

Polskie Towarzystwo Przyrodniców
im. KOPERNIKA



KOSMOS

Błony komórkowe
Fizjologia i farmakologia



Rok 37

WARSZAWA 1988

Numer 2 (199)

PAŃSTWOWE

WYDAWNICTWO

NAUKOWE

POLSKIE TOWARZYSTWO PRZYRODNIKÓW im. KOPERNIKA

ROK 37

NUMER 2 (199)

K O S M O S

Rok założenia 1876



WARSZAWA 1988

PAŃSTWOWE WYDAWNICTWO NAUKOWE

RADA REDAKCYJNA

LESZEK KUŹNICKI (wiceprzewodniczący), WŁODZIMIERZ MICHAŁOW,
WŁODZIMIERZ OSTROWSKI, HENRYK SZARSKI, PRZEMYSŁAW TROJAN,
ADAM URBANEK (przewodniczący), KAZIMIERZ ZIELIŃSKI
sekretarz: JADWIGA KOBUSZEWSKA

KOMITET REDAKCYJNY

BRONISŁAW CYMBOROWSKI, WŁADYSŁAW GOLINOWSKI, ANTONI
HOFFMAN, WŁODZIMIERZ MICHAJŁOW (redaktor naczelny), ALEKSANDRA
PRZEŁĘCKA, KRZYSZTOF STAROŃ, KAZIMIERZ L. WIERZCHOWSKI
(zastępcą redaktora naczelnego), JERZY ŻUK
sekretarz: JADWIGA KOBUSZEWSKA

Adres redakcji: 00-901 Warszawa, Pałac Kultury i Nauki, XIX p.,
Polskie Towarzystwo Przyrodników im. Kopernika
(tel. 20-02-11, wewn. 25-44)

Wydano z pomocą finansową
Polskiej Akademii Nauk

Państwowe Wydawnictwo Naukowe — Warszawa, ul. Miodowa 10

Nakład 1125+105 egz. Ark. wyd. 12,5. Ark. druk. 11,25

Papier druk. mat. III 71 g, B-1.

Oddano do składania 22.II.1988 r. Podpisano do druku 14.IX.1988 r.

Druk ukończono we wrześniu 1988 r.

Zam. 166/88

U-57

Cena zł 190,—

Warszawska Drukarnia Naukowa, Warszawa, ul. Sniadeckich 8

SŁOWO WSTĘPNE

Materia zorganizowana w komórkę, aby żyć, musi być oddzielona od środowiska zewnętrznego specjalną błoną. Struktura ta zapewnia komórce jej integralność, reguluje wzajemną wymianę substancji między nią i otaczającym ją środowiskiem, a także umożliwia odbiór płynących z niego bodźców. Wszelkie więc czynniki środowiskowe, aby zadziałać na żywy ustrój, muszą zetknąć się z błoną komórkową i albo przez nią przeniknąć, albo — swoiście reagując na jej powierzchni — doprowadzić do zmian funkcji wewnątrz tych komórek. Znajomość struktury i fizjologii błony komórkowej (błony plazmatycznej) jest zatem niezbędna dla badaczy zarówno zajmujących się zjawiskami podstawowymi zachodzącymi w komórce, jak i zajmujących się naukami stosowanymi, jak: medycyna, farmakologia, weterynaria, a nawet agrobiologia. Nic też dziwnego, że badania nad różnymi aspektami struktury i funkcji błon komórkowych są intensywnie prowadzone na całym świecie, a postęp w tych badaniach jest tak szybki, że często nasze wiadomości sprzed kilku lat są już niewystarczające. Wobec bogatej literatury przedmiotu i występujących u nas trudności w dostępie do niej, bardzo cennym źródłem informacji są specjalistyczne konferencje. W Polsce corocznie organizowane są tzw. „szkoły biofizyczne” poświęcone tej tematyce. W roku 1987 najnowszym osiągnięciom z tego zakresu poświęcono też jedną z tzw. „farmakologicznych szkół zimowych”. Duże zainteresowanie, jakie wzbudziła tematyka konferencji szczególnie wśród młodszych pracowników naukowych, dało impuls do zaproszenia wykładowców do napisania artykułów, które przybliżyłyby szerszemu gronu biologów najnowsze osiągnięcia badań różnych aspektów anatomii i fizjologii błony komórkowej.

Obecny zeszyt „Kosmosu”, ze względów technicznych, zawiera tylko część tematów omawianych na wspomnianej konferencji. Przedstawione zostały w nim: podstawowe zagadnienia dotyczące struktury i właściwości biofizycznych błony komórkowej, warunkujące wykonywanie jej złożonych funkcji, zagadnienia transportu jonów, oddziaływania różnych związków farmakologicznych z kanałami jonowymi i receptorami bło-

nowymi, działanie neuromediatorów oraz wpływ pobudzenia receptorów na ekspresję genów. Inne zagadnienia, jak: pewne zjawiska jonowe w neuronach, metodyka badań elektrofizjologicznych błony komórkowej, budowa i funkcja receptorów błonowych z uwzględnieniem zjawisk biochemicznych zachodzących w wyniku ich pobudzenia — będą przedstawione w następnym zeszycie „Kosmosu”.

Jerzy Vetulani
Aleksandra Przetęcka

WINCENTY KILARSKI

Instytut Zoologii Uniwersytetu Jagiellońskiego
Kraków

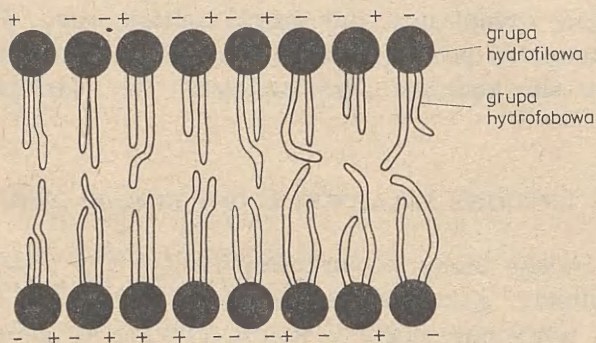
MOLEKULARNA BUDOWA BŁONY KOMÓRKOWEJ

Błona komórkowa jest delikatną, cienką i elastyczną blaszką zamykającą cytoplazmę wraz z jej elementami strukturalnymi. Innymi słowy błona komórkowa jest strukturą, która warunkuje istnienie komórki jako podstawowej jednostki żywej materii. Analiza chemiczna błon komórek eukariotycznych pozwoliła ustalić jej ogólny skład jako lipidowo-białkowy, z dużą domieszką węglowodanów związanych zarówno z drobinami białek, jak i lipidów. Własności fizyko-chemiczne wymienionych składników czynią z błony komórkowej przegrodę między środowiskiem, w szerokim tego słowa znaczeniu, i cytoplazmą. Błona komórkowa umożliwia zatem utrzymanie w komórce materii w stopniu wysokiego uporządkowania, w przeciwieństwie do jej stanu w środowisku pozakomórkowym. Aby utrzymać w komórce stan zgodny z drugim prawem termodynamiki, błona komórkowa tworzy układ zamknięty względnie ograniczony, umożliwiając dopływ energii spoza układu. Błona komórkowa, utrzymując w komórce wysoki stopień organizacji materii, musi spełniać rolę selektywnego pośrednika między komórką i środowiskiem. Między tymi dwoma ośrodkami biegnie w sposób nieprzerwany proces przenoszenia substancji. Zjawisko to może przebiegać na drodze dyfuzji prostej, wspomaganej, transportu aktywnego i wreszcie pinocytozy lub fagocytozy. Błona komórkowa jest ponadto pośrednikiem między środowiskiem i komórką oraz innymi komórkami, nieraz bardzo odległymi. Przekazuje sygnały chemiczne emitowane przez inne komórki do określonych rejonów cytoplazmy lub jądra komórkowego. Jej gatunkowo specyficzna struktura powierzchniowa jest odpowiedzialna za wzajemne rozpoznawanie się komórek „krewniaczych” lub odrzucanie komórek „obcych”.

LIPIDOWE SKŁADNIKI BŁONY KOMÓRKOWEJ

Lipidową frakcję błony komórkowej budują trzy podstawowe grupy lipidów: fosfolipidy, glikolipidy i cholesterol. Ich skład ilościowy, rozmieszczenie i wzajemne stosunki konfiguracyjne są gatunkowo specyficzne, i są różne w różnych rodzajach komórek, a nawet są różne w tych samych typach komórek, ale o różnym położeniu w organizmie.

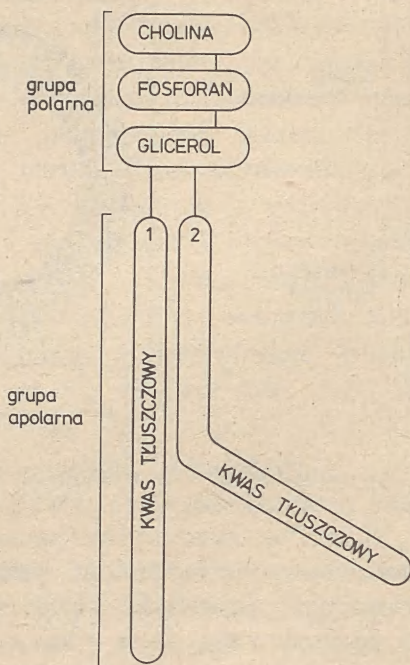
Pod koniec XIX stulecia wielu fizjologów domyslało się istnienia błony komórkowej mimo jej niedostrzegalności w preparatach mikroskopowych. Źródłem tych domysłów było charakterystyczne zachowanie się krwinek lub wodniczek komórek roślinnych w płynach o różnej sile jonowej, wskazujące na istnienie półprzepuszczalnej błony. Prowadząc intensywne obserwacje, głównie na komórkach roślinnych, w roku 1895 Overton stwierdził, że stopień przepuszczalności błony komórkowej dla różnych substancji zależy od ich rozpuszczalności w tłuszczach. Postulował tym twierdzeniem, że błona komórkowa musi być zbudowana z cienkiej warstewki lipidów. Hipoteza Overtona pozostała niezmienną w swojej istotnej treści do dnia dzisiejszego; stanowiła podstawę do badań fizycznych nad molekularną strukturą frakcji lipidowej błony i do zaproponowania pierwszego molekularnego modelu błony komórkowej, zbudowanego wyłącznie z lipidów. Dużą zasługę w wyjaśnieniu organizacji molekularnej lipidów w stosunku do fazy wodnej miała grupa fizyków angielskich: Harkins i Langmuir. Dzięki ich badaniom można było ustalić grubość, warstwowość frakcji lipidowej oraz wzajemne ułożenie poszczególnych drobin lipidowych w stosunku do fazy wodnej. Zgodnie z założeniami modelu lipidowego, błonę komórkową budują dwie warstwy lipidów, których cząsteczki są usytuowane prostopadłe do powierzchni komórki. Części hydrofilowe drobin lipidowych obu warstw są skierowane na zewnątrz błony, tzn. dokomórkowo i dośrodkowo. Części hydrofobowe są natomiast skierowane do wnętrza błony, wiążąc ze sobą obie warstwy za pomocą słabych oddziaływań typu Van der Waalsa. Późniejsze obserwacje błon komórkowych przy zastosowaniu mikroskopu elektronowego oraz analiza ugiętych promieni Roentgena potwierdziły w zasadzie hipotezę o dwulaminarnej strukturze frakcji lipidowej błony komórkowej (rys. 1).



Rys. 1. Pierwszy model błony komórkowej zakładał obecność 2 warstw lipidów. Grupy hydrofilowe skierowane są na zewnątrz błony

AMFIPATYCZNOŚĆ DROBIN LIPIDOWYCH

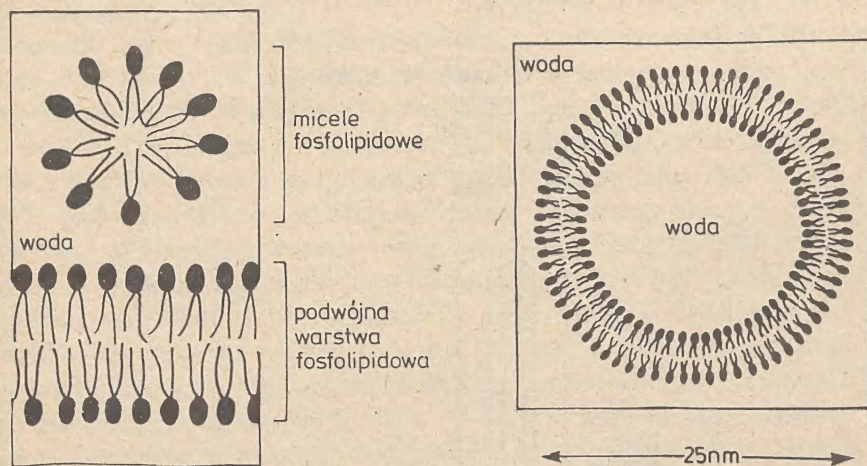
Wszystkie w zasadzie cząsteczki lipidowe wchodzące w skład błony komórkowej mają charakter amfipatyczny. Właściwość tę najlepiej omówić na przykładzie cząsteczki fosfolipidu, podstawowego składnika frakcji lipidowej (55—57%) (rys. 2). Składa się ona z dwóch zasadniczych części:



Rys. 2. Głównym składnikiem frakcji lipidowej błony są fosfolipidy. Ich łańcuchy węglowodorowe (kwasy tłuszczowe) mogą zawierać jedno lub więcej wiązań nienasyconych (łańcuch zagięty)

hydrofilowej, w skład której wchodzi: reszta glicerolu i zasada, np. cholina, oraz hydrofobowej zbudowanej z dwóch łańcuchów węglowodorowych przyłączonych do glicerolu. Łańcuchy węglowodorowe, długości od 14 do 24 atomów węgla, mogą mieć jedno lub kilka wiązań nienasyconych. Amfipatyczność cząsteczek lipidowych określa ich zachowanie się w wodzie. Mogą one tworzyć w roztworach wodnych struktury w zależności od temperatury, siły jonowej i odczynu środowiska wodnego. Struktury lipidowe w środowisku wodnym powstają samorzutnie, tworząc tzw. micelle (struktury sferyczne), dwuwarstwowe struktury laminarne, a w pewnych warunkach dwuwarstwowe pęcherzki — liposomy. We wszystkich prawie przypadkach części hydrofilowe drobin lipidowych są skierowane do środowiska wodnego, podczas gdy części hydro-

fobowe „wiążą” się wzajemnie za pomocą słabych oddziaływań elektrostatycznych. Na utrzymanie tego typu struktur zużywane jest tzw. minimum energii konfiguracyjnej, której wartość wynosi 1—2 Kcal/mol. (rys. 3). W zaraniu powstania życia na Ziemi, amfipatyczne własności



Rys. 3. Częsteczki lipidów są amfipatyczne i w roztworach wodnych tworzą spontaniczne struktury micelarne, dwuwarstwowe i pęcherzykowe

drobin lipidowych umożliwiły prawdopodobnie powstanie samoorganizującej się i samonaprawiającej się otoczki, która oddzielała pierwotną cytoplazmę prakomórek od środowiska. Inne własności fizyczne pierwotnej błony lipidowej, jak płynność, stworzyły idealne warunki do rozpuszczenia w niej białek, które stały się odpowiedzialne za wiele funkcji życiowych komórki.

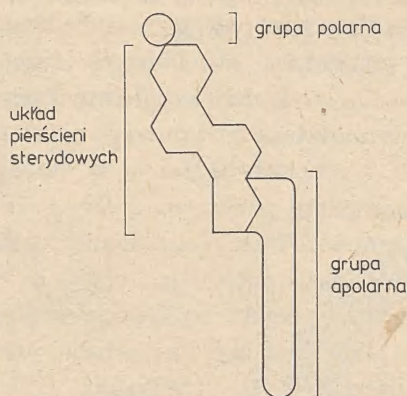
PLYNNOŚĆ WARSTWY LIPIDOWEJ BŁONY

Dwuwarstwowa frakcja lipidowa błony jest strukturą płynną, mającą dwa wymiary. Płynność frakcji lipidowej jest uzależniona od struktury składu jakościowego jej fosfolipidów i obecności cholesterolu. Sztucznie wytworzone błony, zbudowane wyłącznie z jednego rodzaju fosfolipidów mogą wraz z obniżeniem temperatury łatwo zmieniać swój stan płynny w fazę stałą — parakrystaliczną. Można zatem wyobrazić sobie, że dobór naturalny nie popierał organizmów mających błony komórkowe zbudowane z homogennej frakcji lipidowej. Taka bowiem błona może przejść w stan żelu bardzo łatwo wraz z nieznacznym nawet obniżeniem temperatury środowiska. Frakcja lipidowa błony komórkowej

wej jest zbudowana z mieszaniny wielu rodzajów fosfolipidów, których temperatura tzw. „przejścia fazowego”, czyli zmiany stanu płynnego w stan krystaliczny, jest różna dla różnych typów fosfolipidów. Jest bardzo prawdopodobne, że w frakcji lipidowej błon organizmów zmienneociepnych istnieje dynamiczna równowaga między różnymi grupami drobin fosfolipidowych, z których jedne są w stanie przejścia fazowego, inne zaś nie, a ich zachowanie przypomina kry lodu pływającego w wodzie. Bezpośrednio płynność frakcji lipidowej błony zależy od ruchliwości samych cząsteczek fosfolipidów, jak również ich łańcuchów węglowodorowych. Cząsteczki lipidowe wykonują ruchy rotacyjne dookoła swojej osi, mogą się przemieszczać wzajemnie w jednej płaszczyźnie (dyfuzja boczna) z bardzo dużą szybkością (10^7 razy/1 sek.), mogą wreszcie wymieniać się wzajemnie, z warstwy do warstwy (flip-flop). Ruchy wymienne są sporadyczne i bardzo powolne; zachodzą z prędkością 1 cząsteczki na 14 dni. Szybka bowiem wymiana cząsteczek między warstwami byłaby dla komórki ze wszech miar niekorzystna. Błona komórkowa musi zachować asymetryczność. Ruchy łańcuchów kwasów tłuszczowych zależą od ich długości oraz ilości wiązań nienasyconych. Łańcuchy węglowodorowe mające jedno lub kilka wiązań podwójnych są bardzo ruchliwe i luźniej upakowane w przeciwieństwie do łańcuchów pozbawionych wiązań *cis*. Błony komórkowe, zależnie od typu komórki oraz warunków termicznych w których żyje organizm, mają różny stosunek ilościowy lipidów nasyconych i nienasyconych. Określone dla każdego rodzaju błony komórkowej proporcje w składzie lipidów są zapewne uwarunkowane genetycznie i prawdopodobnie powstały pod termiczną presją środowiska.

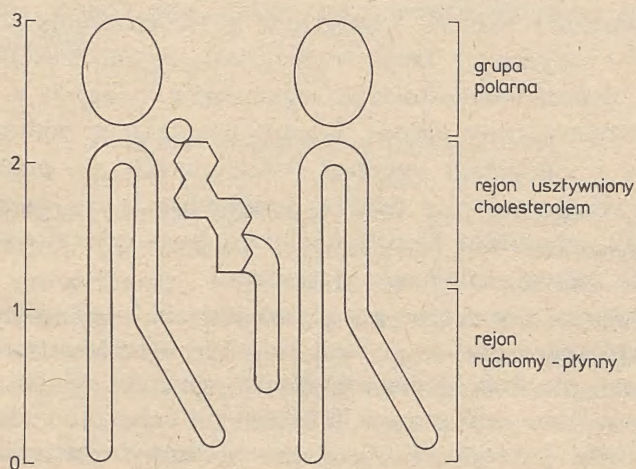
Błony komórkowe bakterii żyjących w gorących źródłach mają przewagę lipidów o nasyconych łańcuchach alifatycznych. Stosunki przeciwne panują w błonach komórkowych organizmów żyjących w fizjologicznie niskich temperaturach. Błony komórkowe tkanek budujących kończyny reniferów, wprawdzie zwierząt stałocieplnych, ale przeżywających surowe zimy, zbudowane są z lipidów mających głównie kwasy tłuszczowe nienasycone, natomiast błony podobnych komórek, ale wchodzących w skład tkanek głowy zwierzęcia, przeciwnie.

Rolę regulacyjną i stabilizującą płynność frakcji lipidowej błony komórkowej spełniają cząsteczki cholesterolu rozmieszczone między łańcuchami alifatycznymi fosfolipidów. Błony komórkowe eukariotów zawierają stosunkowo dużo cholesterolu (17—25%). Cholesterol jest cząsteczką amfipatyczną (rys. 4). Jego polarna grupa hydroksylowa umiejscawia się u podstawy części hydrofilowej cząsteczki fosfolipidu, sztywna sterydowa część cząsteczki sąsiaduje z górnymi odcinkami łańcuchów alifatycznych



Rys. 4. Cząsteczka cholesterolu ma również charakter amfipatyczny, a jej poszczególne odcinki różny stopień ruchliwości (sztywności)

fosfolipidów, natomiast boczny hydrofobowy, bardziej ruchliwy łańcuch węglowodorowy leży w pobliżu dolnej strefy łańcuchów alifatycznych (rys. 5). Cząsteczki cholesterolu częściowo usztywniają górne warstwy hydrofobowe fosfolipidów, rozluźniając równocześnie dolne warstwy hydrofobowe. Rozmieszczenie drobin cholesterolu między łańcuchami alifatycznymi fosfolipidów rozdziela je, zapobiegając tym samym ich ewentualnemu przejściu w stan żel przy niekorzystnych warunkach termicznych.



Rys. 5. Obecność i odpowiednie rozmieszczenie cząsteczek cholesterolu w frakcji lipidowej błony zapewnia jej półpłynne właściwości

Mechanizmy zapobiegające utracie płynności frakcji lipidowej błony należy zaliczyć do fundamentalnych „zdobyczy” w procesie ewolucji komórki i organizmów. Obniżenie bowiem płynności błony, w warunkach doświadczalnych, manifestuje się natychmiast przerwaniem procesów transportu, aktywności enzymów błonowych i lizą komórki. Stan ten można jednak odwrócić przez wprowadzenie cholesterolu.

ASYMETRIA FRAKCJI LIPIDOWEJ BŁONY

W skład frakcji lipidowej błon komórek eukariota wchodzi duża różnorodność fosfolipidów. Cztery najczęściej występujące to: fosfatydylocholina, sfingomielina, fosfatydyloseryna i fosfatydyloetanolamina. Rozmieszczenie tych czterech fosfolipidów jest ściśle określone; i tak w warstwie zewnętrznej — dośrodkowskiej — występują fosfolipidy cholinowe (fosfatydylocholina i sfingomielina), natomiast fosfolipidy aminowe (fosfatydyloseryna i etanolamina) lokalizują się w wewnętrznej — dokomórkowej — warstwie lipidowej. Przedstawione rozmieszczenie czterech głównych fosfolipidów zapewnia pełną asymetrię błony komórkowej. Fosfolipidy cholinowe mają mniej nasycone łańcuchy kwasów tłuszczowych, a ich grupy polarne są obojętne. Natomiast fosfolipidy aminowe mają bardziej nasycone łańcuchy alifatyczne, a grupa hydrofilowa fosfatydyloseryny jest naładowana ujemnie. W wyniku takiego rozmieszczenia fosfolipidów obserwujemy istotną różnicę między obu warstwami zarówno pod względem rozmieszczenia ładunków ujemnych, jak również stopnia płynności jednej z warstw. Asymetria błony komórkowej jest trwała, gdyż jak wspomniano, ruchy wymienne (flip-flop) cząsteczek między warstwami zachodzą stosunkowo rzadko. Asymetria błony jest funkcjonalnie istotna dla właściwego rozlokowania białek, które również rozmieszczone są asymetrycznie. Powstaje ona bardzo wcześnie w procesie syntezy błony komórkowej w siateczce śródplazmatycznej, najprawdopodobniej przy udziale jakiegoś układu enzymatycznego, który przemieszcza poszczególne drobinę zapewniając trwałą asymetrię lipidowej części błony komórkowej. Asymetria lipidowej frakcji błony komórkowej jest dodatkowo podkreślona obecnością glikolipidów. Glikolipidy są pochodnymi sfingozyny — 18-węglowego alkoholu aminowego. Zbudowane podobnie jak sfingolipidy z tą różnicą, że nie mają grupy fosforanowej i jeden wodór w grupie aminowej jest podstawiony długim łańcuchem kwasu tłuszczowego. Natomiast wodór grupy hydroksylowej sfingozyny podstawiony jest cukrem prostym, np. galaktozą (galaktocerebrozyd). Glikolipidy, jak wynika z ich budowy, są cząsteczkami amfipatycznymi i lokalizują się wyłącznie w zewnętrznej warstwie lipidowej. Jedną z najbardziej rozpowszechnionych grup glikolipidów jest grupa lipidów obojętnych. Mają one od 1 do 15 obojętnych reszt cukrowych przyłączo-

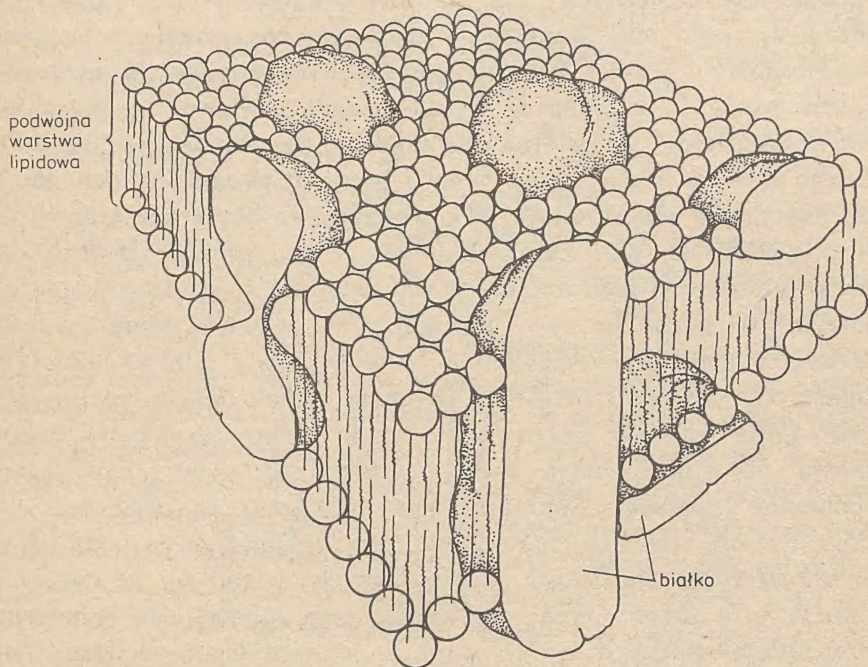
nych do ich części polarnych. Dzięki możliwości przyłączenia tak dużej ilości różnych cukrów do cząsteczki powstaje bardzo dużo kombinacji lipidowo-tłuszczowych, a co za tym idzie, bardzo wiele rozmaitych glikolipidów charakterystycznych nie tylko dla danego gatunku organizmu, ale również dla rozmaitych typów komórek. Najprostszym, bo mającym tylko jedną cząsteczką cukru — galaktozę — i najbardziej rozpowszechnionym glikolipidem jest galaktocerebrozyd. Należy on do grupy glikolipidów obojętnych. Występuje wyłącznie w błonie komórkowej limfocytów — komórek wytwarzających osłonkę mielinową aksonu. Duża zawartość cerebrozydu w błonie osłonki mielinowej (40%) wskazuje na ewentualne izolujące własności tego glikolipidu. Glikolipidy kwasne, noszące jeden ładunek ujemny, należą do glikolipidów złożonych, gangliozydów. W swojej grupie cukrowej mają jedną lub kilka reszt kwasu sjałowego — N-acetyleneuraminowego, w skrócie NANA. Ten właśnie kwas ma jeden ładunek ujemny przy grupie COO^- . W przeciwieństwie do galaktocerebrozydów, gangliozydy występują głównie w błonach komórkowych neuronów (6%), co nie oznacza, że nie można ich znaleźć również w błonach komórkowych innych komórek, lecz w bardzo małych ilościach. Mając na uwadze dużą różnorodność składu reszt cukrowych, udało się wyodrębnić około 30 rodzajów glikolipidów i nadać im odpowiednie oznaczenia np. G_{M1} , G_{M2} , G_{M3} , G_{D1} , G_{T1} . Oznaczają one ile reszt kwasu sjałowego zostało włączonych do cząsteczki glikolipidu (mono, di, tri), natomiast następująca po literze M, D lub T cyfra określa różnicę od 5 reszt cukrów obojętnych. Na przykład, gangliozyd oznaczony symbolami G_{M1} ma jedną resztę kwasu sjałowego i cztery reszty cukrowe obojętne ($5 - 4 = 1$). Niezmierne bogactwo glikolipidów, ich charakterystyczna lokalizacja oraz gatunkowa i komórkowa specyfika wskazują, że muszą one spełniać niepoślednią rolę w błonie komórkowej. Natomiast nasza wiedza o ich roli jest, jeżeli nie żadna, to w każdym razie bardzo skąpa. Trudno sobie wyobrazić, że tak wyspecjalizowane i zróżnicowane drobiny były wyłącznie tolerowane przez dobór naturalny, nie spełniając istotnej dla komórki funkcji. Wiadomo, że niektóre z glikolipidów mają własności receptorowe, wiążąc pewne toksyny bakteryjne, np. G_{M1} błony komórkowej nabłonka śluzówki jelita wiąże toksyny cholery. Nie sposób wyobrazić sobie, że jest to jedyna funkcja G_{M1} , a gdyby tak było, to zostałby on w drodze ewolucji wyeliminowany przez dobór naturalny, przynajmniej z błon komórek nabłonka śluzówki przewodu pokarmowego. Prawdopodobnie jest to zjawisko wtórne i powstałe dzięki podobieństwu chemicznemu toksyny do innego białka, dla którego ten glikolipid jest receptorem. Istnieją przypuszczenia, że glikolipidy mogą spełniać rolę receptorów odbierających sygnały chemiczne innych komórek.

Obeenie, w dobie przeciwciał monoklonalnych, istnieją olbrzymie możliwości prowadzenia analiz czynnościowych poszczególnych drobin i być może już wkrótce glikolipidy odkryją swoją tajemnicę.

BIAŁKOWE SKŁADNIKI BŁONY KOMÓRKOWEJ

Białka błony komórkowej są dużymi drobinami i, niejednokrotnie, kilkaset razy przewyższają swoją wielkością drobinę lipidów. Na jedną cząsteczkę białka przypada średnio pięćdziesiąt cząsteczek lipidów. Białka są głównym składnikiem czynnościowym błony komórkowej. Są odpowiedzialne za wiele czynności życiowych, głównie za różne typy transportu substancji w obie strony: do komórki i z komórki. Pełnią rolę receptorów dla wielu substancji, jak również budują swojego rodzaju mikroszkielet błony komórkowej. Białka są rozpuszczone w płynnej fazie lipidowej błony i w wielu przypadkach mogą się swobodnie przemieszczać w jej płaszczyźnie. Na początku naszego stulecia, a nawet jeszcze w jego latach sześćdziesiątych, konstruowano różne modele błony komórkowej, w których frakcję białkową umieszczano na powierzchni frakcji lipidowej, po obu jej stronach. Wynikało to z obserwacji napięcia powierzchniowego sztucznych błon lipidowo-białkowych oraz samej błony komórkowej. Było ono stosunkowo niskie w porównaniu z napięciem powierzchniowym czystej frakcji lipidowej. Proponowano również modele alternatywne, w których zastąpiono ciągłą warstwę lipidową strukturami micelnymi. Te ostatnie nie wytrzymały jednak krytyki; z elektrycznego punktu widzenia nie mogły bowiem spełniać warunków wysokiej impedancji elektrycznej, jaką wykazywała błona komórkowa. Całkiem przypadkowo, pierwsze modele błony komórkowej znalazły duże poparcie w obrazach błon komórkowych oglądanych w mikroskopie elektronowym. Widoczna na tych obrazach trójlaminarna struktura całkowicie odpowiadała wyobrażeniom o budowie błony komórkowej i błon biologicznych w ogóle ówczesnym twórcom modeli molekularnych. Elektronowo gęste warstwy zewnętrzne i mniej elektronowo gęsta warstwa środkowa miały odpowiadać komponentom białkowym i hydrofobowej komponentce lipidowej. Reprezentowny pogląd, nota bene dość powszechny, był dla wielu biologów trudny do przyjęcia ze względu na zbyt duże uproszczenie stosunków molekularnych. Niemniej jednak, model ten służył nam przez niemal pół wieku, jako roboczy, do konstruowania morfofizjologicznych modeli struktur komórkowych. W latach pięćdziesiątych Robertson zaproponował koncepcję tzw. „jednostki elementarnej błony”. Koncepcja Robertsona dotyczyła wszystkich błon biologicznych i zakładała ich strukturalną jednolitość. Istotny przełom w

pojmowaniu molekularnej organizacji błony komórkowej, a przede wszystkim w zrozumieniu przestrzennego stosunku białek do lipidów, nastąpił po wprowadzeniu kriorytownictwa jako metody morfologicznej i metody rozdzielania białek drogą elektroforezy na żelu poliakrylamidowym. Pierwsza metoda polegała na zamrażaniu błon w temperaturze ciekłego azotu (-196°C), a następnie rozłupaniu zamrożonego preparatu i wykonaniu z niego repliki komplementarnej, którą następnie fotografowano w mikroskopie elektrónowym i analizowano przy użyciu aparatu stereoskopowego. Druga metoda polegała na wymywaniu roztworami wodnymi białek z błon, a następnie rozdzielaniu mieszaniny białek metodą elektroforezy na żelu poliakrylamidowym. Metoda ta pozwala określić ciężary cząsteczkowe poszczególnych białek, lub szybkości migracji zależnej od ładunku elektrycznego cząsteczek. Metodą kriorytowniczą można było stwierdzić, że białka w formie 8 nm ziarn są rozproszone w fazie lipidowej w sposób mniej więcej przypadkowy i nie są ograniczone wyłącznie do powierzchni frakcji lipidowej (rys. 6). Obrazy błon komórkowych przygotowane opisaną metodą przedstawiają wnętrze dwulaminarnej frakcji lipidowej. Zamrażane błony poddane siłom roz-



Rys. 6. Współcześnie przyjęty model błony komórkowej, zgodnie z propozycją Singera i Nicolsona, zakłada mozaikowe rozmieszczenie białek w płynnej fazie lipidowej

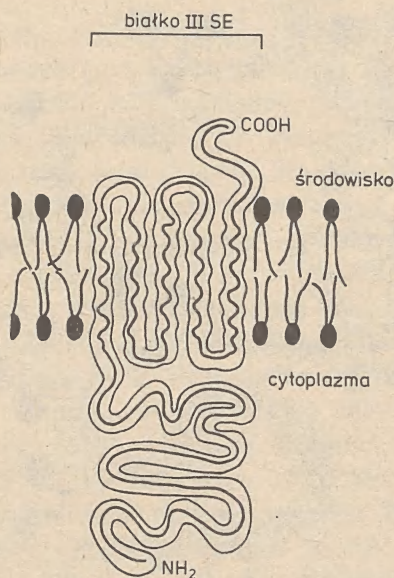
rywającym pękają w miejscach najslabiej związanych, tzn. w środkowej płaszczyźnie, gdzie spotykają się końce łańcuchów kwasów tłuszczowych, odsłaniając zamrożone w niej drobiny białek.

BIĄŁKA INTEGRALNE I POWIERZCHNIOWE

Duża część białek błony komórkowej ma charakter amfipatyczny i jest częściowo związana hydrofobowo z apolarną częścią lipidowej frakcji błony komórkowej. Można się było o tym przekonać wymywając białka z błony przy użyciu roztworów wodnych. Okazało się jednak, że tylko część białek można wymyć roztworami wodnymi i te białka nazwano powierzchniowymi, gdyż są one związane z polarnymi grupami frakcji lipidowej lub innych białek. Pozostała część białek wymywa się z błony komórkowej dopiero po zastosowaniu specjalnych detergentów jonowych lub niejonowych, jak siarczan dodecyłu sodu (SDS) lub tryton X-100. Te białka nazwano białkami integralnymi. Są one związane hydrofobowo z apolarnymi grupami lipidowej frakcji błony komórkowej. Białka integralne są białkami amfipatycznymi. W części apolarnej frakcji lipidowej nie ma wody, w związku z tym łańcuchy polipeptydowe przebiegające przez część apolarną zachowują konfigurację α lub β -helisy w celu wykorzystania swoich grup polarnych do wytworzenia wzajemnych wiązań wodorowych, które w środowisku wodnym wiązałyby się z jej cząsteczkami. Większość białek amfipatycznych przechodzi przez wszystkie trzy rejony frakcji lipidowej: polarny-apolarny-polarny. Są to tzw. białka transmembranowe. Hydrofobowe odcinki ich łańcuchów polipeptydowych mogą się wielokrotnie fałdować w strefie hydrofobowej frakcji lipidowej. Jak już wspomniano, białka integralne nie wymywają się z błony za pomocą roztworów wodnych, ponieważ roztwory te nie rozpuszczają frakcji lipidowej. Wspomniane detergenty, które są cząsteczkami amfipatycznymi, rozpuszczają frakcję lipidową błony i wymywając z niej białka integralne wiążą się swoimi częściami hydrofobowymi z hydrofobowymi odcinkami białek; tym samym spełniają jak gdyby rolę rozpuszczonej i zdeintegrowanej frakcji lipidowej. Po usunięciu detergentu białka integralne precypitują i są nierozpuszczalne w roztworach wodnych. Z tego powodu rozdział elektroforetyczny tych białek musi się prowadzić w obecności jednego z detergentów. Metodą rozdziału elektroforetycznego można było wykryć około 50 rodzajów białek, z czego zaledwie kilka jest lepiej poznanych pod względem ich składu i sekwencji aminokwasowej. Głównie poznano białka błon erytrocytów. Było to możliwe dzięki łatwości izolowania czystych błon z dużej ilości krwinek. W przypadku innych komórek zarówno izolowanie ich błon komórkowych w czystej postaci, jak również poży-

skanie dużej ilości homogennej masy komórkowej napotyka na wiele trudności.

Jednym z lepiej poznanych białek powierzchniowych błony komórkowej krwinek czerwonych jest spektryna. Jest to duże białko występujące jako dimer (240 i 220 kD) w postaci włóknistej. Pod względem ilościowym stanowi ona 30% wszystkich białek błonowych. Spektryna jest zlokalizowana w części hydrofilowej frakcji lipidowej i wyeksponowana do cytoplazmy, gdzie tworzy przestrzenną siateczkę powiązaną z filamentami aktynowymi oraz innym białkiem błonowym, glikoforyną, za pomocą białka ankyryny. Aktynowo-spektrynowy szkielet zapewnia komórkom kształt i elastyczność. Spektryny występują prawie wyłącznie w błonie erytrocytów, jakkolwiek podobne jej białka wykryto również w błonie innych komórek. Przykładem białka integralnego może być glikoforyna. Jest to białko małe (30 kD), ale mające bardzo dużą pod względem masy komponentę cukrową. Stanowi ona około 60% masy drobin białka i składa się na nią około 100 reszt cukrowych, w tym 90% to reszty kwasu sialowego noszące ładunek ujemny. Glikoforyna jest białkiem amfipatycznym zbudowanym ze 131 reszt aminokwasowych. Środkowa część łańcucha, około 20 aminokwasów związanych w formę α -heliksy, jest hydrofobowo połączona z apolarną frakcją lipidową. Pozostała część łańcucha polipeptydowego przebiega przez części polarne frakcji lipidowej i wystercza do cytoplazmy — około 40 aminokwasów z C-końcem oraz do środowiska — około 70 aminokwasów z N-końcem. Wszystkie reszty cukrowe związane są z N-końcową częścią glikoforyny (rys. 7). Funkcja glikoforyny jest nieznana. Występuje wyłącznie w błonach erytrocytów, jakkolwiek są znane przypadki, w których znaleziono krwinki czerwone z błoną pozbawioną glikoforyny i funkcjonujące normalnie. Trzecim białkiem błonowym, którego strukturę, a tym samym funkcję względnie dobrze znamy, jest tzw. białko trzeciego szczytu elektroforetycznego (3 SE). Podobnie jak glikoforyna, białko 3 SE należy do klasy białek transmembranowych. Jest to dimer o ciężarze 100 kD zbudowany z około 800 reszt aminokwasowych. Główna część łańcucha polipeptydowego jest związana hydrofobowo z odpowiednim rejonem frakcji lipidowej. W części apolarnej cząsteczki łańcuch polipeptydowy fałduje się wielokrotnie, przenikając pięciokrotnie przez warstwę apolarną frakcji lipidowej. Część z C-końcem wystająca do środowiska jest bardzo krótka i wiąże kilka reszt cukrowych, natomiast znacznie dłuższa część z N-końcem zanurzona jest w cytoplazmie komórki. Białko 3 SE spełnia rolę „kanału” dla jonów HCO_3^- i Cl^- . Jony te powstają w procesie wymiany gazowej między erytrocytami i plazmą krwi. Można się było o tym przekonać blokując wybiórczo białko 3 SE znakowanym inhibitorem, który hamował transport jonów HCO_3^- i Cl^- .



Rys. 8. Białko 3 szczytu elektroforetycznego jest również białkiem „transmembranowym”. Jego hydrofobowa część łańcucha jest kilkakrotnie sfalowana we frakcji lipidowej błony

przylączając się do białka 3 SE. Transport wspomnianych jonów przebiega zgodnie z gradientem stężeń najprawdopodobniej między fałdami łańcucha polipeptydowego, które w obrębie warstwy apolarnej lipidów tworzą kanały hydrofilowe o odpowiedniej średnicy i ładunkach (rys. 8).

CZĘŚĆ CUKROWA BŁONY KOMÓRKOWEJ

Oprócz komponenty lipidowej i białkowej w błonach komórkowych wszystkich eukariotów występują rozmaite wielocukry w kompleksach z białkami, jako glikoproteiny, i w połączeniu z lipidami, jako glikolipidy. Większość białek wyeksponowanych na zewnątrz błony komórkowej, dośrodkowoko, jest związana z kompleksami cukrów prostych. Wągowo węglowodany stanowią od 2 do 10% masy błony komórkowej. Obecność cukrów na zewnętrznej powierzchni błony komórkowej podnosi znacznie jej asymetryczność. Ogólnie znanych jest około 100 różnych cukrów prostych, ale zaledwie 9 występuje w błonach komórkowych. Są to: galaktoza, glukoza, glukozamina, galaktozamina, fukoza, mannoza i kwas sjałowy. Ten ostatni zajmuje zazwyczaj końcową pozycję w bocz-

nych łańcuchach, eksponując swój ujemny ładunek. Tym samym kwas sjałowy jest odpowiedzialny głównie za ujemne naładowanie błon komórkowych, które, między innymi, charakteryzuje komórki eukariotów. Warstwę cukrową, pokrywającą powierzchnię komórki nazwano glikokaliksem (słodką łupiną). Można ją łatwo zobaczyć w mikroskopie elektronowym, wybarwiając komórki odpowiednimi barwnikami, np. czerwienią rutenu. Można również przeprowadzić odpowiednią reakcję histochemiczną, która polega na przyłączeniu przez reszty cukrowe lektyn roślinnych, np. konkanawaliny A. Glikoproteiny powierzchniowe są silnie uwodnione, ich cząsteczki nie stanowią istotnej zaporę dla transportu większości substancji ważnych dla życia komórki. Jedynie cząsteczki o dużej masie, większe od 60 kD, są przez warstwę glikoproteinową zatrzymywane i nie dochodzą bezpośrednio do powierzchni błony komórkowej.

Grubość warstwy cukrowej, a ściślej mówiąc glikoproteinowej, zależy od wielu czynników. Pomijając już specyficzność gatunkową i komórkową, grubość jej zależy od stanu fizjologicznego komórki. Udało się wykazać, że komórki zmienione nowotworowo mają istotnie grubsza warstwę białkowo-cukrową od wyjściowych komórek normalnych. Zarówno skład cukrowy klikokaliksu, jak i jego grubość jest uwarunkowana genetycznie i może być również tą drogą zmieniona. Komórki transformowane wirusem DNA produkują grubsza otoczkę węglowodanową i o zmienionym składzie chemicznym.

Charakterystyczne cechy otoczki glikoproteinowej, jej unikalne rozmieszczenie ograniczone wyłącznie do powierzchni komórki, wrażliwość na zmiany w genomie komórki sugerują, iż spełnia ona bardzo ważną funkcję we wzajemnym rozpoznawaniu się komórek: tworzenie kontaktu i łączenie się w zespoły tkankowe. Jeżeli bowiem pozbawimy komórki tej otoczki przez traktowanie enzymem, np. trypsyną, komórki tracą kontakt ze sobą i tkanki rozsypują się. Warstwa glikolipidowa szybko jednak się regeneruje, jeżeli wypłuczemy trypsynę lub zablokujemy jej działanie. Po „odrodzeniu” się warstewki glikoproteinowej rozproszone komórki ponownie agregują w zespoły. Dzięki istnieniu charakterystycznego dla każdego gatunku składu chemicznego otoczki glikoproteinowej, komórki układu limfatycznego odróżniają komórki izogenne — własne genetycznie podobne, od komórek ksenogennych — obcych genetycznie. Własność rozpoznawania się komórek ma istotne znaczenie w przeszczepianiu tkanek. Zgodność tkankowa występuje jedynie w przypadku, gdy komórki dawcy i biorecy mają identyczne antygeny powierzchniowe (izoantygeny), którymi są specyficzne kompleksy cukrowo-białkowe lub glikolipidowe błony komórkowej.

LITERATURA ZALECANA W JĘZYKU POLSKIM I CYTOWANA

1. De Robertis E. D. P., Nowiński W. W., Saez F. A. — *Biologia komórki*. PWN, Warszawa, 1974.
2. Gardas A. — *Sfingolipidy błony komórkowej*. Post. Bioch. 24: 309—331. 1978.
3. Giese A. C. — *Fizjologia komórki*. PWN, Warszawa, 1985.
4. Jasiński A., Kilarski W. — *Ultrastruktura komórki*. WSiP, Warszawa, 1984.
5. Kawiak J., Mirecka J., Olszewska M., Warchoń J. — *Podstawy cytofizjologii*. PWN, Warszawa, 1985.
6. Kileczewska D., Farbiszewski R. — *Biogeneza i degradacja glikoproteidów błon plazmatycznych eukariontów*. Post. Biol. Kom. 7: 69-86, 1980.
7. Kosk-Kosicka D. — *Charakterystyka błony komórkowej mięśni szkieletowych*. Post. Biol. Kom. 8: 259-276, 1981.
8. Michałak M., Sarzała M. G. — *Asymetria błon biologicznych*. Post. Bioch. 23: 523-540, 1977.
9. Ostrowski K., Kawiak J. — *Cytofizjologia*. PZWL, Warszawa, 1985.
10. Palamarczyk G. — *Glikozylacje białek w układach eukariotycznych*. Post. Bioch. 24: 443-460, 1978.
11. Przestalski S. — *Błony biologiczne*. Wiedza Powszechna, Warszawa, 1983.
12. Zborowski J. — *Wymiana fosfolipidów pomiędzy błonami biologicznymi*. Post. Bioch. 23: 541-558, 1977.
13. Harkins W. D., Alexander A. E. — *Determination of surface and interfacial tensions*. W: *Physical methods in organic chemistry*. A. Weissberger (red.), Interscience, New York, Part I, str. 797-804, 1959.
14. Langmuir I. — *The constitution and fundamental properties of solids and liquids. II. Liquids*. J. Amer. Chem. Soc. 37: 1848, 1917.
15. Overton E. — *Beiträge zur allgemeinen Muskel- und Nervenphysiologie*. Arch. Physiol. 92: 115-280, 1902.
16. Robertson J. D. — *The ultrastructure of cell membranes and their derivatives*. Biochem. Soc. Symp. 16: 3, 1959.
17. Singer S. J., Nicolson G. L. — *The fluid model of the structure of cell membranes*. Science 175: 720, 1972.

STANISŁAW PRZESTALSKI

Akademia Rolnicza
Wrocław

BIOFIZYKA BŁON

STRUKTURA BŁONY I JEJ FUNKCJE

Biofizyka błon biologicznych obejmuje wiele problemów związanych zarówno ze strukturą błon, jak i z jej funkcjami. Wynika to z jednej strony z określenia biofizyki jako dyscypliny naukowej, która zajmuje się badaniami zjawisk fizycznych w układach żywych, jak i z faktu, że w błonie komórkowej będącej elementem składowym każdej żywej komórki zachodzą różnorodne procesy fizyczne, a sama błona ma strukturę ciekłokrystaliczną. Oczywiście trudno jest w praktyce oddzielić rygorystycznie problematykę biofizyczną od biochemicznej i w dalszym ciągu, eksponując aspekty biofizyczne, nie będziemy abstrahować od koniecznych odniesień biochemicznych.

Błona komórkowa odgranicza i chroni wnętrze komórki od ośrodka zewnętrznego, dzięki czemu komórka może zachować swoją indywidualność. Równocześnie błona, dzięki swoim szczególnym właściwościom zapewnia regulowany kontakt ze światem zewnętrznym. Błony biologiczne (a więc błony komórkowe i błony organelli komórkowych) biorą udział we wszystkich prawie przejawach aktywności komórek. Regulują one procesy transportu substancji (np. cząstek pożywienia, jonów i leków) z ośrodka zewnętrznego do wnętrza komórki i w stronę przeciwną (np. produktów rozkładu); decydują o powstawaniu elektrycznych napięć spoczynkowych i czynnościowych (i w konsekwencji o rozchodzeniu się impulsów nerwowych), biorą udział w przemianach energetycznych (np. skurcz mięśnia, fosforylacja oksydacyjna), wpływają na szybkość reakcji metabolicznych i na rozkład stężeń w przedziałach komórkowych, umożliwiając równocześnie zachodzenie konkurencyjnych reakcji chemicznych, są zaangażowane w przenoszeniu informacji, rozpoznawaniu się komórek i ich fuzji.

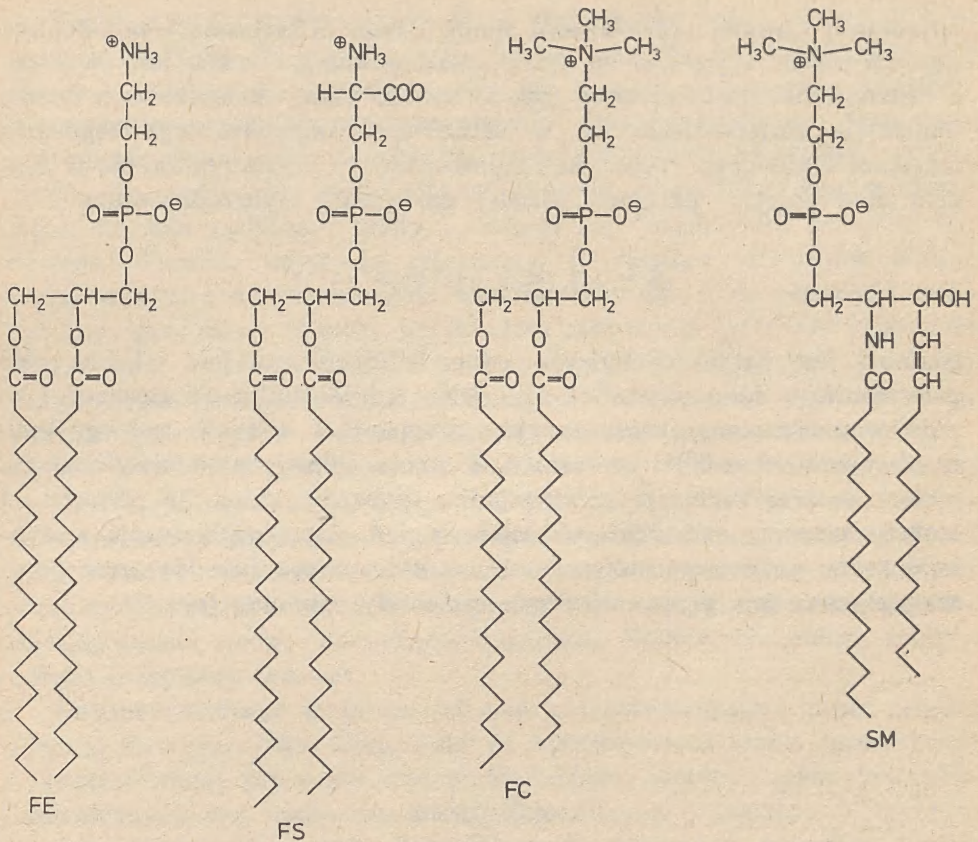
Wszystkie te funkcje błon są związane ze strukturą błony i jej składem chemicznym (lipidy, białka, węglowodany, woda). Zrozumienie fizjologicznej roli błon sprowadza się przede wszystkim do zrozumienia

fizycznych praw, które rządzą molekularną organizacją błon, ponieważ struktura i funkcje błon są ze sobą powiązane.

Pierwsze, w pełni biofizyczne doświadczenie, dzięki któremu udało się opisać strukturę warstwy lipidowej w błonie pochodzi od Gorter a i Grendela [9]. Wykazali oni, że lipidy wyekstrahowane ze znanej liczby erytrocytów ludzkich tworzą na powierzchni wody warstwę monomolekularną o powierzchni mniej więcej dwukrotnie większej od powierzchni krwinek czerwonych, z których lipidy zostały pobrane. Na tej podstawie przyjęto pogląd, który jest w zasadzie do dzisiaj uznawany, że lipidy w błonie są zorganizowane w postaci warstwy dwumolekularnej. Wkrótce potem Danielli i Dawson [5] zaproponowali znany lipidowo-białkowy model błony komórkowej, w którym dwumolekularna warstwa lipidowa jest pokryta z obu stron powierzchniowymi białkami globularnymi; model ten, nieco modyfikowany, przetrwał do początku lat siedemdziesiątych. W roku 1972 Singer i Nicolson [25] zaproponowali nowy model błony, mianowicie model płynnej mozaiki, który w zasadzie jest akceptowany do chwili obecnej. Model ten charakteryzuje się trzema cechami odróżniającymi go od modelu Danielliego-Dawsona: 1) występowaniem białek integralnych niezależnie od białek powierzchniowych, 2) asymetrią w rozmieszczeniu różnych rodzajów lipidów i białek między obiema częściami dwumolekularnej warstwy lipidowej, 3) płynnością.

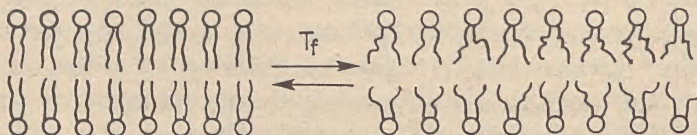
Na przykład, czterema głównymi fosfolipidami błon komórek erytrocytów ludzkich są: fosfatydyloetanolamina, fosfatydyloseryna, fosfatydylocholina zwana lecytyną i sfingomielina; są one przedstawione na rys. 1. Jak wskazuje doświadczenie rozkład tych lipidów w błonie erytrocytarnej charakteryzuje się tym, że w warstwie zewnętrznej błony przeważają fosfatydylocholina i sfingomielina (zawierające w części polarnej grupę cholinową), a w warstwie wewnętrznej, stykającej się z cytoplazmą, występują głównie fosfatydyloetanolamina i fosfatydyloseryna (zawierające w części polarnej grupę aminową). Podobnie wygląda sprawa z białkami, które również rozmieszczone są asymetrycznie.

Pojęcie płynności błony zostało zasugerowane już wcześniej przez Chapmana i wsp. [2] w celu wyjaśnienia stwierdzonych szybkości dyfuzji i procesów metabolicznych. Poparciem dla tej koncepcji były obserwacje z doświadczeń wykonanych za pomocą bardzo różnorodnych i przycyjnnych metod fizycznych. Należały do nich m.in. wyniki badań rentgenowskich Luzzatiego i wsp. [18] oraz badania wykorzystujące metodę magnetycznego rezonansu jądrowego i mikrokalorymetrii. Wykazano, że w określonej temperaturze T_f , dla danego rodzaju lipidu dochodzi do przejścia fazowego ze stanu stałego (stan żelu) do stanu płynnego (ciekłokrystalicznego), w którym łańcuchy alkilowe znajdują



Rys. 1. Cztery rodzaje fosfolipidów, których jest najwięcej w błonach ludzkich krwinek czerwonych (FE — fosfatydyloetanoloamina, FS — fosfatydyloseryna, FC — fosfatydylocholina, SM — sfingomielina)

się w stanie nieuporządkowanym (rys. 2), przy czym przemiana ta jest odwracalna. To topnienie łańcuchów kwasów tłuszczowych, czy też — mówiąc inaczej — przejście „porządek-nieporządek” prowadzi do oscylacyjnego i rotacyjnego ruchu łańcuchów oraz do ruchu całych cząsteczek lipidowych w powierzchni błony (co często nazywa się dyfuzją lateralną). Ruch łańcuchów lipidowych jest właśnie przyczyną płynności warstw dwumolekularnej. Płynność błon mierzy się obecnie m.in. metodą elektronowego rezonansu paramagnetycznego stosując tzw. sondy

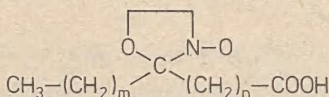


Rys. 2. Przejście „porządek-nieporządek”; T_f — temperatura przejścia fazowego

(znaczniki) spinowe. Przykładem sondy spinowej jest sonda zawierająca łańcuch kwasu tłuszczowego, gdzie część paramagnetyczna jest związana z żądanym węglem łańcucha (np. 3). Sonda taka umieszczona w błonie umożliwia zorientowanie się w zachowaniu odpowiedniego segmentu łańcucha alkilowego cząsteczki lipidowej błony. Wykorzystuje się w tym celu dwa pojęcia: parametr (ściślej parametry) uporządkowania:

$$S = 1/2 (\langle 3 \cos^2 \Theta \rangle - 1),$$

gdzie Θ jest kątem odchylenia odpowiedniego wiązania od kierunku prostopadłego do powierzchni błon (czyli od kierunku osi cząsteczki lipidu w stanie trans), który przyjmuje wartość 1 w stanie pełnego uporządkowania ($\Theta = 0^\circ$) i wartość 0 w stanie pełnego nieuporządkowania oraz τ — czas korelacji, który określa szybkość ruchu. Za pomocą tej metody możemy oczywiście określać stopień nieuporządkowania i szybkość ruchu jedynie w mikrorejonie, w którym znajduje się część paramagnetyczna (np. grupa nitroksylowa) sondy spinowej (rys. 3).



Rys. 3. Przykład sondy spinowej

Temperatura przejścia fazowego w dwumolekularnych błonach modelowych (np. w błonach płaskich BLM lub w błonach liposomów) uformowanych z jednego rodzaju lipidu jest ściśle określona dla tego lipidu, lecz różna dla różnych rodzajów lipidów. Dla błon utworzonych np. z lecytyny dwuoleinowej wynosi ona minus 22°C , dla lecytyny mirystynowej 23°C , a dla lecytyny dwubehynelowej 75°C . W temperaturach fizjologicznych lecytyna dwuoleinowa znajduje się zawsze w stanie płynnym, natomiast lecytyna dwubehynelowa — w stanie stałym. Błon uformowanych z mieszaniny lipidów, a tym bardziej błon biologicznych nie charakteryzuje jedna ściśle określona temperatura przejścia fazowego, lecz pewien zakres temperatur, który niekiedy jest tak duży, że szczegółowy pomiar jest w ogóle niemożliwy. W różnych temperaturach dochodzi do topnienia poszczególnych składników lipidowych błon, co prowadzi do powstania obszarów płynnych i stałych, czyli do tzw. separacji faz.

Temperatura przejścia fazowego i stopień płynności zależą od różnych czynników. Należą do nich różnice związane z charakterem zarówno łańcuchów węglowodorowych, jak i części polarnych cząsteczek. Temperatura przejścia fazowego zależy od długości łańcucha i jego stopnia nienasylenia oraz od rodzaju części polarnych cząsteczek lipidowych. Na ogół wraz ze wzrostem długości łańcuchów węglowodorowych wzrasta stabilność błony i podnosi się temperatura przejścia fazowego. Wszelkie natomiast zaburzenia w układzie łańcuchów alkilowych prowadzą do zmniejszenia stabilności układu i do obniżenia temperatury przemiany fazowej; przykładem zaburzenia może być załamane łańcuchów, zawsze powstające przy wiązaniach podwójnych i zależne od położenia takiego wiązania w łańcuchu. Na płynność błon wpływają również: pH ośrodka, jego siła jonowa, stężenie dwuwartościowych kationów i zawartość cholesterolu. Działanie np. cholesterolu (a jest on jednym z głównych składników błon plazmatycznych komórek ssaków) ma charakter dualistyczny i w pewnym sensie buforowy; w temperaturach wyższych usztywnia on błonę i zabezpiecza przed rozpuszczeniem się komórki w ośrodku, a w temperaturach niższych, przerywając kooperatywność między łańcuchami cząsteczek lipidowych, obniża temperaturę przemiany fazowej.

Pojęcie płynności stało się jednym z najważniejszych pojęć współczesnej membranologii. Uważa się, że utrzymywanie stanu ograniczonej i kontrolowanej płynności dwumolekularnych warstw lipidowych błon biologicznych jest konieczne dla funkcjonowania organizmu. Utrzymuje on taki skład lipidowy błon, jaki zapewnia właściwą jej płynność. Przyjmuje się, że transport substancji przez błonę, dyfuzja lateralna enzymów i substratów, biogeneza błon i wiele innych procesów może zachodzić w sposób właściwy tylko wtedy, kiedy błona ma odpowiednią płynność. Gdyby błona była zbyt płynna, mogłaby utracić swoją integralność i ulec zniszczeniu. Aby uchronić się przed tym, organizmy wykształciły mechanizmy regulujące płynność błon. Błony komórek zwierząt zmienocieplnych, roślin i mikroorganizmów muszą być zdolne do funkcjonowania w szerokim zakresie temperatur, a więc muszą utrzymywać swoją płynność pomimo zmian temperatury zarówno otoczenia, jak i samego organizmu. Błony np. bakterii nie zawierają cholesterolu, toteż wraz ze zmianami temperatury mogłyby ulegać drastycznym i niebezpiecznym zmianom. Stwierdzono jednak, że w błonach bakterii utrzymywanych w niskich temperaturach wzrasta liczba krótkich i nienasyconych łańcuchów węglowodorowych, co utrzymuje płynność tych błon na odpowiednim poziomie. Podobnie przedstawia się sprawa w błonach organizmów zmienocieplnych. Zmiany stosunku ilości nienasyconych łańcuchów cząsteczek lipidowych do ilości nasyconych łańcuchów zachodzą dzięki odpowiedniej regulacji enzymatycznej. Płynność błon

komórek organizmów stałocieplnych jest zapewne również starannie regulowana. Taka sytuacja jest konieczna ze względu na zmienność temperatury oraz na skład substancji pokarmowych, który w błonach może zmieniać skład lipidów. Odpowiednią płynność tych błon zapewnia, przynajmniej w jakimś stopniu, obecność cholesterolu lub jego analogów.

Aktywność wielu enzymów związanych z błoną najprawdopodobniej wymaga odpowiednio zorganizowanej warstwy lipidów o odpowiedniej płynności. Temperatura przejścia fazowego i, w konsekwencji, płynność błon mogą się zmieniać pod wpływem jonów wiązanych przez polarne części cząsteczek lipidowych i pod wpływem białek. Również pewne leki przesuwają temperaturę przejścia fazowego i wpływają na płynność błon oraz na przenikanie przez nie różnych substancji. Poświęcono wiele badań wpływowi środków znieczulających, przeciwbólowych, antydepresyjnych, uspakajających i antybiotyków na błony; np. desipramina i chlorpromazyna już w małych stężeniach obniżają temperaturę przejścia fazowego i zwiększają płynność lipidów błonowych. Cząsteczki leków mogą wpłynąć bezpośrednio (i zapewne pośrednio) na lipidowe składniki błon komórkowych, na składniki białkowe, a niekiedy na grupy węglowodanowe związane z lipidami i białkami. Zmiana pod wpływem leku płynności warstwy lipidowej może prowadzić do zmian w szybkości dyfuzji lateralnej białek enzymatycznych, co z kolei może powodować zmiany w szybkości procesów metabolicznych. Wiele substancji powierzchniowo czynnych charakteryzuje się również aktywnością biologiczną. Należy pamiętać, że substancje toksyczne użyte nawet w bardzo małym stężeniu mogą, jak się sądzi, zmienić płynność błon, co z kolei może dezorganizować działanie zarówno komórek pojedynczych, jak i organizmów złożonych.

W ostatnich kilkunastu latach wykorzystano pojęcie płynności do wyjaśnienia zarówno zjawisk wyżej wspomnianych, jak i wielu innych, takich jak np. wzrost komórek, ich różnicowanie się, odpowiedź hormonalna, procesy immunologiczne, transport elektronów, percepcja czucia, starzenie się, choroba nowotworowa, arterioskleroza i wpływ wielu leków.

PROCESY TRANSPORTU I ICH MODYFIKACJE ZA POMOCĄ PERMEATOKSYN

Do jednej z najbardziej podstawowych funkcji błon należy regulacja procesów transportu substancji przez błony. Biorąc pod uwagę budowę błony biologicznej w takim zakresie, w jakim ją znamy, możemy przewidywać [21], że transport substancji przez błony może się odbywać poprzez fazę lipidową błony, poprzez pewne jej białka integralne (zwa-

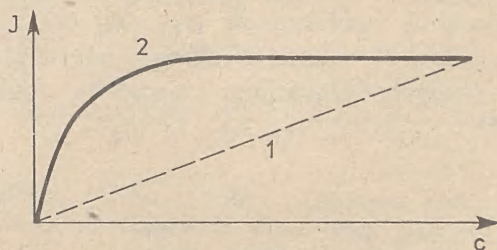
ne w tym przypadku białkami transportowymi), względnie poprzez struktury mieszane. Drogami tymi różne substancje mogą przenikać w sposób bierny (bez nakładu energii metabolicznej) lub w sposób aktywny (z nakładem energii metabolicznej). W sposób bierny substancje mogą przechodzić przez błonę dzięki dyfuzji prostej, dyfuzji złożonej i dyfuzji ułatwionej (zwanej również biernym transportem nośnikowym).

Transport substancji dobrze rozpuszczalnych w lipidach i występujących w dostatecznie małych stężeniach podlega prawu Ficka, o czym wiadomo od czasów Overtona [19]. W przypadku występowania większej liczby bodźców, a nie tylko gradientu stężenia, punktem wyjścia do opisu dyfuzji złożonej są równania fenomenologiczne termodynamiki procesów nierównowagowych:

$$I_i = \sum_{k=1}^{k=n} L_{ik} X_k,$$

gdzie I_i jest i -tym strumieniem, X_k — k -tym bodźcem, L_{ik} są współczynnikami fenomenologicznymi.

Dyfuzja ułatwiona charakteryzuje się tym, że szybkość przenikania zależy od liczby nośników zawartych w błonie i, w związku z tym, występuje w tym procesie nasycenie. Różnica między dyfuzją ułatwioną i dyfuzją prostą jest przedstawiona na rys. 4. Bierny transport nośnikowy



Rys. 4. Zależność między strumieniem I i stężeniem C dla procesu dyfuzji prostej (1) i dyfuzji ułatwionej (2)

wy różni się od dyfuzji prostej, czy też złożonej, również innymi cechami, z których wymienię jedynie efekt konkurencji, kiedy to różne substancje konkurują o ten sam nośnik.

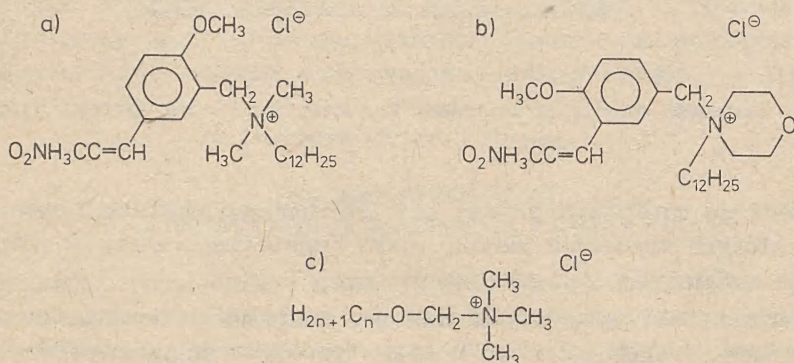
Transport aktywny jest zawsze procesem nośnikowym, ale różni się od biernego transportu nośnikowego tym, że wymaga nakładu energii metabolicznej, co łatwo można sprawdzić za pomocą trucizn metabolicznych, które hamują transport aktywny, a nie hamują transportu

biernego. Transport aktywny trudniej jest opisać w kategoriach matematycznych aniżeli transport bierny.

Na kinetykę transportu substancji przez błony mogą wpływać różnorodowe czynniki. Należą do nich m. in. związki chemiczne, które działają na błonę i modyfikując ją, zmieniają przenikalność błon i charakter przenikania transportowanych substancji. Związki takie bywają nazywane permeatoksynami [27]. Permeatoksyny mogą same kreować nowe drogi transportu w błonie (przykładem są jonofory, m. in. walinomycyna) lub wpłynąć na istniejące drogi przez oddziaływanie np. z elektrycznym ładunkiem powierzchniowym błony lub zmieniając płynność błony.

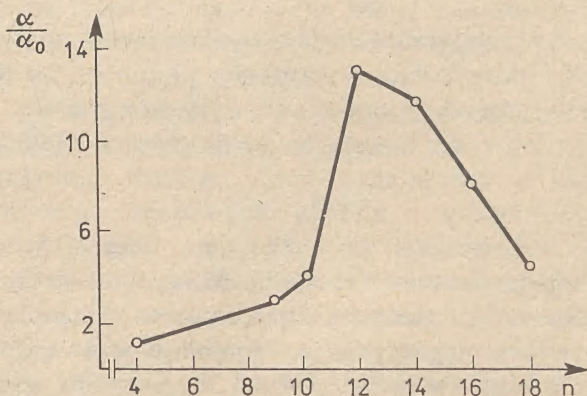
Wiele substancji (również leków) charakteryzujących się aktywnością biologiczną jest permeatoksynami. Stąd wynika możliwość określenia wpływu wielu związków na błony poprzez badanie kinetyki przenikania wybranych substancji (np. znakowanych radioaktywnych) przez błony niemodyfikowane i modyfikowane za pomocą interesujących nas związków o właściwościach permeatoksyn. Znakowane substancje przenikające przez błony odgrywają rolę detektorów działania permeatoksyn.

Przykładem mogą służyć badania prowadzone w Katedrze Fizyki i Biofizyki Akademii Rolniczej we Wrocławiu, poświęcone wpływowi wybranych amfifilowych czwartorzędowych soli amoniowych na błony biologiczne i modelowe. W badaniach tych zastosowano m. in. następujące związki: 1) chlorek N-dodecylo-N-dwumetylo-N-[3-(β-metylo-β-nitrowinylo)-6-metoksybenzylo] amonion (rys. 5a) oraz pewne analogi fragmentów tego związku, 2) chlorek N-dodecylo-N-[3-(β-metylo-β-nitrowinylo)-4-metoksybenzylo] morfoliniowy (rys. 5b) oraz pewne analogi fragmentów tego związku, 3) chlorki N-alkoksymetyleno-N-trójmetyloamoniowe (rys. 5c) o różnych długościach łańcuchów węglowodorowych.



Rys. 5. Wzory chemiczne wybranych czwartorzędowych soli amoniowych (opis w tekście)

Związki te były syntezowane w Instytucie Technologii Organicznej i Tworzyw Sztucznych Politechniki Wrocławskiej, gdzie stwierdzono, że wykazują one pewne właściwości grzybo-, glono- i bakteriobójcze [28]. Badania biernego przenikania znaczonych jonów siarczanowych przez błony lecytynowych liposomów wykazały, że pod wpływem wymienionych związków zmienia się szybkość przenikania stosowanych jonów wskaźnikowych [7, 14, 15, 20]. Stała szybkości procesu przenikania jonów siarczanowych, jak wykazano, wzrasta pod wpływem modyfikacji błon lecytynowych, przy czym szybkość ta zależy, przy pozostałych warunkach niezmiennych, od rozmiarów części polarnych badanych związków, od rozkładu ładunku elektrycznego tej części i od długości łańcucha alkilowego tych związków, przy czym dla związków z 3 grupy obserwuje się charakterystyczne maksimum przenikania dla 12 węgla w łańcuchu alkilowym (rys. 6).



Rys. 6. Zależność względnej stałej przenikania (stosunek stałej szybkości przenikania α znakowanych jonów siarczanowych przez błony liposomów modyfikowanych związkami z rys. 5c do α_0 — stałej szybkości przenikania tych samych jonów przez błony liposomów niemodyfikowanych) do liczby n atomów węgla w łańcuchu permeatoksyn z rys. 5c

Powstaje pytanie, jaki jest mechanizm oddziaływania badanych permeatoksyn z błonami, jeżeli prowadzi on do przyspieszenia przenikania jonów siarczanowych. W pierwszym rzędzie można sobie wyobrazić, że substancje te zwiększają płynność błon, co z kolei może przyspieszyć procesy dyfuzji i elektrodyfuzji. Doświadczenia wykonane metodą elektronowego rezonansu paramagnetycznego za pomocą dwóch rodzajów sond spinowych (rys. 7), pod wpływem wymienionych wyżej permeatok-



Rys. 7. Sondy spinowe stosowane w badaniach zachowania się błon liposomów traktowanych wybranymi czwartorzędowymi solami amonjowymi

syn na błony liposomów wykazały [22], że w temperaturze pokojowej nie zmieniają one (wbrew przewidywaniom) płynności błon, a nieco inne związki z tej samej grupy [24] wywołują bardzo małe zmiany.

KRYTYKA POJĘCIA PŁYNNOŚCI I KONCEPCJA KSZTAŁTU MOLEKULARNEGO

Nasze wątpliwości, dotyczące braku spodziewanej zależności między wzrostem szybkości przenikania i wzrostem płynności, w konsekwencji dotyczące znaczenia pojęcia płynności, nie były odosobnione. W ostatnich latach pojawiło się ich znacznie więcej, np. wykazano metodą sond fluorescencyjnych [13], że wpływ cholesterolu na ruch rotacyjny łańcuchów alkilowych jest nieznaczny, a metodą magnetycznego rezonansu jądrowego — że ruch ten wzrasta. Lindblom i wsp. [17] wykazali, że wprowadzenie cholesterolu do warstwy lipidowej nie ma prawie żadnego wpływu na współczynnik lateralej dyfuzji lipidów. Ghosh i Seeling [8] wykazali za pomocą magnetycznego rezonansu jądrowego, że rotacyjny ruch łańcuchów wzrasta pod wpływem cholesterolu wprowadzonego do warstwy lipidowej. W czysto lipidowych układach płynność ich jest ściśle skorelowana z ruchliwością cząsteczek lipidowych. W naturalnych błonach biologicznych lateralna dyfuzja białek jest na ogół niezależna od ruchliwości lipidów [26]. Te i inne obserwacje pozwoliły postawić pytanie, czy zjawisko płynności jest przyczyną, czy też skutkiem różnych zjawisk.

Na ogół pomiary parametru uporządkowania i czasu korelacji zmieniają się w tym samym kierunku, jednakże znane są przypadki, kiedy tak nie jest; np. Zimmer [29] cytuje dane Ligeti i Horvátha, którzy za pomocą sond spinowych stwierdzili w mitochondriach, że parametr uporządkowania i czas korelacji zmieniają się w przeciwnych kierunkach. Rilfors i wsp. [23] sądzą, że pojęcie płynności może prowadzić do fałszywych wniosków, ponieważ mierzona wielkość zwana „płynnością” zawiera zarówno dynamiczne, jak i statyczne informacje.

Wobec tego można sobie wyobrazić, że zmiana parametru uporządkowania zachodzi pod wpływem zmian struktury, a niekoniecznie pod wpływem zmian w ruchu molekularnym lipidów. W tej sytuacji czasy korelacji i współczynniki dyfuzji translacyjnej lub rotacyjnej powinny być wykorzystane do opisu dynamiki układu, a parametr uporządkowania do opisu molekularnego porządku układu.

W ten sposób pojawiło się pytanie, co to jest właściwie płynność błon i jak należy ją mierzyć.

W trójwymiarowych układach płynność Φ określa się jako odwrotność lepkości η , jak przypomina to Lands [16]:

$$\Phi = 1/\eta.$$

Ponieważ lepkość η jest związana z absorpcją energii kinetycznej przez ośrodek, a energia w warstwie lipidowej jest z kolei związana z ruchem cząsteczek lipidowych: oscylacyjnym, rotacyjnym i translacyjnym, wobec tego można rozróżnić energie oscylacyjne, rotacyjne i translacyjne. Ze względu na to, że każdy z tych ruchów można rozłożyć na składowe prostopadłe i równoległe do płaszczyzny błony, możemy więc ostatecznie rozważać 6 różnych rodzajów energii, które mogą się znacznie różnić od siebie. Którą z tych energii powiązać z lepkością, a w konsekwencji z płynnością — nie wiadomo. Lands proponuje określać globalną płynność opierając się na formule dilatometrycznej:

$$V = V_0 + \beta \Delta T,$$

gdzie V_0 jest objętością molarną warstwy lipidowej tuż ponad temperaturą przejścia fazowego, kiedy płynność jest praktycznie równa zero, V — objętością molarną w danej temperaturze, ΔT — przyrostem temperatury, a β — współczynnikiem.

W tej sytuacji widzimy, że kiedy ekspansja wzrasta wraz z temperaturą to lepkość i gęstość zmniejszają się, a płynność się zwiększa. Wykorzystując zależność podaną przez Hildebranda i Lamoreaux [10]:

$$\Phi = B \frac{V - V_0}{V_0},$$

gdzie B jest współczynnikiem, oraz zależność poprzednią otrzymujemy wyrażenie:

$$\Phi = \frac{B \beta \Delta T}{V_0},$$

które stanowi podstawę określania płynności. Otrzymane w ten sposób wyniki różnią się w ogólności od wyników omawianych wyżej, np. otrzymanych za pomocą sond spinowych, które pozwalają oznaczyć bezpo-

średnio parametr uporządkowania i czas korelacji w określonym mikro-rejonie błony (stąd pochodzi często używane pojęcie mikrolepkości, a więc lepkości mierzonej w mikrorejonie, np. za pomocą odpowiednich sond molekularnych).

W ten sposób dochodzimy do wniosku, że obecnie nie ma jednoznacznej, operacyjnej definicji płynności. Pojęcie to należy więc traktować raczej jakościowo niż ilościowo.

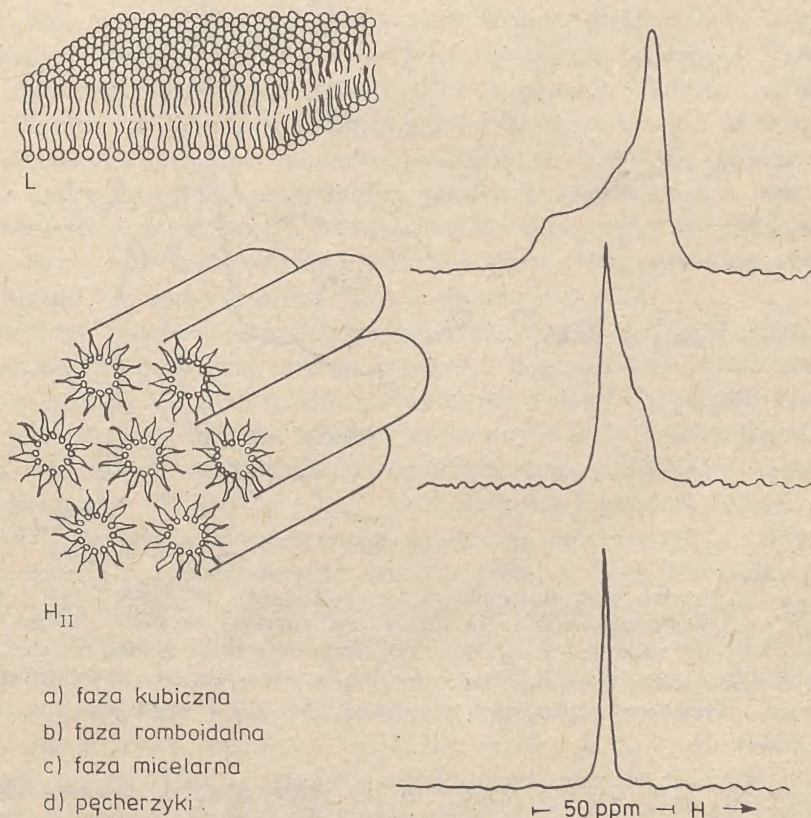
Ze względu na trudności związane z jednoznacznym określeniem płynności, część autorów uznała to pojęcie za nieprzydatne i uznała za konieczne zastąpienie tego pojęcia innym. Nowa koncepcja wynika z rozważań nad rolą lipidów w błonie biologicznej. Cullis i wsp. [4] zwracają uwagę na to, że zwykle przyjmuje się, że lipidy odgrywają w błonach jedynie rolę bierną, stanowiąc barierę dla przenikających substancji oraz stanowiąc matrycę dla białek, które są odpowiedzialne za wszelkie funkcje błony. Ze względu na dużą (sięgającą ponad 100) liczbę różnych lipidów w błonie wydaje się wątpliwe, aby spełniały one jedynie rolę bariery w postaci dwumolekularnej warstwy lipidowej, bo w tym celu wystarczyłby jeden rodzaj fosfolipidu, np. lecytyna. Jak omawialiśmy to, istnienie różnych lipidów membranowych uzasadnia się hipotetyczną (hipotetyczną wg Cullis' a i wsp. [41]) koniecznością istnienia różnych lokalnych regionów błony o różnych płynnościach w celu regulowania funkcji białek. Autorzy ci uważają, że nie ma dostatecznych dowodów na to, że modulacja płynności lipidów w otoczeniu białek odgrywa znaczącą rolę regulacyjną *in vivo*. Zwracają, natomiast, uwagę na znaczenie polimorfizmu lipidowego w wodzie, polegającego na samorzutnym tworzeniu się różnorodnych struktur w zależności przede wszystkim od rodzaju lipidu, temperatury i od stężenia. Polimorfizm ten został stwierdzony doświadczalnie przez wielu autorów [1, 18, 23]. Teoretycznie zagadnienie zostało opracowane przez Israelachvili'ego i wsp. [11, 12], którzy w swoich badaniach wykorzystali formalizm termodynamiki klasycznej.

Substancje amfifilowe możemy podzielić na dwie klasy, z których obie spotykamy w układach biologicznych. Do jednej klasy możemy zaliczyć te substancje amfifilowe, które tworzą micle w roztworach wodnych powyżej temperatury Kraffta. Druga klasa zawiera substancje amfifilowe pęczniejące w wodzie, które nie tworzą roztworów micelarnych, lecz struktury ciekłokrystaliczne (mezofazy). Na przykład detergenty, mydła i lizolecytyna należą do pierwszej klasy, a lecytyna i większość pozostałych lipidów membranowych do drugiej.

Wielu autorów [3, 4, 6] spośród licznych struktur ciekłokrystalicznych wyróżnia szczególne znaczenie dwóch faz mezomorficznych: struktury lamelarnej (L) i odwróconej struktury heksagonalnej (H_{II}). Ta

ostatnia zawiera heksagonalnie ułożone wodne kanały o średnicy poprzecznego przekroju wynoszącej 2 nm (i wobec tego nie może ona stanowić bariery transportowej między ośrodkiem zewnętrznym i wnętrzem komórki w odróżnieniu od dwumolekularnej warstwy lipidowej).

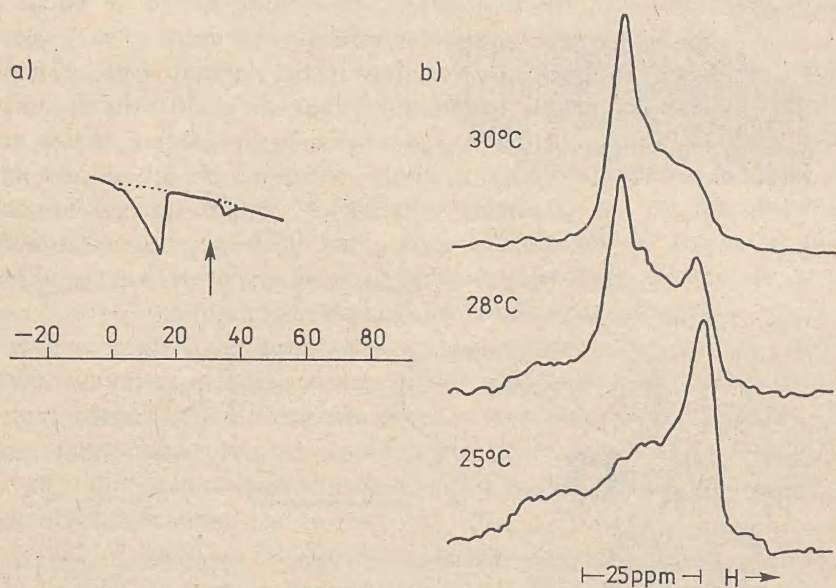
Główne lipidy membranowe z reguły przyjmują w otoczeniu wodnym formę dwumolekularnej warstwy lamelarnej, względnie odwróconą strukturę heksagonalną. Lipidy tworzące micle stanowią niewielką część lipidów membranowych, natomiast lipidy preferujące strukturę H_{II} często stanowią do 30% wszystkich lipidów błonowych. Badania tych układów metodą strukturalnej analizy rentgenowskiej można zrealizować wyłącznie w odniesieniu do układów najprostszych. W układach bardziej złożonych odpowiednie badania można prowadzić metodą fosforowego rezonansu jądrowego (^{31}P magnetyczny rezonans jądrowy). Badania tą metodą wykazały [3], że struktury lamelarne (rys. 8) są źródłem



Rys. 8. Struktury fosfolipidowe i odpowiadające im sygnały ^{31}P -NMR, (wg Cullisa i De Kruijffa [3])

sygnału ^{31}P magnetycznego rezonansu jądrowego, który jest asymetryczny z ramieniem niskopolowym i wysokopolowym maksimum. W przypadku struktury H_{II} sygnał jest również asymetryczny lecz węższy z ramieniem wysokopolowym. W przypadku wielu innych struktur powstają sygnały symetryczne i wąskie. Tak więc istnieje możliwość odróżniania struktur lamelarnych od odwróconych struktur heksagonalnych z jednej strony i obydwu tych struktur od innych z drugiej strony.

Liczne badania szczegółowe wskazały, że pewne lipidy łatwiej tworzą struktury H_{II} niż inne. Na przykład fosfatydyloetanolamina (rys. 1), z żółtka jaja kurzego łatwo tworzy takie struktury, przechodząc w temperaturze mniej więcej 28°C ze struktury L w strukturę H_{II} , przy czym entalpia takiego przejścia jest bardzo mała, co wskazuje, że omawiana dramatyczna przemiana fazowa zachodzi pod wpływem nieznacznego dopływu energii (rys. 9). Fosfatydyloseryna przechodzi ze struktury L w



Rys. 9. a — Krzywa mikrokalorymetryczna wskazująca przejście fazowe wodnej dyspersji fosfatydyloetanolaminy (z żółtka jaja kurzego) ze stanu stałego w stan lamelarny (płynny oraz (co zaznaczono strzałką) przejście ze stanu lamelarnego do odwróconego stanu heksagonalnego (b). Odpowiednie sygnały ^{31}P -NMR dla różnych temperatur (wg Cullisa i De Kruijffa [3])

strukturę H_{II} przy pH 3,5 (kiedy to jej część polarna zawiera ładunek dodatni i ładunek ujemny), ale nie podlega takiej przemianie przy pH 7,4 (kiedy część polarna jest naładowana ujemnie). Fosfatydyloseryna, podobnie jak fosfatydylocholina, ma zdolność do stabilizowania struktury

lamelarnej. Dodanie jednakże do dyspersji fosfatydylloseryny jonów Ca^{+2} prowadzi do powstania struktury H_{II} . Ten wpływ jonów wapnia może zostać odwrócony działaniem takiego anestetyku, jakim jest dibukaina (zdolna do usuwania wapnia z błony). Wpływ białek może być różnorodny. Często działają one stabilizująco na struktury lamelarne. Znane są jednak przypadki odwrotne. Na przykład, cytochrom *c* z wewnętrznej błony mitochondrialnej jest białkiem, które indukuje powstawanie struktur nielamelarnych. Można sądzić, że nielamelarna struktura uformowana w wyniku oddziaływania między cytochromem i kardiolipiną może mieć znaczenie w funkcjonowaniu końcowej części łańcucha oddechowego. Ta hipoteza jest poparta stwierdzeniem, że silny przeciwnowotworowy lek — adriamycyna specyficznym oddziaływującym z kardiolipiną w układzie modelowym blokuje formowanie się nielamelarnych struktur i hamuje mitochondrialną regulację.

Informacje wymienione tutaj i dziesiątki innych nie omawianych w tym miejscu wskazują, że lipidy membranowe nie muszą tworzyć jedynie dwumolekularnej warstwy, a wręcz przeciwnie, zależnie od swoich właściwości, mogą formować również struktury nielamelarne. Uogólniając zebrane informacje można zaproponować prostą koncepcję, którą autorzy [6] nazwali koncepcją kształtu (lub koncepcją kształtu molekularnego). Według tej koncepcji różnym cząsteczkom lipidowym można przypisać kształty zależne od stosunku powierzchni przekroju poprzecznego główki hydrofilowej do powierzchni przekroju poprzecznego łańcuchów węglowych (stosunek ten, K , nosi nazwę współczynnika hydrofilowo-hydrofobowego, lub współczynnika kształtu), przy czym cząsteczki układają się w błonie tak aby dopasować się do siebie optymalnie.

Cząsteczki lipidów, charakteryzujące się względnie dużą częścią polarną w stosunku do powierzchni przekroju poprzecznego łańcuchów węglowych, zostały określone jako „odwrócone stożki” (cząsteczki typu odwróconego stożka). Takimi lipidami są lizofosfolipidy i detergenty które tworzą optymalne energetycznie struktury typu miceli lub zwykłych faz heksagonalnych (H) (rys. 10). Jeśli natomiast przekrój części polarnej jest mniejszy od poprzecznego przekroju łańcuchów, to takiej cząsteczce można przyporządkować kształt stożka; w tym przypadku obserwujemy preferencję tworzenia struktur odwróconych, takich jak faza H_{II} lub odwrócone micelle. Jeśli części polarne i łańcuchy mają porównywalne powierzchnie przekrojów poprzecznych, to cząsteczka ma kształt cylindryczny i organizuje się w warstwy dwumolekularne. Dla stożka współczynnik kształtu $K < 1$, dla cylindra $K \cong 1$, dla odwróconego stożka (ze względu na istnienie struktur pośrednich) $K > 3$. Stosunek K może się zmieniać pod wpływem różnych czynników wpływających na rozmiary części polarnej (np. pod wpływem zmiany elektrycznego ładunku lub zmiany hydratacji) cząsteczek lipidu jak też pod wpływem

czynników zmieniających powierzchnię poprzecznego przekroju łańcuchów (np. pod wpływem zmian nienasylenia, długości łańcucha lub zmiany temperatury).

Lipid (przykład)	Faza	Kształt molekularny
Lizofosfolipidy		
Detergenty	micelarna	
Fosfatydylocholina		
Sfingomielina	lamelarna	
Fosfatydoetanolamina		
cholesterol	heksagonalna H_{II}	

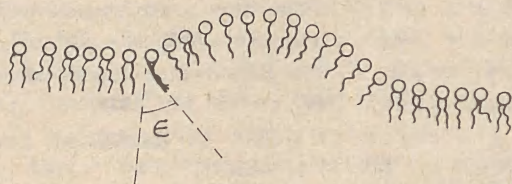
Rys. 10. Koncepcja kształtu molekularnego (opis w tekście) (wg De Kruijffa i wsp. [6])

Chociaż koncepcja kształtu może się wydawać naiwna, a na pewno obecnie ma jeszcze charakter spekulacji, jednakże trafnie opisuje wiele zjawisk. Na przykład zależność od temperatury przejścia $L \rightarrow H$ może być łatwo zrozumiała, jeśli przyjmiemy, że wraz ze wzrostem temperatury wzrasta powierzchnia przekroju łańcuchów hydrofobowych (a więc zmniejsza się K), co powoduje przechodzenie cząsteczki do kształtu stożka i co ostatecznie może zainicjować przemianę fazową. Dodanie jonów wapnia do liposomów uformowanych z kardiolicytyny powoduje ich wiązanie z częścią polarną cząsteczki, co zmniejsza jej rozmiary ze względu na dehydratację, zmienia elektrostatyczne oddziaływania i może prowadzić ze względu na modulację kształtu, do dalszych konsekwencji. Zja-

wiska, które tłumaczy się często za pomocą pojęcia płynności, można również w wielu przypadkach wyrazić wykorzystując koncepcję kształtu. Na przykład, adaptację organizmów tłumaczyliśmy zachowaniem (czyli utrzymywaniem w miarę możliwości w stanie mniej więcej niezmiennym) płynności błony; a stosując nowe podejście możemy efekty adaptacyjne wyjaśnić zachowaniem kształtu molekularnego.

Wprowadzenie, z zewnątrz, cząsteczki do dwumolekularnej warstwy lipidowej może zmienić jej właściwości. Rozważmy np. wprowadzenie białka integralnego do takiej warstwy. Można się spodziewać, że w warstwie lipidowej składającej się z mieszaniny lipidów o różnych kształtach, te lipidy znajdują się w warstwie granicznej białka, których kształt jest komplementarny względem odpowiedniego segmentu białka. W przypadku niezgodności kształtu mogą powstać defekty w upakowaniu, które z kolei mogą wpłynąć na transportowe właściwości błony.

Można również sądzić, że wprowadzenie do błony lecytynowej liposomu cząsteczek i substancji badanej przez nas, a przedstawionych na rys. 5 (składających się z części polarnych i pojedynczego łańcucha węglowodorowego, a więc charakteryzujących się kształtem odwróconego stożka) może zmieniać kształt błony, jak pokazano na rys. 11 i spowodować



Rys. 11. Możliwa zmiana kształtu dwumolekularnej warstwy lipidowej uformowanej z lecytyny pod wpływem amfifilowych cząsteczek jednolancuchowych: ϵ oznacza kąt charakterystyczny dla defektu krawędzi domeny

wać powstanie defektów strukturalnych. Defekty te, być może, są odpowiedzialne za przyspieszenie transportu jonów siarczanowych pod wpływem badanych permeatoksyn, którego to przyspieszenia w poprzednim rozdziale nie mogliśmy wyjaśnić za pomocą pojęcia płynności.

Obecnie powszechnie tłumaczymy różnorodne zjawiska membranowe za pomocą pojęcia płynności. Coraz częściej jednakże stosujemy również koncepcję kształtu molekularnego, która, jak rozumiem, nie wyklucza pojęcia płynności lecz je uzupełnia.

W przedstawionym opracowaniu podkreślono zaledwie kilka zagadnień biofizyki błon i chociaż są one bardzo aktualne nie wyczerpują problemu

LITERATURA

1. Brown G., Wolken J. — *Liquid crystals and biological membranes*. Academic Press, New York-San Francisco-London, str. 22-49, 156-162, 1979.
2. Chapman D., Byrne P., Skopley G. G. — *The physical properties of phospholipids. I. Solid state and mesomorphic properties of some 2,3-diacyl-DL-phosphatidylethanolamines*. Proc. R. Soc. London Ser. A 290: 115-142, 1966.
3. Cullis P., De Kruijff B. — *Lipid polymorphism and the functional roles of lipids in biological membranes*. Biophys. Biochem. Acta 559: 399-420, 1979.
4. Cullis P., De Kruijff B., Hope M. J., Verkleij A., Nayar R., Farren S., Tilcock C., Madden T., Bally M. — *Structural properties of lipids and their functional roles in biological membranes*. W: *Membrane fluidity*. R. C. Aleja (red.), Academic Press, New York, t. 2, str. 40-79, 1982.
5. Danielli J. F., Davson H. — *A contribution to the theory of thin films*. J. Cell. Comp. Physiol. 5: 495-509, 1935.
6. De Kruijff B., Cullis P., Verkleij A., Hope M., van Echtel C., Taraschi T. — *Lipid polymorphism and membrane function*. W: *The enzymes of biological membranes*, A. Martouosi (red.), Plenum Press, New York-London, t. 1, str. 131-204, 1985.
7. Gabrielska J., Kuczera J., Oświęcimska M., Przestalski S., Witek S., Żyłka R. — *Effect of alkyl chain length in alkoxymethylene trimethylammonium chlorides on ion transport across liposome membranes*. Studia Biophys. 82: 149-155, 1979.
8. Gosh R., Seelig J. — *The interaction of cholesterol with bilayers of phosphatidylethanolamine*. Biophys. Biochem. Acta 691: 151-160, 1982.
9. Gorter E., Grendel F. — *On bimolecular layers of lipids on the chromocytes of the blood*. J. Exp. Med. 41: 439-443, 1925.
10. Hildebrand J., Lamoreaux R. — *Fluidity: A general theory*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 69: 3428-3472, 1972.
11. Israelachvili J., Marcelja S., Horn R. — *Physical principles of membrane organization*. Q. Rev. Biophys. 13: 121-200, 1980.
12. Israelachvili J., Mitchel D., Ninham B. — *Theory of self-assembly of hydrocarbon amphiphiles into micelles and bilayers*. J. Chem. Soc. Faraday Trans. II 72: 1525-1568, 1976.
13. Johansson L., Lindblom G. — *Orientation and mobility of molecules in membranes studied by polarized light spectroscopy*. Q. Rev. Biophys. 13: 63-118, 1980.
14. Kuczera J., Gabrielska J., Żyłka R., Przestalski S., Witek S., Grobelny D. — *Influence of the size of the polar part of amphiphile ammonium salts on ion transport across liposome membrane*. Studia Biophys. 96: 203-211, 1983.
15. Kuczera J., Janas T., Przestalski S., Witek S., Oświęcimska M. — *Influence of some amphiphilic derivatives of glycine esters on sulphate ion transport across liposome membrane*. Studia Biophys. 105: 167-176, 1985.
16. Lands W. E. M. — *Fluidity of membrane lipids*. W: *Membrane fluidity: Biophysical techniques and cellular regulation*. M. Kates, A. Kuksis (red.), Humana Press, Clifton N. J., str. 69-73, 1980.

17. Lindblom G., Johansson L., Arvidson G. — *Effect of cholesterol in membranes*. Biochemistry 20: 2204-2207, 1981.
18. Luzzati V., Reiss-Husson F., Rivas E., Gulik-Krzywicki — *Structure and polymorphism in lipid-water systems and their possible biological implications*. Ann. N. Y. Acad. Sci. 137: 409-413, 1966.
19. Overton E. — *Über die allgemeinen osmotischen Eigenschaften der Zelle, ihre vermutlichen Ursachen und ihre Bedeutung für die Physiologie*. Vjschr. Naturforsch. Ges. Zurich 44: 88-135, 1899.
20. Przestalski S. — *Mechanizmy i procesy membranowe związane ze skażeniem organizmów*. W: *Bioindykacja skażeń przemysłowych i rolnych*. PAN, Oddział we Wrocławiu, 1983.
21. Przestalski S. — *Błony biologiczne*. Wiedza Powszechna, Warszawa, 1983.
22. Przestalski S., Kuczera J., Gabrielska J., Schara M., Witek S., Zyłka R. — *Interaction between lipid membranes and quaternary ammonium salts*. Periodicum Biologorum 85: 116-120, 1983.
23. Rilfors L., Lindblom G., Wieslander A., Christiansson A. — *Lipid bilayer stability in biological membranes*. W: *Membrane fluidity*. M. Kates, L. Manson (red.), Plenum Press, New York-London, t. 12, str. 205-241, 1984.
24. Sarapuk J., Hendrich A., Przestalski S., Pódołak M., Bójko L., Witek S. — *Interaction of some glycine esters with model membranes*. Studia Biophys. 105: 121-128, 1985.
25. Singer S. J., Nicolson G. L. — *The fluid mosaic model of the structure of cell membranes — Cell membranes are viewed as two dimensional solution of oriented globular proteins and lipids*. Science 175: 720-731, 1972.
26. Sklar L. A. — *Fluorescence polarization studies of membrane fluidity: where do we go from here*. W: *Biomembranes 12. Membrane fluidity*. M. Kates, L. Manson (red.), Plenum Press, New York-London, str. 125-129, 1984.
27. Szabo G. — *Mechanism by which small molecules alter ion permeability through lipids bilayer membranes*. W: *Membrane toxicity*. M. Miller, A. Shamoo (red.), Plenum Press, New York-London, str. 167-190, 1976.
28. Witek S. — Belg. Patent No 864782, 1978.
29. Zimmer G. — *Fluidity of cell membranes in the presence of some drugs and inhibitors*. W: *Biomembranes 12. Membrane fluidity*. M. Kates, L. Manson (red.), Plenum Press, New York-London, str. 185-187, 1984.

JACEK KUZNICKI

Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego
PAN, Warszawa

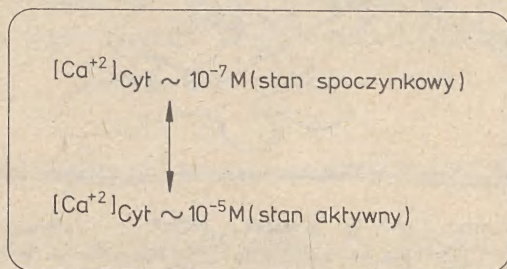
TRANSPORT I FUNKCJE JONÓW WAPNIA U EUKARIOTA

WSTĘP — ROLA JONÓW WAPNIA W KOMÓRCE

Jony wapnia są najbardziej powszechnym i uniwersalnym czynnikiem regulującym procesy komórkowe. Są one przede wszystkim przekaznikiem drugiego rzędu: regulują poziom cyklicznych nukleotydów, Ca^{2+} kwasu arachidonowego, skurcz mięśni oraz ruchliwość komórek niemięśniowych, uwalnianie neurotransmiterów, procesy endocytozy i egzocytozy, metabolizm glikogenu, biorą też udział w procesach mitotycznych, komunikacji międzykomórkowej, reakcjach proteolizy i innych. Jony wapnia są też przekaznikiem pierwszego rzędu, gdyż w niektórych przypadkach biorą udział bezpośrednio w tworzeniu sygnału na poziomie błony komórkowej przez regulację prądów K^+ , Na^+ , a nawet Ca^{2+} [5, 30, 53].

Można zadać pytanie, dlaczego właśnie jony Ca^{2+} stały się takim wielofunkcyjnym czynnikiem [3]? Wydaje się, że zadecydowało o tym to, że wielkość oraz ładunek czynią go łatwo rozróżnialnym od innych kationów występujących w dużej ilości w przyrodzie oraz to, że fosforany wapnia są mało rozpuszczalne, a więc przy dużym stężeniu Ca^{2+} następowałoby w komórce wytrącenie związków fosforanowych, m.in. ATP. Aby do tego nie dopuścić w komórce utrzymywane jest stężenie jonów wapnia poniżej 10^{-5} M, a w większości przypadków poniżej 10^{-7} M, chociaż środowisko zewnętrzne zawiera Ca^{2+} w stężeniu 10^{-3} M (rys. 1). Stę-

$$[\text{Ca}^{2+}] \sim 10^{-3} \text{ M}$$



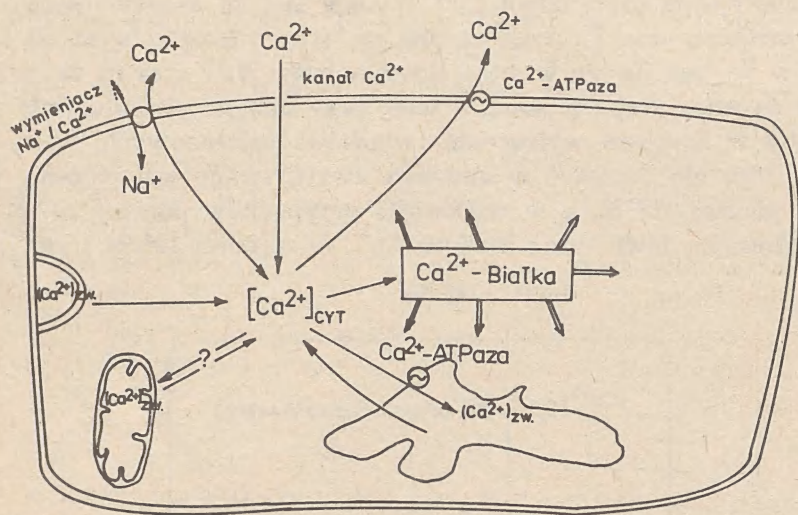
Rys. 1. Zmiany stężenia Ca^{2+} w cytoplazmie w zależności od stanu funkcjonalnego komórki

żenie Ca^{2+} wewnątrz komórki zmienia się w zależności od jej stanu funkcjonalnego i wynosi poniżej 10^{-7}M w komórkach nie pobudzonych, a około 10^{-5}M w komórkach pobudzonych. Aktywacja zależnych od wapnia wymienionych procesów fizjologicznych zachodzi właśnie przy stężeniu około 10^{-5}M wolnych jonów wapnia.

REGULACJA $[\text{Ca}^{2+}]$ W CYTOPLAZMIE

Powyższe informacje wskazują, że metabolizm wapnia można rozpatrywać jako zbiór czterech zagadnień: 1) procesów aktywacji komórki, 2) dróg, którymi wapń dostaje się do komórki po jej aktywacji, 3) białek wiążących wapń jako głównych akceptorów wapnia, 4) dróg, którymi wapń dostaje się z cytoplazmy, co umożliwia komórce powrót do stanu spoczynkowego.

Regulacja poziomu wapnia w komórce zachodzi dzięki współdziałaniu różnych układów komórkowych, które są zlokalizowane w trzech częściach komórki: 1) w błonie plazmatycznej, 2) w organellach wewnątrzkomórkowych, takich jak endoplazmatyczne retikulum i mitochondria oraz 3) w cytoplazmie, w postaci niskocząsteczkowych ligandów: fosforanów, nukleotydów adeninowych oraz białek wiążących wapń (rys. 2)



Rys. 2. Regulacja poziomu Ca^{2+} w komórce. $[\text{Ca}^{2+}]$ — stężenie wolnych jonów wapnia w cytoplazmie; $(\text{Ca}^{2+})_{zw}$ — związane jony wapnia w organellach komórkowych: strzałki pojedyncze pokazują kierunek przepływu jonów wapnia; strzałki podwójne wskazują różne procesy aktywowane przez białka modulowane przez Ca^{2+}

[5—9, 12, 13]. Na rys. 2 pokazano poszczególne systemy transportujące jony wapnia i ich lokalizację komórkową.

Ad. 1. W błonie plazmatycznej znajdują się:

- a. Kanały umożliwiające przepływ Ca^{2+} ze środowiska zewnętrznego do wnętrza komórki.
- b. Ca^{2+} -ATPaza wypompowująca Ca^{2+} na zewnątrz komórki.
- c. Wymieniacz wapniowo-sodowy wynoszący jony wapnia na zewnątrz komórki, który w pewnych warunkach może działać w przeciwną stronę i wprowadzać jony wapnia do komórki.
- d. Hipotetyczne miejsce magazynowania jonów wapnia.

Ad. 2. Organella komórkowe biorące udział w homeostazie wapnia to głównie endoplazmatyczne retikulum i mitochondria. Endoplazmatyczne retikulum zawiera:

- a. Ca^{2+} -ATPazę wypompowującą jony wapnia z cytoplazmy do wnętrza retikulum.
- b. Kanały wapniowe umożliwiające uwalnianie zmagazynowanych jonów wapnia do cytoplazmy.

Mitochondria zawierają różne systemy transportujące jony wapnia, między innymi wymieniacz wapniowo-sodowy i są zdolne do magazynowania dużych ilości wapnia, gdy stężenie tego kationu w cytoplazmie przekracza pewien poziom [18, 43, 44]. Rola mitochondriów w regulacji poziomu wapnia jest niejasna i nie będzie dyskutowana w tym artykule.

Główne układy transportujące jony wapnia to: kanały wapniowe, podstawowa droga zwiększania stężenia jonów wapnia w komórce, ATP-azy wapniowe obniżające stężenie wapnia w cytoplazmie oraz wymieniacz wapniowo-sodowy.

Ad. 3. Trzecim głównym elementem regulującym poziom wapnia w komórce są ligandy cytoplazmatyczne, m. in. białka wiążące wapń, takie jak kalmodulina, troponina C, czy parwalbumina [21, 23, 30, 53]. Buforowanie wapnia, a więc udział w regulacji jego stężenia nie jest jednak ich główną funkcją. Główną funkcją tych białek jest bowiem odbieranie aktywowującego sygnału w postaci wzrastającego stężenia jonów wapnia i przeniesienie tego sygnału na specyficzne efekторы: enzymy i białka strukturalne.

HOMOLOGICZNE BIAŁKA MODULOWANE PRZEZ WAPŃ

Do grupy białek wiążących wapń należą m. in. kalmodulina, troponina C, parwalbumina, białka zależne od witaminy D, białko S-100 i onkomodulina. Są to białka o małym ciężarze cząsteczkowym (od 9 000 do 27 000) i kwaśne (punkt izoelektryczny około 4.0). Zbudowane są one

z podobnych elementów strukturalnych, (tzw. domen „EF-hand”). Wszystkie te białka występują w co najmniej dwóch stanach konformacyjnych: nieaktywnym (bez wapnia) i aktywnym (z wapniem), i dlatego nazywa się je białkami modulowanymi przez wapń. W stanie aktywnym łączą się one z białkami docelowymi (głównie enzymami) i aktywują je.

Najbardziej znanym przedstawicielem tej grupy białek jest kalmodulina, która została wykryta w 1970 roku jako aktywator fosfodwusterazy cyklicznych nukleotydów [32, 36]. Obecnie wiadomo, że jest to powszechne białko i wielofunkcyjny aktywator procesów fizjologicznych. Białko to ma ciężar cząsteczkowy około 17 000 i punkt izoelektryczny około 4.0. Cząsteczka składa się z czterech domen „EF-hand”, każda wiążąca jeden jon wapnia ze stałą dysocjacji około 10^{-6} M. Domena „EF-hand” to dwa odcinki α -heliksu połączone pętlą, w której znajduje się sześć reszt aminokwasowych kompleksujących jeden jon wapnia [30, 32].

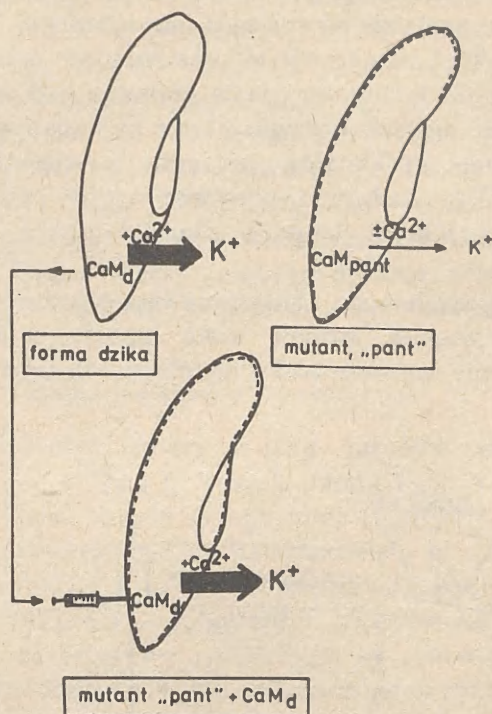
Po związaniu co najmniej trzech jonów wapnia cząsteczka kalmoduliny przyjmuje konformację aktywną, w której przyłącza się i aktywuje docelowe białka [36]. Lista procesów i enzymów regulowanych przez kompleks kalmodulina-wapń jest bardzo duża. Można je połączyć w pięć grup: 1) enzymy metabolizmu cyklicznych nukleotydów (fosfodwusterazy i cyklazy), 2) enzymy transportujące wapń, 3) kinazy i fosfatazy białkowe, 4) białka cytoszkieletowe i 5) inne. Wśród procesów, które określiłem jako inne jest m.in. aktywacja ATP-azy dyneinowej oraz aktywacja, zależnego od Ca^{2+} , kanału K^{+} *Paramecium*. Istnieją mutanty *Paramecium* „pant”, które utraciły prawie całkowicie zależny od Ca^{2+} kanał K^{+} (rys. 3). Następujące doświadczenie pokazuje, że mutacja ta dotyczy kalmoduliny [56]. Wyizolowano z formy dzikiej kalmodulinę, a następnie wstrzykiwano ją do cytoplazmy mutantów „pant”. Stwierdzono, że pojawiał się u tych mutantów kanał potasowy o normalnych właściwościach. Wstrzyknięcie kalmoduliny izolowanej z mutantu nie miało oczywiście żadnego wpływu. Wyniki te wskazują, iż cytoplazmatyczne białko, w tym przypadku kalmodulina, może aktywować kanał w błonie plazmatycznej.

Oprócz kalmoduliny w grupie białek modulowanych przez wapń znajdują się różne białka o specyficznych funkcjach i ograniczonym występowaniu:

— Troponina C to składnik kompleksu regulującego skurcz mięśni szkieletowych i sercowych [21].

— Białko S-100 występuje w dużej ilości w tkance mózgowej, reguluje agregację mikrotubul oraz aktywuje aldolazę [16].

— Białka wiążące wapń, zależne od witaminy D, biorą udział w akumulacji wapnia w jelicie cienkim [55].



Rys. 3. Regulacja zależnego od Ca^{2+} kanału K^+ u *Paramecium*. CaM_d — kalmodulina z formy dzikiej, CaM_{pant} — kalmodulina z mutantu „pant”

— Parwalbumina typu α , pełni rolę „buforu” wapniowego ułatwiającego rozkurcz mięśni szybkich [23].

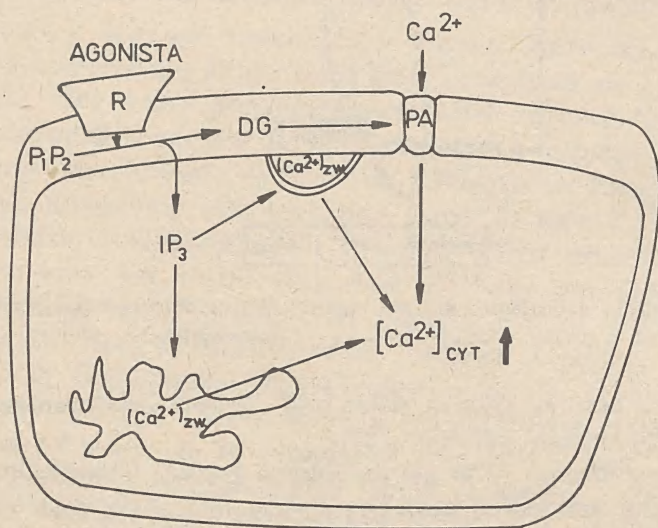
— Onkomodulina — to parwalbumina typu β , występująca w łożysku oraz w wielu komórkach nowotworowych [35]. Aktywuje ona fosfodwuesterazę cyklicznych nukleotydów i procesy mitotyczne.

AKTYWACJA KOMÓRKI — OTWARCIE KANAŁÓW WAPNIOWYCH

Po to, by homologiczne białka wiążące wapń mogły wypełnić swą funkcję aktywatora procesów fizjologicznych niezbędne jest precyzyjne sterowanie zmianami poziomu wolnych jonów wapnia w komórce. Do tego celu służą różne sposoby aktywacji komórki i różne układy transportujące jony wapnia przez błony. Aktywacja komórki odbywa się pod wpływem różnych bodźców, takich jak impuls nerwowy lub czynniki chemiczne [18]. W komórce znajdują się specyficzne receptory poszczególnych hormonów lub neurotransmiterów. Aktywacja niektórych z nich powoduje wzrost stężenia jonów wapnia w komórce [2] i dlatego nazywa

się je receptorami mobilizującymi wapń. Są to m.in. receptory muskarynowe, adrenergiczne, wazopresynowe i histaminowe. Naturalne i syntetyczne związki, które rozpoznają te receptory zwane są agonistami wapnia. Wzrost stężenia jonów wapnia w komórce pod wpływem agonistów wapniowych może zachodzić dzięki otwarciu kanałów w błonie plazmatycznej lub/i otwarciu kanałów organelli wewnątrzkomórkowych magazynujących Ca^{2+} , takich jak endoplazmatyczne retikulum, niezidentyfikowane w miejscach w błonach plazmatycznych, czy mitochondria [43, 44].

Niezmany jest mechanizm otwierania kanałów wapniowych pod wpływem agonistów wapnia. Istnieje kilka hipotez, z których największe uznanie ma obecnie hipoteza fosfatydyloinozytoli (rys. 4) [2, 17, 27]. We-



Rys. 4. Aktywacja receptora mobilizującego wapń. Wpływ produktów metabolizmu fosfolipidów na stężenie wapnia w komórce. R — receptor mobilizujący wapń; P_1P_2 — fosfatydyloinozytol, 4,5 dwufosforan; DG — dwuacyloglicerol; IP_3 — trójfosforan inozytoli; PA — kwas fosfatydowy; $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ — stężenie wolnych jonów wapnia w cytoplazmie; $(\text{Ca}^{2+})_{\text{zw}}$ — jony wapnia związane w organellach komórkowych

dług tej hipotezy aktywacja receptora mobilizującego wapń aktywuje fosfolipazę w błonach. Enzym ten hydrolizuje fosfatydyloinozytoli do dwuacyloglicerolu i trójfosfoinozytoli. Sugeruje się, że ten ostatni mobilizuje wapń z wewnątrzkomórkowych organelli magazynujących wapń. Uważa się, że kwas fosfatydowy powstaje z dwuacyloglicerolu, który ma właściwości jonoforu, może otwierać kanał wapniowy w błonie plazmatycznej.

Inne hipotezy zakładają, że aktywacja receptora mobilizującego wapń uwalnia małą ilość wapnia z wewnętrznej części błony plazmatycznej, i że te, uwolnione jony wapnia wywołują dalsze reakcje, tj. aktywują uwalnianie zmagazynowanego wapnia przez specyficzne kanały endoplazmatycznego retikulum. Jest to proces stwierdzony m.in. w sarkoplazmatycznym retikulum mięśnia sercowego i nazwany uwalnianiem wapnia pod wpływem wapnia (Ca^{2+} -induced Ca^{2+} -release) [19, 42]. Jeszcze inne hipotezy sugerują, iż jony wodorowe lub sodowe, albo produkty metabolizmu kwasu arachidonowego działają między aktywowanym receptorem i kanałami oraz miejscami magazynującymi wapń [18].

RODZAJE KANAŁÓW WAPNIOWYCH

Ogólnie można wyróżnić cztery rodzaje kanałów wapniowych [46]: 1) kanały wrażliwe na zmiany potencjału błony (VOC); 2) kanały wrażliwe na agonistów, tzw. kanały receptorowe (ROC); 3) „kanały” przepuszczalne; 4) „kanały” wrażliwe na napięcie;

Ad. 1. Kanały wapniowe wrażliwe na napięcie (voltage operated channels) występują we wszystkich organizmach zwierzęcych i u pierwotniaków. Kanały te nie są wrażliwe na specyficzne inhibitory kanałów sodowych, takie jak tetrodotoxyna, ale są silnie hamowane przez tzw. antagonistów Ca^{2+} , czyli związki, które hamują wzrost stężenia jonów wapnia w komórce, mimo działania czynnika mobilizującego wapń. Jest to niejednorodna grupa związków chemicznych o dużym znaczeniu klinicznym, m.in. w arytmii serca, *angina pectoris* i w nadciśnieniu.

Ad. 2. Kanały receptorowe (receptor operated channels) to droga przepływu wapnia, otwierana bez zmiany potencjału błony pod wpływem agonistów Ca^{2+} . Na ogół ta droga dopływu wapnia jest mniej wrażliwa na działanie antagonistów wapnia, niż kanały zależne od zmian potencjału. I jest to jedna z cech rozróżniających kanały VOC od kanałów ROC [3, 20].

Ad. 3. Dopływ Ca^{2+} przez „kanał” przepuszczalny (leak channel) jest konsekwencją dużego gradientu elektrochemicznego, który przepycha jony wapnia do komórki oraz faktu, że nie ma błony całkowicie nieprzepuszczalnej. Ten niewrażliwy na agonistów i antagonistów transport wapnia nazywa się kanałem tylko dla wygody, ale nie jest to kanał o klasycznej strukturze.

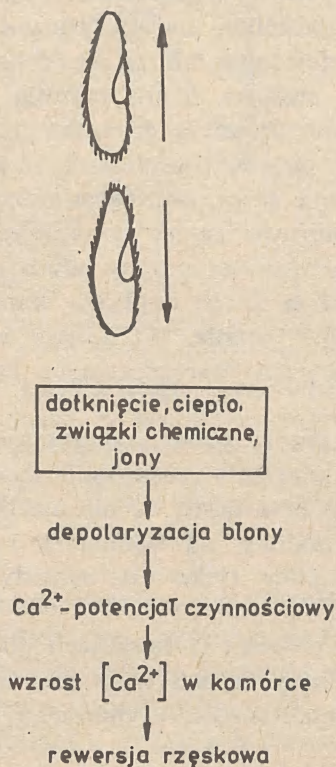
Ad. 4. Podobnie, stwierdzona w mięśniach gładkich naczyń krwionośnych droga przepływu wapnia pod wpływem mechanicznej perturbacji błony komórkowej (stretch sensitive channels) nie ma struktury typowego kanału [3].

Nie wszyscy autorzy zgadzają się z powyższą klasyfikacją, kwestionując istnienie specyficznych kanałów receptorowych [11, 24]. Autorzy

ci uważają, że wszystkie kanały wapniowe należą do kanałów wrażliwych na zmiany potencjału. Jednym z argumentów jest znalezienie w neuronach *Aplysia* i w mięśniu sercowym kanału, którego otwarcie jest zależne zarówno od zmiany potencjału, jak i obecności agonistów. W niektórych mięśniach gładkich, np. mięśniówce aorty podział na VOC i ROC może być jednak utrzymany. Wykazano tam, że działanie agonistów powoduje otwieranie kanałów wapnia bez zmiany potencjału błony i, że antagoniści wapnia nie mają praktycznie wpływu na ten proces. Natomiast kanały wapniowe tych mięśni otwierane pod wpływem zmiany potencjału błony są wrażliwe na działanie antagonistów.

KANAŁY WAPNIOWE U PIERWOTNIAKÓW

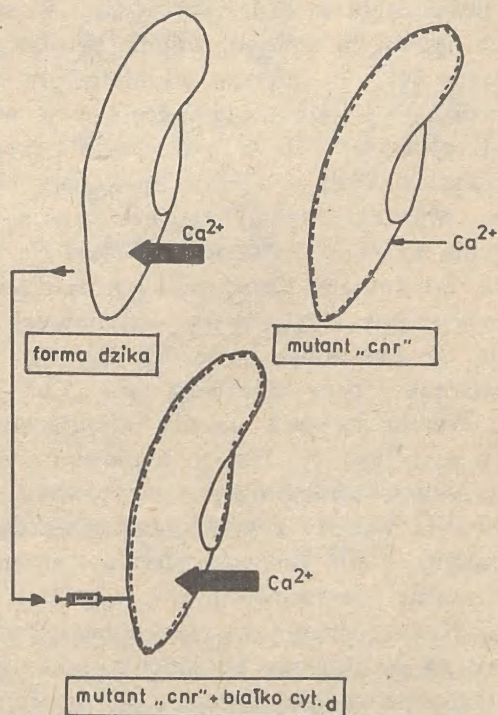
Pewne czynniki, takie jak dotknięcie, ciepło, niektóre związki i jony wywołują reakcję ucieczki u *Paramecium*, tzw. rewersję rzęskową. Na poziomie molekularnym czynniki te wywołują depolaryzację błony rzęskowej pantofelka co indukuje „wapniowy potencjał czynnościowy” i otwarcie kanału wapniowego (rys. 5) [31]. Jest to typowy kanał wrażliwy



Rys. 5. Mechanizm rewersji rzęskowej u *Paramecium*

na zmiany potencjału błony. Efektem otwarcia kanałów wapniowych w błonie jest wzrost stężenia wolnych jonów wapnia w cytoplazmie pantofoelka. Powoduje to, że rzęski zaczynają poruszać się szybciej i pod innym kątem niż zwykle (maks. 100°). Dzięki tej reakcji komórka *Paramecium* może się gwałtownie wycować z nieprzyjawnego środowiska. Po zaniku potencjału Ca^{2+} i wypompowaniu Ca^{2+} z cytoplazmy układ powraca do punktu wyjścia: *Paramecium* ponownie porusza się do przodu.

Wyizolowano mutant *Paramecium*, w którym praktycznie nie funkcjonują kanały wapniowe (rys. 6). Są to mutanty grupy „cnr” („cauda-



Rys. 6. Regulacja kanału wapniowego w błonie rzęskowej *Paramecium caudatum*. „cnr” — mutant *Paramecium* nie wykazujący rewersji rzęskowej

tum non reversal), w których depolaryzacja błony nie powoduje wzrostu stężenia jonów wapnia wewnątrz komórki, a osobniki nie są zdolne do rewersji rzęskowej.

Stwierdzono, że cytoplazma z formy dzikiej *Paramecium* wstrzyknięta mutantom „cnr” przywracała ich kanałom właściwości charakterystyczne dla formy dzikiej [22]. Pojawiał się wapniowy potencjał czynnościowy, prąd wapniowy oraz utrzymująca się przez 2-3 dni zdolność do rewersji

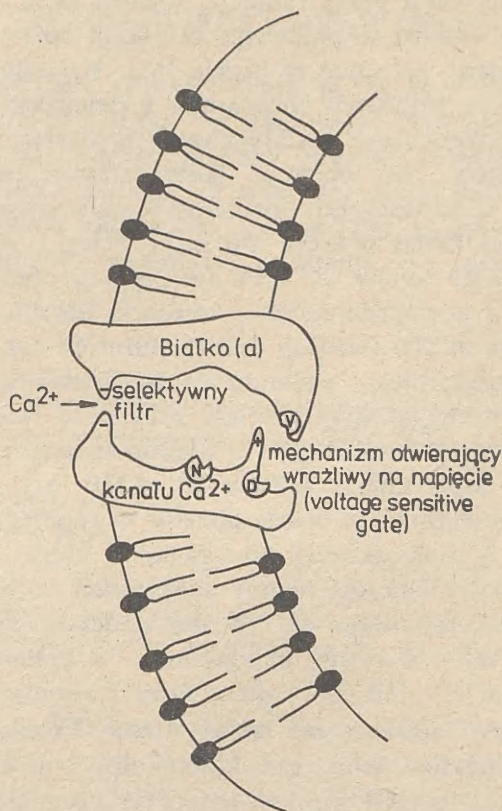
rzęskowej. Udało się częściowo oczyścić czynnik cytoplazmatyczny, który przywracał mutantom „cnr” aktywność kanału wapniowego. Stwierdzono, że czynnik ten to białko rozpuszczalne, wrażliwe na temperaturę, kwaśne (pI 4,5-5,0), o ciężarze poniżej 30 000. Nie jest to jednak kalmodulina, ale jakieś niezidentyfikowane białko.

KANAŁY WAPNIOWE U ZWIERZĄT

U zwierząt kanały wapniowe wrażliwe na napięcie pełnią istotną rolę w uwalnianiu neurotransmiterów, tworzeniu potencjału czynnościowego serca i sprzężeniu pobudzenia ze skurczem mięśni. W niektórych komórkach, np. neuronach, głównym źródłem wapnia są płyny ustrojowe, czyli środowisko zewnętrzne [47]. W mięśniu szkieletowym przeciwnie, uwalniane w czasie skurczu jony wapnia pochodzą prawie wyłącznie z sarkoplazmatycznego retikulum [1, 24]. W pierwszym przypadku czynne są kanały w błonie plazmatycznej, a w drugim kanały błon sarkoplazmatycznego retikulum. Mięsień sercowy reprezentuje sytuację pośrednią. W wyniku pobudzenia mięśnia najpierw otwierają się kanały sarkolemmy i wapń wpływa do komórki. Następnie wzrastające stężenie jonów wapnia indukuje otwieranie się kanałów wapniowych w sarkoplazmatycznym retikulum, co dodatkowo zwiększa stężenie jonów wapnia w komórce. Jest to właśnie proces określany jako „ Ca^{2+} -induced Ca^{2+} release” [19, 39, 40]. Wzrost stężenia wapnia inicjuje skurcz i jednocześnie działa hamująco na te kanały. Jest to hamowanie przez wapń zależnego od wapnia procesu uwalniania wapnia. Zjawisko to wyjaśnia, dlaczego proces uwalniania wapnia z sarkoplazmatycznego retikulum jest procesem stopniowanym, a nie zachodzi według „zasady wszystko albo nic”. Podobne hamowanie obserwowano w przypadku kanałów wapniowych *Paramecium*. Kanały wapniowe sarkoplazmatycznego retikulum są również wrażliwe na nukleotydy adeninowe, takie jak np. ATP. Zarówno ATP, jak i jego analogi nie ulegające hydrolizie działają podobnie i dlatego uważa się, że nie działają one w procesach enzymatycznych, np. fosforylacji. Postuluje się, że wiążą się one z kanałem wapniowym i umożliwiają w ten sposób jego aktywację przez wapń [19, 39, 40, 47, 48].

RECEPTORY ANTAGONISTÓW KANAŁÓW WAPNIOWYCH

Wykrycie antagonistów wapnia umożliwiło biochemiczną charakterystykę kanałów wapniowych, a w szczególności ich receptorów. Antagoniści wapnia tworzą zróżnicowaną grupę związków chemicznych, działających na różne miejsca kanału wapniowego (rys. 7) [13, 33, 46, 52].



Rys. 7. Schemat kanału wapniowego w błonie plazmatycznej. N — miejsca wiązania pochodnych dwuhydropirydyny (np. nitrendipiny), D i V — miejsca wiązania diltiazemu i verapamilu

Dwuhydropirydyna (DHP), w tym nitrendipina i nifedipina wiążą się z miejscem o dużej stałej powinowactwa i hamują transport wapnia. Drugą grupę związków stanowią verapamil i diltiazem, które również blokują przepływ kationów przez kanał, ale wiążą się z miejscami o małej stałej powinowactwa. Związki te wpływają dwójako na wiązanie DHP, a mianowicie verapamil allosterycznie hamuje wiązanie DHP, podczas gdy diltiazem zwiększa wiązania tego związku [46]. Użycie radioaktywnych antagonistów wapnia umożliwiło opracowanie testu identyfikującego receptor kanałów wapniowych w czasie jego oczyszczania. Dzięki temu, po solubilizacji błon przy użyciu digitoniny, można było wyizolować receptory antagonistów wapnia z różnych tkanek. Po oczyszczeniu receptora z mięśni szkieletowych stwierdzono, że składa się on z trzech podjednostek o ciężarach około 130 000, 50 000 i 32 000, obecnych w stosunku równomolarnym. Całkowity ciężar receptora, wyzna-

czony metodą inaktywacji przez radiację, wynosi około 200 000. Stwierdzono, że receptor kanału wapniowego w stanie rozpuszczonym wiąże DHP, tak jak natywny receptor w błonie [51]. Ponadto, wiązanie DHP było zmniejszone pod wpływem verapamilu i zwiększone pod wpływem diltiazemu, a więc zachowane zostały charakterystyczne miejsca wiązania tych antagonistów. Nie wiadomo jakie funkcje mają poszczególne podjednostki i czy są to wszystkie elementy kanału wapniowego. W normalnych warunkach kanał otwiera się na 1 msec i wtedy przechodzi przez niego około 1000 jonów Ca^{2+} . Po fosforylacji przez kinazę zależną od cAMP wzrasta prawdopodobieństwo otwarcia kanału. Obecnie uważa się, że podjednostka 50 000 (według innych autorów ma ona 33 000) jest podjednostką regulatorową podobną do fosfolambanu, tj. regulatora ATPazy wapniowej sarkoplazmatycznego retikulum mięśnia sercowego. Białko to, podobnie jak fosfolamban z sarkoplazmatycznego retikulum, jest fosforylowane przez kinazę zależną od cAMP [51]. Większość autorów uważa, iż kalmodulina nie bierze udziału w regulacji kanałów wapniowych. Ostatnio jednak ukazała się praca, w której sugeruje się, iż kalmodulina jest potrzebna do pełnej aktywności niektórych kanałów wapniowych mięśnia sercowego [4]. W doświadczeniach tych wprowadzono do komórek serca w różnej kolejności — za pomocą liposomów — następujące substancje: inhibitor kalmoduliny (calmidazolium), inhibitor kinazy białkowej zależnej od cAMP, samą kinazę białkową oraz kalmodulinę. Po dodaniu inhibitora kalmoduliny, a następnie kinazy białkowej zależnej od cAMP zanikał potencjał czynnościowy, a potencjał spoczynkowy błony ulegał depolaryzacji. Dodanie jednostki katalitycznej kinazy białkowej przywracało tylko częściowo potencjał czynnościowy. Powrót do stanu wyjściowego był możliwy tylko po dodaniu kalmoduliny. Doświadczenia, w których dodawano najpierw kalmodulinę, a potem kinazę wykazały, że kalmodulina sama nie przywraca aktywności kanału i może jedynie wzmocnić efekt kinazy zależnej od cAMP. Autorzy tego doświadczenia sugerują, iż kanał wapniowy jest regulowany przez dwie kinazy białkowe: pierwsza to kinaza białkowa zależna od cAMP (do czego nie ma większych wątpliwości), a druga to kinaza zależna od kalmoduliny. Wyniki te należy traktować z rezerwą. Nie zostały one bowiem potwierdzone przez innych autorów, a i sama metoda — wprowadzanie białek do komórek za pomocą liposomów — jest obecnie mocno krytykowana. Ponadto, wyniki te są niespójne z doniesieniem na temat inaktywacji kanałów wapniowych przez fosfatazę zależną od kalmoduliny. Autorzy tej pracy stwierdzili bowiem, że calcineuryna wzmacnia hamowanie kanałów wapniowych przez wapń i zaproponowali, że tę inaktywację powoduje defosforylacja białka fosforowego przez kinazę zależną od cAMP [14].

Ca²⁺-ATP-azy BŁON PLAZMATYCZNYCH

Błony plazmatyczne różnych komórek, w tym sarkolemma, zawierają ATPazę wapniową, która wypompowuje Ca²⁺ na zewnątrz komórki (rys. 2) [7-9, 37, 41]. Ciężar ATPazy wynosi około 138 000. Hydroliza jednej cząteczki ATP pociąga za sobą transport jednego jonu wapnia (Tabela 1). Regulacja aktywności Ca²⁺-ATPaz plazmatycznych jest złożona, przynajmniej w niektórych tkankach. We wszystkich badanych

Tabela 1

Porównanie Ca²⁺-ATPaz z błon mięśnia sercowego

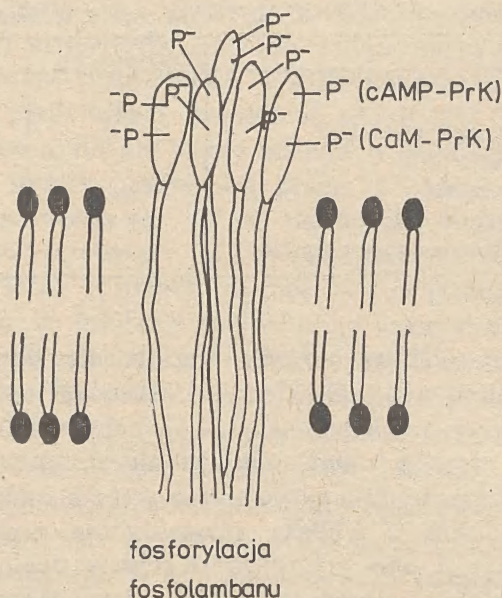
	Plazmatyczne	SR
M _{cz}	138	110
Stechiometria Ca ²⁺ /ATP	1	2
Aktywacja przez:		
kalmodulinę	tak	nie
fosforylację fosfolambanu	tak (?)	tak
fosfolipidy i kwasy tłuszczowe	tak	nie

dotąd przypadkach ATPaza błonowa wiązała się bezpośrednio z kompleksem kalmodulina-wapń. Efektem tej interakcji było zwiększone powinowactwa ATPazy względem wapnia: Km zmieniała się z 10 μM na 0.4 μM czyli 25 razy. A zatem zmniejszanie stężenia jonów wapnia w cytoplazmie jest bezpośrednio aktywowane przez kolmodulinę [36, 49, 50]. Interakcję kalmoduliny z ATPazą plazmatyczną wykorzystano do jej wyizolowania, m.in. z błon erytrocydów stosując metodę chromatografii powinowactwa. ATPaza wpaniowa z błon plazmatycznych jest również aktywowana przez fosfolipidy i nienasycone kwasy tłuszczowe, które zastępują działanie kalmoduliny i Ca²⁺. Ostatnio pojawiły się doniesienia o obecności w sarkolemnie białka podobnego do fosfolambanu sarkoplazmatycznego retikulum. Stwierdzono, że ulega ono podwójnej fosforylacji zależnej od cAMP i Ca²⁺-kalmoduliny [9, 26]. Nie wiadomo czy fosoforylacja tego białka wpływa na aktywność ATPazy.

Ca²⁺-ATP-aza Z ENDOPLAZMATYCZNEGO RETIKULUM

Sarkoplazmatyczne retikulum wypompowuje Ca²⁺ z cytoplazmy za pomocą ATPazy różnej od ATPazy błonowej (Tabela 1). Ca²⁺-ATPaza sarkoplazmatycznego retikulum jest białkiem integralnym błon o masie około 150 000-110 000 [8, 9, 25, 38]. Enzym ten wykazuje duże powinowactwo względem wapnia (stała Michaelisa wynosi poniżej 1 μM).

Hydroliza jednej cząsteczki ATP jest równoważna z przeniesieniem dwóch jonów wapnia. Wypompowany z cytoplazmy Ca^{2+} jest magazynowany wewnątrz błon sarkoplazmatycznego retikulum w połączeniu z białkami, takimi jak kalsekwestryna. W ten sposób nie ma on wpływu na stężenie wolnych jonów wapnia w cytoplazmie. Stwierdzono, że aktywność ATPazy zależy od stopnia ufosforylowania błonowego białka zwanego fosfolambanem (rys. 8). Każda podjednostka (postuluje się, że



Rys. 8. Fosforylacja fosfolambanu w błonach sarkoplazmatycznego retikulum mięśnia sercowego. P^- — miejsca fosforylowane przez kinazę białkową zależną od cAMP (cAMP-PrK) i przez kinazę białkową zależną od wapnia i kalmoduliny (CaM-PrK)

występuje on w postaci pentameru) ma dwa miejsca fosforylacji: jedno rozpoznawane przez kinazę zależną od cAMP, a drugie przez kinazę zależną od Ca^{2+} i kalmoduliny. Chociaż fosfolamban nie wiąże się z Ca^{2+} -ATPazą bezpośrednio, to jednak, im więcej reszt fosforanowych jest przyłączonych do fosfolambanu, tym większe jest powinowactwo Ca^{2+} -ATPazy względem Ca^{2+} , a co za tym idzie wydajność pompy wapniowej [29, 34, 57]. Tak więc, akumulacja jonów wapnia przez sarkoplazmatyczne retikulum jest pośrednio aktywowana przez kompleks Ca^{2+} -kalmodulina.

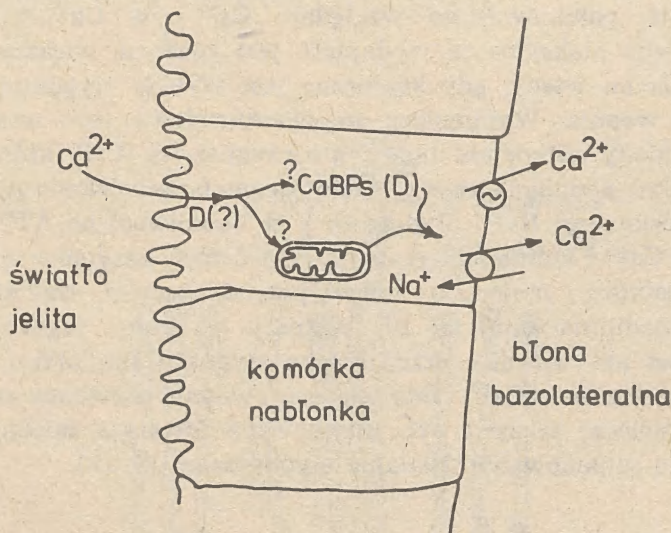
WYMIENIACZ $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$

Wymieniacz wapniowo-sodowy występuje m.in. w błonie plazmatycznej serca, aksonów, w wewnętrznej błonie mitochondrialnej i prawdopodobnie w błonie plazmatycznej wątroby (rys. 2). Wymieniacz ten pracuje ze stechiometrią: jeden jon Ca^{2+} na trzy jony Na^+ [7-10]. Kompensację ładunku uzyskuje się *in vivo*, przez transport Cl^- razem z Na^+ i/lub przez transport K^+ w tym samym kierunku co Ca^{2+} . Wymieniacz ma mniejsze powinowactwo względem Ca^{2+} niż Ca^{2+} -ATPaza błonowa, ale jego maksymalna wydajność jest znacznie większa. Sugeruje się, że działa on wtedy, gdy konieczne jest szybkie wypompowanie dużych ilości wapnia. Wymieniacz wapniowo-sodowy jest wrażliwy nie tylko na zmiany potencjału błony, ale również na ATP, które zwiększa powinowactwo wymieniacza względem wewnątrzkomórkowego Ca^{2+} i zewnątrzkomórkowego Na^+ . Stwierdzono, że wrażliwość na ATP polega na zależnej od Ca^{2+} i kalmoduliny aktywności dwóch enzymów sarkolemy: kinazy i fosfatazy, mających różne powinowactwo względem kompleksu kalmodulina-wapń [9, 10]. Autorzy tej pracy sugerują, że wymieniacz jest aktywowany przez kinazę stymulowaną przez Ca^{2+} tylko do pewnego stężenia Ca^{2+} . Gdy stężenie wapnia zwiększa się powyżej wartości progowej zaczyna być aktywowana fosfataza zależna od Ca^{2+} , co powoduje zahamowanie działania wymieniacza [9, 10].

AKUMULACJA JONÓW WAPNIA W JELICIE

Głównym miejscem akumulacji jonów wapnia w organizmie zwierzęcym jest jelito cienkie. Proces akumulacji zależy od witaminy D [15, 45, 55]. Jony wapnia pobierane ze światła jelita przez komórki nabłonka jelita, są przenoszone na drugi koniec komórki (basolateralny) i tam uwalniane (rys. 9). Pobierane z pożywienia jony wapnia przechodzą zatem przez dwie błony komórek nabłonka: najpierw zgodnie z gradientem stężeń przez błonę luminalną, potem przez błonę basolateralną — przeciwko gradientowi stężeń wapnia. Nie wiele wiadomo o mechanizmie przechodzenia wapnia do wnętrza komórki. Przypuszcza się, że odbywa się to przez kanały wapniowe. Ostatnio wyizolowano z błony luminalnej białko wiążące wapń o ciężarze około 20 000, które prawdopodobnie stanowi element systemu pobierającego wapń. [45]. Transport wapnia z jednego końca komórki do przeciwnego końca odbywa się albo przy udziale białek wiążących wapń, albo przy udziale organelii wewnątrzkomórkowych, takich jak mitochondria czy aparat Golgiego. Znane są dwa białka wiążące wapń występujące w cytoplazmie komórek nabłonka jelita, które mogą brać udział w tym procesie. Są to białka o ciężarze 9 000 i 28 000, które należą do omówionej wcześniej

grupy białek modulowanych przez wapń. Ich synteza zależy bezpośrednio od witaminy D [55]. Jony wapnia znajdujące się w pobliżu błony basolateralnej są następnie wypompowywane przez Ca^{2+} -ATPazę i/lub przez wymiennicz wapniowo-sodowy.



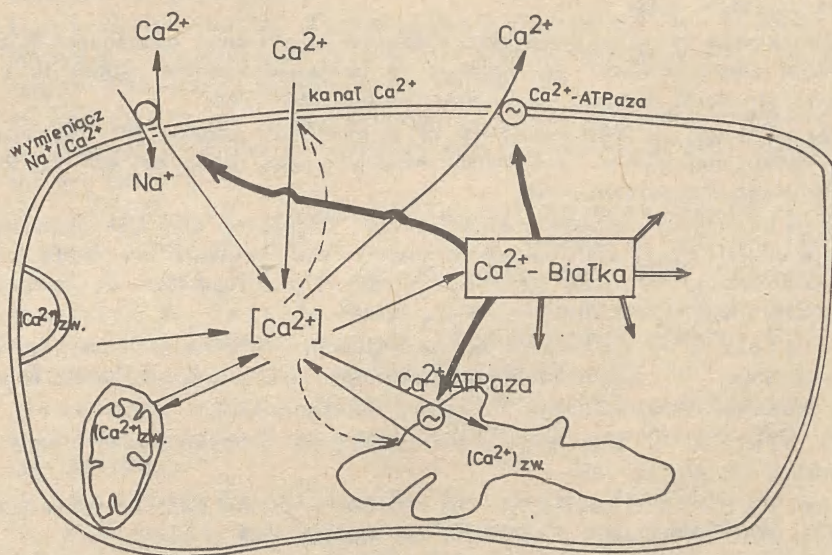
Rys. 9. Akumulacja jonów wapnia przez komórki nabłonka jelita. D — miejsca działania witaminy D; CaBPs — białka modulowane przez wapń o ciężarze 9 000 i 27 000, których synteza zależy bezpośrednio od witaminy D

HOMEOSTAZA WAPNIOWA KOMÓREK NOWOTWOROWYCH

Stwierdzono, że poziom wolnego wapnia oraz białek modulowanych przez wapń (np. kalmoduliny czy białka S-100) jest większy w komórkach nowotworowych niż w komórkach normalnych [28, 54, 58]. Ponadto, w komórkach nowotworowych pojawiają się nowe białka wiążące wapń, takie jak onkomodulina [35], zmienia się również wrażliwość na wapń niektórych procesów komórkowych [54, 58]. I tak, np. normalne komórki hodowane *in vitro* wymagają do wzrostu milimolowych stężeń wapnia w pożywce. Tymczasem komórki nowotworowe mogą rosnąć na pożywce bez wapnia. Nie wyjaśniono dotychczas czy obserwowane zmiany dotyczą białek wiążących wapń, które regulują procesy komórkowe czy też dotyczą białek biorących udział w transporcie wapnia.

PODSUMOWANIE

Na rysunku 10 zaznaczono niektóre powiązania systemów wrażliwych na jony wapnia. Pokazano, że istnieje zależność między błonowymi układami transportującymi jony wapnia i białkami wiążącymi wapń, np. Ca^{2+} -ATPaza w błonach plazmatycznych i w błonach endoplazmatycznego retikulum oraz wymiennicz wapniowo-sodowy są aktywowane po-



Rys. 10. Homeostaza wapnia w komórce. Grube strzałki pokazują miejsca współdziałania błonowych układów transportujących jony wapnia z białkami modulowanymi przez wapń; strzałki przerywane pokazują miejsca aktywacji hamowania kanałów wapniowych przez jony wapnia; reszta oznaczeń tak jak na rys. 2

średnio lub bezpośrednio przez kompleks kalmodulina-wapń. Ponadto, postuluje się obecność mechanizmu, dzięki któremu wapń aktywuje, a w pewnych warunkach hamuje kanały wapniowe w błonach plazmatycznych i w błonach endoplazmatycznego retikulum. Wszystkie te powiązania wskazują, że problemy regulacji poziomu wapnia w komórce, a co za tym idzie wielu procesów komórkowych są bardzo złożone i skomplikowane.

Pracę wykonano w ramach CPBP 04.01.

LITERATURA

1. Almers W., McCleskey E. W., Palade P. T. — *Calcium channels in vertebrate skeletal muscle*. W: *Calcium in biological systems*. Rubin. R. P. i wsp. (red.), str. 321-330. Plenum Press, New York-London, 1985.

2. Berridge M. J. — *Calcium-mobilizing receptors: membrane phosphoinositides and signal transduction*. W: *Calcium in biological systems*. Rubin i wsp. red., str. 31-44. Plenum Press, NewYork-London, 1985.
3. Bevan J. A., Hwa J. J., Owen M. P., Winkquist R. J. — *Calcium and myogenic or stretch-dependent vascular tone*. W: *Calcium in biological systems*. Rubin R. P. i wsp. (red.), str. 391-398. Plenum Press, New York-London, 1985.
4. Bakaly G., Sperelakis N. — *Calmodulin is required for a full activation of the calcium slow channels in heart cells*. J. Cycl. Nucl. Prot. Phosph. Res. 11: 25-34, 1986.
5. Blaustein M. P. — *Intracellular calcium as a second messenger: What's so special about calcium?* W: *Calcium in biological systems*. Rubin R. i wsp. (red.), str. 23-33. Plenum Press, New York-London, 1985.
6. Carafoli E. — *The regulation of intracellular calcium* W: *Regulation of phosphate and mineral metabolism*. Massry i wsp. (red.), str. 461-472, Plenum Publishing Corporation, 1982.
7. Carafoli E. — *Plasma membrane Ca^{2+} transport, and Ca^{2+} handling by intracellular stores and integrated picture with emphasis on regulation*. W: *Mechanisms of intestinal electrolyte transport and regulation by calcium*. str. 121-134. Alan R. Liss Inc., New York, 1984.
8. Carafoli E. — *Calmodulin in the regulation of calcium fluxes in cardiac sarcolemma*. W: *Advances in myocardiology*. t. 5, Harriss P., Poole-Wilson P. A. (red.), str. 97-101. Plenum Publishing Company, 1985.
9. Carafoli E. — *The homeostasis of calcium in heart cells*. J. Mol. Cell Cardiol. 17: 203-212, 1985.
10. Caroni P., Carafoli E. — *The regulation of the Na^{+} - Ca^{2+} exchanger of heart sarcolemma*. Eur. J. Biochem. 132: 451-460, 1983.
11. Casteels R., Droogmans G. — *Role of Ca^{2+} and effect of Ca^{2+} entry blockers on excitations-contraction and excitation-secretion coupling*. W: *Calcium in biological systems*. Rubin R. P. i wsp. (red.), str. 453-457. Plenum Press, New York-London, 1985.
12. Casteels R., Wuytack B., Himpens B., Raeymaekers L. — *Regulatory systems for the cytoplasmic calcium concentration in smooth muscle*. Biomed. Biochim. Acta 45: 147-152, 1986.
13. Cavero I., Spedding M. — *"Calcium antagonist": A class of drugs with a bright future*. Part I. Cellular calcium homeostasis and calcium as a coupling messenger. Life Sci. 33: 2571-2581, 1983.
14. Chad J., Eckert R. — *Biophys. J.* 47: 266a, 1985.
15. DeLuca H. F. — *The vitamin D-calcium axis-1983*. W: *Calcium in biological systems*. Rubin R. P. i wsp. (red.), str. 491-511, Plenum Press, New York-London, 1985.
16. Donato R. — *S-100 proteins*. Cell Calcium 7: 123-145, 1986.
17. Eichberg J., Harrington C. A. — *Receptor-mediated changes in hepatocyte phosphoinositide metabolism: Mechanism and significance*. W: *Calcium in biological systems*. Rubin R. P. i wsp. (red.), str. 53-60. Plenum Press, New York-London, 1985.
18. Exton J. H. — *Adrenergic agonist and Ca^{2+} movement*. W: *Calcium and cell function*. Cheung W. Y. (red.), str. 64-97. Academic Press, New York-London, 1985.

19. Fabiato A. — Calcium both activates and inactivates calcium release from cardiac sarcoplasmic reticulum. W: *Calcium in biological systems*, Rubin R. P. i wsp. (red.), str. 369-375, Plenum Press, New York-London, 1985.
20. Godfraind T. — Cellular and subcellular approaches to the mechanism of action of calcium antagonists. W: *Calcium in biological systems*, Rubin R. P. i wsp. (red.), str. 411-421, Academic Press, New York-London, 1985.
21. Grabarek Z., Kuźnicki J. — Homologiczne białka wiążące wapń. *Post. Biochem.* 26: 209-224, 1980.
22. Haga N., Forte M., Ramanathan R., Saimi Y., Takahashi M., Kung C. — Purification of a soluble protein controlling Ca^{++} channel activity in *Paramecium*. *Biophys. J.* 45: 130-132, 1984.
23. Heizmann C. W. — Parvalbumin, an intracellular calcium-binding protein; distribution, properties and possible roles in mammalian cells. *Experientia* 40: 910-921, 1984.
24. Hermsmeyer K. — Calcium antagonists effects on vascular muscle membrane potentials and intracellular Ca^{2+} . W: *Calcium in biological systems*, Rubin R. P. i wsp. (red.), str. 423-430, Plenum Press, New York-London, 1985.
25. Hoffman W., Sarzala M. G., Chapman D. — Rotational motion and evidence for oligomeric structures of sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -activated ATPase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76: 3860-3864, 1979.
26. Huggins J. P., England P. J. — Sarcolemmal phospholamban is phosphorylated in isolated rat hearts perfused with isoprenaline. *FEBS Lett.* 163: 297-302, 1983.
27. Kaibuchi K., Sawamura M., Katakami Y., Kikkawa U., Takai Y., Nishizuka Y. — Calcium mobilization and phospholipid degradation in signal transduction. W: *Calcium regulation in biological systems*, Ebashi S. i wsp. (red.), str. 105-115, Academic Press, Tokyo, 1984.
28. Kato K., Haimoto H., Aryoshi Y., Horisawa M., Washida H., Kimura S. — High levels of S-100 protein in tumor tissues and in sera of patients with renal cell carcinoma. *Jpn. J. Cancer Rec.* 76: 856-862, 1985.
29. Kranias E. G., Nakamura J., Schwartz A. — Phospholamban, the regulator of the cardiac sarcoplasmic reticulum calcium pump, does not copurify with the Ca^{2+} -ATPase enzyme. *Biochim. Biophys. Acta* 749: 62-68, 1983.
30. Kretsinger R. H. — Structure and evolution of calcium-modulated proteins. *CRC Crit. Rev. Biochem.* 8: 119-174, 1978.
31. Kung C., Saimi Y. — Ca^{2+} channels of *Paramecium*: multidisciplinary study. *Current Topics in Membranes and Transport* 23: 45-66, 1985.
32. Kuźnicki J., Drabikowski W. — Kalmodulina — aktywator procesów regulowanych przez jony wapnia. *Post. Bioch.* 26: 265-290, 1980.
33. Levitan I. B. — Phosphorylation of ion channels. *J. Membrane Biol.* 87: 177-190, 1985.
34. Louis C. F., Maffitt M., Jarvis B. — Factors that modify the molecular size of phospholamban, the 23,000 dalton cardiac sarcoplasmic reticulum phosphoprotein. *J. Biol. Chem.* 257: 15181-15186, 1986.
35. MacManus J. P., Whitfield J. F. — Oncomodulin: A calcium binding protein from hepatoma. W: *Calcium and cell function*, t. 4, Cheung W. Y. (red.), str. 412-440. Academic Press, New York-London, 1983.

36. Manalan A. S., Klee C. — *Calmodulin*. Adv. Cyclic Nucl. Prot. Phosph. Res. 18: 227-278, 1984.
37. Michalak M., Famulski K., Carafoli E. — *The Ca^{2+} -pumping ATPase in skeletal muscle sarcolemma. calmodulin dependence, regulation by cAMP-dependant phosphorylation and purification*. J. Biol. Chem. 259: 15540-15547, 1984.
38. Michalak M., Sarzała M. G. — *Asymetria błon biologicznych*. Post. Biochem. 23: 523-539, 1977.
39. Morii H. — *The effects of adenine nucleotide and external Ca^{2+} on Ca^{2+} release from fragmented sarcoplasmic reticulum in the presence of Mg^{2+}* . W: *Structure and function of sarcoplasmic reticulum*. Fleischer S. i Tonomura Y. (red.), str. 439-452. Academic Press, Orlando, 1985.
40. Ogawa Y., Harfuji H., Kurebayashi N. — *Mechanism of calcium release from sarcoplasmic reticulum: Effect of caffeine on magnesium binding to fragmented sarcoplasmic reticulum from bullfrog skeletal muscle*. W: *Structure and function of sarcoplasmic reticulum*. Fleischer S. i Tonomura Y. (red.), str. 411-427. Academic Press, Orlando, 1985.
41. Penniston J. T. — *Plasma membrane Ca^{2+} -ATPases as active Ca^{2+} pumps*. W: *Calcium and cell function*. t. 4. Cheung W. Y. (red.), str. 100-149. Academic Press, New York-London, 1983.
42. Putney J. W., Jr — *A model for receptor-regulated calcium entry*. Cell Calcium 7: 1-12, 1986.
43. Rasmussen H. — *Calcium ion: A synarchic and mercurial but minatory messenger*. W: *Calcium in biological systems*. Rubin R. P. (red.), str. 13-22. Plenum Press, New York-London, 1985.
44. Rasmussen H. — *Pathways of amplitude and sensitivity modulation in the calcium messenger system*. W: *Calcium and cell function*. t. IV, Cheung W. Y. (red.), str. 2-61. Academic Press, New York, 1983.
45. Schachter D., Kowarski S. — *Vitamin D and the intestinal calcium-binding protein*. W: *Calcium in biological systems*. Rubin R. P. i wsp. (red.), str. 513-518. Plenum Press, New York-London, 1985.
46. Schramm M., Towart R. — *Modulation of calcium channel function by drugs*. Life Sci. 37: 1843-1860, 1985.
47. Silinsky E. M. — *Calcium and transmitter release. Modulation by adenosine derivatives*. W: *Calcium in biological systems*. Rubin R. P. i wsp. (red.), str. 109-119. Plenum Press, New York-London, 1985.
48. Smith J. S., Coronado R., Meissner G. — *Sarcoplasmic reticulum contains adenine nucleotide-activated calcium channels*. Nature 316: 446-449, 1985.
49. Szyja W., Sarzała M. G., Drabikowski W. — *Activation of Ca^{2+} pumping ATPase from erythrocyte ghost by calmodulin and its fragments*. W: *Calcium binding proteins*. de Bernard i wsp. (red.), str. 143-147. Elsevier Science Publishers, Amsterdam-New York-Oxford, 1983.
50. Szyja W., Wrzosek A., Brzeska H., Sarzała M. G. — *Interaction of calmodulin and its fragments with Ca^{2+} -ATPase and myosin light chain kinase*. Cell Calcium 7: 73-88, 1986.
51. Talvenheimo J. A. — *The purification of ion channels from excitable cells*. J. Membrane Biol. 87: 77-91, 1985.

52. Trautwein W., Pelzer D. — *Voltage-dependent gating of single calcium channels in the cardiac cell membrane and its modulation by drugs*. W: *Calcium and cell physiology*. Marne D. (red.), Springer-Verlag, Berlin, str. 53-59, 1985.
53. Van Eldik L. J., Zendegui J. G., Marshak D. R., Watterson D. M. — *Calcium binding proteins and the molecular basis of calcium action*. *Inter. Rev. Cyt.* 77: 1-61, 1982.
54. Veigl M. L., Vanaman T. C., Sedwick W. D. — *Calcium and calmodulin in cell growth and transformation*. *Biochim. Biophys. Acta* 738: 21-48, 1984.
55. Wasserman R. H., Fullmer C. S. — *Calcium transport proteins, calcium absorption and vitamin D*. *Ann. Rev. Physiol.* 43: 375-396.
56. Watterson D. M. — *Site specific mutagenesis and molecular mechanisms of calmodulin action*. *Proc. of Inter. Symp. on Calcium and Calcium Binding Proteins. Molecular and Functional Aspects*, Crans-Montana, 1986.
57. Wegner A. D., Simmerman K. B., Lepnieks J., Jones L. R. — *Proteolytic cleavage of phospholamban purified from canine cardiac sarcoplasmic reticulum vesicles*. *J. Biol. Chem.* 261: 5154-5159, 1986.
58. Whitfield J. F., Boynton A. L., MacManus J. P., Sikorska M., Tsang B. K. — *The regulation of cell proliferation by calcium and cyclic AMP*. *Mol. Cell. Biochem.* 27: 155-179, 1979.

LESZEK KACZMAREK

Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego
PAN, WarszawaPOBUDZENIE RECEPTORÓW BŁONOWYCH A AKTYWACJA
GENÓW

Wrażliwość komórki na bodźce pochodzące ze środowiska zewnętrznego wyraża się zdolnością do odebrania sygnału, a następnie do wykonania odpowiedniej reakcji. Reakcja ta polega na zmianie w budowie, czy też funkcjonowaniu komórki.

Od strony molekularnej możemy wyróżnić dwa podstawowe składniki odpowiedzi komórki. Pierwszy składnik to zmiany struktury, a przez to i funkcji już istniejących białek. W terminologii biologii molekularnej określa się to jako zmiany potranslacyjne. Można do nich zaliczyć fosforylację, metylację, acetylację, glikozylację itp. reszt aminokwasowych w białkach. Do tej samej kategorii należy także włączyć niekowalencyjne wiązanie przez białka małych cząsteczek, np. cAMP. Wszystkie te procesy doprowadzają do modulacji aktywności obecnych w komórce białek, co wyrażać się może (w zależności od typu białka) np. otwarciem kanałów jonowych, pobudzeniem do katalizy enzymatycznej, czy też zmianą struktury cytoszkieletu. Procesy tego rodzaju stanowią podstawy krótkoczasowej składowej reakcji komórki na bodziec. Utrzymują się one bowiem zwykle od ułamków sekund do kilku godzin.

Istnieją również inne zjawiska wywołane działaniem bodźców zewnętrznych. Zjawiska, które pozwalają komórce na znacznie dłużej trwającą modyfikację czynności i budowy, prowadzącą nawet do głębokich zmian fenotypu komórki. Istotą reakcji tego drugiego rodzaju są, z punktu widzenia biologii molekularnej, zmiany ekspresji genów. Tu krótkie wyjaśnienie. Jako miarę ekspresji genu przyjmujemy poziom mRNA — swoistego produktu danego genu. Dla większości genów poziom mRNA wiernie odzwierciedla tempo jego wytwarzania.

Wykaz stosowanych skrótów: cAMP — 3',5'—cykliczny adenozymonofosforan; cGMP — 3',5'—cykliczny guanozymonofosforan; DG — dwugliceryd; EGF — epidermalny czynnik wzrostowy; FCS — płodowa surowica cielęca; IL-2 — interleukina 2; IP₃ — 1,4,5-trójfosforan inozytolu; NGF — nerwowy czynnik wzrostowy; PDGF — płytkowy czynnik wzrostowy; PHA — fitohemaglutynina; PIP₂ — dwufosforan fosfatydyloinozytolu; TPA (PMA) — 12-mirystynian, 13-octan forbolu.

Konsekwencją zmian dotyczących ekspresji genów jest modyfikacja zdolności komórki do wytwarzania określonych białek. W niniejszym artykule omówione zostanie wyłącznie pobudzenie produkcji nowych białek, z pominięciem zagadnienia przerwania ekspresji innych genów. Nowowytwarzane bowiem białka zdają się stanowić podstawę długoterminowej reakcji komórki na bodziec pochodzący ze środowiska zewnętrznego.

Dla komórki stanowiącej część organizmu wielokomórkowego, środowiskiem jest przede wszystkim sam organizm, a bodźcami zewnętrznymi — hormony, czynniki wzrostowe, neuroprzekaźniki itp., określane łącznie jako czynniki humoralne. Pod względem budowy chemicznej można wyróżnić czynniki humoralne lipidowe (np. sterydy, hormony tarczycy) oraz czynniki aminokwasowo-peptydowe. Wiele wiadomo o tym, że hormony sterydowe mogą aktywować ekspresję genów [1]. W przypadku substancji aminokwasowo-peptydowych uwaga badaczy była do niedawna skierowana raczej na krótko trwające efekty działania tych czynników humoralnych, czyli efekty nie wymagające zmian w poziomie ekspresji genów. Celem niniejszego opracowania jest zwrócenie uwagi na zagadnienie wpływu czynników aminokwasowo-peptydowych na ekspresję genów.

Wśród analizowanych czynników humoralnych można wyróżnić:

- a) pojedyncze aminokwasy i ich pochodne,
- b) peptydy złożone z kilku-kilkunastu aminokwasów,
- c) białka zbudowane czasem z więcej niż jednego łańcucha polipeptydowego.

Wszystkie te podgrupy łączy wspólny schemat działania. Polega on na tym, że substancje te wywierają swój wpływ biologiczny poprzez oddziaływanie ze swoistymi receptorami wbudowanymi w błonę komórkową [1, 2]

PRZESŁANNIKI DRUGIEGO RZĘDU

Reakcja połączenia — po zewnętrznej stronie błony komórkowej — peptydowego (aminokwasowego) ligandu, z receptorem prowadzi do pobudzenia — po cytoplazmatycznej stronie błony komórkowej — szeregu procesów biochemicznych. Niektóre z nich scharakteryzowano jako rozprzestrzeniające następnie w głąb komórki informację o aktywacji receptora. Nośniki tej informacji zyskały miano „przesłanników drugiego rzędu” (ang. second messengers) [1, 2]. Nazwę „przesłannik pierwszego rzędu” zarezerwowano dla samego czynnika humoralnego.

Wśród efektów pobudzenia receptorów błonowych należy wyróżnić następujące procesy związane z wytwarzaniem przekaźników drugiego rzędu:

a. Zmiany w poziomie cyklicznych nukleotydów, zwłaszcza cAMP, a także cGMP. Na przykład, efektem działania glukagonu na komórki wątroby jest podwyższenie poziomu cAMP [3], a insulina z kolei obniża poziom cAMP [4].

b. Rozpad dwufosforanu fosfatydyloinozytolu (PIP_2) z wydzieleniem 1,4,5-trójfosforanu inozytolu (IP_3) i dwuglicerydu (DG) [5]. Tego rodzaju procesy wywołuje np. płytkowy czynnik wzrostowy (PDGF — ang. platelet-derived growth factor) oraz interleukina 2 (IL-2).

c. Aktywacja kanałów jonowych, co prowadzi do zmian stężenia jonów w cytoplazmie pobudzanej komórki. Na przykład fitohemaglutynina (PHA), swoisty mitogen dla limfocytów T, aktywuje kanały Ca^{2+} , czego rezultatem jest podwyższenie stężenia tych jonów w cytoplazmie [6].

Warto zwrócić uwagę, że jeden czynnik humoralny może wywołać cały zestaw różnych procesów biochemicznych, wyrażających się powstaniem nie jednego, lecz kilku różnych przekaźników drugiego rzędu. Na przykład glukagon pobudza poprzez swój receptor cyklazę adenylową (enzym wytwarzający cAMP), jak też i fosfolipazę C (enzym rozszczepiający PIP_2 na IP_3 i DG) [3]. Co więcej, obecność IP_3 prowadzi do uwolnienia Ca^{2+} z magazynów wewnątrzkomórkowych, co również powoduje podwyższenie stężenia tych jonów w cytoplazmie. Z kolei insulina aktywuje, przez swój receptor, rozpad innego iż PIP_2 lipidu błonowego, którego produktami są dwugliceryd i glikanowa pochodna inozytolu. Działanie tego ostatniego związku polega na aktywacji fosfodwuesterazy — enzymu przekształcającego cAMP w AMP, a zatem usuwającego cAMP z komórki [4].

W badaniach doświadczalnych nad wpływem określonych przekaźników drugiego rzędu na różne procesy biochemiczne w komórce stosuje się zwykle nie tyle same przekaźniki, co ich łatwo przez komórkę wchłanianie analogi. Na przykład estry forbolu (TPA) działają tak jak dwuglicerydy; bromo- i butyrylo-cAMP działają tak jak cAMP. Podwyższenie poziomu cAMP w komórce można też osiągnąć za pomocą toksyny cholery i forskoliny — aktywujących cyklazę adenylową, jak również za pomocą inhibitorów fosfodwuesterazy. Chcąc podwyższyć poziom Ca^{2+} w cytoplazmie stosować można jonofory wapnia — A 23187 i jonomycynę.

Omawiając podstawowe informacje na temat przekaźników drugiego rzędu warto zwrócić uwagę na pewne wspólne ich cechy.

Po pierwsze, w procesach przeniesienia sygnału od pobudzanego receptora do enzymu wytwarzającego przekaźniki drugiego rzędu biorą udział tzw. białka G — wiążące trójfosforan guanozyny (GTP).

Po drugie wspólną cechą działania różnych wymienionych przekazników drugiego rzędu jest aktywowanie różnych kinaz białkowych, czyli enzymów fosforylujących reszty aminokwasowe (serynowe lub treoninowe) w białkach. Fosforylacja białka od dawna jest uważana za jeden z zasadniczych sposobów modulacji ich aktywności. Przekazniki drugiego rzędu wydają się regulować procesy fosforylacji białek przez różne swoiste dla siebie kinazy. Na przykład cAMP pobudza kinazę A [1, 2]; dwuglicerydy — kinazę C [7]; Ca^{2+} , a zatem pośrednio i IP_3 — kinazy zależne od kalmoduliny [5]. Co więcej, niektóre receptory, np. PDGF, EGF — epidermalny czynnik wzrostowy (ang. epidermal growth factor), insuliny i in., same w sobie niosą aktywność kinazy wyzwalaną po połączeniu się receptora ze swoistym ligandem [8, 9]. Te receptorowe kinazy fosforylują w białkach reszty tyrozynowe.

W dalszej części pracy zostaną wymienione przykłady pobudzenia ekspresji genów przez czynniki humoralne o budowie aminokwasowo-peptydowej. Wraz z nimi przedstawiona zostanie bardzo, jak dotąd fragmentaryczna, wiedza o mechanizmach przeniesienia sygnału z błony cytoplazmatycznej do jądra. Przykłady te będą miały charakter katalogu danych. Taki jest bowiem obecny stan naszej znajomości tego zagadnienia. Wydaje się jednak, że chociażby w taki właśnie faktograficzny sposób warto zasygnalizować pojawianie się nowej, bardzo szybko rozwijającej się gałęzi nauk biomedycznych, stanowiącej przedmiot tego artykułu.

PEPTYDOWE CZYNNIKI HUMORALNE A AKTYWACJA GENÓW

Od kilkunastu lat prowadzono badania nad białkami, których poziom w komórce wzrasta pod wpływem peptydowych (aminokwasowych) czynników humoralnych. W ostatnim okresie, dzięki sklonowaniu odpowiednich genów, udało się stwierdzić, że w wielu przypadkach wzrost ilości białka jest wynikiem podwyższenia poziomu kodującego je mRNA, czyli pobudzenia ekspresji genów.

Wykazano na przykład, że mRNA proenkefalinowy jest stymulowany przez agonistów (czynniki pobudzające) cholinergicznego receptora nikotynowego w komórkach chromafinowych [10]. Pobudzenie to było hamowane przez antagonistę (czynnik blokujący) tego receptora. Ponieważ wiadomo, że cAMP jest przekaznikiem drugiego rzędu dla tego receptora, podjęto intensywne badania nad udziałem tego cyklicznego nukleotydu w pobudzeniu genu kodującego proenkefalinę. Stwierdzono, że cAMP, jego pochodna 8-bromo-cAMP, podobnie jak czynniki pobudzające cyklazę adenylową (forskolina, toksyna cholery) oraz hamujące fosfodwuesterazę (3-izobutylo-1-metylo-ksantyna, IMX) podwyższają po-

ziom ekspresji tego genu [11, 12, 13]. Ostatnio Comb i wsp. [13] wydzielili z genu proenkefalinowego obszar regulacyjny i za pomocą mutantów delecyjnych określili, że odcinek 37 par nukleotydów na końcu 5' genu odpowiada za reakcję na cAMP. Co więcej okazało się, że badany odcinek regulacyjny umożliwiał pobudzenie ekspresji genu również pod wpływem TPA, czyli aktywatora kinazy białkowej C.

Wykazano także, że geny kodujące: hormon wzrostu [14], proopiomelankortynę (POMC) [14], prolaktynę [15], karboksylazę fosfoenolopirugronianu [16], aminotransferazę tyrozyny [17], hydroksylazę tyrozyny [18], podjednostkę alfa przysadkowych hormonów glikoproteinowych [19] mogą być pobudzane przez cAMP. Dla niektórych z tych genów zidentyfikowano sekwencję regulatorową, bardzo zbliżoną do tej, która odpowiada za pobudzenie genu proenkefalinowego przez cAMP i TPA [13].

Sporo uwagi poświęcono również mechanizmowi, za pomocą którego cAMP aktywuje wymienione geny. Uważa się, że istotnym składnikiem tego mechanizmu jest zależna od cAMP kinaza białkowa, która fosforyluje pewne niskocząsteczkowe niehistonowe białko chromatyny [15].

W ostatnich trzech latach najwięcej danych odnoszących się do aktywacji genów przez peptydowe czynniki humorałe zgromadzono badając *in vitro* pobudzenie cyklu komórkowego fibroblastów i limfocytów. Stosowano w tych badaniach komórki spoczynkowe (G_0) traktowane mitogenami [20]. W wyniku działania mitogenu komórka zapoczątkowuje szereg procesów biochemicznych, składających się w efekcie na cykl komórkowy. Procesy te prowadzą najpierw do replikacji jądrowego DNA (faza S cyklu), a następnie do podziału komórki (mitoza).

Wykazano, że pobudzenie proliferacji jest zależne od aktywacji ekspresji genów i pojawienia się nowych białek, nie wytwarzanych przez komórkę spoczynkową [20, 21]. Część z tych białek jest stosunkowo dobrze poznana [22]. Należą do nich enzymy związane z replikacją DNA, histony, białka cytoszkieletu (aktyny, tubuliny, wimentyna), protoonkogeny (c-fos, c-myc, c-myb, c-K-ras, c-H-ras, c-N-ras, p53), a także niektóre inne białka o funkcjach enzymatycznych i regulacyjnych: interferony, dekarboksylaza ornitynowa (ODC), kalmodulina.

Pobudzenie wymienionych genów osiągnięto stosując np. płodową surowicę cielęcą jako mitogen dla mysich fibroblastów w hodowli. Jest to jednak mitogen złożony, składający się z mieszaniny licznych substancji. Wykazano, że FCS może być zastąpiony w swym mitogennym działaniu przez zestaw chemicznie określonych peptydów, zwanych czynnikami wzrostowymi. Inaczej mówiąc, czynniki wzrostowe są to czynniki humoralne regulujące proliferację (a także różnicowanie) komórek poprzez swoje błonowe receptory i przekaźniki drugiego rzędu.

W przypadku mysich fibroblastów linii 3T3 czynnikami wzrostowymi są PDGF, EGF i insulina lub czynnik insulinopodobny I (ang. insulin-like growth factor I). Dla limfocytów T czynnikami warunkującymi stymulację cyklu komórkowego są: antygen (lub łącząca się z tym samym receptorem PHA), interleukina-2 oraz transferyna [23, 24, 25]. Z kolei czynnikami wzrostu limfocytów B są: antygen (można go zastąpić przeciwciałem reagującym z receptorem — powierzchniową immunoglobuliną) oraz BCGF-1 (ang. B cell growth factor 1) [23, 26].

W przypadku fibroblastów myszy w hodowli stwierdzono, że PDGF pobudza ekspresję takich genów, jak: c-myc [27-31], c-fos [27, 28, 30, 32, 34] oraz genów kodujących dekarboksylazę ornitynową [34], interferon beta [35], wimentynę [36], beta-aktynę [28]. Z kolei EGF pobudza w tych samych komórkach ekspresję c-myc [30, 38], c-fos [30], genów kodujących enzymy glikolityczne [37], enzymu przenoszącego ATP przez błonę mitochondrialną [39], białko wiążące wapń — kalcyklinę [40]; natomiast nie pobudza ekspresji beta-aktyny [28] i wimentyny [36].

W przypadku limfocytów T stwierdzono, że Il-2 aktywuje geny c-myc, c-myb [41, 42] oraz gen kodujący receptor dla Il-2 [43, 44, 45]. W limfocytach B stwierdzono aktywację genu c-myc pod wpływem przeciwciała skierowanego przeciwko powierzchniowej immunoglobulinie IgM [46]. Aktywację genów c-fos i c-myc stwierdzono także w komórkach linii tarczycowej szczura (FRT-5), pobudzanych do proliferacji za pomocą czynnika stymulującego hormony tarczycy (TSH) [47]. Ekspresję c-fos aktywuje także agonista beta-adrenergiczny — izoproterenol w komórkach gruczołu podśliniankowego dorosłych myszy. Pod wpływem tego związku komórki tego narządu wchodzi w cykl komórkowy [48].

Badania pobudzenia ekspresji genów c-fos, c-myc i genów kodujących beta-aktynę i dekarboksylazę ornitynową prowadzono również na komórkach szczurzej linii PC 12. Komórki te, wyprowadzone z nowotworu rdzenia nadnerczy, pod wpływem nerwowego czynnika wzrostowego (NGF) przestają proliferować i różnicują się w kierunku neuronów. Procesowi temu towarzyszy aktywacja ekspresji wymienionych czterech genów [49-51]. Z kolei w już zróżnicowanych komórkach PC 12 ekspresję c-myc i c-fos można pobudzić za pomocą agonistów receptorów cholinergiczych — muskarynowych i nikotynowych [52].

Wykazawszy, że czynniki wzrostowe pobudzają ekspresję określonych genów i znając przekaźniki drugiego rzędu związane z tymi czynnikami, podjęto ostatnio szczegółowe badania nad pobudzeniem ekspresji genów za pomocą pojedynczych przekaźników drugiego rzędu. Wśród badanych w ten sposób genów najwięcej danych zgromadzono odnośnie do protoonkogenów c-myc i c-fos, a zwłaszcza ich aktywacji zależnej od jonów Ca^{2+} lub kinazy białkowej C.

Kilka grup badaczy wykazało, że zarówno TPA (lub DG), jak i jonofory Ca^{2+} zdolne są, niezależnie od siebie, pobudzać ekspresję genu *c-myc* [28, 29, 31, 38, 53]. Kaibuchi i wsp. [54] porównali poziom pobudzenia ekspresji *c-myc* przez jonofory Ca^{2+} i aktywatory kinazy C. Autorzy ci zaobserwowali, że w mysich fibroblastach linii Swiss 3T3, TPA i DG są nieco silniejszymi aktywatorami ekspresji *c-myc* niż jonofory wapnia A 23187 i jonomycyna. Z kolei Bravo i wsp. [38] wykazali, że w ludzkich komórkach epidermalnych linii A 431 jest odwrotna sytuacja: nieco lepszym aktywatorem ekspresji *c-myc* okazał się A 23187 niż TPA. Podobny rezultat osiągnęli Reed i wsp. [58] w badaniach ludzkich limfocytów T. Z kolei w ludzkich limfocytach B stwierdzono, że TPA jest dużo mocniejszym stymulatorem *c-myc* niż A 23187 [46].

Również w przypadku *c-fos* wykazano, że ekspresja tego genu wzrasta zarówno pod wpływem jonoforów wapnia, jak i czynników bezpośrednio aktywujących kinazę C (TPA i DG). Bravo i wsp. [38] wykryli, że w komórkach A 431 TPA aktywował *c-fos* bardzo wyraźnie, zaś wpływ A 23187 był tylko nieznacznie zaznaczony. Wiadomo również, że TPA silnie aktywuje ekspresję *c-fos* w komórkach linii pre-monocytnych: HL 60 i U 937, pobudzanych za pomocą tego związku do różnicowania w kierunku makrofagów [55, 56]. Z kolei Greenberg i wsp. [52] stwierdzili, że aktywacja *c-fos* przez agonistów receptora acetylocholinowego zależy od wpływu jonów wapnia do pobudzonej komórki. Udział Ca^{2+} w stymulacji ekspresji *c-fos* w komórkach PC 12 wykazali również Morgan i Curran [57].

Z grupy innych genów, których ekspresja była badana w podobnych warunkach warto jeszcze wymienić:

Gen kodujący **interleukinę 2**. Reed i wsp. [58] zaobserwowali, że poziom *Il-2* mRNA wzrasta w ludzkich limfocytach krwi obwodowej pod wpływem jonomycyny, zaś nie ulega podwyższeniu w wyniku działania TPA. Z kolei Hirano i wsp. [59] wykazali, że TPA aktywuje ten sam gen w limfocytach pochodzących z migdałka człowieka. W takich samych warunkach Yamamoto i wsp. [60] stwierdzili, że stymulacja tego genu zachodzi pod wpływem pobudzenia kinazy C, natomiast *cAMP* i *cGMP* nie pobudzały ekspresji genu kodującego *Il-2*. Co więcej, prostaglandyna E_2 , o której wiadomo, że podwyższa poziom *cAMP*, hamowała ekspresję omawianego genu wywołaną działaniem TPA i PHA.

Gen kodujący **receptor *Il-2***. Reed i wsp. [58] stwierdzili, że TPA jest bardzo silnym aktywatorem tego genu, w przeciwieństwie do jonomycyny wywierającej jedynie nieznaczny wpływ.

Gen kodujący **beta-aktynę**. Bravo i wsp. [30] oraz Rabin i wsp. [61] nie zaobserwowali wpływu TPA na ekspresję tego genu. W prze-

ciwieństwie do nich, Greenberg i Ziff [28] wykazali dodatnie działanie TPA na poziom ekspresji genu beta-aktynowego.

Gen kodujący **receptor dla EGF**. Clark i wsp. [62] stwierdzili, że ekspresja tego genu jest wzmagana przez TPA.

PODSUMOWANIE

Podsumowując przedstawiony katalog danych warto zwrócić uwagę na pewne prawidłowości. Po pierwsze, wydaje się, że mamy do czynienia z nowym, obszernym kierunkiem badawczym, który można określić jako analizę molekularną przeniesienia sygnału między błoną cytoplazmatyczną a jądrem komórki. Jak wynika z przedstawionych danych można wyróżnić przynajmniej trzy różne sposoby przeniesienia tego sygnału:

1) zależny od cAMP, 2) zależny od Ca^{2+} , 3) zależny od kinazy C. Ponadto istnieją prawdopodobnie dodatkowe drogi przeniesienia sygnału (znacznie słabiej poznane), poprzez cGMP i kinazy tyrozyny.

Drogi sygnału zależne od powyższych czynników są częściowo odrębne, a w pewnym zakresie również się nakładają. Na przykład ekspresja genu kodującego proenkefalinę pobudzana jest zarówno przez cAMP, jak i przez aktywatory kinazy białkowej C. Z kolei zarówno podniesienie poziomu Ca^{2+} , jak i aktywacja kinazy C powodują pobudzenie ekspresji protoonkogenów c-myc i c-fos. Co więcej, bywa, że w jednych komórkach można obserwować preferencyjną aktywację pewnego genu jakąś drogą, natomiast w innych komórkach dominuje odrębny szlak stymulacji tego samego genu.

Po drugie warto zwrócić uwagę na inną sugestię wypływającą z omówionych badań. Wydaje się, że istnieje grupa genów, których pobudzenie ekspresji towarzyszy różnym, często przeciwnym procesom fizjologicznym, np. proliferacji, różnicowaniu, przekazywaniu międzysynaptycznemu. Najważniejsi przedstawiciele tej grupy genów to: c-myc, c-fos, geny kodujące beta-aktynę i dekarboksylazę ornitynową. Protoonkogeny c-fos i c-myc kodują białka jądrowe, których funkcja nie jest znana. Wiadomo jednak, że białka te mają zdolność do pobudzania transkrypcji innych genów *in vitro*, a także iż białko c-myc może inicjować w komórkach spoczynkowych procesy związane z cyklem komórkowym [63, 64, 65]. Sugeruje to, że te białka mogą mieć nie znane jeszcze funkcje regulacyjne. Regulacyjną rolę przypisuje się również poliaminom (putrescynie, sperminie, spermidynie), których wytwarzanie zależy od dekarboksylazy ornitynowej [66]. Fakt, że te same geny regulacyjne ulegają aktywacji w różnych procesach fizjologicznych odkrywa nowy kie-

runek badań nad ich możliwą funkcją, jako nowej klasy aktywatorów biologicznych. Być może należałoby je określić jako przekaźniki trzeciego rzędu.

LITERATURA

1. Alberts B., Bray D., Lewis J., Raff M., Roberts K., Watson J. D. — *Molecular biology of the cell*. Garland Publishing Inc., New York-Londyn, 1983.
2. Berridge M. J. — *The molecular basis of communication within the cell*. Sci. Amer. 253: 142-152, 1985.
3. Wekelam M. J. O., Murphy G. J., Hruby V. J., Houslay G. J. — *Activation of two signal-transduction systems in hepatocytes by glucagon*. Nature 323: 68-70, 1986.
4. Saltiel A. R., Fox J. A., Sherline P., Cuatrecasas P. — *Insulin-stimulated hydrolysis of a novel glycolipid generates modulators of cAMP phosphodiesterase*. Science 233: 967-972, 1986.
5. Berridge M. J. — *Intracellular signalling through inositol triphosphate and diacylglycerol*. Biol. Chem. Hoppe-Seyler 367: 447-456, 1986.
6. Kuno M., Goronzy J., Weyand C., Gardner P. — *Single-channel and whole-cell recordings of mitogen-regulated inward currents in human cloned helper T lymphocytes*. Nature 323: 269-273, 1986.
7. Nishizuka Y. — *The role of protein kinase C in cell surface signal transduction and tumor promotion*. Nature 308: 693-697, 1982.
8. Heldin C. H., Westermark B. — *Growth factors: mechanism of action and relation to oncogenes*. Cell 37: 9-20, 1984.
9. Rozengurt E. — *Early signals in the mitogenic response*. Science 234: 161-166, 1986.
10. Eiden L. E., Giraud P., Dave J. R., Hotchkiss A. J., Affolter H.-U. — *Nicotinic receptor stimulation activates enkephalin release and biosynthesis in adrenal chromaffin cells*. Nature 312: 661-663, 1984.
11. Quach T. T., Tang F., Kageyama H., Guido A., Meek J. L., Costa E., Schwartz J. P. — *Enkephalin biosynthesis in adrenal medulla: modulation of proenkephalin mRNA content of cultured chromaffin cells by 8-Br-cyclic AMP*. Mol. Pharmacol. 26: 255-260, 1984.
12. Eiden L. E., Giraud P., Affolter H.-U., Herbert E., Hotchkiss A. J. — *Alternative modes of enkephalin biosynthesis regulation by reserpine and cyclic AMP in cultured chromaffin cells*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81: 3949-3953, 1984.
13. Comb M., Birnberg N. C., Seasholtz A., Herbert E., Goodman H. M. — *A cyclic AMP- and phorbol ester-inducible DNA element*. Nature 323: 353-356, 1986.
14. Simard J., Labrie F., Gossard F. — *Regulation of growth hormone mRNA and pro-opiomelanocortin mRNA levels by cyclic AMP in rat anterior pituitary cells in culture*. DNA 5: 263-270, 1986.

15. Murdoch G. H., Rosenfeld M. G., Evans R. M. — *Eukaryotic transcriptional regulation and chromatin-associated protein phosphorylation by cyclic AMP*. Science 218: 1315-1317, 1982.
16. Wynshaw-Boris A., Lugo T. G., Short J. M., Fournier R. E. K., Hanson R. W. — *Identification of a cAMP regulatory region in the gene for a rat cytosolic phosphoenolpyruvate carboxykinase (GTP)*. J. Biol. Chem. 259: 12161-12169, 1984.
17. Shinomiya T., Scherer G., Schmid W., Zentgraf H., Schütz G. — *Isolation and characterization of the rat tyrosine aminotransferase gene*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81: 1346-1350, 1984.
18. Lewis E. J., Tank A. W., Weiner N., Chikaraishi D. M. — *Regulation of tyrosine hydroxylase mRNA by glucocorticoid and cyclic AMP in a rat pheochromocytoma cell line. Isolation of a cDNA clone for tyrosine hydroxylase*. J. Biol. Chem. 258: 14632-14637, 1983.
19. Goodwin R. G., Moncman C. L., Rottman F. M., Nilson J. H. — *Characterization and nucleotide sequence of the gene for the common alpha subunit of the bovine pituitary glycoprotein hormones*. Nucleic Acids Res. 11: 6873-6882, 1983.
20. Baserga R. — *The biology of cell reproduction*. Harvard University Press, Cambridge-Londyn, 1985.
21. Baserga R., Waechter D. E., Soprano K. J., Galanti N. — *Molecular biology of cell division*. Ann. N.Y. Acad. Sci. 397: 110-120, 1985.
22. Kaczmarek L. — *Protooncogene expression during the cell cycle*. Lab. Invest. 54: 365-376, 1986.
23. Maizel A. L., Lachman L. B. — *Control of human lymphocytes proliferation by soluble factors*. Lab. Invest. 50: 369-380, 1984.
24. Cantrell D. A., Smith K. A. — *The interleukin-2 T-cell system; a new cell growth model*. Science 224: 1312-1316, 1984.
25. Neckers L. M., Cossman J. — *Transferrin receptor induction in mitogen-stimulated human T lymphocytes is required for DNA synthesis and cell division and is regulated by interleukin 2*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80: 3494-3498, 1983.
26. Melchers F., Andersson J. — *Factors controlling the B-cell cycle*. Ann. Rev. Immunol. 4: 13-36, 1986.
27. Bravo R., Burkhardt J., Müller R. — *Persistence of the competent state in mouse fibroblasts is independent of c-fos and c-myc expression*. Exp. Cell. Res. 160: 540-543, 1985.
28. Greenberg M. E., Ziff E. B. — *Stimulation of 3T3 cells induces transcription of c-fos proto-oncogene*. Nature 311: 433-442, 1984.
29. Kelly K., Cochran B., Stiles C. D., Leder P. — *The regulation of c-myc by growth signals*. Curr. Top. Microb. Immunol. 113: 117-126, 1984.
30. Müller R., Bravo R., Burkhardt J., Curra T. — *Induction of c-fos gene and protein by growth factors precedes activation of c-myc*. Nature 312: 716-720, 1984.
31. Tsuda T., Kaibuchi K., West B., Takai Y. — *Involvement of Ca^{2+} in platelet-derived growth factor induced expression of c-myc oncogene in Swiss 3T3 fibroblasts*. FEBS Lett. 187: 43-46, 1985.

32. Cochran B. H., Zullo J., Verma I. M., Stiles C. D. — Expression of the *c-fos* gene and of an *fos*-related gene is stimulated by platelet-derived growth factor. *Science* 226: 1080-1082, 1984.
33. Kruger W., Cooper J. A., Hunter T., Verma I. M. — Platelet-derived growth factor induces rapid but transient expression of the *c-fos* gene and protein. *Nature* 312: 711-716, 1984.
34. Einat M., Resnitzky D., Kimchi A. — Inhibitory effects of interferon on the expression of genes regulated by platelet-derived growth factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82: 7608-7612, 1985.
35. Zullo J. N., Cochran B. H., Huang A. S., Stiles C. D. — Platelet-derived growth factor and double-stranded ribonucleic acids stimulate expression of the same genes in 3T3 cells. *Cell* 43: 793-800, 1985.
36. Ferrari S., Battini R., Kaczmarek L., Rittling S., Calabretta B., DeRiel J. K., Philiponis V., Wei J-F., Baserga R. — Coding sequence and growth regulation of the human vimentin gene. *Mol. Cell. Biol.* 6: 3614-3620, 1986.
37. Matrisian L. M., Rautmann G., Magun B. E., Breathnach R. — Epidermal growth factor or serum stimulation of rat fibroblasts induces an elevation in mRNA levels for lactate dehydrogenase and other glycolytic enzymes. *Nucleic Acids Res.* 13: 711-726, 1985.
38. Bravo R., Burckhardt J., Curran T., Müller R. — Stimulation and inhibition of growth by EGF in different A 431 cell clones is accompanied by the rapid induction of *c-fos* and *c-myc* proto-oncogenes. *EMBO J.* 4: 1193-1197, 1985.
39. Battini R., Ferrari S., Kaczmarek L., Calabretta B., Chen S. T., Baserga R. — Molecular cloning of a cDNA for a human ADP/ATP carrier which is growth regulated. *J. Biol. Chem.* 262: 4355-4359, 1987.
40. Calabretta B., Battini R., Kaczmarek L., DeRiel J. K., Baserga R. — Molecular cloning of the cDNA for a growth factor-inducible gene with strong homology to S-100, a calcium-binding protein. *J. Biol. Chem.* 261: 12628-12632, 1986.
41. Kaczmarek L., Calabretta B., Baserga R. — Effect of interleukin 2 on the expression of cell cycle genes in human T lymphocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 133: 410-416, 1985.
42. Stern J. B., Smith K. A. — Interleukin-2 induction of T-cell G₁ progression and *c-myc* expression. *Science* 233: 203-206, 1986.
43. Reem G. H., Yeh N. H., Urdal D. L., Kilian P. L., Farrar J. J. — Induction and upregulation by interleukin 2 of high-affinity interleukin 2 receptors on thymocytes and T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82: 8663-8666, 1985.
44. Depper J. M., Leonard W. J., Drogula C., Kronke M., Waldmann T., Greene W. C. — Interleukin 2 (IL-2) augments transcription of the IL-2 receptor gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82: 4230-4234, 1985.
45. Reed J. C., Alpers J. D., Nowell P. C., Hoover R. G. — Sequential expression of protooncogenes during lectin-stimulated mitogenesis of normal human lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83: 3982-3986, 1986.
46. Smeland E., Godal T., Ruud E., Beiske K., Funderud S., Clark E. A., Pfeifer-Ohlsson S., Ohlsson R. — The specific induction of *c-myc* proto-oncogene expression in normal human B cells is not a sufficient event for acquisition of competence to proliferate. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82: 6255-6259, 1985.

47. Colletta G., Cirafici A. M., Vecchio G. — *Induction of the c-fos oncogene by thyrotropic hormone in rat thyroid cells in culture.* Science 233: 458-460, 1986.
48. Barka T., Gubits R. M., Van der Neon H. M. — *Beta-adrenergic stimulation of c-fos gene expression in the mouse submandibular gland.* Mol. Cell. Biol. 6: 2984-2989, 1986.
49. Curran T., Morgan J. L. — *Superinduction of c-fos by Nerve Growth Factor in the presence of peripherally active benzodiazepines.* Science 229: 1265-1268, 1985.
50. Greenberg M. E., Greene L. A., Ziff E. B. — *Nerve growth factor and epidermal growth factor induce rapid transient changes in proto-oncogene transcription in PC 12 cells.* J. Biol. Chem. 260: 1401-1410, 1985.
51. Kruijer W., Schubert D., Verma I. M. — *Induction of the proto-oncogene fos by Nerve Growth Factor.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 7330-7334, 1985.
52. Greenberg M. E., Ziff E. B., Greene L. A. — *Stimulation of neuronal acetylcholine receptors induces rapid gene transcription.* Science 234: 80-83, 1986.
53. Reed J. C., Nowell P. C., Hoover R. G. — *Regulation of c-myc mRNA levels in normal human lymphocytes by modulators of cell proliferation.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 4221-4225, 1985.
54. Kaibuchi K., Tsuda T., Kikuchi A., Tanimata T., Yamashita T., Takai Y. — *Possible involvement of protein kinase C and calcium ion in growth factor-induced expression of c-myc oncogene in Swiss 3T3 fibroblasts.* J. Biol. Chem. 261: 1187-1192, 1986.
55. Müller R., Curran T., Müller D., Guilbert L. — *Induction of c-fos during myelomonocytic differentiation and macrophage proliferation.* Nature 314: 548-549, 1985.
56. Mitchel R. L., Zokas L., Schreiber R. D., Verma I. M. — *Rapid induction of the expression of proto-oncogene fos during human monocytic differentiation.* Cell 40: 209-217, 1985.
57. Morgan J. L., Curran T. — *Role of ion flux in the control of c-fos expression.* Nature 322: 552-555, 1986.
58. Kern J. A., Reed J. C., Daniele R. P., Nowell P. C. — *The role of the accessory cell in mitogen-stimulated human T cell gene expression.* J. Immunol. 137: 764-769, 1986.
59. Hirano T., Fujimoto K., Teranishi T., Nishino N., Onoue K., Maeda S., Shimada K. — *Phorbol ester increases the level of interleukin 2 mRNA in mitogen-stimulated human lymphocytes.* J. Immunol. 132: 2165-2169, 1984.
60. Yamamoto Y., Ohmura T., Kawakami K., Onoue K., Hidaka H. — *Induction and regulation of human interleukin 2 gene expression: significance of protein kinase C activation.* J. Biochem. 100: 333-340, 1986.
61. Rabin M. S., Doherty P. J., Gottesman M. M. — *The tumor promoter phorbol 12-myristate 13-acetate induces a program of altered gene expression similar to that induced by platelet-derived growth factor and transforming oncogenes.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83: 357-360, 1986.
62. Clark A. J. L., Ishii S., Richert N., Merlino G. T., Pastan I. — *Epidermal growth factor regulates the expression of its own receptor.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 8374-8378, 1985.

63. Kingston R. E., Baldwin A. S., Sharp P. A. — *Regulation of heat shock protein 70 gene expression by c-myc*. Nature 312: 280-282, 1984.
64. Setoyama C., Frunzio R., Liau G., Mudryj M., de Crombrughe B. — *Transcriptional activation encoded by the v-fos gene*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83: 3213-3217, 1986.
65. Kaczmarek L., Hyland J. K., Watt R., Rosenberg M., Baserga R. — *Microinjected c-myc as a competence factor*. Science 228: 1313-1315, 1985.
66. Tabor C. W., Tabor H. — *Polyamines*. Ann. Rev. Biochem. 53: 749-790, 1984.

JERZY VETULANI

Instytut Farmakologii PAN

Kraków

RECEPTOR FARMAKOLOGICZNY — BŁONOWY RECEPTOR NEUROMEDIATORÓW

Żywa komórka izoluje się od otaczającego ją środowiska błoną komórkową i dba o utrzymanie różnicy między środowiskiem wewnętrznym i zewnętrznym. W związku z tym jej komunikacja z otaczającym światem, równie konieczna dla życia jak zachowanie odrębności, musi być ściśle kontrolowana. Granica chroniąca komórkę, błona komórkowa, jest więc zasadniczo nieprzepuszczalna dla substancji z zewnątrz, a „komorami celnymi” są wyróżnione w tej błonie domeny, zwane receptorami.

Receptory błony komórkowej należą do różnych typów. Można je podzielić na dwie wielkie grupy: receptory, przez które substancje mogą wnikać do komórki, oraz receptory, których kontakt z obcymi substancjami generuje zmiany, będące dla komórki sygnałem, że w jakiś sposób powinna zmienić swój metabolizm lub stan elektryczny. Receptory pierwszej grupy to opłaszczone zagłębienia, biorące udział w endocytozie, oraz kanały jonowe. Te ostatnie są sterowane bądź zmianami potencjału błony, bądź przez receptory neuromediatorów. Są one omawiane w innych artykułach w tym numerze „Kosmosu”. Receptory drugiego typu to receptory immunologiczne, których omawiać tu nie będziemy, oraz receptory sygnałów humoralnych, regulujących działanie ustroju: hormonów i neuroprzekazników (neuromediatorów). Te ostatnie często nazywa się receptorami farmakologicznymi i im właśnie poświęcony jest nasz artykuł.

Receptor farmakologiczny pojawił się w końcu lat dwudziestych i w latach trzydziestych, jako koncepcja teoretyczna, mająca wyjaśnić pewne osobliwości w działaniu leków. Koncepcja ta jest dziełem brytyjskiego farmakologa, Clarka [8], i wyniknęła z prób interpretacji badań typowo farmakologicznych — reakcji izolowanych narządów na leki. Chociaż dziś mówilibyśmy raczej o receptorze błonowym dla chemicznych sygnałów w ustroju, nazwa „receptor farmakologiczny” przywarła do tworów postulowanych przez Clarka, dając dowód na wkład farmakologii do nauk fizjologicznych.

Pojęcie receptora zmieniało się, a termin „receptor” bywał często używany nieprecyzyjnie. Obecnie nie ogranicza się tego terminu wy-

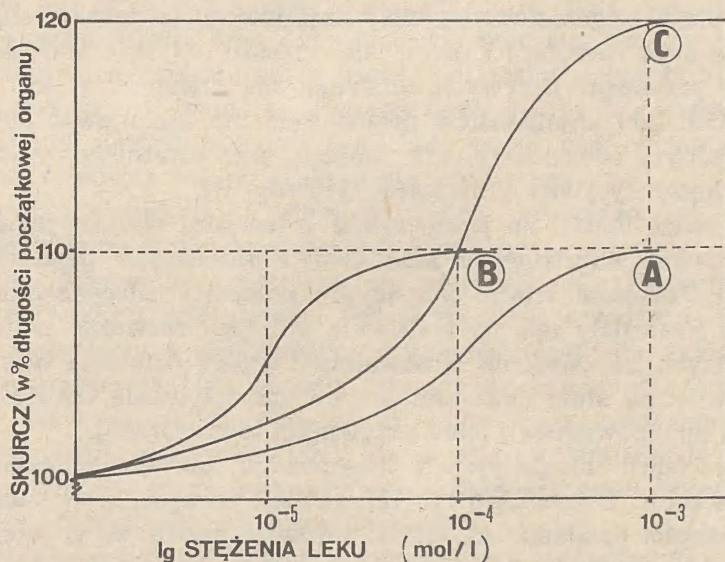
łącznie do domeny recepcyjnej czy rozpoznawczej, tworzą w sposób swoisty łączącego się z daną substancją chemiczną, ale pod pojęciem receptora rozumie się całą strukturę rozpoznającą sygnał zewnętrzny i przekładającą ją na sygnał zrozumiały dla komórki, w wyniku czego dochodzi w tej ostatniej do zmiany aktywności biochemicznej, inicjującej odpowiedź biologiczną. Termin „receptor” nie jest jednak zwykle używany w odniesieniu do całej maszynerii generującej sygnał wewnętrzny, a tylko do wielkiej struktury białkowej rozpoznającej sygnał i uruchamiającej następny składnik kompleksu przekąźnikowego w błonie.

TEORETYCZNE RECEPTORY FARMAKOLOGICZNE

Clark zauważył stosując proste rozważania matematyczne, że niektóre związki chemiczne wywierają swój efekt maksymalny w tak niskich stężeniach, że gdyby ich molekuly rozpostrzeć w postaci monowarstwy, zajęłyby one nie więcej niż 1% ogólnej powierzchni błon komórkowych w badanym organie, podczas gdy inne związki wywierają działanie maksymalne dopiero wówczas, kiedy ich stężenie osiągnie taką wartość, że powierzchnia ich molekul może mniej więcej dokładnie pokryć całość powierzchni błon. Aby to wytłumaczyć przyjął, że ta pierwsza grupa związków działa na pewne szczególne punkty błony, które nazwał receptorami. Połączenie molekuly leku z receptorami miało prowadzić do reakcji badanego organu, a wielkość tej reakcji miała być proporcjonalna do ilości zajętych receptorów, a dokładniej — do stosunku liczby receptorów zajętych do całkowitej liczby receptorów. Była to pierwsza teoria receptorowa działania leków, należąca do grupy tzw. teorii okupacyjnych. Po jej sformułowaniu można było zacząć różnić leki o działaniu receptorowym i o działaniu błonowym.

Receptor farmakologiczny pozostawał przez długi czas pojęciem hipotetycznym, stale jednak rozwijanym. Największe zasługi dla tego rozwoju położył w latach pięćdziesiątych Ariëns i jego grupa z uniwersytetu w Nijmegen [3]. Rozszerzyli oni znacznie koncepcje Clarka, wyróżniając dwie podstawowe właściwości działania leków, które możemy określić jako siłę i moc. W prostym modelu, jakim jest skurczowe działanie leku na narząd izolowany, przez siłę działania rozumiemy iloraz maksymalnego efektu leku przez wysokość dawki lub stężenia. Jeżeli np. lek A w stężeniu 1×10^{-3} mol/l powoduje skurcz narządu izolowanego o 10%, a taki sam efekt powoduje lek B w stężeniu 1×10^{-4} mol/l, to powiemy, że lek B jest dziesięciokrotnie silniejszy od leku A. Ściśle rzecz biorąc możemy tak powiedzieć wówczas, kiedy obserwowane efekty będą efektami maksymalnymi, tzn. że dalsze zwiększanie stężenia leku A lub B nie spowoduje silniejszego skurczu, lub

kiedy krzywe przedstawiające zależność między dawką i odpowiedzią na te leki będą równoległe. Moc działania mówi nam, jak wielki może być maksymalny efekt leku. W omawianym przypadku moc działania leków A i B jest taka sama. Może jednak okazać się, że dwa leki powodują różne efekty maksymalne: np. lek C spowoduje skurcz danego narządu o 20%. Wówczas możemy powiedzieć, że moc jego działania jest dwukrotnie większa od mocy działania leków A i B. Jeżeli ten maksymalny efekt obserwuje się dopiero przy stężeniu 10^{-3} mol/l leku C, wówczas można powiedzieć, że siła jego działania jest równa sile działania leku A, a dziesięć razy mniejsza niż siła działania leku B, mimo dwukrotnie większej mocy (rys. 1).



Rys. 1. Idealne krzywe zależności efektu leku od dawki. Wartości K_D leku A i C wynoszą 10^{-4} mol/l, leku B — 10^{-5} mol/l. Aktywność wewnętrzna α leku C jest dwukrotnie większa niż aktywność leków A i B. Objaśnienia w tekście

Rozważania nad siłą i intensywnością działania leków upraszczają się znacznie w świetle teorii receptorowej Ariënsa. Zakłada ona, że za działanie leków odpowiada ich związanie się z hipotetycznym receptorem, i — jeżeli wiązanie to jest odwracalne i reakcja następuje zgodnie z prawem działania mas Guldberga i Waagego — efekt jest wyznaczony dwoma charakterystykami receptora: jego powinowactwem do leku, odpowiedzialnym za siłę działania, oraz aktywnością wewnętrzną, odpowiedzialną za moc leku. Miarą powinowactwa jest stężenie moralne leku powodujące efekt o wielkości połowy efektu maksymalnego

(stała dysocjacji, K_D ; przy tym stężeniu, zgodnie z założeniami Ariënsa, cząsteczki leku zajmują 50% receptorów w badanej tkance), a miarą aktywności wewnętrznej (oznaczonej jako α) — wielkość efektu maksymalnego.

Klasyczna teoria receptorowa Ariënsa potrafi przewidzieć efekty rozmaitych kombinacji leków i wytłumaczyć skomplikowane niekiedy kształty krzywych obrazujących zależność efektu leku lub kombinacji leków od dawki. Dzięki niej zrozumiano działanie leku pobudzającego receptor, agonisty (związek o pewnym powinowactwie do receptora i dużej aktywności wewnętrznej α), leku porażającego działanie receptora, antagonisty (związek o dużym powinowactwie do receptora i $\alpha=0$) i leku w pewnych warunkach pobudzającego receptor, ale hamującego działanie innych agonistów, agonisty częściowego (związek o dużym powinowactwie do receptora i małej, ale większej od zera wartości α). Na podstawie przebiegu krzywych ilustrujących zależność efektu leku od dawki i obecności antagonistów można było też zdefiniować antagonizm nieodwracalny i odwracalny, a w ramach tego ostatniego wyróżnić antagonizm kompetytywny i niekompetytywny [3].

Warto może dodać, że jednocześnie z teoriami okupacyjnymi receptora próbowano konstruować inne modele tłumaczące działanie leków na tkanki. Jednakże teorie okupacyjne pozostały zdecydowanie popularniejsze. Pozwalały one na podstawie prostych rozważań matematycznych, opartych na założeniu stosowalności prawa działania mas, wyprowadzić wzory na stałe charakteryzujące oddziaływanie leku z receptorem: stałą powinowactwa i stałą aktywności wewnętrznej.

Rozwój teorii okupacyjnych doprowadził do sformułowania dalszych koncepcji. Furchgott [13] zwrócił uwagę, że przebieg krzywych zależności działania od dawki wskazuje na to, że w wielu przypadkach efekt maksymalny osiągnięty zostaje już wtedy, kiedy tylko część receptorów wiąże się z lekiem. To zmusza do założenia, że istnieje pewna grupa receptorów „milczących”, zapasowych, które ujawniają się dopiero po związaniu puli receptorów aktywnych. Natomiast rozważania nad hipotetycznym mechanizmem działania receptora doprowadziły do poglądu, że receptor musi znajdować się w jednym z trzech możliwych stanów: a) podstawowym — nieaktywnym, b) aktywnym, bądź c) niepodstawowym ale nieaktywnym. Wiązanie receptora z agonistą prowadzi do jego przejścia w stan aktywny, a z antagonistą — w nieaktywny. Ukoronowaniem tego kierunku rozważań było stworzenie tzw. modelu MWC, którego nazwa pochodzi od inicjałów nazwisk autorów, którzy go opracowali dla enzymów: Monoda, Wymana i Changeux [34]. Model ten, zakładający istnienie kooperatywności receptorów (tzn. że zmiana stanu jednego receptora może zmieniać reaktywność receptorów sąsiednich), dla receptora farmakologicznego opraco-

wali Changeux i wsp. [7]. Chociaż obecnie uwaga badaczy skupia się głównie na receptorach rzeczywistych, wciąż ulepsza się i konstruuje nowe modele teoretyczne.

Aktualny stan hipotez dotyczących budowy i działania teoretycznych (modelowych) receptorów farmakologicznych, oparty już w znacznym stopniu także na wynikach badań receptorów realnych, przedstawił ostatnio Burgen [13]. Nowoczesne teoretyczne modele receptora zakładają, że przeważająca większość receptorów znajduje się w stanie podstawowym, niewzbudzonym. Konformacja receptora jest wynikiem odpowiedniego ułożenia się jego struktury (którą jest w głównej mierze łańcuch polipetydowy) i w stanie podstawowym receptor przyjmuje konfigurację o najniższym możliwym poziomie energetycznym. Oczywiście nie jest to jedyna możliwa konformacja, a różne konformacje mogą się od siebie różnić albo niewiele, albo znacznie. Poszczególne stany konformacyjne są oddzielone od siebie barierami energetycznymi, które mogą być bądź niskie, i wówczas poszczególne konformacje mogą przechodzić w siebie wzajemnie względnie łatwo, bądź wysokie, i wtedy różne stany receptorów są praktycznie niewymienialne.

Połączenie receptora z agonistą będzie prowadzić do znacznego zmniejszenia energii tej konformacji, która jest konformacją aktywną, wzbudzoną. Antagoniści natomiast nie ułatwiają, po przyłączeniu, tworzenia konformacji wzbudzonej; jest problemem otwartym, czy receptory po połączeniu z antagonistą „zastygają” w stanie podstawowym, czy może przyjmują inną, swoistą, ale równie nieaktywną konformację. Fakt, że wiązanie cholinergicznego receptora muskarynowego ze swoistym antagonistą, związkiem QNB (benzylanem chinuklidylu), zachodzi dwufazowo, sugeruje, że przynajmniej w tym wypadku antagonistą nie łączy się z konformacją stanu podstawowego.

Tworzenie populacji pobudzonych stanów konformacyjnych receptorów jest źródłem informacji, która poprzez błonę komórkową powinna dojść do efektorów. To sprzężenie z efekтором może się odbywać w różny sposób:

a. Zmiana konformacyjna w miejscu przyłączenia liganda jest sprzężona bezpośrednio, przez strukturę białkową, ze zmianą konformacyjną innego miejsca tego samego białka, wykazującego aktywność biologiczną; następuje wzbudzenie centrum aktywnego.

b. Białko wiążące ligand jest podjednostką większego białka, i wiązanie liganda pociągnie za sobą zmiany konformacyjne innych podjednostek. Tak np. dzieje się w przypadku cholinergicznego receptora nikotynowego, gdzie tylko dwie z pięciu podjednostek wiążą acetylocholinę, a po związaniu dwóch cząsteczek tego agonisty następuje zmiana kształtu rozetki tworzonej przez wszystkie pięć podjednostek i otwarcie kanału jonowego.

c. Ligand reguluje łączenie się białka, z którym się wiąże, z innymi białkami. Taki model dotyczy wszystkich receptorów, które działają poprzez aktywację białek G, o czym będzie mowa przy omawianiu rzeczywistej budowy receptorów.

BADANIE RZECZYWISTEJ BUDOWY RECEPTORÓW

Jeszcze ćwierć wieku temu receptory były towarami czysto hipotetycznymi, koncepcjami abstrakcyjnymi, wymyślonymi po to, aby wytłumaczyć pewne działania leków, ale przedstawiającymi rzeczywistość równie wiernie, jak przedstawiały ją epicykle systemu ptolemeuszowskiego czy kopernikańskiego. (System Kopernika również operował epicyklami i mimo usiłowań autora nie uprościł, ale skomplikował system Ptolemeusza, zwiększając liczbę epicykli, dzięki temu jednak i dzięki przeniesieniu głównego punktu do środka orbity Ziemi (nie do Słońca!) zapewnił teoretyczny postęp w budowie harmonijnego obrazu wszechświata: planety poruszały się nie tylko po orbitach dokładnie kołowych, ale na dodatek ze stałą szybkością [26]. Oczywiście obecnie wiemy, że ruch planet można opisać inaczej, a znaczenie Kopernika polega na tym, że sam tego nie chcąc zmienił nasze podejście do klasycznych autorytetów naukowych).

W 1964 roku De Jongh [9] tak pisał o receptorze: „Dla większości współczesnych farmakologów receptor jest jak piękna lecz odległa dama. Piszą oni do niej wiele listów, a ona często im odpowiada. Z odpowiedzi tych farmakolog buduje sobie obraz tej pięknej damy. Nie może jednak uczciwie przyznać, że ją kiedykolwiek oglądał, chociaż pewnego dnia może mu się to uda”. Od tego czasu dokonał się znaczny postęp, i damę, a właściwie szereg dam, możemy oglądać.

Realne receptory farmakologiczne, definiowane przez Hollenberga i Cuatrecasasa [22] jako wysoce selektywne struktury znajdujące się na powierzchni komórki lub w jej wnętrzu (w tym artykule mówimy jedynie o receptorach powierzchniowych) w bardzo niewielkich ilości, które po reakcji z określoną grupą związków zmieniają jakiś krytyczny biochemiczny proces komórkowy, co prowadzi ostatecznie do uogólnionej odpowiedzi całej komórki, zaczęto wykrywać (pominąwszy pierwsze próby autoradiografii) dopiero w końcu lat sześćdziesiątych i na początku siedemdziesiątych. Zanim to nastąpiło wysunięto pewne spekulacje na temat tego, czym są i jak działają prawdziwe, realne receptory. W odróżnieniu jednak od właściwości opisywanych teoretycznie dla tworów, których naturą się nie interesowano, spekulacje na temat natury i budowy realnych receptorów okazały się z reguły chybione.

Nowoczesne badania receptorów umożliwił postęp metodologiczny, a przede wszystkim synteza radioligandów o dużej aktywności właściwej. Bezpośrednie znakowanie receptora dostarczyło dokładnych informacji o wielu jego właściwościach, takich jak: swoistość farmakologiczna miejsca wiążącego, heterogenność podtypów receptora, kinetyka reakcji wiązania i dysocjacji oraz dokładna lokalizacja receptora w różnych tkankach. Swoisty radioligand może być również użyty jako marker w procesie solubilizacji i oczyszczania receptora. Badanie wiązania można też wykorzystać do ustalenia rodzaju sił fizycznych biorących udział w wiązaniu liganda.

BADANIA AUTORADIOGRAFICZNE

Najwcześniejsze próby bezpośredniego badania rzeczywistych receptorów farmakologicznych, wykorzystujące radioaktywnie znakowane swoiste ligandy, to próby ich lokalizacji metodami autoradiograficznymi. Prace takie podjął W a s e r w połowie lat pięćdziesiątych, i przy użyciu radioaktywnej tubokuraryny zlokalizował receptory cholinergiczne w przeponie szczura [64].

Nowoczesne metody wizualizacji receptorów w ośrodkowym układzie nerwowym mają swoje początki w znacznie późniejszych pracach grupy K u h a r a [27]. Początkowe badania polegały na autoradiografii *ex vivo*: zwierzętom podawano duże dawki radioligandów, poczem zabijano, a mózg krajano na skrawki do badań autoradiograficznych. Metoda ta dawała jednak wyniki tylko wówczas, gdy użyte ligandy charakteryzowały się dużym powinowactwem (tzn. siłą działania), tak że ich stała powinowactwa była rzędu 10^{-10} mola/l. Trzeba tu jednak dodać, że wiele potężnych leków współczesnej psychiatrii charakteryzuje się właśnie powinowactwem tego rzędu, i dzięki temu można było uwidocznić autoradiograficznie receptory opioidowe (stosując trytowaną diprenorfinę lub etorfinę), dopaminowe i serotoninowe (z użyciem trytowanego spiroperidolu), czy muskarynowe (uwidaczniane trytowanym QNB). Koncepcję badań receptorów u żywych zwierząt wykorzystano następnie do badań receptorów opioidowych, dopaminowych, serotoninowych i benzodiazepinowych w mózgu ludzkim, stosując zamiast autoradiografii technikę tomografii pozytonowej [53].

Inny kierunek badań polegał na wykorzystaniu skrawków mózgu, które inkubowano w odpowiednich warunkach z radioligandem [50]. W tych warunkach można było badać wiązanie ligandów o słabszym powinowactwie, a np. dużej selektywności.

Metody autoradiograficzne wykazały nie tylko sam fakt nierównomierności rozłożenia receptorów, ale pozwoliły wnioskować o ich roli. Stwierdzono np., że receptory opioidów w rdzeniu kręgowym występu-

ją jedynie w substancji galaretowatej [38], o której od dawna wiadomo było, że jest zaangażowana w percepcji bólu. W badaniach funkcji receptorów pomaga zbadanie rozmieszczenia neuromediatorów. Stosując przeciwciała przeciw enkefalinom można było zbadać ich rozmieszczenie, a stwierdzenie koincydencji między dystrybucją enkefalin i receptorów opioidowych w rdzeniu wyjaśniło, że receptory te są receptorami enkefalinergicznymi [48].

BIOCHEMICZNE BADANIE WIAZANIA RADIOLIGANDÓW

Później niż badania autoradiograficzne, ale znacznie energiczniej zaczęły się rozwijać badania biochemiczne, w których charakteryzowano wiązanie radioligandów do preparatów błonowych. Pierwsze takie próby przeprowadzili na początku lat siedemdziesiątych Goldstein i wsp. nad receptorami opioidowymi [17]. Udało im się wykazać, że niewielki procent całkowitego wiązania radioligandów do receptora opioidowego jest wiązaniem stereospecyficznym i należy je uznać za wiązanie swoiste z receptorem. Badania te wykazały, że wiązanie specyficzne (a więc występowanie receptorów) ograniczone jest tylko do niektórych części mózgu i występuje tylko w błonach, a nie innych frakcjach subkomórkowych. Wyniki te początkowo nie wzbudziły zainteresowania, zwłaszcza, że wiązanie swoiste nie przekraczało 2-3% wiązania całkowitego, ale postęp metodyki doprowadził szybko do opracowania łatwych i wydajnych sposobów swoistego znakowania miejsc wiążących. Śladem grupy Goldsteina, kilka zespołów zajęło się badaniem swoistego wiązania opioidów, ustalając ponad wszelką wątpliwość istnienie receptorów dla związków morfinopodobnych [39, 49, 55]. Odkrycie to doprowadziło do postulowania istnienia, a następnie izolowania i charakteryzacji naturalnych ligandów tych receptorów, jako pierwszych odkrytych z bardzo licznej grupy neuromodulatorów peptydowych [58]. Obecnie znamy dla większości receptorów radioligandy tak swoiste, i potrafimy tak dobrać warunki doświadczenia, że uzyskujemy często ponad 80 a nawet 90% wiązania swoistego. Analiza danych biochemicznych pozwala na określenie gęstości miejsc receptorowych w badanej tkance (wyrażanej w pikomolach białka receptorowego na miligram tkanki lub całkowitego białka) oraz stałej powinowactwa, odpowiadającej dokładnie stałej powinowactwa wyznaczanej metodami farmakologii klasycznej dla receptorów teoretycznych (stężenie radioliganda, przy którym połowa miejsc receptorowych jest związana z radioligandem). Metodyka tych badań jest bardzo prosta i omawiałem ją niedawno [57]. W ciągu, jednak, kilku lat uczyniony został na tym polu dalszy postęp. Ostatnio często stwierdza się, że radioligandy, które uznawano za swoiste, w rzeczy-

wistości wykazują swoistość niewielką. Przykładem na taką późno odkrytą niepełną swoistość może być już dzisiaj praktycznie nie stosowany, a niegdyś popularny jako ligand rzekomo swoisty dla receptora α_1 -adrenergicznego, związek WB-4101 [21]. Ostatnio doniesiono, że klonidyna, dotychczas uważana za bardzo swoisty ligand receptora α_2 -adrenergicznego, w pewnych strukturach ośrodkowego układu nerwowego, łączy się tylko w 70% z tych receptorem, a w 30% z miejscami wiążącymi się z imidazolem [10]. Badacze często stają przed dylematem, czy stosować ligandy o dużej swoistości, ale małym powinowactwie, czy raczej o dużym powinowactwie, a umiarkowanie swoiste. Wybór często zależy od aktualnego stężenia receptorów w mózgu [11].

Badania prowadzone metodą wiązania radioligandów ze swoistymi receptorami doprowadziły do przełomu w naszych poglądach na komunikację między neuronami. Okazało się, że w przeciwieństwie do tego, co sądzono 10 lat temu, istnieje bardzo wiele typów i podtypów receptorów dla różnego rodzaju substancji endogennych, pełniących funkcje neuromediatorów lub neuromodulatorów.

TERMODYNAMICZNE BADANIE NATURY WIAZANIA LIGANDA Z RECEPTOREM

Badając wiązanie można nie tylko opisać jego parametry „formalne”, ale również badać rodzaj sił fizycznych zaangażowanych w tym procesie. Można o tym wnioskować na podstawie zmian energetycznych towarzyszących reakcji. Jeżeli w czasie wiązania następuje pobieranie lub oddawanie ciepła, wówczas reakcja jest charakteryzowana zmianami entalpii, zazwyczaj odzwierciedlającymi udział sił międzycząsteczkowych w stabilizacji kompleksu lek-receptor. Jeżeli reakcja następuje bez zmian cieplnych, jest ona napędzana zmianami entropii, odzwierciedlającymi stabilizację kompleksu lek-receptor przez zmianę ilości możliwych ekwiwalentnych stanów energetycznych substratów i produktów reakcji. Wiele reakcji jest napędzanych zarówno zmianami entalpii, jak i entropii [33].

Jednym z sposobów określania zmian energetycznych jest badanie wiązania w różnych temperaturach, a następnie interpretacja wyników według zasady termodynamiki stanu równowagi. W tym celu mierzymy wartości stałej asocjacji w stanie równowagi K_a . Dla związków nie radioaktywnych możemy ją obliczyć pośrednio z wypierania radioliganda:

$$K_b = (1 + B/K_b): IC_{50},$$

gdzie: B — stężenie radioliganda, K_b — jego stała dysocjacji (K_d), a IC_{50} — stężenie hamujące wiązanie radioliganda o 50%. Wartości K_a wsta-

wiamy w równanie van't Hoffa: nachylenie prostej wykresu K_a względem $1/T$ wynosi — $\Delta H/R$ (gdzie T — temperatura bezwzględna, H — entalpia, R — stała gazowa). Z wykresu obliczamy wartość zmiany entalpii. Znając wartość zmiany entalpii oraz obliczywszy zmianę wolnej energii ΔG ze wzoru:

$$\Delta G = -RT \ln K_a,$$

możemy obliczyć zmianę entropii ΔS ze wzoru:

$$\Delta G = \Delta H - T \Delta S.$$

Stosując tego typu podejście do analizy β -adrenoreceptora wykazano zasadnicze różnice między interakcjami molekularnymi agonistów i antagonistów z tym receptorem — wiązanie antagonistów jest napędzane entropią, a więc podobne do pasywnego wiązania ligandów do białek. Natomiast wiązanie agonistów różni się istotnie od wiązania biernego — jest napędzane entalpią i związane ze stosunkowo dużym, termodynamicznie niekorzystnym spadkiem entropii, umożliwiającym przez wielki spadek entalpii. Wydaje się, że te zmiany w entalpii i entropii odzwierciedlają zmiany w konformacji receptora wywołane związaniem z agonistą [65]. Ponieważ samo przyłączenie liganda do jednostki rozpoznawczej jest z reguły związane ze wzrostem entropii, omawiany wynik sugeruje głęboką zmianę konformacyjną białka receptorowego lub przyległych doń elementów błonowych, w wyniku której, wskutek spadku entalpii, dochodzi do zmniejszenia entropii przewyższającego jej początkowy wzrost wynikły z połączenia liganda z jednostką rozpoznawczą.

WYZNACZENIE WIELKOŚCI RECEPTORA METODĄ ANALIZY RADIACYJNEJ

Metodą umożliwiającą pomiar wielkości receptora jest metoda inaktywacji radiacyjnej [25]. Polega ona na umieszczeniu badanej próbki (zamrożonej lub liofilizowanej) w strumieniu elektronów o wysokiej energii. Jeżeli elektron trafi w receptor, powoduje zniszczenie strukturalne molekuly znoszące jej aktywność biologiczną, a więc i zdolność wiązania liganda. Zakłada się, że szansa trafienia przez elektron jest proporcjonalna do wielkości cząsteczek i w związku z tym cząsteczki większe będą inaktywowane szybciej, a cząsteczki mniejsze — wolniej. Porównanie spadku zdolności wiązania napromieniowanych receptorów ze zmianami aktywności enzymów o znanej masie cząsteczkowej, podanych temu samemu promieniowaniu, pozwala na wyznaczenie masy cząsteczkowej, a właściwie wielkości (promienia czynnego) badanego

receptora. Analiza tego typu ma liczne zalety, a mianowicie jest niezależna od stopnia czystości próbki (można więc jej używać do nieoczyszczonych preparatów błonowych), charakteryzuje wielkość receptora w jego stanie funkcjonalnym i może służyć do badania wymiarów w różnych stanach. Tak właśnie Nielsen i wsp. [36] wykazali, że masa cząsteczkowa cyklazy adenylowej z erythrocyta indyka w stanie podstawowym wynosiła 92 kDa, zwiększała się o 130 kDa po aktywacji nie ulegającym hydrolizie analogiem GTP, 5'-guanylimidodifosforanem (6ppNHp), a jeszcze dodatkowo o 90 kDa wzrastała masa badanego kompleksu po aktywacji swoistym ligandem β -adrenoceptora, izoprote-renolem. Tak więc można było stwierdzić, że aktywowany kompleks składa się z trzech podjednostek: receptora, białka G (jednostki aktywowanej przez nukleotydy guaninowe) i enzymu tworzącego wtórny przekaznik. Porównanie wyników otrzymanych metodą inaktywacji radiacyjnej oraz przez izolację receptora wskazują, że w większości wypadków masy cząsteczkowe uzyskane w tej pierwszej metodzie są większe, często sugerując, że aktywną jednostką receptorową w błonie jest dimer [30]. Jednakże należy zauważyć, że w metodyce tej pojawiają się trudności związane z ustaleniem odpowiednich czynników korekcyjnych, i stąd często uzyskuje się dane rozbieżne zarówno w pracowniach stosujących tę samą metodykę, jak i w wynikach uzyskiwanych metodą inaktywacji radiacyjnej i metodami hydrodynamicznymi (chromatografia na sitach molekularnych itp.).

IZOLACJA, BADANIE BUDOWY I REKONSTYTUCJA RECEPTORÓW

Podobnie jak niegdyś enzymologia, farmakologia molekularna, stawiając sobie za cel poznanie natury receptora, dąży do otrzymania go w stanie czystym. Opis izolacji cholinergicznego receptora nikotynowego podaje w tym zeszycie „Kosmosu” Skangiel-Kramska [51]. Pierwszym etapem izolacji jest ekstrakcja receptora z badanej tkanki, co wymaga jego solubilizacji przy użyciu detergentów. Przy prowadzeniu solubilizacji w odpowiednich warunkach, rozpuszczony receptor w dalszym ciągu zachowuje zdolność wiązania się z ligandami, można więc użyć odpowiednich radioligandów do wykrycia i izolacji białka receptorowego. Z reguły oczyszczenie białka wykonuje się metodą chromatografii powinowactwa. Na przykład do izolacji receptora glicynowego sporządzono żywicę w taki sposób, że do ziarn agarozy przyczepiono ligand, biologicznie aktywną pochodną strychniny, poprzez długi łańcuch hydrofilny. Jeżeli się wszystko powiedzie, można uzyskać żywicę o takich własnościach, że za jej pomocą można białko receptorowe oczyścić prawie do homogenności już po pojedynczym pasażu [4].

Dalszym etapem pracy nad izolowanym receptorem jest zbadanie, czy i z jakich podjednostek się składa. Najczęściej stosowaną techniką wyznaczania masy cząsteczkowej białka jest elektroforeza na żelu poliakrylamidowym w obecności dodecylosulfonianu sodowego (SDS-PAGE) lub chromatografia filtracyjna na żelu. Po separacji podjednostek, można badać która z nich przyłącza znakowany ligand, aby zorientować się, która musi znajdować się po zewnętrznej części komórki. Ostatnim stadium badań jest rekonstrukcja białka receptorowego. Tak np. Haga i wsp. [19] po oczyszczeniu receptora muskarynowego rekonstruowali go w pęcherzykach fosfolipidowych. W tym celu mieszaninę zawierającą oczyszczony receptor oraz białko G_i , wyizolowane z mózgu szczura, zawieszano w detergencie wraz z nieoczyszczoną frakcją fosfolipidową z mózgu szczura i fosfatydylocholiną. Po filtracji na żelu otrzymano uwolnione od detergentu pęcherzyki fosfolipidowe zawierające około 80% dodanego białka wiążącego radioligand (była nim [3H]-N-metyloskopolamina) i około 50% białka G_i . Takie pęcherzyki wykazywały właściwości receptora muskarynowego, wiązały odpowiedni radioligand, a pod wpływem agonisty wykazywały charakterystyczną dla receptora reakcję biochemiczną — wzrost aktywności GTP-azy. Oznacza to, że białko receptorowe w pęcherzykach uległo pod wpływem agonisty sprzężeniu z białkiem G_i , tak, jak czyniłby to funkcjonalny receptor w błonie komórkowej. Nie ulega więc wątpliwości, że udało się faktycznie wyizolować receptor. W analogiczny sposób wyizolowano wiele innych typów receptorów.

Chociaż izolacja i rekonstrukcja receptora nie daje wszystkich informacji o jego budowie, jednak rozszerza bardzo naszą wiedzę o nim, a ponadto jest warunkiem przejścia do następnego etapu badań — ustalenia jego struktury pierwszorzędowej.

USTALENIE STRUKTURY PIERWSZORZĘDOWEJ RECEPTORA

Bezpośrednie wyznaczanie całej aminokwasowej struktury receptora byłoby zajęciem niesłychanie żmudnym. Z pomocą przychodzi tu badaczom inżynieria genetyczna. Mając do dyspozycji oczyszczony receptor można wyznaczyć strukturę aminokwasową jego fragmentów (sekwencje przy końcu N podjednostek), co jest konieczne dla sporządzenia sond molekularnych potrzebnych do przygotowania komplementarnego DNA. Dysponując zaś komplementarnym DNA można wydedukować strukturę całego receptora. Metodykę takich badań omawia w następnym zeszyście „Kosmosu” Skangiel-Kramska [51].

Znając strukturę pierwszorzędową receptora, możemy wnioskować o jego ułożeniu w błonie komórkowej. Można bowiem wyznaczyć, na ile hydrofobowe lub hydrofilowe są fragmenty jego łańcucha. Fragmenty

hydrofobowe są zazwyczaj sekwencjami, które penetrują przez błonę komórkową, a fragmenty hydrofilowe znajdują się po wewnętrznej lub zewnętrznej stronie błony.

BUDOWA RECEPTORÓW

Receptory neurotransmiterów i neuromodulatorów można podzielić, ze względu na mechanizm biochemiczny ich działania, na dwie wielkie grupy: receptory jonotropowe, które bezpośrednio regulują kanały jonowe, oraz receptory metabotropowe, których pobudzenie prowadzi do zwiększenia lub zmniejszenia syntezy wtórnego przekąźnika.

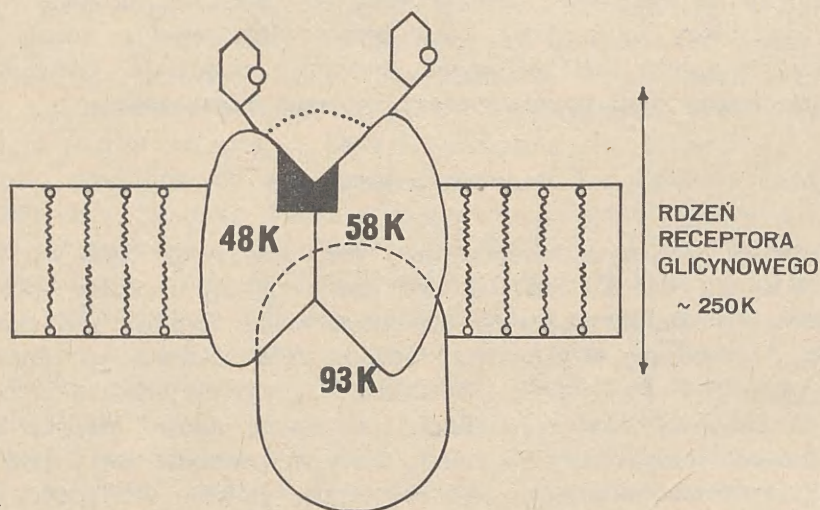
RECEPTOR JONOTROPOWY

Najlepiej poznanym receptorem z pierwszej grupy jest omówiony przez Skangiel-Kramską [51] cholinergiczny receptor nikotynowy. Mniej dokładnie poznany, ale intensywnie badany, jest receptor GABA_A i wchodzący w jego skład receptor benzodiazepinowy, omówione m.in. przez Haefely'ego [18]. Jeszcze innym przykładem może być receptor glicynowy, którego biologię i strukturę omówił ostatnio Betz [4] i któremu przyjrzymy się bliżej. Glicyna, podobnie jak GABA, jest neurotransmiterem hamującym, ale występuje głównie w niższych częściach ośrodkowego układu nerwowego — pniu mózgu i rdzeniu, podczas gdy GABA znajduje się w przewodzie w mózgu. Oba hamujące aminokwasy wywierają swoje działanie otwierając kanał chlorkowy. Receptor glicynowy jest silnie pobudzany również działaniem innych aminokwasów, β -alaniny i tauryny.

Najsilniejszym znanym swoistym antagonistą receptora glicynowego jest strychnina, której toksyczne, drgawkorodne działanie, wynika z zahamowania przekąźnictwa glicynergicznego w różnych obszarach ośrodkowego układu nerwowego. Właśnie przy użyciu strychniny i jej pochodnych izolowano i oczyszczono receptor glicynowy. Strychnina łączy się z receptorem glicynowym w miejscu związanym z kanałem jonowym. Innymi, słabszymi antagonistami tego receptora są THIP (4, 5, 6, 7-tetrahydroizoksazolo [5, 4-c] pirydino-3-ol) i jego pochodne, które łączą się z innym miejscem białka niż strychnina. Do jeszcze innego miejsca receptora glicynowego dołącza się awermektyna B_{1a}. Tak więc receptor glicynowy ma 3 odmienne, chociaż nakładające się na siebie lub oddziałujące wzajemnie punkty uchwytu dla antagonistów.

Receptor glicynowy jest glikoproteiną o charakterystyce fizycznej podobnej do innych białek regulujących kanały jonowe — receptora nikotynowego czy zależnego od napięcia kanału sodowego (*voltage-de-*

pendent sodium channel). W jego skład wchodzi trzy typy podjednostek, o masie cząsteczkowej 48, 58 i 93 kDa, z których dwie pierwsze są glikoproteinami. Przypuszczalną strukturę receptora glicynowego przedstawia schematycznie rys. 2. Sądzi się, że część wiążąca strychninę, o masie 250 kDa, składa się z 2-3 jednostek 48 kDa i 1-2 jednostek 58 kDa, które są obie glikozylowane i w których znajduje się miejsce



Rys. 2. Schematyczny obraz receptora jonotropowego — receptor glicynowy [wg. 4]. Rdzeń receptora, zawierający domenę wiążącą strychninę jest heterooligomerem o masie około 250 kDa, składającym się z kilku polipeptydów o masie 48 i 58 kDa (na rysunku pokazano po jednej kopii każdego). Miejsce wiążące strychninę zaznaczono na czarno. Pierścienie symbolizują łańcuchy węglowodanowe. Dalsze objaśnienia w tekście

wiązące neuromediator. Miejsce to znajduje się w domenie chronionej przez struktury lipidowe, gdyż proteoliza, przy użyciu trypsyny, nie powoduje odszczepienia strychniny związanej w strukturach błonowych. Te podjednostki tworzą kanał jonowy. Do aktywacji kanału konieczne jest przyłączenie dwóch molekuł glicyny. Jednostka 93 kDa, której rola jest nieznana, znajduje się po wewnętrznej stronie błony.

RECEPTOR METABOTROPOWY

Budowa receptorów metabotropowych jest bardziej złożona. Receptory tego typu, mimo bardzo odmiennych właściwości farmakologicznych, wydają się być strukturalnie bardzo podobne. Wykazano to przynajmniej dla trzech tak niepodobnych czynnościowo receptorów, jakimi są recep-

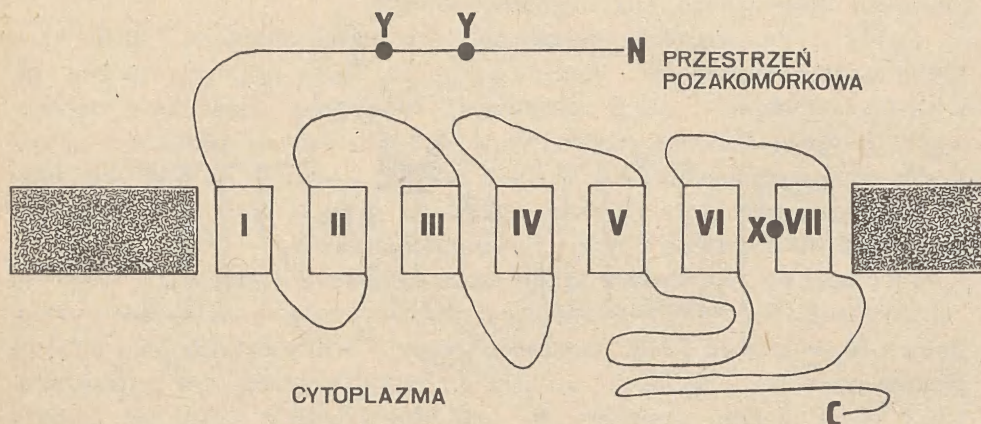
tor β -adrenergiczny, muskarynowy receptor cholinergiczny oraz receptory światła — barwniki wzrokowe (rodopsyna i opsyny) [20]. Choć receptory te uczestniczą w różnych systemach transdukcji, mechanizm zapoczątkowujący ich działanie jest taki sam. W wyniku aktywacji receptora wchodzi on w połączenie z tzw. białkiem G (zwanym też białkiem N), w ten sposób je aktywując, a to z kolei zmienia aktywność enzymów regulujących syntezę wtórnych przekazników, przenoszących sygnał do wnętrza komórki. Proces ten bardziej szczegółowo omówimy po opisie budowy receptora metabotropowego.

Każdy z omawianych receptorów jest przedstawicielem ściśle spokrewnionej grupy białek. Istnieją receptory β_1 - i β_2 -adrenergiczne, M_1 i M_2 -muskarynowe i wiele pokrewnych rodopsynie barwników wzrokowych. Budowę ludzkiej rodopsyny wydedukowano na podstawie znajomości odpowiedniego mRNA w 1984 roku, a opsyn — w dwa lata później. Budowę receptora β_2 -adrenergicznego z płuca chomika wydedukowano, po sklonowaniu genu i komplementarnego DNA, w grupie Lefkowitza. Na drodze klonowania, ustalenia sekwencji i ekspresji komplementarnego DNA kodującego muskarynowy receptor acetylocholinowy M_1 w mózgu świni badacze z grupy N umy ustalili jego budowę pierwszorzędową i wykazali, że jest on różny od receptora muskarynowego M_2 . Podobnie receptory β_1 - i β_2 -adrenergiczny różnią się między sobą sekwencją aminokwasową (patrz [20]). Wynik ten jest o tyle istotny, że sugeruje iż różniące się farmakologicznie pod pewnymi względami, choć ogólnie rzecz biorąc bardzo zbliżone do siebie podtypy receptorów, są jednak produktami innych genów, a nie powstają w wyniku zmian potranslacyjnych.

Omawiane trzy typy receptorów mają w zasadzie identyczny plan budowy, przedstawiony na rys. 3. Są to białka penetrujące błonę wielokrotnie: prawdopodobnie siedem razy, gdyż tyle zawierają odcinków hydrofobowych, składających się z 20-25 aminokwasów. Ponieważ liczba przekroczeń błony jest nieparzysta, jeden koniec receptora powinien się znajdować w cytoplazmie, drugi w przestrzeni międzykomórkowej. Jak się wydaje, w cytoplazmie znajduje się długi hydrofilowy odcinek C-końcowy, a także długa pętla hydrofilowa między fragmentami transmembranowymi V i VI i krótsze pętla między odcinkami I i II oraz III i IV. Przypuszcza się, że pętla między odcinkami I i II jest miejscem interakcji z białkiem G; wykazuje ona dużą stałość budowy w różnych typach receptorów [20]. Również wysoki stopień homologii (28% dla receptorów muskarynowego i β -adrenergicznego) wykazują odcinki transmembranowe, o których przypuszcza się, że mogą zawierać miejsca wiążące ligandy w receptorach β -adrenergicznym i muskarynowym, a różnice w ich budowie w różnych opsynach sugerują, że mogą być odpowiedzialne za absorpcję światła i różnice w charakterystyce spektralnej

barwników wzrokowych. Wydaje się więc, że podobnie jak w przypadku receptora glicynowego, miejsca wiążące tych receptorów są związane ze strukturami lipofilnymi.

Odcinek C-końcowy jest również interesujący: jest on bogaty w serynę i treoninę, i najprawdopodobniej tu zachodzi reakcja fosforylacji, regulująca liczbę aktywnych receptorów.



Rys. 3. Schematyczny obraz receptora metabotropowego — receptora związanego z białkiem G [wg. 20]. Y — miejsca glikozylacji. X — miejsce lizyny, do której w opsynie wiąże się retinal. Dalsze objaśnienia w tekście

Podobieństwo planu budowy i duży stopień homologii sugerują, że omawiane tu receptory, a prawdopodobnie także inne receptory metabotropowe, których zbadanie jest tylko sprawą czasu, są związane ze sobą ewolucyjnie i są przedstawicielami rodziny szeroko rozpowszechnionych receptorów powierzchniowych związanych z białkami G.

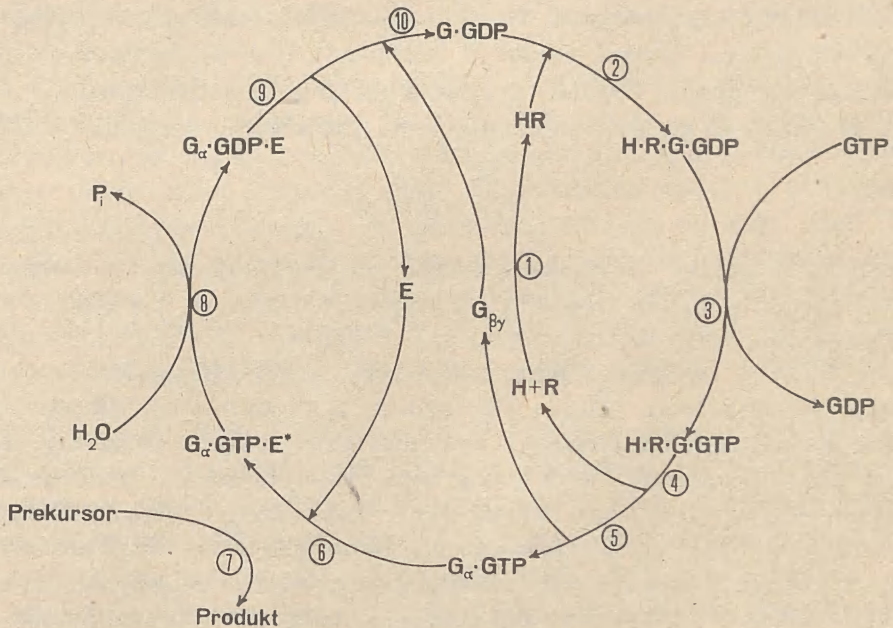
BIAŁKA G I WTÓRNE PRZEKAŹNIKI

Białka G, stanowiące niezbędny składnik receptorów metabotropowych, umożliwiające tworzenie wtórnych przekazaźników, zostały odkryte w ostatnim dziesięcioleciu [42] i wciąż są przedmiotem intensywnych badań i artykułów poglądowych [16, 24, 36]. Ich istnienie zostało pierwszy raz zasygnalizowane przez odkrycie, że GTP jest niezbędny do aktywacji hormonalnej cykazy adenyłowej, chociaż równocześnie silnie hamuje wiązanie hormonu do receptora [44]. Obecnie wiemy, że białka G znajdują się w błonie komórkowej. Są to heterotrimery: składają się z trzech różnych podjednostek, nazwanych α (46-40 kDa), β (37 kDa)

i γ (8 kDa). Podjednostki β i γ są, jak się wydaje, identyczne u wszystkich białek G, podczas gdy podjednostki α są różne: mogą one bądź pobudzać, bądź hamować produkcję wtórnego przekazywnika.

MECHANIZM DZIAŁANIA BIAŁEK G

Białka G w stanie podstawowym w błonie są związane z GDP i są nieczynne. Przebieg reakcji rozpoczynającej się od połączenia receptora (jednostki rozpoznającej) z hormonem i prowadzącej do wytworzenia sygnału wewnątrzkomórkowego, wtórnego przekazywnika, a następnie do odtworzenia stanu wyjściowego przedstawia rys. 4.



Rys. 4. Schemat interakcji białka G z nukleotydami guaninowymi, receptorami i układem generującym wtórny przekazywnik [wg. 16]. Objaśnienia w tekście

Pierwszą reakcją (1) jest połączenie się hormonu lub neuromediatora (H) z jednostką rozpoznawczą receptora błonowego (R). W jej wyniku tworzy się kompleks hormon-receptor (H·R.), który w kolejnej reakcji (2) łączy się ze znajdującym się w błonie nieczynnym kompleksem białka G z GDP. Połączenie się G·GDP z H·R w kompleks H·R·G·GDP zmniejsza powinowactwo białka G do GDP, a zwiększa powinowactwo do GTP i w następnej reakcji (3) zachodzi wymiana nukleotydów guaninowych i wytworzenie kompleksu H·R·G·GTP. Kompleks ten jest aktywny, ale niestabilny: odłącza się od niego hormon i receptor

(reakcja 4), a następnie białko G rozpada się na podjednostki. W reakcji tej (reakcja 5) podjednostka $G_{\beta\gamma}$ zostaje uwolniona, zaś $G_{\beta\gamma}$ wciąż połączona z GTP — G_{α} .GTP — jest formą aktywną, reagującą ze znajdującą się w stanie spoczynkowym jednostką katalityczną receptora, E, enzymem tworzącym wtórny przekaźnik. W wyniku tej reakcji (reakcja 6) tworzy się aktywny kompleks G_{α} .GTP.E* i aktywowana jednostka katalityczna (np. cyklaza adenyłowa albo fosfolipaza C) katalizuje reakcję 7, tworzenie się wtórnego przekaźnika z prekursora (np. cAMP z ATP). Aktywny kompleks G_{α} .GTP.E* ulega łatwo hydrolizie katalizowanej przez guanozynotrifosfatazę. W wyniku tej reakcji odszczepia się z GTP fosfor nieorganiczny i powstaje GDP (reakcja 8). Podjednostka G_{α} połączona z GDP nie ma już własności aktywowania jednostki katalitycznej, a powstały w wyniku reakcji 8 nieaktywny kompleks 9, G_{α} .GDPE odłącza się od jednostki katalitycznej (reakcja 9), a do pozostałego kompleksu G_{α} .GDP przyłącza się zespół podjednostek β i γ , $G_{\beta\gamma}$, w reakcji 10 tworząc ponownie pełny nieaktywny kompleks G.GDP.

TYPY BIAŁEK G

Białka G pełnią niesłychanie ważną rolę regulując działanie wszystkich receptorów metabotropowych. Być może właśnie ze względu na swą kluczową rolę stały się one celem ataku licznych toksyn bakteryjnych. Różne toksyny swoiście atakują różne typy białek G, powodując rybozylację (przeniesienie grupy ADP-ryboza z dinukleotydu nikotynamidoadeninowego, NAD) reszty cysteinowej w miejscu wiązania GTP przez podjednostkę G_{α} . W wyniku tego białko G zostaje bądź permanentnie aktywowane, bądź zablokowane. Tak działają toksyny *Corynebacterium diphtheriae*, *Escherichia coli*, *Bordetella pertussis*, *Vibrio cholerae* i różnych *Pseudomonas*. Toksyny te, zwłaszcza toksyny cholery (choleratoksyna) i krztuśca (pertussogen), odegrały olbrzymią rolę w identyfikacji funkcji różnych białek G.

Obecnie znamy cztery zasadnicze typy białek G [16]:

1. G_s , białko stymulujące cyklazę adenyłową, atakowane swoiście przez choleratoksynę; w wyniku rybozylacji zahamowaniu ulega reakcja hydroksylacji aktywnego kompleksu (reakcja 8) i następuje wzmożone tworzenie wtórnych przekaźników [46]. Wykazano istnienie dwóch form podjednostki G_{α} , kodowanych przez wspólny gen, a powstających w wyniku różnego rozcięcia mRNA, o masach 46 i 44,5 kDa. Znaczenie funkcjonalne istnienia dwóch form G_{α} nie jest jeszcze jasne. Poza działaniem pobudzającym na cyklazę adenyłową sugeruje się, że regulują one transport jonów magnezu, a być może także glukozy i jonów wapnia [43].

2. G_i , białko blokujące cyklazę adenylową, jest hamowane swoiście przez pertussogen; w wyniku rybozylacji podjednostki $G_{\alpha i}$ uniemożliwiona jest jej dysocjacja od podjednostek $G_{\beta\gamma}$ (reakcja 5), a więc nie tworzy się aktywny kompleks hamujący jednostkę katalityczną i zwiększa się tworzenie wtórnego przekaźnika [24]. Masa cząsteczkowa $G_{\alpha i}$ wynosi 40,5 kDa. Mechanizm hamowania cyklazy adenylowej nie jest jasny. Poza działaniem na cyklazę $G_{\alpha i}$ wydaje się regulować wewnątrzkomórkowe stężenie wapnia i syntezę oraz rozkład fosfatydyloinozytoli w niektórych, ale nie wszystkich typach komórek. Mimo tego, że G_i jest białkiem hamującym cyklazę adenylową, wydaje się, że jego obecność jest konieczna do maksymalnej stymulacji tego enzymu przez G_s (ze względu na obniżenie wartości podstawowych aktywności cyklazy), a więc może być potrzebne zarówno do hamowania, jak i nasilania tworzenia wtórnego przekaźnika [6].

3. G_o (od *other*, a więc czytane G-o, nie G-zero!), o nieznanym dotychczas funkcjonowaniu, znajdujące się w dużych ilościach w mózgu, zwłaszcza w korze czołowej, a ponadto występujące w innych tkankach pobudliwych (serce, rdzeń kręgowy). Również blokowane swoiście przez pertussogen. G_{zo} jest najlżejsze ze wszystkich G_x , mając masę około 39 kDa. Fakt, że dystrybucja G_o pokrywa się z topografią miejsc wiążących forbol, sugeruje, że jest ono związane z metabolizmem fosfatydyloinozytoli [16], a fakt, że występuje w tkankach pobudliwych — że może być szczególnie związane z regulacją kanałów jonowych sterowanych przez receptory.

4. G_t , zwane inaczej transducyną, związane z barwnikami wzrokowymi, aktywuje fosfodiesterazę cGMP w siatkówce, jest atakowane zarówno przez choleratoksynę, jak i przez pertussogen; wykazano istnienie dwóch bardzo zbliżonych form: G_{t1} ($G_{\alpha t1}$ 40 kDa) występującej w zewnętrznych partiach pręcików, i G_{t2} ($G_{\alpha t2}$ 40,5 kDa) — w czopkach.

Jak się wydaje G_s , G_i i G_o mają identyczny kompleks podjednostek $\beta\gamma$; podjednostki te w G_t są podobne, ale nieco inne.

Ostatnio postuluje się jeszcze istnienie odrębnej grupy białek G , G_p , które miałyby być związane z aktywacją fosfolipazy C w niektórych komórkach. Nie udowodniono jednak dotychczas ich istnienia.

Dyskutując ostatnio możliwą rolę białek G , Rodbell [43] sugeruje, że podjednostki $G_{\alpha s}$ i $G_{\alpha i}$ same mogą pełnić rolę wtórnych przekaźników, a różnorakie efekty hormonów na docelowe komórki nie są wyłącznie wynikiem produkcji pojedynczego, niskocząsteczkowego sygnału chemicznego, takiego jak cykliczny AMP, trifosforan inozytoli, diacyloglicerol, czy jony wapnia, ale raczej powstają wskutek oddziaływań uwolnionych podjednostek $G_{\alpha s}$ i $G_{\alpha i}$ z różnorodnymi systemami efektorowymi w komórce. Jego wstępne wyniki sugerują, że podjednostki $G_{\alpha s}$

mogą być uwalniane z błon. Nie wydaje się jednak, aby ta najnowsza koncepcja Rodbella poważnie zagroziła w najbliższych latach dobrze ugruntowanym teoriom o działaniu receptorów metabotropowych przez proste wtórne przekazywniki. Z drugiej strony, wykazana ostatnio wybitna hydrofilność podjednostek $G_{\alpha i}$ i $G_{\alpha o}$ sugeruje, że ich aktywność może nie ograniczać się do błony komórkowej.

Jak wspomniano, w poznaniu roli białek G wielką rolę odegrało zastosowanie toksyn bakteryjnych: toksyny cholery i pertussogenu [24]. Właśnie stosując pertussogen i wykazując, że po jego użyciu słabnie odpowiedź biologiczna, okazało się, że białko G_i jest związane z wieloma receptorami hamującymi, takimi jak α_2 -adrenergiczny (zarówno pre-, jak i postsynaptyczny), dopaminowy D_2 , opioidowy, adenylinowy, prostaglandynowy, muskarynowy itp. Dla psychofarmakologów szczególnie interesujące były wyniki badań, w których podawano pertussogen bezpośrednio do komór mózgowych. Efekty biologiczne były opóźnione, występowały po upływie 1—3 dni. Wykazano, że u tak traktowanych szczurów ulegają osłabieniu odpowiedzi na wiele leków stymulujących różne receptory hamujące i pojawia się długotrwałe pobudzenie motoryczne [37]. Ten ostatni efekt świadczy o tym, że w warunkach fizjologicznych receptory hamujące związane z białkiem G (może to być białko G_i lub G_o) aktywnie hamują pobudzenie behawioralne.

BIAŁKA G A ADAPTACYJNE ZMIANY RECEPTOROWE

Jedną z ważniejszych cech receptorów farmakologicznych jest ich zdolność ulegania zmianom adaptacyjnym pod wpływem pewnych zabiegów, prowadzących do długotrwałego zmniejszenia lub zwiększenia ich oddziaływania z neuromediatorami. Przejawia się to w nasileniu lub osłabieniu reakcji, w którą zaangażowany jest receptor.

Takie zjawisko w układzie adrenergicznym wykazaliśmy dla ośrodkowych receptorów adrenergicznych zaangażowanych w syntezę cyklicznego AMP: w warunkach deficytu noradrenaliny wywołanego podaniem rezerpiny lub 6-hydroksydopaminy zdolność syntezy cyklicznego AMP ulegała szybko znacznemu wzrostowi, natomiast po zabiegach prowadzących do chronicznego podniesienia poziomu amin biogennych — przewlekłym podawaniu inhibitorów monoaminooksydazy — zwolna wytwarzała się podwrażliwość układu na działanie agonistów [61]. Dalsze badania wykazały, że podwrażliwość wytwarza się również po chronicznym podawaniu inhibitora wychwytu noradrenaliny, desipraminy, a także elektrowstrząsów i leków przeciwdepresyjnych nie powodujących ewidentnych zmian w stężeniu noradrenaliny w sąsiedztwie receptora [60, 62]. Zjawisko to, ochrzczone opierającym się spolszczeniu mianem *down regulation*, jest w większości wypadków związane ze spadkiem liczby

miejsz wiążących ligand receptora β -adrenergicznego. (Niektórzy autorzy [47] termin *down regulation* rezerwują tylko dla zjawiska nieodwracalnego zmniejszenia się liczby receptorów). Chroniczne podawanie leków przeciwdepresyjnych powoduje również zmiany adaptacyjne w innych typach receptorów w ośrodkowym układzie nerwowym. Zmiany adaptacyjne różnych typów receptorów obserwowano później również po wielu innych manipulacjach. Budzą one duże zainteresowanie farmakologów, gdyż mogą być wynikiem podawania leków, modyfikować działanie leków, a czasem, jak właśnie w wypadku leków przeciwdepresyjnych mogą być odpowiedzialne za efekt leczniczy [59].

Molekularne mechanizmy prowadzące do podwrażliwości i nadwrażliwości receptorów metabotropowych są w głównej mierze związane ze zmniejszeniem lub zwiększeniem szybkości syntezy wtórnego przekąźnika, a nie ze zmianami szybkości jego rozkładu lub spadkiem jego efektywności [47]. Białka G mogą niewątpliwie być zaangażowane w tych zmianach, ponieważ pełnią krytyczną rolę w sprzężeniu receptora z efekтором. Zmiany wrażliwości mogą być wywołane bądź zmianą zdolności receptora do sprzężenia się z białkiem G (reakcja 2, rys. 4), bądź zmianą zdolności białka G do wiązania się z GTP (reakcja 3), zmianą zdolności podjednostki G_s do łączenia się z enzymem efektorowym (reakcja 6) albo zmianą liczby białek G lub stosunku ilościowego między białkami G_s i G_i .

Szczególnie wiele wiemy o mechanizmach regulacji receptora β -adrenergicznego dzięki badaniom grupy Lefkowitz'a [47]. Badacze ci wykazali zasadnicze różnice w mechanizmach regulacji homologicznej, występującej w wyniku zmiany ilości naturalnego agonisty receptora reagującego z ligandem, i regulacji heterologicznej, wywołanej oddziaływaniem czynników nie będących swoistymi agonistami lub antagonistami receptora β -adrenergicznego (np. prostaglandyny powodują zmniejszenie, a sterydy zwiększenie odpowiedzi układu β -adrenergicznego). Podwrażliwość homologiczna, tzn. wywołana przez nadmiar agonisty, wydaje się być konsekwencją fosforylacji samego tylko receptora (fosforylacja receptora β -adrenergicznego i pokrewnych mu receptorów metabotropowych, zachodząca przy znajdującym się w cytoplazmie odcinku końcowym C jest — jak wiadomo — zasadniczym procesem regulującym aktywność tego typu receptorów). Ta zmiana receptora prowadzi do jego rozprzęgnięcia się z białkiem G, a dalej do sekwestracji (odosobnienia) w błonie i w końcu do zniszczenia enzymatycznego w cytoplazmie (*down regulation* w znaczeniu używanym przez Lefkowitz'a). Natomiast podwrażliwość heterologiczna, która rozwija się znacznie wolniej, wydaje się być związana nie tylko z fosforylacją białka receptorowego, ale także z równoczesną modyfikacją (prawdopodobnie też fosforylacją) białka G_s .

ale nie prowadzi do sekwestracji ani do destrukcji receptora [47]. Zmiana białka G oczywiście odbija się na możliwościach jego oddziaływania bądź z GTP, bądź z enzymem katalizującym tworzenie wtórnego przekaznika. Istnieją też dowody na to, że heterologiczne wywołanie podwrażliwości może w niektórych tkankach wynikać ze wzrostu poziomu białka G_i , przy niezmienionym poziomie białka G_s [47].

BIAŁKA G A CHARAKTER DZIAŁANIA LIGANDA

W klasycznych badaniach wiązania radioligandów do jednostek rozpoznawczych receptora sądzono, że nie będzie można tylko na tej podstawie odróżnić, czy ligand będzie agonistą, czy antagonistą receptora, i badania mające to stwierdzić będą musiały być uzupełnione badaniami funkcjonalnymi lub, jak to omówiono, termodynamicznymi. Dlatego też powitano ze zdziwieniem, ale i radością, dowód na to, że w przypadku receptorów opioidowych o charakterze liganda można się zorientować po tym, czy wiązanie ulega osłabieniu w obecności jonów sodowych [40]. Obecność jonów sodowych hamowała bardzo silnie wiązanie agonistów receptora, nie wpływała na wiązanie antagonistów, a zmniejszała stosunkowo nieznacznie wiązanie agonistów częściowych, uważanych za związki najbardziej interesujące z punktu widzenia praktycznego, gdyż sądzi się, że wśród nich należy szukać związków o silnym działaniu przeciwbólowym, ale niewielkim działaniu uzależniającym. Odkrycia tego dokonano długo przed poznaniem białek G, ale obecnie wiemy, że tzw. „efekt sodowy” jest właśnie związany z tym białkiem, oraz że jest charakterystyczny nie tylko dla wiązania receptorów opioidowych, ale i innych, działających poprzez białko G_i [42].

Po wspomnianym już odkryciu Rodbella i wsp. [44], że GTP poza tym, że jest konieczny do aktywacji cykazy adenyłowej przez glukagon, równocześnie hamuje wiązanie glukagonu wykazano [32], że ogólnie nukleotydy guaninowe hamują wiązanie agonistów receptorów metabolotropowych, ale nie zmieniają wiązania antagonistów. Odkrycie to umożliwia przewidzenie, czy badany ligand będzie działać jako agonista, czy antagonistą, na podstawie porównania wiązania w obecności i nieobecności GTP lub, co częściej się stosuje, jego nie ulegającej hydrolizie pochodnej, GppNHp. Dokładny mechanizm obniżenia wiązania agonisty nie jest znany, ale wybiórczość tego efektu łączy się z faktem, że agonista po związaniu się z receptorem aktywuje białko G, podczas gdy kompleks receptora z antagonistą nie łączy się z białkiem G i wskutek tego antagonistą, okupując bezużytecznie receptor, utrudnia działanie naturalnych, endogennych ligandów.

FIZJOLOGICZNE SKUTKI POBUDZENIA RECEPTORA

Pobudzenie receptora jonotropowego powoduje otwarcie kanałów znajdujących się pod kontrolą tych receptorów, co pociąga za sobą napływ do komórki lub wypływ z niej odpowiednich jonów, a to z kolei zmienia stan pobudliwości komórki i ułatwia lub utrudnia generację potencjałów czynnościowych. Aktywacja receptora metabotropowego powoduje tworzenie się wtórnych przekazników — cyklicznego AMP lub pochodzących z rozpadu fosfatydyloinozytoli trifosforanu inozytoli i diacyloglicerolu [35, 56]. Zjawiskom tym poświęcone są osobne opracowania w tym zeszycie „Kosmosu”.

FARMAKOLOGICZNA KLASYFIKACJA RECEPTORÓW

Receptory farmakologiczne farmakolog klasyfikuje nie na podstawie budowy lub biochemicznego mechanizmu przenoszenia sygnałów ale na podstawie tego, z jakim neuromediatorem związane jest ich działanie. Klasyczne receptory farmakologiczne to receptory adrenergiczne, dopaminergiczne, serotonergiczne, cholinergiczne, opioidowe, gabergiczne, glicynergiczne, receptory pobudzających aminokwasów itp. Okazało się też, po stwierdzeniu że klasyczne neuromediatory w neuronach występują z reguły w towarzystwie modulujących ich działanie peptydów, iż peptydy te mają też swoje własne receptory [58]. Omówienie różnych typów receptorów farmakologicznych przekroczyłoby znacznie ramy tego artykułu, warto jednakże poczynić tu kilka uwag ogólnych.

Pojedynczy klasyczny neuromediator z reguły pobudza kilka klas receptorów. Tak np. już dawno stwierdzono, że noradrenalina pobudza receptory α - i β -adrenergiczne, a obecnie wiemy, że w obrębie tych klas istnieją jeszcze podklasy, które w przypadku receptorów α -adrenergicznych bardzo wybitnie różnią się między sobą, natomiast bardzo podobne do siebie są receptory β_1 i β_2 -adrenergiczne. Analogicznie, dopamina pobudza receptory co najmniej dwóch typów, D_1 i D_2 , a prawdopodobnie jeszcze więcej. Acetylocholina pobudza receptory nikotynowe i muskarynowe, a w obrębie tych ostatnich wyróżniamy receptory M_1 i M_2 . Wiele mówi się ostatnio o różnych typach receptora serotonergicznego, $5HT_1$, $5HT_2$ i $5HT_3$.

Różne klasy receptorów tego samego neuromediatora z reguły albo różnią się od siebie zasadniczo mechanizmem działania (np. receptor nikotynowy jest receptorem jonotropowym, a receptory muskarynowe — metabotropowymi), albo sterują syntezą różnych wtórnych przekazników (np. receptor muskarynowy M_1 pobudza syntezę fosfatydyloinozytoli, a receptor M_2 — hamuje aktywność cykazy adenylowej [15], receptory β -adrenergiczne pobudzają aktywność cykazy adenylowej, recepto-

ry α_2 -adrenergiczne hamują ją, a receptory α_1 stymulują tworzenie trifosforanu inozytolu i diacyloglicerolu [23]).

Badanie interakcji różnych typów receptorów tego samego neuroprzekaźnika może rzucić nowe światło na procesy regulacyjne ustroju. Tak np. wykazano, że istnieje współdziałanie między receptorami dopaminowymi D_1 i D_2 . Chociaż początkowo sądzono, że jedynie receptor D_1 jest związany z cykłązą adenylową, dalsze badania wykazały, że oba te receptory regulują tworzenie tego samego wtórnego przekaźnika, cyklicznego AMP, ale w przeciwny sposób: stymulacja receptora D_1 pobudza, a stymulacja receptora D_2 hamuje jego syntezę [54]. Okazuje się jednak, że w żywym ustroju receptory te działają z reguły synergistycznie w odpowiedziach behawioralnych, chociaż obserwowano też efekty antagonistyczne. Wyniki badań White'a [66] i Longoniego i wsp. [31] wskazują, że bez pewnego pobudzenia receptorów D_1 , w warunkach fizjologicznych zapewnianego przez obecność endogennej dopaminy, nie można wyzwolić reakcji z receptorów D_2 . Bardzo interesujące są też wyniki Pilca i Enny [41], wskazujące na istnienie kooperacyjnej interakcji między receptorami α_2 - i β -adrenergicznymi w skrawkach mózgu (być może łączące się ze współdziałaniem białek G_s i G_i [6]). Zdaniem tych autorów działanie terapeutyczne leków przeciwdepresyjnych polega na zaburzeniu tej interakcji. Jednakże nie zawsze pobudzenie dwóch podtypów receptorów tego samego neuromediatora prowadzi do efektu synergistycznego. Na przykład u receptorów opioidowych, które występują również w licznych postaciach, pobudzenie jednych z nich powoduje efekty przeciwne niż pobudzenie innych.

Jednym z najbardziej znanych przykładów przeciwstawnych efektów receptorów aktywowanych przez ten sam neuromediator, prowadzących do subtelnej regulacji działania neuromediatora, jest działanie autoreceptorów. W ciągu ostatnich 15 lat nagromadzono wiele dowodów przemawiających za tym, że uwalnianie neuromediatora (a więc w konsekwencji jego działanie na receptor postsynaptyczny) jest hamowane przez ten sam neuromediator, gdyż pobudza on równocześnie receptory presynaptyczne hamujące uwalnianie autoreceptory. Tego typu regulację stwierdzono dla noradrenaliny, serotoniny i dopaminy [29].

Bardzo interesującym polem badań jest wzajemne oddziaływanie między receptorami. Teoretyczne modele Changeux i wsp. [7] przewidują możliwość kooperatywności receptorów, a więc zmiany własności receptorów gdy receptory sąsiednie zostają związane z ligandami. Kooperatywność taka może być ujemna (następne receptory łączą się z mniejszym powinowactwem), ale także i dodatnia. Problemy te są jednak stosunkowo mało poznane w odniesieniu do receptorów farmakologicznych.

Innym zagadnieniem, również o wielkim znaczeniu biologicznym, jest oddziaływanie jednych typów receptorów na drugie — oddziaływania heterotropowe. Zagadnienie to było energicznie badane od chwili, kiedy okazało się, że obowiązująca przez ponad pół wieku w farmakologii reguła Dale'a: „jeden neuron — jeden przekaznik” nie jest prawdziwa, a koegzystencja neuromediatorów klasycznych z neuromodulatorami peptydowymi w jednym neuronie jest raczej regułą niż wyjątkiem [58]. Wykazano, że w wielu wypadkach wiązanie się neuromodulatora ze swoistym receptorem zmienia charakterystykę wiązania klasycznego neuromediatora. Na przykład substancja P wiążąc się ze swoistym receptorem w rdzeniu powoduje tam wzrost liczby receptorów serotoninowych, o mniejszym jednak niż normalnie powinowactwie [2], a cholecystokina moduluje (w przeciwny sposób) receptor dopaminowy D_2 w prądkowiu [14].

Jak się wydaje, wzajemne oddziaływania między różnymi typami receptorów mogą dotyczyć także receptorów swoistych dla różnych neuromediatorów klasycznych. O modulowaniu β -adrenoceptorów w sercu przez receptory muskarynowe donieśli Rosenberger i wsp. [45], a Kumakura i wsp. [28] wykazali, że receptory opioidowe regulują receptory nikotynowe w komórkach chromochłonnych w nadnerczach.

UWAGI KOŃCOWE

Chociaż tzw. receptor farmakologiczny jest tylko jednym z typów receptorów błonowych, a jego nazwa nie odzwierciedla rzeczywistej funkcji, którą jest regulacja neurotransmisji — przekazywania z neuronu na neuron bodźców chemicznych, a ściślej — rozpoznawanie bodźców chemicznych i ich tłumaczenie na sygnały zrozumiałe dla neuronu i sterujące jego metabolizmem i równowagą jonową, badania nad nim przyniosły olbrzymi postęp zarówno w biochemii, jak neurofizjologii, psychologii i medycynie. W czasie mniej więcej 80 lat receptor z mglistego pojęcia teoretycznego stał się strukturą błonową dającą się izolować, rekonstruować, opisać i syntetyzować. Lata pięćdziesiąte i sześćdziesiąte były okresem konstrukcji modeli teoretycznych przewidujących działanie leków na podstawie hipotez receptorowych. Lata siedemdziesiąte to okres opisywania właściwości wiązania receptorów, ich lokalizacji w tkankach, a także sformułowania teorii wtórnych przekazników. Pierwsza połowa lat osiemdziesiątych to era poznawania mechanizmu działania receptorów metabotropowych dzięki białkom G oraz izolacji i rekonstrukcji funkcjonalnych receptorów. Obecny okres to — dzięki osiągnięciom inżynierii genetycznej — czas poznawania pierwszorzędowej budowy receptorów.

W nadchodzących latach niewątpliwie można się spodziewać dalszego postępu metodycznego, zwłaszcza w rozwoju techniki stosowania radio-ligandów, nie tylko do badania klasycznych receptorów farmakologicznych, ale również do badań receptorów związanych z kanałami jonowymi, a także swoistych enzymów biorących udział w regulacji neuromediatorów [52]. Należy się spodziewać odkrycia nowych typów białek G i nowych funkcji przez nie regulowanych. Można też przypuszczać, że podjęte zostaną próby korekcji pewnych schorzeń związanych z deficytem lub niewłaściwym funkcjonowaniem receptorów dzięki wykorzystaniu metod inżynierii genetycznej. Należy oczekiwać wypracowania nowego, integralnego spojrzenia na receptor farmakologiczny, łączącego naszą wiedzę wyniesioną z modeli teoretycznych — zwłaszcza o istnieniu wielości stanów receptora — z coraz większą znajomością realnej budowy receptora i jego geometrii. Nie ulega też wątpliwości, że pojawią się nowe, nieoczekiwane odkrycia i kierunki badań receptorowych, których nie jesteśmy obecnie w stanie przewidzieć, a które w zasadniczy sposób mogą zmienić nasze rozumienie procesów neurotransmisji i mechanizmów działania niektórych związków, modyfikujących przepływ sygnałów w ustroju, a wykorzystywanych jako leki neuro- i psychotropowe.

Praca wykonana w ramach CPBP 06. 02.

LITERATURA

1. Aghajanian G. K., Wang Y.-Y. — *Pertussis toxin blocks the outward current evoked by opiate and α_2 -agonists in locus coeruleus neurons*. Brain Res. 371; 390-394, 1986.
2. Agnati L. F., Fuxe K., Benfenati F., Battistini N., Härfstrand A., Hökfelt T., Tatemoto K., Mutt V. — *Neuropeptide Y in vitro selectively increases the number of α_2 -adrenergic binding sites in membranes of the medulla oblongata of the rat*. Acta Physiol. Scand. 118; 293-295, 1983.
3. Ariëns E. J., van Rossum J. M., Simonis A. M. — *A theoretical basis of molecular pharmacology*. Arzneimittel-Forsch, 6: 282-293, 611-621, 737-746, 1956.
4. Betz H. — *Biology and structure of the mammalian glycine receptor*. Trends Neurosci. 10: 113-117, 1987.
5. Burgen A. S. V. — *Drug receptors and dynamic processes in cells*. W: Drug Receptors and Dynamic Processes in Cells. Alfred Benson Symposium 22. J. S. Schou, A. Geisler, S. Norn (red.), Munksgaard, Copenhagen, str. 15-23, 1986.
6. Cerione R., Staniszewski C., Caron M. G., Lefkowitz R. J., Codina J., Birnbaumer L. — *A role for N_1 in the hormonal stimulation of adenylate cyclase*. Nature 318; 293-295, 1985.

7. Changeux J.-P., Thiery J., Tung Y., Kittel C. — *On the cooperativity of biological membranes*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 57: 335-341, 1967.
8. Clark A. J. — *The mode of action of drugs on cells*. E. Arnold & Co., London 1933.
9. De Jongh D. K. — *Some introductory remarks on the conception of receptors*. W: *Molecular pharmacology*, vol. 1. E. J. Ariens (red.), Academic Press, New York-London, str. XIII-XVI, 1964.
10. Ernsberger P., Meeley M. P., Mann J. J., Reis D. J. — *Clonidine binds to imidazole as well as α_2 -adrenoceptors in the ventrolateral medulla*. Eur. J. Pharmacol. 134: 1-13, 1987.
11. Foster A. C., Fagg G. E. — *Comparison of L-[3 H]glutamate, D-[3 H]aspartate, DL-[3 H]AP5 and [3 H]NMDA as ligands for NMDA receptors in crude postsynaptic densities from rat brain*. Eur. J. Pharmacol. 133: 291-300, 1987.
12. Fujita N., Nakahiro M., Fukuchi I., Saito K., Yoshida H. — *Effects of pertussis toxin on D_2 -dopamine receptor in rat striatum: Evidence for coupling of Ni regulatory protein with D_2 -receptor*. Brain Res. 333: 231-236, 1985.
13. Furchgott R. F. — *The use of β -haloalkylamines in the differentiation of receptors and in the determination of dissociation constants of receptor-agonist complexes*. Adv. Drug Res. 3: 21-55, 1966.
14. Fuxe K., Agnati L. F., Benfenati F., Cimino M., Algeri S., Hökfelt T., Mutt V. — *Modulation of cholecystokinins of 3 H-spiroperidol binding in rat striatum: evidence for increased affinity and reduction in the number of binding sites*. Acta Physiol. Scand. 113: 567-569, 1981.
15. Gil D. W., Wolfe B. B. — *Prienzepine distinguishes between muscarinic-receptor mediated phosphoinositide breakdown and inhibition of adenylate cyclase*. J. Pharmacol. Exp. Ther. 232: 608-616, 1985.
16. Gilman A. G. — *Receptor-regulated G proteins*. Trends Neurosci. 9: 460-463, 1986.
17. Goldstein A., Lowney L., Pal B. K. — *Stereospecific and nonspecific interactions of the morphine congener levorphanol in subcellular fraction of mouse brain*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 68: 1742-1747, 1971.
18. Haefely W. E. — *System gabergiczny i benzodiazepiny*. Wszechświat 85: 125-130, 149-155, 1984.
19. Haga K., Haga T., Ichiyama A., Katada T., Kurose H., Ui M. — *Functional reconstitution of purified muscarinic receptors*. Nature 316: 731-733, 1985.
20. Hall Z. W. — *Three of a kind: the β -adrenergic receptor, the muscarinic acetylcholine receptor, and rhodopsin*. Trends Neurosci. 10: 99-101, 1987.
21. Hoffman B. B., Lefkowitz R. J. — [3 H]WB4101 — *caution about its role as an α -adrenergic subtype selective radioligand*. Biochem. Pharmacol. 29: 1537-1541, 1980.
22. Hollenberger M. D., Cuatrecasas P. — *Membrane receptors and hormone action: recent developments*. Progr. Neuro-Psychopharmacol. 2: 287-302, 1978.
23. Homcy C. J., Graham R. M. — *Molecular characterization of adrenergic receptors*. Circ. Res. 56: 635-650, 1985.
24. Houslay M. D. — *A family of guanine nucleotide regulatory proteins*. Trends Biochem. Sci. 9: 39-40, 1984.
25. Kempner E. S., Schlegel W. — *Size determination of enzymes by radiation inactivation*. Analyt. Biochem. 92: 2-10, 1979.

26. Koestler A. — *The Sleepwalkers*. Penguin Books, London, 1964.
27. Kuhar M. J. — *Autoradiographic localization of receptor sites in the CNS in vivo*. W: *Psychopharmacology. A generation of progress*. M. A. Lipton, A. D. DiMascio, K. F. Kilian (red.), Raven Press, New York, str. 371-376, 1978.
28. Kumakura K., Karoum F., Guidotti A., Costa E. — *Modulation of nicotinic receptors by opiate receptor agonists in cultured adrenal chromaffin cells*. *Nature* 283: 489-492, 1980.
29. Langer S. Z. — *Regulation of neurotransmission through presynaptic receptors — Pharmacological and clinical relevance*. W: *Drug Receptors and Dynamic Processes in Cells*. Alfred Benzon Symposium 22. J. S. Schou, A. Geisler, S. Norn (red.), Munksgaard, Copenhagen, str. 27-44, 1986.
30. Lilly L., Fraser C. M., Jung C. Y., Seeman P., Ventor C. J. — *Molecular site of the canine and human brain D₂ dopamine receptor as determined by radiation inactivation*. *Mol. Pharmacol.* 24: 10-14, 1983.
31. Longoni R., Spina L., Di Chiara G. — *Permissive role of D-1 receptor stimulation by endogenous dopamine for the expression of postsynaptic D-2-mediated behavioural responses. Yawing in rats*. *Eur. J. Pharmacol.* 134: 163-173, 1987.
32. Maguire M. E., Van Arsdale P. M., Gilman A. G. — *An agonist-specific effect of guanine nucleotides on binding to the beta adrenergic receptor*. *Mol. Pharmacol.* 12: 335-339, 1976.
33. Minneman K. P. — *Receptor thermodynamics*. *Monogr. Neural Sci.* 10: 20-26, 1984.
34. Monod J., Wyman J., Changeux J.-P. — *On the nature of allosteric transitions: a plausible model*. *J. Mol. Biol.* 12: 88-118, 1965.
35. Nalepa I. — *Trifosforan inozytolu i diacylglicerol — nowe „wtórne przekazniki” i ich rola w przetwarzaniu informacji dla komórki*. *Wszechświat* 87: 275-278, 1986.
36. Nielsen T. B., Laol P. M., Preston M. S., Kempner E., Schlegel W., Rodbell M. — *Structure of the turkey erythrocyte adenylate cyclase system*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78: 722-726, 1981.
37. Nomura Y., Kawata K., Kitamura Y., Wanatabe H. — *Effects of pertussis toxin on the α -adrenoceptor-inhibitory GTP-binding protein-adenylate cyclase system in rat brain: pharmacological and neurochemical studies*. *Eur. J. Pharmacol.* 134: 123-129, 1987.
38. Pert C. B., Kuhar M. J., Snyder S. H. — *Opiate receptor: autoradiographic localization in rat brain*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 73: 3729-3733, 1976.
38. Pert C. B., Snyder S. N. — *Opiate receptor: demonstration in nervous tissue*. *Science* 179: 1011-1014, 1973.
40. Pert C. B., Snyder S. H. — *Opiate receptor binding of agonists and antagonists affected differently by sodium*. *Mol. Pharmacol.* 10: 868-879, 1974.
41. Pilc A., Enna S. J. — *Synergistic interaction between α - and β -adrenergic receptors in rat brain slices: possible site for antidepressant drug action*. *Life Sci.* 37: 1183-1194, 1985.
42. Rodbell M. — *The role of hormone receptors and GTP regulatory proteins in membrane transduction*. *Nature* 284: 17-24, 1980.
43. Rodbell M. — *GTP-regulatory proteins are intracellular messengers; a model for hormone action*. W: *Drug Receptors and Dynamic Processes in Cells*. Alfred Benzon Symposium 22. J. S. Schou, A. Geisler, S. Norn (red.), Munksgaard, Copenhagen, str. 48-58, 1986.

44. Rodbell M., Birnbaumer L., Pohl S. L., Krans H. M. J. — *Glucagon-sensitive adenylyl cyclase system in plasma membranes of rat liver. V. Obligatory role of guanyl nucleotides in glucagone action.* J. Biol. Chem. 246: 1877-1882, 1971.
45. Rosenberger L. B., Yamamura H. I., Roeske W. R. — *The regulation of cardiac muscarinic cholinergic receptor by isoproterenol.* Eur. J. Pharmacol. 65: 129-130, 1980.
46. Schramm M., Selinger Z. — *Message transmission: Receptor controlled adenylyl cyclase system.* Science 225: 1350-1356, 1984.
47. Sibley D. R., Lefkowitz R. J. — *Molecular mechanisms of receptor desensitization using the β -adrenergic receptor-coupled adenylyl cyclase system as a model.* Nature 317: 124-129, 1985.
48. Simantov R., Kuhar M. J., Uhl G. R., Snyder S. H. — *Opioid peptide enkephalin: Immunohistochemical mapping in rat central nervous system.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74: 2167-2171, 1977.
49. Simon E. J., Hiller J. M., Edelman L. — *Stereospecific binding of the potent narcotic antagonist 3 H-etorphine to rat brain homogenate.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA 70: 1947-1949, 1973.
50. Skangiel-Kramska J. — *Nowe narzędzie w badaniach neurotechnicznych — Autoradiografia ilościowa receptorów.* Post. Bioch. 29: 393-395, 1983.
51. Skangiel-Kramska J. — *Budowa cholinergicznego receptora nikotynowego.* Kosmos, 3, 1988 (w druku).
52. Snyder S. H. — *Brain receptors: the emergence of a new pharmacology.* Trends Neurosci. 9: 455-459, 1986.
53. Stahl S. M., Leenders K. L., Bowery N. G. — *Imaging neurotransmitters and their receptors in living human brain by positron emission tomography.* Trends Neurosci. 9: 241-245, 1986.
54. Stoof J. C., Kebabian J. W. — *Opposing roles for the D-1 and D-2 dopamine receptors in efflux of cyclic AMP from rat neostriatum.* Nature 294: 366-368, 1981.
55. Terenius L. — *Stereospecific interaction between narcotic analgesics and synaptic plasma membrane fraction of rat cerebral cortex.* Acta Pharmacol. Toxicol. 32: 317-320, 1973.
56. Vetulani J. — *Regulatory czynności komórki.* Wszechświat 83: 212-215, 1982.
57. Vetulani J. — *Biochemiczne metody badania receptorów w mózgu.* W: *Nowe metody w badaniach mózgu*, B. Żernicki (red.), Ossolineum, Wrocław, str. 81-105, 1983.
58. Vetulani J. — *Neuropeptydy a neurotransmisja.* Post Bioch. 31: 401-420, 1985.
59. Vetulani J. — *Adaptacje biochemiczne presynaptyczne i receptorowe w trakcie przewlekłych kuracji antydepresyjnych.* Psychiat. Pol. 21: 190-198, 1987.
60. Vetulani J., Stawarz R. J., Dingell J. V., Sulser F. — *A possible common mechanism of action of antidepressant treatments. Reduction in the sensitivity of the noradrenergic cyclic AMP generating system in the rat limbic forebrain.* Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 293: 109-114, 1976.
61. Vetulani J., Stawarz R. J., Sulser F. — *Adaptative mechanisms of the noradrenergic cyclic AMP generating system in the limbic forebrain of*

- the rat: adaptation to persistent changes in the availability of norepinephrine (NE). *J. Neurochem.* 27: 661-666, 1976.
62. Vetulani J., Sulser F. — Action of various antidepressant treatment reduces reactivity of noradrenergic cyclic AMP generating system in limbic forebrain. *Nature* 257: 495-496, 1975.
63. Walker J. M., Thompson L. A., Frascella J., Friederich M. W. — Opposite effects of μ and κ opiates on the firing-rate of dopamine cells in the substantia nigra of the rat. *Eur. J. Pharmacol.* 134: 53-59, 1987.
64. Waser P. G. — The cholinergic receptor. *J. Pharm. Pharmacol.* 12: 577-594, 1960.
65. Weiland G. A., Minneman K. P., Molinoff P. B. — Fundamental difference between the interactions of agonists and antagonists with the beta-adrenergic receptor. *Nature* 281: 114-117, 1979.
66. White F. J. — D-1 dopamine receptor stimulation enables the inhibition of nucleus accumbens neurons by a D-2 receptor agonist. *Eur. J. Pharmacol.* 135: 101-105, 1987.

STANISŁAW WOLFARTH

Instytut Farmakologii PAN

Kraków

ZARYS ELEKTROFIZJOLOGII I FARMAKOLOGII
KANALÓW JONOWYCH

WSTĘP

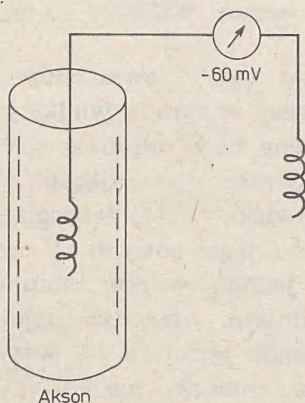
Układ nerwowy jest, jak powszechnie wiadomo, zbudowany z ogromnej liczby komórek, w tym z wielkiej liczby komórek nerwowych. Komórki te połączone są w ogromną sieć funkcjonalną, której rolą jest analizowanie bodźców docierających do organizmu ze świata zewnętrznego oraz środowiska wewnętrznego ustroju i przygotowanie odpowiedzi adekwatnej do jego potrzeb. U podłoża tej wielkiej złożoności funkcjonalnej leżą jednak, wbrew temu czego można by oczekiwać, pewne proste, zasadnicze, własności fizjologiczne komórek nerwowych, takie same lub bardzo podobne dla wszystkich neuronów.

Zasadniczą własnością komórki nerwowej jest przenoszenie informacji na następny neuron lub komórkę organu wykonawczego. Informacja ta jest kodowana w postaci zmian elektrochemicznych, które ograniczają się do małego wycinka błony komórkowej lub przesuwają się na kształt fali wzdłuż wszystkich wypustek neuronu i przeskakują przez szczeliny synaptyczne na następne ogniwa sieci neuronalnej. We wszystkich tych przenoszących informację zmianach elektrochemicznych istotną rolę odgrywa transport jonów przez odpowiednie kanały jonowe, przede wszystkim jonów sodu i potasu, a także chlorków, wapnia i innych.

W tym opracowaniu omówimy zarys elektrofizjologii i farmakologii niektórych tylko kanałów jonowych, przede wszystkim niektórych kanałów sodowych i kanałów dla jonów chlorkowych. Badania farmakologiczne poświęcone tym kanałom pozwoliły wnikać głęboko w złożoną strukturę i funkcję tych, tak ważnych dla fizjologii, elementów błony komórkowej, a także szeroko wykorzystać te właściwości w praktyce terapeutycznej. Omówieniu pozostałych kanałów jonowych, przede wszystkim kanałów przenoszących jony wapniowe, także niezwykle interesujących dla farmakologa, a także kanału sodowego związanego z receptorem acetylocholinowym poświęcone są osobne opracowania.

WŁASNOŚCI ELEKTRYCZNE BŁONY KOMÓRKOWEJ

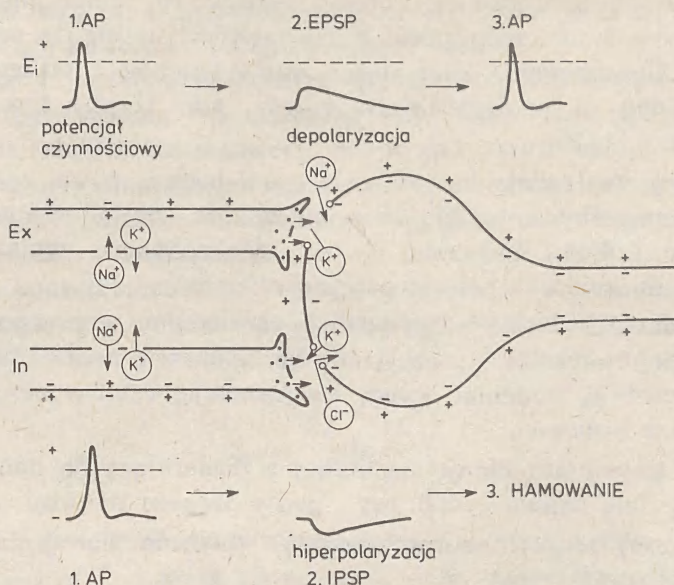
Pojawienie się potencjału czynnościowego, impulsu nerwowego, jest możliwe dzięki stale odnawianej polaryzacji błony komórkowej neuronu, która jest zawsze gotowa do przeniesienia kolejnej fali depolaryzacji. Jeżeli przyjmiemy że otoczenie neuronu prezentuje potencjał zeroowy, to ów stały transmembranowy stan spolaryzowania wyraża się potencjałem ujemnym i określany jest jako potencjał spoczynkowy (rys. 1). Natomiast depolaryzacja błony komórkowej wyraża się w sto-



Rys. 1. Schematyczny rysunek aksonu kałamarnicy i elektrod pomiarowych [4]

sunku do potencjału spoczynkowego dodatnią zmianą potencjału i przenosi impulsy określone jako pobudzające. Błona komórkowa może jednak ulec dalszej polaryzacji. Ta zmiana, pogłębiająca ujemny potencjał błony, określana jest mianem hiperpolaryzacji (rys. 2). Jest ona wyrazem działania impulsów hamujących. Hiperpolaryzacja lub depolaryzacja może być zmianą lokalną, dotyczącą tylko wycinka błony postsynaptycznej i jest wtedy określana, odpowiednio, jako hamujący lub pobudzający potencjał postsynaptyczny. (W literaturze anglosaskiej odpowiednio: *inhibitory postsynaptic potential* (IPSP) lub *excitatory postsynaptic potential* (EPSP).

Depolaryzacja rozprzestrzeniająca się na cały neuron nosi nazwę potencjału czynnościowego (*action potential*, AP, rys. 2). Wszystkie te zmiany potencjału są wyrazem przesunięć jonowych, zachodzących mię-



Rys. 2. Schemat działania synapsy pobudzającej i hamującej na kanały jonyowe [29]

dzy wnętrzem komórki i jej otoczeniem. Realizują się one przez przesunięcia odpowiednich jonów do komórki lub z jej wnętrza na zewnątrz, między innymi przez odpowiednie kanały jonowe znajdujące się w błonie komórkowej.

Błona komórek nerwowych, podobnie zresztą jak i innych rodzajów komórek, stanowi potężną przeszkodę dla ruchu jonów między środowiskiem wnętrza komórki i płynem pozakomórkowym. Przepuszczalność tej błony jest różna dla różnych rodzajów jonów i zależy od ich własności fizykochemicznych. Większość sygnałów elektrycznych w obrębie systemu nerwowego wiąże się ze zmianami przepuszczalności błony komórkowej, różnymi dla różnych jonów: głównie sodowych, potasowych, chlorkowych i wapniowych [4, 26]. Przepuszczalność błony komórkowej dla jonów jest funkcją aktualnej konformacji chemicznej makrocząsteczek kanałów jonowych, ich otwarcia lub zamknięcia. Kanały jonowe są makrocząsteczkami białek o dużym stopniu zorganizowania, koniecznego dla wypełniania najbardziej podstawowej funkcji komórki nerwowej, jaką jest zmiana potencjału jej błony, ona to bowiem koduje przepływ informacji w układzie nerwowym.

Rozmieszczenie jonów jest w warunkach potencjału spoczynkowego błony następujące: wewnątrz komórki przeważają wielokrotnie jony potasu i duże aniony organiczne, natomiast na zewnątrz komórki znajduje się znacznie więcej sodu i chlorków (tab. 1). Tabela 1 przedstawia stę-

zenia jonów po obu stronach błony komórkowej olbrzymiego aksonu kałamarnicy w stanie spoczynku. Należy zwrócić uwagę, że mimo znacznych, 10- i 20-krotnych, różnic stężeń, sumy anionów i kationów po obu stronach błony są w przybliżeniu równe, tak, iż oba środowiska są izoosmotyczne [4, 26].

Informacje te i wiele innych, o których będzie mowa, zostały uzyskane na szczególnym modelu doświadczalnym, na olbrzymim aksonie kałamarnicy *Loligo*. Wykazano jednak, że zasadnicze wnioski stosują się również do komórek nerwowych innych zwierząt [4].

Trzy rodzaje bodźców mogą powodować zmiany w przepuszczalności jonowej błony neuronu. Inaczej mówiąc, makrocząsteczki kanałów jonowych zdolne są zmieniać swoją konformację, czyli otwierać się lub zamykać, pod wpływem:

1. Różnicy potencjału błony, związanej z docierającą do danego odcinka błony falą depolaryzacji, czyli pod wpływem impulsu nerwowego.
2. Specyficznej reakcji neuroprzekaźnika (neuromediatora, neurotransmitera) z receptorem.
3. Energii określonych bodźców świata zewnętrznego (np. światło, dźwięk, zapach) docierających do wyspecjalizowanej struktury odbiorczej neuronu (receptory różnych modalności czuciowych).

Jak wspomniano, spoczynkowa różnica potencjałów, występująca między wnętrzem komórki nerwowej i jej otoczeniem, jest ujemna w stosunku do płynu zewnątrzkomórkowego i wynosi np. dla olbrzymiego aksonu kałamarnicy około 60 mV (rys. 1) [w/g 4]. Jak dochodzi do tej różnicy potencjałów w warunkach spoczynkowych, gdy ustala się równowaga między jonami opuszczającymi komórkę i wchodzącymi do niej? Zasadniczą i bezpośrednią przyczyną jest różnica w koncentracjach potasu zewnątrz- i wewnątrzkomórkowego. Wynika ona ze względnie większej drożności potasowych kanałów jonowych, która jest w stanie spoczynku 50-krotnie większa niż przepuszczalność kanałów sodowych. Należy jednak pamiętać, że jony potasowe dyfundują przez błonowe kanały jonowe w stanie spoczynku i tak aż 10^8 razy wolniej, niż w roztworze wodnym wolnym od przeszkód błonowych. Szybkość dyfuzji jest przy tym regulowana ilością otwartych kanałów, które umożliwiają przepływ jonów zgodny z gradientem stężeń.

Dlaczego zatem nie dochodzi do wyrównania stężeń w warunkach wspomnianej, relatywnej przepuszczalności błony komórkowej dla potasu? Przyczyną jest z jednej strony niemożność przekroczenia bariery komórkowej przez duże aniony organiczne, które musiałyby opuścić komórkę w ślad za dodatnimi jonami potasu, z drugiej strony zaś, co najważniejsze, aktywna eliminacja jonów sodowych z wnętrza komórki (pompa sodowo-potasowa). Dzięki temu potas, choć mógłby opuścić ko-

mórkę przez względnie przepuszczalną błonę, pozostaje w niej zachowując równowagę kationową po obu stronach błony.

Pierwszą hipotezę o roli jonów potasu w powstawaniu potencjału spoczynkowego wysunął na początku XX wieku Bernstein w odniesieniu do włókien mięśniowych [4]. W pół wieku później rozszerzono ją na olbrzymie aksony kałamarnicy i inne rodzaje neuronów oraz zmodyfikowano. Główne modyfikacje polegały na uwzględnieniu roli sodu w procesie depolaryzacji oraz na fakcie, że komórki używają do aktywnego usuwania sodu ze swojego wnętrza, w zamian za wchodzący doń potas, energii metabolicznej. Punktem wyjścia tych hipotez było równanie Nernsta [4]. Dla jonów potasu wygląda ono następująco:

$$E_{K^+} = \frac{RT}{zF} \ln \frac{[K^+]_o}{[K^+]_i},$$

gdzie: E — to potencjał w stanie spoczynku, R — stała gazowa, T — temperatura absolutna, F — stała Faradya, z — to wartościowość jonu sodu, a K_o^+ i K_i^+ — stężenia potasu na zewnątrz i wewnątrz komórki. Po podstawieniu odpowiednich wartości, w tym za $[K^+]_o$ i $[K^+]_i$ stężeń potasu stwierdzonych na zewnątrz i wewnątrz olbrzymiego aksonu kałamarnicy, to jest 20 mM i 400 mM odpowiednio (tab. 1), otrzymujemy w wyniku obliczeń —75 mV. Ta obliczona na podstawie równania Nernsta wartość potencjału równowagi dla potasu odpowiada w przybliżeniu obserwowanej w doświadczeniu wartości —60 mV spoczynkowej różnicy potencjałów. Odchylenia od tej wartości związane są z przepuszczalnością błony dla innych jonów, w tym przede wszystkim dla jonów sodowych.

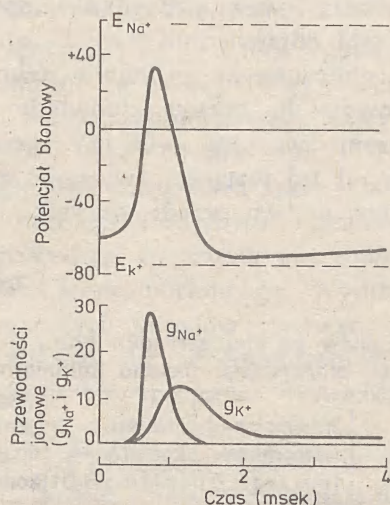
Tabela 1

Stężenia jonów po obu stronach błony komórkowej olbrzymiego aksonu kałamarnicy [4]

	Wewnątrz- komórkowe (mM/kg H ₂ O)	Zewnątrz- komórkowe (mM/kg H ₂ O)	Stosunek zewnątrz- do wewnątrz- komórkowego
K ⁺	400	20	1/20
Na ⁺	50	440	9/1
Cl ⁻	50	550	11/1
Ca ⁺⁺	0,4	10	25/1
Aniony organiczne	350	0	—

Uzyskana w podobny sposób z równania Nernsta wartość E_{Na^+} wynosi +55 mV, co oznacza, że potencjał równowagi dla jonów sodowych ustala się na poziomie dodatnich wartości potencjału w stosunku do otoczenia komórki [4]. Warunkiem ustalenia się potencjału na tym dodatnim poziomie jest jednak duża przepuszczalność błony komórkowej dla jonów sodowych, czyli gwałtowne otwarcie kanałów przepuszczających wybiórczo te jony, co rzeczywiście ma miejsce w czasie depolaryzacji błony.

Warto tu wspomnieć, że omawiane przesunięcia jonowe są w gruncie rzeczy bardzo małe. Wynika to z następującego rozumowania. Układ — wewnątrz komórki, błona komórkowa i płyn zewnątrzkomórkowy — można potraktować jako kondensator elektryczny, a więc jak dwa przewodniki oddzielone warstwą o dużej oporności. Odpowiednie obliczenia wykazują, że dla wywołania zmiany potencjału o 100 mV wystarczy przesunięcie zaledwie jednego z 10 milionów jonów potasowych znajdujących



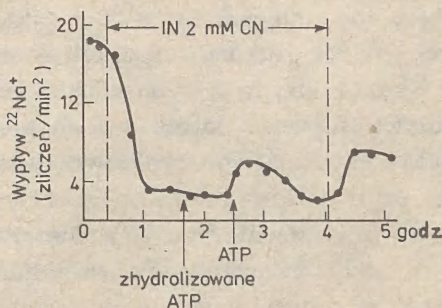
Rys. 3. Krzywe teoretyczne z równań (Hodgkin i Huxley wg Bullock [4]) opisujących wpływ potasu z komórki = 4,26 pM/cm² i przepływ sodu do komórki = 3,33 pM/cm²

się we wnętrzu komórki (rys. 3). Taki ubytek potasu we wnętrzu komórki można jednak zmierzyć z zastosowaniem zsumowanych efektów wielokrotnego drażnienia i pomiaru radioaktywnego potasu i sodu [4].

POMPA SODOWO-POTASOWA

Choć omówione wyżej przesunięcia jonowe dotyczą bardzo niewielkich ilości sodu i potasu, to warunkiem przejścia każdego kolejnego impulsu jest odnowienie gradientów jonowych odpowiedzialnych za potencjał spoczynkowy. Komórki muszą zatem mieć mechanizm uwalniający je od kumulującego się w ich wnętrzu sodu i odnawiający zapas potasu. Co więcej, muszą to czynić wbrew gradientom stężeń tych jonów. Wiadomo, że eliminacja sodu z wnętrza komórki pociąga za sobą znaczne wydatki energetyczne [15].

Mechanizm wyrzucający sód z wnętrza komórki znany jest powszechnie pod nazwą pompy sodowej lub pompy sodowo-potasowej. Wiadomo, że aktywne wyrzucanie sodu z komórki wymaga obecności wysokoenergetycznych związków fosforowych, głównie kwasu adenozynotrójfosforowego (ATP), stąd często do nazwy pompa sodowo-potasowa dodaje się określenie ATP-zależna [19]. Dowody na to są liczne. Wykazano np., że zahamowanie produkcji związków wysokoenergetycznych za pomocą cyjanków lub dwunitrofenolu (związków hamujących aktywność metaboliczną) dramatycznie obniża wypływ sodu z komórki, a wstrzyknięte w tych warunkach do aksonu ATP przywraca częściowo wyrzucanie sodu. Wstrzyknięcie kwasu adenozynomonofosforowego (AMP) lub nieorganicznych związków fosforowych pozostaje bez wpływu (rys. 4). Wykazano ponadto, że wypływ sodu jest silnie uzależniony od temperatury [4].



Rys. 4. Wpływ znakowanych jonów sodowych z neuronu po zablokowaniu ATPazy (Caldwell i Keynes wg Bullock [4])

Istniały także inne próby wytłumaczenia powstawania różnic w stężeniu jonów po obu stronach błony komórkowej. Ling np., nie mogąc się pogodzić z wielkimi ilościami energii potrzebnymi do utrzymywania tych różnic za pomocą mechanizmu pompy sodowej, zaproponował następujący, alternatywny mechanizm [14, 15]. Jony sodowe mają szereg stanów uwodnienia wolnymi cząsteczkami wody. Jednak w sytuacji, gdy

woda jest związana przez inne cząsteczki, jak to wydaje się mieć miejsce w komórce, jony łatwiej przechodzą do płynu zewnątrzkomórkowego, gdzie mają większe możliwości uwodnienia. W trakcie elektrycznie lub chemicznie wywołanej depolaryzacji, zmian konformacji błony komórkowej i cytoplazmy, zmienia się również układ miejsc wiążących sódy, powodując powstanie korzystniejszych warunków do wiązania i uwodnienia jonów sodowych wewnątrz komórki. Według Linga, do przepływu jonów sodowych z powrotem do komórki dochodzi głównie pod wpływem ciśnienia entropii układu, który dąży do wyrównania stężeń jonów wolnych, uwodnionych oraz związanych. Teoria ta nie tłumaczy w gruncie rzeczy niczego poza tym, co już wyjaśniła teoria Hodgkina i Huxleya [w/g 4], z wyjątkiem operowania mniejszymi i, według Linga, bardziej prawdopodobnymi ilościami energii, jakie komórka musi zużyć dla utrzymania potencjału spoczynkowego. Wobec wielu dowodów przemawiających za mechanizmem pompy sodowej, teoria ta nie uzyskuje jak dotąd większego rozgłosu.

Pomimo konieczności stałego dostarczania energii dla utrzymania właściwych gradientów stężeń jonowych po obu stronach błony, brakuje bezpośredniego związku między metabolizmem komórki i powstawaniem potencjału czynnościowego. Na przykład, mimo blokady przez cyjanki metabolizmu komórkowego i wypływu sodu z komórki, potencjał czynnościowy nie zostaje zahamowany. Bardzo przekonującym dowodem okazało się doświadczenie [4], w którym wyciśnięto całą zawartość olbrzymiego aksonu kałamarnicy i napełniono go z powrotem roztworem zawierającym tylko jony nieorganiczne, bez jakichkolwiek związków wysokoenergetycznych (także glukozy, organelli komórkowych i podobnych źródeł energii). Okazało się, że w tych warunkach, o ile tylko utrzymane zostały prawidłowe stężenia potasu i sodu wewnątrz aksonu aby wykazywał on normalny potencjał spoczynkowy, akson był zdolny do generowania potencjału czynnościowego. Dalszym dowodem może być obserwacja wskazująca, że zahamowanie pompy sodowej nie zmniejsza do komórkowego przepływu sodu związanego z rozwojem potencjału czynnościowego. Proces ten, w przeciwieństwie do aktywnej eliminacji sodu z komórki, okazał się zatem procesem niezależnym od dopływu energii.

Wprawdzie przepuszczalność kanałów sodowych jest w stanie równowagi spoczynkowej 50-ciokrotnie mniejsza od przepuszczalności kanałów potasowych, ale też siły elektrochemiczne wciągające sód do komórki są potężne. W sumie zatem, prąd jonów sodowych stale płynie do wnętrza komórki i musi być stale równoważony działaniem pompy sodowej wyrzucającej napływające jony sodowe. Ostatecznie jednak, ponieważ oba prądy się równoważą, efektywnie nie płynie w stanie spoczynku żaden prąd [4, 26].

Dwa mechanizmy są odpowiedzialne za działanie pompy sodowej. Pierwszy z nich to pompa obojętna, która wymienia sód na potas wchodzący w miejsce usuwanego sodu do komórki [4]. Mechanizm ten wymienia tylko dwa dodatnie jony, Na^+ na K^+ , w sumie nie przenosząc żadnych ładunków elektrycznych i nie zmieniając potencjału błony. Drugi mechanizm, zwany pompą elektrogenną, wyrzuca jony sodowe bez ich wymiany na inne dodatnie, powodując powstanie ujemnego ładunku we wnętrzu komórki (potencjał spoczynkowy).

Istnienia mechanizmu pompy obojętnej dowodzi fakt, że związki hamujące metabolizm obniżają nie tylko wypływ sodu z komórki, ale także wchodzenie do niej potasu, a jak wiadomo, obniżenie poziomu potasu w płynie pozakomórkowym powoduje również zmniejszenie wypływu sodu z komórki, nawet do 30% [4].

Dowody na obecność mechanizmu pompy elektrogennej są liczne [4, 6]. Wiadomo, że po przejściu potencjału czynnościowego błona komórkowa staje się bardziej ujemna niż w spoczynku. Dowodzi to, że w tym okresie pracy neuronu sód musi być wypompowywany szybciej niż w okresie równowagi spoczynkowej, a także szybciej niż zdoła wrócić do wnętrza komórki, które staje się bardziej ujemne. Dalszy dowód, że pompa sodowa może generować potencjał błonowy uzyskano w doświadczeniu, w którym wstrzykiwano do neuronu jony sodu, potasu lub litu [4]. Okazało się, że wstrzyknięcie sodu wywołało wyraźniejszy wzrost potencjału transmembranowego błony, niż podanie równoważnych ilości jonów potasu lub litu. Co więcej, ten wzrost potencjału błony po doneuronalnym podaniu sodu można było zahamować przez podanie ouabainy, związku blokującego działanie ATPazy sodowo-potasowo-zależnej. Wykazano nadto, że stymulacja pompy sodowej przez doneuronalne podanie sodu zwiększa różnicę potencjału błonowego do mniejszej od E_{K^+} , co sprawia, że przestaje się on podporządkowywać równaniom Nernsta (opracowanym dla warunków równowagi spoczynkowej, kiedy pompa sodowa pracuje z szybkością podstawową, a nie stymulowaną). Okazało się także, że ouabaina, związek blokujący pompę sodową, znosi potencjały następce pojawiające się w niektórych rodzajach aksonów po ich przewlekłej stymulacji.

Wydaje się, że wiele neuronów wykorzystuje oba mechanizmy pompy sodowej, w zależności od aktualnych potrzeb.

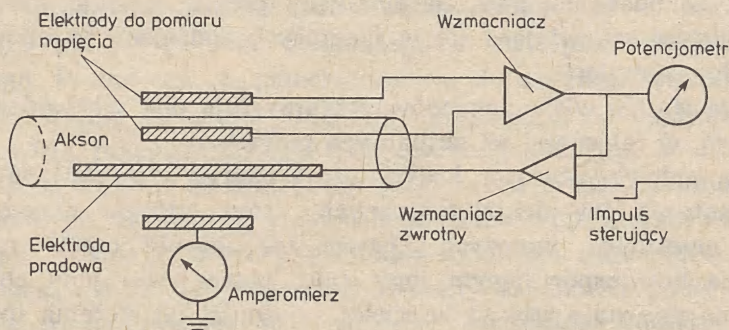
Pompa sodowo-potasowa, korzystając z energii metabolicznej, tworzy różnicę potencjałów elektrostatycznych, która wtórnie napędza wiele dalszych przesunięć jonowych. Dlatego też obecnie często mówi się o systemie kotransportującym jony sodu, potasu oraz jony chlorkowe. System ten pozostaje zresztą w ścisłej zależności od stężenia innych jeszcze jonów, a w szczególności jonu wapniowego. Jak wspomniano, potas wyrzucony do szczeliny synaptycznej pobierany jest stamtąd zwrot-

nie. Szybkość tego transportu w cyklu uwalniania i zwrotnego poboru potasu wydaje się zależeć od funkcji kanałów potasowych, które z kolei są regulowane przez jony wapnia [17, 21, 22]. Jest ona jednak także związana z szybkością przemieszczania jonów sodu i chlorkowych przez system kotransportujący. Tak więc ostatecznie operacje systemu kotransportu sodu, potasu i chlorków są oczywiście zależne od gradientu sodowego, a zatem w pierwszym rzędzie od pompy sodowo-potasowej. System kotransportu sodu, potasu i chlorków jest prawdopodobnie elektrycznie obojętny, bowiem stosunki stechiometryczne wydają się być następujące: jeden jon sodowy i jeden jon potasowy wymieniane są na dwa jony chlorkowe.

W niektórych neuronach także jony wapnia i jony chlorkowe mogą również być aktywnie transportowane przez błonę neuronalną. Dotyczy to zwłaszcza tych neuronów, które wykorzystują doneuronalny prąd jonów wapniowych do przenoszenia potencjału czynnościowego, i w których zmiany przewodności dla jonów chlorkowych odgrywają rolę w przewodnictwie synaptycznym.

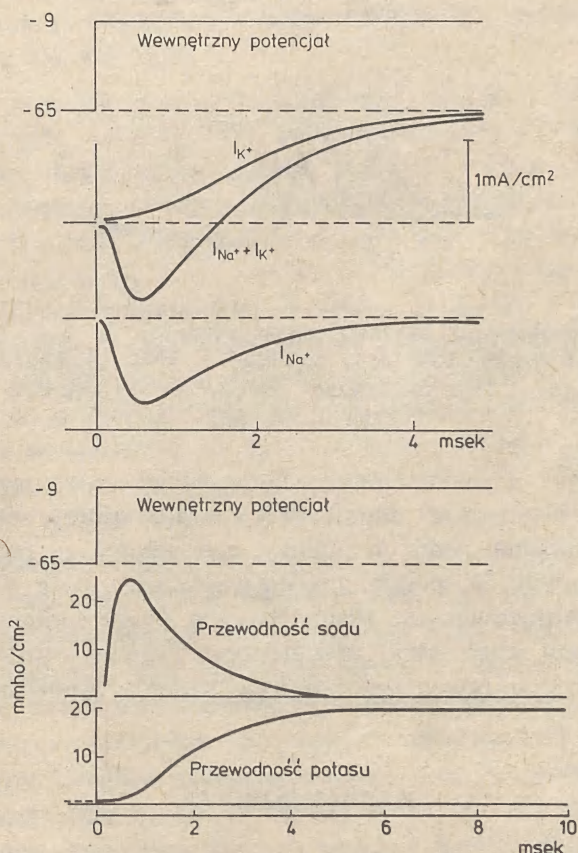
POMIAR POTENCJAŁU BŁONY KOMÓRKOWEJ, JEJ PRZEWODNOŚCI ORAZ PRĄDÓW JONOWYCH

W celu oceny roli poszczególnych zmiennych, biorących udział w procesach depolaryzacji i repolaryzacji błony komórkowej, wprowadzono specjalną technikę pozwalającą kontrolować doświadczalnie transmembranowy potencjał błony komórkowej oraz mierzyć związane z nim prądy jonowe, a także oporności błony dla poszczególnych jonów (rys. 5). Znana jest ona głównie pod angielską nazwą *voltage clamp* — stabilizacja lub utrwalenie napięciowe [2, 3, 4, 7, 18]. Technika ta pozwala utrzymywać potencjał błony komórkowej na dowolnym założonym poziomie mimo fizjologicznych zmian zachodzących w przewodności błonowej. Bez użycia tej techniki zmiany te przesunęłyby potencjał na nowy



Rys. 5 Schematyczny rysunek układu doświadczenia „voltage clamp” [4]

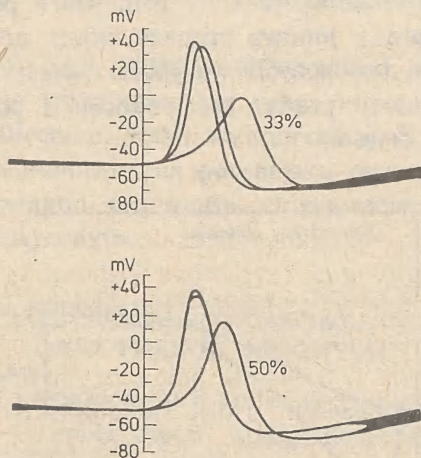
poziom równowagi. Stabilność potencjału błonowego jest wymuszana przez prąd elektryczny doprowadzony z zewnątrz i płynący przez błonę. Prąd ten powoduje spadek napięcia przeciwdziałający spadkowi wywoływanemu fizjologicznymi wahaniami przewodności kanałów jonowych i, wbrew tym naturalnym zmianom, utrzymuje stały poziom napięcia. Prąd ten, kompensujący wahania napięcia błony, można mierzyć, a zależność między prądem I , płynącym przez opór błonowy, potencjałem błony V i przewodnością g (odwrotność oporu R , $g = 1/R$) wyznacza prawo Ohma $R = V/I$. Obecnie stosuje się rozmaite pochodne tej techniki, tak zwane metody łątkowe (*patch clamp*, [2-4, 7, 18]), które pozwalają wyznaczać z ogromną precyzją prądy jonowe płynące nawet przez jeden kanał jonowy. Wyznaczono w ten sposób wszystkie istotne parametry fizjologiczne błony komórkowej: prądy, przewodności i potencjały dla jonów sodu, potasu i innych (rys. 6).



Rys. 6. Prądy przepływające przez błonę komórkową: sodowy (I_{Na^+}) i potasowy (I_{K^+}) oraz odpowiadające im zmiany przewodności kanałów sodowych i potasowych w doświadczeniu „voltage clamp” (Hodgkin i Huxley wg Bullock [4])

Obraz tych zależności w czasie depolaryzacji przedstawiają rysunki 3 i 6. Łatwo zauważyć, że za pierwszą fazę zmian, depolaryzację błony, odpowiedzialna jest zmiana przewodności jonów sodowych, natomiast przewodność błony dla jonów potasowych zmienia się przede wszystkim w fazie repolaryzacji błony.

Przekonującego dowodu na rolę sodu w depolaryzacji błony komórkowej dostarczyli w 1949 roku Hodgkin i Katz [w/g 4], zmieniając stężenie sodu w płynie otaczającym olbrzymi akson kałamarnicy (rys. 7).



Rys. 7. Wpływ zredukowania poziomu jonów sodowych w płynie otaczającym olbrzymi akson kałamarnicy: 33% wody morskiej + 67% izotonicznej dekstrozy lub 50% wody morskiej + 50% izotonicznej dekstrozy (Hodgkin i Katz wg Bullock [4])

Wykazali oni, że potencjał depolaryzacji spada mniej więcej o 1/3 po zredukowaniu poziomu sodu do połowy, a o połowę po redukcji do 33% wartości wyjściowej. W podobnym doświadczeniu [w/g 4], przeprowadzonym na zmielinizowanych aksonach żaby (jony sodowe wymieniano stopniowo na jon cholinowy) stwierdzono liniowy spadek potencjału depolaryzacyjnego w miarę redukowania stężenia jonów sodowych.

KANAŁY JONOWE

Pobudliwość elektryczna komórek nerwowych, a co za tym idzie ich rola, różni się w zależności od natury posiadanych przez nie kanałów jonowych, ich gęstości, a także lokalizacji na poszczególnych funkcjonal-

nych częściach neuronu. Kanały jonowe są włączonymi w lipidową strukturę błony komórkowej makrocząsteczkami, zbudowanymi niekiedy z podjednostek zdolnych do zmiany wzajemnego położenia [5]. Jak z samej nazwy wynika, w ich obrębie znajduje się kanał, przez który jony mogą przenikać do wnętrza lub na zewnątrz komórki. Kanały jonowe są w znacznym stopniu selektywne (nie wszystkie), bowiem potrafią różnicować poszczególne rodzaje jonów. Umożliwia to specjalne ukształtowanie kanału, a zwłaszcza rozmieszczenie u wlotu i w jego wnętrzu odpowiednich grup chemicznych naładowanych elektrycznie. Pozwala to na przejście tylko określonych jonów, zależnie od ich rozmiaru i ładunku. Inne jony mogą już mieć znacznie zmniejszoną szybkość przenikania przez kanał, a dla jeszcze innych kanał ten może być całkowicie niedrożny. Na przykład, kanał sodowy jest niemal w tym samym stopniu przenikalny dla sodu, jak i dla litu, podczas gdy potas przechodzi przez ten kanał 12-krotnie słabiej. Natomiast jeden z rodzajów kanałów potasowych jest około 100-krotnie bardziej drożny dla potasu i pokrewnego mu rubidu, niż dla sodu [21].

W obrębie kanałów jonowych znajdują się ponadto szczególne układy grup chemicznych i dipoli, które tworzą wrażliwą na zmiany napięcia błony strukturę bramkującą kanał (*voltage sensing gating structure* [5]), to jest strukturę otwierającą lub zamykającą kanał. Jony nie mogą przechodzić przez zamknięty kanał, ale gdy jest otwarty przesłizguje się przezeń wiele milionów jonów w ciągu sekundy. Czas otwarcia trwa zwykle od ułamka milisekundy do kilku milisekund, co pozwala na przepływy krótkich i gwałtownych ale niewielkich prądów. Kanały otwierają się lub zamykają w zasadzie niezależnie jedne od drugich, jednak statystyczne prawdopodobieństwo ich otwarcia lub zamknięcia wzrasta lub maleje w zależności od spolaryzowania błony komórkowej. Właśnie owo statystyczne prawdopodobieństwo otwarcia kanałów dla określonych jonów wyznacza przepuszczalność błony komórkowej [5].

Kanały jonowe mogą być związane z receptorami wrażliwymi na określone rodzaje neuroprzekazników i mogą być niewrażliwe na zmiany polaryzacji otaczającej je błony komórkowej. Kanały przewodzące te same jony mogą być przy tym związane z receptorami wrażliwymi na różne rodzaje neuroprzekazników. Co więcej, określone typy komórek mogą mieć więcej niż jeden typ kanałów przewodzących ten sam jon, np. różne typy kanałów potasowych [27]. Kanały mogą być wrażliwe na zmiany potencjału błony komórkowej [1-4, 7, 18]. Mówimy o nich, że są sterowane napięciem. Istnieją ponadto kanały różnie reagujące na różne dwuwartościowe kationy nieorganiczne, przede wszystkim na wapń [21], ale także na magnez, mangan, kobalt, bar czy cez lub na różne

związki chemiczne, takie jak sole tetraetyloamoniowe (TEA) lub 4-aminopirydyna (4-AP) (kanał potasowy) [27], czy też na specyficzne neurotoksyny kanału sodowego (tab. 2). Wreszcie kanały jonowe mogą się

Tabela 2

Miejsca kanału sodowego wiążące
neurotoksyny

Miejsce wiążące	Neurotoksyny	Efekt fizjologiczny
1	tetrodotoksyna saksitoksyna	hamowanie transportu jonowego
2	weratrydyna batrachotoksyna grajanotoksyna akonityna	permanenna aktywacja
3	α toksyny skorpiona północnoafrykańskiego	zwalniają, inaktywację
4	β toksyny skorpiona amerykańskiego	wzmagają, aktywację

(Catterall, Science 1984, 223, 653)

charakteryzować wysokim lub niskim przewodnictwem (dużą lub małą wydajnością, czy „przepustowością”) i, jak już wspomniano, mogą być w mniejszym lub większym stopniu selektywne dla różnych jonów [17].

Kanały jonowe są rozmieszczone z różną gęstością na różnych funkcjonalnie strukturach neuronu. Decyduje to o progu potencjału czynnościowego, który może zostać wyzwolony przez określony odcinek błony komórkowej. Kanały jonowe nie muszą zresztą koniecznie być związane z błoną komórkową. Pewne dane wskazują, iż także w błonach organelli komórkowych obecne są struktury pełniące rolę kanałów jonowych (Ca^{2+}). Istnieją także struktury białkowe o budowie i funkcji kanałów, które łączą cytoplazmy sąsiadujących komórek. Nie są one jednak związane z polarnością błony i transmisją impulsów nerwowych [16].

Kanały sodowe odpowiedzialne są za depolaryzację błony komórkowej, natomiast kanały potasowe i chlorkowe — za jej polaryzację, repolaryzację lub hiperpolaryzację. Istnieją jednak wyjątki i od tej reguły [8, 10].

KANAL SODOWY

Najważniejszym dla procesu depolaryzacji błony komórkowej kanałem jonowym jest kanał sodowy [5]. Zależność przewodności jonowej od napięcia błony sugeruje, że zmiany przewodności związane są ze zmianami konformacji elektrycznie naładowanych cząsteczek, wchodzących w skład błony komórkowej.

Podczas stopniowej depolaryzacji błony przed wychyleniem wskazującym na pojawienie się prądu jonów sodowych wnikaających do wnętrza olbrzymiego aksonu kałamarnicy, pojawia się krótkotrwałe wychylenie prądu skierowanego przeciwnie, na zewnątrz komórki. Prąd ten, zwany prądem bramkowym (*gate current* [4]), wyprzedza ów silny prąd sodowy skierowany do wewnątrz, jest jednak przeciwnie skierowany i znacznie od niego słabszy. Pojawia się on także w warunkach, gdy wyeliminowano prądy jonowe, np. w doświadczeniu w którym podstawiono jony nieprzechodzące przez błonę w miejsce sodu i potasu. Uważa się, że prąd ten nie ma charakteru jonowego lecz pojemnościowy, zaś jego genezy szukać należy w zmianie konformacji błony komórkowej, co wiąże go z opisaną wyżej strukturą bramkującą kanału oraz z lawinowym otwarciem kanałów sodowych.

Ostatnio udało się oczyścić oraz zrekonstruować funkcjonalnie makrocząsteczkę białka, która tworzy napięciowo-zależny kanał sodowy. U ssaków tworzą go trzy podcząsteczki białkowe o łącznej masie powyżej 300 tysięcy daltonów (podcząsteczka α ma dwieściekilkadziesiąt kilodaltonów, a β_1 i β_2 po kilkadziesiąt kilodaltonów każda) [5]. Jeśli założymy, że makrocząsteczka białka kanału sodowego jest w przybliżeniu sferyczna, będzie ona miała, w związku ze swoją wielkością, średnicę około 118 Å. Będzie zatem znacznie większa od postulowanego otworu transmembranowego, przez który jony sodowe przechodzą, bowiem otwór ten, a właściwie kanał, ma prawdopodobnie średnicę rzędu 3 do 5 Å w najwęższym punkcie, czyli przy filtrze selekcyjującym jony. Wybiórczość przechodzenia jonów przez kanał wiąże się właśnie z obecnością owego specjalnego hydrofilnego otworu, przepuszczającego tylko jony sodowe. Przenoszenie jonów przez kanał sodowy regulują dwa procesy: 1) pobudzenie, które kontroluje zakres otwarcia kanału sodowego i zależność prawdopodobieństwa otwarcia kanału od napięcia depolaryzującego oraz 2) hamowanie kontrolujące zamykanie się kanałów w przypadku utrzymującej się depolaryzacji. Podstawowymi cechami kanałów sodowych są zatem: 1) wybiórczość transportu ograniczona do jonów sodu, 2) zależne od napięcia prawdopodobieństwo otwarcia kanału oraz 3) zależne od napięcia unieczynnienie kanału [5].

Wiele informacji o budowie kanału sodowego uzyskano, posługując się specyficznymi toksynami wpływającymi na przewodnictwo sodowe (tab. 2). Dotychczas wykryto toksyny wykazujące powinowactwo do 4 różnych struktur receptyjnych w jego obrębie [5]. Tetrodotoksyna (TTX), związek otrzymany z pewnego gatunku ryb i należący do heterocyklicznych guanidyn, a także pokrewna jej chemicznie saksitoksyna wiążą się blisko zewnętrznego otworu kanału do struktury receptyjnej 1 (tab. 2) i już w bardzo małych stężeniach (TTX: 5×10^{-9} – 10^{-7}) blokują transport jonowy. Warto wspomnieć, że związki te, wiążąc się w proporcji 1 cząsteczka związku do 1 kanału jonowego, pozwoliły na obliczenie gęstości kanałów sodowych w poszczególnych okolicach błony komórkowej. Gęstość kanałów odgrywa, jak zobaczymy dalej, istotną rolę dla funkcji neuronu. Weratrydyna, batrachotoksyna, grajanotoksyna i akonityna, toksyny rozpuszczalne w tłuszczach, wiążą się kompetytywnie do struktury receptyjnej 2, której rola polega na regulowaniu zależnej od napięcia aktywacji lub inaktywacji kanału sodowego. Powodują one permanentny stan aktywacji, blokując unieczynnianie kanału. Powstaje w ten sposób selektywny i trwały wzrost przepuszczalności kanałów sodowych, co wywołuje oczywiście trwałą depolaryzację komórek nerwowych. Do następnej grupy należą α toksyny północnoafrykańskiego skorpiona, a także toksyny pewnego rodzaju anemonów morskich. Podobnie jak poprzednie, wpływają one na strukturę receptyjną 2, ale także lub przede wszystkim na receptor 3, wywołując podobny efekt permanentnej depolaryzacji przez zahamowanie procesów inaktywacyjnych. Istnieją dane wskazujące, że receptor 3 jest zlokalizowany w tej części kanału, która ulega zmianom konformacyjnym w czasie zależnego od napięcia otwarcia kanału. Toksyny skorpiona lub anemonów morskich wiążą się zatem do tej części kanału, którą można by określić mianem sensora napięcia i struktury bramkującej (otwierającej lub zamykającej) kanału sodowego. Ze strukturą receptyjną kanału sodowego oznaczoną numerem 4 wiążą się toksyny innego rodzaju skorpiona, skorpiona amerykańskiego. Określa się je jako β toksyny skorpiona. Wpływają one raczej na aktywację, niż na inaktywację kanału.

Rozmieszczenie i gęstość kanałów sodowych ma podstawowe znaczenie dla fizjologii i roli neuronu. Cechy te badano w szczególności w aksonach, oznaczając np. ilość znakowanych trytem cząsteczek saksitoksyny, które wiązały się z błoną komórkową [5]. Badania te wykazały, że kanały sodowe zajmują najwyżej 1% powierzchni błony komórkowej nerwu błędnego królika, a więc znajdują się tam w liczbie około 110 kanałów na mikrometr kwadratowy powierzchni błony (tab. 3). Choć rozsięte rzadko, są funkcjonalnie bardzo wydajne.

Tabela 3

Szacunkowe rozmieszczenie kanałów sodowych na „typowym” neuronie kręgowców

Część komórki	Gęstość kanałów sodowych (μm^{-2})
Ciało komórkowe	50 - 75
Początkowy segment aksonu	350 - 500
Akson niezmielinizowany	110
Węzeł Ranviera zmielinizowanego aksonu	2000 - 12000
Błona międzywęzłowa	< 25
Zakończenia nerwowe	20 - 75

(wg Catterall, Science 1984, 223, 4637)

Rozmieszczenie kanałów jonowych zależy w znacznym stopniu od tego, czy włókno nerwowe jest zmielinizowane czy też nie. Kanały jonowe w błonie komórkowej włókien niezmielinizowanych rozsiane są równomiernie, zapewniając równomierne przenoszenie się procesu depolaryzacji. Natomiast we włóknach zmielinizowanych błona komórkowa aksonów jest dostępna dla jonów sodowych tylko w obrębie węzłów Ranviera, czyli w obrębie nie pokrytych mieliną około $1\text{-}\mu\text{m}$ odcinków aksonów, rozmieszczonych w odstępach około 1 mm [4, 5, 26]. Pozostałe odcinki owinięte są, jak wiadomo, wieloma warstwami elektrycznie niepobudliwej błony, zwanej otoczką mielinową, produkowanej przez wyspecjalizowane komórki gleejowe.

We włóknach zmielinizowanych przewodnictwo impulsów ma charakter skokowy. Impulsy przerzucają się błyskawicznie od jednego węzła Ranviera do drugiego na zasadzie fizycznej. Obniżający się między węzłami potencjał regenerowany jest biologicznie (jedynie w ich obrębie) mechanizmami wymiany jonowej. Do kolejnego węzła Ranviera, długości zaledwie $1\text{ }\mu\text{m}$, dociera tylko niewielki ułamek wyjściowej czynnościowej różnicy potencjałów [5]. Przebyła ona bowiem długi 1-milimetrowy odcinek błony międzywęzłowej wystartowawszy z poprzedniego węzła. Ta niewielka różnica potencjałów wystarcza jednak dla przekroczenia progu potencjału czynnościowego (który ma zostać przeniesiony na następny odcinek międzywęzłowy), bowiem gęstość kanałów jonowych w błonie międzywęzłowej jest nieporównanie większa. Pozwala to na zwiększenie prawdopodobieństwa otwarcia kanałów, tak, że nawet niewielkie zmiany depolaryzacyjne docierające do niej są w stanie otworzyć liczbę kanałów wystarczającą dla przekroczenia progu potencjału

czynnościowego. W obrębie węzła znajduje się bowiem 2-12 tysięcy kanałów jonowych (tab. 3). Natomiast, w obrębie błony aksonalnej znajdującej się między węzłami Ranviera, a zatem pokrytej mieliną i w związku z tym nie mającej warunków dla wymiany jonowej i regeneracji potencjału błonowego, nie ma kanałów jonowych lub są tylko bardzo nie liczne (tab. 3) [5].

Elektryczne własności ciał komórkowych i dendrytów są złożone i nie w pełni poznane. Wydaje się jednak, że kanały sodowe obecne są w tych częściach neuronu w proporcji mniej więcej o połowę mniejszej na jednostkę powierzchni błony ($50-75/\mu\text{m}^2$), niż w obrębie niezmielinizowanych błon aksonalnych (około $110/\mu\text{m}^2$) [5]. W wielu dendrytach kanały sodowe wydają się być jednak nieobecne. Gęstość kanałów sodowych w błonie zakończeń nerwowych jest podobna lub nieco mniejsza od gęstości w błonie ciała komórki i dendrytów.

Studia nad pobudliwością neuronów rdzeniowych wykazały, że wiele interneuronów oraz neurony ruchowe wykazują wyraźnie niższy próg wyzwalania potencjału czynnościowego w obrębie początkowego segmentu aksonu, w porównaniu z innymi odcinkami błony komórkowej ciała neuronu. Pomiary specyficznie związanej znakowanej toksyny skorpioną wykazały nierównomierność rozmieszczenia kanałów sodowych w obrębie błony aksonu. Błona segmentów początkowych aksonu wykazuje 3-, a nawet 5-krotnie większą gęstość kanałów sodowych ($350-500/\mu\text{m}^2$), niż w aksonach niezmielinizowanych (tab. 3). Wydaje się, że większa gęstość kanałów sodowych obniża próg pobudliwości, pozwalając na wyzwolenie potencjału czynnościowego przy udziale mniejszej części zaktwowanych kanałów. To większe prawdopodobieństwo wyzwolenia potencjału czynnościowego w błonie segmentu początkowego determinuje integracyjne właściwości neuronu [5].

KANAŁ SODOWY A LEKI ZNIECZULAJĄCE MIEJSCOWO

Przewodnictwo impulsów nerwowych jest zależne przede wszystkim od sprawności kanału sodowego. Na przewodnictwo nerwowe wpływa bardzo wiele związków chemicznych i leków, które jednak często doprowadzają do stałego uszkodzenia komórek nerwowych. Wielką zaletą związków znieczulających miejscowo jest odwracalność ich działania [25]. Przerywają one przewodnictwo w dowolnym miejscu systemu nerwowego, niezależnie od tego, czy jest to nerw czuciowy, ruchowy, czy kora mózgowa. Związki te wydają się jednak działać silniej na cienkie i niezmielinizowane włókna, niż na włókna grube i pokryte mieliną. Gdy działanie tych leków ustępuje, wraca normalna funkcja uprzednio wyłączonych neuronów bez śladów uszkodzeń strukturalnych [25].

Wyłączenie funkcjonalne neuronów przez leki znieczulające miejscowo polega na uniemożliwieniu im wyzwolenia i przewodnictwa impulsu nerwowego przez działanie skierowane głównie na błonę komórkową. Przede wszystkim powodują one silne, choć odwracalne, zmniejszenie, a nawet zniesienie zdolności kanałów sodowych do reagowania wzrostem przewodności na depolaryzację otaczającej je błony. W końcu uniemożliwia to w ogóle przenoszenie depolaryzacji błony komórkowej i generowanie oraz przewodzenie wszelkich potencjałów, lokalnych i czynnościowych. Leki znieczulające miejscowo mogą obniżać przewodność kanałów potasowych i sodowych także w stanie równowagi spoczynkowej, ponieważ jednak obniżenie przewodności odpowiedzialnych za potencjał spoczynkowy kanałów potasowych wymaga większych stężeń leków, blokowi przewodnictwa nie towarzyszą większe zmiany w potencjale spoczynkowym.

Pośrednio na działanie leków znieczulających miejscowo mogą wpływać także jony wapnia [25]. Działają one wielokierunkowo: 1) poprzez zmiany w potencjale błonowym, 2) przez obniżenie inaktywacji kanałów sodowych za pomocą tych leków i osłabienie powinowactwa struktury kanałów do cząsteczek tych leków oraz 3) poprzez zwiększenie działania związków znieczulających miejscowo na drodze zmiany kinetyki ich działania, wzmagając hamowanie otwierania kanałów sodowych w odpowiedzi na depolaryzację [25].

Ostatnie badania wydają się sugerować, że leki znieczulające miejscowo nie oddziałują na błonę komórkową z zewnątrz, lecz od jej wewnętrznej strony i to prawdopodobnie w formie kationowej [25]. By dotrzeć do swych punktów uchwytu, muszą zatem najpierw przejść przez błonę do wnętrza komórki. Co ciekawsze, receptor poprzez który działają, znajduje się nie na wewnętrznej powierzchni błony, lecz mniej więcej w połowie długości kanału sodowego. Fakty te mają swoje praktyczne znaczenie. Wiadomo, że stopień zablokowania przewodnictwa przez określone stężenie leku znieczulającego miejscowo zależy od tego: czy, jak silnie, pojedynczo czy wielokrotnie, oraz kiedy ostatnio drażniono nerw. Wiadomo przy tym, że nerw niedrażniony jest znacznie mniej podatny na działanie znieczulające. Przyczyną jest to, że cząsteczka związku znieczulającego miejscowo uzyskuje, w swojej formie czwartorzędowej, dostęp do receptora tylko wtedy, gdy wewnętrzny otwór kanału jest otwarty, a także dlatego, że cząsteczki leku wiążą się wówczas ściślej i skuteczniej stabilizują nieaktywny stan kanału sodowego [25].

Pewną rolę w działaniu leków znieczulających miejscowo może także odgrywać inny mechanizm [25]. Przez długie lata był on uważany za podstawowy mechanizm odpowiedzialny za ich wpływ na przewodnictwo nerwowe. Od dawna bowiem wiadomo, że siła działania tych le-

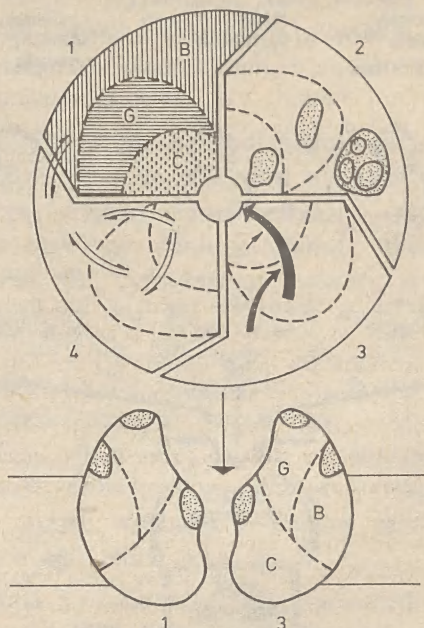
ków jest równoległa z ich skutecznością we wzmaganiu ciśnienia powierzchniowego monomolekularnych warstw lipidów. W oparciu o to stwierdzenie uważano, iż do działania tych związków dochodzi poprzez zwiększenie ciśnienia powierzchniowego warstwy lipidów, które tworzą błonę komórkową komórek nerwowych. W konsekwencji działanie to sprowadzało się do zamknięcia otworów, przez które przechodzą jony. Mówiono wówczas o działaniu stabilizującym błonę komórkową. Miało to obniżać przewodność spoczynkową i zdolność do gwałtownego wzrostu przewodności kanałów sodowych, co stanowi podstawową cechę warunkującą powstanie potencjału czynnościowego. W kilka lat później pojawiły się jednak wyniki sugerujące, że pod wpływem leków znieczulających miejscowo nieuporządkowanie błony komórkowej — zamiast maleć — wzrasta. Chociaż ostatecznie nie można wykluczyć pewnego wpływu leków znieczulających miejscowo, wywieranego poprzez działanie skierowane na ciśnienie powierzchniowe warstw lipidowych błony komórkowej, wydaje się jednak obecnie, że ich zasadniczy wpływ związany jest ze specyficznym receptorem znajdującym się w kanale sodowym [25].

KANAŁ CHLORKOWY A RECEPTORY GABA I BENZODIAZEPINOWE

Według Richardsa i wsp. [24] i Haefely [9], kanał chlorkowy wchodzi w skład wielkocząsteczkowego kompleksu o masie około 200 000 daltonów. Hipotetyczna makrocząsteczka zawierająca kanał chlorkowy składa się prawdopodobnie z czterech identycznych monomerów (rys. 8), z których każdy ma 3 anatomicznie i funkcjonalnie różne rejony: rejon kanału chlorkowego, rejon receptora GABA_A i rejon receptora benzodiazepinowego. Każda z tych części ma miejsce wiążące dla właściwych sobie ligandów. Część monomeru, będąca fragmentem kanału chlorkowego, ma miejsca wiążące barbituraty i niektóre związki drgawkotwórcze, np. pikrotoksynę (rys. 8). Sąsiadująca z fragmentem kanału chlorkowego struktura chemiczna zawierająca receptor GABA wiąże agonistów i antagonistów GABA, zaś sąsiadujący z nimi fragment monomeru z receptorem benzodiazepinowym ma miejsce wiążące agonistów, odwrotnych agonistów i antagonistów tegoż receptora (rys. 8 i 9).

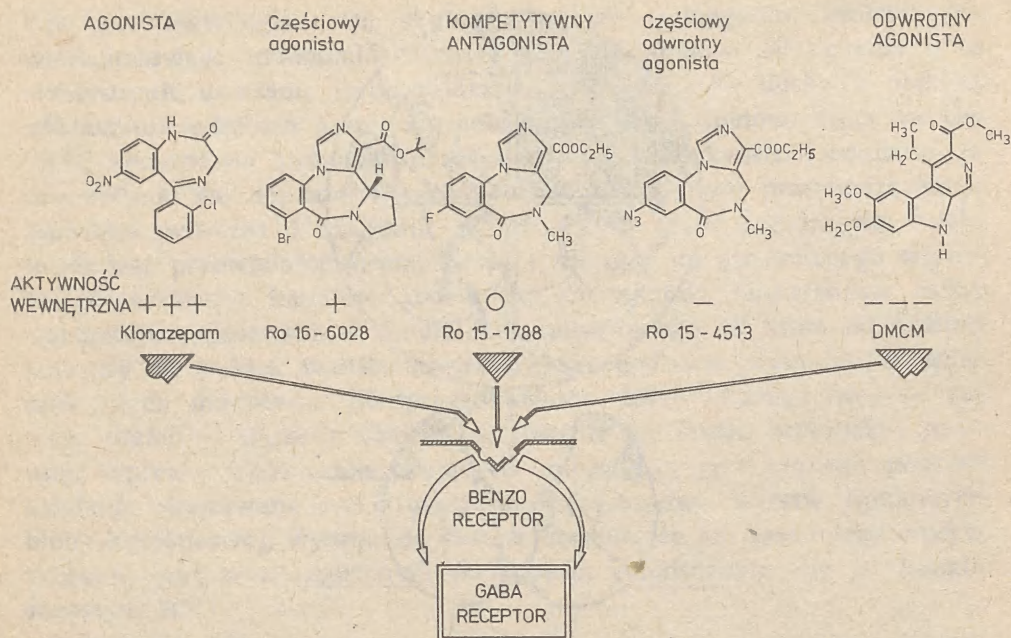
Przedstawiony tu opis budowy cząsteczki zawierającej kanał chlorkowy, receptor GABA_A i receptor benzodiazepinowy dotyczy cząsteczki mającej jedną z 2 podgrup receptorów GABA, receptor GABA_A.

Farmakologicznie, receptory GABA_A charakteryzują się selektywną aktywacją przez analog GABA — muscimol, aktywacją, którą blokują związki drgawkotwórcze, takie jak bikukulina i pikrotoksyna oraz wzrostem przewodnictwa chlorkowego pod wpływem aktywacji [20, 23].



Rys. 8. Schematyczny rysunek hipotetycznego kompleksu receptor GABA-receptor benzodiazepinowy-kanał chlorkowy. Każdy z czterech identycznych monomerów ma 3 anatomiczne i czynnościowe okolice: okolica kanału chlorkowego (C), okolica receptora GABA (G) i okolica receptora benzodiazepinowego (B); okolica kanału chlorkowego ma miejsca wiążące barbituraty i różne związki drgawkogenne — nap. pikrotoksynę (patrz tekst) [9]

Receptory GABA_A, wiążące znakowane benzodiazepiny i wykazujące farmakologiczne cechy tego receptora [20], są, jak to wykazano autoradiograficznie, rozmieszczone całkowicie odmiennie od miejsc wiążących na komórkach glejowych, dla których nie zdołano wykazać specyficzności farmakologicznej [24]. Metodami autoradiograficznymi udało się wykazać obecność 2 różnych miejsc wiążących GABA. Przy użyciu ³H-muscimolu wykazano obecność miejsc o dużym powinowactwie do GABA, a przy użyciu ³H-bikukuliny miejsc o małym powinowactwie, przy czym rozmieszczenie tych ostatnich odpowiadało lepiej rozmieszczeniu receptorów benzodiazepinowych. Kolejne miejsce wiążące w obrębie kompleksu receptora GABA_A zostało wykazane za pomocą ³⁵S-TBPS (³⁵S-t-butylo-dwucyklofosforotnian). Ponieważ wykazano, że struktura tego miejsca wiążącego wiąże również barbituraty i niektóre związki drgawkotwórcze, przyjmuje się, że ³⁵S-TBPS znakuje specyficznie okolice kanału chlorkowego. Receptor GABA_A został ostatnio wyekstrahowany z mózgu krowiego. Za pomocą monoklonalnych przeciwciał wytrącono z wyciągów błonowych kompleks białkowy, wykazujący



Rys. 9. Schemat wpływu agonistów, odwrótnych agonistów i antagonistów na receptor benzodiazepinowy oraz na sprzężony z nim receptor GABA [24]

wszystkie cechy charakterystyczne izolowanego receptora GABA_A [12]. Są nimi: powinowactwo charakterystyczne dla receptora GABA_A, duże powinowactwo receptora benzodiazepinowego i miejsca wiążące dla ³⁵S-TBPS, które wskazują na obecność kanału chlorkowego. Epitopy, rozpoznane przez te monoklonalne przeciwciała, były zlokalizowane na cząsteczce białka o wadze 50 lub 55 kDa, co odpowiada 2 częściom składowym kompleksu receptorowego [24].

Związanie się jednego z wymienionych związków chemicznych z właściwym sobie receptorem powoduje konformacyjną zmianę struktury pozostałych części monomeru. Tym samym zmniejsza to prawdopodobieństwo związania się pozostałych ligandów, np. związanie się cząsteczki odwrótnego agonisty z receptorem benzodiazepinowym oraz zmniejsza wiązanie się GABA z receptorem-kanałem chlorkowym (rys. 8) [9, 11, 24]. Układ, kanał chlorkowy-receptory funkcjonuje następująco: aktywacja receptorów GABA otwiera kanał chlorkowy hiperpolaryzując błonę komórkową [11]. Podobnie działają agoniści receptora benzodiazepinowego, wzmagając powinowactwo receptora GABA do GABA i/lub ułatwiając bramkującą funkcję (*gating function*) GABA w stosunku do kanału chlorkowego (przyspieszają funkcjonowanie układu receptor GABA-kanał chlorkowy). Każdy z tych efektów z osobna, a tym bar-

dziej oba te efekty łącznie, wyjaśniają jasno wzrost prawdopodobieństwa otwierania się kanałów chlorkowych w odpowiedzi na agonistów receptora benzodiazepinowego w warunkach normalnego dopływu GABA. Podobnie działają barbituraty (rys. 8).

Odwrotni agoniści receptora benzodiazepinowego obniżają transmisję GABA [9, 24]. Przyjmuje się, że odwrotni agoniści powodują w recepto-rze benzodiazepinowym zmiany przeciwne do powodowanych przez ago-nistów, czyli spadek szybkości funkcjonowania układu receptor GABA-kanał chlorkowy (rys. 9). Tymczasem związki specyficznie blokujące receptor benzodiazepinowy (np. Ro 15-1788) mają działać tak jak wszy-stkie związki kompetetywnie blokujące receptory, to znaczy poprzez związanie się z receptorem benzodiazepinowym bez wywołania funkcyj-nalnych zmian w receptorze (nie mają tzw. aktywności wewnętrznej (*intrinsic activity*)) (rys. 9), a więc zmian prowadzących w tym wypadku do otwarcia kanału chlorkowego. Czyste związki antagonistyczne, przez zablokowanie miejsc wiążących, znoszą zarówno wpływ agonis-tów, jak i odwrotnych agonistów (rys. 9).

Model ten wyjaśnia złożone wzajemne stosunki wpływów barbitura-tów, β -karbolin i Ro 15-1788 (rys. 9). Barbituraty w małych i średnich dawkach działają, jak się przypuszcza, na okolicę kanału i zwiększają średni półczas otwarcia kanału [23]. Dlatego też ich działanie farmako-logiczne zależy od wywoływanej przez GABA aktywacji receptora. Czysty antagonist receptora benzodiazepinowego, Ro 15-1788, nie wpływa na działanie barbituratów, podobnie jak i nie osłabia normalnej transmisji GABA. Jednakże drgawkotwórcze β -karboliny (odwrotni ago-niści receptora benzodiazepinowego) działają antagonistycznie w stosun-ku do efektów barbituratów, osłabiając funkcjonowanie receptora GABA (rys. 9). Ten właśnie efekt antagonistyczny odwrotnych agonistów w stosunku do działania barbituratów znosi Ro 15-1788, czysty antago-nista receptora benzodiazepinowego [9, 24].

Ostatnio publikowane wyniki, uzyskane po podaniu częściowych ago-nistów (Ro 16-6028) i częściowych odwrotnych agonistów (Ro 15-4513) receptorów benzodiazepinowych, wydają się wskazywać na obecność różnych podtypów receptorów GABA, odmiennie rozmieszczonych w różnych strukturach mózgu [9].

Warto tu wspomnieć, że Richards i wsp. [24] zaproponowali peł-nienie przez receptor benzodiazepinowy określonej roli w warunkach fi-zjologicznych, to znaczy w warunkach braku wprowadzonego z zewnątrz leku benzodiazepinowego. Rolę naturalnych, endogennych ligandów (agonistów) miałyby w tym wypadku pełnić właśnie β -karboliny lub jeszcze nieodkryte związki pokrewne. Te endogenne związki miałyby być odpowiedzialne za lęk i inne zaburzenia, to jest za stany w których

benzodiazepiny działają korzystnie. Nie odkryto jednak jeszcze ani naturalnych substancji o działaniu benzodiazepinowym, ani nie ustalono który z możliwych związków β -karbolinowych miałby być owym agonistą. Brakuje zatem jak dotąd wielu ogniw tej hipotezy.

RECEPTOR GABA_B

Receptory GABA_B są, jak z samej nazwy wynika, podgrupą receptorów GABA [13, 20]. Wykazano bowiem, że GABA jest endogennym ligandem także i tych receptorów. Receptory GABA_B są, w przeciwieństwie do receptorów GABA_A, niewrażliwe na bikukulinę, a ich selektywnym agonistą jest związek przeciwdrgawkowy β -p-chlorofenylo-GABA (baklofen) [13]. Do niedawna mechanizm jonowy działania baklofenu nie był jasny. Obecnie wydaje się, przynajmniej w odniesieniu do niektórych typów komórek nerwowych, np. hipokampalnych neuronów piramidowych szczura *in vitro* [7], że baklofen działa poprzez aktywację przepuszczalności błony dla potasu. Wywołany przez ten związek prąd potasowy jest niezależny od prądu wapniowego. Efekt ten można uzyskać za pomocą GABA przy zablokowanych uprzednio receptorach GABA_A. Wskazuje to na GABA, jako na endogennego agonistę tego receptora.

KANAŁY JONOWE A KOMÓRKI GLEJOWE

Warto tu także wspomnieć o wzrastającym zainteresowaniu obecnością kanałów jonowych w błonach komórkowych rozmaitych komórek glejowych, zwłaszcza w komórkach Schwanna [8, 28]. Szczególna wrażliwość kanałów jonowych komórek Schwanna na zmiany napięcia błony komórkowej, z bardzo wąskim oknem napięciowym przy którym ulegają one otwarciu, utrudnia próby tłumaczenia ich fizjologicznej roli [8]. Proponowane funkcje dla kanałów potasowych i chlorkowych w astrocytach są jednak interesujące [8].

Wielokrotnie sugerowano, że rolą komórek glejowych jest usuwanie z przestrzeni międzykomórkowej jonów potasowych, które zostały do niej uwolnione przez sąsiadujące neurony. Usunięcie potasu z przestrzeni okołoneuronalnej miało ułatwić funkcjonowanie komórek nerwowych. Schemat ten, w swojej uproszczonej formie, ma tę wadę, że ostatecznie owe jony potasu winny jednak wrócić do macierzystych neuronów. Jest to konieczne, jeśli mają one nadal funkcjonować prawidłowo, a byłoby trudne, gdyby jony potasu przemieściły się zbyt daleko. Argumenty te.

wysuwane uprzednio przeciwko roli gleju w usuwaniu nadmiaru potasu, wydają się obecnie tracić na wartości, wykazano bowiem, że wywołana przez jony potasu depolaryzacja błony wzmacnia przepuszczalność kanałów chlorkowych. Sugeruje to, że jony chlorkowe mogą być kotransportowane do komórki razem z potasem. Stwarzałoby to możliwość przechowywania potasu razem z jonami chlorkowymi, bez zmiany elektrycznych własności komórki gлевой, która w razie potrzeby mogłaby zwracać potas neuronom, pozostawiając przy tym jony chlorkowe w przestrzeni międzykomórkowej [8].

Inna, interesująca, ale bardzo już spekulatywna hipoteza sugeruje, że kanały sodowe i potasowe komórek Schwanna stanowią źródło, które zaopatruje aksony w gotowe cząsteczki funkcjonalnie sprawnych kanałów [8]. W przeciwnym wypadku ich transport, aż z ciała komórki, mógłby stanowić problem, zwłaszcza jeśli uwzględnić niektóre długości aksonów, np. w motoneuronach ssaków.

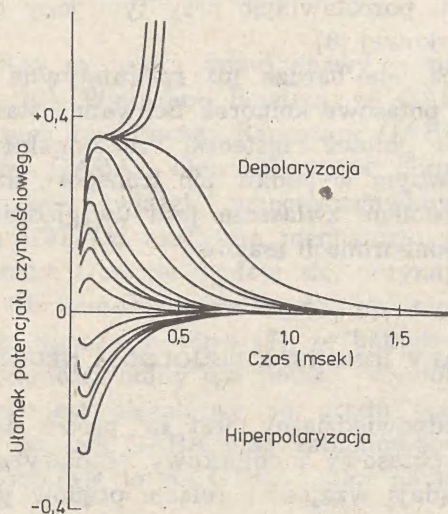
KANAŁY JONOWE A FIZJOLOGIA NEURONÓW

Kanał sodowy odpowiedzialny jest za proces depolaryzacji błony, podczas gdy kanał potasowy i chlorkowy repolaryzują ją lub hiperpolaryzują. Jak wyglądają wzajemne relacje prądów jonowych płynących przez te kanały i jaka jest ich rola w fizjologii neuronu?

Zmiany przepuszczalności jonowej i związane z tym zmiany potencjału elektrycznego błony komórkowej mogą ograniczać się do niewielkiego wycinka błony w otoczeniu synapsy lub też uogólniać się na cały neuron ze wszystkimi jego wypustkami. Lokalne, postsynaptyczne potencjały hamujące lub pobudzające mogą się sumować, jeśli pochodzą z synaps zlokalizowanych w niewielkiej odległości jedna od drugiej i pojawiają się w zbliżonym czasie (sumacja przestrzenna i czasowa). Sumacja ta ma charakter algebraiczny. Zmiany potencjału o przeciwnych znakach i podobnej amplitudzie znoszą się wzajemnie. Na skutek sumacji kilku potencjałów o tym samym znaku, bądź po pojawieniu się jednego impulsu o odpowiedniej sile przekroczony może zostać próg zmiany lokalnej (rys. 10) i od tego momentu depolaryzacja błony neuronu rozprzestrzenia się lawinowo we wszystkich kierunkach na wszystkie wypustki komórki — jest to potencjał czynnościowy (o znacznie wyższej amplitudzie, niż lokalny potencjał postsynaptyczny (rys. 10 i 2).

Czym jest ów próg zmiany lokalnej, próg potencjału czynnościowego? Jak dochodzi do jego przekroczenia? Pojawienie się nawet słabej, lokalnej zmiany depolaryzacyjnej sprowadza się do przepływu pewnego prądu sodowego na skutek wzrostu przewodności kanałów przewodzących ten jon. W sytuacji wzrostu przepuszczalności tych kanałów, znaj-

dujące się na zewnątrz komórki pozostałe jony sodowe będą starały się przepływać zgodnie z gradientem stężeń, do wnętrza komórki i depolaryzować ją jeszcze bardziej zdążając do potencjału właściwej sodowi równowagi. Temu dodatkowemu, dośrodkowemu prądowi sodowemu przeciwstawia się prąd potasowy. Wyrzuca on na zewnątrz jony potasowe i stara się przywrócić błonie komórkowej potencjał spoczynkowy,



Rys. 10. Rejestrowana zewnątrzkomórkowo odpowiedź aksonu kraba na bodźce hiperpolaryzujące i depolaryzujące. Trzy najsilniejsze bodźce wyzwały potencjały czynnościowe o amplitudzie przyjętej za 1,0 na skali pionowej (Hodgkin wg Bullock [4])

który, jak pamiętamy, znajduje się bardzo blisko potencjału równowagi dla jonów potasu. Prąd ten płynie, mimo iż początkowo nawet nie wzrasta przewodność kanałów potasowych (rys. 3); są one przecież w warunkach równowagi spoczynkowej 50-krotnie bardziej przepuszczalne, niż kanały sodowe [4]. Prąd ten płynie, bowiem napędzany jest różnicą między potencjałem częściowo spolaryzowanej błony, a potencjałem równowagi potasowej. Wszystko zatem zależy od pojedynku tych prądów. Jeśli przeważa prąd potasowy zmiany nie przekroczą progu potencjału czynnościowego i potencjał błony wróci do poziomu spoczynkowego. Natomiast, jeśli zostanie przekroczony krytyczny poziom depolaryzacji (próg potencjału czynnościowego) przewodność kanału sodowego wzrośnie na tyle, że przeważa prąd sodowy, a nie prąd potasowy i potencjał błony komórkowej wzrośnie wybuchowo do poziomu równowagi dla jonu sodowego (rys. 3 i 10). Cała błona komórkowa zostanie wówczas objęta potencjałem czynnościowym. Gwałtowny charak-

ter tego procesu polega na dodatnim sprzężeniu zwrotnym między depolaryzacją z jednej, a przewodnością kanału sodowego i prądem sodowym z drugiej strony. Każdy bowiem wzrost depolaryzacji zwiększa przewodność kanałów sodowych, co prowadzi do wzrostu prądu sodowego i dalszej, jeszcze większej, depolaryzacji błony. Jeśli temu mechanizmowi nie przeciwstawi się prąd potasowy, musi pojawić się potencjał czynnościowy.

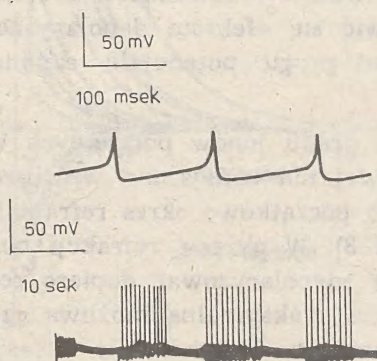
Rzecz w tym, że prąd potasowy i wzrost przewodności kanału potasowego przeciwstawia się temu depolaryzacyjnemu wzrostowi przewodności kanału sodowego z pewnym opóźnieniem (rys. 3). Jeśli opisane zmiany depolaryzacyjne i wzrost przewodności kanału sodowego zachodzą wolno, opóźniony wzrost przewodności dla kanału potasowego może zdążyć przeciwstawić się efektom depolaryzacji. Wynikiem takiego działania będzie wzrost progu potencjału czynnościowego i akomodacja [4].

Podczas przepływu prądu jonów potasowych w czasie repolaryzacji, błona komórki nerwowej ma zmniejszoną wrażliwość dla impulsów depolaryzujących. Jest to początkowo okres refrakcji bezwzględnej, a następnie względnej (rys. 3). W okresie refrakcji bezwzględnej żaden impuls nie jest w stanie zdepolaryzować dopiero repolaryzującej się błony. Okres ten ogranicza maksymalną możliwą częstotliwość przenoszenia impulsów przez neuron. Natomiast w okresie refrakcji względnej przeniesienie impulsu jest możliwe. Jeśli potencjał błony komórkowej znajduje się jeszcze powyżej progu potencjału czynnościowego, to kolejny potencjał czynnościowy będzie mniejszy, ale jeśli potencjał ów znajduje się już poniżej progu, wyzwolenie kolejnego potencjału czynnościowego będzie wymagać silniejszego impulsu wyzwalamącego. Po przejściu potencjału czynnościowego, potencjał mierzony po obu stronach błony nie od razu odzyskuje poziom potencjału spoczynkowego. Bezpośrednio po potencjale czynnościowym ma ona — w okresie refrakcji względnej — potencjał mniejszy do spoczynkowego i jeszcze bliższy potencjałowi równowagi dla jonów potasu. Powoduje to jeszcze większą przepuszczalność kanałów potasowych, niż w spoczynku.

Po pierwszym ujemnym potencjale następczym okresu refrakcji względnej mogą nastąpić dalsze oscylacje potencjału błony: dodatnia, a niekiedy jeszcze jedna ujemna; po czym utrwała się potencjał spoczynkowy — aż do następnego impulsu. Impusy trafiające na błonę komórkową o innym potencjale niż spoczynkowy, będą albo łatwiej doprowadzać do pojawienia się potencjału czynnościowego — mówimy wówczas o utorowanej drodze, o torowaniu lub ułatwieniu w przebiegu impulsów — albo też utrudniać pojawienie się potencjału czynnościowego — mówimy wówczas o hamowaniu impulsów. Hamowanie i torowanie im-

pulsów odgrywa ważną rolę w fizjologii złożonych sieci neuronalnych [4].

W niektórych rodzajach komórek (np. neuronach kałamarnicy) potencjały czynnościowe mogą pojawiać się mimo braku zewnętrznego impulsu wyzwalającego. W komórkach tego typu po okresie refrakcji bezwzględnej nie dochodzi do opisanych wyżej oscylacji potencjału błony wokół potencjału spoczynkowego. Ulega ona stopniowej, stosunkowo powolnej depolaryzacji, aż do osiągnięcia progu potencjału czynnościowego, co powoduje samorzutne pojawienie się następnego potencjału (rys. 11). Powodem tej depolaryzacji jest stopniowy spadek przewodności ka-



Rys. 11. Potencjały rytmiczne (*pacekamer potentials*) i potencjały czynnościowe wyzwalane samorzutnie w neuronach *Aplysia* (L. Tauc wg Bullock [4])

nałów potasowych i przewaga prądu sodowego. Ten powolny potencjał depolaryzacyjny znany jest w literaturze anglosaskiej jako *pacemaker potential* (potencjał nadający rytm) [4].

Niektóre neurony w normalnych warunkach wyzwalają spontanicznie potencjały czynnościowe; inne, nie pobudzone, milczą (*silent cells*) [4]. Niektóre iskrzą salwami impulsów, po których regularnie następują dłuższe lub krótsze, rytmicznie się powtarzające okresy hiperpolaryzacji między salwami (rys. 11). Przerwy między impulsami lub salwami impulsów mogą być bardzo zmienne i zależne od wpływu innych neuronów lub też od wpływów pochodzących z przestrzeni pozakomórkowej, np. od zmian w metabolizmie lub zmian w składzie jonowym. Wiadomo, że np. obniżając poziom wapnia pozakomórkowego można obniżyć poziom wapnia w komórce tak dalece, że będzie ona wyzalać potencjały czynnościowe nie po dojściu depolaryzacji do progu potencjału czynnościowego, lecz już na poziomie potencjału spoczynkowego.

W ostatnich latach nastąpił gwałtowny rozwój wiedzy o budowie i fizjologii błony komórkowej i różnych jej elementów składowych. Szczególnie intensywnie badane były kanały, poprzez które wewnątrz komórki łączy się w funkcjonalną całość z płynem międzykomórkowym, z innymi neuronami oraz komórkami glejowymi. Pozwala to żywić nadzieję na wyjaśnienie tych zjawisk z fizjologii neuronów, które obecnie musimy ciągle jeszcze kwitować suchym opisem zaobserwowanych faktów.

LITERATURA

1. Bevan S., Raff M. — Voltage-dependent potassium currents in cultured astrocytes. *Nature* 315: 229-232, 1985.
2. Bezanilla F., White M. M. — Properties of ionic channels in excitable membranes. W: *Physiology of membrane disorders*. Andreoli T. E., Hoffman J. F., Fanestil D. D., Schultz S. G. (red.), Plenum Publ. Corp., str. 437-448, 1986.
3. Bormann J., Clapham D. E. — γ -Aminobutyric acid receptor channels in adrenal chromaffin cells: A patch-clamp study. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82: 2168-2172, 1985.
4. Bullock T. H., Orkand R., Grinnell A. — *Introduction to nervous systems*, Freeman W. H. and Co., San Francisco, 1977.
5. Catterall W. A. — The molecular basis of neuronal excitability. *Science* 223: 653-661, 1984.
6. Fleming W. W. — The electrogenic Na^+ , K^+ -pump in smooth muscle: physiologic and pharmacologic significance. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol* 20: 129-149, 1980.
7. Gähwiler B. H., Brown D. A., del Castillo J. — GABA_B-receptor-activated K^+ current in voltage-clamped CA₁ pyramidal cells in hippocampal cultures. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82: 1558-1562, 1985.
8. Gray P. T. A., Ritchie J. M. — Ion channels in Schwann and glial cells. *TIINS* 8: 411-415, 1985.
9. Haefely W. — The biological basis of benzodiazepine actions. W: *The benzodiazepines. Current standards for medical practice*. Smith D. E., Wesson D. R. (red.), MTP Press Limited Lancaster, Boston, str. 7-41, 1985.
10. Hamill O. P., Bormann J., Sakmann B. — Activation of multiple-conductance state chloride channels in spinal neurones by glycine and GABA. *Nature* 305: 805-808, 1983.
11. Harris R. A., Allan A. M. — Functional coupling of γ -aminobutyric acid receptors to chloride channels in brain membranes. *Science* 228: 1108-1110, 1985.
12. Häring P., Stähli C., Schoch P., Takacs B., Staehelin T., Möhler H. — Monoclonal antibodies reveal structural homogeneity of γ -aminobutyric acid/benzodiazepine receptors in different brain areas. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82: 4837-4841, 1985.

13. Hill D. R., Bowery N. G. — ^3H -baclofen and ^3H -GABA bind to bicuculline-insensitive GABA_B sites in rat brain. *Nature* 290: 149-152, 1981.
14. Ling G. N. — A new model for the living cell: a summary of the theory and recent experimental evidence in its support. W: *International review of cytology*, Bourne G. H. Danielli J. S., Jeon K. W. (red.), Academic Press, New York, 26: 1-61, 1969.
15. Ling G. N. — Physiology and anatomy of the cell membrane: the physical state of water in the living cell. *Fed. Proc.* 24 (suppl. 15): 103-112, 1965.
16. Loewenstein W. R. — Cell-to-cell communication. Permeability, regulation, formation, and functions of the cell-cell membrane channel in cell junctions. W: *Physiology of membrane disorders*, Andreoli T. E., Hoffman J. F., Fanestil D. D., Schultz S. G. (red.), Plenum Publ. Corp., str. 329-343, 1986.
17. Marty A. — Ca^{2+} -dependent K^+ channels with large unitary conductance. *TINS* 6: 262-265, 1983.
18. Mullins L. J., Requena J., Whitembury J. — Ca^{2+} entry in squid axons during voltage-clamp pulses is mainly $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchange. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82: 1847-1851, 1985.
19. Noma A. — ATP-regulated K^+ channels in cardiac muscle. *Nature* 305: 147-150, 1983.
20. Olsen R. W., Wong E. H. F., Stauber G. B., King R. G. — Biochemical pharmacology of the γ -aminobutyric acid receptor/ionophore protein. *Fed. Proc.* 43: 2773-2778, 1984.
21. Petersen O. H., Maruyama Y. — Calcium-activated potassium channels and their role in secretion. *Nature* 307: 693-696, 1984.
22. Quandt F. N., MacVicar B. A. — Calcium activated potassium channels in cultured astrocytes. *Neuroscience* 19: 29-41, 1986.
23. Rall Th. W., Schleifer L. S. — Drugs effective in the therapy of the epilepsies. W: *Goodman and Gilman's The pharmacological basis of therapeutics*. Goodman Gilmann A., Goodman L. S., Rall Th. W., Murad F. (red.), MacMillan Publ. Comp., New York, str. 446-472, 1985.
24. Richards J. G., Schoch P., Möhler H., Haefely W. — Benzodiazepine receptors resolved. *Experientia* 42: 121-126, 1986.
25. Ritchie J. M., Greene N. M. — Local anesthetics. W: *Goodman and Gilman's The pharmacological basis of therapeutics*. Goodman Gilmann A., Goodman L. S., Rall Th. W., Murad F. (red.), MacMillan Publ. Comp., New York, str. 302-321, 1985.
26. Schadé J. P., Ford D. H. — *Basic neurology*. Elsevier, Amsterdam, 1973.
27. Thompson S. H. — Three pharmacologically distinct potassium channels in molluscan neurones. *J. Physiol. (Lond.)* 265: 465-488, 1977.
28. Watson W. E. — Physiology of neuraglia. *Physiol. Rev.* 54: 245-271, 1974.
29. Weiner N., Taylor P. — Drugs acting at synaptic and neuroeffector junctional sites. W: *Goodman and Gilman's The pharmacological basis of therapeutics*. Goodman Gilmann A., Goodman L. S., Rall Th. W., Muhad F. (red.), MacMillan Publ. Comp., New York, str. 66-99, 1985.

ZBIGNIEW S. HERMAN

Śląska Akademia Medyczna

Katowice

DZIAŁANIE I ZASTOSOWANIE LEKÓW BLOKUJĄCYCH
KANAŁY WAPNIOWE

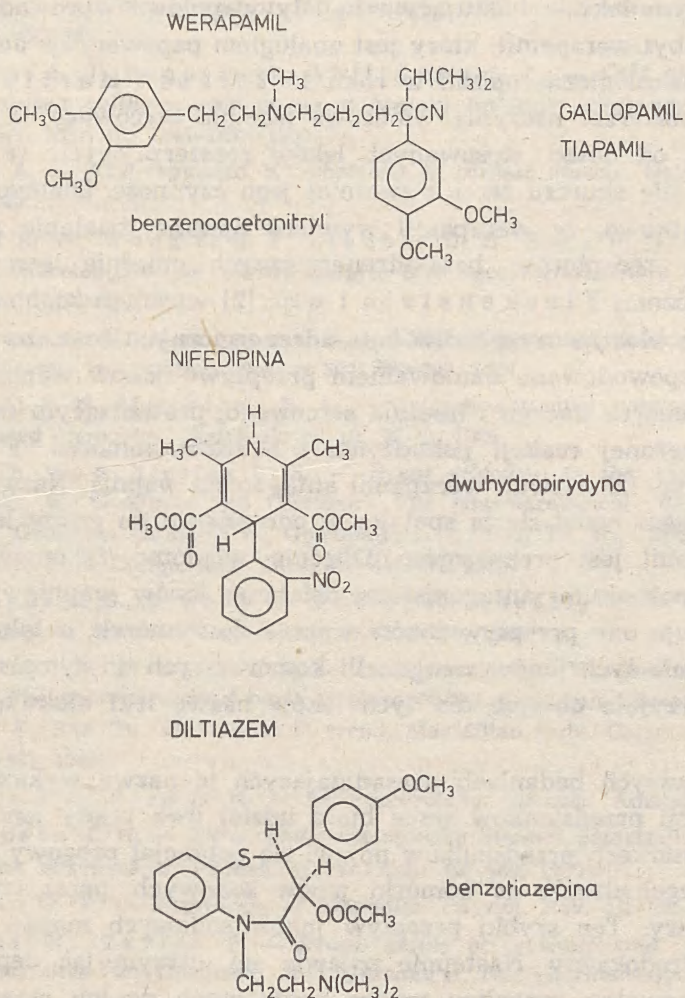
Pierwszym lekiem blokującym kanały wapniowe wprowadzonym do leczenia był werapamil, który jest analogiem papaweryny. Jego właściwości farmakologiczne opisali w roku 1962 Hass i Hartfelder [1]. Lek ten rozszerzał naczynia wieńcowe mięśnia sercowego, w odróżnieniu jednak od dotąd stosowanych leków rozszerzających te naczynia zmniejszał siłę skurczu serca i zwalniał jego czynność. Dlatego też uważano początkowo, że werapamil wywiera opisane działanie na skutek blokowania receptorów beta-adrenergicznych mięśnia sercowego. W kilka lat później Fleckenstein i wsp. [2] wysunęli hipotezę, że werapamil nie blokuje receptorów beta-adrenergicznych oraz, że jego działanie jest spowodowane hamowaniem przepływu jonów wapniowych do wnętrza komórek naczyń i mięśnia sercowego, prowadzącym do zahamowania sprzężonej reakcji pobudzenia i skurczu komórek. Fleckenstein i wsp. [2] nazwali werapamil antagonistą wapnia. Nazwy tej używano i czasem nadal się ją spotyka w odniesieniu do grupy leków, której werapamil jest prekursorem. Obecnie wiadomo, że omawiane leki nie są bezpośrednimi antagonistami działania jonów wapniowych, natomiast hamują one przepływ jonów wapnia do komórek, a także hamują przechodzenie tych jonów z organelli komórkowych do cytoplazmy. Dlatego też przyjęto obecnie dla tych leków nazwę leki blokujące kanały wapniowe.

W pierwszych badaniach uzasadniających tę nazwę wykazano, że w depolaryzacji przedsionków serca biorą udział dwa prądy jonowe [3, 4]. Gdy w komórkach przedsionków pojawi się potencjał progowy występuje szybkie przechodzenie do komórki jonów sodowych przez tzw. szybki kanał sodowy. Ten szybki przepływ jonów sodowych można znieść za pomocą tetrodoksyny. Następnie pojawia się, utrzymując depolaryzację komórek, powolny przepływ jonów wapniowych do ich wnętrza przez tzw. powolny kanał wapniowy. Przepływ jonów wapniowych hamują

jony manganowe, natomiast tetrodoksyna nań nie wpływa. W następnych badaniach wykazano, że werapamil i jego pochodne silnie hamują przepływ jonów wapniowych do wnętrza komórki [5].

BUDOWA CHEMICZNA

Trzy podstawowe leki blokujące kanały wapniowe różnią się istotnie swoją budową chemiczną. Werapamil jest pochodną benzenoacetonitrylu, nifedypina jest przedstawicielem grupy dwuhydropirydyn, a diltiazem jest benzotiazepiną.



Rys. 1. Leki blokujące kanały wapniowe

Wymienione leki są aktywne optycznie, ich l-izomery blokują kanały wapniowe 5-10 razy silniej w porównaniu z d-izomerami. Werapamil i diltiazem rozpuszczają się w wodzie, natomiast pochodne dwuhydropirydyny rozpuszczają się w rozpuszczalnikach organicznych.

DZIAŁANIE FARMAKOLOGICZNE

Naczynia krwionośne. Skurcz mięśni gładkich naczyń krwionośnych jest powodowany przez przechodzenie jonów wapnia do wnętrza komórki przez jej błonę oraz jego uwalnianie z organelli komórkowych do cytoplazmy. Zależy on więc od stężenia wolnych jonów wapniowych w cytoplazmie. Regulacja tego stężenia odbywa się za pomocą dwu mechanizmów.

Pierwszy, zwany sprzężeniem elektro-mechanicznym, związany jest z kanałami wapniowymi zależnymi od napięcia powstającego prądu, które otwierają się na skutek depolaryzacji błony komórkowej. Jony wapniowe przepływając przez te kanały wywołują skurcz mięśni gładkich naczyń. Następnie występuje zamknięcie tych kanałów na pewien określony czas po upływie którego mogą one zostać otwarte ponownie.

Drugi mechanizm sprzężenia farmako-mechanicznego polega na pobudzeniu swoistych receptorów otwierających kanał wapniowy bez depolaryzacji błony komórkowej. Pobudzenie receptorów powoduje uwolnienie jonów wapnia we wnętrzu komórki oraz zwiększenie ich przepływu z zewnątrz do wnętrza komórki. Wzrost stężenia jonów wapnia wewnątrz komórek powoduje zwiększenie ich wiązania się z kalmoduliną. Powstały kompleks jonów wapnia z kalmoduliną wywołuje fosforylację lekkich łańcuchów miozyny, co powoduje reakcję aktyny i miozyny prowadzącą do skurczu mięśni gładkich.

Leki blokujące kanały wapniowe wpływają na obydwa mechanizmy, lecz blokują kanały wapniowe zależne od depolaryzacji w znacznie mniejszych stężeniach, niż to jest konieczne do zamknięcia kanałów zależnych od receptorów wapniowych. Leki te silnie rozszerzają mięśnie gładkie tętnic, natomiast bardzo słabo rozszerzają mięśnie gładkie żył, a więc nie wpływają na obciążenie przedsukczowe mięśnia sercowego [6, 7].

Komórki serca. Depolaryzacja komórek węzła zatokowego i przedsionkowo-komorowego zależy w znacznej mierze od przechodzenia jonów wapniowych przez ich kanał powolny. W komórkach roboczych mięśnia sercowego jony wapnia łącząc się z troponiną zapobiegają jej hamującemu wpływowi na interakcję aktyny z miozyną i wywołują skurcz tych komórek. Dlatego leki blokujące kanał wapniowy zmniejszają siłę skurczu mięśnia sercowego.

Zmniejszenie przewodzenia przedsionkowo-komorowego oraz częstości uderzeń serca wywołane przez leki blokujące kanały wapniowe zależy także od tego, czy dany lek opóźnia ponowne otwarcie powolnych kanałów wapniowych w odpowiedzi na ich aktywację. Nifedypina i jej pochodne, blokując powolny kanał wapniowy z siłą proporcjonalną do dawki, nie wpływają na czas ponownego otwarcia kanałów upływający po ich pobudzeniu. Dlatego też nie wpływają one na czas przewodzenia impulsów w węzłach mięśnia sercowego. Natomiast werapamil hamując przepływ jonów wapniowych wydłuża bardzo wyraźnie czas ponownego otwarcia kanałów wapniowych, dzięki temu zmniejsza on wyraźnie przewodnictwo przedsionkowo-komorowe i hamuje częstość rytmu serca. Diltiazem działa na serce podobnie do werapamilu, lecz słabiej. Stąd wynika stosowanie tych dwu leków w leczeniu arytmii nadkomorowych [8, 9, 10].

DZIAŁANIE POSZCZEGÓLNYCH LEKÓW BLOKUJĄCYCH KANALAŁY WAPNIOWE NA UKŁAD KRAŻENIA

POCHODNE DWUHYDROPIRYDINY

Nifedypina. Jej główne działanie polega na rozszerzaniu naczyń wieńcowych serca oraz tętnic obwodowych [11]. W konsekwencji występuje odruchowe pobudzenie układu adrenergicznego powodujące przyspieszenie czynności i wzrost siły skurczu serca. Nifedypina wywiera wprawdzie bezpośrednie działanie na serce hamując siłę jego skurczu, nie ma ono jednak znaczenia klinicznego, gdyż jest bardzo niewielkie po zastosowaniu dawek wystarczających do rozszerzenia tętnic [12]. Tak więc nifedypina rozszerzając naczynia krwionośne obniża ciśnienie krwi, hamuje ilość krwi dopływającej do serca, co w konsekwencji zmniejsza zużycie tlenu przez serce. Stąd jej istotne działanie lecznicze w chorobie niedokrwiennej serca. Po podaniu doustnym przeważa działanie naczyniowo-rozszerzające nifedypiny, natomiast po jej podaniu podjęzykowym występuje ponadto zwiększenie wyrzutu sercowego [13, 14].

Nimodypina. Blokuje kanały wapniowe za pomocą mechanizmu działania charakterystycznego dla innych leków pochodnych dwuhydropirydiny, mianowicie stabilizuje kanały wapniowe znajdujące się w stanie nieaktywnym i dzięki temu hamuje przepływ jonów wapniowych do komórek. Ponadto pobudzając aktywność ATP-azy zależnej od sodu i potasu, zwiększa wypływ jonów wapnia z komórki. Jest lekiem, który szczególnie silnie blokuje kanały wapniowe w naczyniach mózgowych. Nie znamy wyjaśnienia przyczyn tego zjawiska, być może jest ono spowodowane szczególną zależnością stanu napięcia mięśni gładkich naczyń krwionośnych mózgu od stężenia pozakomórkowego jonów wapniowych,

a także bardzo dużą rozpuszczalnością w tłuszczach nimodypiny, znacznie przewyższającą właściwości lipofilne nifedypiny.

Nimodypina znacznie zwiększała przepływ krwi przez naczynia krwionośne mózgowia psów, kotów, królików i małp po zastosowaniu dawek nie obniżających wyraźnie ciśnienia krwi. Wyższe dawki leku obniżały ciśnienie krwi i słabiej zwiększały przepływ krwi przez mózgowie. U zwierząt, u których wywołano doświadczalnie krwotok podpażęczynówkowy nimodypina hamowała odruchowo występujący skurcz naczyń mózgowych. Zmniejszała ona również wielkość doświadczalnie wywołanej martwicy tkanki mózgowej. Istnieją dane doświadczalne wskazujące, że nimodypina działa bezpośrednio na ośrodkowy układ nerwowy. Hamowała ona drgawki kardiazalowe i zmniejszała amnezję wywołaną niedotlenieniem mózgu u myszy.

Obecnie prowadzone są badania kliniczne tego leku. Wskazują one na przydatność nimodypiny w leczeniu stanów po udarze mózgu oraz w profilaktyce bólów głowy pochodzenia naczyniowego. Prowadzone są badania nad przydatnością nimodypiny u chorych po urazie mózgu, u chorych którzy przeżyli zatrzymanie czynności serca, w leczeniu padaczki, otępienia, nagłej głuchoty oraz oczopląsu pochodzenia przedsionkowego [15, 16].

Nitrendypina. Działa blokując na kanały wapniowe głównie w mięśniach gładkich. Wykazano jej silne działanie obniżające ciśnienie krwi za pomocą wielu modeli doświadczalnych u zwierząt. Potwierdzono jej wyraźne działanie obniżające ciśnienie krwi u ludzi z chorobą nadciśnieniową, któremu towarzyszyło zmniejszenie obwodowych oporów naczyniowych i niewielkie odruchowe przyspieszenie czynności serca. Najczęściej dotąd obserwowanymi objawami niepożądanymi po stosowaniu tego leku były bóle głowy i zaczerwienienie skóry [17].

Nikardypina. Jest obiecującym środkiem w leczeniu choroby niedokrwiennej serca [18].

INNE LEKI BLOKUJĄCE KANAŁY WAPNIOWE

Werapamil. Rozszerza naczynia tętnicze słabiej od nifedypiny nie wpływając na żyły [11]. Natomiast znacznie silniej oraz inaczej od nifedypiny działa na serce. Działa wyraźnie hamując na częstość akcji serca, przewodzenie impulsów w sercu i siłę skurczu mięśnia sercowego. W związku z tym, pomimo że po podaniu dożylnym werapamil silnie obniża ciśnienie krwi, jego bezpośrednie działanie na serce osłabia występujące odruchy układu adrenergicznego normalnie wywołane spadkiem ciśnienia krwi [19]. U chorych z niewydolnością krążenia pochodzenia ser-

cowego dożylnie wstrzyknięcie werapamilu może tę niewydolność znacznie pogarszyć na skutek zmniejszenia kurczliwości lewej komory serca [20]. Natomiast doustne stosowanie leku wywołuje głównie zmniejszenie oporów naczyniowych oraz spadek ciśnienia krwi bez wyraźnych zmian częstotliwości uderzeń serca [13].

Diltiazem. Podany dożylnie wywołuje wyraźne zmniejszenie oporów naczyniowych oraz spadek ciśnienia krwi z odruchowym przyspieszeniem czynności serca i zwiększeniem wyrzutu krwi, a następnie na skutek rozwijającego się bezpośredniego wpływu leku na czynność serca występuje jej zwolnienie. Po podaniu doustnym wywołuje długotrwałe obniżenie ciśnienia krwi oraz zwolnienie czynności serca [13, 21, 22].

MECHANIZM DZIAŁANIA

Leki blokujące kanały wapniowe zależne od napięcia w komórkach mięśni gładkich, mięśnia sercowego, neuronach czy komórkach分泌nych działają w sposób podobny jak środki znieczulające miejscowo: hamują kanały sodowe [23, 24].

Najpierw wchodzi one do błony komórkowej lub przenikają przez nią do swojego miejsca działania w kanale wapniowym. Przemawia za tym fakt, że są one związkami lipofilnymi, łatwo przenikającymi przez błony komórkowe do cytozolu [25]. Czwartorzędowa pochodna gallopamilu, nie przenikająca przez błony komórkowe, nie wpływała po podaniu zewnątrzkomórkowym na potencjał komórek komór mięśnia sercowego świnki morskiej, podczas gdy hamowała fazę drugą tego potencjału, zależnego od jonów wapnia po jej podaniu wewnątrzkomórkowym. Natomiast sam gallopamil czy podany zewnątrz-, czy też wewnątrzkomórkowo hamował potencjał komórek sercowych zależny od wapnia, co wskazuje że może on działać po przeniknięciu do błony komórkowej [26].

Celem poznania interakcji leków z kanałami wapniowymi wykonano szereg badań wiązania się leków blokujących te kanały, znakowanych radioizotopami. Wykazano istnienie dwu różnych miejsc błon komórkowych wiążących się z lekami blokującymi kanały wapniowe. Jedne miejsca wiązania charakteryzowały się małym powinowactwem oraz dużą pojemnością wiązania leków, podczas gdy druga grupa miejsc wiązania miała duże powinowactwo, lecz małą pojemność wiązania się tych leków z błonami komórkowymi. Na ogół stwierdzano dodatnią zależność między siłą wiązania się leków z błonami komórkowymi i wielkością ich stężenia potrzebną do wywołania zablokowania funkcji kanałów wapniowych. Zjawisko to obserwowano najczęściej w komórkach mięśni gładkich. W mięśniu sercowym, mięśniach prążkowanych i neuronach

mózgowych obserwowano silne wiązanie się leków blokujących kanały wapniowe z błonami komórkowymi, gdy leki te stosowano w małych stężeniach nie wystarczających do wywołania objawów blokady kanałów wapniowych. Ten fakt tłumaczy się tym, że warunki doświadczalne, w jakich bada się wiązanie leków blokujących kanały wapniowe powodują, że fragmenty badanych błon komórkowych zawierają większość miejsc wiązania się z lekami, znajdujących się w stanie nieaktywnym [27, 28, 29, 30, 31].

Wiązanie się nifedypiny oraz innych pochodnych dwuhydropirydyny z błonami komórkowymi ulega zmianie pod wpływem werapamilu lub diltiazemu. Mianowicie werapamil zmniejsza, natomiast diltiazem zwiększa wiązanie się pochodnych dwuhydropirydyny [32]. Pomimo że istnieje antagonizm funkcjonalny między pozakomórkowymi jonami wapnia i lekami blokującymi kanały wapniowe, niewielkie lub umiarkowane stężenia jonów wapniowych nie hamują wiązania się leków pochodnych dwuhydropirydyny z błonami komórkowymi. Zahamowanie tego wiązania wywołują tylko bardzo duże stężenia jonów wapniowych pozakomórkowych [33, 34].

Wykazano też, że pochodne dwuhydropirydyny oraz werapamil wiążą się zarówno z otwartymi, jak i zamkniętymi kanałami wapniowymi, podczas gdy diltiazem wiąże się głównie z kanałami zamkniętymi [35].

Pochodne dwuhydropirydyny szybko odszczepiają się od kanałów wapniowych po związaniu się z nimi [36].

Leki i neroprzełączniki układu autonomicznego mają istotne znaczenie regulujące aktywność kanałów wapniowych. Leki pobudzające receptory β -adrenergiczne silnie pobudzają kanały wapniowe. Leki te bowiem aktywując adenylocyklazę i zwiększając stężenie cyklicznego AMP w cytoplazmie zwiększają aktywność kinazy białkowej, która powoduje fosforylację białek kanałów wapniowych [37, 38]. Natomiast leki cholinomimetyczne pobudzające receptory muskarynowe zmniejszają przepływ jonów wapniowych do komórek, prawdopodobnie aktywując układ guanylocykloza-cykliczny GMP [39, 40].

Różnice w działaniu poszczególnych leków blokujących kanały wapniowe wynikają z ich wpływu na różne typy kanałów wapniowych, różnych receptorów tych leków, a także z ich działania na inne mechanizmy, m. in. hamowania uwalniania wapnia wewnątrzkomórkowego, hamowania postsynaptycznych receptorów α -adrenergicznych, interakcji z kalmoduliną, hamowania aktywności fosfodwuesterazy cyklicznego AMP, pobudzania ATP-azy aktywowanej jonami sodu i potasu oraz bezpośredniego pobudzania białek kurczliwych [41].

DANE FARMAKOKINETYCZNE

Nifedypina. Wchłania się szybko i całkowicie po podaniu podjęzykowym. Po podaniu doustnym wchłania się w ok. 50% osiągając stężenie maksymalne w osoczu po 1-3 godz. Wiąże się w 98% z białkami osocza, ulega całkowitej biotransformacji w wątrobie do związków nieaktywnych wydalanych z moczem. Jej biologiczny okres półtrwania wynosi 3-4 godz. [42, 43].

Werapamil. Po podaniu doustnym wchłania się dobrze z przewodu pokarmowego. Jednak dostępność biologiczna leku jest niewielka, wynosząca ok. 20%, na skutek tego, że większość wchłoniętego leku ulega rozkładowi w czasie pierwszego przepływu krwi przez wątrobę. Po kilkutygodniowym systematycznym podawaniu leku jego dostępność biologiczna zwiększa się. Działanie lecznicze występuje po 1-2 godz. i jest najsilniejsze po ok. 5 godz. Biologiczny okres półtrwania leku wynosi ok. 6 godz., zwiększa się on czterokrotnie u chorych z marskością wątroby, wraz ze wzrostem dostępności biologicznej leku. W związku z tym u tych chorych dawkę doustną werapamilu należy zmniejszyć o 80%, a dawkę dożylną o 50% w porównaniu z dawkami stosowanymi u chorych z nieuszkodzoną wątrobą. Niewielka ilość leku (10%) ulega N-demetylacji w wątrobie, powstały metabolit jest aktywny biologicznie, lecz działa znacznie słabiej od produktu macierzystego. Po wstrzyknięciu dożylnym maksymalne efekty farmakologiczne werapamilu występują po 10-15 min. [44, 45].

Diltiazem. Dostępność biologiczna leku po jego podaniu doustnym wynosi ok. 50%. Zaczyna działać po 15 min., wywierając najsilniejsze działanie po ok. 30 min. Biologiczny okres półtrwania leku wynosi 3-4 godz. Niewielka ilość leku jest metabolizowana do dezacetylodiltiazemu, który ma 40-50% siły działania leku macierzystego [46, 47, 48].

EFEKTY NIEPOŻĄDANE I TOKSYCZNE

Nifedypina. Najczęstszym działaniem niepożądanym jest zbyt silne działanie naczynioworozszerzające powodujące obrzęki kończyn, zawroty głowy. Rzadziej występują bóle głowy, znaczne obniżenie ciśnienia krwi, zaczerwienienie skóry, zaburzenia czucia palców, nudności, wymioty, uspokojenie. Opisane objawy występują u ok. 20% chorych i mają na ogół niewielkie natężenie oraz tendencję do samoistnego ustępowania w czasie leczenia. Można je zwykle znieść obniżając stosowane dawki. Ostatnio wykazano, że te objawy niepożądane są spowodowane nie tylko blokowaniem przez nifedypinę kanałów wapniowych, lecz także potęgowaniem działania endogennej adenozyiny [49]. Opisano też u niektórych chorych pogorszenie objawów choroby niedokrwiennej serca na

skutek zbyt gwałtownego obniżenia przez nifedypinę ciśnienia krwi, co prowadzi do zmniejszonego przepływu krwi przez naczynia wieńcowe lub wzrost zużycia tlenu przez mięsień sercowy na skutek odruchowego przyspieszenia czynności serca. Natomiast przeciętne dawki lecznicze werapamilu lub diltiazemu rzadziej pogarszają istniejące niedokrwienie mięśnia sercowego, gdyż słabiej rozszerzają naczynia krwionośne, a zatem wywołują mniejsze objawy niepożądane dla serca, wywołane tym objawem [21, 22].

Werapamil. Po dożylnym podaniu leku obserwowano znaczne zwolnienie lub nawet zatrzymanie czynności serca lub gwałtowny spadek ciśnienia krwi. Istnieją zatem przeciwwskazania do dożylnego podawania werapamilu chorym z niewydolnością serca, zaburzeniami przewodzenia lub ciśnieniem skurczowym poniżej 90 mm Hg, a także chorym leczonym lekami beta-adrenolitycznymi [19, 20]. Doustne stosowanie werapamilu jest znacznie lepiej tolerowane; tylko u kilku procent chorych obserwowano bóle lub zawroty głowy, zaczerwienie skóry, zaparcia, obrzęki kończyn, podciśnienie lub blok przedsionkowo-komorowy I lub II stopnia. Werapamil zwiększa stężenie digoksyny w osoczu, lecz jak dotąd bardzo rzadko obserwowano nasiloną toksyczność tego glikozydu nasercowego stosowanego równocześnie z werapamilem [50].

Diltiazem. Wywiera bardzo podobne lecz słabiej wyrażone działania uboczne podobne do wywołanych przez werapamil, głównie blok przedsionkowo-komorowy [21, 22].

ZASTOSOWANIE LECZNICZE

Choroba niedokrwienna serca. Leki blokujące kanały wapniowe zmniejszają wyraźnie objawy różnych postaci choroby niedokrwiennej serca. Wszystkie trzy leki stosowano z dobrym efektem w odmianie Prinzmetalla choroby wieńcowej u ok. 70% chorych [51, 52, 53], oraz w powysiłkowej chorobie wieńcowej [54, 55, 56], z wyjątkiem chorych z bardzo znacznym zwężeniem tętnic wieńcowych. Jak wspomniano wyżej, nifedypina może wywołać zaostrzenie objawów choroby niedokrwiennej serca. Zdarza się to u ok. 10% chorych. Wówczas wskazane jest jej równoczesne stosowanie z lekami beta-adrenolitycznymi, które wygaszają odruchy układu adrenergicznego wywołane przez nifedypinę [57]. Leki blokujące działają również leczniczo w tzw. niestabilizowanej dusznicy bolesnej (stan przedzawałowy, „*angina crescendo*”) [58, 59].

Niemiarowość serca. Werapamil jest głównym lekiem blokującym kanały wapniowe stosowanym w leczeniu niemiaryowości nadkomorowych, m.in. częstokurczu napadowego komorowego, migotania lub trzepotania przedsionków, natomiast nie ma znaczenia w leczeniu niemiary-

wości pochodzenia komorowego. Wpływa on na receptory alfa-adrenergiczne. Ten jego efekt również ma znaczenie w mechanizmie antyarytmicznego działania werapamilu [8, 10].

Choroba nadciśnieniowa. Wszystkie opisane leki są stosowane w leczeniu nadciśnienia. Spośród nich nifedypina wywiera najsilniejsze działanie naczyniowo-rozszerzające i dzięki temu najczęściej wywołuje niepożądaną odruchową sympatykotonie, rzadziej występującą po werapamilu i diltiazemie, które zapobiegają jej działając bezpośrednio na serce.

Inne zastosowanie leków blokujących kanały wapniowe. Udowodniono działanie werapamilu, nifedypiny i nimodypiny zapobiegające napadom migreny. Niemniej konieczne są dalsze badania, które ustalą ich miejsce w terapii w porównaniu z dotąd stosowanymi lekami, stosowanymi zapobiegawczo przeciwko występowaniu migreny [60].

Opisano dobrze efekty lecznicze nifedypiny i diltiazemu w leczeniu objawu Raynauda, polegającego na odwracalnym skurczu naczyń kończyn [61].

Niedawno Fleckenstein [62] opisał wyraźne hamowanie wapnienia tętnic wywołane doświadczalnie u szczurów po stosowaniu werapamilu, diltiazemu, nifedypiny, nizoldypiny, nitrendypiny lub nimodypiny. Opisanie dane skłaniają do przeprowadzenia badań u ludzi mające na celu stwierdzenie, czy wymienione leki blokujące kanały wapniowe mogą być potencjalnymi środkami opóźniającymi występowanie u człowieka zwapnienia blaszek miażdżycowych.

PREPARATY I DAWKOWANIE

Werapamil (Isoptin, Cordilox). Doustnie przeciętnie 40-160 mg co 8 godz., dożylnie 5 mg w powolnej iniekcji trwającej 2-3 min.

Nifedypina (Adalat, Cordipin, Corinfar, Cordafen). Doustnie 10 mg co 8 godz. lub 20 mg preparatu o przedłużonym działaniu co 12 godz., lub podjęzykowo 10 mg co 8 godz. Przeciętnie na dobę do 80-120 mg.

Diltiazem (Dilzem, Tildiem, Herbesser). Doustnie przeciętnie 180-270 mg na dobę w 3 dawkach podzielonych.

PERSPEKTYWY NA PRZYSZŁOŚĆ

W najbliższych latach można oczekiwać pełniejszej charakterystyki kanałów wapniowych, wyizolowania i oczyszczenia receptorów leków blokujących te kanały, a więc uzyskania odpowiedzi na pytanie czy te receptory są kanałami wapniowymi, czy też nie. W dalszej kolejności można przewidywać poznanie szczegółów budowy tych kanałów w poszczególnych tkankach i stwierdzenie czy różnice w ich funkcjach fizjo-

logicznych i odpowiedziach na działanie leków zależą od różnicy budowy kanałów wapniowych, czy też od różnic w środowisku pozakomórkowym. Poznanie odpowiedzi na te pytania może pozwolić na racjonalne programowanie syntez chemicznych nowych leków blokujących kanały wapniowe o lepszych, a być może także innych właściwościach terapeutycznych. Przypuszczalne środki pobudzające kanały wapniowe, dotąd używane jako narzędzia doświadczalne, staną się nową grupą leków. Dotychczas zsyntetyzowane środki wykazują działanie zwiększające siłę skurczu serca, lub działają przeciwartmicznie, przedłużając czas trwania potencjału czynnościowego serca, a jeszcze inne potęgują uwalnianie 5-hydroksytryptaminy z neuronów mózgowia [63].

LITERATURA

1. Haas H., Hartfelder G. *α -Isopropyl- α [N-methyl-N-homoveratryl- α -amino-propyl] dimethoxyphenylacetone nitril, eine Ausstanz mit coronargefassen Eigenschaften.* *Arzneim.-Forsch.* 12: 549-558, 1962.
2. Fleckenstein J. A., Kammermeier H., Döring H., Freund H. J. — *Zum Wirkungsmechanismus neuartiger Koronardilatoren mit gleichzeitiger Sauerstoff-einsparenden, myokard-Effekten, Prenylamin und Iproveratril.* *Z. Kreislaufforsch.* 56: 716-744, 839-853, 1967.
3. Rougier O., Vossort G., Garnier D., Gargouil Y. M., Coraboeuf E. — *Existence and role of a slow inward current during the frog atrial action potential.* *Pflügers Arch.* 308: 91-110, 1969.
4. Coraboeuf E. — *Ionic basis of electrical activity in cardiac tissues.* *Amer. J. Physiol.* 234: H101-H116, 1978.
5. Kohlhardt M., Bauer B., Krause H., Fleckenstein A. — *Differentiation of the transmembrane Na and Ca channels in mammalian cardiac fibres by the use of specific inhibitors.* *Pflügers Arch.* 335: 309-322, 1972.
6. Somlyo A. V., Somlyo A. P. — *Electromechanical and pharmacomechanical coupling in vascular smooth muscle.* *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 159: 129-145, 1968.
7. Bolton T. B. — *Mechanisms of action of transmitters and other substances on smooth muscle.* *Physiol. Rev.* 59: 606-718, 1979.
8. Henry P. D. — *Mechanisms of action of calcium antagonists in cardiac and smooth muscle.* W: *Calcium channel blocking agents in the treatment of cardiovascular disorders.* (red. Stone P. H., Antman E. M.). Futura Publishing Co., Mount Kisco, N. Y., s. 107-154, 1983.
9. Kohlhardt M., Fleckenstein A. — *Inhibition of the slow inward current by nifedipine in mammalian ventricular myocardium.* *Naunyn-Schmiedeberg Arch. Pharmacol.* 298: 267-272, 1977.
10. Ehara T., Kaufmann R. — *The voltage- and time-dependent effects of (-)-verapamil on the slow inward current in isolated cat ventricular myocardium.* *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 207: 49-55, 1978.
11. Robinson B. F., Dobbs R. J., Kelsey C. R. — *Effects of nifedipine on resistance vessels, arteries and veins in man.* *Br. J. Clin. Pharmacol.* 10: 433-438, 1980.

12. Ono H., Hashimoto K. — *In vivo* tissue effects of calcium flux inhibition. W: *Calcium channel blocking agents in the treatment of cardiovascular disorders*. (red. Stone P. H., Antman E. M.). Futura Publishing Co., Mount Kisco, N.Y., s. 115-175, 1983.
13. Theroux P., Waters D. D., De Baisieux J. C., Szlachin J., Mizgala H. F., Bourassa M. G. — *Hemodynamic effects of calcium ion antagonists after acute myocardial infarction*. Clin. Invest. Med. 3: 81-85, 1980.
14. Ludbrook P. A., Tiefenbrunn A. J., Reed F. A., Sobel B. E. — *Acute hemodynamic responses to sublingual nifedipine: dependence on left ventricular function*. Circulation 65: 489-498, 1982.
15. Scriabine A., Battye R., Hoffmeister F., Kazda S., Towart R., Garthoff B., Schlüter G., Ramsch K.-D., Scherling D. — *Nimodipine*. New Drugs Annual: Cardiovascular Drugs 3: 197-218, 1985.
16. Betz E., Deck K., Hoffmeister F. (red.) — *Nimodipine — pharmacological and clinical properties*. Schattauer Verlag, Stuttgart, s. 1-501, 1985.
17. Scriabine A., Garthoff B., Kazda S., Ramsch K.-D., Schlüter G., Stoepl K. — *Nitrendipine*. New Drugs Annual: Cardiovascular Drugs 2: 37-49, 1984.
18. Scheidt S., Lewinter M. M., Hermanovich J., Venkataraman K., Freedman D. — *Nicardipine for stable angina pectoris*. Br. J. Clin. Pharmacol. 20: 178S-186S, 1985.
19. Singh B. N., Roche A. H. G. — *Effects of intravenous verapamil on hemodynamics in patients with heart disease*. Amer. Heart J. 94: 593-599, 1977.
20. Chew C. Y. C., Hecht H. S., Collett J. T., Mc Allister R. G., Singh B. N. — *Influence of severity of ventricular dysfunction on hemodynamic responses to intravenously administered verapamil in ischemic heart disease*. Amer. J. Cardiol. 47: 917-922, 1981.
21. Flaim S. F. — *Diltiazem*. New Drugs Annual: Cardiovascular Drugs 2: 123-156, 1984.
22. Just H., Schroeder J. S. (red.) — *Advances in clinical applications of calcium antagonist drugs. International diltiazem workshop*. Excerpta Medica, Amsterdam, s. 1-165, 1985.
23. Hondeghem L. M., Katzung B. G. — *Antiarrhythmic agents: The modulated receptor mechanisms of action of sodium and calcium channel-blocking drugs*. Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. 24: 387-423, 1984.
24. McDonald T. F., Pelzer D., Trautwein W. — *On the mechanism of slow calcium channel block in heart*. Pflügers Arch. Physiol. 385: 175-179, 1980.
25. Pang D. C., Sperelakis N. — *Nifedipine, diltiazem, bepridil and verapamil uptakes into cardiac and smooth muscles*. Eur. J. Pharmacol. 87: 199-207, 1983.
26. Hescheler J., Pelzer D., Trube G., Trautwein W. — *Does the organic calcium channel blocker D 600 act from inside or outside on the cardiac cell membrane?* Pflügers Arch. Physiol. 393: 287-291, 1982.
27. Kunze D. L., Hawkes M. J., Hamilton S. L., Brown A. M. — *Binding and pharmacological studies of nitrendipine on PC 12 cells*. Biophys. J. 47: 264a, 1985.
28. Shrikhande A. V., Sarmiento J. G., Janis R. A., Rutledge E., Trigg D. J. — *Characteristics of binding of Bay K 8644 to high and low affinity sites on cardiac membranes*. Biophys. J. 47: 265a, 1985.

29. Janis R. A., Triggle D. J. — *New developments in Ca^{2+} channel antagonists*. J. Med. Chem. 26: 775-785, 1983.
30. Towart R., Schramm M. — *Recent advances in the pharmacology of the calcium channel*. Trends Pharmacol. Sci. 5: 111-113, 1984.
31. Spedding M. — *Calcium antagonist subgroups*. Trends Pharmacol. Sci. 6: 109-114, 1985.
32. Murphy K. M. M., Gould R. J., Largent B. L., Snyder S. H. — *A unitary mechanism of calcium antagonist drug action*. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 80: 860-864, 1983.
33. Ehlert F. J., Roeske W. R., Itoga E., Yamamura H. I. — *The binding of ^3H -nitrendipine to receptors for calcium channel antagonists in the heart, cerebral cortex and ileum of rats*. Life Sci. 30: 2191-2202, 1982.
34. Gould R. J., Murphy K. M. M., Snyder S. H. — *^3H -nitrendipine-labeled calcium channels discriminate inorganic calcium agonists and antagonists*. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 79: 3656-3660, 1982.
35. Hurwitz L. — *Pharmacology of calcium channels and smooth muscle*. Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. 26: 225-258, 1986.
36. Lee K. S., Tsien R. W. — *Mechanism of calcium channel blockade by verapamil, D 600, diltiazem and nitrendipine in single dialysed heart cells*. Nature 302: 790-794, 1983.
37. Kass R. S., Wiegers S. E. — *Ionic basis of concentration-related effects of noradrenaline on the action potential of cardiac Purkinje fibers*. J. Physiol. 322: 541-558.
38. Rinaldi M. L., Capong J. P., Demaille J. G. — *The cyclic AMP-dependent modulation of cardiac sarcolemmal slow calcium channels*. J. Molec. Cell. Cardiol. 14: 279-289, 1982.
39. Trautwein W., Taniguchi J., Noma A. — *The effect of intracellular cyclic nucleotides and calcium on the action potential and acetylcholine response of isolated cardiac cells*. Pflügers Arch. Physiol. 392: 307-314, 1982.
40. Ousterhout J. M., Sperelakis N. — *Role of cyclic nucleotides in regulation of slow channel function in vascular smooth muscle*. Biophys. J. 47: 266a, 1985.
41. Andersson K.-E. — *Pharmacodynamic profiles of different calcium channel blockers*. Acta Pharmacol. Toxicol. 58: suppl. II, 31-42, 1986.
42. Danek A., Wójcik M. — *Antagoniści wapnia. Cz. II. Nifedypina*. Farm. Pol. 39: 521-525, 1983.
43. Foster T. S., Hamann S. R., Richards V. R., Bryant P. J., Graves D. A., McAllister R. G. Jr. — *Nifedipine kinetics and bioavailability after single intravenous and oral doses in normal subjects*. J. Clin. Pharmacol. 23: 161-170, 1983.
44. Danek A., Wójcik M. — *Antagoniści wapnia. Cz. I. Werapamil*. Farm. Pol. 39: 391-398, 1983.
45. Hamann S. R., Blouin R. A., McAllister R. G. Jr. — *Clinical pharmacokinetics of verapamil*. Clin. Pharmacokinet. 9: 26-41, 1984.
46. Danek A., Wójcik M. — *Antagoniści wapnia. Cz. III. Diltiazem*. Farm. Pol. 39: 709-712, 1983.
47. Hermann P., Roger S. D., Remones G., Thenot J. P., London D. R., Morselli P. L. — *Pharmacokinetics of diltiazem after intravenous and oral administration*. Eur. J. Clin. Pharmacol. 24: 349-352, 1983.

48. Smith M. S., Verghese C. P., Shand D. G., Pritchett E. L. C. — *Pharmacokinetics and pharmacodynamic effects of diltiazem*. Amer. J. Cardiol. 51: 1369-1374, 1983.
49. Swanson T. H., Green C. L. — *Nifedipine: more than a calcium channel blocker*. Gen. Pharmacol. 17: 255-260, 1986.
50. Schwartz J. B., Keefe D., Kates R. E., Kirsten E. B., Harrison D. C. — *Acute and chronic pharmacodynamic interaction of verapamil and digoxin in atrial fibrillation*. Circulation 65: 1163-1170, 1982.
51. Antman E. — *Nifedipine therapy for coronary-artery spasm: experience in 127 patients*. N. Engl. J. Med. 302: 1269-1273, 1980.
52. Severi S., Davies G., Maseri A., Marzullo P., L'Abbate A. — *Long term prognosis of "variant" angina with medical treatment*. Amer. J. Cardiol. 46: 223-232, 1980.
53. Yasue H., Omote S., Takizawa A., Nagao M., Miwa K., Tanaka S. — *Circadian variation of exercise capacity in patients with Prinzmetal's variant angina: role of exercise-induced coronary arterial spasm*. Circulation 59: 938-943, 1979.
54. Moskowitz R. M., Piccini P. A., Nacarelli G., Zelis R. — *Nifedipine therapy for stable angina pectoris: preliminary results of effects on angina frequency and treadmill exercise response*. Amer. J. Cardiol. 44: 811-816, 1979.
55. Neumann M., Luisada A. A. — *Double blind evaluation of orally administered iproveratril in patients with angina pectoris*. Amer. J. Med. Sci. 251: 552-556, 1966.
56. Wagniar P., Ferguson R. J., Chaitmann B. R., Achard F., Benacerraf A., Delanguenhagen B., Morin B., Pasternac A., Bourassa M. G. — *Increased exercise tolerance and reduced electrocardiographic ischemia with diltiazem in patients with stable angina pectoris*. Circulation 66: 23-28, 1982.
57. Bassan M., Weiler-Raveil D., Sholev O. — *The additive anti-anginal action of oral nifedipine in patients receiving propranolol*. Circulation 66: 710-716, 1982.
58. Hugenholtz P. G., Michels H. R., Serruys P. W., Brower R. W. — *Nifedipine in the treatment of unstable angina, coronary spasm and myocardial ischemia*. Amer. J. Cardiol. 47: 163-173, 1981.
59. Nakamura M., Koiwaya Y. — *Beneficial effect of diltiazem, a new antianginal drug, on angina pectoris at rest*. Japan Heart J. 20: 613-621, 1979.
60. Andersson K.-E., Brandt L., Hindfelt B., Ryman T. — *Migraine treatment with calcium channel blockers*. Acta Pharmacol. Toxicol. 58: suppl. III, 161-167, 1986.
61. Nilsson H. — *Pharmacological treatment of Raynaud's phenomenon with special reference to calcium-entry blockers*. Acta Pharmacol. Toxicol. 58: suppl. II, 137-149, 1986.
62. Fleckenstein A. — *Calcium antagonism in heart and vascular smooth muscle*. Medicinal Res. Rev. 5: 395-425, 1985.
63. Schramm M., Towart R. — *Modulation of calcium channel function by drugs*. Life Sci. 37: 1843-1860, 1985.

ELŻBIETA WYROBA

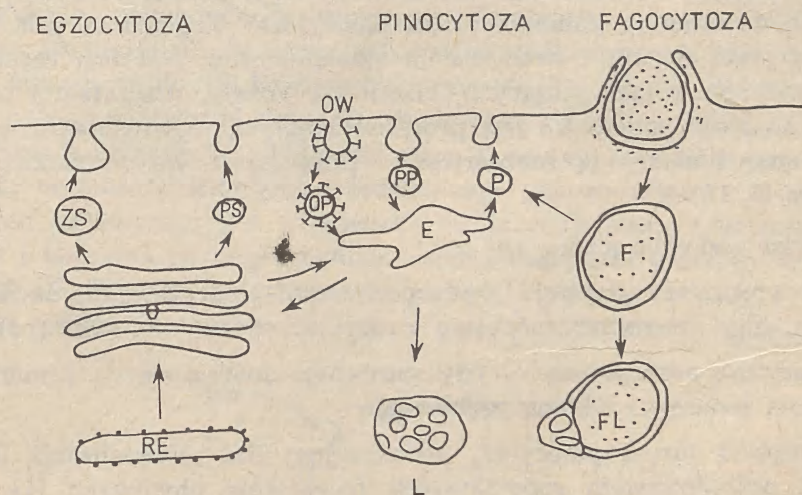
Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego
PAN, Warszawa

ENDOCYTOZA I EGZOCYTOZA

ENDOCYTOZA

Endocytoza jest terminem ogólnie używanym do określenia procesu pobierania (internalizowania) zewnątrzkomórkowego płynu lub cząstek przez inwaginację i odrywanie się błony plazmatycznej. Tą drogą dostają się do komórek substancje pokarmowe, hormony, czynniki wzrostowe, przeciwciała, enzymy, lipoproteiny, substancje patogenne [2, 29].

Endocytoza jest procesem, w którym pobierane są ogromne ilości materiału zarówno płynnego, jak i błonowego: fibroblasty internalizują równowartość 50% swej powierzchni oraz 5—10% swej objętości w cią-



Rys. 1. Schemat ilustrujący proces egzo- i endocytozy. RE — retikulum endoplazmatyczne, ZS — ziarnistości sekrecyjne, PS — pęcherzyki sekrecyjne, OW — opłaszczone wgłębienia błony, OP — opłaszczone pęcherzyki, E — endosomy, L — lizosomy, PP — pęcherzyki pinocytotyczne, F — fagosom, FL — fagolizosomy, P — pęcherzyk transportujący receptory (a czasem kompleksy receptor-ligand) cyklicznie powracające na powierzchnię błony plazmatycznej. Szlak egzocytyczny rozgałęzia się w obrębie aparatu Golgiego na sekrecję regulowaną (ZS) i spontaniczną (PS) — szczegółowo zilustrowaną na rysunku 4. Modyfikacja schematu wg Mellman i wsp. [18]

gu godziny, a makrofagi aż do 200% swej powierzchni [29]. Nie powoduje to jednak ani zmniejszenia wielkości komórek, ani zatrzymania procesu z powodu wyczerpania się składników, gdyż istnieje stały przepływ błon z powierzchni komórki do jej wnętrza i z powrotem. Podczas gdy internalizowane płyny i ligandy dostarczane są do lizosomów, „opakowujące” je błony cyklicznie powracają na powierzchnię i mogą być wielokrotnie użyte [2, 14, 29].

Schematyczny zarys koncepcji endocytozy jako przepływu błon w systemie wakuolarnym i jej powiązań z egzocytozą pokazano na rysunku 1. Wspólną cechą wszystkich szlaków endocytotycznych, a więc fagocytozy (F), pinocytozy zachodzącej poprzez pęcherzyki pinocytotyczne (PP) czy też pęcherzyki opłaszczone (OP) jest fakt, że endocytowana błona powraca na powierzchnię komórki (P) bardzo szybko z tzw. kompartmentu prelizosomalnego, czyli zanim jeszcze materiał internalizowany trafi do lizosomów.

KLASYFIKACJA ENDOCYTOZY

Internalizację dużych cząstek ($> 0,5 \mu\text{M}$) nazywa się fagocytozą. Płyny i zawarte w nich małe cząstki oraz rozpuszczone substancje dostają się do wnętrza komórki dzięki pinocytozie. Fagocytoza jest aktywowana przez cząstki i wrażliwa na cytochalazynę. Jest ona cechą typowych komórek fagocytujących, takich jak ameby, makrofagi i leukocyty. Natomiast pinocytoza jest procesem ciągłym, niewrażliwym na cytochalazynę i można ją zaobserwować praktycznie we wszystkich komórkach [2, 18].

Pinocytozę podzielić można na:

- a. Pinocytozę fazy płynnej — gdy pęcherzyki pinocytotyczne zawierają tylko płyn zewnątrzkomórkowy i rozpuszczone w nim substancje.
- b. Pinocytozę adsorpcyjną — gdy substancje dostają się do komórki w postaci związanej z błoną pęcherzyka.

Szczególną formą pinocytozy adsorpcyjnej jest internalizacja ligandów za pośrednictwem specyficznych receptorów błonowych [11, 21]. Najczęściej określa się ją jako endocytozę pośredniczoną przez receptory (receptor-mediated endocytosis). Niektórzy badacze dokonują innego podziału endocytozy, wyróżniając 3 jej rodzaje: fagocytozę, pinocytozę i endocytozę zachodzącą za pośrednictwem receptorów [6].

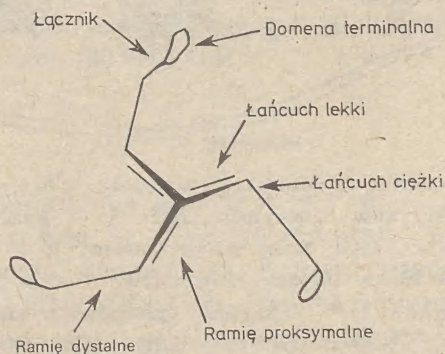
Dalsza część tego szkicu poświęcona będzie temu ostatniemu rodzajowi endocytozy ze względu na rolę, jaką odgrywa w komórce oraz na znaczenie poznawcze i praktyczne, zarówno w biologii, jak i w medycynie.

ENDOCYTOZA ZACHODZĄCA ZA POŚREDNICTWEM RECEPTORÓW

Endocytoza pośredniczona przez receptory jest drogą specyficznego wiązania i internalizowania makrocząsteczek z płynu zewnątrzkomórkowego. Cząsteczki dostające się tą drogą są rozpoznawane przez wyspecjalizowane receptory błonowe syntetyzowane przez komórkę. Wszystkie, do tej pory zbadane receptory, są integralnymi glikoproteinami błonowymi. Ten szlak endocytotyczny dostarcza komórkom cholesterolu (dzięki receptorom lipoprotein), żelaza poprzez receptor transferyny, hormonów peptydowych (insulina, gonadotropina kosmówkowa, czynników wzrostowych oraz immunoglobulin. Ze względu na duże rozpowszechnienie jest on również wykorzystywany przez wirusy i toksyny, choć ich receptory nie są jeszcze zidentyfikowane [21, 29].

OPŁASZCZONE PECHERZYKI — ROLA KLATRYNY W ENDOCYTOZIE

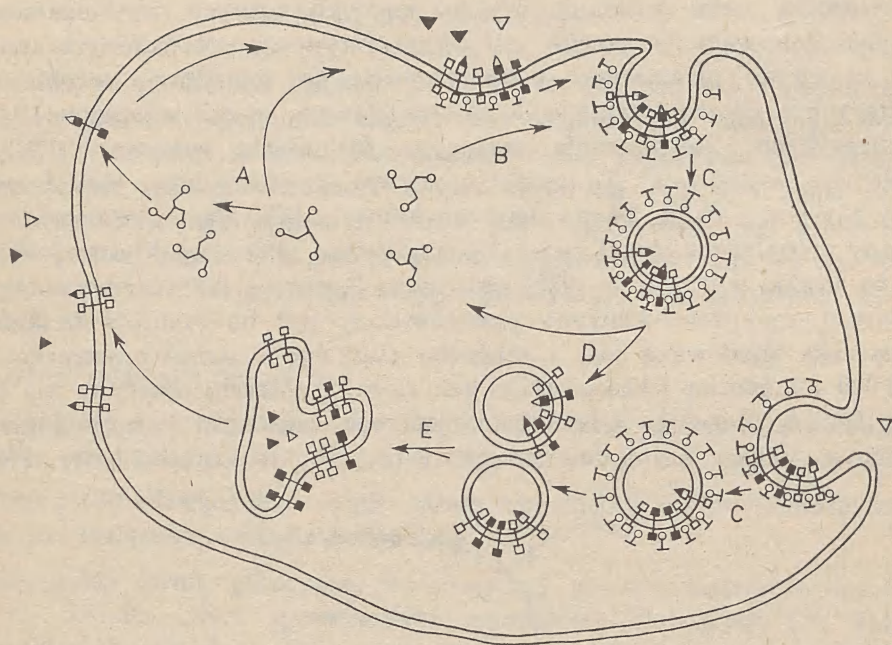
Wspólną cechą wszelkich szlaków endocytotycznych przebiegających za pośrednictwem receptorów jest wykorzystywanie opłaszczonych struktur na błonie plazmatycznej do gromadzenia ligandów i receptorów, z których w postaci kompleksów internalizowane są one w opłaszczonych pęcherzykach. Powierzchnia typowego fibroblastu zawiera 1000-2000 wgłębień „coated pits”. Te wyspecjalizowane struktury mają 1400 Å średnicy i zajmują około 2% powierzchni komórki [21]. Są one oplecione od strony cytoplazmatycznej siateczką zbudowaną głównie z klatryny. Białko to zostało wykryte w 1975 roku przez Pearse [22]. Schemat molekularnej organizacji klatryny przedstawiony jest na rysunku 2. Każda cząsteczka zbudowana jest z łańcucha ciężkiego o masie cząsteczkowej 180 000 i łańcucha lekkiego. Łańcuch ciężki cząsteczki klatryny ma ponad 500 Å długości. N-terminalny odcinek cząsteczki tworzy domenę końcową. Region łącznikowy (wrażliwy na proteazy i gietki) łączy tę do-



Rys. 2. Trimer (przekrój) klatryny

menę z ramieniem dystalnym. Łańcuch lekki znajduje się w proksymalnym ramieniu cząsteczki klatryny. Znane są dwa rodzaje łańcuchów lekkich LCa i LCb. Występują one w stosunku molarnym 1 : 2, lecz są rozmieszczone przypadkowo. Ich wielkość jest zmienna zależnie od tkanki, lecz we wszystkich analizowanych przypadkach łańcuch LCa (36 000) jest nieco większy niż LCb (33 000).

Cząsteczki klatryny asocjują ze sobą tworząc stabilne polimery — trimery (triskeliony). Są one podstawowymi podjednostkami struktur zwanymi „klateczkami” tworzących koszyczek oplatający błonę otaczającą internalizowany materiał [22]. Wydaje się, że łańcuchy lekkie nie są zaangażowane w kontakty między trimerami; gdy ich brak trimery układają się prawidłowo w „klateczki” [16]. Proces tworzenia się opłaszczonych wgłębień i pęcherzyków w trakcie endocytozy zachodzącej za pośrednictwem receptorów zilustrowany jest na rysunku 3.



Rys. 3. Schemat molekularnych interakcji w czasie tworzenia opłaszczonych klatryną wgłębień i pęcherzyków endocytotycznych. A — Asocjacja trimerów klatryny z wewnętrzną powierzchnią błony plazmatycznej. B — Tworzenie się opłaszczonego wgłębienia na błonie plazmatycznej (tzw. coated pit). C — Powstawanie opłaszczonych pęcherzyków. D — Usuwanie opłaszczenia klatrynowego z pęcherzyków. E — Fuzja pęcherzyków i utworzenie endosomów, w których następuje proces rozdzielania receptorów od ligandów [wg 13]. □, ■ — receptory, △, ▲ — ligandy

Trimery klatryny asocjują z wewnętrzną powierzchnią błony plazmatycznej oraz z kompleksem białek, tzw. pomocniczych (o masie cząsteczkowej 100 000 i 50 000). Białka te znaleziono w wyizolowanych opłaszczonych pęcherzykach. Uczestniczą one także w procesie ponownego opłaszczenia „gołych” pęcherzyków *in vitro* oraz w tworzeniu klateczek z oczyszczonej klatryny jako czynniki indukujące ten proces. Nieodłączną konsekwencją sposobu łączenia się trimerów klatrynowych jest powstawanie zakrzywienia umożliwiającego utworzenie klateczki [13].

Pojawienie się opłaszczonego zagłębienia (rys. 3B) związane jest z inwaginacją błony. Uważano że powstaje ona w wyniku asocjacji integralnych białek błonowych z rosnącą siateczką klatrynową. Prawdopodobnie komponenty błony oddziałują z końcową domeną klatryny (która skierowana jest ku błonie na giętkim łączniku) oraz z białkami pomocniczymi [13]. Ostatnio stwierdzono, że klatryna ma specyficzne własności warunkujące jej funkcję. Badania spektroskopowe wykazały, że zaburza ona konformację dwuwarstwy lipidowej zarówno w układzie modelowym, jak i w systemach pochodzących z wyizolowanych opłaszczonych pęcherzyków. Sieć klatrynowa może wywołać wystarczające nieuporządkowanie łańcuchów acylowych w regionie błony leżącym pod nią, żeby nastąpiła inwaginacja i wytworzenie opłaszczonego pęcherzyka [27]. Uważa się, że gromadzenie (clustering) receptorów w opłaszczonych zagłębieniach błony wymaga interakcji ich cytoplazmatycznych domen z komponentami opłaszczenia. Kompleks białek pomocniczych lub inne białka mogą pośredniczyć w tym procesie wysortowywania receptorów [17]. Klatryna działa więc jak sito molekularne — tylko specyficzne białka znajdują się w opłaszczonych pęcherzykach i ulegną internalizacji [23]. Gdy siateczka oplatająca wgłębienie błony jest ukończona, powstaje opłaszczony pęcherzyk (rys. 3C) wędrujący w głąb cytoplazmy. Usunięcie opłaszczenia pęcherzyka następuje w ciągu kilku minut prawdopodobnie przy udziale specjalnych ATP-az, które nadają jednokierunkowość całemu temu cyklowi. W procesie uczestniczą prawdopodobnie łańcuchy lekkie klatryny, które ponadto stymulują kinazę fosforylującą jedno z białek pomocniczych (50 000) [13].

ENDOSOMY

Pozbawione opłaszczenia pęcherzyki zlewają się ze sobą i/lub innymi błonami wewnętrznymi, by stworzyć struktury zwane pierwotnymi endosomami. Endosomy stanowią heterogenną populację wakuoli o średnicy wahającej się od 0.3 do 1 μm [14]. W literaturze znaleźć można jeszcze inne terminy określające te organelle lub też ich subpopulacje: receptosomy, pęcherzyki endocytotyczne, CURL (compartments of uncoupling receptor and ligand). Często składają się one z kompleksu elemen-

tów wakuolarnych i tubularnych lub też przybierają postać struktury wielopęcherzykowej [37]. Liczba i wielkość endosomów jest zmienna zależnie od typu komórki oraz jej stanu funkcjonalnego i np. w makrofagach otrzewnowych stwierdzono obecność 240 endosomów, których sumaryczna powierzchnia stanowiła około 15% powierzchni błony plazmatycznej [14]. Najbardziej charakterystyczną cechą endosomów jest ich niskie pH, dzięki czemu spełniać mogą swoją główną funkcję, jaką jest rozdzielanie endocytowanego materiału, a przede wszystkim receptorów od ligandów [14].

W różnych elementach kompartmentu endosomalnego pH nie jest jednakowe. Ligandy napotykają obniżające się pH w miarę upływu czasu przebywania w tej strefie. Początkowo pH endosomów wynosi 5,5-6,0. W ciągu następnych 30 minut spada do około 5,0 i ostatecznie osiąga minimum, w lizosomach wynoszące 4,5—5,0. Biorąc pod uwagę kinetykę cyklicznego obiegu receptorów (10—15 minut dla fazy wewnątrzkomórkowej) większość receptorów wrażliwych na niskie pH nie pozostaje w kompartmentcie endosomalnym wystarczająco długo, by zetknąć się z niższymi wartościami pH, co zgodne jest z obserwacją, że większość ligandów tego typu dysocjuje już przy pH 6,0. Badania morfologiczne wykazały, że endosomy o średnio kwaśnej zawartości zlokalizowane są na obwodzie cytoplazmy, natomiast endosomy wykazujące bardzo niskie pH zaobserwować można w strefie okołojądrowej. Endosomy obwodowe, do których dostaje się najpierw internalizowany materiał, wydają się więc odgrywać rolę w jego ukierunkowaniu [18].

CYKLICZNY OBIEG RECEPTORÓW

Receptory stale krążą między błoną plazmatyczną i endosomami: cyklicznie pojawiają się na kilka minut na powierzchni komórki, a następnie są internalizowane (ta faza ich przebywania wewnątrz komórki trwa około 15 minut) i ponownie powracają na błonę [29]. Ten cykliczny obieg receptorów (ang. recycling) ma ogromne znaczenie dla komórki. Jedna cząsteczka receptora może ułatwić internalizację wielu cząsteczek ligandów. W przypadku receptora LDL (low density lipoproteins — lipoprotein o niskiej gęstości) obliczono, że użyty on jest około 150 razy w ciągu 30 godzinnego istnienia [11]. Ciekawe, że proces ten zachodzi również w nieobecności ligandów, co stwierdzono np. dla receptorów LDL i transferyny [18, 29]. Niektóre receptory zlokalizowane są wybiórczo w opłaszczonych wgłębieniach błony, a inne szybko migrują w te regiony tylko po związaniu ligandów [18, 21]. W endosomach zarówno wolne receptory, jak i kompleksy receptor-ligand napotykają środowisko o znacznie niższym pH niż to, którym były poprzednio otoczone. W zależności od wrażliwości na pH 5,0-6,5 rozróżnia się 3 ich kategorie [18].

1. Receptory modyfikowane przez niskie wartości pH. Niskie pH w endosomie powoduje dysocjację kompleksu receptor-ligand. Uwolniony receptor może powrócić na błonę, wiązać następne cząsteczki i ponownie dostać się do wnętrza komórki. Oddysocjowane ligandy stają się częścią objętości endosomu i zwykle dostarczane są do lizosomów. Tak więc niskie pH w endosomie reguluje proces rozdzielania ligandów od receptorów.

Do tej grupy należą następujące receptory: EGF (nabłonkowy czynnik wzrostu), LDL, asjaloglikoprotein, α_2 -mikroglobulin oraz insuliny [29, 18]. Badania wykazały, że niskie wartości pH wywołać mogą zmiany konformacyjne w dwóch z wymienionych receptorów: EGF i asjaloglikoprotein. Świadczyć to może o tym, że przede wszystkim receptory, a nie ligandy, reagują na kwaśne środowisko we wnętrzu endosomu. Następnym argumentem przemawiającym na korzyść tego stwierdzenia jest fakt blokowania cyklicznego obiegu wolnych receptorów, czyli takich, które dostały się do komórki jako nie związane z ligandami przez substancje podnoszące pH wewnątrz endosomu [18].

2. Ligand wrażliwy na niskie wartości pH. Przykładem tej kategorii reakcji na zakwaszenie wnętrza endosomu jest system transportujący żelazo. Transferyna wiąże 2 atomy żelaza i dostarcza je do komórek mających receptory. Kompleks ligand-receptor internalizowany jest w opłaszczonych wgłębieniach błony. Żelazo oddysocjowuje w endosomach od transferyny i przenoszone jest na cząsteczkę magazynującą — ferrytynę. Pozbawiona żelaza apotransferyna pozostaje związana ze swoim receptorem i w tej postaci powraca na powierzchnię komórki [6, 29].

W zetknięciu ze środowiskiem zewnątrzkomórkowym mającym obojętne pH kompleks rozdysocjowuje i zarówno apotransferyna, jak i receptor mogą ponownie uczestniczyć w transporcie żelaza [6]. Opisany mechanizm wynika z własności wymienionych białek: transferyna wykazuje duże powinowactwo wobec receptora w środowisku obojętnym, a apotransferyna w kwaśnym. Natomiast żelazo, niezwykle mocno związane z transferyną w pH obojętnym, łatwo oddysocjowuje w środowisku lekko kwaśnym. Tak więc przy niskich wartościach pH w endosomach oddysocjowują atomy żelaza, a kompleks apotransferyna-receptor pozostaje trwały [18, 6].

3. Kompleksy ligand-receptor niewrażliwe na niskie wartości pH. Najlepiej znanymi przykładami tej kategorii receptorów są receptory choriogonadotropiny i immunoglobulin. W tym przypadku kompleksy receptor-ligand są albo rozkładane w lizosomach, albo transportowane przez komórki nabłonkowe. Najczęściej takie receptory są użyte tylko raz, a następnie degradowane w lizosomach lub rozszczepiane proteolitycznie. I tak np. receptor Fc z grupy immunoglobulin G jest transblo-

nową glikoproteiną makrofagów niewrażliwą na pH [18]. Wiąże się ona z podjednostką Fc przeciwciał występujących, czy to w połączeniach rozpuszczalnych, czy też na powierzchni różnych cząstek. Zależnie od wielkości cząstek, do których przymocowane są przeciwciała, kompleksy receptor-ligand są internalizowane albo przez opłaszczone pęcherzyki, albo w fagosomach. Ligandy nie oddysocjują w kwaśnym środowisku endo- lub fagosomu i receptory nie mogą być ponownie użyte. Całe kompleksy są degradowane w lizosomach lub w fagolizosomach. Powoduje to ubytek receptorów na powierzchni makrofagów (down regulation); stwierdzono, że wynosi on aż 70% w porównaniu z 10-20% spadkiem ilości innych antygenów powierzchniowych i ta sytuacja utrzymuje się długo, bo aż 24 godziny. Przy braku ligandów receptor podlega internalizacji i ponownej cyklicznej ekspozycji na powierzchni komórki, czyli normalnemu procesowi „recycling”. Tak więc dopiero związanie ligandu skierowuje receptor na inny szlak — ku lizosomom, gdzie ulega degradacji [29]. Odmienne zachowuje się receptor immunoglobulin G transportujący je przez komórki nabłonkowe jelita u nowo narodzonych szczurów. Ten receptor ma duże powinowactwo do IgG zarówno w pH obojętnym, jak i kwaśnym, co umożliwia tworzenie kompleksów w świetle jelita i przejście przez endosomy w postaci nie zdysocjowanej od powierzchni wierzchołkowej do komórki. Stosunkowo wysokie pH płynu śródmiąższowego przy boczno-podstawowej stronie komórki powoduje dysocjację transportowanej immunoglobuliny [29].

FUNKCJE LIZOSOMÓW

Lizosomy są kompartmentem komórki o najniższym pH. Ułatwia ono działanie enzymów lizosomalnych, które wykazują optimum w zakresie 4,5-5,5. Takie niskie pH jest korzystne dla reakcji hydrolitycznych i wiele substratów ulega denaturacji w tych warunkach, stając się bardziej podatnymi na degradację enzymatyczną [18].

Do lizosomów trafiają ligandy oraz niektóre kompleksy receptor-ligand, niewrażliwe na pH panujące w endosomie (jak opisany powyżej receptor podjednostki Fc przeciwciał IgG).

ZABURZENIA W ENDOCYTOZIE WSKUTEK PODWYZSZENIA pH ORGANELLI

Kiedy zakwaszenie endosomów zostanie zahamowane przez dodanie czynników podnoszących pH w organellach, takich jak słabe aminy lub jonofory karboksylowe (monenzyna, nigerycyna), wewnątrzkomórkowa dysocjacja kompleksu receptor-ligand jest całkowicie lub częściowo zablokowana. Zapobiega to dalszemu wiązaniu liganda z receptorem i je-

go internalizacja może ulec zatrzymaniu po jednorazowym wnikięciu do komórki. Większość nie zdysocjowanych kompleksów receptor-ligand kumulowana jest w nabrzmiących wakuolach, a powierzchnia komórki pozbawiona jest większości cząsteczek receptora. Jednocześnie ulega zablokowaniu ciągly, cykliczny obieg receptorów nie związanych z ligandami. Przyczyny takiego stanu są złożone. Przede wszystkim kumulacja receptorów w wakuolach odzwierciedla proces redystrybucji błony z powierzchni do wnętrza komórki, co powoduje zmiany morfologiczne: powiększenie rozmiarów wakuoli. Konsekwencją fizjologiczną tego faktu może być np. zaburzony ruch w obrębie cytoplazmy, co utrudniałoby kontakty z innymi organellami, takimi jak lizosomy. Być może stan konformacyjny receptorów w obojętnym pH uniemożliwia wejście na któryś z możliwych szlaków, czyli cyklicznego obiegu lub skierowania do lizosomów. Wówczas endosom musiałby mieć specjalny mechanizm rozdzielania receptorów na podstawie ich konformacji, stanu agregacji, ładunku lub innych własności uzależnionych od pH [18, 30].

ROLA ATP W ENDOCYTOZIE

W badaniach nad receptorem asjaloglikoprotein w hepatocytach stwierdzono, że zmniejszony poziom ATP hamował zarówno przetwarzanie pęcherzyków endocytotycznych, jak i reutilizację receptora [33].

Proces fuzji zachodzący w trakcie endocytozy próbowano zrekonstruować w systemie pozakomórkowym. Fuzja pęcherzyków endocytotycznych wymagała ATP i zachodziła tylko wtedy, gdy pochodziły one z pewnych określonych miejsc szlaku endocytotycznego. Lizosomy i pęcherzyki pochodzące z błony plazmatycznej nie ulegały fuzji [7].

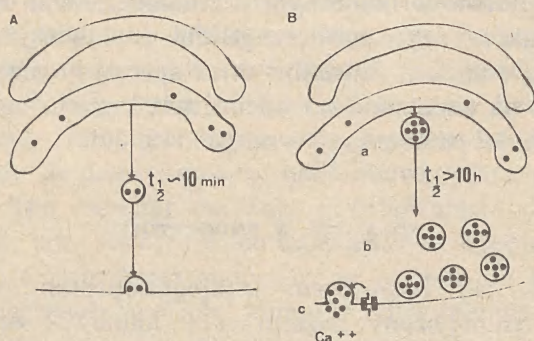
EGZOCYTOZA

Egzocytoza jest dominującym zjawiskiem w życiu większości komórek eukariotycznych zdarzającym się około 10^{12} razy w ciągu sekundy w ciele człowieka. Leży ona u podłoża wielu ważnych procesów, takich jak neurotransmisja, sekrecja hormonów i enzymów, krzepnięcie krwi i uwalnianie wielu białek surowiczych [24].

SEKRECJA SPONTANICZNA I REGULOWANA

Do niedawna uważano, że komórka wydziela wszystkie swoje białka tą samą drogą. W komórkach wydzielniczych i wątrobowych wszystkie produkty sekrecji znaleźć można we wszystkich regionach szorstkiej siateczki wewnątrzplazmatycznej i aparatu Golgiego, co wskazuje na

brak specjalizacji. U drożdży mutanty sekrecyjne mają upośledzoną eksternalizację wszystkich znanych białek sekrecyjnych. Ponadto badania immunocytochemiczne wykazały, że ten sam szlak: szorstka siateczka wewnątrzplazmatyczna — aparat Golgiego — powierzchnia komórki wykorzystywany jest przez białka błony plazmatycznej [15]. Chociaż podstawowy szlak wydzielania białek jest podobny w wielu typach komórek, od drożdży poczynając aż po ssaki, poszczególne jego etapy różnią się. Według Tartakoffa i Vassalliego [31] komórki wydzielnicze podzielić można na 2 klasy: sekrecji spontanicznej i regulowanej (rys. 4). Limfocyty wydzielające przeciwciała są przykładem komórki



Rys. 4. Dwa szlaki sekrecji białek. A — Sekrecja spontaniczna: nowo zsyntetyzowane cząsteczki nie ulegają kondensacji, ani nie są magazynowane, a pęcherzyki transportujące je z aparatu Golgiego docierają do powierzchni komórki w krótkim czasie. B — Sekrecja regulowana: a) produkty sekrecji ulegają kondensacji, a pęcherzyki zawierające je gromadzą się w cytoplazmie mając długi okres półtrwania; b) fuzja wymaga zmiany poziomu wewnątrzkomórkowego „przekaźnika”, np. wapnia [wg 15]

typu pierwszego. Nie mają one dużej wewnątrzkomórkowej puli przeciwciał. Nowo zsyntetyzowane białka osiągają powierzchnię komórki w ciągu minuty po opuszczeniu aparatu Golgiego. Ponieważ pęcherzyki transportujące je mają tak krótki okres półtrwania, trudno znaleźć je na zdjęciach mikroskopowo-elektronowych cytoplazmy komórkowej. Pęcherzyki transportujące zlewają się z błoną plazmatyczną, by uwolnić swą zawartość na drodze egzocytozy przy braku bodźca zewnętrznego. Komórki wydzielnicze wykazujące sekrecję ciągłą są bardzo rozpowszechnione: należą do nich fibroblasty, komórki wątroby i mięśni. Zmiana w szybkości sekrecji białek w tych komórkach jest dokonywana przez zmianę

szybkości syntezy białka. Regulowane komórki wydzielnicze wyspecjalizowane są w krótkotrwałym uwalnianiu dużych ilości białka ze znacznie większą szybkością niż szybkość syntezy. Osiągana jest ona przez magazynowanie nowo zsyntetyzowanego białka w pęcherzykach wydzielniczych, które mają okres półtrwania wynoszący dni (rys. 4B) i gromadzą się w cytoplazmie, co stanowi jedną z charakterystycznych cech morfologicznych tych komórek. Pęcherzyki te nie podlegają fuzji z błoną plazmatyczną, dopóki poziom przekąźnika cytoplazmatycznego, zwykle wapnia, nie ulegnie zmianie. W większości komórek sekrecyjnych typu regulowanego materiał wewnątrz dojrzałych pęcherzyków wydzielniczych jest skondensowany, co powoduje, że mają one elektronowo-gęsty „rdzeń” na zdjęciach w mikroskopie elektronowym, tym ciemniejszy i większy, im wyższe jest stężenie wydzielanego produktu. W komórkach wewnątrzwydzielniczych stężenie białka zwiększa się 200-krotnie podczas przechodzenia od ostatniej cysterny Golgiego do dojrzałych pęcherzyków wydzielniczych. W komórkach zewnątrzwydzielniczych stężenie to jest nieco mniejsze — około 9-krotne w porównaniu z poziomem w szorstkiej siateczce śródplazmatycznej.

Tak więc w komórkach, które regulują swoją sekrecję, produkt wydzielania ulega kondensacji, podczas gdy w komórkach wydzielających w sposób ciągły taki proces nie zachodzi [15].

POLARYZACJA SEKRECJI

Komórki sekrecyjne podzielić można na niespolaryzowane i spolaryzowane. Komórki niespolaryzowane nie regulują miejsca egzocytozy — zachodzi ona gdziekolwiek na błonie, jak w przypadku fibroblastów, lub

Tabela 1

Klasyfikacja komórek wydzielających białka [15]

Sekrecja spontaniczna ciągła	Sekrecja regulowana
spolaryzowana	
Komórki miąższowe wątroby	Neurony Komórki wewnątrz- i zewnątrzwydzielnicze Spermatocyty (reakcja akrosomowa)
niespolaryzowana	
Fibroblasty	Granulocyty obojętne i zasadochłonne
Chondrocyty	Komórki tuczne
Makrofagi	Płytki krwi
Limfocyty typu B	Komórka jajowa podczas zapłodnienia

też z tej strony błony, która została pobudzona, jak w granulocytach obojętnochłonnych lub komórkach tucznych. W komórkach spolaryzowanych, takich jak wątrobowe, komórki wewnątrz- i zewnątrzwydzielnicze (tab. 1), sekrecja zachodzi poprzez wyspecjalizowane domeny błony plazmatycznej. I tak komórki wątrobowe uwalniają albuminę tylko na powierzchni zatokowej. Natomiast sekrecja w komórkach zewnątrzwydzielniczych zachodzi na powierzchni wierzchołkowej z dala od błon podstawowych. Komórki wewnątrzwydzielnicze, takie jak trzustkowe wysepek Langerhansa czy rdzenia nadnerczy, wydzielają hormony na powierzchniach boczno-podstawowych.

Komórki o sekrecji regulowanej mogą wykazywać również sekrecję ciągłą.

ROLA MIKROTUBUL W PROCESIE SEKRECJI

Najlepiej poznanym przypadkiem sekrecji spolaryzowanej są komórki nerwowe. Po opuszczeniu aparatu Golgiego pęcherzyki błonowe skierowane do zakończenia nerwowego asocjują z mikrotubulami w aksonie. Powoduje to ruch z prędkością 2-5 μm na sekundę w określonym kierunku. Oddziaływania pęcherzyki-mikrotubule zostały ostatnio odtworzone *in vitro*: w obecności ATP udało się zaobserwować ruch o zbliżonej prędkości [15]. Można więc rozpatrywać 2 stadia w sekrecji spolaryzowanej: 1) selektywne połączenie pęcherzyków wydzielniczych z cytoszkieletem, by nastąpiło przemieszczenie do właściwej strefy sekrecji, a następnie 2) wbudowanie na drodze egzocytozy w określoną domene błony plazmatycznej. Tak dzieje się np. w komórkach AtT-20 (linia mysia przysadkowa) hodowanych w warunkach sprzyjających tworzeniu długich wypustek. Gromadzenie się pęcherzyków zawierających ACTH obserwowano tylko na końcach wypustek [32]. Doświadczenia z zastosowaniem czynników uszkadzających mikrotubule, np. kolchicyny, wykazały, że mikrotubule zaangażowane są w proces przemieszczania się pęcherzyków sekrecyjnych nie tylko w neuronach, lecz także w innych typach komórek. Pod wpływem czynników antymitotycznych obserwowano bowiem akumulację nowo zsyntezowanych pęcherzyków wydzielniczych w rejonie aparatu Golgiego, zarówno w spolaryzowanych komórkach regulowanych wewnątrz- i zewnątrzwydzielniczych, jak i spolaryzowanych komórkach o sekrecji spontanicznej, np. komórkach wątroby [25, 36].

SYNTEZA I PRZETWARZANIE POTRANSLACYJNE BIAŁEK SEKRECyjnych

Białka sekrecyjne syntetyzowane są na rybosomach związanych z retikulum endoplazmatycznym, a następnie wędrują z retikulum do aparatu Golgiego i ostatecznie do ziarnistości wydzielniczej [15]. Prekursory

różnych błon i organelli przebywają taki sam szlak od miejsc syntezy w siateczce wewnątrzplazmatycznej do aparatu Golgiego, gdzie podlegają rozdzieleniu. Decyzja, czy nowo zsyntetyzowane białka przechodzą do systemu siateczka wewnątrzplazmatyczna-aparat Golgiego, czy pozostają w cytoplazmie zapada podczas translacji na podstawie obecności lub braku sekwencji sygnałowej. Sekwencje sygnałowe obecnie są w białkach wydzielniczych błon plazmatycznych i lizosomalnych. Okazało się, że są one rozpoznawane przez specjalną rybonukleoproteinę, tzw. SRP (signal recognition particle). Wiąże ona nowo zsyntetyzowaną sekwencję sygnałową aminokwasów, gdy ta wystaje z rybosomu. Synteza białka zostaje wówczas zatrzymana aż do momentu, gdy kompleks rybosom-SRP nie zostanie prawidłowo „zakotwiczony” w błonie siateczki wewnątrzplazmatycznej. W ten sposób SRP rozdziela białka, spełniając podwójną funkcję: zapobiega niewłaściwej syntezie w cytoplazmie i zapewnia, że synteza białek niosących sekwencję sygnałową zachodzi tylko na rybosomach umocowanych do siateczki wewnątrzplazmatycznej [34]. Nowo zsyntetyzowane białka docierają następnie do pierwszego kompartmentu aparatu Golgiego — cysterny cis. Tutaj następuje kolejne rozgałęzienie szlaku metabolicznego zależnie od przeznaczenia poszczególnych białek. W cysternie cis następuje selektywna modyfikacja prekursorów enzymów lizosomalnych, w wyniku której pojawiają się w ich cząsteczkach terminalne grupy mannozo-6-fosforanu [26]. Stanowią one grupy markerowe enzymów lizosomalnych. Receptor mannozo-6-fosforanu znajdujący się w cysternie Golgiego wiąże nowo powstałe hydrolazy i zostają one skierowane do lizosomów (jako odsznurowujące się pęcherzyki — lizosomy pierwotne). Prawdopodobnie istnieje jeszcze inny szlak rozdzielania enzymów lizosomalnych od pozostałych białek. Te białka, które nie mają lizosomalnego markera, transportowane są poza obręb aparatu Golgiego jako białka błony plazmatycznej i sekrecyjne [15]. Według Kelly'ego (1985) transport białek sekrecyjnych w komórkach wydzielających je w sposób ciągły jest biernym przepływem bez mechanizmu rozdzielania (sorting). Komórki wydzielania regulowanego nie zawsze tracą zdolność sekrecji ciągłej, która wg tegoż autora jest jakby cechą pierwotną. Jeśli istnieją dwie drogi sekrecji, a wydzielane białka wykazują preferencję dla jednej z nich, to musi istnieć mechanizm ich rozdzielania.

WSPÓLISTNIENIE DWÓCH TYPÓW SEKRECJI W JEDNEJ KOMÓRCIE PROBLEM SORTOWANIA BIAŁEK SEKRECyjnych

W 1982 roku Gumbiner i Kelly wykazali, że w nowotworowych komórkach przysadkowych AtT-20 hormon ACTH był gromadzony w pęcherzykach wydzielniczych i uwalniany wskutek stymulacji, podczas

gdy prekursor hormonu oraz glikoproteina błonowa wydzielane były w sposób ciągły [12]. Tak więc był to dowód na współistnienie obu szlaków sekrecji białek w jednej komórce. Można było je również odróżnić farmakologicznie, gdyż chlorochinon, podnoszący pH wewnątrz organelli komórkowych, blokował dostarczanie prekursora ACTH do ziarnistości sekrecyjnych, czyli wydzielanie regulowane, nie zaburzając jego sekrecji ciągłej [15].

Współistnienie 2 sposobów sekrecji w jednym typie komórek sugeruje obecność mechanizmu, który rozdzielałby białka znajdujące się w cysternie Golgiego zależnie od szlaku, na jaki zostaną skierowane ku powierzchni komórki. Sugeruje się istnienie transportu pośredniczonego przez przenośniki rozpoznające określone domeny (sorting domain) na wydzielanym białku [3] oraz bierny przepływ, do którego niepotrzebna jest żadna informacja (zachodzi wtedy sekrecja ciągła). Aby wyjaśnić proces kondensacji wydzielanych białek, w wyniku którego powstaje gęsty „rdzeń” ziarnistości sekrecyjnej, Kelly [15] zaproponował następujący model. W świetle cysterny „trans” aparatu Golgiego białka sekrecyjne które mają być wydzielone razem, zaczynają agregować ze sobą. Receptory rozpoznają agregat i następuje proces odpączkowania od cysterny Golgiego. Nadmiar błony oraz materiał rozpuszczalny nie zaangażowany w tworzenie rdzenia ziarnistości sekrecyjnej, powraca do aparatu Golgiego. Jest to zarówno sposób na zmniejszenie stosunku powierzchni/objętość, co ułatwia kondensację zawartości, jak i na usunięcie zbędnych białek z niedojrzałej ziarnistości wydzielniczej. Zgodnie z tym modelem rozdzielanie białek sekrecyjnych za pośrednictwem przenośnika odbywa się po ich kondensacji lub równocześnie z nią. Jak dotąd nie znane są jeszcze czynniki indukujące tworzenie agregatów, choć wydaje się, że mogłyby nimi być białka wspólne dla wielu pęcherzyków sekrecyjnych. Pozostaje też kwestią otwartą identyfikacja receptora w cysternie Golgiego, który — analogicznie do receptora mannozo-6-fosforanu rozpoznającego enzymy lizosomalne — wychwytywałby białka przeznaczone do pęcherzyków wydzielniczych.

Pęcherzyki wydzielnicze w komórkach o sekrecji regulowanej ulegają fuzji z błoną plazmatyczną tylko wtedy, gdy poziom wewnątrzkomórkowego wapnia lub innego przekaźnika drugiego rodzaju ulegnie zmianie. Ta zależność nie występuje w przypadku sekrecji ciągłej. Występowanie obu typów wydzielania w jednej komórce oznacza, że jeden typ pęcherzyków wydzielniczych ulega fuzji z błoną plazmatyczną w sposób ciągły, podczas gdy inny typ pęcherzyków wydzielniczych w tej samej komórce nie zlewa się z błoną. Wydaje się, że organelle komórkowe są w ciągłym procesie odpączkowywania pęcherzyków i ich fuzji z wyjątkiem okresu podziału komórki [35]. Każda błona powinna więc mieć środki rozpo-

znawania tych błon, z którymi może podlegać fuzji. Tak więc fuzja błon to nie prosta interakcja dwu warstw lipidowych, lecz proces, w który zaangażowane są białka rozpoznające miejsce przeznaczenia.

PROCES EGZOCYTOZY W ZIARNISTOŚCI CHROMOCHŁONNEJ

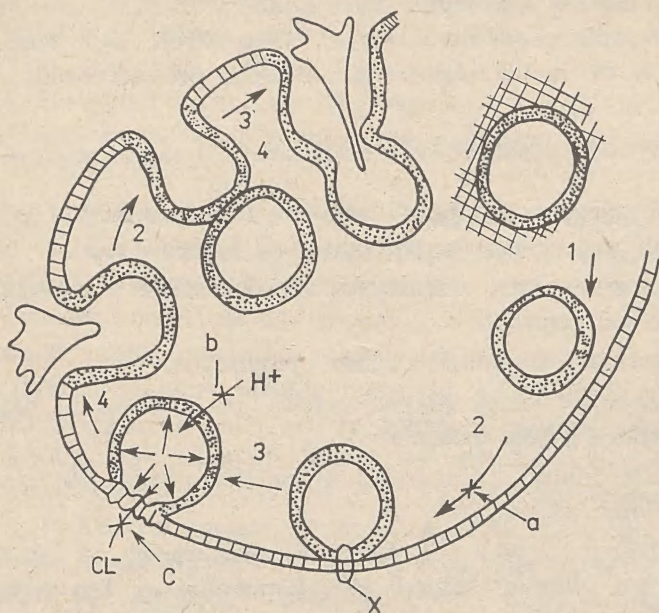
Termin egzocytoza obejmuje całą sekwencję zjawisk, które w przypadku ziarnistości sekrecyjnej przedstawić można jako:

1. Syntezę i utworzenie ziarnistości wg dokładnie przebiegającego szlaku metabolicznego.
2. Przemieszczanie ziarnistości przez cytoplazmę.
3. Umocowanie do błony plazmatycznej, gdzie zachodzi fuzja i zawartość ziarnistości jest uwalniana.
4. Odzyskanie błony ziarnistości, która kierowana jest do lizosomów lub ponownie użyta.

Rozpatrując procesy 2 i 3 należy zwrócić uwagę na ich zależność od stężenia jonów wapnia. Interesującą koncepcję na ten temat wysunęli niedawno Pollard i wsp. [24]. Badali oni komórki chromochłonne wyodrębniając następujące etapy egzocytozy: a) specyficzną interakcję aktywny z błoną ziarnistości chromochłonnej, b) specyficzną asocjację błon ziarnistości między sobą oraz z błoną plazmatyczną za pośrednictwem białka — syneksyny, c) fuzję tych błon, d) energetykę sekrecji wyrażoną przez eksperymentalne podobieństwa między własnościami chemiosmotycznymi ziarnistości i egzocytozą komórek chromochłonnych. Fascynującym aspektem tej koncepcji jest to, że zarówno asocjacja aktywny z błoną ziarnistości, jak i wszystkie etapy reakcji wywoływanych przez syneksynę zależą od stężenia jonów wapnia. Ponadto fuzja błon pośredniczona przez syneksynę zależy od gradientu osmotycznego i cis-nienasyconych kwasów tłuszczowych.

INTERAKCJE MIĘDZY AKTYNĄ I BŁONĄ ZIARNISTOŚCI

Ziarnistości chromochłonne wędrując ku powierzchni komórki (rys. 5) stykają się z wieloma elementami cytoszkieletu włącznie z filamentami aktynowymi i mikrotubulami. Pollard i wsp. [24] wykazali, że izolowane błony ziarnistości nie tylko wiążą i sieciują F-aktynę lecz, że ta interakcja regulowana jest przez stężenie wolnego wapnia uznane za aktywujące sekrecję *in vivo*. Przy stężeniach wolnego wapnia mniejszych od $0,1 \mu\text{M}$ błona ziarnistości może związać 2 (lub więcej) filamenty aktynowe dzięki obecności miejsc wiążących to białko na powierzchni cytoplazmatycznej, sieciując w ten sposób filamenty i powodując znaczny wzrost lepkości w badaniach *in vitro*. W stężeniach około $1 \mu\text{M}$ wol-



Rys. 5. Egzocytoza w komórkach chromochłonnych. 1 — Uwolnienie ziarnistości z utrzymujących ją elementów cytoszkieletu. 2 — Asocjacja ziarnistości z błoną plazmatyczną w wyniku interakcji z syneksyną — utworzenie kompleksu pentalaminarnego x. 3 — Rozerwanie błony ziarnistości. 4 — Masowa egzocytoza. Proces może być przerwany w punkcie: a — przez fenotiazyny, b — czynniki rozprężające oksydacyjną fosforylację, c — kompetycyjną inhibicję wnikania jonu chlorowego (np. przez hydroksyetylosulfonian). Schemat wg Pollarda i wsp. [24]

nego wapnia filamenty aktynowe oddysocjują z miejsc wiążących na błonie ziarnistości, co rozrywa poprzeczne połączenia. Autorzy koncepcji uważają, że dysocjacja pęcherzyków sekrecyjnych z cytoplazmatycznej sieci filamentów aktynowych (rys. 5-1) może być istotna dla ruchu w kierunku błony plazmatycznej w trakcie egzocytozy. Gdy niskie, spoczynkowe stężenie wapnia ulegnie podwyższeniu podczas aktywacji, uwolnione nagle pęcherzyki będą przemieszczać się w kierunku wyższego stężenia wapnia — najprawdopodobniej ku peryferiom komórki. Nie wykluczone też, że wapń może regulować ten proces nie bezpośrednio, lecz poprzez inne białka, np. typu żelozoliny.

ROLA SYNEKSYNY ORAZ KWAŚU ARACHIDONOWEGO W AGREGACJI I FUZJI ZIARNISTOŚCI

Tuż przed samym uwolnieniem swojej zawartości pęcherzyki wydzielnicze tworzą pentalaminarne strefy kontaktu albo z wewnętrzną stroną błony plazmatycznej (rys. 5-2x), albo z błonami pęcherzyków sek-

recyjnych, które poprzednio uległy fuzji z błoną komórkową i już pozbyły się zawartości. Ten pentalaminarny kompleks, wynikły z nałożenia się dwóch trójlaminarnych błon, nie ma molekularnego wytłumaczenia; zdarzały się opinie, że jest to artefakt wynikający z utrwalania preparatów. Jednakże obraz ten był tak powszechnie spotykany w badanych systemach wydzielniczych, że zaczęto poszukiwać czynnika, który powodowałby agregację ziarnistości. W ten sposób wykryto w 1978 roku nowe białko i nazwano je syneksyną [5]. W obecności niewielkich stężeń wapnia syneksyna powodowała agregację ziarnistości chromochłonnych w roztworze. Dalsze badania wykazały, że białko to ma ciekawą właściwość — wapń powoduje jego polimeryzację. Powstające polimery o kształcie cygar (100 Å długości i 50 Å średnicy) łączyły się ze sobą i tworzyły jeszcze większe struktury parakrystaliczne. Indukowana przez wapń samoasocjacja syneksyny jest więc wstępnym etapem agregacji granul i jednocześnie mechanizmem wzmacniającym sygnał identyfikujący specyficzne miejsca wiążące to białko, występujące na błonie plazmatycznej i błonie ziarnistości. Ponadto okazało się, że aby zaszła fuzja błon ziarnistości, połączonych przez syneksynę w agregaty, niezbędna jest obecność niewielkiej ilości cis-nienasyconych kwasów tłuszczowych. Najaktywniejszy okazał się kwas arachidonowy, wywołujący fuzję w stężeniu około 6 μM . Co ciekawe, tylko ziarnistości zagregowane przez syneksynę były podatne na działanie nienasyconych kwasów tłuszczowych — gdy dodano kwasu arachidonowego do granul agregowanych poli-L-lizyną, fuzja błon nie zachodziła [24].

WŁASNOŚCI CHEMIOOSMOTYCZNE ZIARNISTOŚCI

Sekrecja katecholamin z komórek chromochłonnych uzależniona jest od syntezy ATP. Jeśli glukozę zastąpi się 2-dezoksyglukozą — sekrecja nie zachodzi. Z drugiej strony nie znaleziono takiego etapu egzocytozy, który zależałby od dodanego ATP lub byłby wrażliwy na czynniki rozprzegające oksydacyjną fosforylację. Wyjaśnieniem tych faktów, zdaniem Pollarda i wsp. [24], jest obserwacja poczyniona na wyizolowanych ziarnistościach chromochłonnych: w obecności soli magnezowej ATP i dużego stężenia jonów chlorkowych ulegają one lizie osmotycznej (rys. 5-3). Dzieje się tak dlatego, że w tych warunkach błonowa ATP-aza pompuje H^+ do wnętrza ziarnistości, co powoduje wzrost ciśnienia osmotycznego i wnikanie wody, a w konsekwencji rozerwanie błony. Zebrane dowody doświadczalne sugerują zaangażowanie czynnika chemioosmotycznego w procesie egzocytozy *in vivo*.

CZY KALMODULINA ZAANGAŻOWANA JEST W PROCES EGZOCYTOZY?

Koncepcja udziału kalmoduliny w procesie egzocytozy została wysunięta przez Bakera i wsp. w 1979 roku, którzy rozpatrywali zależność tego procesu od stężenia wapnia oraz fakt, że fenotiazynowe inhibitory kalmoduliny hamowały sekrecję w różnych typach komórek [1]. Pierwsze dowody eksperymentalne pchodziły z prac Steinhardta i Aldertona [28], którzy używając przeciwciał wobec kalmoduliny doszli do wniosku, że jest ona zlokalizowana na wewnętrznej powierzchni błony plazmatycznej komórki jajowej i jest odpowiedzialna za regulację sekrecji ziarnistości kortykalnych w obecności wapnia. Wydawało się więc, że kalmodulina zaangażowana jest w fuzję błon biologicznych i egzocytozę w fizjologicznym stężeniu wapnia. Odkrycie syneksyny i jej roli w egzocytozie skierowało badania na inny tor. Okazało się bowiem, że klasyczny inhibitor kalmoduliny — trójfluoroperazyna hamuje zarówno wywoływaną przez syneksynę agregację ziarnistości chromochłonnych (poprzedzającą fuzję błon), jak i sekrecję katecholamin z hodowanych komórek chromochłonnych. Dokładny mechanizm tej reakcji nie jest znany, najprawdopodobniej leki z grupy fenotiazyn hamują tworzenie kompleksów pentalaminarnych. Stawia to jednak pod znakiem zapytania dotychczasową interpretację doświadczeń z inhibitorami fenotiazynowymi. Szerokie rozpowszechnienie syneksyny w różnych organach rozmaitych zwierząt, jako białka zachowującego niezmiernie konserwatywną formę, oraz jej własności wydają się dowodzić, że to właśnie syneksyna a nie kalmodulina jest wewnątrzkomórkowym receptorem wapnia w procesie egzocytozy [5, 24].

EGZOCYTOZA A FOSFORYLACJA BIAŁEK

W ciągu ostatnich 5 lat ukazało się wiele publikacji wskazujących na to, że stymulację egzocytozy (pośredniczoną przez receptory) skorelować można ze zmianami w stopniu ufosforylowania białek w gruczołach zewnątrzwydzielniczych. Wykazano, że niezależnie od charakteru agonisty towarzyszy jej fosforylacja białka o ciężarze molekularnym 32 000, które zidentyfikowano jako rybosomalne S6 [20]. Nieoczekiwanie okazało się, że w wyniku stymulacji β -adrenergicznej (zależnej od cAMP) i cholinergiczej (zależnej od wapnia) otrzymano takie same fosfopeptydy białka S6. Jakkolwiek wydaje się mało prawdopodobne, by fosforylacja tego białka była bezpośrednio zaangażowana w procesie egzocytozy, to jej wykrycie umożliwiło identyfikację enzymu, który ulega aktywacji w trakcie stymulowania egzocytozy — jest nią kinaza C zależna od wapnia i fosfolipidów. Aktywacja przez agonistę, wykorzystującego cAMP jako przekaznik drugiego rodzaju, wynika prawdopodobnie ze zwią-

szanej produkcji diacyloglicerolu (gdyż cAMP stymuluje lipolizę triacylogliceroli, podczas gdy aktywowanie kinazy przez agonistę angażującego wapń jako przekaźnik, można wytłumaczyć jako wynik jednoczesnego wzrostu poziomu wolnego wapnia w cytozolu oraz diacyloglicerolu. Niektórzy autorzy przypisują fosforylacji rolę w utrzymywaniu systemu sekrecyjnego w gotowości do wydzielania, natomiast sam proces wydzielania łączy z defosforylacją [4, 10].

ENDOCYTOZA SPRZĘŻONA Z EGZOCYTOZA

W wyniku egzocytotycznego uwolnienia materiału sekrecyjnego następuje wbudowanie błony, która uczestniczyła w transporcie tegoż materiału w błonę powierzchni komórki. Badanie morfologiczne i użycie znaczników endocytozy, takich jak peroksydaza chrzanowa, dekstran i kationizowana ferrytyna wykazały, że istnieje kompensacyjne odzyskiwanie błony z powierzchni komórki na drodze endocytozy [8].

Inicjacja procesu endocytozy, który następuje tuż po sekrecji, wydaje się być ściśle regulowana. Komórki zewnątrzwydzielnicze, które magazynują produkt sekrecji, nie wykazują żadnej, lub bardzo małą aktywność endocytotyczną, dopóki nie nastąpi wywołanie egzocytozy [29].

Doświadczenia przeprowadzone na 5 różnych typach komórek (wewnątrz- i zewnątrzwydzielnicze oraz uwalniające immunoglobuliny) pozwoliły stwierdzić, że błona ziarnistości krąży jako „kontener” dla produktów sekrecji. Po egzocytozie błona odzyskana endocytotycznie podlega fuzji z rozszerzonymi częściami cystern Golgiego (gdzie zachodzi gromadzenie produktów sekrecji) albo też zlewa się najpierw z lizosomami, a potem z aparatem Golgiego zależnie od typu komórek [8]. Fakt istnienia szlaku od powierzchni komórki do kompleksu Golgiego ma istotne implikacje. Częsteczki o charakterze informacyjnym (hormony, katecholaminy) z przestrzeni zewnątrzkomórkowej mogłyby się tą drogą dostać do kompartmentu biosyntetycznego i wpływać na inne procesy wewnątrzkomórkowe. Również komponenty błony powierzchniowej (receptory, enzymy i inne białka błonowe) mogłyby być modyfikowane glikozylowane, sulfonowane, fosforylowane), przechodząc przez cysterny Golgiego [8].

Ciekawe wyniki uzyskano badając proces odzyskiwania błon w zewnątrzwydzielniczych komórkach groniastych gruczołu śliniankowego, gdy porównano obie powierzchnie tych spolaryzowanych komórek. Od strony wierzchołkowej endocytoza zachodziła za pośrednictwem pęcherzyków o gładkiej powierzchni, które gromadziły się w pobliżu aparatu Golgiego, a następnie dostarczały swą zawartość do lizosomów. Od stro-

ny bocznej i podstawy komórki proces przebiegał odmiennie: był w znacznym stopniu uzależniony od stymulowania sekrecji, a internalizacja zachodziła w opłaszczonych pęcherzykach, co zdaniem autorów sugerowałoby endocytozę za pośrednictwem receptorów. Tak więc, endocytoza zachodząca od strony wierzchołkowej byłaby procesem odzyskiwania błony ziarnistości sekrecyjnej [19]. Opłaszczone pęcherzyki zaangażowane są w trakcie endocytywania błon po sekrecji w komórkach chromochłonnych, przy czym ilość opłaszczonych struktur błonowych znacznie wzrosła po stymulacji cholinergiczej [9].

PODOBIENSTWO MIĘDZY ENDO- I EGZOCYTOZĄ. ROLA POMP PROTONOWYCH

Większość błonowych organelli komórkowych w typowej komórce eukariotycznej należy do elementów szlaku egzo- i endocytotycznego, zwanych systemem wakuolarnym. Należą do nich: retikulum endoplazmatyczne (siateczka wewnątrzplazmatyczna), kompleks Golgiego, pęcherzyki wydzielnicze, endosomy, lizosomy i inne organelle zaangażowane w biosyntezę, obróbkę, transport, przechowywanie, uwalnianie i degradację rozpuszczalnych i związanych z błoną makrocząstek. Zarówno szlak skierowany do wnętrza komórki, jak i w stronę przeciwną składa się z szeregu organelli, poprzez które materiał przechodzi kolejno w sposób uporządkowany za pomocą specyficznych pęcherzyków transportujących i dzięki podziałom oraz fuzji błon. Na obu szlakach zachodzi molekularne rozdzielanie komponent rozpuszczalnych i związanych z błoną, jak też przechowywanie cząstek. Mechanizmy odzyskiwania błon między kompartmentami zapewniają równowagę w przepływie błon. Obydwa szlaki, egzo- i endocytotyczny są funkcjonalnie powiązane (rys. 1). Istotnym podobieństwem większości organelli systemu wakuolarnego jest obecność ATP-az protonowych odpowiedzialnych za generację kwaśnego środowiska w ich wnętrzu [14, 18, 24]. O kwasowości lizosomów i niektórych pęcherzyków wydzielniczych, takich jak ziarnistości chromochłonne, było wiadomo od dawna. Ostatnio okazało się, że wiele innych organelli wakuolarnych, takich jak endosomy, aparat Golgiego i opłaszczone pęcherzyki wykazują niskie pH. W trakcie endocytozy materiał wnikaający napotyka stopniowo obniżające się pH. Podobną sytuację zaobserwowano na szlaku egzocytotycznym, gdzie pH ulega obniżeniu w miarę przesuwania się produktów sekrecji od retikulum endoplazmatycznego ku pęcherzykom wydzielniczym.

Własności pomp protonowych odpowiedzialnych za generację gradientów protonowych są podobne we wszystkich organellach: są one elektrogenne, wykazują specyficzność substratową wobec ATP i są inhibowane N-etylomaleimidem w niskich stężeniach [18]. pH w roz-

maitych organellach jest różne, a zakwaszenie poszczególnych struktur pełni odmienną rolę. W ziarnistościach chromochłonnych gradient protonowy jest źródłem energii dla sprzężonego transportu amin biogennych. W przypadku endocytozy pośredniczonej przez receptory różnica pH między endosomem i środowiskiem zewnątrzkomórkowym służy komórce do stworzenia asymetrii w obiegu: wchodzące receptory, ligandy i komponenty fazy płynnej wykazują odmienne właściwości w kompartmentach wewnątrz- i zewnątrzkomórkowych. Ekspozycja na niskie pH w endosomach wywołuje zmiany konformacyjne, które z kolei mogą prowadzić do dysocjacji kompleksów receptor-ligand czy zmian w rozpuszczalności ligandów. W wielu przypadkach takie zmiany determinują późniejsze rozdzielanie i przeznaczenie pobieranych cząsteczek.

Właściwe skierowanie i przechowywanie białek wydzielniczych oraz uporządkowany przepływ wzdłuż szlaku egzocytotycznego zależy bezpośrednio lub pośrednio od gradientów pH utrzymywanych przez ATP-azy protonowe [18].

Pracę wykonano w ramach C.P.B.P. 04. 01.

LITERATURA

1. Baker P. F., Knight D. E., Whitaker M. J. — *Calcium and the control of exocytosis*. W: *Calcium-binding proteins: structure and function*. F. L. Siegel, E. Carafoli, R. H. Kretsinger, D. H. MacLennan, R. H. Wasserman (red.), Elsevier North Holland Inc., 1980.
2. Besterman J. M., Low R. B. — *Endocytosis: a review of mechanisms and plasma membrane dynamics*. *Biochem. J.* 210: 1-13, 1983.
3. Blobel G. — *Intracellular protein topogenesis*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 77: 1496-1500, 1980.
4. Brooks J. C., Tremal S., Brooks M. — *Thiophosphorylation prevents catecholamine secretion by chemically skinned chromaffin cells*. *Life Sci.* 35: 569-574, 1984.
5. Creutz C. E., Scott J. H., Pazoles C. J., Pollard H. B. — *Further characterization of the aggregation and fusion of chromaffin granules by synexin as a model for compound exocytosis*. *J. Cell Biochem.* 18: 87-97, 1982.
6. Dautry-Varsat A., Lodish H. F. — *How receptors bring proteins and particles into cells*. *Sci. Amer.* 250: 48-54, 1984.
7. Davey J., Hurlley S. M., Warren G. — *Reconstitution of an endocytic fusion event in a cell-free system*. *Cell* 43: 643-652, 1985.
8. Farquhar M. G. — *Membrane recycling in secretory cells: implication for traffic of products and specialized membranes within the Golgi complex*. *Meth. Cell Biol.* 23: 399-427, 1981.

9. Geisow M. J., Childs J., Burgoyne R. D. — Cholinergic stimulation of chromaffin cells induces rapid coating of the plasma membrane. *Eur. J. Cell Biol.* 38: 51-56, 1985.
10. Gilligan D. M., Satir B. H. — Protein phosphorylation/dephosphorylation and stimulus-secretion coupling in wild type and mutant *Paramecium*. *J. Biol. Chem.* 257: 13903-13906, 1982.
11. Goldstein J. L., Anderson R. G. W., Brown M. S. — Coated pits, coated vesicles and receptor-mediated endocytosis. *Nature* 279: 679-685, 1979.
12. Gumbiner B., Kelly R. B. — Two distinct intracellular pathways transport secretory and membrane glycoproteins to the surface of pituitary tumor cells. *Cell* 28: 51-59, 1982.
13. Harrison S. C., Kirchhausen T. — Molecular interaction in receptor cycling and endocytosis by clathrin-coated vesicles. *TIBS*, 10 (wkładka), 1985.
14. Helenius A., Mellman I., Wall D., Hubbard A. — Endosomes. *TIBS* 8: 245-250, 1983.
15. Kelly R. B. — Pathways of protein secretion in eukaryotes. *Science* 230: 25-32, 1985.
16. Kirschhausen T., Harrison S. C. — Protein organization in clathrin trimers. *Cell* 23: 755-761, 1981.
17. Lehrman M. A., Goldstein J. L., Brown M. S., Russell D. W., Schneider W. J. — Internalization-defective LDL receptors produced by genes with nonsense and frameshift mutations that truncate the cytoplasmic domain. *Cell* 41: 735-743, 1985.
18. Mellman I., Fuchs R., Helenius A. — Acidification of the endocytic and exocytic pathways. *Ann. Rev. Biochem.* 55: 663-700, 1986.
19. Oliver C., Hand A. R. — Membrane retrieval in exocrine acinar cells. *Meth. Cells Biol.* 23: 429-444, 1981.
20. Padel U., Söling H.-D. — Phosphorylation of the ribosomal protein S6 during agonist-induced exocytosis in exocrine glands is catalyzed by calcium-phospholipid-dependent protein kinase (protein kinase C). *Eur. J. Biochem.* 151: 1-10, 1985.
21. Pastan I., Willingham M. C. — Receptor-mediated endocytosis: coated pits, receptosomes and the Golgi. *TIBS* 8: 250-254, 1983.
22. Pearse B. M. F. — Coated vesicles from pig brain: purification and biochemical characterization. *J. Mol. Biol.* 97: 93-98, 1975.
23. Pearse B. M. F., Bretscher M. S. — Membrane recycling by coated vesicles. *Ann. Rev. Biochem.* 50: 85-101, 1981.
24. Pollard H. B., Creutz C. E., Fowler V., Pazoles C. J. — Calcium-dependent regulation of chromaffin granule movement, membrane contact and fusion during exocytosis. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, t. 46, cz. 2, 1982.
25. Redman C. M., Banerjee D., Yu S. — The effect of colchicine on the synthesis and secretion of rat serum albumin. *Meth. Cell Biol.* 23: 231-245, 1981.
26. Sly W. S., Fischer H. D. — The phosphomannosyl recognition system for intracellular transport of lysosomal enzymes. *J. Cell. Biochem.* 18: 67-85, 1982.
27. Steer C. J., Vincent J. S., Levin I. W. — Membrane lipid response to

- clathrin coat protein determined by infrared spectroscopy. Possible involvement in coated vesicle formation. *J. Biol. Chem.* 259: 8052-8055, 1984.
28. Steinhardt R. A., Alderton J. M. — Calmodulin confers calcium sensitivity on secretory exocytosis. *Nature* 295: 154-155, 1982.
 29. Steinman R. M., Mellman I. S., Muller W. A., Cohn Z. A. — Endocytosis and the recycling of plasma membrane. *J. Cell Biol.* 96: 1-27, 1983.
 30. Tartakoff A. M. — Perturbation of vesicular traffic with the carboxylic ionophore monensin. *Cell* 32: 1026-1028, 1983.
 31. Tartakoff A., Vasalli P. — Comparative studies of intracellular transport of secretory proteins. *J. Cell Biol.* 79: 694-707, 1978.
 32. Trifaro J. M., Lee R. W. H. — Morphological characteristics and stimulus-secretion coupling in bovine adrenal chromaffin cell cultures. *Neuroscience* 5: 1533-1546, 1980.
 33. Tolleshaug H., Kolset S. O., Berg T. — The influence of cellular ATP levels on receptor-mediated endocytosis and degradation of asialo-glycoproteins in suspended hepatocytes. *Biochem. Pharmacol.* 34: 1639-1645, 1985.
 34. Walter P., Ibrahimi I., Blobel G. — Translocation of proteins across the endoplasmic reticulum. I. Signal recognition particle (SRP) binds to in vitro assembled polysomes synthesizing secretory proteins. *J. Cell Biol.* 91: 545-550, 1981.
 35. Warren G. — Membrane traffic and organelle division. *TIBS* 10: 439-443, 1985.
 36. Williams J. A. — Effects of antimetabolic agents on ultrastructure and intracellular transport of protein in pancreatic acini. *Meth. Cell Biol.* 23: 247-258, 1981.
 37. Willingham M. C., Pastan I. — Receptosomes, endosomes, CURL: different terms for the same organelle system. *TIBS* 10: 190-191, 1985.

СОДЕРЖАНИЕ

Вступительное слово — Й. Ветулани, А. Пжеленца	159
В. Киларски — Молекулярное строение клеточной мембраны	161
С. Пжестальски — Биофизика мембраны	177
Й. Кузьицки — Транспорт и функции ионов кальция у эукариот	197
Л. Качмарек — Возбуждение мембранных рецепторов и активация генов	219
Й. Ветулани — Фармакологический рецептор — мембранный рецептор нейромедиаторов	233
С. Вольфартх — Очерк электрофизиологии и фармакологии ионных каналов	263
З. Херман — Действие и применение средств блокирующих кальцевые каналы	293
Э. Выроба — Эндоцитоз и экзоцитоз	307

CONTENTS

Foreword — J. Vetulani, A. Przełęcka	159
W. Kilarski — Molecular structure of the cell membrane	161
S. Przestalski — Membrane biophysics	177
J. Kuźnicki — Transport and function of calcium ions in eukaryotic cell	197
L. Kaczmarek — Stimulation of membrane receptors and gene activation	219
J. Vetulani — Pharmacological receptor as a cell membrane receptor for neuromediators	233
S. Wolfarth — An outline of the electrophysiology and pharmacology of ionic channels	263
Z. S. Herman — The action and application of drugs blocking the calcium channels	293
E. Wyroba — Endo- and egzocytosis	307

SPIS TREŚCI

Słowo wstępne — Jerzy Vetulani, Aleksandra Przełęcka	159
Wincenty Kilariski — Molekularna budowa błony komórkowej	161
Stanisław Przestalski — Biofizyka błon	177
Jacek Kuźnicki — Transport i funkcje jonów wapnia u eukariota	197
Leszek Kaczmarek — Pobudzenie receptorów błonowych a aktywacja genów	219
Jerzy Vetulani — Receptor farmakologiczny — błonowy receptor neuromediatorów	233
Stanisław Wolfarth — Zarys elektrofizjologii i farmakologii kanałów jonowych	263
Zbigniew S. Herman — Działanie i zastosowanie leków blokujących kanały wapniowe	293
Elżbieta Wyroba — Endocytoza i egzocytoza	307

Informacje dla Autorów

KOSMOS jest kwartalnikiem adresowanym do szerszego grona biologów. Publikuje oryginalne artykuły referatowe i przeglądowe informujące o postępach wiedzy w różnych dziedzinach nauk biologicznych. Prowadzi dział dyskusji i krytyki naukowej oraz dział recenzji. Podaje informacje o działalności instytutów i zakładów naukowych oraz omówienia przebiegu ważniejszych zjazdów, sympozjów i konferencji. Zamieszcza krótkie notatki o najnowszych odkryciach i syntetyczne omówienia rozwoju badań w wybranych dziedzinach nauki, opracowane przez specjalistów dla szerszego grona odbiorców.

Autorzy są odpowiedzialni za merytoryczną treść artykułów, poprawność użytej nomenklatury naukowej oraz za ścisłość podawanych informacji. Proszeni są o nadsyłanie tekstów opracowanych starannie pod względem językowym i stylistycznym oraz zgodnie z podanymi niżej wskazówkami technicznymi.

Artykuły i inne materiały nadsyłane do KOSMOSU są recenzowane i redagowane stosownie do wskazówek recenzentów w porozumieniu z Autorami. Redakcja zastrzega sobie prawo skracania tekstów i wprowadzania poprawek nie wpływających na treść pracy. Autorów obowiązuje korekta autorska; ponoszą oni koszty zmian tekstu w korekcie, wykraczające poza usunięcie błędów drukarskich.

Zamieszczone w KOSMOSIE prace honoruje się według obowiązujących stawek autorskich. Autorzy artykułu otrzymują bezpłatnie 25 odbitek; zamówienia na płatne, dodatkowe odbitki należy zgłaszać pisemnie łącznie ze zwrotem korekty autorskiej.

Przygotowanie prac do druku

1. Prace należy nadsyłać w 2 egzemplarzach, zarówno tekst jak i załączniki.
2. Maszynopis powinien być sporządzony na białym papierze formatu A4, na maszynie i czcionką normalnej wielkości, przez czarną taśmę, jednostronnie z podwójnym odstępem między wierszami i ok. 4 cm marginesem po lewej stronie, nie więcej niż 60 znaków w jednym wierszu i nie więcej niż 30 wierszy na jednej stronie. Strony należy numerować.
3. Na oddzielnej, nie numerowanej stronie tytułowej należy podać: tytuł pracy, imię (w pełnym brzmieniu) oraz nazwisko autora, adres zakładu pracy i adres zamieszkania, nr telefonu w miejscu pracy (lub w domu) oraz wskazówki dotyczące przesyłania korespondencji i sposobu przekazania honorarium (także nr konta). Przy artykułach (dział I Kosmosu) i pracach przeznaczonych do działu „Dyskusja i krytyka” należy podać tłumaczenie tytułu na język angielski i rosyjski.
4. Teksty powinny być pisane bez używania wyróżnień jak podkreślanie, spacjowanie lub pisanie dużymi literami (wersalikami). Wszelkie wskazówki dla redakcji dotyczące wyróżnień w tekście należy zaznaczać zwykłym ołówkiem, zaś dotyczące składu (np. odnośnie włamania rysunku lub tabeli) — ołówkiem na marginesie maszynopisu.
5. Załączone do maszynopisu tabele, rysunki, schematy, mapy, wzory itp. powinny być oznaczone na marginesie lub na odwrotnej stronie przez podanie nazwiska autora i początkowych wyrazów tytułu pracy, a także nr jednostki ilustracyjnej.
6. Tabele winny być napisane w układzie zbliżonym do układu zecerskiego, a tekst nie powinien przekraczać linii ograniczających poszczególne kolumny. Treść tabel należy pisać z podwójnym odstępem między wierszami, jak tekst podstawowy.

Należy unikać dzielących linii pionowych i poziomych (z wyjątkiem główki). Liczby wielocyfrowe należy pisać dzieląc je od końca po 3 cyfry (np. 50 000).

7. Rysunki, schematy, mapy, fotografie i inne materiały ilustracyjne muszą nadawać się do reprodukcji lub przerysowania. Oryginały rysunków winny być wykonane tuszem na kalce technicznej lub na białym papierze. Rysunki robocze winny być sporządzone czytelnie, w sposób umożliwiający bezbłędne wykonanie czystorysów do reprodukcji. Odbitki fotograficzne winny być wykonane w formacie nie mniejszym niż późniejsze reprodukcje w tekście, na białym papierze błyszczącym o odpowiednim kontraście. Map i planów nie należy przeładowywać zbyt obszerną treścią i szczegółowymi oznaczeniami, gdyż może to spowodować nieczytelność reprodukcji.

8. Wszystkie jednostki ilustracyjne winny być ponumerowane ze wskazaniem, w razie potrzeby, góry rysunku. Podpisy powinny być podane na oddzielnej stronie maszynopisu.

9. Literaturę należy podać na końcu maszynopisu w kolejności omawianych w tekście prac. Odnośniki bibliograficzne, w wypadku czasopism, winny zawierać dane w następującej kolejności: liczba porządkowa, nazwisko i pierwsza litera imienia autora, tytuł pracy w pełnym brzemieniu, przyjęty skrót tytułu czasopisma, tom, strony (od-do) i rok. Przy wydawnictwach książkowych należy podawać: liczbę porządkową, nazwisko i pierwszą literę imienia autora, tytuł książki, przy pracach wielotomowych: nr tomu, przy wydawnictwach seryjnych: nazwę serii, a dalej: nazwę wydawnictwa (w skrócie), miejsce i rok wydania.

Powołanie się w tekście na odnośną pozycję literatury następuje przez podanie liczby porządkowej w nawiasie kwadratowym. Przy cytowaniu prac o podstawowym znaczeniu dla omawianego zagadnienia wskazane jest poza tym przytoczenie w tekście również nazwiska autora (autor i współpr.).

W ten sposób przygotowany materiał autorski pozwoli uniknąć błędnego składu lub reprodukcji i wpłynie niewiätpliwie na skrócenie cyklu wydawniczego.

**Tylko prenumerata zapewnia
regularne otrzymywanie
kwartalnika**

K O S M O S

Prenumerata krajowa

Warunki prenumeraty:

Prenumeratę na kraj przyjmują i informacji udzielają urzędy pocztowe i doręczy-
ciele na wsi oraz Oddziały RSW „Prasa-Książka-Ruch” w miastach.

Prenumeratę ze zleceniem wysyłki za granicę przyjmuje RSW „Prasa-Książka-
-Ruch”, Centrala Kolportażu Prasy i Wydawnictw, ul. Towarowa 28, 00-958 War-
szawa, konto PKO PB XV Oddział w Warszawie Nr 1658-201045-139-11. Wysyłka za
granicę pocztą zwykłą jest droższa od prenumeraty krajowej o 50% dla zlecenio-
dawców indywidualnych i o 100% dla zlecających instytucji i zakładów pracy.

Prenumerata zagraniczna

Terminy przyjmowania prenumerat na kraj i za granicę:

- do dnia 10 listopada na I półrocze roku następnego i na cały rok następny,
- do dnia 1 czerwca na II półrocze roku bieżącego.

Bieżące i archiwalne numery można nabyć lub zamówić we Wzorcowni Ośnodka
Rozpowszechniania Wydawnictw Naukowych PAN, Pałac Kultury i Nauki, 00-901
Warszawa.

Subscription orders for all the magazines published in Poland available through
the local press distributors or directly

through the
Foreign Trade Enterprise
ARS POLONA

00-068 Warszawa, Krakowskie Przedmieście 7, Poland

Our bankers:

BANK HANDLOWY WARSZAWA S.A.

Indeks 36260
