



Towarzystwo Przyrodników
im. KOPERNIKA

KOSMOS



ROK 37

WARSZAWA 1988

Numer 3 (200)

PAŃSTWOWE

WYDAWNICTWO

NAUKOWE

K O S M O S

Rok założenia 1876



Warszawa 1988

Państwowe Wydawnictwo Naukowe

RADA REDAKCYJNA

IESZEK KUŹNICKI (wiceprzewodniczący), WŁODZIMIERZ MICHAJŁOW,
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 Ł WIERZCHOWSKI
(zastępca 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 1122+108. Ark. wyd. 15,25. Ark. druk. 11,625. Papier druk.
mat. III 71 g. B-1

Oddano do składania 6.VI.1988 r. Podpisano do druku w
lutym 1989 r. Druk ukończono w lutym 1989 r.

Zam. 416/88

U-58

Cena zł 190,—

WARSZAWSKA Drukarnia Naukowa, WARSZAWA, ul. ŚNIADECKICH 8

JERZY Z. NOWAK

Zakład Amin Biogennych PAN

Łódź

RECEPTORY BŁONOWE A PRZEMIANY FOSFOINOZYTYDÓW: TRIFOSFORAN INOZYTOŁU I DIACYLOGLICEROL JAKO DRUGIE PRZEKAŹNIKI INFORMACJI

I. WSTĘP

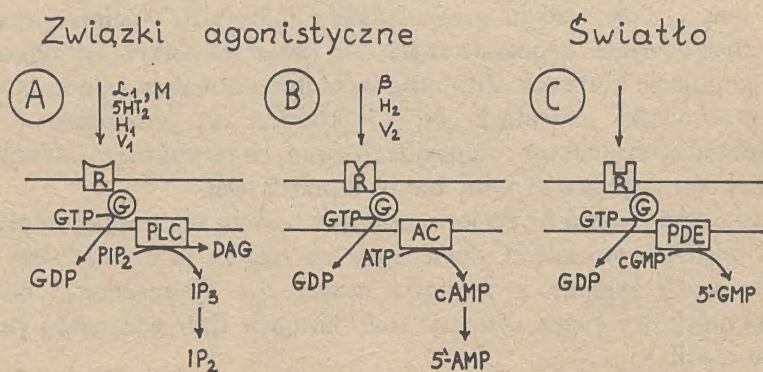
Podstawą prawidłowego funkcjonowania każdego narządu w organizmie, jak również organizmu jako całości, jest utrzymanie sprawnego systemu komunikacji międzykomórkowej. Przepływ informacji między komórkami odbywa się przy udziale różnych substancji o wysokiej aktywności biologicznej, takich jak hormony, neuroprzeźniki i autakoidy, które w specyficzny dla siebie sposób inicjują w komórce docelowej właściwą odpowiedź. Substancje te, zwane inaczej “pierwszymi przeźnikami informacji”, pełnią zatem rolę sygnałów chemicznych rozpoznawanych nie przez wszystkie, ale tylko przez określone populacje komórek. Zdolność wybiórczego reagowania komórek na pierwsze przeźniki informacji jest uzależniona od posiadania przez te komórki specjalnych struktur receptyjnych zwanych receptorami, zlokalizowanych na zewnętrznej powierzchni błony komórkowej.

Ponieważ błona komórkowa jest naturalną barierą ograniczającą przepływ informacji międzykomórkowej, docierające do niej za pośrednictwem receptorów błonowych sygnały z zewnątrz muszą być “tłumaczone” na język wewnątrzkomórkowy przez systemy tzw. “drugich (lub wtórnych) przeźników informacji”.

W przeciwieństwie do stosunkowo dużej liczby pierwszych przeźników informacji, liczba drugich przeźników jest zadziwiająco mała, sugerując tym samym uniwersalność języka wewnątrzkomórkowego. Przepływ informacji do wnętrza komórki odbywa się przy udziale jednego z dwóch zasadniczych torów biochemicznych wykorzystujących jako drugie przeźniki informacji albo cykliczne nukleotydy (cAMP, cGMP), albo związki powstałe w wyniku hydrolizy fosfolipidów błony komórkowej (głównie trifosforan inozytolu i diacyloglicerol) oraz jony wapniowe.

Mechanizmy przepływu informacji przy udziale obydwu torów biochemicznych mają szereg cech wspólnych. W obydwu systemach, pobudzenie receptora błonowego stymuluje wewnątrzbłonową jednostkę regulacyjną kompleksu receptorowego, tzw. białko G (białko wiążące GTP). Białko G aktywuje następnie jednostką katalityczną, t.j. odpowiedni dla danego toru enzym zlokalizowany na wewnętrznej powierzchni błony komórkowej. Zadaniem tego enzymu jest przekształcenie cząsteczek prekursora w cząsteczki drugiego przekaźnika. Należy podkreślić, że z reguły prekursorami są związki wysoko ufosforylowane. Tak więc w jednym z torów cykloaza adenyloza przekształca trifosforan adenozyne (ATP) w cAMP, natomiast w drugim fosfolipaza C (fosfodiesteraza fosfatydyloinozytolu) rozszczepia błonowy fosfolipid — 4,5-difosforan fosfatydyloinozytolu na trifosforan inozytolu i diacyloglicerol (rys. 1). Analogiczny przebieg reakcji ma miejsce w komórkach fotoreceptorowych, przy czym jednostką recepcyjną kompleksu receptorowego jest rodopsyna (Rh), a czynnikiem agonistycznym — światło (rys. 1).

W niniejszym artykule omówione zostaną przemiany fosfatydyloinozytolu stymulowane aktywacją receptorów błonowych. Jednakże, wydaje się celowe wcześniejsze zwięzłe przedstawienie współczesnej koncepcji receptora, wzajemnych oddziaływań między elementami receptora i składnikami błony komórkowej oraz podstawowych pojęć w receptorologii.



Rys. 1. Schemat kompleksu receptorowego: A — układu generującego trifosforan inozytolu (IP₃) i diacyloglicerol (DAG); PLC — fosfolipaza C, PIP₂ — difosforan fosfatydyloinozytolu; B — układu generującego cAMP; AC — cyklaza adenyloza; C — pobudzanego przez światło układu aktywującego zależną od cGMP fosfodiesterazę (PDE) w komórkach fotoreceptorowych. R — jednostka recepcyjna (w fotoreceptorach pręcikowych jednostką recepcyjną jest rodopsyna); G — jednostka regulacyjna (białko G); PLC, AC i PDE — odpowiednie jednostki katalityczne. Inne wyjaśnienia w tekście

II. STRUKTURA BŁONY KOMÓRKOWEJ I WSPÓŁCZESNE POJĘCIA W RECEPTOROLOGII

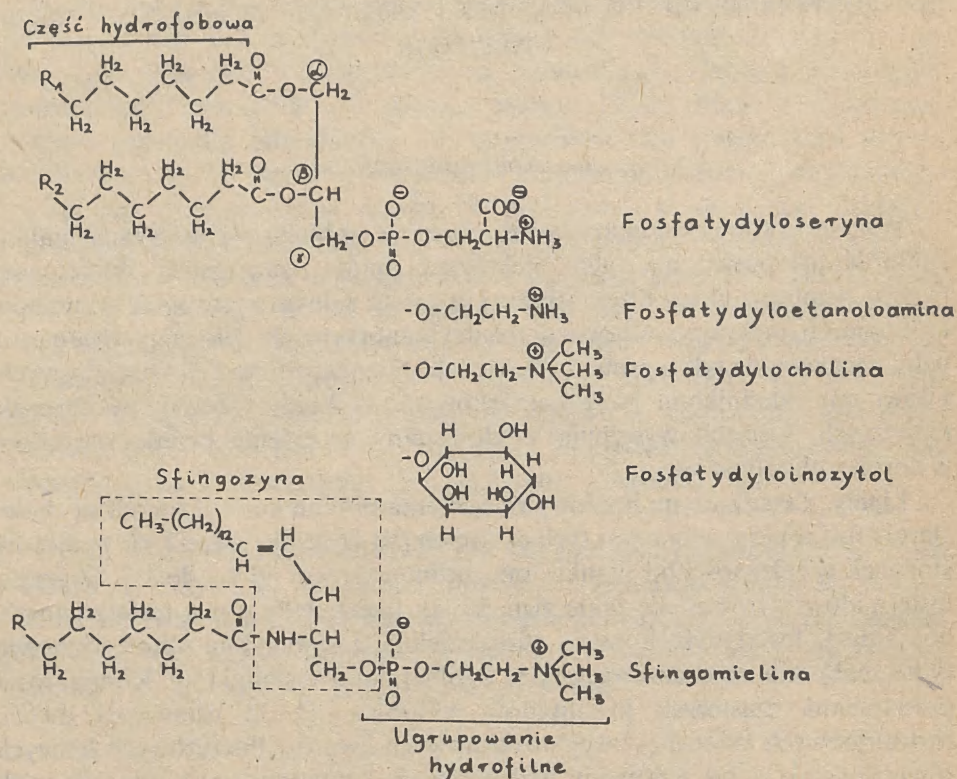
II. 1. BŁONA KOMÓRKOWA

Wszystkie komórki eukariotyczne otoczone są błoną plazmatyczną, mającą zdolność przepuszczania tylko niektórych jonów i cząsteczek. Właściwości fizyko-chemiczne błony plazmatycznej są zatem jednym z istotnych czynników limitujących przepływ informacji międzykomórkowych. Błona plazmatyczna pełni więc rolę nie tylko protektora, ale także regulatora funkcji komórkowych. Głównymi składnikami błon komórkowych są lipidy i białka; w znacznie mniejszych ilościach występują węglowodany spotykane przede wszystkim w formie glikolipidów.

Lipidy. Zasadniczymi lipidowymi elementami błon komórkowych są cholesterol i fosfolipidy, przy czym tych ostatnich jest znacznie więcej i ich wzajemny stosunek w zależności od tkanki oraz gatunku wynosi od 1:2 do 1:6. W grupie fosfolipidów wyróżnia się takie związki jak fosfatydyloseryna, fosfatydyloetanoloamina, fosfatydylocholina i sfingomielina; fosfatydyloinozytole stanowią tylko małą, kilkuprocentową frakcję ogólnej ilości fosfolipidów. Konfiguracja przestrzenna cząsteczek fosfolipidów podobna jest do ustawienia dwóch hydrofobowych łańcuchów węglowodorowych kwasów tłuszczowych leżących równolegle do siebie z grupami hydrofilowymi (utworzonymi z odpowiednich fosfozwiązków) skierowanych w przeciwny koniec cząsteczki (rys. 2).

Białka. Wyróżnia się dwa rodzaje białek błonowych: 1) związane — tzw. białka obwodowe (lub zewnętrzne), i 2) integralne — tzw. białka wewnątrz-błonowe. Białka obwodowe są luźno związane z błonami wykorzystując do tego celu zasadę oddziaływań elektrostatycznych i/lub wiązań wodorowych. Z kolei białka integralne (np. zależna od jonów Na/K-ATPaza, rodopsyna), reprezentujące więcej niż 70% białek błonowych, mają w swojej strukturze domeny hydrofobowe, które wchodzi w interakcję z częściami węglowodorowymi lipidów. Interakcje te sprawiają, że białka integralne są usadowione w błonie plazmatycznej znacznie silniej aniżeli białka obwodowe. Części peryferyjne białek integralnych, strukturalnie odmienne i wykazujące właściwości hydrofilowe, występują zarówno na zewnętrznej, jak i wewnętrznej stronie błony. Zróżnicowana kompozycja fosfolipidów i białek po obydwu stronach błony plazmatycznej wskazuje na istniejącą asymetrię strukturalną i sugeruje odmienność funkcjonalną zewnętrznej i wewnętrznej części błony.

Polipeptydy integralne mogą tworzyć w błonie pory (kanały) o dużym stopniu selektywności wobec określonych jonów lub struktur chemicznych i w ten sposób mogą istotnie uczestniczyć w procesie transportu różnych



Rys. 2 Struktury chemiczne fosfolipidów. R, R₁ i R₂ — reszty kwasów tłuszczowych

molekuł przez błonę. Wiele białek "kanałowych" jest funkcjonalnie sprzężonych z białkami receptorowymi, i zmiany w konformacji i funkcji jednego z nich pociągają za sobą zmiany w konformacji i funkcji drugiego polipeptydu. Możliwość interakcji między różnymi polipeptydami w błonie plazmatycznej zapewnia "płynność" niemalże wszystkich elementów błonowych, bowiem cząsteczki lipidów utrzymane w formie dwuwarstwowej znajdują się w ciągłym ruchu (ruchy Browna), a cząsteczki białek wykazują zdolność swobodnej bocznej dyfuzji w warstwie lipidów. Powyższą sytuację można porównać do boi (polipeptydów) pływających w basenie wypełnionym lipidami. Intensywność płynności błony jest uzależniona w sposób odwrotnie proporcjonalny od długości łańcuchów lipidowych oraz od stopnia nasycenia kwasów tłuszczowych. Ponadto, obecność białek integralnych lub cholesterolu (obydwa składniki zakłócają porządek "upakowania" łańcuchów lipidowych) odpowiednio zwiększa lub zmniejsza płynność błony. Zasygnalizowane zagadnienia mają ogromne znaczenie dla sprawności transferu informacji z zewnątrz do wnętrza komórki. Zakładając, że na zewnętrznej powierzchni błony komórkowej znajdują się różne typy receptorów, których stymulacja prowadzi do generacji

odpowiednich drugich przekaźników informacji, np. cAMP, trifosforanu inozytolu i diacyloglicerolu (dwa ostatnie przekaźniki powstają na drodze rozkładu błonowego fosfolipidu — fosfatydyloinozytolu), można sądzić z dużą dozą prawdopodobieństwa, że zmiany w biochemizmie błony plazmatycznej, a w szczególności zmiany w intensywności przemian fosfolipidów (prowadzące w konsekwencji do wzrostu płynności błony), muszą wywierać wpływ na inne zjawiska zachodzące w błonie, m.in. na transfer sygnału przenoszonego przy udziale cAMP. O tym, że tak w istocie jest świadczą dane doświadczalne pojawiające się coraz częściej z różnych ośrodków badawczych.

Podsumowując można powiedzieć, że współczesna koncepcja błony plazmatycznej, oryginalnie zaproponowana przeszło 50 lat temu przez Daniellego i Davisona (model statyczny) i stosunko niedawno, bo w roku 1972, uaktualniona i rozszerzona przez Singera i Nicolsona (model dynamiczny, "the fluid mosaic model"), zakłada, że cząsteczki lipidów błonowych, głównie fosfolipidów, tworzą warstwę podwójnie cząsteczkową — biomolekularną — o grubości około 7,5 nm, z niepolarnymi końcami cząsteczek zwróconymi ku sobie w obrębie błony, a końcami polarnymi ustawionymi w stronę fazy wodnej do wewnątrz i na zewnątrz komórki. Białka globularne, zarówno obwodowe jak i integralne, które rozmieszczone są mozaikowo w podwójnej warstwie fosfolipidowej, znajdują się w stanie dynamicznym i płynnym. Ta nieustanna zmienność dynamiczna wszystkich elementów błonowych, umożliwiającą współdziałanie ze sobą określonych cząsteczek (głównie polipeptydów) tworzących tzw. kompleksy receptorowe, gwarantuje niezwykle sprawny przepływ informacji przez błony komórkowe.

II. 2. RECEPTORY BŁONOWE

W roku 1878 Langley po raz pierwszy zasugerował, że w komórce muszą znajdować się substancje, z którymi związki chemiczne "tworzą kompleksy". Wiele lat później, w roku 1906 Ehrlich wprowadził termin "receptor" w działaniu związków. W tym samym roku Dale, pracując nad działaniami sympatycznymi alkaloidów sporyszu, zaproponował istnienie takich receptorów dla hormonów adrenergicznych. Te pionierskie prace Langleya, Ehrlicha i Dale'a, a później wielu innych uczonych, stały się podstawą współczesnej koncepcji receptora. W obecnym rozumieniu, koncepcja receptora opiera się na fakcie, że pewne substancje chemiczne, np. hormony czy neuroprzekaźniki, w wyniku interakcji (o charakterze odwracalnym) ze specyficznymi dla nich receptorami zlokalizowanymi w błonie komórkowej wywołują określone działania w komórce docelowej. Związanie się hormonu lub neuroprzekaźnika z receptorem, a właściwie z elementem recepcyjnym kompleksu receptorowego, powoduje zmianę konformacyjną białka receptorowego, która z kolei inicjuje kaskadę interakcji między komponentami efektorowymi

systemu. W efekcie ostatecznym, zdarzenia te prowadzą do fizjologicznej odpowiedzi komórki. Tak jak to było powiedziane wcześniej, receptor jest układem kompleksowym, zbudowanym najczęściej z trzech elementów: 1) jednostki receptyjnej (jej rola polega na rozpoznawaniu i wiązaniu hormonu), 2) jednostki regulacyjnej (tzw. wewnątrz błonowy "przetwarzacz"), oraz 3) jednostki katalitycznej (patrz rys. 1).

Związki agonistyczne i antagonistyczne; ligandy. Związkami agonistycznymi są hormony, neuroprzekazniki oraz wszystkie substancje chemiczne, które po połączeniu się z określonym receptorem stymulują komórkę do odpowiedzi fizjologicznej. Substancje, które łączą się specyficznie z receptorem nie wywołując jednakże odpowiedzi komórki (jak również zapobiegając działaniu związków agonistycznych), nazywane są związkami antagonistycznymi. Ligand jest to nazwa ogólna substancji, która charakteryzuje się zdolnością do specyficznego wiązania się z receptorem; a zatem ligandami są zarówno związki agonistyczne jak i antagonistyczne.

III. RECEPTORY BŁONOWE A PRZEMIANY FOSFATYDYLOINOZYTOLI

III.1. METABOLIZM FOSFATYDYLOINOZYTOŁU — POLIFOSFOINOZYTYDY JAKO SUBSTRAT DLA FOSFOLIPAZY C

Fosfatydyloinozytole są to estry glicerolu i kwasów tłuszczowych o różnym stopniu nasycenia, zawierające reszty kwasu ortofosforowego i sześciowodorotlenowy alkohol — inozytol — występujący przede wszystkim w postaci izometrycznej mio-inozytolu. Fosfatydyloinozytole stanowią tylko niewielką, około 5% część błonowych fosfolipidów. Stosunkowo duża szybkość obrotu oraz właściwości chemiczne tej grupy związków wyróżniają je spośród innych komponentów lipidowych błony plazmatycznej, sugerując ich udział w procesach istotnych dla życia komórki [1-4].

Pierwszymi badaczami, którzy zwrócili uwagę na możliwość zaangażowania błonowych fosfatydyloinozytoli w mechanizmie działania związków o wysokiej aktywności biologicznej była dwójka Kanadyjczyków H o k i n i H o k i n, która przeszło 30 lat temu dokonała pionierskiej obserwacji tzw. "efektu fosfolipidowego". Autorzy ci opisali wówczas stymulujący wpływ acetylocholiны na wbudowywanie radioaktywnego fosforu do frakcji błonowych fosfolipidów w trzustce [5].

Dalsze badania, w większości przeprowadzone w ostatnich 10 latach wykazały, że wiele substancji chemicznych, wśród nich hormony i neuroprzekazniki, nasila przemiany fosfatydyloinozytolu w różnych typach komórek u różnych gatunków zwierząt. Wyniki tych eksperymentów dostarczyły również dowodów wskazujących na receptorowy charakter działania takich

związków agonistycznych. Tak więc sugestie Durela i wsp. [6] o istnieniu powiązań między pobudzeniem receptorów błonowych i intensyfikacją przemian fosfatydyloinozytolu znalazły swoje potwierdzenie i rozwinięcie w pracach innych naukowców, wśród których na szczególne podkreślenie zasługują prace pochodzące z laboratoriów kierowanych przez Michella, Berridge'a, Nishizukę, Agranoffa, czy Nahorskiego.

O ile wpływ hormonów i neuroprzekazników na metabolizm błonowych fosfolipidów szybko stał się faktem ogólnie akceptowanym i docenianym, o tyle toczyły się liczne dyskusje dotyczące punktu działania tych substancji. Problem ten jest bardzo ważny bowiem dotyczy sprecyzowania molekularnego mechanizmu interakcji: receptor-fosfatydyloinozytole.

Grupę fosfatydyloinozytoli tworzą przynajmniej trzy związki fosfolipidowe: fosfatydyloinozytol oraz ufosforylowane pochodne fosfatydyloinozytolu, mianowicie 4-fosforan fosfatydyloinozytolu i 4,5-difosforan fosfatydyloinozytolu. Reakcję ufosforylowania przy 4 i 5 atomie węgla struktury inozytolu katalizują odpowiednie kinazy białkowe, wykorzystując grupy fosforanowe pochodzące od ATP. W błonie plazmatycznej wykryto ponadto obecność specyficznych fosfomonoesteraz, które mogą usuwać grupy fosforanowe w pozycji 4 i 5. Zatem, odwracalność procesów ufosforylowania i defosforylacji stwarza możliwość utrzymania równowagi dynamicznej między rozważanymi fosfolipidami. Chociaż poziom fosfatydyloinozytolu w błonie plazmatycznej przewyższa ilość obydwu polifosfoinozytydów, to w świetle przeważających danych literaturowych uważa się, że strukturą mającą największe powiązania z kompleksem receptorowym jest 4,5-difosforan fosfatydyloinozytolu. Jedną z pierwszych obserwacji torujących drogę do takiego wnioskowania było wykazanie w preparacie mięśnia gładkiego tęczówki stymulacji przez acetylocholinę rozkładu radioaktywnego 4,5-difosforanu fosfatydyloinozytolu. Rozkład tego polifosfoinozytydu był niewiątpliwie mediowany przez fosfodiesterazę, bowiem obserwowano jednoczesny wzrost hydrofilowego metabolitu — 1,4,5-trifosforanu inozytolu [7, 8]. W innych pracach podawano, że w wątrobie wazopresyna powodowała szereg zmian w metabolizmie fosfolipidów, przy czym zmianą szczególnie wyraźną był szybki rozkład właśnie 4,5-difosforanu fosfatydyloinozytolu [9]. Na podstawie wyników badań własnych oraz innych autorów Michell i Berridge [10-11] zasugerowali w 1981 roku, że pierwotną odpowiedzią na hormony jest hydroliza polifosfoinozytydów katalizowana przez aktywną formę fosfolipazy C (t.j. fosfodiesterazy 4,5-difosforanu fosfatydyloinozytolu), a obserwowane w niektórych badaniach zmiany w stężeniu fosfatydyloinozytolu są zjawiskiem wtórnym, odzwierciedlającym funkcjonujący mechanizm regulacyjny, zmierzający do skompensowania ubytku 4,5-difosforanu fosfatydyloinozytolu i utrzymania dynamicznej równowagi fosfolipidów w błonie.

Hipoteza postawiona przez grupy Michella i Berridge'a szybko zyskiwała poparcie w wynikach kolejnych badań. Otóż, przeprowadzona

w laboratorium Berridge'a [12] analiza kinetyki stymulowanych przez serotoninę przemian fosfatydyloinozytolu w gruczole ślinowym muchy wykazała 5-krotny wzrost zawartości 1,4,5-trifosforanu inozytolu w ciągu zaledwie 5 sekund. W tym samym czasie zanotowano znaczny spadek poziomu 1,4-difosforanu fosfatydyloinozytolu i nie wykryto zmian w zawartości zarówno 1-fosforanu inozytolu, jak też wolnego inozytolu, chociaż poziom wolnego inozytolu ulegał podwyższeniu w późniejszym czasie. Podobne do opisanych, zmiany w kinetyce przemian fosfatydyloinozytolu wykazano w przysadce mózgowej pod wpływem TRH, t.j. hormonu uwalniającego tytropinę [13].

A zatem stało się jasne, że zasadniczym substratem wykorzystywanym przez mechanizm receptorowy, a więc mechanizm stymulowany przez związki agonistyczne, jest 4,5-difosforan fosfatydyloinozytolu (jednakże nie wyklucza się udziału 4-fosforanu fosfatydyloinozytolu oraz samego fosfatydyloinozytolu), a fosfolipaza C, analogicznie do cyklazy adenylowej w układzie cyklicznych nukleotydów, najprawdopodobniej stanowi integralny element kompleksu receptorowego.

W ostatnich kilku latach opublikowano dziesiątki doniesień naukowych potwierdzających cytowane dane, jak również rozszerzających spektrum substancji agonistycznych mających zdoność do aktywowania fosfolipazy C i, co za tym idzie, stymulowania rozkładu 4,5-difosforanu fosfatydyloinozytolu do 1,4,5-trifosforanu inozytolu i diacyloglicerolu w wielu tkankach u różnych gatunków zwierząt (prace przeglądowe [1-4, 14, 15]). Tabele 1 i 2 zawierają wykaz substancji czynnych z uwzględnieniem (tam, gdzie to było możliwe) typu, lub podtypu, receptora związanego z przemianami fosfatydyloinozytolu.

Chociaż 1,4,5-trifosforan inozytolu i 1,2-diacyloglicerol wg opinii większości badaczy uchodzą za główne, jeśli nie jedyne produkty rozkładu 4,5-polifosfoinozytydu, to niektórzy autorzy w swoich najnowszych doniesieniach opisują powstawanie 1,3,4-trifosforanu inozytolu oraz 1,3,4,5-tetrafosforanu inozytolu. Kumulację tego nietypowego trifosforanu inozytolu opisano po raz pierwszy w gruczole ślinowym szczura po stymulacji receptorów muskarynowych [16]. Pochodzenie i rola tej pochodnej inozytolu są nieznane. Sugeruje się, że 1,3,4-trifosforan inozytolu mógłby powstawać w wyniku np. hydrolizy 3,4-difosforanu fosfatydyloinozytolu albo izomeryzacji 1,4,5-trifosforanu inozytolu. Z kolei 1,3,4,5-tetrafosforan inozytolu zidentyfikowano w stymulowanych związkami muskarynowymi skrawkach zarówno gruczołu ślinowego, jak i kory mózgowej szczura [17]. Źródłem tetrafosforanu inozytolu jest prawdopodobnie 1,4,5-trifosforan inozytolu, który ulega ufosforylowaniu w pozycji 3 przez specyficzną 3-kinazę [18]. Intensywność kumulacji tego nowozidentyfikowanego związku była na tyle duża, aby sugerować jego znaczenie w przemianach błonowych fosfoinozytydów. Nie jest wykluczone, że tetrafosforan inozytolu jest naturalnym prekursorem dla 1,3,4-trifosforanu inozytolu, bowiem jak wykazano 5-fosfataza (uzyskana z krwinek czerwonych) aktywnie katalizowała defosforylację (w pozycji 5) 1,3,4,5-tetrafosforanu inozytolu [17,

Tabela 1

Substancje aktywujące przemiany błonowych
fosfoinozytydów

Neuroprzekaźniki	Acetylocholina (M_1), Noradrenalina (α_1), Adrenalina (α_1), Histamina (H_1), Serotonina (HT_2).
Neuropeptydy	ACTH (hormon adrenokortykotropowy)(?), Wazopresyna (V_1), Angiotensyna II, Cholecystokinina, Gastryna, Bombesyna, Neurotensyna, Pankreozymina, Substancja P, Bradykinina, TRH (hormon tyotropowy)
Czynniki wzrostowe	PDGF (czynnik wzrostowy pochodzenia płytkowego), EGF (epidermalny czynnik wzrostowy), Mitogeny
Inne	Tromboksan, Trombina, Kolagen, PAF (czynnik aktywujący płytki krwi) Sekretogeny, Chemoatraktatyny, Depolaryzacja błon komórkowych wywołana jonami K^+ , Depolaryzacja błon komórkowych wywołana prądem

18]. Nowozidentyfikowane polifosforany inozytolu obecnie koncentrują na sobie uwagę uznanych ośrodków badawczych i w najbliższym czasie należy oczekiwać dalszych wyników dotyczących zarówno aspektów metabolicznych, jak i aktywności biologicznej tych związków.

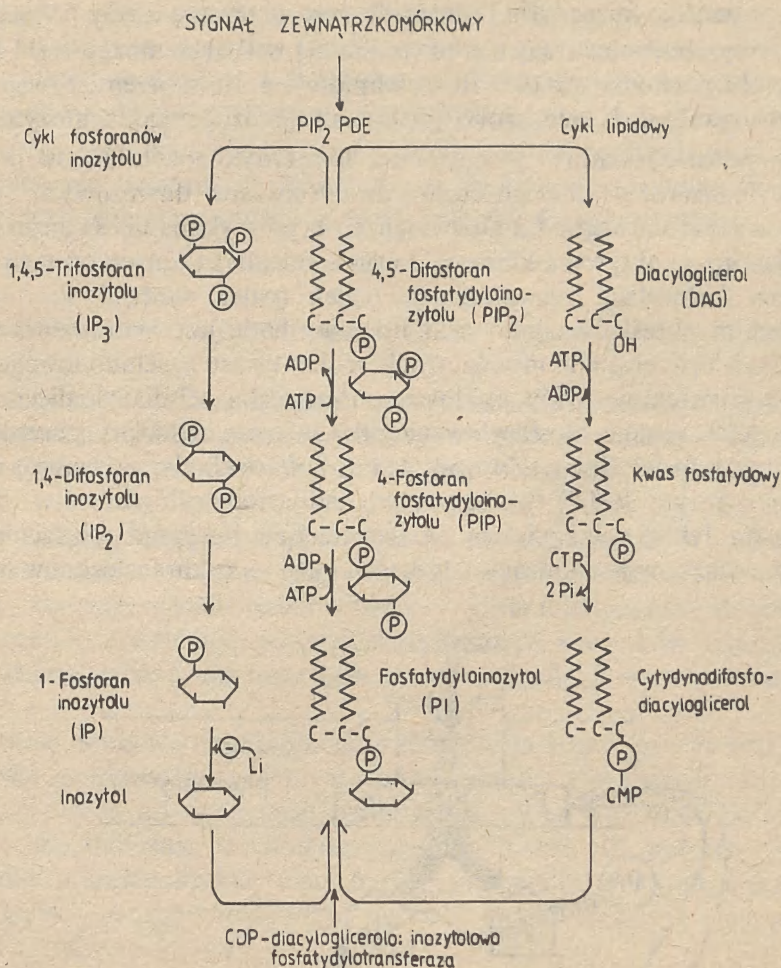
Można sobie wyobrazić, że stymulowany pobudzeniem receptorów błonowych rozkład polifosfoinozytydów mógłby szybko doprowadzić do zaburzeń

Czynniki aktywujące przemiany błonowych fosfoinozytydów w OUN

Neuroprzekaznik	Receptor	Lokalizacja
Acetylocholina	muskarynowy (M ₁ i M ₂)	większość obszarów mózgu, ale głównie kora mózgowa, hipokamp i prążkowie
Noradrenalina	α_1	większość obszarów mózgu, ale głównie kora mózgowa, hipokamp i pień mózgu; szyszynka
Adrenalina		
Serotonina	5HT ₂	kora mózgowa, hipokamp
Histamina	H ₁	większość obszarów mózgu, ale głównie kora mózgowa i mózdzek
Substancja P	SP-P, SP-E	podwzgórze, prążkowie, substancja czarna
Wazopresyna	V ₁	hipokamp, zwój górny szyjny
Neurotensyna		większość obszarów mózgu, ale głównie kora mózgowa i podwzgórze
Cholecystokinina		kora mózgowa
Światło	rodopsyna	siatkówka

w przemianach błonowych fosfatydyloinozytoli na skutek wyczerpania się zasobów odpowiednich substratów, a przede wszystkim inozytoli. Jednakże tak nie jest, albowiem magazyny błonowego inozytoli są stale uzupełniane w dwojaki sposób: 1) przez wychwyt tego związku z krwi, oraz 2) wskutek jego odzyskiwania z 1,4,5-trifosforanu inozytoli. Ta druga droga, która wydaje się mieć fundamentalne znaczenie, jest określana jako tzw. cykl fosforanów inozytoli i stanowi część zamkniętego cyklu przemian (obiegu) fosfatydyloinozytoli w błonie plazmatycznej (rys. 3). Polega ona na odszczepianiu grup fosforanowych z trifosforanu inozytoli (kolejno w pozycji 5, 4 i 1) w wyniku działania selektywnej dla każdego etapu fosfatazy [2, 19].

W organizmie znana jest jeszcze jedna droga przemian biochemicznych prowadząca do powstania nie inozytoli, ale 1-fosforanu inozytoli. Jest to synteza cząsteczki *de novo* z 6-fosforanu glukozy. Jednakże, utworzony w ten sposób ufosforylowany inozytol występuje w formie enancjomerycznej "l", podczas gdy pojawiający się cyklicznie w wyniku przemian fosfatydyloinozytoli 1-fosforan inozytoli występuje w formie enancjomerycznej "d". Jak wykazały badania Shermána i wsp. [20], przeprowadzone na korze mózgowej szczura, około 90% ogólnej zawartości 1-fosforanu inozytoli, który kumuluje się po selektywnym zablokowaniu (przez lit *) aktywności inozytolowej 1-fosfa-

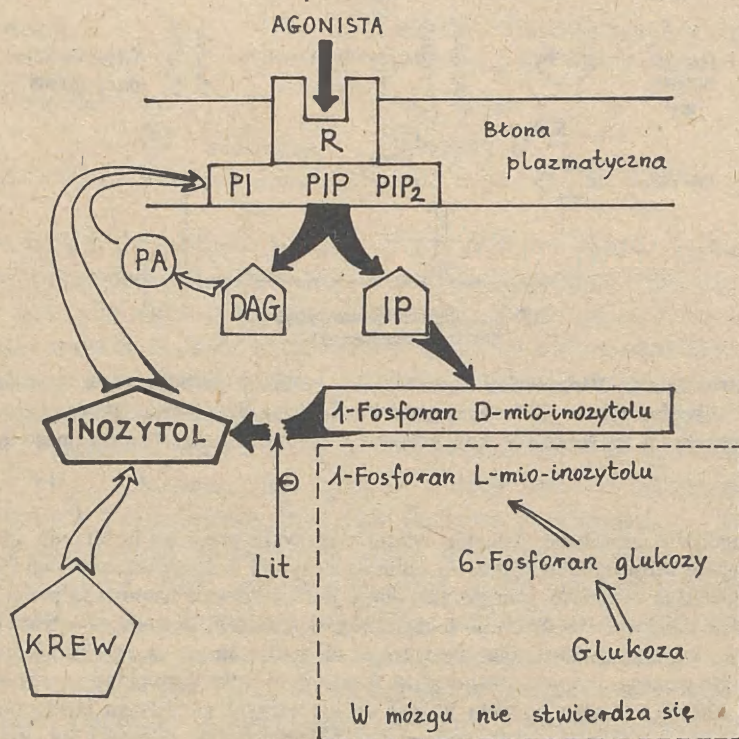


Rys. 3 Schemat przemian fosfatydyloinozytoli. PIP₂-PDE — fosfodiesteraza 4,5-difosforanu fosfatydyloinozytoli (fosfolipaza C; fosfoinozytydaza C). Jony litu hamują aktywność fosfatazy 1-fosforanu inozytoli i w ten sposób blokują przejście 1-fosforanu inozytoli do wolnego inozytoli

* Na szczególne podkreślenie zasługuje ostatni etap cyklu przemian fosforanów inozytoli, mianowicie przejście 1-fosforanu inozytoli do wolnego inozytoli. Reakcję defosforylacji katalizuje inozytolowa 1-fosfataza — enzym, którego aktywność jest selektywnie hamowana przez lit [21]. Zastosowanie litu uniemożliwia działanie inozytoliowej 1-fosfatazy, powodując wzrost stężenia przede wszystkim 1-fosforanu inozytoli (ale również di- i trifosforanu inozytoli) i jednocześnie obniżenie poziomu wolnego inozytoli, zarówno w tkankach ośrodkowego układu nerwowego jak i na obwodzie [20, 21]. Z tego powodu lit stał się użytecznym narzędziem farmakologicznym stosowanym w badaniu intensywności przemian fosfatydyloinozytoli, zależnych od pobudzenia odpowiednich receptorów błonowych tak *in vitro*, jak i *in vivo* [np. 21-24]. Wpływ litu na metabolizm fosfatydyloinozytoli w błonie plazmatycznej, jak również wynikające stąd implikacje dotyczące działania terapeutycznego soli tego metalu zostały obszerniej omówione w innej pracy autora tego artykułu [25].

tazy, reprezentuje formę "d". Ta zdecydowana przewaga formy "d" nad formą "l" wskazuje, że gromadzący się, przynajmniej w tkance mózgowej, 1-fosforan d-inozytolu pochodzi z rozkładu fosfolipidów, a nie z przemian węglowodanów. Na rysunku 4 zaznaczono główne drogi uzupełniania inozytolu.

W wyniku rozkładu 4,5-difosforanu fosfatydylinozytolu powstaje także 1,2-diacylglicerol — ester glicerolu i dwóch kwasów tłuszczowych, stearynowego i arachidonowego. 1,2-Diacylglicerol, po wykonaniu swojego zadania polegającego na aktywacji kinazy C i uruchomieniu zależnych od tego enzymu procesów fosforylacji odpowiednich białek (patrz rozdział V.2.), podlega przemianom określanym jako cykl lipidowy bądź jest hydrolizowany przez lipazę diacylglicerolu do monoacylglicerolu i kwasu arachidonowego (rys. 3). W pierwszym etapie cyklu lipidowego, cząsteczka 1,2-diacylglicerolu, przy udziale ATP, zostaje ufosforylowana przy węglu γ struktury glicerolu i powstaje kwas fosfatydowy. Związek ten z kolei wchodzi w reakcję z trifosforanem cytozyny (CTP) tworząc cytydynodifosfodiacylglicerol — strukturę gotową do dyfuzji z inozytalem. W tym miejscu następuje połączenie dwóch różnych związków pochodzących z dwóch cykli — cyklu fosforanów inozytolu



Rys. 4. Drogi uzupełnienia mio-inozytolu (inozytału). IP — fosforany inozytolu; DAG — diacylglicerol; PA — kwas fosfatydowy; PI — fosfatydylinozytol; PIP i PIP₂ — fosforany fosfatydylinozytolu

i cyklu lipidowego. Tak więc w wyniku działania błonowej transferazy (inna nazwa tego enzymu to syntetaza fosfatydyloinozytolowa) dochodzi do odtworzenia cząsteczki fosfatydylo-1-D-mio-inozytolu (fosfatydyloinozytolu). Jak już wspomniano w niniejszym rozdziale, fosfatydyloinozytol podlega dwukrotnemu ufosforylowaniu, tworząc kluczowy związek z punktu widzenia mechanizmu receptorowego, mianowicie 4,5-difosforan fosfatydyloinozytolu. W ten sposób cały cykl przemian (obieg) fosfatydyloinozytoli zostaje zamknięty.

III.2. PRZEMIANY FOSFOINOZYTYDÓW A WRAŻLIWOŚĆ RECEPTORÓW BŁONOWYCH: FAKTY I HIPOTEZY

Sprawność przemian biochemicznych na każdym z dyskutowanych etapów obiegu fosfatydyloinozytoli niewątpliwie rzutuje nie tylko na przepływ sygnału od jednostki recepcyjnej do elementu efektorowego kompleksu receptorowego, ale także na wrażliwość receptora (jako całości) na związki agonistyczne. I odwrotnie, z dużą dozą prawdopodobieństwa można założyć, że zarówno intensywna stymulacja receptora przez związki agonistyczne, jak również przedłużający się brak sygnału receptorowego — dwie funkcjonalnie przeciwstawne sytuacje — spowodują powstanie odmiennych warunków interakcji wszystkich elementów łańcucha łączącego receptor z fizjologiczną odpowiedzią komórki.

W literaturze naukowej można spotkać doniesienia sugerujące, że zmiany we wrażliwości receptora postsynaptycznego wynikające z przerywania impulsacji presynaptycznej, np. w sytuacji odnerwienia, mogą być spowodowane zmianami w metabolizmie fosfatydyloinozytoli [26-29]. W pracach tych brakuje jednakże szczegółowych danych eksperymentalnych wyjaśniających w sposób satysfakcjonujący molekularny mechanizm takich zmian i pozostaje nam, niestety, tylko spekulacja.

Można przypuszczać, że zmiany we wrażliwości receptora związanego z układem błonowych fosfolipidów będą pochodnymi zmian np. w stężeniu substratu fosfolipazy C, t.j. 4,5-difosforanu fosfatydyloinozytolu. Nawet niewielkie zmiany w aktywności kinazy lub fosfomonoesterazy mogą zaburzać równowagę między fosfatydyloinozytolem i jego ufosforylowanymi pochodnymi, dając w efekcie zmianę w wielkości puli 4,5-difosforanu fosfatydyloinozytolu dostępnej dla fosfolipazy C. Ponadto uruchomienie w komórce mechanizmów biochemicznych wpływających na całkowitą ilość polifosfoinozytydów mogłoby także prowadzić do zmian w zawartości 4,5-difosforanu fosfatydyloinozytolu. Istotność takich mechanizmów staje się większa po uwzględnieniu małych rozmiarów (np. około 8% w gruczole ślinowym owadów [30], czy 17% w komórkach nowotworowych sutka szczura [31]) puli fosfoinozytydów wrażliwych na działanie agoistów receptorów błonowych. W przypadku ślinianki owadów, zredukowanie wrażliwej na pobudzenie odpowiednich receptorów puli polifosfoinozytydów powodowało inaktywację sygnału mobili-

lizującego wewnątrzkomórkowe jony wapniowe. Efekt ten ustępował po odbudowaniu właściwej puli fosfolipidów [30].

Utrzymanie wrażliwej na hormony puli fosfatydyloinozytoli zależy od równowagi między szybkością rozkładu fosfoinozytydów (zależnego od pobudzenia receptorów błonowych) i szybkością ich syntezy. A zatem, intensywniejszej interakcji hormon-receptor musi towarzyszyć większa szybkość resyntezy substratów fosfolipidowych. Jest wysoce prawdopodobne, że zabezpieczenie odpowiednio wysokich poziomów inozytoli jest jednym z ważniejszych, jeśli nie najważniejszych czynnikami odpowiedzialnym za zachowanie równowagi, szczególnie przy intensywniej i długotrwałej stymulacji receptora. W tym aspekcie, ciekawą sytuację w organizmie musi wywoływać długotrwałe podawanie soli litu, np. u pacjentów cierpiących na chorobę maniako-depresyjną, czy u zwierząt doświadczalnych. Jak opisano wcześniej, jony litu hamują zarówno *in vitro*, jak i *in vivo* aktywność inozytolowej 1-fosfatazy, enzymu katalizującego konwersję 1-fosforanu inozytoli do wolnego inozytoli. Dane doświadczalne wskazują, że sole litu najskuteczniej obniżają poziom inozytoli w tych komórkach, w których stymulowany przez odpowiednie receptory błonowe rozkład polifosfoinozytydów jest szczególnie aktywny. Można zatem sądzić, że właśnie w tych komórkach będzie występowało największe zapotrzebowanie na inozytol — związek konieczny do resyntezy fosfoinozytydów (w tym m.in. 4,5-difosforanu fosfatydyloinozytoli) i zachowania prawidłowej czynności receptorów. Utrzymujące się pobudzenie receptorów błonowych w obecności jonów litu może doprowadzić do stopniowego obniżania w błonie komórkowej zawartości czynnego fosfatydyloinozytoli. Konsekwencją takiego efektu byłoby osłabienie wrażliwości tych mechanizmów receptorowych, w których fosfolipidy inozytoli odgrywają istotną rolę w przenoszeniu informacji międzykomórkowej przez błonę plazmatyczną.

III.3. ROLA BIAŁKA G W RECEPTOROWEJ STYMULACJI PRZEMIAN FOSFATYDYLOINOZYTOLU

Hormony, neuroprzekazniki i inne związki agonistyczne, zanim pobudzą komórkę do odpowiedzi fizjologicznej, muszą wejść w interakcję z receptorem błonowym. Łącząc się specyficznie z jednostką receptyjną kompleksu receptorowego, substancje te uruchamiają szereg procesów w błonie plazmatycznej prowadzących do aktywacji jednostki katalitycznej tego kompleksu receptorowego, którą najprawdopodobniej jest enzym fosfolipaza C. Ten szereg procesów, który łączy dwa peryferyjne elementy układu w jedną funkcjonalną całość, pozostaje, jak dotychczas, w większości niejasny.

Badania z zastosowaniem techniki wiązania radioaktywnych związków agonistycznych (znanych ze swoich właściwości stymulujących rozkład polifosfoinozytydów) do błonowych miejsc receptorowych wykazały, że w obecności nukleotydów guanylowych interakcja ligandów z receptorami podlegała mo-

dulacji polegającej na obniżaniu powinowactwa receptorów do swoistych agonistów. Ponadto, badania wpływu GTP i jego niehydrolizujących analogów, takich jak 5'-[β,γ -imido] trifosforan guanozyny (Gpp [NH] p) czy 5'-[γ -tio] trifosforan guanozyny (GTP γ S), zastosowanych samych lub w skojarzeniu ze związkami agonistycznymi na intensywność rozkładu 4,5-difosforanu fosfatydyloinozytolu, dostarczyły danych sugerujących istnienie związku między fosfolipazą C i tzw. białkiem G (zwanym inaczej białkiem wiążącym GTP lub białkiem N). W badaniach tych bowiem wykazano, że neuklotydy guanylowe wpływały pobudzająco (gdy zastosowane same) i/lub potencjalizowały stymulujące działania związków agonistycznych na aktywność fosfolipazy C [32-34].

Podobieństwo działania nukleotydów guanylowych w układzie fosfoinozytydów do efektów wywieranych przez te związki w dobrze poznanym układzie receptorowym związanym z syntezą cAMP [35-37] zrodziło sugestię, że GTP może odgrywać identyczną rolę w obydwu układach generujących drugie przekazywanie informacji. Rola ta ma polegać na aktywacji białka G. Sugeruje się, że na sygnał wynikający z interakcji hormon-receptor białko G (a właściwie jego jednostka α) przyłącza cząsteczkę GTP. Zaktywowane białko G (G_{α} -GTP) pełni funkcję pośrednika między jednostką receptyjną i katalityczną kompleksu receptorowego, który we wnętrzu błony plazmatycznej przenosi odpowiednią dla danego receptora informację. Z tego też względu białko G uważa się za integralną część receptora błonowego i określa mianem jednostki regulacyjnej kompleksu receptorowego. Rysunek 5 schematycznie przedstawia udział białka G w zależnych od pobudzenia receptora błonowego mechanizmach aktywujących: 1) fosfolipazę C, 2) cyklazę adenylową i 3) specyficzną dla cGMP fosfodiesterazę (w komórkach fotoreceptorowych).

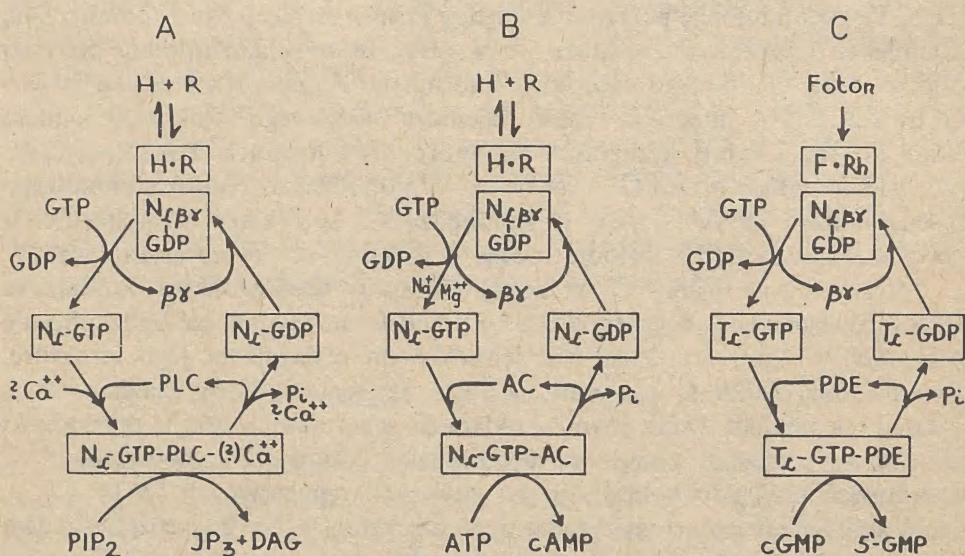
Miejsce i rola białka G w funkcjonowaniu "wzbudzonego" kompleksu receptorowego związanego z rozkładem polifosfoinozytydów nie budzi obecnie większych wątpliwości. Pozostaje jednakże do wyjaśnienia jego struktura. Pytanie, czy białko G jest uniwersalnym elementem błony plazmatycznej, a zatem elementem wymiennym w układach generujących drugie przekazywanie informacji, pozostaje wciąż bez definitywnej odpowiedzi, chociaż zaczyna dominować pogląd o heterogenności jednostek regulacyjnych [36].

W układzie receptorowym związanym z generacją cAMP wyróżnia się dwa rodzaje białek G określanych jako jednostki regulacyjne N_s i N_i . Pierwsza z nich (N_s) mediuje sygnał receptorów pobudzających tworzenie cAMP, np. receptorów β -adrenergicznych czy D_1 -dopaminowych, natomiast druga (N_i) bierze udział w przenoszeniu sygnału receptorów hamujących generację cAMP, np. receptorów α_2 -adrenergicznych, muskarynowych czy D_2 -dopaminowych (rys. 6).

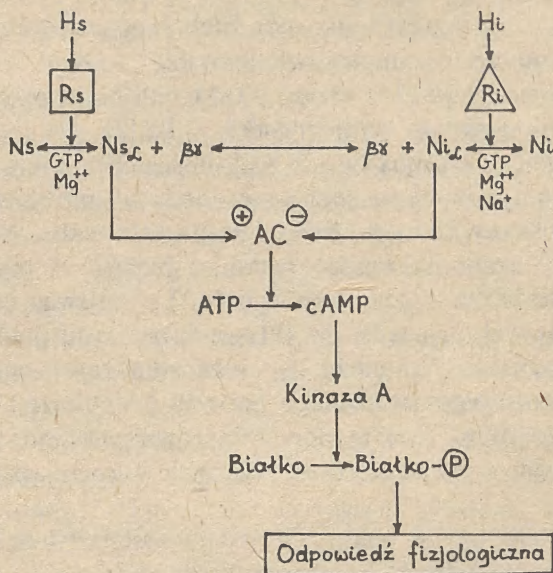
Badania oczyszczonych jednostek N_s i N_i wykazały istnienie wielu cech wspólnych: 1) każda z tych jednostek składa się z trzech podjednostek — α , β i γ , 2) obydwie jednostki wiążą GTP i jego analogi, 3) są substratami

ADP-rybozylotransferazy toksyn bakteryjnych: toksyny przecinkowca cholery (*Vibrio cholerae*) dla N_s oraz toksyny pałeczek krztuśca (*Bordetella pertussis*) dla N_i , 4) przyłączają jony magnezowe i 5) wykazują aktywność GTPazową. Zarówno N_s , jak i N_i , po przyłączeniu jonów magnezowych i GTP (lub Gpp [NH]p czy GTP γ S), dysocjują na podjednostki $N_{s\alpha}$ i $N_{i\alpha}$ mające związane nukleotydy guanylowe (struktury aktywne wobec jednostki katalitycznej systemu receptorowego) oraz na kompleksy złożone z podjednostek β - γ . Podjednostki $N_{s\alpha}$ i $N_{i\alpha}$ różnią się między sobą wspomnianą już wrażliwością na toksyny bakteryjne oraz masą cząsteczkową. W większości tkanek, podjednostka $N_{s\alpha}$ wykazuje heterogenność z przeważającą formą 41-42 kD (w mniejszych ilościach 51-52 kD), natomiast $N_{i\alpha}$ występuje zasadniczo w jednej formie 40-41 kD. Podjednostki β i γ obydwu komponentów są jeśli nie identyczne to bardzo zbliżone do siebie (masa cząsteczkowa około 35 kD dla β i 5-8 kD dla γ).

Innym scharakteryzowanym białkiem G jest tzw. transducyna. Białko to występuje w komórkach fotoreceptorowych siatkówki i jest aktywowane przez



Rys. 5. Przemiany białka G (białka N) w zależnych od pobudzenia receptora błonowego mechanizmach aktywujących: A — fosfolipazę C (PLC), B — cyklazę adenylową (AC) i C — specyficzną dla cGMP fosfodiesterazę (PDE) w komórkach fotoreceptorowych. H — hormon, neuroprzebieznik lub związek agonistyczny; R — jednostka receptyjna kompleksu receptorowego; H·R — kompleks (interakcja) hormonu z receptorem; F·Rh — zaktwowana światłem konformacja rodopsyny (tzw. metarodopsyna II). $N_{\alpha\beta\gamma}$ -GDP — białko G z przyłączoną do podjednostki α cząsteczką GDP (forma biologicznie nieaktywna); w komórkach fotoreceptorowych białkiem G jest transducyna (T); N_{α} -GTP, T_{α} -GTP — aktywna forma białka G; N_{α} -GTP-PLC, N_{α} -GTP-AC, T_{α} -GTP-PDE — aktywne jednostki katalityczne; N_{α} -GDP, T_{α} -GDP — nieaktywne podjednostki α białka G. Inne szczegóły w tekście



Rys. 6. Schemat działania receptora aktywującego (R_s) i hamującego (R_i) układ generujący cAMP. AC — cyklaza adenylova. Ns — białko G pobudzające; Ni — białko G hamujące. Szczegóły w tekście

wzbudzoną światłem konformację rodopsyny. Ma ono typową trzyczęściową strukturę złożoną z podjednostek α , β i γ , których masy cząsteczkowe wynoszą odpowiednio: 39, 36 i 8 kD. Transducyna ma wiele cech wspólnych z białkiem Ni.

W przeciwieństwie do stosunkowo dobrze poznanych jednostek regulacyjnych układu cyklazowego, t.j. jednostek Ns i Ni oraz biorącej udział w procesie wzbudzania wzrokowego transducyny, wiadomości o białku G układu fosfatydylinozytowego są, jak dotychczas, skąpe. Badania przeprowadzone na komórkach tucznych, neutrofilach i komórkach białaczkowych HL-60 wykazały, że zastosowanie toksyny krztuśca (która hamuje aktywność jednostki regulacyjnej Ni) obniżało zdolność związków agonistycznych do stymulacji rozkładu polifosfoinozytydów, sugerując podobieństwo jednostki regulacyjnej układu fosfatydylinozytowego do jednostki regulacyjnej hamującej (Ni) układu cyklazowego [34, 38]. Gdyby tak w istocie było, to jednostka Ni mogłaby pełnić podwójną rolę: 1) inhibitora aktywności cyklazy adenylowej i 2) aktywatora fosfolipazy C. Jednakże ostatnia praca Masters i wsp. [39] nie potwierdza identyczności obydwu białek G, przynajmniej w sercu kury i komórkach gwiazdki (astrocytoma), i dalsze badania są konieczne dla rozwiązania tego problemu.

Pod koniec 1984 roku dwie grupy badawcze [40, 41] zidentyfikowały w tkance mózgowej krowy nowe trzyczęściowe białko zbliżone w swojej

budowie do struktury znanych już jednostek regulacyjnych Ni, Ns i transducyny, które oznaczono tymczasowo jako białko No. Ustalono, że masa cząsteczkowa podjednostki No_α wynosi 39 kD, natomiast podjednostki β i γ są identyczne z analogicznymi podjednostkami białka Ns, Ni i transducyny. Białko to występuje w stosunkowo dużych ilościach w tkance mózgowej (jak dotychczas nie ma danych o jego obecności w innych tkankach) i jest substratem dla toksyny krztuśca. Fizjologiczna rola białka No nie jest znana, jednakże, jak wykazały najnowsze badania, białko to może współdziałać z receptorami muskarynowymi w mózgu [42]. Ponieważ stymulacja receptorów muskurynowych prowadzi do aktywacji rozkładu polifosfoinozytydów, spekuluje się, że białko No może być jednostką regulacyjną (białkiem G) kompleksu receptorowego związanego poprzez fosfolipazę C z przemianami błonowych fosfolipidów. Tezę tę popierają również najnowsze badania immunohistochemiczne wykazujące dużą zbieżność w rozmieszczeniu białka No i kinazy C [43].

Jest prawdopodobne, że białko G układu fosfatydyloinozytolowego jest białkiem swoistym mającym być może strukturę podobną do innych jednostek regulacyjnych, ale jednocześnie wyraźnie zachowującym odrębność funkcjonalną. Jest także prawdopodobne, że mamy do czynienia z różnicami gatunkowymi, jak również z różnicami zależnymi od rodzaju tkanki w obrębie tego samego gatunku.

III.4. PRZEMIANY FOSFOINOZYTYDÓW W TKANCE NERWOWEJ: NEURONY CZY KOMÓRKI GLEJOWE?

Badania "efektu fosfolipidowego" w ośrodkowym układzie nerwowym (OUN) w przeważającej części przeprowadzono na skrawkach różnych struktur mózgowych. Tkanka nerwowa charakteryzuje się dużą heterogennością komórkową, albowiem w jej skład wchodzi zarówno neurony, komórki glejowe, jak i gęsta sieć naczyń krwionośnych. Obecność w OUN tych wszystkich elementów komórkowych utrudnia analizę przemian fosfoinozytydów w ich aspekcie funkcjonalnym. Nie ma bowiem żadnych danych eksperymentalnych na podstawie których można by było sądzić, że tylko jeden z wymienionych kompartmentów komórkowych (np. neurony) ma odpowiednie receptory, pobudzenie których nasila przemiany fosfatydyloinozytolu. Wprost przeciwnie, są już liczne prace wskazujące na to, że przemiany fosfatydyloinozytolu zachodzą we wszystkich elementach komórkowych mózgu.

Badania przeprowadzone na "czystych" hodowlach tkankowych otrzymanych z komórek nerwowych lub też glejowych, jak również na uzyskanych z mózgu szczura oczyszczonych frakcjach subkomórkowych zawierających synaptozomy, wykazały, że pobudzenie receptorów muskarynowych i α_1 -adrenergicznym nasilało przemiany fosfatydyloinozytolu we wszystkich analizo-

wanych preparatach [44-48]. Bezpośrednie badania porównawcze przeprowadzone przez grupę *Crews* a [45] dostarczają danych podkreślających wielokrotnie szybszy obrót błonowych fosfolipidów w uzyskanej z mózgu szczura hodowli komórek nerwowych (zawierających 75-80% komórek neuronalnych) w porównaniu z hodowlą komórek glejowych (zawierającej 98% komórek astrocytarnych i około 2% komórek oligodendrocytarnych). Tak np. inkubacja obydwu preparatów tkankowych z 1 mM karbacholu intensyfikowała przemiany fosfatydyloinozytolu około 30 razy silniej w neuronach. Jakościowo podobny, aczkolwiek słabiej wyrażony efekt obserwowano po zastosowaniu 75 μ M noradrenaliny (różnica 6 razy). Wyliczone wartości EC_{50} dla noradrenaliny i karbacholu w preparacie neuronalnym wynosiły 5,2 i 62 μ M, wykazując idealną zgodność z wartościami EC_{50} dla obydwu związków w skrawkach mózgowych (około 5 i 50 μ M [24, 49]).

Powyższe dane wskazują na to, że w komórkach neuronalnych pobudzenie receptorów muskarynowych i α_1 -adrenergicznych prowadzi do znaczącego "efektu fosfolipidowego" sugerując tym samym istotność tych zjawisk biochemicznych w procesach neuroprzekaznictwa.

Z kolei *Pea rce* i wsp. [46, 47] donoszą, że w otrzymanej z mózgu szczura hodowli komórek glejowych (zawierającej nie mniej niż 85% komórek astrocytarnych i 10-15% fibroblastów; nie stwierdzono obecności oligodendrocytów i neuronów) noredrenalina i karbachol stymulowały przemiany fosfatydyloinozytolu z wartościami EC_{50} wynoszącymi odpowiednio 4 i 22 μ M, a zatem wartościami niewiele różniącymi się od cytowanych wyżej danych dla skrawków mózgowych. Ci sami autorzy [46, 47] wykazali ponadto, że stymulowane pobudzeniem receptorów muskarynowych i α_1 -adrenergicznych przemiany błonowych fosfoinozytydów w hodowli komórek glejowych przebiegały podobnie w środowisku inkubacyjnym zawierającym jony wapniowe (2,5 mM $CaCl_2$), jak też w środowisku bezwapniowym; jednakże dodanie 0,5 mM EGTA do środowiska bezwapniowego hamowało przemiany fosfolipidów. Analogiczne wyniki prezentowali *Kendall* i *Nahorski* [50] w odniesieniu do efektów tych samych związków agonistycznych w skrawkach kory mózgowej szczura. O istniejącym podobieństwie między tkanką glejową (zawierającą głównie astrocyty) i skrawkami tkanki mózgowej świadczy również fakt, że w obydwu preparatach tkankowych, oprócz karbacholu i noradrenaliny, także serotonina i histamina nasilały przemiany fosfatydyloinozytolu, wykazując przy tym relatywnie podobną siłę działania: karbachol > noradrenalina >> serotonina > histamina [46, 47, 50]. Przytoczone dane sugerują pewien udział komórek glejowych w całkowitym odpowiedzi (t.j. stymulowanego pobudzeniem odpowiednich receptorów obrotu błonowych fosfolipidów) uzyskiwanych w badaniach przeprowadzonych w skrawkach mózgowych.

Wspomniana na początku podrozdziału, sieć mózgowych naczyń krwionośnych powinna być także brana pod uwagę w ogólnych rozważaniach

stymulowanego „efektu fosfolipidowego” w różnych częściach OUN, przynajmniej w odniesieniu do niektórych substancji agonistycznych. I tak w splocie naczyniowym mózgu szczura obserwowano istotne nasilenie przemian błonowych fosfoinozytydów po inkubacji preparatu tkankowego z serotoniną. Okazało się, że tkanka naczyniowa była wielokrotnie bardziej wrażliwa na działanie tego neuroprzekaźnika, niż kora mózgowa (wartości EC_{50} dla serotoniny wynosiły odpowiednio $46 \mu M$ i $540 \mu M$ [51]).

III.5. INTERAKCJA JONÓW POTASOWYCH ZE ZWIĄZKAMI STYMULUJĄCYMI PRZEMIANY FOSFATYDYLOINOZYTOLU

Interesujących wyników dotyczących tkanki mózgowej dostarczyły badania interakcji jonów potasowych (zastosowanych w stężeniach depolaryzujących błonę komórkową, t.j. powyżej $10 mM$) ze związkami stymulującymi przemiany fosfatydyloinozytolu. Silnie wyrażony efekt synergistyczny selektywnie obserwowano w odniesieniu do agonistów receptorów muskarynowych, takich jak acetylocholina, karchol czy oksotremoryna [52, 53]. Mechanizm leżący u podstaw tego zjawiska nie jest znany. Wyklucza się udział ewentualnie uwolnionego przez jony potasowe neuroprzekaźnika lub też neuromodulatora z magazynów presynaptycznych, ponieważ eliminacja jonów wapniowych ze środowiska inkubacyjnego nie wpływała na rejestrowany „efekt fosfolipidowy” [53]. Sugeruje się, że związki muskarynowe oraz jony potasowe działają na różnych etapach przenoszenia sygnału błonowego. Związki muskarynowe wchodzi w interakcję z jednostką recepcyjną kompleksu receptorowego i w ten sposób inicjują kaskadę reakcji prowadzących do aktywacji fosfolipazy C, zaś jony potasowe w nieznanym dotychczas sposób „uczulają” elementy łańcucha: receptor-efektor, zwiększając efektywność mechanizmów pośrednich (np. przez wpływ na jednostkę regulacyjną kompleksu receptorowego) [53].

III.6. ŚWIATŁO JAKO CZYNNIK STYMULUJĄCY PRZEMIANY FOSFATYDYLOINOZYTOLU W SIATKÓWCE — ROLA TRIFOSFORANU INOZYTOLU W FOTOTRANSDUKCJI

Siatkówka wraz z nerwem wzrokowym są wypustką mózgu i, według danych embriologicznych, morfologicznych i czynnościowych, stanowią integralną część OUN. Komórki fotoreceptorowe (t.j. pręciki i czopki) odbierają bodźce świetlne i przekształcają je w impulsy nerwowe, które są przekazywane do komórek dwubiegunowych i następnie do komórek zwojowych. W wyniku interakcji z komórkami horyzontalnymi i amakrynowymi informacja świetlna zostaje odpowiednio przekształcona i zintegrowana. Wytworzone impulsy nerwowe drogą aksonów komórek zwojowych opuszczają siatkówkę i przez ciała kolankowate boczne, promienistość wzrokową dochodzą do kory wzrokowej — struktury mózgu, w której następuje właściwe odczytanie pierwotnej informacji świetlnej (np. [54]).

W siatkówce, podobnie jak w tkance mózgowej, głównymi składnikami błonowych lipidów są fosfolipidy, które stanowią około 75% całkowitej zawartości lipidów, i cholesterol (10-12%). Pozostałe składniki to obojętne glicerydy, wolne kwasy tłuszczowe i gangliozydy. W grupie fosfolipidów naczelnie miejsca zajmują: fosfatydylocholina (40-50%), fosfatydyloetanoloamina (30-35%) i fosfatydyloseryna (5-10%); fosfatydyloinozytol stanowi zaledwie 3-6%.

Pomimo stosunkowo małej zawartości fosfatydyloinozytolu w siatkówce jego znaczenie dla funkcji tej tkanki podkreśla fakt, że właśnie ten fosfolipid jest stosunkowo szybko syntezowany z [^{14}C] glicerolu czy [^3H] kwasu arachidonowego [55, 56]. W badaniach, zarówno *in vitro* jak i *in vivo*, stwierdzono, że w siatkówce okres półtrwania fosfatydyloinozytolu jest znacznie krótszy od okresu półtrwania np. fosfatydylocholiny, czy fosfatydyloetanoloaminy [56].

Przemiany fosfatydyloinozytolu w siatkówce kręgowców są analogiczne do przemian tego fosfolipidu w tkance mózgowej [55-58] i w związku z tym nie będą tutaj dodatkowo omawiane. Uwaga, natomiast, zostanie skoncentrowana na wpływie światła na przemiany fosfatydyloinozytolu.

Pierwsze dane doświadczalne mówiące o stymulującym działaniu światła na syntezę fosfoinozytydów pochodzą z roku 1976. W swojej pracy B a z a n i, B a z a n (zob. [55]) opisali indukowany światłem wzrost [^{14}C] glicerolipidów po inkubacji siatkówki żaby z radioaktywnym glicerolem. Autorzy pracy zwracali uwagę na dwa związki, które najsilniej kumulowały się pod wpływem stymulacji świetlnej; były nimi fosfatydyloinozytol i kwas fosfatydowy.

Kolejnych wyników dostarczyły badania wykonane przez A n d e r s o n a i H o l l y f i e l d a [56, 59]. Doświadczenia przeprowadzone na izolowanej siatkówce żaby wykazały aktywujący wpływ światła na wbudowywanie [^3H] inozytolu do fosfoinozytydów. Wykorzystując technikę autoradiografii, badacze ci stwierdzili, że stymulowana światłem inkorporacja radioaktywnego inozytolu była szczególnie intensywna w warstwie spłotowatej zewnętrznej siatkówki i dotyczyła przede wszystkim komórek horyzontalnych.

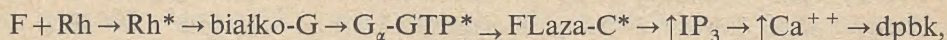
Prowadząc szczegółowe badania *in vitro* na adaptowanych do ciemności siatkówkach szczura (enukleacja i preparatyka tkanki przy ciemnoczerwonym oświetleniu), S c h m i d t [60] zaobserwowała dwa zależne od światła zjawiska, t.j. wzrost inkorporacji [^3H] inozytolu do fosfoinozytydów oraz nasilenie hydrolizy fosfatydyloinozytolu, które świadczyły o intensyfikacji przez bodziec świetlny obrotu fosfoinozytydów w siatkówce. Doświadczenia wykonane na wyizolowanej warstwie komórek fotoreceptorowych i na preparacie tzw. siatkówki wewnętrznej (części siatkówki pozbawionej czopków i pręcików) sugerują, że wbudowywanie radioaktywnego inozytolu oraz hydroliza fosfoinozytydów zachodzą w obydwu preparatach tkankowych, przy czym intensywność tych reakcji jest znacznie większa w komórkach fotoreceptorowych. Jest znamienne, że światło najbardziej nasilało obydwa procesy

biochemiczne właśnie w komórkach fotoreceptorowych, t.j. w kompartmentcie o wysokim obrocie fosfolipidów.

Mechanizm, na drodze którego światło stymuluje przemiany błonowych fosfoinozytydów w siatkówce kręgowców pozostaje niewyjaśniony. Jedynym znanym bezpośrednim efektem światła w siatkówce jest fotoizomeryzacja części chromoforowej rodopsyny — 11-cis-retinalu do trans-retinalu [54]. Ta zmiana konformacyjna cząsteczki retinalu powoduje szereg zmian w konfiguracji przestrzennej pigmentu wzrokowego (t.j. rodopsyny w pręcikach) i we wnętrzu komórek fotoreceptorowych uruchamia kaskadę reakcji biochemicznych (jedną z pierwszych reakcji jest aktywacja specyficznego białka G zwanego transducyną), prowadzących do zmiany potencjału błonowego (hiperpolaryzacji) pręcików i czopków, i w konsekwencji zahamowania wyrzutu neuroprzekaźnika z zakończenia synaptycznego komórek fotoreceptorowych. Dalším efektem tych zmian jest depolaryzacja lub hiperpolaryzacja innych siatkówkowych neuronów, co w całokształcie interakcji prowadzi do generacji ostatecznego impulsu nerwowego [54].

Wrażliwe na światło cząsteczki pigmentu wzrokowego z przyczepionymi do nich grupami chromoforowymi są usytuowane w błonie dysków — strukturach nie mających w fotoreceptorach pręcikowych bezpośredniego kontaktu z błoną komórkową. Można więc przyjąć, że musi istnieć jakiś związek chemiczny, który będzie pełnił rolę łącznika między procesami pierwotnymi przebiegającymi w błonie dysków i zjawiskami wtórnymi (t.j. zmianami w polaryzacji błony), zachodzącymi w błonie komórkowej fotoreceptorów. Przypuszcza się, że tym łącznikiem są cząsteczki cGMP albo jony wapniowe; jest prawdopodobne, że obydwie te substancje współdziałają ze sobą [54].

Światło nie stymuluje zatem bezpośrednio przemian fosfoinozytydów (i prawdopodobnie syntezy *de novo* fosfatydyloinozytolu), podobnie jak nie stymuluje bezpośrednio aktywności innych torów metabolicznych w komórkach fotoreceptorowych, np. katalizowanej przez fosfodiesterazę hydrolizy cGMP, fosforylacji rodopsyny, czy reakcji defosforylacji zależnych od GTPazy. Uważa się więc, że metaboliczna aktywność neuronów siatkówkowych jest pochodną zjawisk inicjowanych pochłonięciem fotonu przez cząsteczkę pigmentu wzrokowego. Fain [61] wraz z grupą Berridge'a [62, 63], na podstawie wyników własnych badań biochemicznych i elektrofizjologicznych przeprowadzonych na komórkach fotoreceptorowych skrzypłocza (*Limulus*), sugerują następującą sekwencję zjawisk:



gdzie: F — foton; Rh — rodopsyna; Rh* — aktywna konformacja Rh (najprawdopodobniej metarodopsyna II); $G_\alpha\text{-GTP}$ — aktywna podjednostka białka G; FLaza-C — fosfolipaza C; IP_3 — 1,4,5-trifosforan inozytolu; dpbk — depolaryzacja błony komórkowej.

Pochłonięcie fotonu przez rodopsynę aktywuje białko G, które następnie działa stymulująco na fosfolipazę C. W wyniku hydrolizy 4,5-difosforanu

fosfatydyloinozytolu dochodzi do nasilenia przemian fosfoinozytydów, wzrostu stężenia 1,4,5-trifosforanu inozytolu i mobilizacji wapnia z wewnętrznych magazynów komórki fotoreceptorowej. Uruchomione w ten sposób jony wapniowe miałyby oddziaływać na błonę komórkową fotoreceptorów, powodując zmianę jej polaryzacji.

Ponieważ ogólne procesy wzbudzenia wzrokowego u bezkręgowców są zasadniczo podobne do mechanizmów fototransdukcji u kręgowców, można sugerować, że przedstawiona sekwencja zjawisk ma znaczenie uniwersalne.

Niewyjaśnionym problemem pozostaje nadal struktura białka G biorącego udział w aktywowanej światłem generacji trifosforanu inozytolu. Uważa się, że transducyna (T) jest specyficznym białkiem wiążącym GTP, które ulega aktywacji przez wzbudzoną konformację rodopsyny [54]. Jednakże, według licznych danych literaturowych, transducyna, a właściwie jej funkcjonalnie czynna podjednostka T_{α} -GTP, stymuluje specyficzną dla cGMP fosfodiesterazę (PDE), co prowadzi do hydrolizy i obniżenia poziomu tego cyklicznego nukleotydu w komórkach pręcikowych [54]. Procesy te ilustruje schemat:

$F + Rh \rightarrow Rh^* \rightarrow T \rightarrow T_{\alpha}\text{-GTP}^* \rightarrow PDE^* \rightarrow \downarrow cGMP \rightarrow \text{hiperpolaryzacja-bk.}$

Nasuwa się zatem pytanie, czy transducyna jest białkiem G specyficznym dla rodopsyny, występującym w fotoreceptorach i biorącym udział w zależnej od światła aktywacji zarówno toru przemian fosfoinozytydów, jak i hydrolizy cGMP, czy też występują dwa niezależne i specyficzne dla każdego toru białka G? Jeżeli pierwsza część pytania jest prawdziwa to możnaby oczekiwać, że sugerowane jako specyficzne dla toru przemian błonowych fosfoinozytydów białko G, tzw. białko No, byłoby strukturą jeśli nie identyczną to zbliżoną do transducyny.

IV. WZAJEMNE RELACJE MIĘDZY PRZEMIANAMI FOSFATYDYLOINOZYTOŁU I WEWNĄTRZKOMÓRKOWYM WAPNIEM

Dane doświadczalne zgromadzone na przestrzeni wielu lat wskazują, że w wielu przypadkach hormony i neuroprzekazniki (sygnały komunikacji międzykomórkowej, pierwsze przekazniki informacji) wywierają swoje działania, jeśli nie w całości to przynajmniej w części, przez mobilizację wewnątrzkomórkowych jonów wapniowych. Z drugiej strony wiadomo, że liczne związki agonistyczne, które powodują wzrost stężenia wolnego wapnia w cytozolu komórki, przez interakcję ze specyficznymi receptorami stymulują również przemiany błonowych fosfoinozytydów. Czy zatem obserwowane po zastosowaniu tych samych związków agonistycznych dwa różne zjawiska, t.j. nasilenie przemian błonowych fosfolipidów i zmiany w poziomach cytozolowego wapnia, są wzajemnie (przyczynowo) ze sobą powiązane czy też przebiegają w sposób niezależny od siebie? Jeśli taki związek istnieje to należy sprecyzować czy zmiany w poziomach wapnia są konsekwencją przemian fosfatydyloinozytolu, czy też pierwotnym procesem jest mobilizacja dwukationu we wnętrzu

komórki z następującym wzrostem obrotu fosfoinozytydów. Te ostatnie rozważania implikują jeszcze jeden element. O ile można wyobrazić sobie, że jony wapniowe pierwotnie uwolnione z wewnątrzkomórkowych magazynów mogłyby stosunkowo łatwo penetrować w cytozolu i działać na fosfolipidy w błonie, o tyle sytuacja odwrotna jest trudniejsza do zobrazowania bez założenia, że istnieje hydrofilny czynnik uruchamiany w wyniku przemian fosfoinozytydów, który łączyłby zjawiska zachodzące w błonie plazmatycznej z wewnątrzkomórkowymi magazynami wapnia.

Pierwszą próbą zintegrowania licznych danych doświadczalnych, dotyczących stymulowanych pobudzeniem receptora błonowego przemian fosfatydyloinozytolu i zmian w poziomach cytozolowego wapnia, była przeprowadzona przez brytyjskiego biochemika i farmakologa Michella syntetyczna analiza faktów, która stała się podstawą do wysunięcia przez niego w roku 1975 sugestii, że za mobilizację wapnia z jego magazynów wewnątrzkomórkowych odpowiada hydroliza fosfoinozytydów [1]. Twórca hipotezy zakłada, że stymulowany pobudzeniem receptorów błonowych rozkład fosfatydyloinozytolu jest procesem, który wyprzedza zmiany w stężeniu wapnia we wnętrzu komórki, sugerując tym samym, że jest to zjawisko niezależne od wzrostu poziomu wolnego wapnia w cytozolu. Poniższy schemat przedstawia założenia hipotezy Michella:



gdzie: H — hormon, neuroprzekaznik lub związek agonistyczny; R — receptor; H-R — interakcja (kompleks) hormonu z receptorem; PI — błonowy fosfatydyloinozytol.

Ponieważ fosfolipaza C katalizuje rozkład polifosfoinozytydów, w myśl powyższej hipotezy można oczekiwać, że działanie enzymu będzie niezależne od obecności lub też zmian w stężeniu jonów wapniowych w środowisku inkubacyjnym. Badania *in vitro* przeprowadzone na enzymie uzyskanym z mózgu szczura (homogenat tkankowy) nie wykazały istotnego wpływu różnych stężeń jonów wapniowych (0,1-10 μM) na proces hydrolizy 4,5-difosforanu fosfatydyloinozytolu [64], dostarczając tym samym dowodu popierającego słuszność powyższej tezy.

Hipoteza Michella znalazła również poparcie w wynikach badań przeprowadzonych na preparatach różnych tkanek (zachowujących jednakże integralność komórkową), takich jak: wątroba, ślinianka przyuszna, gruczoł ślinowy owadów, komórki tuczne, płytki krwi czy bazoofile białaczkowe, w których stwierdzono, że stymulowany przez różnorodne związki agonistyczne proces hydrolizy fosfoinozytydów nie zależy od zmian stężenia wapnia cytozolowego [65-68].

We wcześniejszej części niniejszego artykułu omawiającego wielorakie aspekty przemian fosfoinozytydów zasygnalizowano, że spośród wielu związków chemicznych występujących w cyklu przemian fosfatydyloinozytolu, strukturami biologicznie czynnymi są produkty hydrolizy polifosfoinozytydów,

a mianowicie 1,4,5-trifosforan inozytoli (i być może inne polifosforany inozytoli) oraz 1,2-diacyloglicerol. Jednakże z tych dwóch produktów tylko trifosforan inozytoli wykazuje zdecydowaną aktywność wobec jonów wapniowych. W licznych pracach, opublikowanych w większości w ciągu ostatnich 2-3 lat, przedstawiono wyniki badań przeprowadzonych na materiale pochodzącym z różnych tkanek, dowodzących że 1,4,5-trifosforan inozytoli jest silnym liberatorem jonów wapniowych z niemitochondrialnych magazynów wewnątrzkomórkowych (najprawdopodobniej z retikulum endoplazmatycznego) [69-71]. Tak więc i te dane popierają zasadność hipotezy Michella. Jednocześnie stanowią one kluczowy argument wskazujący na fizjologiczną rolę trifosforanu inozytoli.

Omawiana hipoteza została jednakże sformułowana przez Michella zbyt ogólnie i w niedługim czasie po jej opublikowaniu stała się przedmiotem żywej krytyki. Bowiem, jak wykazali inni autorzy, m.in. Berridge [72], Cockcroft [73] i Hawthorne [74], znane są sytuacje odwrotne, np. w granulocytach obojętnochłonnych (tzw. neurofilach) czy płytkach krwi, gdzie właśnie wzrost stężenia jonów wapniowych w cytozolu stymulował rozkład fosfatydyloinozytoli. Ponadto w mięśni gładkich tęczówki aktywowany pobudzeniem receptorów muskarynowych i α_1 -adrenergicznych rozkład 4,5-difosforanu fosfatydyloinozytoli wymagał obecności jonów wapniowych w środowisku inkubacyjnym. Dodanie EGTA (związku chelatującego jony wapniowe) lub substancji blokujących translokację tego dwukationu zapobiegało działaniom związków cholinergiczych i adrenergicznych; jednakże efekty tych związków agonistycznych ponownie obserwowano po wprowadzeniu do środowiska inkubacyjnego jonoforu wapniowego — związku A23187 [75]. Innym przykładem są komórki tuczne; z jednej strony konkanawalina A stymulowała hydrolizę fosfatydyloinozytoli w sposób niezależny od obecności jonów wapniowych w środowisku reakcji, podczas gdy działanie ATP wymagało obecności tego dwukationu [76]. Powyższe wyniki sugerują istnienie w tej samej populacji komórek tucznych dwóch różnych mechanizmów stymulujących rozkład fosfatydyloinozytoli: 1) mechanizmu wapniowego i 2) mechanizmu receptorowego niezależnego od obecności wapnia.

Tak więc rozważania i dyskusje, jak również wyniki intensywnie prowadzonych badań w licznych laboratoriach na świecie (np. [10, 72, 73, 75, 77]), doprowadziły do wniosku, że w zależności od typu komórki lub też tkanki pierwotnym bodźcem pobudzającym przemiany fosfoinozytydów w błonie plazmatycznej może być zarówno interakcja związku agonistycznego z odpowiednim receptorem (ten mechanizm wydaje się funkcjonować w przeważającej liczbie przypadków), jak i wzrost poziomu wolnego wapnia w cytozolu (np. w odniesieniu do leukocytów, limfocytów, płytek krwi, czy mięśnia gładkiego tęczówki), przy czym nie wyklucza się możliwości współistnienia obydwu mechanizmów (np. w komórkach tucznych).

Na osobne omówienie zasługuje sytuacja jaka ma miejsce w mózgu. Otóż

wykazano, że w synaptozomach uzyskanych z kory mózgowej pobudzenie receptorów muskarynowych prowadzi do mobilizacji wapnia cytozolowego [78, 79]. Efekt ten wydaje się być działaniem pośrednim związków muskarynowych wynikającym z przemian fosfoinozytydów [44, 48]. Z kolei w skrawkach mózgu szczura karchabol — agonista receptorów muskarynowych — nasilał produkcję polifosforanów inozytoli w środowisku bezwapniowym, jednakże dodanie EGTA całkowicie blokowało tę odpowiedź [24].

W innych badaniach, w których skrawki kory mózgowej szczura inkubowano w środowisku bezwapniowym (usunięcie wapnia + 0,5 mM EDTA) z karbacholem, noradrenaliną, serotoniną i histaminą nie obserwowano tworzenia fosforanów inozytoli. Natomiast, w obecności niskich (10 μ M) stężeń wapnia w środowisku inkubacyjnym, stymulowana przez karbachol hydroliza polifosfoinozytydów w skrawkach mózgu szczura przebiegała bez zakłóceń; jednakże w tych samych warunkach doświadczalnych odpowiedź na pobudzenie receptorów H_1 -histaminowych była praktycznie zniesiona, a receptorów α_1 -adrenergicznych i HT_2 -serotoninowych zredukowana [50]. Nahorski i wsp. [50] sugerują, że w przypadku tkanki mózgowej do przebiegu stymulowanego przez aktywację receptorów błonowych procesu hydrolizy polifosfoinozytydów niezbędna jest obecność małych (μ M) ilości jonów wapniowych. Stwierdza się jednakże duże zróżnicowanie receptorów w ich zapotrzebowaniu na jony wapniowe.

V. TRIFOSFORAN INOZYTOLU I DIACYLOGLICEROL JAKO DRUGIE PRZKAŹNIKI INFORMACJI

Jak przedstawiono w poprzednich rozdziałach niniejszego artykułu, pobudzenie przez związki agonistyczne pewnych typów receptorów, np. α_1 -adrenergicznych i cholinergicznych muskarynowych (pełniejszy wykaz receptorów zawierają tabele 1 i 2), prowadzi do aktywacji fosfolipazy C i uruchomienia procesu przemian fosfatydylonizytopli w błonie plazmatycznej. Produktami hydrolizy polifosfoinozytydów, a przede wszystkim 4,5-difosforanu fosfatydylonizytopli, są fosforany inozytoli, wśród których naczelnie miejsce zajmuje 1,4,5-trifosforan inozytoli, oraz 1,2-diacyloglicerol. Według zgodnej opinii badaczy właśnie te dwa związki — trifosforan inozytoli i diacyloglicerol — odpowiadają klasycznym kryteriom stawianym drugim przekaźnikom informacji: 1) przetwarzają informację zewnątrzkomórkową na wewnątrzkomórkową, 2) są szybko syntetyzowane po pobudzeniu odpowiednich receptorów błonowych, 3) mają dużą aktywność biologiczną, oraz 4) ulegają szybkiej inaktywacji.

V.1. TRIFOSFORAN INOZYTOLU

Ze względu na swoje właściwości hydrofilowe 1,4,5-trifosforan inozytoli (IP_3) nie przechodzi łatwo przez błony komórkowe. Stąd, badania aktywności

biologicznej tego związku w preparatach tkankowych zachowujących integralność komórkową (np, skrawki tkankowe) nie należą do prostych, bowiem IP_3 podany do środowiska inkubacyjnego nie penetruje do wnętrza komórki.

Bariera ta została jednakże pokonana z chwilą znalezienia sposobu, przynajmniej w odniesieniu do niektórych tkanek, na zmniejszenie "szczelności" błony plazmatycznej umożliwiającej penetrację małych cząsteczek, m.in. IP_3 . Ponadto, w innych pracach wykorzystano "bezbłonowe" preparaty (frakcje) tkankowe wzbogacone w różne elementy subkomórkowe, w których badano bezpośrednie oddziaływania IP_3 .

W laboratorium Berridge'a wykazano, że inkubacja komórek wydzielniczych trzustki szczura w środowisku zawierającym małe stężenie jonów wapniowych powoduje zmiany w przepuszczalności błony plazmatycznej umożliwiające wejście egzogenego IP_3 do cytozolu pankreatocytów. Podobne zmiany w przepuszczalności błony plazmatycznej zaobserwowano w komórkach wątrobowych po ich inkubacji z saponiną. Używając tak przygotowanych preparatów tkankowych Berridge wraz ze wsp. [80, 81] wykazali, że egzogeny IP_3 , po wejściu do wnętrza pankreatocytów lub hepatocytów, powodował uwolnienie $^{45}Ca^{++}$ ze znakowanych wcześniej tym izotopem wewnątrzkomórkowych magazynów. Powyższe wyniki zostały szybko potwierdzone przez innych badaczy. Niemalże w tym samym czasie ukazały się prace pochodzące z innych laboratoriów, opisujące analogiczne działania IP_3 w kolejnych preparatach tkankowych, takich jak: neurofile, komórki nowotworowe uwalniające insulinę i prolaktynę, czy komórki przynacyniowych mięśni gładkich [82-84]. Dalsze badania przeprowadzone na subfrakcjach zawierających (lub wzbogaconych w) określone organelle komórkowe wykazały, że IP_3 uwalnia jony wapniowe z niemitochondrialnych magazynów, najprawdopodobniej z retikulum endoplazmatycznego (np. [70, 71]).

Analiza kinetyki działania IP_3 wskazuje, że ten hydrofilny produkt rozkładu 4,5-difosforanu fosfatydyloinozytolu powoduje znaczne uwolnienie jonów wapniowych z retikulum endoplazmatycznego już w ciągu zaledwie 2 sekund, a maksymalny efekt jest osiągany w 15-60 sekund (w zależności od rodzaju tkanki). Uwolnienie jonów wapniowych obserwuje się przy małych, submikromolowych stężeniach IP_3 . Efekt działania jest specyficzny dla trifosforanu, albowiem zarówno monofosforan (IP), jak i difosforan (IP_2) inozytolu pozostawały nieaktywne.

Tak więc proces mobilizacji wapnia przez IP_3 wydaje się być na tyle szybki i specyficzny aby sugerować, że jest on bezpośrednią odpowiedzią na zajęcie i pobudzenie odpowiednich receptorów błonowych przez związki agonistyczne.

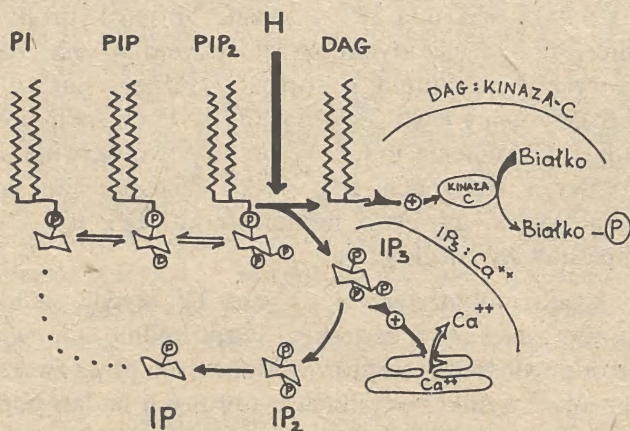
Podsumowując, wyniki wszystkich cytowanych badań popierają słuszność poglądu, że IP_3 jest czynnikiem łączącym przemiany błonowych fosfoinozytydów z magazynami wapniowymi we wnętrzu komórki. Wyniki te stanowią argument potwierdzający słuszność hipotezy, że pobudzenie określonych receptorów błonowych prowadzące do aktywacji fosfolipazy C, poprzez

rozkład 4,5-difosforanu fosfatydyloinozytolu i jednoczesną produkcję IP_3 oraz oddziaływania IP_3 na retikulum endoplazmatyczne, przyczynia się do wzrostów poziomu wapnia cytozolowego (rys. 7). W wyniku aktywacji kinazy zależnej od Ca^{++} i kalmoduliny dochodzi do ufosforylowania substratów białkowych tego enzymu i uruchomienia w ten sposób odpowiednich mechanizmów efektorowych komórki.

V.2. DIACYLOGLICEROL

1,2-Diacyloglicerol (DAG) jest drugim, obok IP_3 , produktem katalizowanego przez fosfolipazę C rozkładu 4,5-difosforanu fosfatydyloinozytolu. Jego obecność oraz szybka kumulacja, wynikająca z pobudzenia niektórych receptorów błonowych, opisano w wielu tkankach u różnych gatunków zwierząt. Tkanki te wymieniono we wcześniejszych rozdziałach tego artykułu przy okazji omawiania cyklu przemian fosfatydyloinozytolu i oddziaływań IP_3 ; bowiem wszędzie tam gdzie działa fosfolipaza C i powstaje IP_3 , tam również powstaje DAG (np. [2, 3, 85, 86]). Istnieje jednakże zasadnicza różnica między IP_3 i DAG, która determinuje miejsce działania obydwu drugich przekazników informacji. Mianowicie, IP_3 będąc związkiem hydrofilnym opuszcza błonę komórkową i działa w cytozolu, natomiast DAG jest strukturą hydrofobową i pozostaje w błonie plazmatycznej stanowiącej jego rejon działania.

DAG jest selektywnym i silnym aktywatorem jednej z kinaz białkowych, określanej obecnie mianem kinazy C; zatem DAG, podobnie jak i cAMP, cGMP oraz Ca^{++} (w kooperacji z kalmoduliną), jest stymulatorem procesów



Rys. 7. Schemat powstawania i działania trifosforanu inozytolu (IP_3) i diacyloglicerolu (DAG) w komórce. IP_3 uwalnia jony wapniowe z retikulum endoplazmatycznego — tor $\text{IP}_3/\text{Ca}^{++}$; DAG aktywuje kinazę C — tor DAG/kinaza C

fosforylacji określonych białek (patrz rys. 7). Tak jak można się spodziewać, w przypadku drugich przekaźników informacji, utworzona cząsteczka DAG jest szybko inaktywowana — związek ten albo powraca do cyklu przemian błonowych fosfoinozytydów (patrz rys. 3), albo podlega dalszej degradacji do kwasu arachidonowego, prekursora syntezy tromboksanów, prostaglandyn i leukotrienów [87]. Na przykład w płytkach krwi okres istnienia DAG jest krótszy niż 1 min.

Kinaza C jest enzymem występującym we wszystkich narządach organizmów żywych reprezentujących różne szczeble rozwoju filogenetycznego, m.in. u owadów, gryzoni i człowieka [2, 85]. Jak wykazały liczne badania, płytki krwi, tkanki ośrodkowego układu nerwowego, niektóre mięśnie gładkie i limfocyty są szczególnie bogate w ten enzym [85, 88, 89]. W mózgu duża część kinazy C jest odzyskiwana we frakcji synaptozomalnej, co sugeruje jej udział w procesach przekazywania synaptycznego [85, 89].

W większości tkanek w warunkach spoczynku kinaza C występuje w formie nieaktywnej, jako enzym cytozolowy lub luźno związany z błoną plazmatyczną. Pobudzenie receptorów błonowych uruchamiających kaskadę przemian fosfatydyloinozytolu powoduje uściślenie kontaktu kinazy C z błoną. Kontakt ten z kolei umożliwia interakcję DAG z enzymem. Aktywacja kinazy C przez DAG jest procesem złożonym, wymagającym, jako kofaktorów, jonów wapniowych i fosfolipidu (przede wszystkim fosfatydyloseryny). Badania *in vitro* przeprowadzone w laboratorium Nishizuki wykazały, że DAG powoduje dramatyczny wzrost powinowactwa kinazy C do obydwu kofaktorów — jonów wapniowych i fosfatydyloseryny, umożliwiając tym samym działanie enzymu przy fizjologicznych stężeniach dwukationu w środowisku reakcji [77, 85]. Inne eksperymenty tej samej grupy badawczej dostarczyły ciekawych danych na temat roli fosfolipidów w procesie aktywowania kinazy C przez DAG. Otóż w obecności fizjologicznego (t.j. $0,1 \mu\text{M}$) stężenia jonów wapniowych w środowisku reakcyjnym tylko fosfatydyloseryna aktywowała enzym, natomiast inne testowane fosfolipidy błonowe, które same nie wywierały efektu, nasilały lub też osłabiały działanie fosfatydyloseryny. I tak, skojarzenie fosfatydyloseryny z fosfatydyloetanoloaminą dawało dalszy wzrost aktywności kinazy C, podczas gdy zastąpienie fosfatydyloetanoloaminy fosfatydylocholiną lub sfingomieliną prowadziło do obniżenia aktywności enzymu. Fosfatydyloinozytol i kwas fosfatydowy nie modyfikowały działania fosfatydyloseryny. Na podstawie uzyskanych wyników Nishizuka i wsp. sugerują, że asymetryczne rozmieszczenie w błonie komórkowej różnych fosfolipidów sprzyja aktywacji kinazy C. Autorzy ci przypuszczają, że stopień aktywacji enzymu w warunkach fizjologicznych jest najprawdopodobniej całkowicie uzależniony od szybkości rozkładu polifosfoinozytydów i produkcji DAG, albowiem wydaje się mało prawdopodobne, aby w błonie plazmatycznej występowały niedobory fosfolipidów — kofaktora kinazy C [85].

W niektórych tkankach zidentyfikowano białko podlegające fosforylacji

katalizowanej przez kinazę C. Tak np. w płytkach krwi jest nim białko o masie cząsteczkowej 40 kD, którego fosforylację obserwuje się w trombocytach stymulowanych przez trombinę, kolagen i PAF (czynnik aktywujący płytki krwi) [85, 90]. Sugerowano ponadto, że w tkance nerwowej tzw. białko B50 (identyfikowane z białkiem F1) jest specyficznym substratem kinazy C [91]. Argumentem popierającym taką sugestię jest obserwacja prawie identycznego rozmieszczenia w różnych strukturach mózgowych kinazy C i białka B50 [89, 92]. Wykazano także, że szereg innych białek, jak np. synapsyna I, tzw. białko 87 kD obecne w cytozolu synaptozomów, czy białko związane z mikrotubulami, mogą być substratami kinazy C; jednakże fizjologiczne znaczenie reakcji fosforylacji tych białek pozostaje niejasne [90]. Poza wspomnianymi białkami kinaza C katalizuje fosforylację licznej grupy endogennych białek [93]. Można mieć nadzieję, że najbliższe badania rozstrzygną, które z nich są fizjologicznymi substratami tego enzymu. Tabela 3 zawiera wykaz białek substratowych kinazy C.

Tabela 3

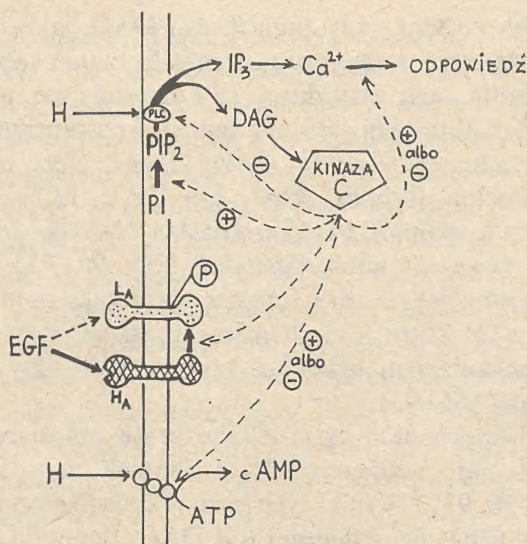
Znane białka substratowe dla kinazy C

BIĄŁKA RECEPTOROWE (agonista lub typ receptora)	insulina, somatomedyna C, EGF, transferyna, interleukina 2, IgE, receptor komórki T (limfocyty T) komplement, receptor β-adrenergiczny
ENZYMY	syntetaza glikogenowa, hydroksylaza tyrozynowa
BIĄŁKA CYTOSZKIELETOWE	meromiozyna (lekka), winkulina, wimentyna, białka wiążące aktynę
RÓŻNE	płytkowy polipeptyd 40 kD, neuronalny polipeptyd B-50, rybozomalny polipeptyd S-6, synaptozomalny polipeptyd 87 kD, synapsyna*

Do olbrzymiego postępu w badaniach roli DAG, jako drugiego przekaźnika informacji, przyczyniło się wprowadzenie do badań substancji naśladujących efekty działania tego związku i jednocześnie nie podlegających tak szybkiej jak DAG inaktywacji (lub eliminacji). Substancjami tymi są 1-oleinian-2-octan glicerolu, syntetyczny analog DAG, oraz estry forbolu (np. 12-mirystynian-13-octan forbolu, PMA lub TPA; 12,13-dimaślan forbolu, PDB; 12,13-diocetan forbolu, PDA; 13-izomaślan 12-deoksyforbolu) — związki znane ze swych własności kancerogennych [85, 90, 93]. Zarówno 1-oleinian-2-octan glicerolu, jak i estry forbolu wywierają swoje działania przez aktywację kinazy C. Zatem, mechanizm działania tych substancji jest analogiczny z mechanizmem działania endogennego aktywatora kinazy C, a mianowicie DAG [85, 93].

W ostatnich 5 latach ukazały się liczne prace opisujące efekty działania estrów forbolu w najprzeróżniejszych wariantach doświadczalnych (prace pogładowe [3, 86, 90, 93]). Wyniki tych prac w dużym stopniu kształtują nasz obecny pogląd na temat fizjologicznej roli DAG. Sugerują one, że w warunkach fizjologicznych DAG funkcjonuje bardziej jako modulator specyficznych procesów komórkowych, niż jako ich bezpośredni aktywator. Działania modulacyjne aktywatorów kinazy C dotyczą wielu zjawisk biologicznych, jak np. wzrostu nowotworowego i różnicowania komórek, uwalniania substancji o wysokiej aktywności biologicznej z elementów morfotycznych krwi, komórek sekrecyjnych i skrawków tkanki mózgowej, oraz procesów błonowych, np. zmian płynności błony plazmatycznej, wpływu na cykl przemian fosfatydilinozytoli, zmian funkcji receptorów błonowych. Rysunek 8 przedstawia schematycznie interakcje, zarówno pozytywne jak i negatywne, między układem DAG/kinaza C i niektórymi zjawiskami błonowymi.

Na uwagę zasługuje dualistyczny charakter interakcji układu DAG/kinaza C z zależnym od pobudzenia receptorów β -adrenergicznych układem generującym cAMP. Badania przeprowadzone na różnych preparatach tkankowych wykazały, że obecność estrów forbolu w środowisku inkubacyjnym powodowała obniżanie odpowiedzi β -adrenergicznej. Sądzi się, że mechanizmem odpowiedzialnym za obserwowane zjawisko jest katalizowana przez kinazę C fosforylacja białka receptorowego i wynikająca stąd desensytyzacja receptora β -adrenergicznego [94, 95]. Z drugiej strony, w innych układach doświadczalnych, jak np. w komórkach białaczkowych S49, estry forbolu nasilały stymulowane przez izoprenalinę (agonistę receptorów β -adrenergicznych) tworzenie cAMP [96]. Podobny efekt w odniesieniu do 2-chloroadenozyny (agonisty receptorów adenozynowych) i forskoliny (związku bezpośrednio aktywującego cyklazę adenylową) obserwowano w preparacie "częsteczkowym" kory mózgowej świnki morskiej [97]. Ponadto w gruczole szyszynkowym interakcja obydwu analizowanych układów drugich przekaźników informacji ma również charakter pozytywny, bowiem zarówno 1-oleinian-2-octan glicerolu, jak i estry forbolu potencjalizowały stymulujące kumu-



Rys. 8. Schemat działań modulatorych toru DAG/kinaza C. "—", działania hamujące; "+", działania pobudzające. Szczegóły w tekście

lację cAMP działania izoprenaliny w zawieszynie pinealocytów [98].

Aktywacja kinazy C prowadzi do zmiany we wrażliwości nie tylko receptorów β -adrenergicznych, ale także szeregu innych receptorów błonowych, m.in. insuliny, somatomedyny C, transferyny, EGF (epidermalny czynnik wzrostowy) czy receptorów α_1 -adrenergicznych. W przypadku receptorów EGF, katalizowana przez kinazę C fosforylacja białka receptorowego wywołuje obniżenie wrażliwości receptora wobec EGF, powodując jego przejście ze stanu dużego powinowactwa do stanu małego powinowactwa (np. [99]). Podobnie w wyniku fosforylacji białka receptorowego kompleksu receptora α_1 -adrenergicznego następuje jego desensytyzacja wobec związków agonistycznych, co uniemożliwia aktywację przemian fosfoinozytydów mediowaną właśnie przez tę klasę receptorów [100]. Wyniki innych badań przeprowadzonych na skrawkach aorty szczura sugerują, że estry forbolu, najprawdopodobniej przez aktywację kinazy C, zmniejszają wrażliwość receptorów 5HT₂, które w tej tkance stymulują obrót fosfatydyloinozytolu oraz mediuje skurcz jej mięśniówki [101].

Układ DAG/kinaza C wpływa także na cykl przemian fosfatydyloinozytolu, a więc na mechanizmy, które decydują o syntezie tego drugiego przekaźnika informacji. Efekty działania kinazy C są zróżnicowane i najprawdopodobniej zależą zarówno od rodzaju tkanki, jak i typu receptora błonowego. Wykazano, że aktywacja kinazy C może modulować procesy fosforylacji fosfoinozytydów, wpływając w ten sposób na ilość czynnego substratu fosfolipazy C. W mózgu działania te są mediowane pośrednio, najprawdopodobniej przez wpływ na

tw. białko B50, które reguluje aktywność kinaz fosfatydyloinozytolu i 1-fosforanu fosfatydyloinozytolu [102] — enzymów odpowiedzialnych za syntezę 4,5-difosforanu fosfatydyloinozytolu. Ciekawych wyników dostarczyły badania efektów ACTH (hormonu adrenokortykotropowego). Otóż, hormon ten przez wpływ hamujący na aktywność kinazy C może wywierać działanie neuro-modulacyjne na przekąźnictwo synaptyczne. W efekcie dochodzi do zwiększenia ilości czynnego polifosfoinozytydu poprawiającego sprawność przepływu sygnału błonowego przenoszonego przez niektóre receptory [101, 103]. Analogiczny efekt zarejestrowano w komórkach neuroblastoma (klonu N1E-115), gdzie estry forbolu hamowały stymulowane przez receptory muskarynowe typu M_1 (ale nie M_2) tworzenie zarówno fosforanów inozytolu jak i cGMP [104]. Odwrotne do opisanych w tkance mózgowej i w aorcie szczura efekty aktywacji kinazy C obserwowano w tymocytach i trombocytach, gdzie estry forbolu nasilały tworzenie polifosfoinozytydów [105, 106]. Jednakże w wielu innych tkankach, np. ludzkich płytkach krwi, bazofilach białaczkowych, komórkach gwiaździstych oraz komórkach przysadki mózgowej, obecność estrów forbolu w środowisku inkubacyjnym powoduje znaczne hamowanie stymulowanego przez aktywację odpowiednich receptorów błonowych rozkładu 4,5-difosforanu fosfatydyloinozytolu [101].

Na podkreślenie zasługuje także synergistyczna interakcja między układami DAG/kinaza C i IP_3/Ca^{++} . Interakcja ta, opisana po raz pierwszy w płytkach krwi przez grupę Nishizuki [85], została wkrótce potwierdzona i rozszerzona na inne tkanki przez badaczy japońskich oraz naukowców z wielu laboratoriów na świecie (tabela 4).

Na przykład w tkance mózgowej ssaków, gdzie znajduje się wiele typów receptorów związanych funkcjonalnie z przemianami fosfoinozytydów, układ IP_3 -DAG miałby odgrywać rolę neuromodulacyjną, polegającą m.in. na wpływie na reaktywność niektórych receptorów błonowych (tor DAG/kinaza C; patrz tabela 3 oraz rys. 8), czy też otwieraniu (tor IP_3/Ca^{++}) bądź zamykaniu (tor DAG/kinaza C) kanałów jonowych — głównie kanałów potasowych aktywowanych jonami wapniowymi (np. [107, 108]). Te ostatnie zjawiska mogłyby prowadzić do powstawania długotrwałych zmian plastycznych zaangażowanych w fenomenie pamięci.

Zjawiska jonowe indukowane produktami rozkładu błonowych polifosfoinozytydów najprawdopodobniej kontrolują procesy podziału i proliferacji komórkowej. Wiadomo bowiem, że niektóre czynniki wzrostowe aktywują fosfolipazę C (patrz tabela 1), a wytworzone IP_3 i DAG wykorzystują do mobilizacji cytozolowego wapnia i aktywacji pompy Na^+/H^+ , która wymienia wewnątrzkomórkowy Na^+ , powodując alkalizację wnętrza komórki. Uważa się, że wzrost pH środowiska wewnątrzkomórkowego jest ważnym czynnikiem mitogennym, t.j. czynnikiem stymulującym podział komórki. Jest prawdopodobne, że właśnie ten mechanizm jonowy może funkcjonować w przypadku wzrostu nowotworowego indukowanego np. estrami forbolu. Zjawiska jonowe,

Tabela 4

Odpowiedzi fizjologiczne wywołane prawdopodobnie przez synergistyczne działanie aktywacji kinazy C i mobilizacji jonów Ca^{2+}

Tkanka	Odpowiedź fizjologiczna
Płytki krwi	uwolnienie serotoniny, uwolnienie enzymu lizosomalnego
Neutrofile	uwolnienie enzymu lizosomalnego
Rdzeń nadnerczy	sekrecja aldosteronu
Wysepki trzustki	sekrecja insuliny
Komórki groniaste trzustki	sekrecja amylazy
Komórki tuczne	uwolnienie histaminy
Nerwy cholinergiczne w jelitach	uwolnienie acetylocholiny
Hepatocyty	glikogenoliza
Limfocyty T	synteza DNA

które wynikają z (lub towarzyszą) patologicznej aktywacji układu IP_3 -DAG mogą być także odpowiedzialne za szybką transkrypcję onkogenów (takich jak fos, myc i innych), co prowadzi do proliferacji nowotworowej danej tkanki (np. [2, 85, 86, 90, 93, 109]).

O ile zjawiska synergistycznej interakcji układu IP_3 -DAG są znane i szeroko cytowane, o tyle szczegóły mechanizmu leżącego u podstaw tej interakcji pozostają wciąż do wyjaśnienia.

VI. ZAKOŃCZENIE

Przez długi czas niewiele wiadomo było o mechanizmach, na drodze których sygnał międzykomórkowy dociera do wnętrza komórki docelowej i aktywuje ją do wykonania specyficznej czynności, t.j. charakterystycznej dla danego typu komórki odpowiedzi fizjologicznej. Termin "czarna puszką" był często stosowany przez wielu badaczy w celu wypełnienia nieznanych ogniw w łańcuchu molekularnych zdarzeń łączących bodziec (np. hormon czy światło) z odpowiedzią fizjologiczną. Obraz sekwencji zjawisk leżących u podstaw komunikacji międzykomórkowej przybliżyło wprowadzenie i rozwinięcie koncepcji receptora błonowego (jako trzyczęściowego kompleksu) oraz drugih przekaźników informacji.

Pomimo stosunkowo wczesnej obserwacji nasilenia obrotu błonowych polifosfoinozytydów w wyniku pobudzenia szeregu receptorów, dopiero w ciągu ostatnich kilku lat nastąpił gwałtowny postęp w naszym rozumieniu tych

niezwykle istotnych zjawisk receptorowych. Obecnie wiadomo, że pobudzenie odpowiednich receptorów błonowych przez czynniki agonistyczne i wynikająca stąd aktywacja specyficznego białka G i fosfolipazy C prowadzi do hydrolizy 4,5-difosforanu fosfatydyloinozytolu i powstania IP_3 i DAG — dwóch kolejnych związków zaliczonych do grupy drugich przekaźników informacji. Pierwszy z nich (IP_3) przechodzi z błony komórkowej do cytoplazmy i uwalnia jony wapniowe z retikulum endoplazmatycznego, drugi (DAG) natomiast pozostaje w błonie gdzie aktywuje kinazę C. Obydwa zjawiska indukowane przez IP_3 i DAG prowadzą w efekcie do fosforylacji białek katalizowanych odpowiednio przez kinazę zależną od Ca^{++} i kalmoduliny oraz przez kinazę C. Uważa się, że tor IP_3/Ca^{++} jest bezpośrednio zaangażowany w aktywację wielu procesów komórkowych, podczas gdy tor DAG/kinaza C funkcjonuje głównie jako tor modulacyjny. Ten duet drugich przekaźników informacji tworzy elastyczny układ, który inicjuje i w niezwykle sprawny sposób kontroluje (razem z innymi drugimi przekaźnikami informacji) przebieg takich procesów fizjologicznych, jak: skurcz, sekrecja, metabolizm, transdukcja sensoryczna, zapłodnienie, czy wzrost i dojrzewanie komórki.

Należy oczekiwać, że dynamiczny rozwój badań nad błonowymi fosfolipidami pozwoli na pełniejsze zrozumienie ich biochemizmu, a także na wyjaśnienie roli jaką pełnią produkty hydrolizy polifosfoinozytydów (głównie IP_3 i DAG) w różnorodnych procesach fizjologicznych, jak i patologicznych przebiegających we wnętrzu komórki.

LITERATURA

1. Michell R. H. — *Inositol phospholipids and cell surface receptor function*. Biochem. Biophys. Acta 415: 81-147, 1975.
2. Berridge M. J. — *Inositol trisphosphate and diacylglycerol as second messengers*. Biochem. J. 220: 345-360, 1984.
3. Nishizuka Y. — *Turnover of inositol phospholipids and signal transduction*. Science 225: 1365-1370, 1984.
4. Nahorski S. R., Kendall D. A., Batty I. — *Receptors and phosphoinositide metabolism in the central nervous system*. Biochem. Pharmacol. 35: 2447-2453, 1986.
5. Hokin M. R., Hokin L. E. — *Enzyme secretion and the incorporation of ^{32}P into phospholipids of pancreas slices*. J. Biol. Chem. 203: 967-977, 1953.
6. Durell J., Sodd M. A., Friedel R. O. — *Acetylcholine stimulation of the phosphodiesteratic cleavage of guinea pig brain phosphoinositides* (cz. II). Life Sci. 7:363-368, 1968.
7. Abdel-Latif A. A., Akhtar R. A., Hawthorne J. N. — *Acetylcholine increases the breakdown of triphosphoinositide of rabbit iris muscle prelabelled with (^{32}P) phosphate*. Biochem. J. 162: 61-73, 1977.
8. Akhtar R. A., Abdel-Latif A. A. — *Requirement for calcium ions in acetylcholine-stimulated phosphodiesteratic cleavage of phosphatidyl-myo-inositol 4,5-bisphosphate in rabbit iris smooth muscle*. Biochem. J. 192: 783-791, 1980.
9. Creba J. A., Downes C. P., Hawkins P. T., Brewster G., Michell R. H.,

- Kirk C. J. — *Rapid breakdown of phosphatidylinositol 4-phosphate and phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate in rat hepatocytes stimulated by vasopressin and other Ca^{2+} -mobilizing hormones.* Biochem. J. 212: 733-747, 1983.
10. Michell R. H., Kirk C. J. — *Why phosphatidylinositol degraded in response to stimulation of certain receptors?* Trends Pharmacol. Sci. 3: 86-89, 1981.
11. Berridge M. J. — *Phosphatidylinositol hydrolysis: a multifunctional transducing mechanism.* Moll. Cell Endocrinol. 24: 115-140, 1981.
12. Berridge M. J. — *Rapid accumulation of inositol trisphosphate reveals phosphatidylinositol.* Biochem. J. 212: 849-853, 1983.
13. Rebecchi M. J., Gershengorn M. C. — *Thyroliberin stimulates rapid hydrolysis of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate by a phosphodiesterase in rat mammotropic pituitary cells.* Biochem. J. 216: 287-294, 1983.
14. Berridge M. J., Irvine R. F. — *Inositol trisphosphate, a novel second messenger in cellular signal transduction.* Nature 312: 315-321, 1984.
15. Farese R. V. — *Phosphoinositide metabolism and hormone action.* Endocrine Rev. 4: 78-95, 1983.
16. Irvine R. F., Letcher A. J., Lander D. J., Downes C. P. — *Inositol trisphosphate in carbachol-stimulated rat parotid glands.* Biochem. J. 223: 237-243, 1984.
17. Nahorski S. R., Batty I. — *Inositol tetrakisphosphate: recent developments in phosphoinositide metabolism and receptor function.* Trends Pharmacol. Sci. 7: 83-85, 1986.
18. Irvine R. F., Letcher A. J., Heslop J. P., Berridge M. J. — *The inositol tris/tetrakisphosphate pathway – demonstration of $\text{Ins} (1, 4, 5) \text{P}_3$ 3-kinase activity in animal tissues.* Nature 320: 631-634, 1986.
19. Downes C. P., Mussat M. C., Michell R. H. — *The inositol trisphosphate phosphomonoesterase of the human erythrocyte membrane.* Biochem. J. 203: 169-177, 1982.
20. Sherman W. R., Leavitt A. L., Honchar M. P., Hallcher L. M., Phillips B. E. — *Evidence that lithium alters phosphoinositide metabolism: chronic administration elevates primarily D-myo-inositol-1-phosphate in cerebral cortex of the rat.* J. Neurochem. 36: 1947-1951, 1981.
21. Berridge M. J., Downes C. P., Hanley M. R. — *Lithium amplifies agonist-dependent phosphatidylinositol response in brain and salivary glands.* Biochem. J. 206: 587-595, 1982.
22. Brown E., Kendall D. A., Nahorski S. R. — *Inositol phospholipid hydrolysis in rat cerebral cortical slices: I. receptor characterization.* J. Neurochem. 42: 1379-1384, 1984.
23. Daum P. R., Downes C. P., Young J. M. — *Histamine stimulation of inositol 1-phosphate accumulation in lithium-treated slices from regions of guinea pig brain.* J. Neurochem. 43: 25-32, 1984.
24. Gonzales R. A., Crews F. T. — *Characterization of the cholinergic stimulation of phosphoinositide hydrolysis in rat brain slices.* J. Neurosci. 4: 3120-3127, 1984.
25. Nowak J. Z. — *Blonowe fosfolipidy jako substrat dla terapeutycznego działania litu.* Psychiatr. Pol. 21: 199-205, 1987.
26. Downes C. P., Dibner M. D., Hanley M. R. — *Sympathetic denervation impairs agonist-stimulated phosphatidylinositol metabolism in rat parotid glands.* Biochem. J. 214: 865-870, 1983.
27. Janowsky A., Labraca R., Paul S. M. — *Noradrenergic denervation increases α_1 -adrenoceptor-mediated inositol-phosphate accumulation in the hippocampus.* Eur. J. Pharmacol. 102: 193-194, 1984.
28. Kendall D. A., Brown E., Nahorski S. R. — *α_1 -adrenoceptor-mediated inositol phospholipid hydrolysis in rat cerebral cortex: relationship between receptor occupancy and response and effects of denervation.* Eur. J. Pharmacol. 114: 41-52, 1985.
29. Zatz M. — *Denervation supersensitivity of the rat pineal to norepinephrine-stimulated (^3H) inositide turnover revealed by lithium and a convenient procedure.* J. Neurochem. 45: 95-100, 1985.

30. Fain J. N., Berridge M. J. — *Relationship between phosphatidylinositol synthesis and recovery of 5-hydroxytryptamine-responsive Ca^{2+} flux in blowfly salivary glands.* Biochem. J. 180: 655-661, 1979.
31. Monaco M. E. — *The phosphatidylinositol cycle in WRK-1 cells.* J. Biol. Chem. 257: 2137-2139, 1982.
32. Cockcroft S., Gomperts B. D. — *Role of guanine nucleotide binding protein in the activation of polyphosphoinositide phosphodiesterase.* Nature 314: 534-536, 1985.
33. Gonzales R. A., Crews F. T. — *Guanine nucleotides stimulate production of inositol triphosphate in rat cortical membranes.* Biochem. J. 232: 799-804, 1985.
34. Joseph S. K. — *Receptor-stimulated phosphoinositide metabolism: a role for GTP-binding proteins?* Trends Biochem. Sci. 10: 297-298, 1985.
35. Rodbell M. — *The role of hormone receptors and GTP-regulatory proteins in membrane transduction.* Nature 284: 17-22, 1980.
36. Gilman A. G. — *G proteins and dual control of adenylate cyclase.* Cell 36: 577-579, 1984.
37. Levitzki A. — *β -Adrenergic receptors and their mode of coupling to adenylate cyclase.* Physiol. Rev. 66: 819-854, 1986.
38. Molski T. F. P., Naccache P. H., Marsh M. L., Kermode J., Becker E. L., Sha'afi R. I. — *Pertussis toxin inhibits the rise in intracellular concentration of free calcium that is induced by chemotactic factors in rabbit neutrophils.* Biochem. Biophys. Res. Commun. 124: 644-650, 1984.
39. Masters S. B., Martin M. W., Harden T. K., Brown J. H. — *Pertussis toxin does not inhibit muscarinic receptor-mediated phosphoinositide hydrolysis or calcium mobilization.* Biochem. J. 227: 933-937, 1985.
40. Neer E. J., Lok J. M., Wolf L. G. — *Purification and properties of the inhibitory guanine nucleotide regulatory unit of brain adenylate cyclase.* J. Biol. Chem. 259: 14222-14229, 1984.
41. Sternweis P. C., Robishaw J. D. — *Isolation of two proteins with high affinity for guanine nucleotides from membranes of bovine brain.* J. Biol. Chem. 259: 13806-13813, 1984.
42. Florio V. A., Sternweis P. C. — *Reconstitution of resolved muscarinic cholinergic receptors with purified GTP-binding proteins.* J. Biol. Chem. 260: 3477-3483, 1985.
43. Worley P. F., Baraban J. M., Van Dop C., Neer E. J., Snyder S. H. — *G_0 , a guanine nucleotide-binding protein: immunohistochemical localization in rat brain resembles distribution of second messenger systems.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83: 4561-4565, 1986.
44. Brown-Mastes S., Harden T. K., Brown J. H. — *Relationships between phosphoinositide and calcium responses to muscarinic agonists in astrocytoma cells.* Mol. Pharmacol. 26: 149-155, 1984.
45. Gonzales R. A., Feldstein J. B., Crews F. T., Raizada M. K. — *Receptor-mediated inositide hydrolysis is a neuronal response: comparison of primary neuronal and glial cultures.* Brain Res. 345: 350-355, 1985.
46. Pearce B., Cambray-Deakin M., Morrow C., Grimble J., Murphy S. — *Activation of muscarinic and α_1 -adrenergic receptors on astrocytes results in the accumulation of inositol phosphates.* J. Neurochem. 45: 1534-1540, 1985.
47. Pearce B., Morrow C., Murphy S. — *Receptor-mediated inositol phospholipid hydrolysis in astrocytes.* Eur. J. Pharmacol. 121: 231-243, 1986.
48. Van Rooijen L. A. A., Traber J. — *Muscarinic cholinergic enhancement of inositide turnover in cerebral nerve endings is not mediated by calcium uptake.* Biochem. Pharmacol. 35: 2715-2720, 1986.
49. Gonzales R. A., Crews F. T. — *Cholinergic and adrenergic stimulated inositide hydrolysis in brain: interaction, regional distribution and coupling mechanisms.* J. Neurochem. 45: 1076-1084, 1985.
50. Kendall D. A., Nahorski S. R. — *Inositol phospholipid hydrolysis in rat cerebral cortical slices: II. Calcium requirement.* J. Neurochem. 42: 1388-1394, 1984.
51. Conn P. J., Sanders-Bush E., Hoffman B. J., Harting P. R. — *An unique serotonin*

- receptor in choroid plexus is linked to phosphatidylinositol turnover. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 83: 4086-4088, 1986.
52. Fowler C. J., O'Carroll A. M., Court J. A., Candy J. M. — Stimulation by noradrenaline of inositol phospholipid breakdown in the rat hippocampus: effect of ambient potassium concentration. *J. Pharm. Pharmacol.* 38: 201-208, 1986.
53. Eva C., Costa E. — Potassium ion facilitation of phosphoinositide turnover activation by muscarinic receptor agonists in rat brain. *J. Neurochem.* 46: 1429-1435, 1986.
54. Nowak J. Z. — The retina as a model neural tissue: comparative studies on retinal and brain aminergic mechanisms. *Pol. J. Pharmacol. Pharm.* 39: 451-482, 1987.
55. Bazan N. G. — Metabolism of phospholipids in the retina. *Vision Res.* 22: 1539-1548, 1982.
56. Anderson R. E., Hollyfield J. G. — Light stimulates phosphatidylinositol synthesis in the retina. *Biochem. Biophys. Acta* 665: 619-622, 1981.
57. Anderson R. E., Maude M. B., Pu G. A. W., Hollyfield J. G. — Effect of light on the metabolism of lipids in the rat retina. *J. Neurochem.* 44: 773-778, 1985.
58. Ghalayini A., Anderson R. E. — Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate light-mediated breakdown in the vertebrate retina. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 124:503-506, 1984.
59. Anderson R. E., Maude M. B., Kelleher P. A., Rayborn M. E., Hollyfield J. G. — Phosphoinositide metabolism in the retina: localization to horizontal cells and regulation by light and divalent cations. *J. Neurochem.* 41: 764-771, 1983.
60. Schmidt S. Y. — Light enhances the turnover of phosphatidylinositol in rat retinas. *J. Neurochem.* 40: 1630-1638, 1983.
61. Fain A. — Blockade of visual excitation and adaptation in *Limulus* photoreceptor by GDP- β -S. *Science* 232: 1543-1545, 1986.
62. Brown J. E., Rubin L. J., Ghalayini A. J., Tarver A. P., Irvine R. F., Berridge M. J., Anderson R. E. — Myo-inositol polyphosphate may be a messenger for visual excitation in *Limulus* photoreceptors. *Nature* 311: 160-163, 1984.
63. Fain A., Payne R., Corson D. W., Berridge M. J., Irvine R. F. — Photoreceptor excitation and adaptation by inositol 1,4,5-trisphosphate. *Nature* 311: 157-160, 1984.
64. Irvine R. F., Letcher A. J., Dawson R. M. C. — Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate phosphodiesterase and phosphomonoesterase activities of rat brain. *Biochem. J.* 218: 177-185, 1984.
65. Jones L. M., Michell R. H. — The relationship of calcium to receptor-controlled stimulation of phosphatidylinositol turnover. *Biochem. J.* 148: 479-485, 1975.
66. Cockcroft S., Gomperts B. D. — Evidence for a role of phosphatidylinositol turnover in stimulus-secretion coupling. *Biochem. J.* 178: 681-687, 1979.
67. Fain J. N., Berridge M. J. — Relationship between hormonal activation of phosphatidylinositol hydrolysis, fluid secretion and calcium flux in the blowfly salivary gland. *Biochem. J.* 178: 45-58, 1979.
68. Kirk C. J., Creba J. A., Downes C. P., Michell R. H. — Hormone-stimulated metabolism of inositol lipids and its relationship to hepatic function. *Biochem. Soc. Trans.* 9: 377-379, 1981.
69. Joseph S. K. — Inositol triphosphate: an intracellular messenger produced by Ca^{2+} mobilizing hormones. *Trends Biochem. Sci.* 9: 420-421, 1984.
70. Delfert D. M., Hill S., Pershadsingh H. A., Sherman W. R. — Myo-inositol 1,4,5-trisphosphate mobilizes Ca^{2+} from isolated adipocyte endoplasmic reticulum but not from plasma membranes. *Biochem. J.* 236: 37-44, 1986.
71. Dawson A. P., Comerford J. G., Fulton D. V. — The effect of GTP on inositol 1,4,5-trisphosphate-stimulated Ca^{2+} efflux from a rat liver microsomal fraction. *Biochem. J.* 234: 311-315, 1986.
72. Berridge M. J. — Receptors and calcium signalling. *Trends Pharmacol. Sci.* 1: 419-424, 1980.
73. Cockcroft S. — Does phosphatidylinositol breakdown control the Ca^{2+} -gating mechanism? *Trends Pharmacol. Sci.* 2: 340-342, 1981.

74. Hawthorne J. N. — *Is phosphatidylinositol now out of the calcium gate?* Nature 295: 281-282, 1982.
75. Abdel-Latif A. A. — *Metabolism of phosphoinositides*. W: *Handbook of neurochemistry*. Vol. 3. A. Lajtha (red.). Plenum Press, New York, str. 91-131, 1984.
76. Cockcroft S., Gomperts B. D. — *The ATP⁴-receptor of rat mast cells*. Biochem. J. 188: 789-798, 1980.
77. Takai Y., Kishimoto A., Kawahara Y., Minakuchi R., Sano K., Kikkawa U., Mori T., Yu B., Kaibuchi K., Nishizuka Y. — *Calcium and phosphatidylinositol turnover as signalling for transmembrane control of protein phosphorylation*. Adv. Cyclic Nucleotide Res. 14: 301-313, 1981.
78. Fisher S. K., Agranoff B. W. — *Calcium and the muscarinic synaptosomal phospholipid labelling effect*. J. Neurochem. 34: 1231-1240, 1980.
79. Fisher S. K., Agranoff B. W. — *Enhancement of the muscarinic synaptosomal phospholipid labelling effect by the ionophore A23187*. J. Neurochem. 37: 968-977, 1981.
80. Streb H., Irvine R. F., Berridge M. J., Schultz I. — *Release of Ca²⁺ from a nonmitochondrial intracellular store in pancreatic acinar cells by inositol-1,4,5-triphosphate*. Nature 306: 67-69, 1983.
81. Burgess G. M., Irvine R. F., Berridge M. J., McKinney J. S., Putney J. W. — *Actions of inositol phosphates on Ca²⁺ pools in guinea-pig hepatocytes*. Biochem. J. 224: 741-746, 1984.
82. Biden T. J., Prentki M., Irvine R. F., Berridge M. J., Wollheim C. B., — *Inositol 1,4,5-trisphosphate mobilizes intracellular Ca²⁺ from permeabilized insulin-secreting cells*. Biochem. J. 223: 467-473, 1984.
83. Prentki M., Wollheim C. B., Lew P. D. — *Ca²⁺ homeostasis in permeabilized human neutrophils — characterization of Ca²⁺-sequestering pools and the action of inositol 1,4,5-trisphosphate*. J. Biol. Chem. 259: 13777-13783, 1984.
84. Joseph S. K., Williams R. J., Corkey B. E., Matschinsky F. M., Williamson J. R. — *The effect of inositol trisphosphate on Ca²⁺ fluxes in insulin-secreting tumor cells*. J. Biol. Chem. 259: 12952-12955, 1984.
85. Nishizuka Y., Takai Y., Kishimoto A., Kikkawa U., Kaibuchi K. — *Phospholipid turnover in hormone in hormone action*. Recent Progr. Horm. Res. 40:301-341, 1984.
86. Drummond A. H., MacIntyre D. E. — *Protein kinase C as a bidirectional regulator of cell function*. Trends Pharmacol. Sci. 6: 233-234, 1985.
87. Feinstein M. B., Sha'afi R. I. — *Role of calcium in arachidonic acid metabolism and in the actions of arachidonic acid-derived metabolites*. Calcium and Cell Function 4:337-376, 1983.
88. Kuo J. F., Anderson R. G. G., Wise B. C., Mackerlova L., Salomansson I., Brockett N. L., Katoh N., Shoji M., Wrenn R. W. — *Calcium-dependent protein kinase: widespread occurrence in various tissues and phyla of the animal kingdom and comparison of effects of phospholipid, calmodulin and trifluoroperazine*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77: 7039-7043, 1980.
89. Worley P. F., Baraban J. M., Snyder S. H. — *Heterogenous localization of protein kinase C in rat brain: autoradiographic analysis of phorbol ester receptor binding*. J. Neurosci. 6: 199-207, 1986.
90. Nishizuka Y. — *The role of protein kinase C in cell surface signal transduction and tumor promotion*. Nature 308: 693-697, 1984.
91. Nelson R. B., Routtenberg A. — *Characterization of protein F1 (47 kD, 4.5 pI): A kinase substrate directly related to neuronal plasticity*. Exp. Neurol. 89: 213-224, 1985.
92. Oestreicher A. B., Zwiers H., Schotman P., Gispen W. H. — *Immunohistochemical localization of a phosphoprotein (B50) isolated from rat brain synaptosomal plasma membranes*. Brain Res. Bull. 6: 145-153, 1981.

93. Ashendel C. L. — *The phorbol ester receptor: a phospholipid-regulated protein kinase.* Biochem. Biophys. Acta 822: 219-242, 1985.
94. Sibley D., Nambi P., Peters J. R., Lefkowitz R. J. — *Phorbol diesters promote β -adrenergic receptor phosphorylation and adenylate cyclase desensitization in duck erythrocytes.* Biochem. Biophys. Res. Commun. 121: 973-979, 1984.
95. Kelleher D. J., Pessin J. E., Ruoho A. E., Johnson G. L. — *Phorbol ester induces desensitization of adenylate cyclase and phosphorylation of the β -adrenergic receptor in turkey erythrocytes.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81: 4316-4320, 1984.
96. Bell J. D., Buxton I. L. O., Brunton L. L. — *Enhancement of adenylate cyclase activity in S49 lymphoma cells by phorbol esters.* J. Biol. Chem. 260: 2625-2628, 1985.
97. Hollingsworth E. B., Sears E. B., Daly J. W. — *An activator of protein kinase C (phorbol-12-myristate-13-acetate) augments 2-chloroadenosine elicited accumulation of cyclic AMP in guinea pig cerebral cortical particulate preparations.* FEBS Lett. 184: 339-342, 1985.
98. Sugden D., Vanecek J., Klein D. C., Thomas T. P., Anderson W. B. — *Activation of protein kinase C potentiates isoprenaline-induced cyclic AMP accumulation in rat pinealocytes.* Nature 314: 359-361, 1985.
99. Brown K. D., Blay J., Irvine R. F., Heslop J. P., Berridge M. J. — *Reduction of epidermal growth factor receptor affinity by heterologous ligands: evidence for a mechanism involving the breakdown of phosphoinositides and the activation of protein kinase C.* Biochem. Biophys. Res. Commun. 123: 377-384, 1984.
100. Cotecchia S., Leeb-Lundberg L. M. F., Hagen P. O., Lefkowitz R. J., Caron M. G. — *Phorbol esters on α_1 -drenoceptor binding and phosphatidylinositol metabolism in cultured vascular smooth muscle cells.* Life Sci. 37: 2389-2398, 1985.
101. Roth B. L., Nakaki T., Chuang D. M., Costa E. — *5-Hydroxytryptamine₂ receptors coupled to phospholipase C in rat aorta: modulation of phosphoinositide turnover by phorbol ester.* J. Pharmacol. Exp. Ther. 238: 480-485, 1986.
102. Aloyo V. J., Zwiers H., Gispén W. H. — *Phosphorylation of B-50 protein by calcium-activated, phospholipid-dependent protein kinase.* J. Neurochem. 41: 649-653, 1983.
103. Jolles J., Zwiers H., Dekker A., Wirtz K. W. A., Gispén W. H. — *Corticotropin-(1-24)-tetracosapeptide affects protein phosphorylation and polyphosphoinositide metabolism in rat brain.* Biochem. J. 194: 283-291, 1981.
104. Kanba S., Kanba K. S., Richelson E. — *The protein kinase C activator, 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA), inhibits muscarinic (M_1) receptor-mediated inositol phosphate release and cyclic GMP formation in murine neuroblastoma cells (clone N1E-115).* Eur. J. Pharmacol. 125: 155-156, 1986.
105. Taylor M. V., Metcalfe J. C., Hesketh T. R., Smith G. A., Moore J. P. — *Mitogens increase phosphorylation of phosphoinositides in thymocytes.* Nature 312: 462-465, 1984.
106. Halenda S. P., Feinstein M. B. — *Phorbol myristate acetate stimulates formation of phosphatidylinositol 4-phosphate and phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate in human platelets.* Biochem. Biophys. Res. Commun. 124: 507-513, 1984.
107. Higashida H., Brown D. A. — *Two polyphosphatidylinositide metabolites control two K^+ currents in a neural cell.* Nature 323: 333-335, 1986.
108. Malenka R. C., Madison D. V., Andrade R., Nicoll R. A. — *Phorbol esters mimic some cholinergic actions in hippocampal pyramidal neurons.* J. Neurosci. 6: 475-480, 1986.
109. Vicentini L. M., Villereal M. L. — *Inositol phosphates turnover, cytosolic Ca^{++} and pH: putative signals for the control of cell growth.* Life Sci. 38: 2269-2276, 1986.

MIROSLAWA MEIZACKA

Instytut Farmakologii PAN
Kraków

PŁYNNOŚĆ MEMBRANY A STAN RECEPTORA BŁONOWEGO

Pojęcie płynność membrany biologicznej obejmuje kombinację rozmaitych ruchów cząsteczek lipidów i białek budujących daną błonę, a związanych z a) giętkością łańcuchów kwasowych fosfolipidów; b) boczną dyfuzją cząsteczek w płaszczyźnie błony; c) przejściem cząsteczki z fazy do fazy, co prowadzi do bocznej separacji faz; d) poprzeczną dyfuzją cząsteczek w wewnętrznej do zewnętrznej warstwy lipidowej. Nasilenie przynajmniej jednego z wymienionych ruchów prowadzi do wzrostu stanu nieuporządkowania (disorder) czyli upłynnienia (fluidization) podwójnej warstwy lipidowej membrany.

Płynność błony związana jest ściśle ze składem ilościowym i jakościowym lipidów budujących membranę. Duża zawartość lipidów sterydowych (cholesterolu) w stosunku do fosfolipidów, fosfatydylocholine (PC) w stosunku do fosfatydyloetanoloaminy (PE), fosfatydylo-N-metyloetanoloaminy (PEM), fosfatydyloseryny (PS) i fosfatydyloinozytolu (PI), wysoki poziom sfingomieliny w stosunku do lecytyny powodują usztywnienie membrany, sytuacja odwrotna nasila fluidyzację [1, 2].

Stopień nienasycenia kwasów tłuszczowych, wchodzących w skład lipidów błonowych, również określa płynność błony. Im wyższy stopień nienasycenia (w znaczeniu stosunek ilości nienasyconych kwasów tłuszczowych do nasyce-
nia kwasów tłuszczowych) tym większa fluidyzacja błony [1].

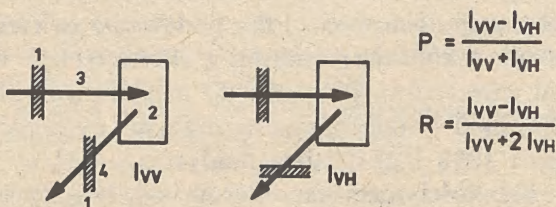
Fluidyzację błony można modulować sztucznie *in vivo* i *in vitro* przy użyciu odpowiednich substancji lipidowych. I tak podawanie zwierzętom diety bogatej w cholesterol lub inkubacja membran z cholesterolem względnie hydrofobowymi estrami cholesterolu prowadzi do usztywnienia błon, lecytyna lub preparat AL (active lipid — mieszanina naturalnych glicerydów zawierających ok. 20% lecytyny i 10% PE) działają fluidyzująco [3].

Do pomiaru płynności membran stosuje się, między innymi, rozmaite metody spektroskopowe, jak magnetyczny rezonans jądrowy (NMR) [4], rezonans spinu elektronowego (ESR) [5] lub pomiar spolaryzowanej fluorescencji emitowanej przez cząsteczki barwnika wbudowane w regiony hydrofobowe i hydrofobowo-hydrofilowe danej membrany [6, 7]. Intensywność spolaryzowanej fluorescencji emitowanej przez cząsteczki związanego z błoną

barwnika jest miarą ruchliwości tych cząsteczek w hydrofobowym otoczeniu membrany. Cząsteczki barwnika częściowo unieruchomione w sztywnej matrycy, którą stanowi fragment błony, pobudzone światłem spolaryzowanym emitują fluorescencję, która jest polaryzowana w płaszczyźnie równoległej lub prostopadłej do płaszczyzny polaryzacji światła pobudzającego. Im większa płynność membrany tym szybciej poruszają się cząsteczki barwnika podczas trwającej nanosekundy stanu pobudzenia cząsteczki i tym bardziej zredukowana jest intensywność spolaryzowanej fluorescencji wyrażonej wartością P — polaryzacja (polarization) lub r — anizotropia (anisotropy) (rys. 1). A zatem im większa fluidyzacja błony tym mniejsza wartość P lub r (zawsze mniejsza od jedności). Najczęściej stosowanym barwnikiem jest 1,6-dwufenylo-1,3,5-heksatrien (DPH), którego cząsteczka ma kształt pręta [8]. Nie wiadomo czy cząsteczki DPH po wnikięciu do błony są położone równolegle do łańcuchów kwasowych fosfolipidów, a więc równolegle do powierzchni błony, czy też są zorientowane prostopadle do powierzchni błony, nie wiadomo także czy dystrybucja DPH w błonie jest równomierna. Stubbbs i wsp. [7] używając membrany modelowej stwierdzili, że cząsteczki DPH rozmieszczone są równomiernie między zewnętrznymi i wewnętrznymi segmentami warstwy lipidowej, co sugeruje, że DPH określa stan płynności błony w różnych jej fragmentach w sposób równocenny. Nie potwierdzono jednak tych obserwacji w przypadku biomembrany i stąd niektórzy autorzy kwestionują rzetelność wyników uzyskanych metodą spolaryzowanej fluorescencji [8].

Inną metodą określania płynności biomembrany jest oznaczenie aktywności fosfolipido-N-metylotransferazy, enzymu metylującego fosfolipidy błonowe [9]. Jakkolwiek szybkość poprzecznej (wertykalnej) dyfuzji z warstwy do warstwy w błonie modelowej jest bardzo wolna [10] (ruch ten określany jest w literaturze anglosaskiej jako "flip-flop"), to wydaje się, że w biomembranie może ten proces zachodzić znacznie szybciej [11] i wg Hirata i Axelroda [12] oraz Goldsteina i Bretta [13] związany jest on z metylacją fosfolipidów błonowych.

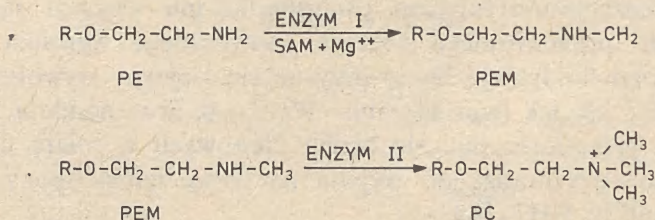
Proces metylacji fosfolipidów jest reakcją dwustopniową. Pierwszy etap



Rys. 1. Zasada pomiaru fluidyzacji błon metodą spolaryzowanej fluorescencji. 1 — polaryzatory; 2 — próbka; 3 — światło pobudzające; 4 — światło emitowane; I_{VV} — intensywność fluorescencji spolaryzowanej w płaszczyźnie równoległej do płaszczyzny światła pobudzającego; I_{VH} — intensywność fluorescencji spolaryzowanej w płaszczyźnie prostopadłej do płaszczyzny polaryzacji światła pobudzającego

katalizowany jest przez fosfolipido-N-metylotransferazę I i polega na wprowadzeniu jednej grupy metylowej do cząsteczki PE i wytworzeniu PEM. Enzym I ma bardzo duże powinowactwo do S-adenozylometioniny (SAM), a reakcja wymaga obecności jonów Mg^{++} . Etap drugi to metylacja PEM do PC. Proces ten katalizowany jest przez fosfolipido-N-metylotransferazę II charakteryzującą się niskim powinowactwem do SAM (rys. 2). Podczas metylacji fosfolipidów następuje ich przemieszczenie (flip-flop) z warstwy wewnętrznej błony do warstwy zewnętrznej. W świetle dotychczasowych wyników badań wykonanych w błonach retikulocytów wydaje się, że aktywacja fosfolipido-N-metylotransferazy I, która prowadzi do komulacji PEM, wywołuje upłynnienie błony, podczas gdy wzrost zawartości PC w stosunku do stężenia PE i PEM, a więc aktywacja enzymu II prowadzi do usztywnienia membrany [12, 13, 14].

Niektóre substancje egzogenne działają aktywująco lub hamująco na fosfolipido-N-metylotransferazę I, np. β -agoniści indukują, β -antagoniści hamują aktywność enzymu [14]. Inkubacja błon izolowanych z retikulocytów szczura z izoprenalina lub dwuhydroalprenolem wykazała wzrost fluidyzacji membran pod wpływem β -agonisty i usztywnienie pod wpływem β -antagonisty, co korespondowało z ich działaniem na aktywność fosfolipido-N-metylotransferazy. Równocześnie, w miarę usztywniania membrany rosła populacja receptorów β -adrenergicznych, natomiast fluidyzacja zmniejszała ich ilość [14]. Mechanizm "odsłaniania się" receptorów β -adrenergicznych w miarę usztyw-



Rys. 2. Schemat reakcji metylacji fosfatydyloetanolaminy (PE) do fosfatydylocholiny (PC) w biomembranie

niania membrany jest trudny do wytłumaczenia. Wg Borochova i Shinitzky'ego [15], w miarę spadku fluidyzacji błony dochodzi do wypychania na jej powierzchnię "ukrytych" we wnętrzu błony receptorów na skutek ciasnego upakowania cząsteczek lipidów w podwójnej warstwie lipidowej błony. Z kolei Strittmatter i wsp. [14] uważają, że "koziółkowanie" fosfolipidów doprowadza do zmiany mikroładunku elektrycznego w różnych regionach membrany, także w regionach sąsiadujących z "ukrytym" receptorem β -adrenergicznym, co z kolei miałoby doprowadzić do "odsłonięcia" tego receptora. Należy jednak pamiętać, że fluidyzacja błony nie zawsze prowadzi do spadku populacji receptorów β -adrenergicznych. Na przykład upłynnieniu błony izolowanej z hepatocytów towarzyszył wzrost specyficznego

wiązania dwuhydroalprenololu [16], a zmiana fluidyzacji membran erytrocytarnych indyka nie wpływała na ilość receptorów β -adrenergicznych w tych błonach [17]. Wydaje się zatem, że kierunek zmian w populacji receptorów β -adrenergicznych pod wpływem zmian fluidyzacji membrany zależy od geometrii receptora w aktualnie otaczającym go regionie lipidowym błony, najprawdopodobniej geometria ta jest różna w błonach izolowanych z różnych tkanek [18]. Ponadto wydaje się, że działanie usztywniające β -antagonistów obserwuje się w błonach zawierających niewiele cholesterolu, np. w błonach retikulocytów [14], natomiast w membranach bogatych w ten lipid sterydowy β -antagoniści mają działanie fluidujące [19].

Niewiele jest informacji na temat relacji między płynnością błony (określonej aktywnością fosfolipido-N-metylotransferazy), a stanem receptora dopaminowego. Z opublikowanych informacji wynika, że aktywacja fosfolipido-N-metylotransferazy I nie wpływa na receptor dopaminergiczny w prądkowiu myszy i nie zmienia płynności błony izolowanej z kory mózgowej myszy [13]. Wydaje się zatem, że w ośrodkowym układzie nerwowym (OUN), przynajmniej myszy, tylko w niektórych strukturach zmiany szybkości metylacji fosfolipidów błonowych prowadzą do zmiany fluidyzacji membran i do zmian w populacjach receptorowych.

Sporo informacji można znaleźć w literaturze na temat zależności między stanem receptora serotoninowego w OUN myszy i szczura, a płynnością błony [18]. Sztuczne usztywnienie membran izolowanych z mózgu myszy (inkubacja *in vitro* z benzylobursztynianem cholesterolu lub kwasem stearynowym) prowadziło do pięciokrotnego wzrostu specyficznego wiązania serotonininy (5-HT). Sztuczna fluidyzacja błony przy użyciu lecytyny wywoływała statystycznie zmienny spadek tego wiązania. Wyniki te korespondują z koncepcją wertykalnego przemieszczania się białek błonowych w miarę usztywniania membrany, co doprowadza do wyjścia na powierzchnię błony "ukrytych" w niej receptorów 5-HT [13].

Badania Herona i wsp. [3] wykazały, że stan receptorów opiatowych znakowanych [^3H]D-Ala-enkefaliamidem (DAEA), zależy od płynności membrany, na której zlokalizowane są te receptory. Fluidyzacja membran lecytiną wywoływała spadek specyficznego wiązania DAEA, inkubacja błon z cholesterolem prowadziła do istotnego wzrostu tego wiązania, a więc podobnie, jak w przypadku receptora 5-HT, usztywnienie membrany zwiększyło ilość specyficznych miejsc wiążących DAEA. W badaniach tych użyto błon mitochondrialnych izolowanych z przodomózgowie myszy [3].

Nie stwierdzono natomiast zmian w wiązaniu ^3H -flunitrazepamu (receptor benzodwazepinowy) i ^3H -benzylanu 3-chinuklidyny (QNB) (receptor acetylocholinowy) do membran synaptycznych po ich uprzednim sztucznym usztywnieniu [20] (tab. 1).

Zmiana fluidyzacji błony związana z kumulowaniem się PC (aktywacja metylazy II) prowadzi do zmian w aktywności niektórych enzymów błono-

Tabela 1

Wpływ usztywnienia membrany na wiązanie specyficzne niektórych ligandów. Błony izolowano z retikulocytów (R) lub mózgu (M) szczura (wg Shinitzky'ego [20])

Ligand	Wiązanie specyficzne
^3H -dwuhydroalprenolol	wzrost (R)
^3H -serotonina	wzrost (M)
^3H -nalokson	wzrost (M)
^3H -D-Ala-enkefalinamid	wzrost (M)
^3H -flunitrazepan	b.z. (M)

wych. I tak, usztywnienie błony hamuje aktywność ATP-azy Na^+ i K^+ oraz ATP-azy Ca^{2+} , a także cyklazy adenyłowej i fosfolipyzy A_2 , natomiast aktywuje cholesteroloacetylotransferazę [20] (tab. 2).

Kompleksowe badania R i m o n a i w sp. [21] zależności między płynnością

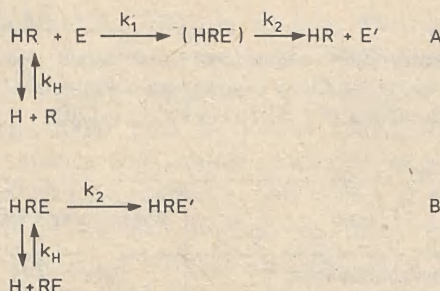
Tabela 2

Wpływ usztywnienia membrany na aktywność niektórych enzymów błonowych (błony izolowano z erytrocytów szczura) (wg Shinitzky'ego [20])

Enzym	Aktywność enzymu
ATP-aza Na^+ , K^+	spadek
ATP-aza Ca^{++}	spadek
Cyklaza adenyłowa	spadek
Fosfolipaza A_2	spadek
Cholesteroloacetylotransferaza	wzrost

membrany, a aktywnością cyklazy adenyłowej wykazały, że w przypadku cyklazy aktywowanej adrenaliną receptor i enzym prawdopodobnie "pływają" w membranie, a szansa połączenia jednostki regulacyjnej receptora i jednostki katalitycznej enzymu rośnie w miarę wzrostu płynności błony (collision coupling). Natomiast w przypadku cyklazy katalizowanej adenozyną, receptor i enzym połączone są na stałe (permanent coupling), a zatem zmiana fluidyzacji błony nie wpływa na aktywność enzymu (rys. 3).

Niektóre substancje, jak insulina, serotonina, acetylocholina, nikotyna, ACTH zmieniają płynność biomembran. Insulina usztywnia membrany komó-



Rys. 3. Mechanizm interakcji między jednostką regulacyjną receptora i jednostką katalityczną cykazy adenylowej. A — połączenie kolizyjne (collision coupling); H — hormon; E — enzym; R — receptor; k_1 — stała szybkości łączenia się kompleksu HR z enzymem; E' — uaktywniony enzym; k_2 — stała aktywacji; k_H — stała dysocjacji kompleksu HR; B — połączenie stałe (permanent coupling); RE — kompleks receptor-enzym; k_2 — stała aktywacji; k_H — stała dysocjacji kompleksu HRE (wg Rimon i wsp. [21])

rek wątroby, serotonina zmniejsza płynność błon trombocytów i retikulocytów, nikotyna, acetylocholina i ACTH fluidyzują błony retikulocytów [20] (tab. 3).

Kierunek działania danego leku na płynność membrany zależy, między innymi, od stężenia leku oraz od stężenia lipidów sterydowych w badanej błonie. Na przykład, małe stężenia anestetyków lokalnych usztywniają błony zawierające niewielkie ilości cholesterolu *in vitro*. Efekt ten nasila zakwaszenie środowiska [22, 23]. Duże stężenia anestetyków w środowisku alkalicznym działają na błony fluidyzująco [22]. Chloropromazyna w stężeniach mM fluidyzuje bogate w cholesterol błony erytrocytów ale usztywnia błony synaptosomalne izolowane w OUN, które charakteryzuje niewielka zawartość cholesterolu [23, 24]. Barbiturany, np. pentobarbital, tiopental, usztywniają membrany synap-

Tabela 3

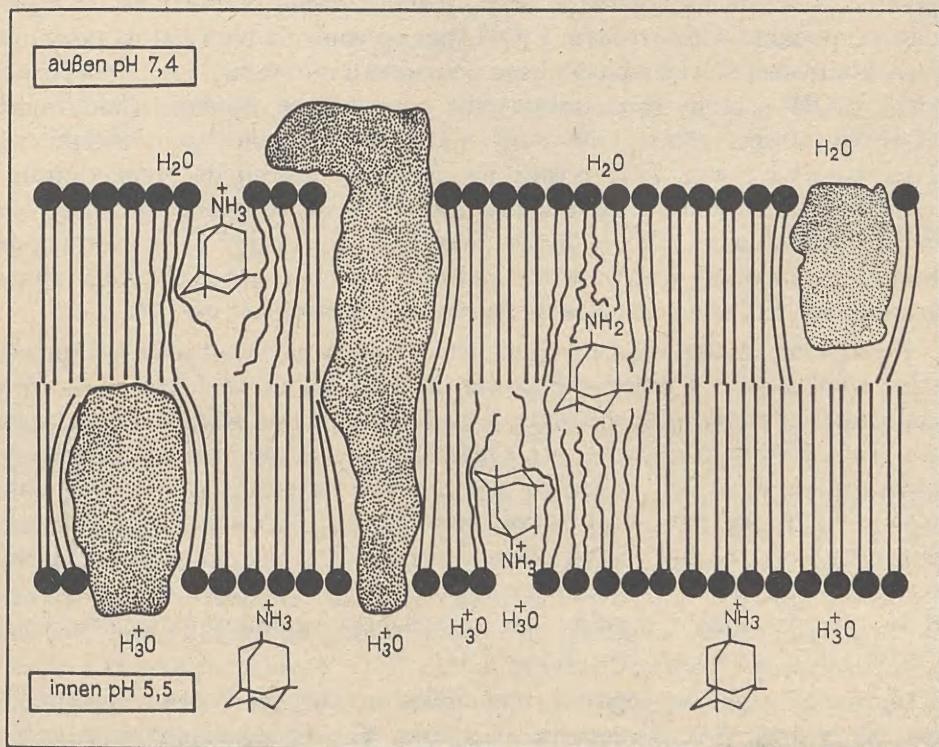
Wpływ niektórych ligandów na płynność błon izolowanych z komórek wątroby (W), erytrocytów (R) lub trombocytów (T) (wg Shinitzky'ego [20])

Ligand	Płynność błony
Insulina	spadek (W)
Serotonina	spadek (T)
Acetylocholina	wzrost (R)
Nikotyna	wzrost (R)
ACTH	wzrost (R)

tyczne ale działają fluidyzująco na błony erytrocytów [23, 25, 26]. Imipramina, wg Delmelle i wsp. [27], w stężeniu 1mM działa usztywniająco na membrany mitochondrialne, natomiast wyższe stężenia imipraminy (5mM) w mieszaninie inkubacyjnej fluidyzują te błony.

Pochodne adamantanu, z których dwa związki, adamantyna (D_1) i me-mantyna (D_{145}), znalazły, między innymi, zastosowanie jako środki przeciw-działające sztywności mięśniowej pochodzenia centralnego i rdzeniowego [28], zmieniają fluidyzację membran w OUN, który to efekt ma być odpowiedzialny za działanie ośrodkowe tych połączeń [29]. Klateczkowa struktura cząsteczki adamantanu oraz duża lipofilność ułatwiają wbudowanie się molekuly do błony zarówno w formie zjonizowanej, jak i w formie obojętnej co prowadzi do zaburzenia w "upakowaniu" podwójnej warstwy lipidowej, a pośrednio do zmian ilościowo-jakościowych na powierzchni błony i w jej regionach hydro-fobowych (rys. 4).

Zbadano, pod względem działania na membrany synaptyczne izolowane z różnych struktur OUN szczura, dwie pochodne adamantanu, związki o symbolach D_{174} i D_{175} , które podobnie jak D_1 i D_{145} wykazują działanie



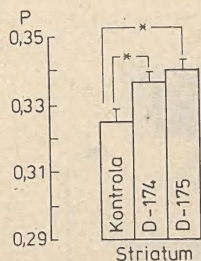
Rys. 4. Mechanizm działania fluidyzującego na błonę pochodnych adamantanu (wg Wesemanna [29])

antypastyczne. Związki te po podaniu jednorazowym nie zmieniały płynności błony w prążkowie, mózdku i hipokampie, ale usztywniały membrany w prążkowie, a D_{174} fluidyzowało błony izolowane z kory mózgowej [30]. Wyniki tych badań wskazują, że ten sam lek (substancja) może działać w rozmaity sposób na płynność membran izolowanych z różnych tkanek (rys. 5). Przyczyną tego zjawiska może być, o czym już wspomniano, rozmaity skład jakościowy i ilościowy lipidów w błonach izolowanych z poszczególnych części OUN i związana z tym rozmaita płynność wyjściowa tych błon. Jak wykazały badania Herona i wsp. [18], wykonane na membranach synaptosomalnych izolowanych z różnych regionów mózgu myszy, a także wyniki badań własnych wykonanych na membranach izolowanych z kory, prążkowie, hipokampa, mózdku, rdzenia przedłużonego i rdzenia kręgowego szczura [30], stosunek fosfolipidów do cholesterolu w poszczególnych membranach, a także ich płynność różniły się w sposób istotny. Najwyższy poziom fosfolipidów i największa płynność charakteryzowały błony izolowane z kory mózgowej szczura, natomiast błony rdzenia przedłużonego i rdzenia kręgowego charakteryzował wysoki poziom cholesterolu i odpowiednio mała płynność (rys. 6, 7).

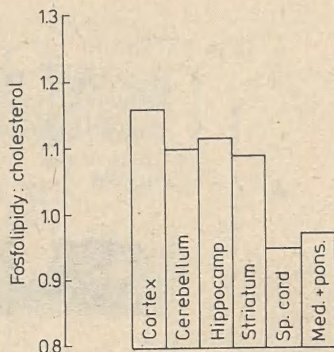
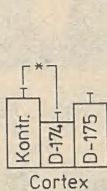
Etanol (EtOH) jest środkiem fluidyzującym błony w obrębie OUN. Efekt upłynnienia membran obserwuje się po jednorazowym podaniu EtOH, natomiast po podaniu wielokrotnym EtOH stan upłynnienia błon jest na poziomie grupy kontrolnej (a więc usztywnienie w stosunku do sytuacji po jednorazowej dawce EtOH) i błony te charakteryzuje oporność na działanie fluidyzujące EtOH w eksperymencie *in vitro* [31]. Mechanizm tych zmian wg Magruder a i wsp. [32] polega na aktywacji fosfolipido-N-metylotransferazy II przez wielokrotnie podany EtOH, co w rezultacie prowadzi do wzrostu stosunku PC/PE w błonie. Wspomniani autorzy [32] uważają, że obserwowane zmiany w zawartości lipidów w membranach synaptycznych po chronicznym EtOH są jedną z przyczyn uzależnienia.

Pojedyncza dawka morfiny działa fluidyzująco na membrany synaptosomalne wyizolowane z przodomózgowia myszy; podanie wielokrotne morfiny działa na membrany usztywniająco, prawdopodobnie na skutek gromadzenia się w nich cholesterolu [3, 33, 34]. Okazało się także, że podawanie myszom preparatu AL silnie fluidyzującego membrany w znacznym stopniu osłabiało objawy abstynencji, natomiast dwupalmitynanin lecytyny, który działa usztywniająco na błony, nasilał objawy odstawienia morfiny. Wyniki te doprowadziły do wysunięcia hipotezy, że jednym z czynników wywołujących nadwrażliwość OUN po odstawieniu morfiny jest usztywnienie membran synaptycznych i "odsłonięcie" pewnych receptorów [33].

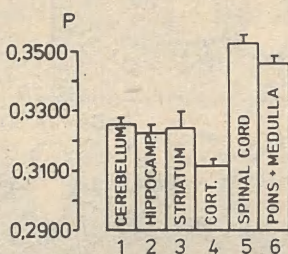
Normalny stan fizjologiczny membrany w obecności neurotransmitera ilustruje rysunek 8A. Dostępność receptora dla cząsteczki neuromediatora zależy od lokalnej fluktuacji w płynności fragmentu błony, na której zlokalizowane są receptory. Lek fluidyzuje błonę albo na skutek wiązania się z recep-



Ryc. 5



Ryc. 6



Ryc. 7

1 → 4 $p < 0,05$
 1 → 5 $p < 0,001$
 1 → 6 $p < 0,001$

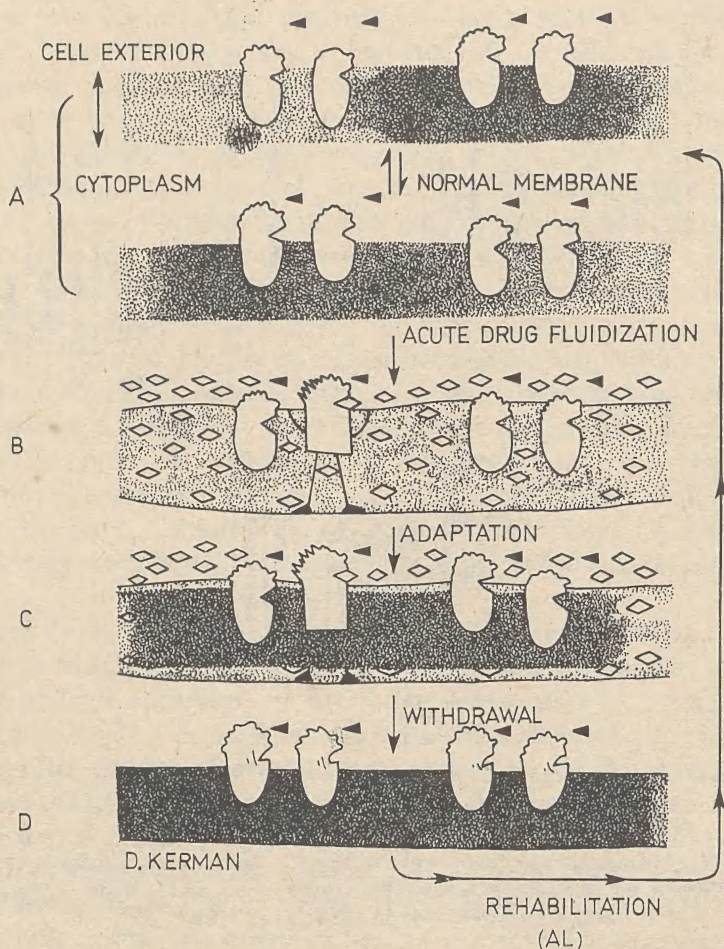
Rys. 5. Wpływ jednorazowego podania D-174 lub D-175 na płynność błon izolowanych z prążkowie i kory mózgowej szczura (P — polaryzacja) (wg Melzackiej i wsp. [30])

Rys. 6. Stosunek fosfolipidów do cholesterolu w błonach izolowanych z różnych części OUN szczura. Poziom poszczególnych lipidów błonowych oznaczano metodą chromatografii cienkowarstwowej (wg Melzackiej i wsp. [30])

Rys. 7. Płynność błon izolowanych z różnych części OUN szczura (P — polaryzacja)

torem (tak miałyby działać morfina i acetylocholina), albo w wyniku niespecyficznego wiązania się z lipidami błonowymi (EtOH; barbiturany) (rys. 8B). W wyniku chronicznego działania leku o właściwościach fluidyzujących dochodzi do zmian adaptacyjnych polegających na gromadzeniu się cholesterolu w błonie i jej usztywnieniu (rys. 8C). Ten stan miałby być odpowiedzialny za objawy tolerancji na lek. Część D rysunku 8 ilustruje sytuację po odstawieniu leku, odsłonięcie receptorów na skutek usztywnienia błony i związania z tym nadwrażliwość OUN, którą można by usunąć poprzez upłynnienie błony, np. za pomocą preparatu AL lub też diety bogatej w lecytynę [33].

Z wyjątkiem wyników Holadaya i wsp. [35], w badaniach receptorowych nie udało się znaleźć istotnych zmian w ilości czy powinowactwie receptorów w OUN zwierząt uzależnionych od opiatów [36, 37, 38], co



Rys. 8. Zaproponowany przez Heron a i wsp. [33] model powstawania tolerancji i abstynencji morfinowej. A — stan fizjologiczny błony; B — upłynnienie błony po jednorazowym podaniu leku; C — zmiany adaptacyjne błony (usztynwienie) w wyniku chronicznego podawania leku (stan odpowiedzialny za tolerancję); D — stan po odstawieniu leku, "odsłonięcie" receptorów prowadzące do nadwrażliwości w OUN (stan odpowiedzialny za abstynencję). Inne objaśnienia w tekście

podważa zaproponowany przez Heron a i wsp. [33] model powstawania tolerancji i abstynencji morfinowej (rys. 8). Wg Heron a i wsp. [33] niezgodność ta może być skutkiem niedoskonałości metod stosowanych w badaniach receptorowych. Większość tych badań przeprowadza się na homogenatach mózgowych, zaś proces homogenizacji jest zabiegiem drastycznym, uszkadzającym ciągłość membrany, a zatem preparat badany *in vitro* może pod wieloma względami różnić się od biomembrany *in vivo*. Podczas homogenizacji tkanki mózgowej może także dojść do wymiany związków lipidowych między membranami, których skład ilościowo-jakościowy lipidów

Tabela 4

Dostępność (receptor accessibility) (A) i pojemność (receptor capacity) (C) receptorów błonowych w procesie starzenia komórek. Badania prowadzono na membranach izolowanych z mózgu myszy lub szczura. (wg Shinitzky'ego [20])

Receptor	A ^a	C ^a
5-HT	wzrost	spadek
μ -opiatowy	b.z.	spadek
β -NE	spadek	b.z.
Ach	spadek	b.z.

a — dostępność receptora wg Shinitzky'ego [20] jest to pula receptorów błonowych dostępnych dla danego liganda w danym stanie upłynnienia membrany (mierzona wielkością B_{max}). Pojemność receptorową można wyznaczyć oznaczając B_{max} dla danego liganda w różnych stanach upłynnienia membrany.

jest różny. Na przykład cholesterol z mieliny może wbudować się do membran synaptycznych, które charakteryzuje niska zawartość tego lipidu sterydowego. Zmiana płynności błony na skutek inkorporacji lub dysocjacji cholesterolu może zmieniać istotnie relację między ilością białka i substancji lipidowych na powierzchni błony, co z kolei może maskować zmiany receptorowe [33]. Ponadto, wg Herona i wsp. [3, 18] wiele receptorów jest ukrytych pod powierzchnią błony, a zatem zmiany w odpowiednio niewielkiej, ale ważnej dla funkcji puli receptorowej "dostępnej" mogą być niedostrzegalne.

Innym problemem związanym z płynnością błon jest wpływ starzenia się organizmu na fluidyzację membran. Jak wynika z prac Herona i wsp. [18] starzeniu komórki towarzyszy usztywnianie błon w związku z odkładaniem się w nich cholesterolu i spadkiem zawartości fosfolipidów oraz w związku z aktywacją peroksydazy lipidowej, jako rezultatu pojawienia się w dużym stężeniu wolnych rodników (peroksydacja lipidów prowadzi do wysycenia kwasów tłuszczowych wchodzących w skład lipidów błonowych). Procesowi starzenia się komórek i związanym z nim usztywnieniem błony towarzyszą zmiany w receptorach błonowych; i tak z wiekiem rośnie ilość i pojemność receptorów 5-HT, zmniejsza się pojemność receptorów opiatowych (ale nie zmienia się ich liczba), spada ilość receptorów β -adrenergicznych (ale nie zmienia się ich pojemność) i wreszcie spada ilość receptorów cholinergiczných (bez zmian pojemności). Wyniki te uzyskano badając odpowiednie membrany synaptyczne izolowane z mózgu szczura i myszy [20] (tab. 4).

Fluidyzacja membran oddziałuje także na ich przepuszczalność. Jeżeli mechanizm dyfuzji przez błony będziemy rozpatrywać w świetle teorii Träuble'go i Haynesa [39], rotacyjna izomeryzacja łańcuchów kwasowych w lipidach prowadzi do wytworzenia "kinks" (supelków), które umożliwiają dyfuzję, to wysoki stopień nienasycenia łańcuchów kwasowych w lipidach (co jest równoznaczne z większą fluidyzacją błony) ułatwia dyfuzję przez błonę. Częsteczki nienasyconych kwasów tłuszczowych występują w błonie najczęściej w odmianie izomerycznej "cis", która prowadzi do odgięcia łańcucha i wytworzenia stałego supelka ("kink") [39]. Cholesterol zmniejsza szybkość penetracji przez błony oraz podwyższa energię hamującą dyfuzję przez membranę ponieważ redukuje ilość supelków w błonie [40].

Zasygnalizowane problemy, związane z płynnością błony, stanowią nową dziedzinę badań farmakologicznych. Badania te objęły jak dotąd tylko niektóre membrany, dotyczyły tylko niektórych receptorów i enzymów błonowych, a wyniki ich są często kontrowersyjne. Wydaje się jednak, że poznanie działania fizykochemicznego substancji endo- i egzometrycznych w hydrofobowo-hydrofilowych i hydrofobowych regionach błony jest konieczne do pełnego wyjaśnienia procesów zachodzących na powierzchni i we wnętrzu membrany, i ich znaczenia dla stanu funkcjonalnego komórki.

LITERATURA

1. Shinitzky M., Barenholz Y. — *Fluidity parameters of lipid regions determined by fluorescence polarization*. Biochem. Biophys. Acta 515: 367-370, 1978.
2. Cooper R. A. — *Influence of increased membrane cholesterol on membrane fluidity and cell function in human red blood cells*. J. Supramol. Struct. 8: 413-416, 1978.
3. Heron D. S., Israeli M., Hershkowitz M., Samuel D., Shinitzky M. — *Lipid-induced modulation of opiate receptors in mouse brain membranes*. Eur. J. Pharmacol. 72: 361-364, 1981.
4. Seeling A., Seeling J. — *The dynamic structure of fatty acid chains in a phospholipid bilayer measured by deuterium magnetic resonance*. Biochemistry 13: 4839-4845, 1974.
5. Hubbell W. L., McConnell H. M. — *Orientation and motion of amphiphilic spin labels in membranes*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 64: 20-27, 1969.
6. Pesce A. J., Rosen C. G., Pasby T. L. — *Fluorescence spectroscopy. An induction for biology and medicine*. M. Dekker, New York, 1971.
7. Stubbs G. W., Litman B. J., Barenholz Y. — *Microviscosity of the hydrocarbon region of the bovine retinal rod outer segment disk membrane determined by fluorescence probe measurements*. Biochemistry 15: 2766-2772, 1976.
8. Goldstein D. B. — *The effects of drugs on membrane fluidity*. Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. 24: 43-64, 1984.
9. Hirata F., Axelrod J. — *Phospholipid methylation and biological signal transmission*. Science 209: 1082-1090, 1980.
10. Kornberg R. D., McConnell H. M. — *Inside-outside transitions of phospholipids in vesicle membranes*. Biochemistry 10: 1111-1120, 1971.
11. McNamee M. G., McConnell H. M. — *Transmembrane potentials and phospholipid flip-flop in excitable membrane vesicles*. Biochemistry 12: 2951-2958, 1973.

12. Hirata F., Axelrod J. — *Enzymatic methylation of phosphatidylethanolamine increases erythrocyte membrane fluidity.* Nature 275: 219-220, 1978.
13. Goldstein D. B., Brett P. B. — *Role of membrane fluidity in the events mediated by phospholipid methyltransferases.* J. Neurochem. 41: S51A, 1983.
14. Strittmatter W. J., Hirata F., Axelrod J. — *Phospholipid methylation unmasks cryptic β -adrenergic receptors in rat reticulocytes.* Science 204: 1205-1207, 1979.
15. Borochoy H., Shinitzky M. — *Vertical displacement of membrane proteins mediated by changes in microviscosity.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA 73: 4526-4530, 1976.
16. Bakardjieva A., Galla H. J., Helmreich E. J. M. — *Modulation of the β -receptor adenylate cyclase interactions in cultured Chang liver cells by phospholipid enrichment.* Biochemistry 18: 3016-3023, 1979.
17. Hanski E., Rimón G., Levitzki A. — *Adenylate cyclase activation by the β -adrenergic receptors as a diffusion-controlled process.* Biochemistry 18: 846-853, 1979.
18. Heron D. S., Shinitzky M., Hershkowitz M., Samuel D. — *Lipid fluidity markedly modulates binding of serotonin to mouse brain membranes.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 7463-7467, 1980.
19. Surewicz W. K. — *Propranolol-induced structural changes in human erythrocyte ghost membrane.* Biochem. Pharmacol. 31: 691-694, 1982.
20. Shinitzky M. — *Physiology of membrane fluidity.* Tom I i II. CRS Press Inc., Boca Raton, Florida, 1984.
21. Rimón G., Hanski E., Braun S., Levitzki A. — *Mode of coupling between hormone receptors and adenylate cyclase elucidated by modulation of membrane fluidity.* Nature 276: 394-396, 1978.
22. Butler K. W., Schneider H., Smith I. — *The effects of local anesthetics on lipid multilayers.* Arch. Biochem. Biophys. 154: 548-554, 1973.
23. Neal M. J., Butler K. W., Polnaszek D. F., Smith I. C. P. — *The influence of anesthetics and cholesterol on the degree of molecular organization and mobility of ox brain white matter.* Mol. Pharmacol. 12: 144-155, 1976.
24. Giraud F., Claret M., Bruckdorfer K. R., Chailley B. — *The effects of membrane lipid order and cholesterol on the internal and external cationic sites of the Na^+ - K^+ pump in erythrocytes.* Biochim. Biophys. Acta 647: 249-258, 1981.
25. Pang K. Y., Miller K. W. — *Cholesterol modulates the effects of membrane perturbors in phospholipid vesicles and biomembranes.* Biochim. Biophys. Acta 511: 1-9, 1978.
26. Miller K. W., Pang K. Y. — *General anaesthetics can selectively perturb lipid bilayer membranes.* Nature 263: 253-255, 1976.
27. Delmelle M., Wattiaux-De Coninck S., Dubois F., Wattiaux R. — *Efect de l'imipramine sur les lipides membranaires mitochondriaux.* Soc. Bel. Biochem. 12: 801-802, 1979.
28. Sontag K. H., Wand P., Schwarz M., Wesemann W., Osborne N. N. — *Die Wirkung von Memantin auf spinale α -Motoneurone und auf Gehalt von Dopamin, Noradrenalin und Serotonin des Striatums und lumbalen Rückenmarks.* Arzneimittel-Forsch. 32: 1263-1275, 1982.
29. Wesemann W. — *Aspekte zum Wirkmechanismus von Amantadinen.* Amantadin-Workshop. Verlag Socio-medico, Grafelfing, SS. 15-25, 1984.
30. Melzacka M., Wesemann W., Sturm G., Sontag K-H. — *Effects of some adamantane derivatives on the membrane fluidity in the CNS of rats. An in vivo study.* (praca przygotowywana do druku).
31. Chin J. H., Goldstein D. B. — *Drug tolerance in biomembranes: A spin label study of the effects of ethanol.* Science 196: 684-685, 1976.
32. Magruder J. D., Waid-Jones M., Reitz R. C. — *Ethanol-induced alterations in rat synaptosomal plasma membrane phospholipids. Relationship to changes in the phospholipid methyltransferases.* Mol. Pharmacol. 27: 256-262, 1985.
33. Heron D. S., Shinitzky M., Samuel D. — *Alleviation of drug withdrawal symptoms by treatment with a potent mixture of natural lipids.* Eur. J. Pharmacol. 83: 253-261, 1982.

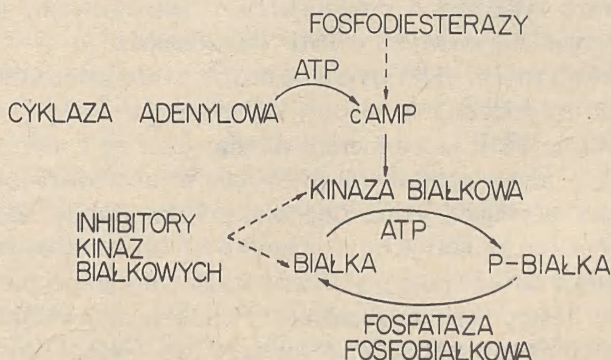
34. Heron D. S., Shinitzky M., Zamir N., Samuel D. — *Adaptive modulations of brain membrane fluidity in drug addiction and denervation supersensitivity*. *Biochem. Pharmacol.* 31: 2435-2438, 1982.
35. Holaday J. W., Hitzemann R. J., Curell J., Tortella F. C., Belenky G. L. — *Repeated electroconvulsive shock or chronic morphine treatment increases the number of ^3H -D-Ala², D-Leu⁵-enkephalin binding sites in rat brain membranes*. *Life Sci.* 31: 2359-2362, 1982.
36. Dum J., Blasig J., Meyer G., Herz A. — *Opiate antagonist-receptor interaction unchanged by acute or chronic opiate treatment*. *Eur. J. Pharmacol.* 55: 375-383, 1979.
37. Hollt V., Dum J., Blasig J., Schubert P., Herz A. — *Comparison of in vivo and in vitro parameters of opiate receptor binding in naive and tolerant/dependent rodents*. *Life Sci.* 16: 1823-1828, 1975.
38. Antkiewicz-Michaluk L., Michaluk J., Marona-Lewicka D., Vetulani J. — *The effect of morphine abstinence on opioid receptors in the cerebral cortex and spinal cord of rat*. *Pol. J. Pharmacol. Pharm.* (praca przyjęta do druku).
39. Träuble H., Haynes D. H. — *The volume change in lipid bilayer lamellae at the crystalline-liquid crystalline phase transition*. *Chem. Phys. Lipids* 7: 324-335, 1971.
40. Schreier-Muccillo S., Marsh D., Smith I. C. P. — *Monitoring the permeability profile of the membranes with spin probes*. *Arch. Biochem. Biophys.* 172: 1-11, 1976.

ANDRZEJ SZMIGIELSKI

Zakład Farmakodynamiki
Akademia Medyczna, Łódź

CYKLICZNE NUKLEOTYDY I FOSFORYLACJA BŁON

Najlepiej poznane są procesy fosforylacji stymulowane przez cykliczny adenozyno-3'5'-monofosforan (cAMP). Stymulacja cykazy adenyłowej przez hormony lub neuromediatory prowadzi do powstania cAMP z ATP. Ten cykliczny nukleotyd łączy się z fosfotransferazą białkową (kinazą) zależną od cAMP, przeprowadzając enzym w formę czynną, która w obecności ATP fosforyluje białka (rys. 1).



Rys. 1. Schemat procesów fosforylacji w komórce

Podobnie przebiegają procesy kaskady fosforylacji zależnej od cyklicznego guanozyno-3'5'-monofosforanu (cGMP). Procesy fosforylacji są więc zależne od wielu czynników i mogą być regulowane na różnych etapach kaskady. Zmiany aktywności cykazy adenyłowej i cykazy guanyłowej, wywołane neuromediatorami i hormonami, są przedstawione w innych rozdziałach. W niniejszym opracowaniu zająłem się problemem regulacji aktywności fosfodiesteraz, kinaz białkowych oraz fosforylacji endogennych białek błonowych.

Fosfodiesterazy (PDE) cyklicznych nukleotydów są enzymami, które katalizują rozkład cAMP i cGMP do odpowiednich 5'-monofosforanów. Stwierdzono, że enzym występuje w wielu formach molekularnych [49, 92, 99]. Przy

użyciu preparatywnej elektroforezy na żelu poliakryloamidowym wyodrębniono z mózdzku szczura sześć odmiennych form PDE (I-IV) różniących się od siebie masą cząsteczkową, właściwościami kinetycznymi oraz powinowactwem do cAMP i cGMP. Dwie z tych form, II i IV, były aktywowane przez kalmodulinę i jony Ca^{++} . Pozostałe formy nie zmieniały aktywności w obecności Ca^{++} -kalmoduliny.

Mózg szczura bez mózdzku zawierał formy I, II, III i IV [95]. Przyłączenie kompleksu Ca^{++} -kalmodulina do PDE-VI zwiększało powinowactwo cAMP do enzymu (zmniejszenie K_m z 250 do $50 \mu\text{M}$) bez zmiany wartości $V_{\max}$. Taki sam kompleks PDE-II zwiększał zdolność tego enzymu do rozkładania cAMP (zwiększenie wartości $V_{\max}$) bez zmiany K_m [50, 91]. Wiele badań nad molekularnymi formami PDE prowadzono przy użyciu kolumnowej chromatografii jonowymiennej na DEAE-celulozie, uzyskując trzy różne formy enzymu [20, 43, 70, 89]:

1. Fosfodiesterazę cAMP o dużym powinowactwie do cAMP ($1-5 \mu\text{M}$) i nieznacznym powinowactwie do cGMP,

2. Fosfodiesterazę cGMP o dużym powinowactwie do cGMP ($3-8 \mu\text{M}$) aktywowaną przez kalmodulinę,

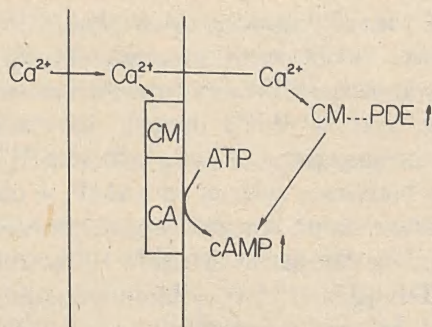
3. Fosfodiesterazę cyklicznych nukleotydów o jednakowym, stosunkowo małym powinowactwie do cAMP i cGMP ($50-200 \mu\text{M}$).

Jedna z form molekularnych PDE stymulowanych przez kalmodulinę została wyizolowana oraz oczyszczona z serca [48] i mózgu wołu [44, 58, 74]. Pozwoliło to ustalić, że PDE jest dimerem składającym się z dwóch identycznych podjednostek o masie cząsteczkowej 59000. W obecności jonów Ca^{++} każda podjednostka przyłącza jedną cząsteczkę kalmoduliny. Kalmodulina podnosi $V_{\max}$ enzymu bez zmiany K_m w stosunku do substratów. Przyłączenie kalmoduliny prowadzi do odwracalnej zmiany konformacji enzymu z centrum aktywnym bardziej dostępnym dla substratu. Podobna aktywacja, ale nieodwracalna PDE następuje również po zastosowaniu limitowanej proteolizy przy użyciu trypsyny, co łączy się ze zmniejszeniem masy cząsteczkowej enzymu. Lin i Cheung [49] uważają, że przyłączenie kalmoduliny do PDE powoduje czasowe odłączenie kompleksu polipeptydów Ca^{++} -kalmodulina od cząsteczki enzymu i odsłonięcie centrum aktywnego.

Cyklaza adenylova jest stymulowana nie tylko przez neuromediatory, hormony i nukleotydy guanylowe, ale również przez kalmodulinę. Stwierdzono, że kalmodulina katalizuje aktywujący wpływ jonów Ca^{++} na cyklazę adenylową wyizolowaną z mózgu [8, 9, 14]. Westcott i wsp. [100] wyizolowali formę enzymu stymulowaną przez kalmodulinę oraz drugą frakcję, która nie łączy się z tym białkiem. Brostrom i wsp. [11] stwierdzili, że stymulowane przez kalmodulinę cyklaza adenylova i PDE znajdują się w komórkach jednego typu. Wskazuje to na kluczową rolę kalmoduliny w reakcji w reakcji poziomów cyklicznych nukleotydów. Piascik i wsp. [65] stwierdzili, że cyklaza adenylova wymaga do swej aktywacji mniejszych stężeń

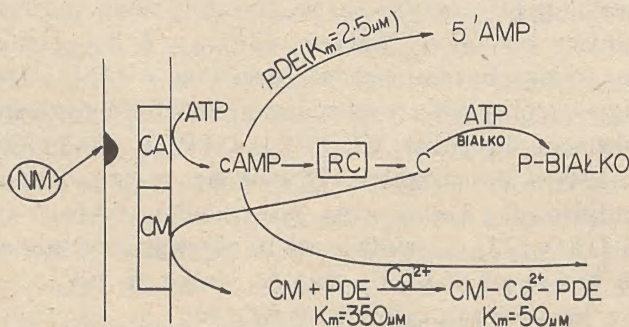
Ca^{++} niż PDE. Wyszuli hipotezę, że wnikanie jonów Ca^{++} przez błonę komórkową najpierw aktywuje cyklazę adenylową, a dopiero później, po osiągnięciu większych stężeń PDE, co prowadzi do krótkotrwałej akumulacji cAMP w komórce (rys. 2). Wiele danych doświadczalnych przemawia za hipotezą zaproponowaną przez Guegy i wsp. [35]. Zauważyli oni, że oczyszczona kinaza białkowa, zależna od cAMP, w obecności ATP fosforyluje kalmodulinę związaną z błoną komórkową, co prowadzi do jej translokacji do frakcji cytozolowej. Uwolniona od cytozolu kalmodulina obniża K_m zależnej od kalmoduliny PDE [32, 41]. Rolą błonowej kalmoduliny jest stymulacja cyklazy adenylowej. Używając frakcji błonowej stwierdzono, że kalmodulina podnosi 2-4 krotnie wrażliwość cyklazy adenylowej prądkowia szczurów na dopaminę [34]. Rolę kalmoduliny uwypukla obserwacja, że gdy brakuje jonów Ca^{++} i kalmoduliny, toksyna cholery nie aktywuje cyklazy adenylowej w hodowli komórek C-6 glioma [10]. Wywołanie nadreaktywności cyklazy adenylowej, zależnej od dopaminy, podaniem 6-hydroksydopaminy lub długotrwałym podawaniem haloperidolu powoduje zwiększenie ilości kalmoduliny związanej z błoną komórkową w prądkowiu szczurów [33]. Zmniejszona reaktywność receptorów dopaminowych jest związana ze wzrostem ilości kalmoduliny zlokalizowanej w cytozolu [42]. Mechanizm aktywowania cyklazy adenylowej przez kalmodulinę nie jest dokładnie poznany. Ponieważ toksyna cholery, inhibitor GTP-azy, nie wywiera swego działania przy braku Ca^{++} -kalmoduliny [10], wydawało się, że kalmodulina może działać na układ białek zależnych od GTP. Badania Guegy i Bagley'a wykazały, że kalmodulina wykazuje sumujące się działanie z GTP przy aktywowaniu częściowo oczyszczonej cyklazy adenylowej prądkowia szczurów, ale pochodne GTP, nie ulegające hydrolizie (G_{pp}NH_p i $\text{GTP}\gamma\text{S}$), i kalmodulina wzajemnie hamują swe aktywujące działanie. Wydaje się, że kalmodulina bezpośrednio aktywuje podjednostkę katalityczną, jak postulują Salter i wsp. [71] oraz Seamon i Daly [72]. Stwierdzili oni, że aktywacja cyklazy adenylowej przez kalmodulinę nie wymaga GTP, oraz że białko to bezpośrednio działa na podjednostkę katalityczną cyklazy adenylowej.

Przedstawione dane wskazują, że kalmodulina gra dużą rolę przy utrzymywaniu odpowiedniego poziomu cAMP w komórce. Stymulacja cyklazy adenylowej prowadzi do wzrostu poziomu cAMP i aktywowania kinazy białkowej zależnej od cAMP. Ten ostatni enzym katalizuje między innymi fosforylację błonowej kalmoduliny i jej translokację do frakcji cytozolowej. Prowadzi to do zmniejszenia aktywności cyklazy adenylowej, a więc do zmniejszenia produkcji cAMP oraz do nasilenia hydrolizy cAMP przez stymulację PDE (rys. 3). Opisany mechanizm wydaje się być jednym z czynników odpowiedzialnych za znane zjawisko szybkiej desensytyzacji receptorów dopaminowych i β -adrenergicznych. Kalmodulina aktywuje również PDE, cGMP [44, 74] oraz cyklazę guanylową [59, 79]. Rola kalmoduliny we wzajemnych zależnościach między cyklazą guanylową i PDE jest jednak nieznaną.



Rys. 2. Schemat wpływu jonów Ca^{2+} i kalmoduliny (CM) na aktywność cykazy adenylowej (CA) i fosfodiesterazy (PDE)

Opisano również inne mechanizmy regulacji aktywności PDE. Stymulowana przez kalmodulinę PDE podlega fosforylacji przez kinazę białkową zależną od cAMP. PDE jest bardzo dobrym substratem kinazy białkowej zależnej od cAMP. Fosforylacja zachodzi z taką samą szybkością jak fosforylacja histonu i 1 mol fosforu wbudowuje się w 1 mol PDE [73]. Wydaje się, że ufosforylowany enzym jest mniej aktywny, niż forma nieufosforylowana [22].



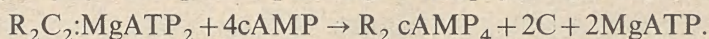
Rys. 3. Schemat wpływu kalmoduliny na aktywność cykazy adenylowej i PDE. CM — kalmodulina, R — podjednostka regulacyjna APK, C — podjednostka katalityczna APK, CA — cyklaza adenylowa, NM — neuromediator

KINAZY BIAŁKOWE

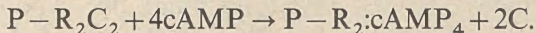
Fosfotransferazy białkowe zwane kinazami białkowymi są enzymami, które katalizują fosforylację specyficznych białek. Jedną z klas tych enzymów, zwana kinazami białkowymi zależnymi od cAMP (APK), wykazuje swe katalityczne

właściwości w obecności fizjologicznych stężeń cAMP. W warunkach braku cAMP, APK znajduje się w postaci nieczynnego holoenzymu, kompleksu podjednostki regulacyjnej i katalitycznej. Cykliczne AMP łączy się z podjednostką regulacyjną enzymu z jednoczesnym oddysocjowaniem wolnej podjednostki katalitycznej, aktywnej formy APK [28,90]. Oczyszczanie APK na jednowymieniaczu, DEAE-celulozie, pozwoliło na wyodrębnienie dwóch różnych izoenzymów APK-I i APK-II. Izoenzymy różnią się podjednostkami regulacyjnymi R-I i R-II o masie cząsteczkowej odpowiednio 49 kD i 53 kD. Wielu badaczy uważa, że oba izoenzymy mają taką samą podjednostkę katalityczną o masie cząsteczkowej 40 kD [4, 69]. Zoller i wsp. zaobserwowali jednak, że po podaniu podjednostek katalitycznych APK-I i APK-II proteolizie powstają różne fragmenty, co dowodzi, że podjednostki obu izoenzymów są różne mimo jednakowej masy cząsteczkowej.

APK-I jest tetramerem składającym się z dwóch podjednostek regulacyjnych i dwóch podjednostek katalitycznych połączonych z ATP i jonami Mg^{++} . Dysocjacja kompleksu przebiega następująco [6, 13]:



APK-II nie występuje w kompleksie z ATP i jonami Mg^{++} . Podjednostka regulacyjna tego izoenzymu występuje *in vivo* w formie ufosforylowanej. Dysocjacja kompleksu APK-II przebiega następująco [66]:



Mechanizmem inaktywacji APK *in vivo* jest rekombinacja podjednostek z wytworzeniem nieczynnego holoenzymu. Dysocjacja holoenzymu i rekombinacja podjednostek APK mogą przebiegać bardzo szybko, pozwalając na szybkie procesy fosforylacji i defosforylacji specyficznych białek [7].

Jednym z mechanizmów regulujących aktywność APK jest ich fosforylacja. Podjednostka regulacyjna APK-I jest fosforylowana przez kinazę białkową zależną od cGMP (GPK). Proces ten przebiega stosunkowo wolno [27]. Ufosforylowana podjednostka regulacyjna APK-I ma mniejsze zdoności do hamowania aktywności podjednostki katalitycznej tego enzymu [25, 26]. Podjednostka regulacyjna APK-II podlega szybkiej fosforylacji przez własną podjednostkę katalityczną, nawet bez udziału cAMP [68]. Fosforylacja podjednostki regulacyjnej APK-II prowadzi do podniesienia K_m w stosunku do cAMP oraz do zwolnienia procesu rekombinacji [4, 67]. GPK jest enzymem, który katalizuje fosforylację białek w obecności fizjologicznych stężeń cGMP. U ssaków największe ilości enzymu znajdują się w płucach i mózgdzku. GPK z różnych tkanek waha się między 120 i 165 kD. Enzym składa się z podjednostki katalitycznej i podjednostki regulacyjnej. Dysocjacja holoenzymu do obu podjednostek odbywa się w obecności dużych stężeń cGMP i histonu lub protaminy. Wówczas, gdy w roztworze znajdują się tylko cGMP lub histon, dysocjacja przebiega tylko częściowo [77, 78]. Ponieważ dysocjacja holoenzymu przebiega w obecności cGMP w stężeniach wielokrotnie większych od

spotykanych w warunkach fizjologicznych (50-100 μ M), wielu badaczy uważa, że aktywacja GPK przez cGMP odbywa się bez dysocjacji cząsteczki holoenzymu [47, 52, 55, 78]. Stwierdzono, że homogenna GPK jest dimerem składającym się z dwóch identycznych podjednostek, z których każda wykazuje właściwości katalityczne i wiąże cGMP [12, 55]. GPK podlega autofosforylacji [18], jak i fosforylacji za pośrednictwem APK [53]. Znaczenie tego procesu dla aktywności nie jest poznane.

TERMOSTABILNE BIAŁKA REGULUJĄCE AKTYWNOŚĆ KINAZ BIAŁKOWYCH

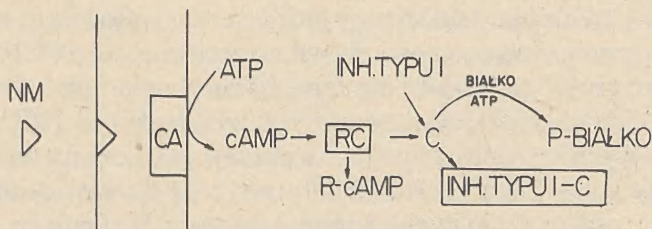
Walsh i wsp. [98] stwierdzili, że w mięśniach szkieletowych ssaków znajduje się termostabilne, niskocząsteczkowe białko, które hamuje aktywność APK. Późniejsze badania wykazały, że w mózdzku szczurów znajdują się dwa różne termostabilne białka, które hamują aktywność kinaz białkowych. Jedno z nich, wybiórczy inhibitor APK (inhibitor Walsh, inhibitor typu I), oraz inhibitor typu II, który hamuje fosforylację katalizowaną przez APK, GPK i kinazy białkowe niezależne od cyklicznych nukleotydów [84]. Ponieważ inhibitor typu I i typu II izolowano na kolumnie z Sephadexem G-100 po uprzednim ogrzewaniu supernatantu tkankowego w temp. 90-95°C przez 10 min., istniała możliwość, że oba inhibitory mogą być produktami termicznej lub proteolitycznej degradacji białek. Dla wyjaśnienia tych wątpliwości poddano supernatant mózdzku (bez uprzedniego ogrzewania) filtracji na żelu Sephadex G-100. Otrzymane frakcje poddawano ogrzewaniu w temp. 90-95°C przez 10 min. Aktywność poszczególnych frakcji oznaczano w obecności APK i GPK. Otrzymano identyczny profil eluacyjny, co wskazuje, że inhibitory typu I i II nie są produktem termicznej degradacji białek. W celu wyjaśnienia, czy inhibitory powstają pod wpływem enzymów proteolitycznych po śmierci zwierzęcia, poddano filtracji na żelu Sephadex-100 supernatant mózdzku szczura zabitego wysokoenergetycznym promieniowaniem mikrofalowym zśrodkowanym na głowie zwierzęcia. Takie postępowanie pozwala na uśmiercenie zwierzęcia i inaktywację enzymów w mózgu przez ogrzanie tkanki do około 80°C w ciągu 1,5-2 s. Profil eluacyjny i aktywność obu inhibitorów z mózdzku szczurów były identyczne, jak u zwierząt zabitych przez dekapitację. Wydaje się więc, że inhibitory typu I i II są substancjami występującymi w warunkach fizjologicznych w tkankach zwierzęcych [84].

Inhibitor typu I jest termostabilnym białkiem o masie cząsteczkowej 22 kD (1,98). Jest on kompetytywnym inhibitorem wolnej podjednostki katalitycznej APK. Tworzy on z podjednostką katalityczną APK kompleks, który nie ma zdolności do fosforylacji substratów [2, 19, 56, 97]. Aktywność inhibitora typu I zmienia się wraz ze zmianami poziomu cAMP [97]. Badania Ku o i wsp. [45] wykazały, że doświadczalna cukrzyca wywołana alloxanem prowadzi do spadku poziomu cAMP i wzrostu aktywności inhibitora typu

I w trzustce. Inkubacja limfocytów ludzkich w środowisku zawierającym adrenalinę i izoprenalinę prowadzi do wzrostu zawartości cAMP z jednoczesnym spadkiem aktywności inhibitora typu I. Działanie to jest blokowane przez propranolol, środek blokujący receptory β -adrenergiczne [80]. Pobudzenie β receptorów w sercu szczurów również wywołuje jednoczesny wzrost poziomu cAMP i zmniejszenie aktywności inhibitora typu I *in vitro*. Jednocześnie nie obserwowano zmian w aktywności inhibitora typu II. Perfuzja izolowanego serca szczura płynem odżywczym zawierającym dibutyrylo-cAMP (pochodną cAMP, która nie podlega hydrolizie pod wpływem PDE) wywołuje wybiórczo spadek aktywności inhibitora typu I. Stwierdzono również, że podanie szczurom izoprenaliny powoduje, proporcjonalnie do podanej dawki, zmniejszenie aktywności inhibitora typu I i wzrost poziomu cAMP. Największe zmiany poziomu cAMP i aktywności inhibitora typu I występują 10 i 20 min po wstrzyknięciu izoprenaliny. W 40 min po wstrzyknięciu zarówno poziom cAMP, jak i aktywność inhibitora typu I nie różniły się od wartości kontrolnych. Poza tym stwierdzono również, że aminofilina (środek blokujący PDE) nasila zarówno wywołany izoprenaliną wzrost poziomu cAMP, jak i zmniejszenie aktywności inhibitora typu I [81]. Pobudzenie receptorów β -adrenergicznych wywołuje spadek aktywności inhibitora typu I również w szyszynce, hipokampie i pniu mózgu szczurów [88]. Pobudzenie receptorów D_1 -dopaminowych wywołuje *in vitro* wzrost poziomu cAMP i zmniejszenie aktywności inhibitora typu I w prądkowiu [82]. *In vivo* apomorfina powoduje różne zmiany aktywności inhibitora typu I w zależności od użytej dawki. Małe dawki tego związku wywołują wzrost aktywności inhibitora typu I. Działanie to jest blokowane przez małe dawki haloperidolu ($5 \mu\text{g/kg}$) i przez aminofillinę. Obserwowany wzrost aktywności inhibitora typu I jest wywołany pobudzeniem receptorów D_2 -dopaminowych i obniżeniem poziomu cAMP w prądkowiu. Większe dawki apomorfiny powodują obniżenie aktywności inhibitora typu I przez pobudzenie receptorów D_1 -dopaminowych i wzrost poziomu cAMP [85].

Inhibitor typu I reguluje wybiórczo aktywność APK. Zmiany poziomu cAMP w tkankach powodują odwrotne zmiany w aktywności inhibitora typu I: wzrostowi poziomu cAMP w tkankach towarzyszy spadek aktywności inhibitora typu I, a spadkowi poziomu cAMP — wzrost aktywności tego inhibitora. Inhibitor typu I wydaje się być czynnikiem, który zapobiega spontanicznej fosforylacji katalizowanej przez APK w okresie spoczynku komórki. Aktywowanie błonowej cykazy adenylowej prowadzi do wzrostu poziomu cAMP wewnątrz komórki, spadku aktywności inhibitora typu I i umożliwia fosforylację białek, w której pośredniczy APK. Schemat działania inhibitora typu I przedstawia rys. 4.

Wrażliwość inhibitora typu I na środki pobudzające receptory β -adrenergiczne zmienia się w przypadku nadreaktywności lub zmniejszonej reaktywności tych receptorów. Długotrwałe podawanie środków antydepresyjnych



Rys. 4. Schemat działania inhibitora typu I w komórkach. CA — cyklaza adenyloza, R — podjednostka regulacyjna APK, C — podjednostka katalityczna APK, INK typu I — inhibitor typu I

imipraminy, nomifenzyny i mianseryny powoduje zmniejszenie reaktywności receptorów β -adrenergicznych. U szczurów po kuracji tymi lekami, izoprenalina wywołuje zmniejszenie aktywności inhibitora typu I w dawkach około 5-krotnie większych, niż u zwierząt kontrolnych [88]. Podobne zjawisko obserwowano po elektrowstrząsach [104]. Podanie 6-hydroksydopaminy lub kilkakrotne wstrzyknięcie rezerpiny wywołuje nadreaktywność receptorów β -adrenergicznych. W warunkach nadreaktywności tych receptorów wywołanie spadku aktywności inhibitora typu I wymaga znacznie mniejszych dawek izoprenaliny, niż u zwierząt kontrolnych [103]. Podobne zjawisko obserwowano przy nadreaktywności receptorów dopaminowych w prążkowie. U szczurów po podaniu 6-hydroksydopaminy, apomorfina w znacznie mniejszych, niż u zwierząt kontrolnych, dawkach wywołuje spadek aktywności inhibitora typu I. Wskazuje to na nadreaktywność receptorów D_1 -dopaminowych [86]. Przedstawione wyniki wskazują, że wrażliwość inhibitora typu I na środki pobudzające receptory β -adrenergiczne i dopaminowe może być dobrym biochemicznym testem oceny zmian reaktywności receptorów β -adrenergicznych i dopaminowych *in vivo*.

Inhibitor typu II jest termostabilnym białkiem o masie cząsteczkowej około 15 kD. Jest kompetytywnym inhibitorem białkowych substratów, akceptorów fosforu, i blokuje fosforylację katalizowaną przez APK, GPK i kinazy białkowe niezależne od cyklicznych nukleotydów [84]. Aktywność inhibitora typu II zmienia się wraz ze zmianami poziomu cGMP. Harmalina powoduje u szczurów tremor, któremu towarzyszy kilkakrotny wzrost poziomu cGMP w mózdku. Jednocześnie spada aktywność inhibitora typu II w tej strukturze mózgowej. Wszystkie opisane zmiany występują bezpośrednio po podaniu harmaliny i trwają około 30 min [83]. Mechanizm działania harmaliny polega na znacznym zwiększeniu impulsacji we włóknach wspinających — jednej z dróg aferentnych prowadzących do mózdku [5]. Guidotti i wsp. [37] stwierdzili, że podanie szczurom 3-acetylopirydyny prowadzi do wybiórczej chemicznej degeneracji włókien wspinających. Harmalina u szczurów ze zniszczonymi włóknami wspinającymi nie wywiera swego charakterystycznego

działania. U tych zwierząt nie obserwuje się ani tremoru, ani wzrostu poziomu cGMP w mózdzku. Nie zmienia się również aktywność inhibitora typu II [83]. Spadek aktywności inhibitora typu II jest więc skutkiem podwyższenia poziomu cGMP, a nie bezpośrednim działaniem harmaliny. Stwierdzono również, że nawet duże zmiany zawartości cAMP nie wpływają na aktywność inhibitora typu II [83]. Klonidyna wywołuje również zmiany w aktywności inhibitora typu II, zależnie od podanej dawki. Małe dawki tego leku (10-50 $\mu\text{g}/\text{kg}$) wywołują wzrost, a wysokie (0,2-1 mg/kg) obniżenie aktywności tego inhibitora w podwzgórzu szczurów. Obserwowany wzrost aktywności inhibitora typu II jest wywołany pobudzeniem presynaptycznych receptorów α_2 -adrenergicznych, ponieważ podanie 6-hydroksydopaminy zupełnie zapobiega temu działaniu. Jest to związane z obniżeniem poziomu cGMP, ponieważ wywołany klonidyną wzrost aktywności inhibitora typu II jest zmniejszony podaniem inhibitora PDE [87]. Duże dawki klonidyny wywołują wzrost poziomu cGMP w szyszynce [63, 64] i w podwzgórzu [87]. Towarzyszy temu spadek aktywności inhibitora typu II. Wydaje się, że inhibitor typu II jest jednym z czynników regulujących fosforylację katalizowaną przez GPK. Zapobiega on spontanicznej fosforylacji mediowanej przez układ zależny od cGMP. Pobudzenie cykazy guanylowej i wzrost poziomu cGMP powoduje jednoczesny spadek aktywności inhibitora typu II, co ułatwia efektywny proces fosforylacji.

Badania grupy Costy i Guidottiego wykazały, że inhibitor typu II odgrywa dużą rolę w transmisji GABA-ergicznego, dlatego białko to nazwano GABA modulina. Pobudzenie receptorów benzodiazepinowych przez diazepam powoduje zmniejszenie zawartości GABA moduliny w frakcji błonowej [3, 16, 17]. Jednocześnie obserwuje się wzrost aktywności tego białka we frakcji rozpuszczalnej [83]. Rolą GABA moduliny błonowej jest blokowanie miejsc receptorowych o dużym powinowactwie do GABA [40, 83]. Wysoce oczyszczona GABA modulina wykazuje zarówno właściwości blokowania miejsc wiązania GABA o wysokim powinowactwie, jak i właściwości blokowania fosforylacji [36, 40, 83, 93]. Blokowanie przez GABA modulina miejsc wiązania GABA o dużym powinowactwie jest spowodowane blokowaniem przez nią fosforylacji białek błonowych [15, 17, 39, 94]. Błony komórkowe, które pozbawiono GABA moduliny przez intensywne jej wymywanie ulegają szybkiej fosforylacji przez kinazę białkową, zależną od Ca^{++} -kalmoduliny z jednoczesnym zwiększeniem ilości miejsc wiązania GABA o dużym powinowactwie.

Fizjologiczna rola inhibitora typu II (GABA moduliny) nie ogranicza się do hamowania fosforylacji katalizowanej przez GPK. Odgrywa ona również olbrzymią rolę w regulacji neuroprzekaznictwa GABA-ergicznego przez regulację fosforylacji specyficznych białek błonowych, katalizowanej przez kinazę białkową zależną od Ca^{++} -kalmoduliny.

Donnelly i wsp. [21] stwierdzili, że wyciąg z mięśni szkieletowych zawiera termostabilne białko, które ma zdolność aktywowania GPK. Białko to

nazwano aktywującym stymulatorem. Kuo i Kuo [46] wyizolowali aktywujący modulator z kilku tkanek szczurów. Białko to zostało oczyszczone do homogenności (masa cząsteczkowa 34 kD) przez tę samą grupę badaczy. Aktywujący modulator ulega łatwo agregacji i dezagregacji. Zagregowana forma białka może mieć masę cząsteczkową do około 180 kD [75]. Wielu badaczy stwierdziło, że aktywujący modulator nasila w sposób zależny od stężenia fosforylację histonu katalizowaną przez GPK. Obecność tego białka jest nieodzowna do wykazania maksymalnej aktywności GPK [30, 54, 75, 78, 102]. Niewiele dotychczas wiadomo o fizjologicznej roli aktywującego modulatora. Shoji i wsp. [76] stwierdzili, że w szybko rosnących i dzielących się komórkach hepatoma 3924A znajduje się znacznie większa ilość GPK i aktywującego modulatora, niż w normalnych komórkach wątrobowych. Jest to zgodne z ogólnie akceptowanym poglądem, że w szybko rosnących i proliferujących komórkach występuje względna przewaga układu fosforylacyjnego stymulowanego przez cGMP, w stosunku do fosforylacji katalizowanej przez cAMP.

BŁONOWE SUBSTRATY FOSFORYLACJI STYMULOWANEJ PRZEZ CYKLICZNE NUKLEOTYDY

Dotychczas zidentyfikowano około 70 białek, które podlegają fosforylacji katalizowanej przez APK, GPK lub przez jony Ca^{++} . Niewiele jednak z nich zostało zaakceptowanych jako substraty. Nestler i Greengard [61] zdefiniowali warunki, jakie muszą spełnić białka, które są substratami fosforylacji:

1. Musi być znana specyficzność kinaz białkowych w stosunku do substratu. Substraty mogą być fosforylowane przez jedną lub przez kilka kinaz białkowych. Każda z kinaz białkowych może fosforylować jedną lub kilka specyficznych seryn wchodzących w skład substratu.

2. Należy określić dystrybucję w ośrodkowym układzie nerwowym oraz dystrybucję subkomórkową. Są to często cenne wskazówki ułatwiające określenie roli fizjologicznej fosfobiałek.

3. Należy prześledzić zmiany ilości i lokalizacji substratów fosforylacji w rozwoju ontogenetycznym.

4. Fosforylacja substratu powinna występować w układzie nienaruszonych komórek. Pozwala to na identyfikację neuromediatora i drugiego przekaźnika bodźców odpowiedzialnych za fosforylację substratu.

Najczęstszym aminokwasem, który podlega fosforylacji jest seryna. Czasem fosforylacji może ulegać również treonina. Wyjątkiem jest błonowa kinaza białkowa stymulowana przez EGF zwana kinezą tyrozyny, która wybiórczo fosforyluje tyrozinę.

W cytoplazmie komórkowej znajduje się wiele dobrze poznanych białek enzymatycznych, które są substratami APK i kinaz białkowych zależnych od jonów Ca^{++} i kalmoduliny. W tym opracowaniu ograniczę się jednak do substratów błonowych.

Jednym z dobrze poznanych błonowych białek podlegających fosforylacji jest GABA-modulina. Białko to jest fosforylowane przez kinazę zależną od Ca^{++} -kalmoduliny i przez APK [38, 101]. Ufosforylowana GABA modulina odłącza się od błony komórkowej i przechodzi do frakcji cytoplazmatycznej. Wówczas ulega fosforylacji inne białko błonowe, część receptora kompleksu receptora GABA-ergicznego, co powoduje znaczne zwiększenie powinowactwa GABA do swojego receptora.

Innym dobrze poznanym substratem fosforylacji jest synapsyna I (zwana uprzednio białkiem I). Synapsyną I nazwano dwa białka o masach cząsteczkowych 80 i 86 kD. Ich obecność stwierdzono we wszystkich neuronach. Synapsyna I ma bardzo specyficzną lokalizację subkomórkową. Znajduje się ona na zewnętrznej powierzchni ziarnistości synaptycznych, co sugeruje udział tych białek w procesie egzocytozy. Badania grupy Greengarda wykazały, że synapsyna I jest fosforylowana przez trzy różne kinazy białkowe: APK, kinazę I i kinazę II zależne od Ca^{++} -kalmoduliny. Te trzy kinazy białkowe fosforylują synapsynę I w trzech ściśle określonych miejscach. Jedną serynę fosforyluje APK i kinaza białkowa I zależna od Ca^{++} -kalmoduliny. Dwie inne seryny są fosforylowane przez kinazę białkową II zależną od Ca^{++} -kalmoduliny. Fosforylacja seryn 2 i 3 powoduje zmniejszenie powinowactwa synapsyny I do ziarnistości synaptycznych. Fosforylacja tych białek w miejscu 1 przez APK i kinazę zależną od Ca^{++} -kalmoduliny towarzyszy procesowi egzocytozy i wyzwala neuromediatora [61]. Doświadczenia wykonane na zwoju szyjnym górnym królika wykazały, że drażnienie elektryczne powoduje wyzwolenie noredrenaliny i fosforylację synapsyny I w miejscu 1. Fosforylacja tych białek występuje dopiero w kilkanaście sekund po stymulacji (50 impulsów 10 Hz) i osiąga szczyt po 30-60 sek. W dwie minuty po zakończeniu stymulacji synapsyna I jest znów w stanie zdefosforylowanym. Odpowiada to ściśle zależnościom czasowym występującym przy wyzwalaeniu neuromediatora po drażnieniu elektrycznym. Wydaje się więc, że fosforylacja synapsyny I przez APK lub kinazę białkową I, zależną od Ca^{++} -kalmoduliny, ma duże znaczenie przy procesie egzocytozy i uwolnieniu neuromediatora [60]. Dalsze badania wykazały, że środki depolaryzujące powodują znaczny wzrost stężenia wewnątrzkomórkowego wapnia i drastyczne zwiększenie fosforylacji synapsyny I, ponadto stymulują wyzwalaenie neuromediatora. W warunkach braku jonów Ca^{++} środki depolaryzujące nie wyzwalały neuromediatora i nie powodują fosforylacji synapsyny I [57]. Regulacji ulega nie tylko stopień fosforylacji synapsyny I, zmienia się również jej ogólna ilość. Podanie izoprenaliny powoduje około 30% zwiększenie ilości synapsyny I w szyszynce. Działanie to jest blokowane przez propranolol. Ilość synapsyny I w szyszynce

waha się w cyklu dobowym. Największą jej ilość obserwowano w czasie pierwszych 6 godzin ciemności [62].

Innym ciekawym białkiem, substratem fosforylacji katalizowanej przez APK, jest DARPP-32 (dopamina and cAMP regulated phosphoprotein). Jest to białko o masie cząsteczkowej 32 kD o specyficznej lokalizacji w OUN. Znajduje się w tych strukturach mózgu, które zawierają dużą liczbę receptorów D_1 -dopaminowych. W stanie fizjologicznym około 20% DARPP-32 jest w formie ufosforylowanej. Inkubacja skrawków z dopaminą lub dibutyrylo-cAMP powoduje dalszą fosforylację tego białka. DARPP-32 nie ulega fosforylacji, gdy w mieszaninie inkubacyjnej znajduje się noradrenalina, histamina lub 5-hydroksytryptamina. Wydaje się więc, że DARPP-32 jest białkiem wybiórczo zlokalizowanym w postsynaptycznych neuronach zawierających receptory D_1 -dopaminowe. Rola fizjologiczna tego białka dotychczas nie jest znana [96].

Zidentyfikowano jeszcze kilka błonowych fosfobiałek, u ssaków i u zwierząt niższych. Ich rola nie jest jednak jasna. We frakcji błonowej włókien soczewki oka stwierdzono istnienie dwóch białek — MP-26 i MP-19. Są one fosforylowane przez APK [24]. Metodami immunocytochemicznymi określono lokalizację MP-26. Białko znajduje się wyłącznie w komórkach soczewki oka [23]. Przykładem fosfobiałek u zwierząt niższych są fosfobiałka neuronów czuciowych i neuronów R-15 u *Aplysia*. Oba te białka są fosforylowane przez APK i prawdopodobnie regulują działanie kanału potasowego [61].

LITERATURA

1. Ashby C. D., Walsh D. A. — *Characterization of the interaction of protein inhibitor with adenosine-3,5-monophosphate-dependent protein kinases. I. Interaction with the catalytic subunits of the protein kinase.* J. Biol. Chem. 247: 6637-6642, 1972.
2. Ashby C. D., Walsh D. A. — *Characterization of the interaction of protein inhibitor with adenosine 3,5-monophosphate-dependent protein kinases. II. Mechanism of action with holoenzyme.* J. Biol. Chem. 248: 1255-1261, 1973.
3. Baraldi M., Guidotti A., Schwartz J. P., Costa E. — *GABA receptors in clonal cell lines: A model for study of benzodiazepine action at the molecular level.* Science 205: 821-823, 1979.
4. Beavo J. A., Bechtel P. J., Krebs E. G. — *Mechanism of control for cyclic AMP-dependent protein kinase from skeletal muscle.* Adv. Cyclic Nucleotide Res. 5: 241-251, 1975.
5. Biggio G., Guidotti A. — *Climbic fibers activation and 3,5-cyclic guanosine monophosphate (cGMP) content in cortex and deep nuclei of cerebellum.* Brain. Res. 96: 365-373, 1976.
6. Builder S. E., Beavo J. A., Krebs E. G. — *Stoichiometry of cAMP and 1,N⁶-etheno-cAMP binding to protein kinase.* J. Biol. Chem. 255: 2350-2354, 1980.
7. Builder S. E., Beavo J. A., Krebs E. G. — *The mechanism of activation of bovine skeletal muscle protein kinase by adenosine 3',5'-monophosphate.* J. Biol. Chem. 255: 3514-3519, 1980.
8. Brostrom C. O., Huang Y. C., Breckenridge B. M., Wolff D. J. — *Identification of*

- a calcium-binding protein as a calcium-dependent regulator of brain adenylate cyclase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 72:64-68, 1975.
9. Brostrom M. A., Brostrom C. O., Breckenridge B. M., Wolff D. J. — Calcium-dependent regulation of brain adenylate cyclase. *Adv. Cyclic Nucleotide Res.* 9: 85-99, 1978.
 10. Brostrom M. A., Brostrom C. O., Wolff D. J. — Cholera toxin-stimulated cyclic AMP accumulation in glial tumor cells modulation by Ca^{++} . *Mol. Pharmacol.* 20: 59-67, 1981.
 11. Brostrom M. A., Brostrom C. O., Wolff D. J. — Calcium dependence of hormone-stimulated cAMP accumulation in intact glial tumor cells. *J. Biol. Chem.* 254: 7548-7557, 1979.
 12. Buss J. E., McCune R. W., Gill G. N. — Comparison of cyclic nucleotide binding to adenosine 3'-5'-monophosphate-dependent protein kinases. *J. Cyclic Nucleotide Res.* 5:225-237, 1979.
 13. Chau V., Huang L. C., Romero G., Biltonew R. L., Huana C. — Kinetic studies on the dissociation of adenosine cyclic 3'-5'-monophosphate from the regulatory subunit from rabbit skeletal muscle. *Biochemistry* 19: 924-928, 1980.
 14. Cheung W. Y., Bradham L. S., Lynch T. J., Lin Y. M., Tallant E. A. — Protein activator of cyclic 3'-5'-nucleotide phosphodiesterase of bovine or rat brain also activates its adenylate cyclase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 66: 1055-1062, 1975.
 15. Costa E. — Mechanism of GABA potentiation by benzodiazepines. *Prog. Physiol. Sci.* 12:185-195, 1981.
 16. Costa E., Guidotti A. — Recent studies on the mechanism whereby benzodiazepines facilitate GABA-ergic transmission. W: *GABA-biochemistry and CNS function*. Mandel P., De Fendis P.W. (red.), Plenum Publ. Corp., New York, str. 371-379, 1979.
 17. Costa E., Guidotti A., Massotti M., Mazarri S. — The regulations of GABA 1,4-benzodiazepine interactions. W: *Neurotransmitters and their receptors*. Littauer U.Z., Dudai Y., Silman I., Teichberg V. I., Vogel Z. (red.), John Wiley and Sons Ltd., New York, str. 417-427, 1980.
 18. De Jonge H. R., Rosen O. M. — Self-phosphorylation of cyclic guanosine 3'-5'-monophosphate-dependent protein kinase from bovine lung. *J. Biol. Chem.* 252: 2780-2783, 1977.
 19. Demaille J. G., Peters K. A., Fischer E. H. — Isolation and properties of the rabbit skeletal muscle protein inhibitor of adenosine 3'-5'-monophosphate-dependent protein kinases. *Biochemistry* 16:3080-3086, 1977.
 20. Donnelly T. E. — Properties of the activator-dependent cyclic nucleotide phosphodiesterase from bovine heart. *Biochem. Biophys. Acta* 480: 193-203, 1977.
 21. Donnelly T. E., Kuo J. F., Miyamoto E., Greengard P. — Protein kinase modulator from lobster tail muscle. II. Effects of modulator on holoenzyme and catalytic subunits of guanosine 3'-5'-monophosphate-dependent and adenosine 3,5-monophosphate-dependent protein kinases. *J. Biol. Chem.* 248: 199-203.
 22. Eldik L. J. V., Watterson D. M. — Phosphorylation and calmodulin stimulated activities. *Fed. Proc.* 38: 789, 1979.
 23. Fitzgerald P. G., Bok D., Horwitz J. — Immunocytochemical localization of the main intrinsic polypeptide (MIP) in ultrathin frozen sections of rat leus. *J. Cell. Biol.* 97: 1491-1499, 1983.
 24. Garland D., Russel P. — Phosphorylation of leus fiber cell membrane proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82: 652-657, 1985.
 25. Geahlen R. L., Allen S. M., Krebs E. G. — Effect of phosphorylation on the regulatory subunit of the type I cAMP-dependent protein kinase. *J. Biol. Chem.* 256: 4536-4540, 1981.
 26. Geahlen R. L., Krebs E. G. — Studies on the phosphorylation of the type I cAMP dependent protein kinase. *J. Biol. Chem.* 255: 9375-9379, 1980.
 27. Geahlen R. L., Krebs E. G. — Regulatory subunit of the type I cAMP dependent protein

- kinase as an inhibitor and substrate of the cGMP-dependent protein kinase. *J. Biol. Chem.* 255: 1164-1169, 1980.
28. Gill G. N., Garen I. D. — Role of the receptor in the mechanism of adenosine 3'5'-cyclic monophosphate. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 68: 786-790, 1971.
 29. Gill G. N., Holdy K. E., Walton G. M., Kanstein C. B. — Purification and characterization of 3'5'-cyclic GMP-dependent protein kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 73: 3918-3922, 1976.
 30. Gill G. N., Walton G. N. — Assay for cyclic nucleotide-dependent protein kinases. *Adv. Cyclic Nucleotide Res.* 10: 93-106, 1979.
 31. Gnegy M. E., Bagley S. — Effect of guanyl nucleotides on calmodulin stimulation of adenylate cyclase activity in rat striatum. W: *Dynamics of neurotransmitter function*. Hanin I (red.), Reven Press, New York, str. 237-243, 1984.
 32. Gnegy M. E., Lau Y. S., Treisman G. — Role of calmodulin in states of altered 3'5'-cyclic AMP by endogenous phosphodiesterase activator. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 73: 352-355, 1976.
 33. Gnegy M. E., Lau Y. S., Treisman G. — Role of calmodulin in states of altered catecholamine sensitivity. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 356: 304-318, 1980.
 34. Gnegy M., Treisman G. — Effect of calmoduline on dopamine sensitive adenylate cyclase activity in rat strial membranes. *Mol. Pharmacol.* 19: 256-263, 1981.
 35. Gnegy M. E., Uzunov P., Costa E. — Regulation of dopamine stimulation of strial adenylate cyclase by an endogenous Ca^{2+} -binding protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 73: 3887-3890, 1976.
 36. Guidotti A., Baraldi M., Schwartz J. P., Costa E. — Molecular mechanism regulating the interaction between the benzodiazepines and GABA receptors in the central nervous system. *Pharm. Biochem. Behav.* 10:803-807, 1979.
 37. Guidotti A., Biggio G., Costa E. — 3-Acetylpyridine: A tool to inhibit the tremor and increase of cGMP in cerebellar cortex elicited by Hermaline. *Brain Res.* 107: 201-205, 1977.
 38. Guidotti A., Konkeld D. R., Ebstein B., Corda M. B., Wise B. C., Krutzsch H., Meek J. L., Costa E. — Isolation, characterization and purification to homogeneity of a rat brain protein (GABA-modulin). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79:6084-6088, 1982.
 39. Guidotti A., Massotti M., Costa E. — GABA-modulin regulates solubilized benzodiazepine and GABA recognition sites. W: *Psychopharmacology and biochemistry of neurotransmitter receptors*. Yamamura H. J., Olsen R. W., Usdin E. (red.), Elsevier/North Holland Biomed. Press, Amsterdam, str. 655-660, 1980.
 40. Guidotti A., Toffano G., Costa E. — An endogenous protein modulates the affinity of GABA and benzodiazepine receptors in rat brain. *Nature* 257: 553-555, 1978.
 41. Hanbauer I., Gimble J., Sankaron K., Sherard R. — Modification of striatal cyclic nucleotide phosphodiesterase by calmodulin: regulation by opiate dopamine receptor activation. *Neuropharmacology* 18: 859-864, 1979.
 42. Hanbauer I., Pradhan S., Yang H. Y. T. — Role of calmodulin in dopaminergic transmission. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 356: 292-303, 1980.
 43. Hidaka H., Yamaka T., Ochiai Y., Asano T., Yamabe H. — Cyclic 3'5'-nucleotide phosphodiesterase determined in various human tissues by DEAE-cellulose chromatography. *Biochem. Biophys. Acta* 484: 398-407, 1977.
 44. Krinks M., Klee C. B. — Proteolytic activation of Ca^{2+} -dependent cyclic nucleotide phosphodiesterase. *Fed. Proc.* 39: 1624, 1980.
 45. Kuo J. F. — Changes in activities of modulators of cyclic AMP-dependent and cyclic GMP-dependent protein kinases in pancreas and adipose tissue from alloxan-induced diabetic rats. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 85:1214-1220, 1975.
 46. Kuo W. N., Kuo J. F. — Isolation of stimulatory modulator of guanosine 3'5'-monophosphate-dependent protein kinase from mammalian heart devoid of inhibitory

- modulator of adenosine 3'5'-monophosphate-dependent protein kinase. *J. Biol. Chem.* 251: 4283-4286, 1974.
47. Kuo J. F., Shoji M., Kuo W. N. — *Molecular and physiopatological aspects of mammalian cyclic GMP-dependent protein kinase.* *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 18: 341-355, 1978.
48. La Porte D. C., Toscano W. A., Storm D. R. — *Cross-linking of iodine ¹²⁵labelled calmoduline to the Ca⁺⁺-sensitive phosphodiesterase purified from bovine heart.* *Biochemistry* 18: 2820-2825, 1979.
49. Lin Y. M., Cheung W. Y. — *Ca²⁺-dependent cyclic nucleotide phosphodiesterase. W: Calcium and cell function.* Vol. 1, Cheung W. Y. (red.), Academic Press, New York, str. 79-107, 1980.
50. Lin M. Y., Lin Y. P., Cheung W. Y. — *Cyclic 3,5-nucleotide phosphodiesterase. Purification, characterization and active from of the protein activator from bovine brain.* *J. Biol. Chem.* 249: 4943-4954, 1974.
51. Lincoln T. M., Corbin J. D. — *Adenosine 3'5'-monophosphate and guanosine 3'5'-monophosphate-dependent protein kinases: Possible homologous proteins.* *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74: 3239-3243, 1977.
52. Lincoln T. M., Dills W. L., Corbin J. D. — *Purification and subunit composition of guanosine 3'5'-monophosphate-dependent protein kinase from boine lung.* *J. Biol. Chem.* 252: 4269-4275, 1977.
53. Lincoln T. M., Flockhert D. A., Corbin J. D. — *Studies on the Structure and mechanism of action of guanosine 3'5'-monophosphate-dependent protein kinase.* *J. Biol. Chem.* 253: 6002-6009, 1978.
54. McKenzie C. W., Donnelly T. E. — *Variable dependence on protein kinase stimulatory modulator for cGMP stimulation of histone phosphorylation by rat liver cyclic GMP-dependent protein kinase.* *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 88: 462-469, 1979.
55. McCune R. W., Gill G. N. — *Positive cooperativity in guanosine 3'5'-monophosphate binding to guanosine 3'5'-monophosphate-dependent protein kinase.* *J. Biol. Chem.* 254: 5083-5091, 1979.
56. McPherson J. M., Whitehouse S., Walsh D. A. — *Possibility of shape conformers of the protein inhibitor of the cyclic adenosine monophosphate-dependent protein kinase.* *Biochemistry* 18: 4835-4845, 1979.
57. Meldolesi J., Huttner W. B., Tsien R. Y., Pozzan T. — *Free cytoplasmic Ca²⁺ and neurotransmitter release: Studies on PC12 cells and synaptosomes exposed to α -latrotoxin.* *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81: 620-624, 1984.
58. Morril M. E., Thompson S. T., Stillwagen — *Purification of a cyclic nucleotide phosphodiesterase from bovine brain using blue dextran-sepharose chromatography.* *J. Biol. Chem.* 254: 4371-4374, 1979.
59. Nagao S., Suzuki Y., Watanabe Y. — *Activation by calcium-binding protein of guanylate cyclase in Tetrahymena pyriformis.* *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 90: 261-268, 1979.
60. Nestler E. J., Greengard P. — *Nerve impulses increase the phosphorylation state of protein I in rabbit superior cervical ganglia.* *Nature* 296: 452-454, 1982.
61. Nestler E. J., Greengard P. — *Protein phosphorylation in the brain.* *Nature* 305: 583-588, 1983.
62. Nestler E. J., Zatz M., Greengard P. — *A diurnal rhythm in pineal protein I content mediated by adrenergic neurotransmission.* *Science* 217: 357-359, 1982.
63. O'Dea R. F., Gagnon C., Zatz M. — *Regulation of guanosine 3'5'cyclic monophosphate in the rat pineal and posterior pituitary glands.* *J. Neurochem.* 31: 733-741, 1978.
64. O'Dea R., Zatz M. — *Catecholamine-stimulated cyclic GMP accumulation in the rat pineal: Apparent prasyaptic site of action.* *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 73: 3398-3405, 1976.
65. Piascik M. T., Wisler P. L., Johnson C. L., Potter J. D. — *Ca²⁺-dependent regulation of guinea pig brain adenylate cyclase.* *J. Biol. Chem.* 255: 4176-4181, 1980.

66. Rangel-Aldo R., Kupiec J. W., Rosen O. M. — Resolution of the phosphorylated and dephosphorylated cAMP-binding proteins of bovine cardiac muscle by affinity labeling and two-dimensional electrophoresis. *J. Biol. Chem.* 254: 2499-2508, 1979.
67. Rangel-Aldo R., Rosen O. M. — Dissociation and reassociation of the phosphorylated and nonphosphorylated forms of adenosine 3'5'-monophosphate-dependent protein kinase from bovine cardiac muscle. *J. Biol. Chem.* 251: 3375-3380, 1976.
68. Rose O. M., Erlichman J. — Reversible autophosphorylation of a cyclic 3'5'-AMP-dependent protein kinase from bovine cardiac muscle. *J. Biol. Chem.* 250: 7786-7794, 1975.
69. Rosen O. M., Erlichman J., Rubin C. S. — Molecular structure and characterization of bovine heart protein kinase. *Adv. Cyclic Nucleotide Res.* 5: 253-263, 1975.
70. Sakai T., Makino H., Tanaka R. — Increase activity of cyclic AMP phosphodiesterase from frozen-thawed rat liver. *Biochem. Biophys. Acta* 522: 477-480, 1978.
71. Salter R. S., Krinks M. H., Klee C. B., Neer N. J. — Calmoduline activates catalytic unit of brain adenylate cyclase. *J. Biol. Chem.* 256: 9830-9833, 1981.
72. Seamon K. B., Daly J. W. — Calmoduline stimulation of adenylate cyclase in rat brain membranes does not require GTP. *Life Sci.* 30: 1457-1464, 1982.
73. Sharma R. K., Wang T. H., Wirch E., Wang J. H. — Purification and properties of bovine brain calmodulin-dependent cyclic nucleotide phosphodiesterase. *J. Biol. Chem.* 255: 5916-5923, 1980.
74. Sharma R. K., Wang T., Wirch E., Wang J. H. — Purification and properties of bovine brain calmodulin-dependent cyclic nucleotide phosphodiesterase. *Fed. Proc.* 39: 1624, 1980.
75. Shoji M., Brackett N. L., Tse J., Shapira R., Kuo J. F. — Molecular properties and mode of action of homogeneous preparation of stimulatory modulator of cyclic GMP-dependent protein kinase from the heart. *J. Biol. Chem.* 253: 3427-3434, 1978.
76. Shoji M., Morris H. P., Davis C. W., Brackett N. L., Kuo J. F. — Modified cyclic nucleotide system in Morris hepatoma 3924A favoring expression of cyclic GMP effect. *Biochem. Biophys. Acta* 500: 419-424, 1978.
77. Shoji M., Patrick J. G., Davis C. W., Kuo J. F. — Guanosine cyclic monophosphate-dependent protein kinase from fetal calf heart. Purification, general properties and catalytic subunit. *Biochem. J.* 161: 213-221, 1977.
78. Shoji M., Patrick J. G., Tse J., Kuo J. F. — Studies on the cyclic GMP-dependent protein kinase from bovine aorta. Possible existence of a catalytic subunit. *J. Biol. Chem.* 252: 4347-4353, 1977.
79. Suzuki Y., Nagao S., Abe K., Hirabayashi T., Watanabe Y. — Tetrahymena calcium-binding protein is indeed calmodulin. *J. Biochem.* 89: 333-336, 1981.
80. Szmigielski A. — The effect of beta receptor stimulation on the activity of the inhibitor of cAMP-dependent protein kinase. *Acta Physiol. Pol.* 32: 501-506, 1981.
81. Szmigielski A. — Modulation of endogenous protein kinase inhibitors in rat heart by the beta adrenergic receptor. *Arch. Int. Pharmacodyn. Therap.* 249: 64-71, 1981.
82. Szmigielski A. — Endogenous protein kinase inhibitors: Modulation by dopaminergic receptors. W: *Dynamics of neurotransmitter function*, Hanin I. (red.), Raven Press, New York, str. 339-348, 1984.
83. Szmigielski A., Guidotti A. — Action of harmaline on the cerebellar content of cyclic GMP and on the activities of two endogenous inhibitors of protein kinase. *Neurochem. Res.* 4: 189-200, 1979.
84. Szmigielski A., Guidotti A., Cosa E. — Endogenous protein kinase inhibitors. Purification, characterization, and distribution in different tissues. *J. Biol. Chem.* 252: 3848-3853, 1977.
85. Szmigielski A., Kowner A. — The effect of stimulation of pre- and postsynaptic dopamine receptors on the endogenous inhibitor of cAMP-dependent protein kinase. *Arch. Int. Pharmacodyn. Therap.* 272: 205-213, 1984.

86. Szmigielski A., Szadowska A., Szmigielska H. — *Effect supersensitivity of pre- and postsynaptic dopamine receptors on the activity of endogenous inhibitor of cAMP dependent protein kinase in rat striatum*. Arch. Int. Pharmacodyn. Therap. 272: 214-224, 1984.
87. Szmigielski A., Szmigielska H., Zalewska J. — *The effect of clonidine on cGMP content and on the activity of endogenous inhibitor of protein kinase in rat hypothalamus*. I.R.C.S. Med. Sci. 12: 1036-1037, 1984.
88. Szmigielski A., Zawilska J., Kondracki K. — *Isoprenaline-induced changes in type I inhibitor activity as an index of beta-adrenergic receptor subsensitivity*. Pol. J. Pharmacol. Pharm. 36: 281-291, 1984.
89. Taniguchi T., Ejisawa M., Lee J. J., Hidaka H. — *Cyclic 3'5'-nucleotide phosphodiesterase of rabbit sinoarterial node*. Biochem. Biophys. Acta 522: 465-476, 1978.
90. Tao M., Salas M. I., Lipman F. — *Mechanisms of activation by adenosine 3'5'-cyclic monophosphate of a protein phosphokinase from rabbit reticulocytes*. Proc. Natl. Acad. Sci USA 67: 408-414, 1970.
91. Tao T. S., Wang T. H., Wang J. H. — *Purification and properties of the protein activator of bovine heart cyclic adenosine 3,5-monophosphate phosphodiesterase*. J. Biol. Chem. 248: 558-595, 1973.
92. Thompson W. J., Terrasaki W. L., Epstein P. M., Strada S. J. — *Assay of cyclic nucleotide phosphodiesterase and resolution of multiple forms of the enzyme*. Adv. Cyclic. Nucleotide Res. 10: 69-92, 1979.
93. Toffano G., Guidotti A., Costa E. — *Purification of an endogenous protein inhibitor for the high affinity binding of gamma-aminobutyric acid to synaptic membrane of rat brain*. Proc. Natl. Acad. Sci USA 75: 4024-4028, 1978.
94. Toffano G., Leon A., Massotti M., Guidotti A., Costa E. — *GABA-modulin: A regulatory protein for GABA receptors*. W: *Advances in biochemical psychopharmacology*, Raven Press, New York, vol. 21, str. 133-142, 1980.
95. Uzunov P., Weiss B. — *Separation of multiple molecular forms of cyclic adenosine 3,5-monophosphate phosphodiesterase in rat cerebellum by polyacrylamide gel electroforesis*. Biochim. Biophys. Acta 284: 220-226, 1972.
96. Walaas S. I., Asward D. W., Greengard P. — *A dopamine-and cyclic AMP-regulated phosphoprotein enriched in dopamine innervated brain regions*. Nature 301: 69-71, 1983.
97. Walsh D. A. — *Role of the cAMP-dependent protein kinase as the transducer of cAMP action*. Biochem. Pharmacol. 27:1801-1804, 1978.
98. Walsh D. A., Ashby C. D., Gonzales C., Calkins D., Fischer E. H., Krebs E. G. — *Purification and characterization of a protein inhibitor of adenosine 3,5-monophosphate-dependent protein kinase*. J. Biol. Chem. 246: 1977-1985, 1971.
99. Wells J. N., Hardman J. G. — *Cyclic nucleotide phosphodiesterase*. Adv. Cyclic Nucleotide Res. 8: 119-143, 1977.
100. Wetcott K. R., La Porte D. C., Storm D. R. — *Resolution of adenylate cyclase sensitive to Ca^{2+} and calmodulin by calmodulin-Sepharose affinity chromatography*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76: 204-208, 1979.
101. Wise B., Guidotti A., Cos a E. — *Phosphorylation induced a decrease in the biological activity of the protein inhibitor (GABA-modulin) of gamma-aminobutric acid binding sites*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80: 886-890, 1983.
102. Yamamoto M., Kakai Y., Hashimoto E., Nishizuka Y. — *Intrinsic activity of guanosine 3'5'-monophosphate-dependent protein kinase similar to adenosine 3'5'-monophosphate-dependent protein kinase. I. Phosphorylation of histone fractions*. J. Biochem. 81: 1857-1863, 1977.
103. Zawilska J., Szmigielski A. — *Isoprenaline-induced changes in the activity of the*

- endogenous inhibitor of cAMP-dependent protein kinases under conditions of β -adrenoceptor supersensitivity.* J. Pharm. Pharmacol. 38: 239-241, 1986.
104. Zawilska J., Szmigielski A. — *Effect of repeated electroconvulsive shocks on isoprenaline-induced changes of the endogenous inhibitor of cAMP-dependent protein kinase in rat brain.* Europ. J. Pharmacol. 126: 273-279, 1986.
105. Zoller M. J., Kerlavage A. R., Taylor S. S. — *Structural comparisons of cAMP dependent protein kinases I and II from porcine muscle.* J. Biol. Chem. 2408-2412, 1979.

MARCIN KAMIŃSKI

Śląska Akademia Medyczna

Katowice

NEURON

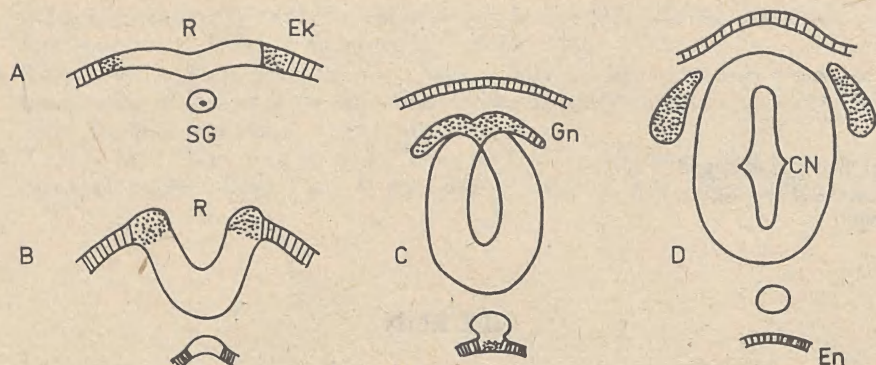
WPROWADZENIE

Różnorodne, zarówno pod względem ilościowym, jak i jakościowym, bodźce docierające ze środowiska zewnętrznego oraz wewnętrznego sprawiają, iż w trakcie rozwoju filogenetycznego i ontogenetycznego z ektodermy rozwija się układ nerwowy. Układ o niezmiernym stopniu skomplikowania morfologicznego i funkcjonalnego, pełniący rolę nadrzędnego systemu integrującego przebieg różnorodnych procesów i przemian. W tkance tej oprócz wysoko wyspecjalizowanych struktur odbierających bodźce (receptory), występują inne, które odpowiadają za transmisję informacji, jej analizę, selekcję, interpretację, magazynowanie (pamięć) itp. Komórki nerwowe charakteryzuje nie tylko pobudliwość, zdolność do przewodzenia, ale co najważniejsze gotowość do tworzenia nowych powiązań międzyneuronalnych (interneuronalna synaptogeneza), w których są przechowywane i utrwalane doświadczenia osobnicze.

Podstawową strukturą układu nerwowego są neurony występujące w liczbie 22 miliardów, które otrzymujemy „w wianie” na całe życie. Oprócz nich, w ośrodkowym układzie nerwowym występują komórki glejowe, a w obwodowym układzie nerwowym komórki Schwanna (lemmocyty) i satelitarne komórki tkanki łącznej — mezoglej, fibloblasty, włókna łącznotkankowe oraz naczyń krwionośne.

ROZWÓJ UKŁADU NERWOWEGO

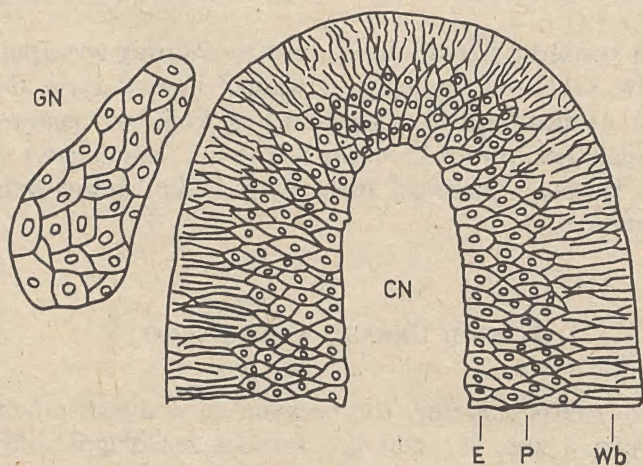
Różnicowanie neuroektodermy rozpoczyna się w dwudziestym dniu rozwoju zarodkowego, a więc wówczas gdy zarodek ma długość około 0,5 mm i składa się z 5-6 somitów. Skupiona na grzbietowej stronie zarodka ektoderma tworzy płytkę nerwową, a w niej na wysokości struny grzbietowej powstaje początkowo płytka, a następnie pogłębiające się zagłębienia zwane rynienką nerwową (rys. 1). Przed jej zamknięciem i wytworzeniem cewki nerwowej, która



Rys. 1. Rozwój układu nerwowego A-D, R — rynienka nerwowa, SG — struna grzbietowa, Ek — ektoderma, Gn — grzebień nerwowy, CN — cewka nerwowa, En — entoderma

w przyszłości stanie się punktem wyjścia różnicowania centralnego systemu nerwowego, wywędrowują zarówno z jej odcinka grzbietowego (grzebień nerwowy), jak i brzuszno ugrupowania komórek tworząc związki zwojów mózgowych, rdzeniowych oraz układu anatomicznego.

W fazie początkowej cewkę nerwową wyściela jednowarstwowy nabłonek walcowaty, utworzony z medulloblastów. Komórki te intensywnie dzieląc się przekształcają nabłonek jednowarstwowy w wielowarstwowy. W rezultacie ściana cewki nerwowej od strony światła składa się z: a) warstwy wewnętrznej (ependymalnej), b) warstwy środkowej (płaszczowej) zawierającej najwięcej komórek, c) warstwy zewnętrznej (wielonabrzeżnego) pozbawionej jąder komórkowych (rys. 2).



Rys. 2. CN — fragment cewki nerwowej, E — warstwa ependymalna, P — warstwa płaszczowa, Wb — welon brzeżny, GN — grzebień nerwowy

Równoległe z cewką nerwową różnicują się grzebień nerwowy, które tracą

łączność, tworzą samodzielne ugrupowania komórek po jej bokach. Z nich powstana:

- neuroblasty a następnie neurocyty zwojów mózgowych i rdzeniowych;
- glioblasty gleju obwodowego a następnie komórki satelitarne zwojów rdzeniowych, komórki Schwanna (lemmocyty) uczestniczące w budowie osłonek (osłonek mielinowych);
- sympatoblasty, które wytworzą neurony wielobiegunkowe zwojów układu autonomicznego oraz komórki chromochłonne rdzenia nadnerczy i ciałek przyzwojowych chromochłonnych;
- komórki c tarczycy oraz prawdopodobnie wszystkie inne komórki serii APUD Perse'a (*amine precursor uptake and decarboxylation*);
- komórki opony miękkiej.

Wracając do cewki nerwowej, z warstwy wewnętrznej (ependymalnej) rozwijają się:

- ependymoblasty — ependymocyty wyściełające komory mózgu, kanał centralny rdzenia wraz z odmianami — tanocyty;
- komórki nabłonkowe wyściełające oponę twardą i spłot naczyńiówkowy;
- pituicyty — tworzące zrąb części nerwowej przysadki mózgowej;
- pinealoblasty — pinealocyty — ostateczne komórki gruczołowej szyszynki.

Z warstwy płaszczowej cewki nerwowej rozwijają się glioblasty, a następnie komórki glejowe centralnego systemu nerwowego (CSN) — astrocyty włókniste, astrocyty protoplazmatyczne, oligodendrocyty oraz neuroblasty różnicujące się w neurocyty i niektóre komórki zmysłowe.

BUDOWA NEURONU

Neuron to podstawowa morfologiczna, funkcjonalna i troficzna jednostka układu nerwowego, zbudowana z ciała komórki nerwowej — perikarionu zawierającego jądro komórkowe wraz z niewielką częścią cytoplazmy oraz licznych wypustek. Średnice neuronów są niezmiernie zróżnicowane od niewielkich 4 μm ulokowanych w korze ruchomej mózgu, do wielkich komórek piramidalnych Betza 100—140 μm ulokowanych w korze ruchowej mózgu. Do dużych zaliczamy również motoneurony ruchowe rogów przednich rdzenia kręgowego (60—80 μm) oraz komórki gruszkowate Purkiniego mózdzku (60—75 μm). Zwykle neurony o średnicy mniejszej niż 25 μm są wyposażone w krótki, pozbawiony mieliny akson, większe natomiast mają akson dłuższy pokryty osłonką rdzenną.

Większość neuronów ma dwojakiego typu wypustki nerwowe — protoplazmatyczne, czyli dendryty oraz neuryty. Pierwsze z wymienionych są zazwyczaj mnogie, silnie rozgałęzione w pobliżu perikarionu, mają na swojej powierzchni bardzo liczne kolce dendrytyczne. Dendryty przewodzą podniety nerwowe dokońrkowo, celulopetalnie, aferentnie. Neuryt występuje zwykle pojedynczo, z wyjątkiem niektórych komórek układu autonomicznego. Znane są

również neurony bezwypustkowe spełniające funkcję pól dendrytycznych, np. komórki amakrynowe siatkówki oka oraz komórki ziarniste opuszki węchowej. Zazwyczaj neuryty rozgałęziają się dopiero w końcowych odcinkach swojego przebiegu, a więc z dala od ciała komórki. Przewodzą odkomórkowo, celulofugalnie, czyli eferentnie.

Dzięki wypustkom nerwowym między neuronami mogły powstawać bardzo rozbudowane i skomplikowane połączenia międzyneuralne zwane synapsami. Wypustki łączą się z elementami strukturalnymi różnorodnych tkanek — nabłonkowej, łącznej, mięśniowej — tworząc wyspecjalizowane układy receptorów.

KLASYFIKACJA NEURONÓW

Wyróżniamy trzy morfologiczne kryteria podziału neuronów:

1. na podstawie liczby wypustek nerwowych,
2. w zależności od długości neurytu,
3. na podstawie stopnia rozprzestrzeniania i wyglądu dendrytów.

Przyjmując kryterium liczby wypustek neurony dzielimy na: jednowypustkowe, rzekomo jednowypustkowe, dwuwypustkowe oraz najliczniej reprezentowane wielowypustkowe (rys. 3).

— **Neurony jednowypustkowe** (unipolarne) mają wyłącznie neuryt. U człowieka wstępują one w jądrze ruchowym nerwu trójdzielnego, w części jąder podwzgórza.

— **Neurony rzekomo jednowypustkowe** (pseudounipolarne) wyposażone są w pojedynczą wypustkę, która w niewielkiej odległości od perikarionu dzieli się w kształcie litery T na dendryt i neuryt. Tego typu komórki w organizmie człowieka występujące we wszystkich zwojach rdzeniowych i mózgowych, poza zwojem węzownicowatym i przedsionkowym nerwu słuchowego, są typowymi neuronami czuciowymi.

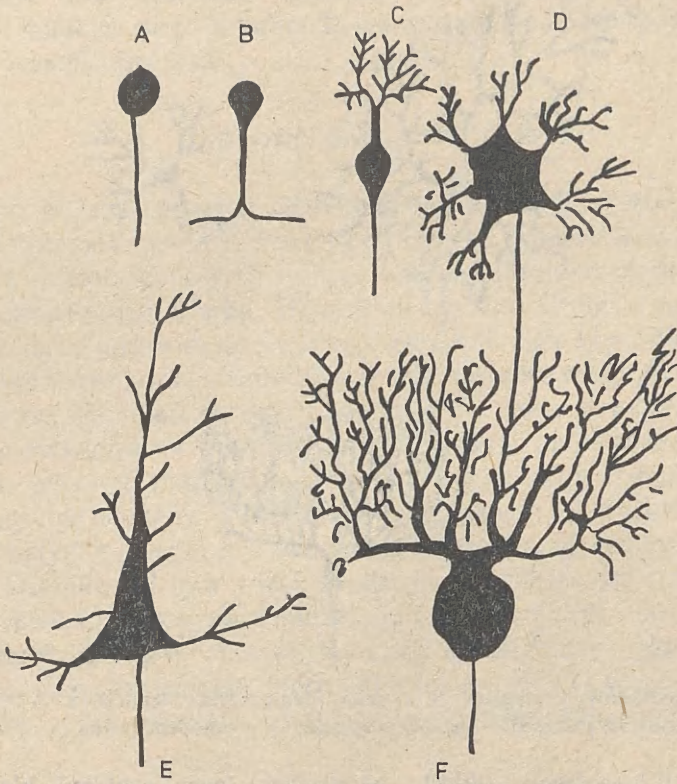
— **Neurony dwuwypustkowe** (bipolarne) mają jeden dendryt i neuryt. Występują w jądrze przedsionkowym i węzownicowatym nerwu słuchowego, w nabłonku węchowym, siatkówce oka oraz w niektórych jądrach podwzgórza.

— **Neurony wielowypustkowe** (multipolarne) mają jeden neuryt oraz wiele dendrytów. Dzielimy je dodatkowo na podstawie kształtu na:

- a. Neurony gwiazdziste występujące w zwojach układu autonomicznego i w rdzeniu kręgowym,
- b. Neurony piramidalne zlokalizowane w korze mózgu,
- c. Neurony różnokształtne (gruszkowate, mitralne) budujące korę mózgu, mózdzku, rdzeń przedłużony, jądra mózgu i mózdzku.

Przyjmując jako kryterium podziałowe długość aksonu wśród neuronów możemy wyróżnić:

1. Neurony o długim neurycie — typ Golgi I, np. motoneurony ruchowe



Rys. 3. Kształt komórek nerwowych. A — komórka jednobiegunowa, B — komórka rzekomo-jednobiegunowa, C — komórka dwubiegunowa, D — komórka wielobiegunowa, gwiazdzista, E — komórka piramidalna, F — komórka Purkiniego

rogów przednich rdzenia kręgowego, komórki piramidalne kory mózgu, komórki gwiazdzone warstwy ziarnistej kory mózdzku itp.

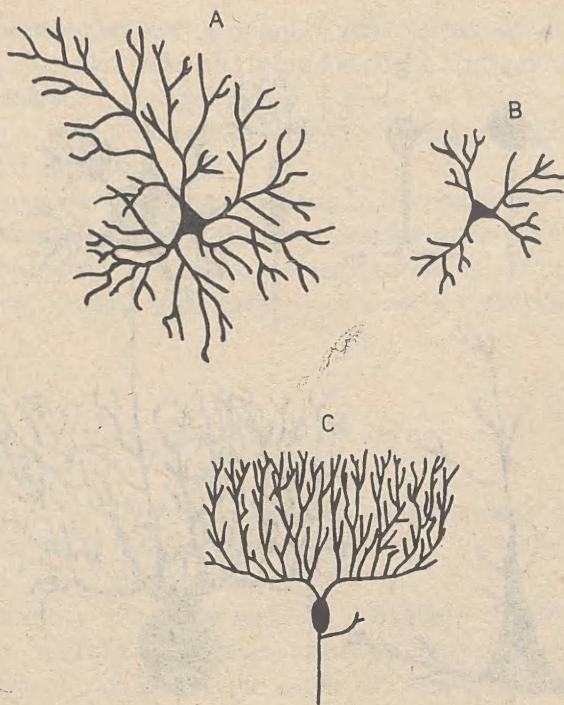
2. Neurony o krótkim neurycie — typ Golgi II, do nich należy zaliczyć większość komórek nerwowych CSN, zwłaszcza w obrębie kory mózgowej i substancji szarej rdzenia kręgowego.

Wygląd i rozprzestrzenianie dendrytów stworzyło podstawę do podziału neuronów na:

a. **Izodendrytyczne** charakteryzujące się długimi prostymi wypustkami protoplazmatycznymi o średniej liczbie rozgałęzień i umiarkowanej liczbie kolców dendrytycznych. Występują one w obrębie ośrodków pnia mózgu.

b. **Allodendrytyczne**, te z kolei mają kilka głównych pni dendrytycznych mocno rozgałęzionych. Należą do nich np. komórki piramidalne kory mózgu oraz inne neurony wielowypustkowe poza neuronami pnia mózgu.

c. **Idiodendrytyczne** tworzą rozgałęzienia drzewkowate z bardzo licznymi kolcami dendrytycznymi. Do tego typu komórek nerwowych zaliczamy: komórki zwojowe Purkiniego mózdzku, węchowe opuszki węchowej, zwojowe nerwu słuchowego, dwubiegunowe siatkówki (rys. 4).



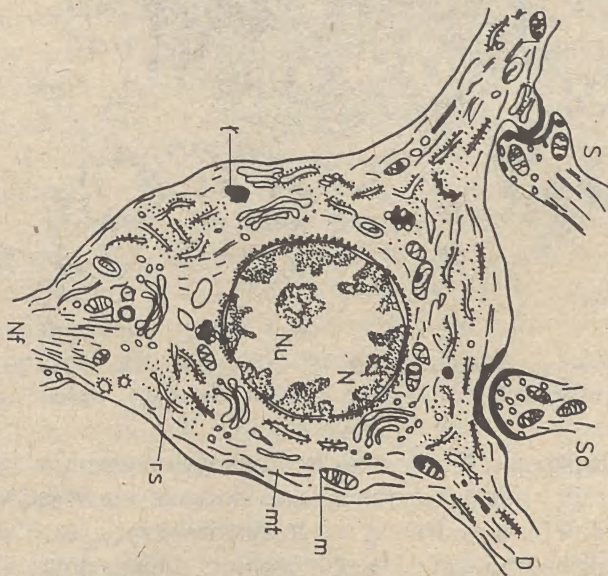
Rys. 4. Podział neuronów wynikający ze stopnia rozpuszczenia dendrytów. A — neurony izodendryczne, B — aksodendryczne, C — idiodendryczne

Po omówieniu rozwoju układu nerwowego oraz systemu klasyfikacji neuronów chciałbym przejść do analizy składowych strukturalnych zarówno perykarionu, jak i wypustek. Pomimo, iż komórki te w podstawowej swojej charakterystyce morfologicznej podlegają ogólnym prawom i zasadom funkcjonującym w całym układzie komórkowym, to jednak mają szereg różnic zarówno jakościowych, jak i ilościowych wynikających z ich specyficznej funkcji. Jedną z nich ma charakter spektakularny i jest widoczna za pomocą prostych mikroskopów optycznych. Otóż objętość neuroplazmy, z której zbudowane są wypustki neuronów wielokrotnie przewyższa objętość perykarionu. Z kolei objętość cytoplazmy przekracza o dwa trzy rzędy wielkości objętości jądra komórkowego, zaś powierzchnia perykarionu to zaledwie 10% powierzchni całej komórki nerwowej. Konieczność stałej odbudowy, modyfikacji, wymiany składowych neuroplazmy w wypustkach, a zwłaszcza w zakończeniach nerwowych, sprawiła, iż w perykarionie musiał powstać rozbudowany aparat syntetyzujący niezbędne składniki budulcowe, natomiast w wypustkach i to zarówno neurytach, jak i dendrytach — skomplikowany, dotąd jeszcze ostatecznie nie poznany system ich efektywnego transportu. Zatem komórka nerwowa chyba jak żadna inna ma bardzo spolaryzowany układ organeli komórkowych, z jednej strony syntetyzujących i modyfikujących białka, glikoproteidy, glikolipidy, neurohormony, neuroprzekaźniki, z drugiej układ

transportu zawarty przede wszystkim w neurytach, oparty na cysternach siateczki gładkiej, mitochondriach, lizosomach, neurotubulach, neurofilamentach i mikrofilamentach.

JĄDROWE SKŁADNIKI NEURONU

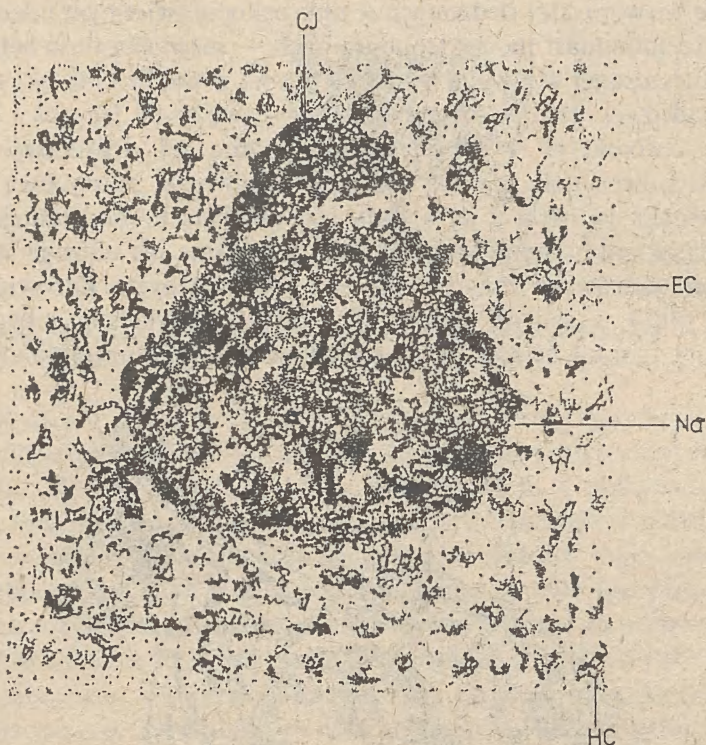
Jądro w fizjologicznych neuronach ma zazwyczaj kształt okrągły i leży w centralnej części perykarionu (rys. 5). Lokację pozaśrodkową wykazują jądra komórek wielobiegunowych zwojów układu autonomicznego oraz neurony jądra grzbietowego Clarka. W uszkodzonych neuronach, np. po przecięciu neurytu, jądro przesuwa się na jeden z biegunów ciała komórki. W preparatach klasycznie barwionych i śledzonych w mikroskopie świetlnym uderza ich słaba barwność, natomiast na elektronogramach — niewielka ilość heterochromatyny rozmieszczonej w postaci wąskiego pasma w pobliżu blaszki wewnętrznej osłonki jądrowej oraz w bezpośrednim sąsiedztwie jąderka. Taki obraz struktury chromatyny z olbrzymią dominantą jej organizacji w postaci euchromatynowej wskazuje na znaczną aktywność matrycową jądrowego DNA. Osłonka jądrowa z jej organizacją dwublaszkową i umiejscowionymi między blaszkami licznymi kompleksami porowymi, nie odbiega strukturalnie od otoczek jądrowych innych komórek somatycznych. Zarówno w błonie jądrowej, jak i w samym jądrze komórkowym wykazano obecność wielu enzymów, w tym tak kluczowych jak: dehydrogenaza bursztynianowa, mlecz-



Rys. 5. Schemat perykarionu komórki nerwowej. S — synapsa aksodendryczna, So — synapsa aksomatyczna, D — dendryt, Nf — neuryt, m — mitochondria, l — lizosomy, N — jądro komórkowe, Nu — jąderko, rs —

nowa, oksydaza cytochromowa, dehydrogenazy cyklu pentożowego, adenozy-notrójfosfataza, glukoza-6-fosfataza, RNA-aza, cytochromy P-450, b_5 oraz oksydoreduktazy cytochromu P-450 i b_5 .

Kompleksy porowe, zgodnie z wynikami badań autoradiograficznych, są podstawowym miejscem przekazywania rybonukleoproteidów budujących większe i mniejsze podjednostki rybosomów cytoplazmatycznych powstających w obrębie jąderka. Szereg substancji o ciężarze cząsteczkowym do 40000 wymienia jądro i cytoplazma poprzez przestrzeń perinuklearną oraz odchodzące od blaszki wewnętrznej otoczki jądrowej cysterny siateczki śródplazmatycznej szorstkiej. Stałym kompartmentem jądra jest jąderko lub jąderka (rys. 6). Wielkość ich zazwyczaj koreluje z wielkością jądra. Zajmują zmienne



Rys. 6. Organizacja ultrastrukturalna jąderka. EC — euchromatyna, HC — heterochromatyna, CJ — chromatyna jąderkotwórcza, Na — nukleolonema zbudowana z części ziarnistej i włóknistej

położenie w korioplazmie. Obserwacja hodowanych neuronów z jednoczesnym wykonywaniem zdjęć poklatkowych skłania do wniosku, iż jąderko wykonuje ruch okrężny wokół błony jądrowej, a jego chwilowe zatrzymanie się w pobliżu porów błony jądrowej jest zwykle połączone z zauważalnym zmniejszeniem średnicy.

Wspomniane już wcześniej badania autograficzne potwierdziły, iż moment zatrzymania się jąderka w pobliżu porów łączy się z przekazywaniem do

cytoplazmy rybonukleoproteidów podjednostek rybosomów cytoplazmatycznych. Jąderka neuronów, tak jak i dużej grupy innych komórek, zbudowane są z części włóknistej, ziarnistej, bezpostaciowej oraz pochodzenia chromosomalnego. Części włókniste buduje prekursorowy 45s RNA połączony z białkiem, ziarniste duże i małe podjednostki rybosomów, natomiast w części jądrowej jąderka zawarta jest chromatyna jąderkowa kodująca syntezę 18s i 28s RNA. Jąderko odgrywa zatem zasadniczą rolę w syntezie tigroidu, który jest morfologicznym podłożem syntezy białek strukturalnych i eksportowych w neuronie.

Nic więc dziwnego, iż istnieją zależności między średnicą jąderka, jądra oraz zawartością tigroidu, o czym będę jeszcze mówił komentując zjawisko tigrolizy.

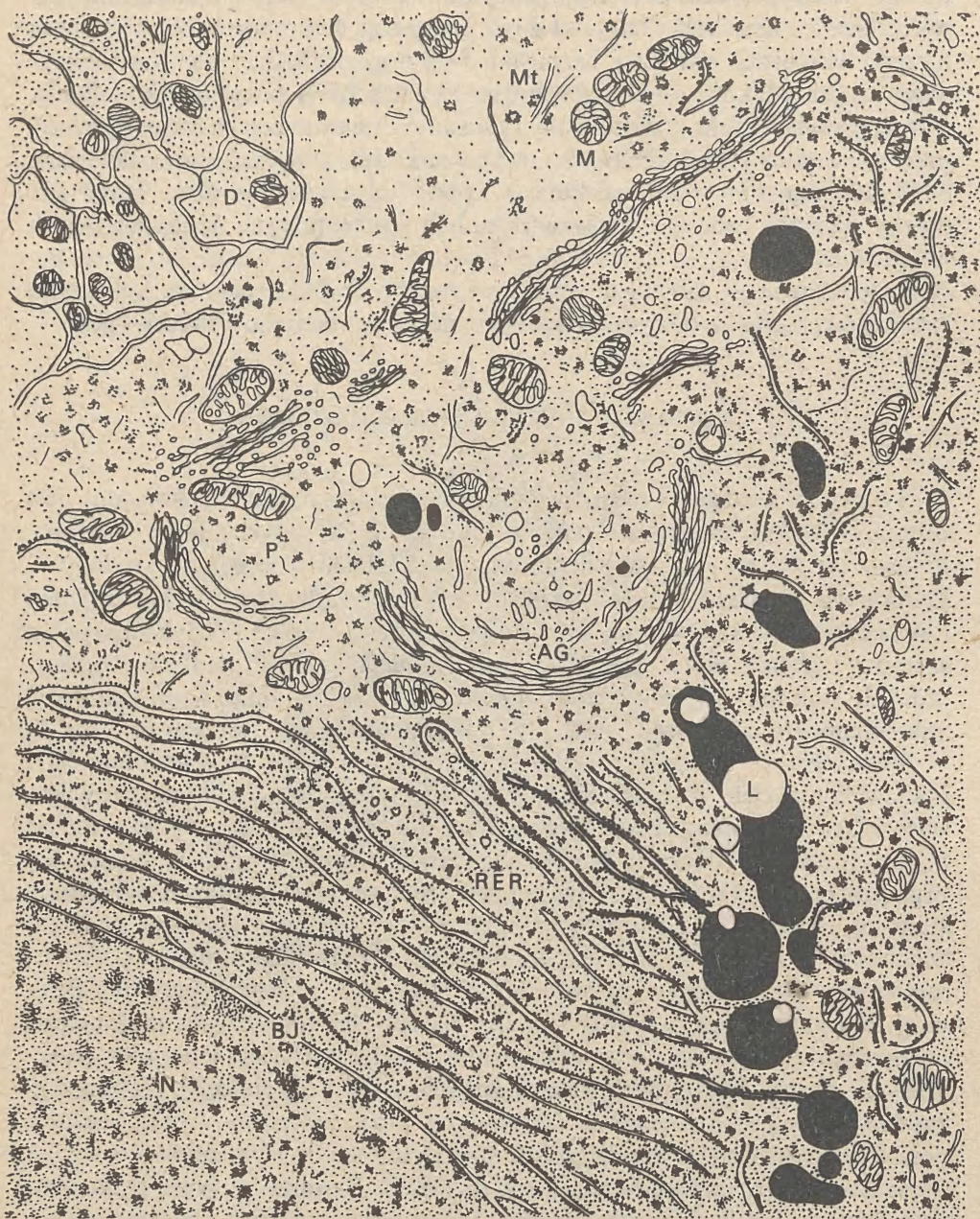
CYTOPLAZMATYCZNE SKŁADNIKI NEURONU

Ponieważ szczegółowej organizacji błony plazmatycznej poświęcony jest odrębny artykuł, a eksponowane w nim generalia dotyczą także neuronu, dlatego też rezygnuję z omówienia tego zagadnienia w obecnym artykule.

Perykarion szczelnie wypełnia odpowiednio uporządkowany układ organeli i struktur komórkowych, na który składają się: siateczka śródplazmatyczna szorstka i gładka, mitochondria, aparat Golgiego, system gładkich i opłaszczonych wakuoli, różne generacje lizosomów, neutrotubule, neurofilamenty, mikrofilamenty, ziarnistości, melanin, lipofuscyny, krople tłuszczu itp. (rys. 7)

Franz Nissl — niemiecki neurolog dostrzegł i opisał na przełomie XIX i XX wieku w ciele komórek nerwowych substancję zasadochłonną barwiącą się fioletem krezylu, błękitem metylenowym lub błękitem toluidyny. W sześć lat później Lankossek nazwał wspomnianą substancję — substancją Nissla. Jej organizacja, układ w perykarionie, a także średnica poszczególnych ziarnistości stały się punktem wyjścia do zaproponowania kolejnego sposobu podziału neuronów. Wyróżniono w ten sposób neurony o stychochromowym, akrichromowym, kriosychochromowym i griochromowym układzie tigroidu. Pierwszy, charakteryzujący się dużą średnicą ziarnistości, występuje w motoneuronach rdzenia kręgowego oraz w komórkach jąder ruchowych nerwów czaszkowych. Drugi, o drobnych rozproszonych w postaci siateczki ziarenkach, wypełnia cytoplazmę komórek Purkiniego kory mózdzku. Trzeci, mający postać pośrednią organizacji tigroidu między uprzednio wymienionymi, lokuje się w komórkach piramidalnych kory ruchowej. Czwarty, o typie pyłkowym rozproszenia substancji Nissla, można dostrzec w neuronach rzekomo jednobiegowych zwojów rdzeniowych.

Substancja Nissla niezależnie od typu organizacji, gromadzi się przede wszystkim w pobliżu jądra komórkowego. Jej ilość stopniowo maleje w kierunku obwodu perykarionu, dendrynu oraz ulega całkowitej likwidacji w tzw. stożku aksonalnym i neurycie. Ultrastrukturalnym odpowiednikiem ziarnistości zasa-



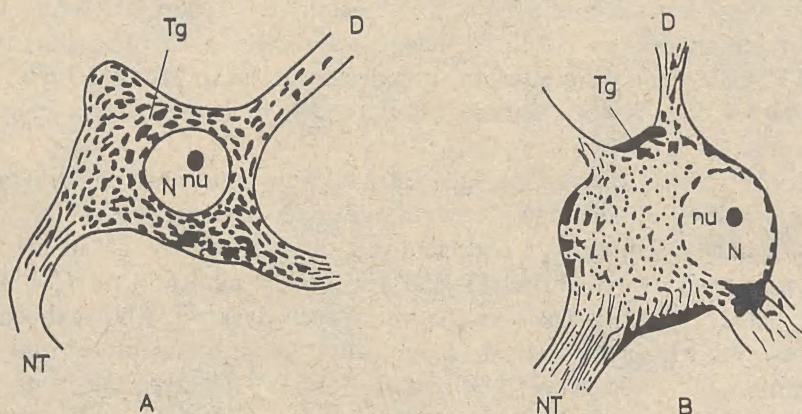
Rys. 7. Fragment perykarionu komórki piramidalnej kory mózgu. N — jądro komórkowe, BJ — otoczka jądrowa, RER — siateczka śródplazmatyczna szorstka (tigroid), L — lizosomy, AG — aparat Golgiego, M — mitochondria, Mt — neurotubule, D — dendryt, P — polisomy

dochłonnych jest w głównej mierze siateczka śródplazmatyczna szorstka, utworzona z pakietów cystern ograniczonych dwoma błonami lipoproteinowymi pokrytymi na powierzchni rybosomami, zamykająca przestrzeń lumenalną o średnicy od 30 do 50 nm. W skład tigroidu wchodzi również wolne rybosomy oraz rozety polisomalne liczące najczęściej od 4 do 8 rybosomów. W dużych neuronach siateczka szorstka stanowi około 15 % objętości perykaryonu, a jej błony w 70% zbudowane są z białek i w 30% z lipidów. W porównaniu z plazmolemą, zawiera więcej białek strukturalnych i enzymatycznych oraz ma inny skład fosfolipidowy. Część białek — wagowo około 2% — ma komponentę węglowodanową w postaci reszt mannozylowych i galaktozylowych, końcowym cukrem łańcuchów polisacharydowych jest zwykle kwas sialowy, natomiast podstawową heksozaminę — glukozamina. Na tłuszcze błon składają się w 85% fosfolipidy w tym: lecytyna — 55% i fosfatydyloetanolamina — 25 %, fosfatydyloseryna — 5-10%, sfingomieliina — 4-7%. Stężenie cholesterolu kształtuje się na poziomie 3-6%, trójglicerydów — 5%. Kwasy tłuszczowe w znacznym stopniu mają charakter nienasycony.

W błonach siateczki szorstkiej i gładkiej, także w neuronach, zlokalizowano niezwykle ważny układ białek enzymatycznych związanych z procesami biotransformacji wielu egzo- i endogennych substratów tzw. układ monooksygenaz zależnych od cytochromu P-450. Jego rola w neuronie, na ogół bardzo słabo poznana, wywołuje wiele kontrowersyjnych dyskusji. RNA rybosomów zintegrowanych z błonami siateczki śródplazmatycznej buduje w 19% adenina, 33% guanina, 27% cytozyna, 21% uracyl. Ilość RNA przypadająca na jeden neuron zależy przede wszystkim od jego wielkości i waha się w granicach od 80 do 1000 pg.

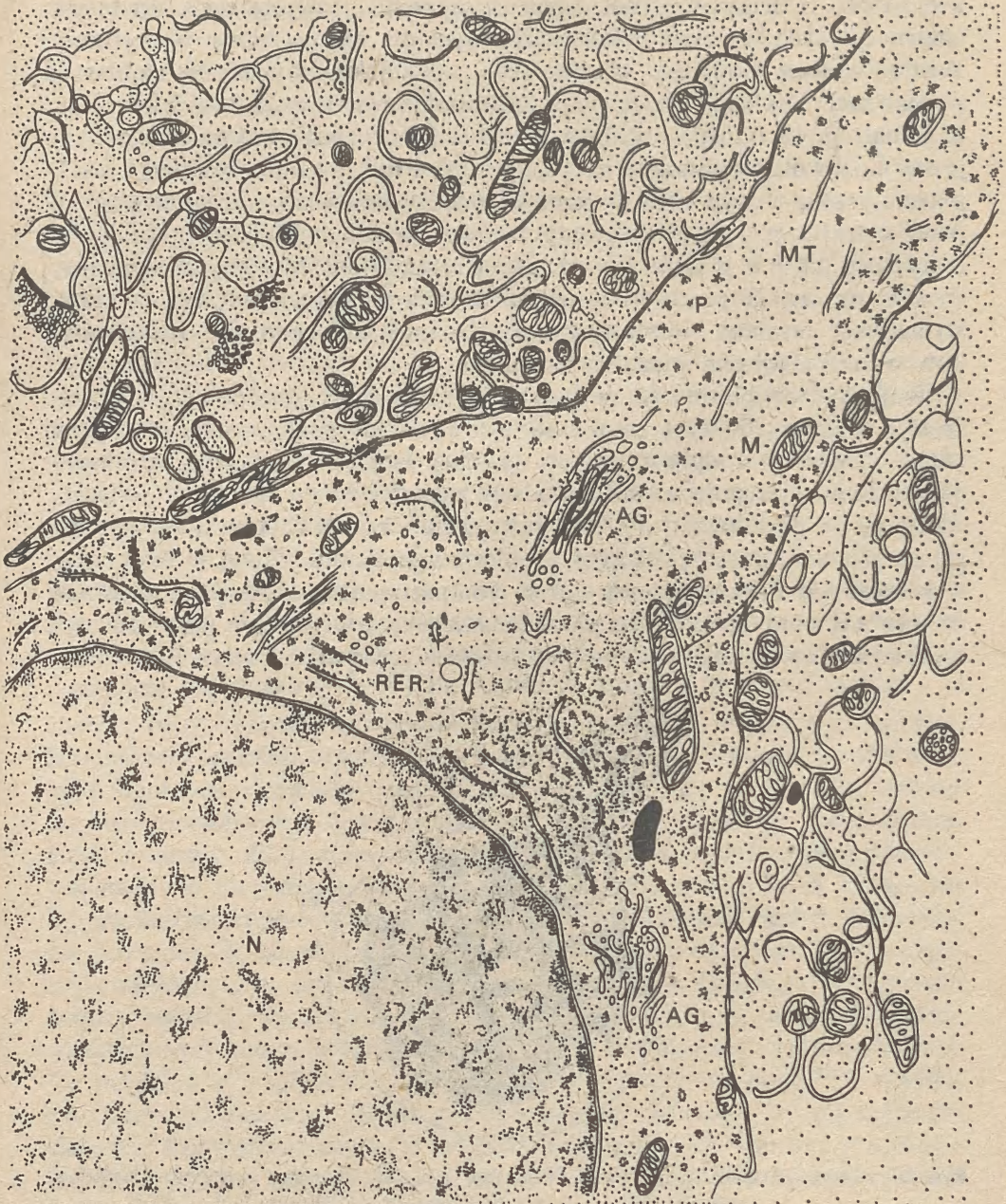
Zawartość substancji Nissla w istotny sposób zależy od wieku organizmu. I tak tigroid w neuronach człowieka pojawia się na przełomie 3-4 miesiąca życia płodowego, między 5 i 50 rokiem życia jego ilość osiąga wartości szczytowe, po czym w latach późniejszych maleje. Ustalono, iż stopniowe dojrzewanie ziaren substancji Nissla w czasie rozwoju ontogenetycznego zbiega się z procesem funkcjonalnego kształtowania neuronu, stabilizacją potencjału bioelektrycznego, a także końcowego wzorca ilościowego i jakościowego wyposażenia enzymatycznego. Wiele innych czynników, takich jak bodźce natury chemicznej, mechanicznej, toksycznej i infekcyjnej wywołują gwałtowne i głębokie zmiany ilościowe tigroidu w neuronach (rys. 8). Proces nazwany tigrolizą połączony jest ze zmianami w objętości i lokalizacji jądra, a zwłaszcza jąderka i aparatu Golgiego. Tigroliza ma zazwyczaj charakter przejściowy i po upływie kilku godzin, dni lub tygodni (czas powrotu zależy od przyczyny wywołującej) następuje restytucja tigroidu. Najbardziej typowy przebieg ma tigroliza indukowana mechanicznym uszkodzeniem aksonu. Wówczas to zanik substancji Nissla łączy się z przesunięciem jądra komórkowego w kierunku obwodu perykaryonu, zdecydowanym powiększeniem i zbliżeniem jąderka do otoczki

jądrowej oraz znacznym rozbudowaniem gładkich cystern i wakuoli aparatu Golgiego. Sytuacja normuje się po upływie 2 tygodni, a całkowity powrót tigroidu i struktury wymienionych uprzednio organeli komórkowych do stanu wyjściowego ma miejsce po 3-7 miesiącach. Tigroliza zachodzi również w neuronach nieuszkodzonych — tigroliza transneuronalna. Obraz tigroidu, a więc siateczki śródplazmatycznej szorstkiej, jako morfologicznego podłoża syntezy białek strukturalnych i eksportowanych przez komórkę nerwową jest precyzyjnym wskaźnikiem intensywności przebiegu procesów syntetycznych mających kapitalne znaczenie dla formowania nowych połączeń międzyneuronalnych, tworzenia kolejnych cegiełek pamięci, czy też przesuwania substratów transportem aksonalnym do plazmolemy zakończeń nerwowych i kolbek synaptycznych.



Rys. 8. Obraz rozłożenia tigroidu w prawidłowym wielobiegunowym neurocyte (A), obraz po przecięciu aksonu (tigroliza) (B). Tg — tigroid, N — jądro komórkowe, nu — jąderko, D — dendryt, NT — neuryt

W pobliżu siateczki śródplazmatycznej szorstkiej lub nawet w bezpośrednich z nią kontaktach w perykarionach, a także w dendrytach oraz w neurytach i kolbkach synaptycznych występują mitochondria. W dużych aktywnych neuronach ich liczbę ocenia się na 10^4 . Zatem komórki nerwowe pod względem liczebności mitochondriów są absolutnym potentatem wśród innych komórek. Przypomnę, iż liczbę mitochondriów w hepatocytach ocenia się na 900-2000, w komórkach nabłonkowych kanalików głównych nefronu na około 700, a w komórkach okładzinowych gruczołów dna żołądka 500 (rys. 9). Zwykle są one wydłużone, mają średnicę $7\ \mu\text{m}$, a błazka wewnętrzna wytwarza dość liczne grzebienie mitochondrialne zanurzone w jasnej drobnoziarnistej macierzy. Do rzadkości w neuronach należą mitochondria olbrzymie o średnicy do $20\ \mu\text{m}$ i organizacji błony wewnętrznej w postaci tubul — mitochondria tubulane. Tego typu ciała mitochondrialne spotyka się w neuronach autonomicznego układu nerwowego. Bezpośrednie sąsiedztwo siateczki szorstkiej i mitochondriów w perykarionie ma głębokie uzasadnienie funkcjonalne,

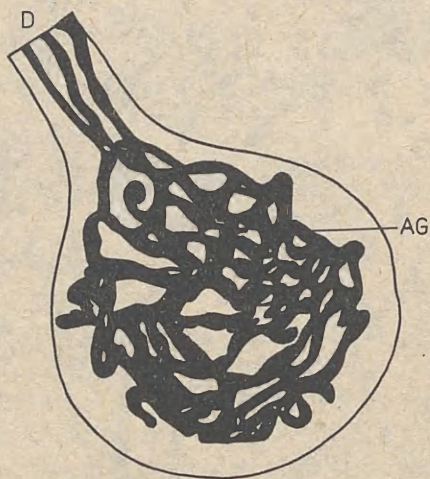


Rys. 9. Fragment perykarionu i dendrytu komórki piramidalnej kory mózdzku. N — jądro komórkowe, RER — siateczka śródplazmatyczna szorstka, AG — aparat Golgiego, M — mitochondria, P — polisomy, MT — neurotubule, As — astrocyt

bowiem z jednej strony mitochondria produkując ATP zabezpieczają pod względem energetycznym między innymi syntezę białek, z drugiej mając własny

kwas DNA o długości 5,5 nm zapewniają produkcję wyłącznie kilku białek enzymatycznych i strukturalnych niezbędnych dla własnej błony wewnętrznej. Reszta zarówno budujących blaszkę wewnętrzną, jak i wszystkie białka blaszki zewnętrznej oraz macierzy są syntetyzowane na rybosomach siateczki szorstkiej i następnie transportowane do wnętrza mitochondriów. Ostatnio sugeruje się możliwość współpracy mitochondriów i mikrosomów (siateczka śródplazmatyczna) w wymianie elektronów między łańcuchami enzymatycznymi przez cytochrom b_5 zlokalizowany zarówno w błonach siateczki śródplazmatycznej, jak i w blaszce zewnętrznej mitochondriów. Miałoby to w istotny sposób usprawnić procesy tworzenia energii w mitochondriach, a także stymulować przebieg biotransformacji substancji endogennych i ksenobiotyków w retikulum endoplazmatycznym.

Siateczka śródplazmatyczna szorstka poprzez gładkościenne i jasne pęcherzyki o średnicy 30-50 nm, zwane tranzytowymi, lub pozbawione rybosomów kanały siateczki śródplazmatycznej gładkiej łączy się z kolejną strukturą perykarionu, występującą także u podstawy dendrytów — aparatem Golgiego, stanowiącym przeciętnie 1-4% powierzchni ciała komórki. Aparat ten opisany po raz pierwszy przez włoskiego patomorfologa Camillo Golgi w 1898 roku, w komórkach Purkiniego jest stałym kompartmentem wszystkich komórek nerwowych, pomimo iż do lat pięćdziesiątych naszego stulecia przez znaczną część świata naukowego uważany był za metodyczny artefakt (rys. 10). W neu-



Rys. 10. Aparat Golgiego* w komórce Purkiniego mózdzku (kontrast wykonano metalami ciężkimi). AG — aparat Golgiego, D — dendryt

ronach ma on formę licznych diktiosomów sąsiadujących z siateczką śródplazmatyczną szorstką, a zarazem koncentrycznie otaczających jądro komórkowe. Na strawkach ultracienkich aparat składa się z trzech podstawowych części — gładkich cystern lub woreczków, dużych wakuoli oraz drobnych pęcherzyków. Ta pełna, trójskładnikowa charakterystyka jest typowa dla komórek

intensywnie powiązanych z procesami syntezy białek, a więc i neuronów. Podstawowy element struktury zwany diktiosomem składa się z wydłużonych cystern w liczbie 5-8 położonych nad drugą w ustabilizowanej odległości 15-20 nm. Średnica przestrzeni lumenalnej w odcinku centralnym cysterny wynosi przeciętnie 15 nm, a w obwodowym powiększa się do 50 nm. Jest ona w części środkowej płaska na obwodzie zagięta i często perforowana. Wszystkie woreczki w obrębie diktiosomu układają się w kształt litery C lub S, tak iż każdy następny, nieco krótszy ma większy promień krzywizny. Są one wzajemnie powiązane ze sobą systemem gładkich tubul o średnicy 30-50 nm. Stabilność odległości między poszczególnymi cysternami wydają się zapewniać docierające w pobliżu aparatu Golgiego neurotubule.

Duże wakuole o średnicy 0,5-3,0 μm , towarzyszące obwodowym odcinkom cystern są stosunkowo rzadko obserwowane w neuronach, natomiast gładkie pęcherzyki opłaszczone o wyjątkowo stabilnych wymiarach są zawsze obecne w pobliżu aparatu. Późniejsze badania biochemiczne i autoradiograficzne wykazały, iż siateczka śródplazmatyczna jest ściśle morfologicznie i funkcjonalnie powiązana z aparatem Golgiego przez pęcherzyki tranzytowe, bowiem pęcherzyki te nie tylko otaczają cysterny aparatu, lecz także są w niego wybudowywane, przyczyniając się w ten sposób do wzbogacenia lub odbudowy jego struktury. Pęcherzyki „opłaszczone”, zazwyczaj mniej liczne, towarzyszą wklęsłemu biegunowi aparatu. Nazwę swą zawdzięczają białku — klatrynie o ciężarze cząsteczkowym 150 kd i symetrii penta- lub heksagonalnej.

Część z nich wykazuje aktywność fosfatazy kwaśnej — markera lizosomów. Stosunkowo wcześniej dostrzeżono istotne różnice w organizacji strukturalnej poszczególnych elementów aparatu Golgiego. Różnice te znalazły, między innymi, swe odzwierciedlenie w dążności do ich precyzyjnego nazewnictwa. I tak fragmenty diktiosomu zwrócone do siateczki śródplazmatycznej szorstkiej nazwano biegunem proksymalnym, zewnętrznym, wypukłym, kreującym lub cis, natomiast przeciwne — dystalnym, wewnętrznym, wklęsłym, dojrzewania lub trans. W latach sześćdziesiątych i siedemdziesiątych przekonywująco udowodniono, iż w strukturach błoniastych aparatu Golgiego rozłożonych między biegunem cis i trans zachodzą głębokie zmiany w zawartości białek strukturalnych i enzymatycznych, tłuszczy oraz komponenty węglowodanowej. Na przykład w biegunie cis aparatu dominują reduktazy NADPH, NADH, cytochrom b_5 , glukozo-6-fosfataza, a więc enzymy charakterystyczne także dla siateczki śródplazmatycznej. W środkowych cysternach wzrasta stopniowo indeks transferaz glikozylowych, natomiast w biegunie trans aktywność fosfatazy kwaśnej i markera plazmolemy — 5'nukleotydazy.

Podobne tendencje dostrzeżono analizując skład lipidowy błon mitochondrialnych, siateczki śródplazmatycznej, aparatu Golgiego oraz plazmolemy w komórkach wątrobowych i nerki. Otóż ustalono, iż błony aparatu Golgiego różnią się od siateczki szorstkiej i gładkiej większą zawartością lipidów, w tym lipidów obojętnych i sfingomieliny, mają mniej białek strukturalnych i en-

zymatycznych, wykazują największe stężenie kwasu siałowego i glukozaminy.

W świetle przedstawionych danych w neuronie, podobnie jak w innych komórkach naszego ustroju, odbywa się proces permanentnego przepływu błon komórkowych od kompartmentu do kompartmentu z kierunkiem przepływu — siateczka śródplazmatyczna szorstka → gładka → aparat Golgiego → pęcherzyki uwalniane na jego powierzchni trans → plazmolema. Wektor przeciwny przepływu błon, bądź jest związany z endocytozą fazy wodnej (fagosomy, pinosomy) i ma formę niespecyficzną lub z endocytozą resorpcyjną z udziałem pęcherzyków klatrynowych (dołków klatrynowych plazmolemy). W drugim wypadku, transport pęcherzyków ma charakter specyficzny (hormony białkowe, NGF) a przekazywane substancje wraz z błonami ze środowiska zewnętrznego preferencyjnie docierają do aparatu Golgiego.

Zatem aparat Golgiego należy uznać za to miejsce w komórce, w którym przebiegają procesy różnicowania i dystrybucji błon, mające między innymi na celu ich przystosowanie chemiczne i strukturalne do wbudowania w błonę komórkową. W neuronach lizosomy występują w zróżnicowanej liczbie. W komórkach małych, np. w neurocytach warstwy ziarnistej kory mózdzku lub dwubiegunach siatkówki oka spotyka się je niezmiernie rzadko, natomiast w motoneuronach rdzenia kręgowego ich liczba znacznie przekracza zawartość lizosomów w hepatocycie. Rozmieszczone są zazwyczaj w perykarionie, dendrytach i neurycie poza stożkiem początkowym.

Lizosomy neuronów w większym stopniu niż w innych komórkach wykazują heterogenność kształtów, średnic, zawartości itp. Dzielimy je na pierwotne leżące w pobliżu bieguna trans aparatu, zachowujące charakter ciałek gęstych o średnicy 50 nm. Ta klasa lizosomów, mając typowy dla siebie warsztat enzymatyczny, nie podjęła funkcji biologicznej. Lizosomy wtórne, które aktualnie uczestniczą w procesach trawienia struktur własnych komórki (autolizosomy) lub materiału pozakomórkowego (heterolizosomy) oraz duża rodzina postlizosomów w postaci ciałek wielopęcherzykowych, wieloblaszkowych zbudowanych z powielających się układów błon. Dość specyficznym rodzajem neurolizosomów wtórnych są tzw. ciała lipofuscynowe. Obecne w ich macierzy ziarnistości pochodzą głównie z oksydacji fosfolipidów, a zwłaszcza fosfotydyletanolaminy. Liczba ciałek lipofuscynowych wzrasta wraz z wiekiem organizmu. Przypuszczalnie ich powstanie związane jest z autofagią mitochondriów.

W normalnych neuronach wakuole autofagowe i autolizosomy spotyka się rzadko. Ich liczba natomiast bardzo szybko zwiększa się w momencie uszkodzenia komórki nerwowej, np. po przecięciu aksonu, po napromienieniu, po działaniu toksyn bakteryjnych, po zatruciu związkami fosfoorganicznymi, rozpuszczalnikami organicznymi, metalami ciężkimi. Skład lipidowy lizosomów neuronowych jest zbliżony do lizosomów nerkowych. Zawartości komponenty lipidowej wynosi: fosfolipidy — 11,3%, cholesterol — 3,2%, glikolipidy — 1%. Skład fosfolipidowy jest następujący: sfingomielina — 16%, lecytyna — 40%,

fosfatydyloetanolamina — 23%, fosfatydaloseryna — 8%. Prawie 50% z ogólnej ilości kwasów tłuszczowych ma charakter nienasycony. Białka lizosomalne charakteryzuje wysokie stężenie aminokwasów kwaśnych oraz zawierających siarkę (metionina). Garnitur enzymatyczny neurolizosomów jest zbliżony do innych tkanek i narządów. Znajdujemy w nim enzymy trawiące białka, kwasy nukleinowe, polisacharydy, mukopolisacharydy, lipidy itp.

Największą aktywność mają następujące enzymy: fosfataza kwaśna, kwaśna dezyksyrybonukleaza, kwaśna rybonukleaza, niespecyficzne esterazy, beta glukuronidaza, N-acetyl-D-glukozonidaza, katepsyny. Wspomniane enzymy w komórkach nerwowych funkcjonujących w fizjologicznych warunkach ujawniają tylko pewien procent swych potencjalnych możliwości litycznych, tzw. aktywność wolną. Naruszenie struktury błon lizosomalnych przez takie czynniki, jak niektóre leki, środki toksyczne, napromieniowanie X lub UV, niedotlenienie, hiperoksja, gwałtowne naprzemienne zmiany temperatury, toksyny bakteryjne, detergenty jonowe i niejonowe, hormony, łączy się z odsłonięciem centrów aktywowanych gromadzonych enzymów i uwolnieniem aktywności całkowitej. Znane są również środki działające stabilizująco na lizosomy, np. glikozydy nasercowe glikosterydy.

Za podstawowe funkcje lizosomów w neuronach uznaje się:

- a. uczestnictwo w trawieniu wewnątrzkomórkowym,
- b. udział w transporcie aksoplazmatycznym oraz wymianie substratów między neuronem i tkanką glejową,
- c. udział w kształtowaniu i sekrecji neurohormonów,
- d. udział w procesie tigrolizy,
- e. udział w procesach syntezy kwasów nukleinowych i białek.

Peroksysomy to kolejna struktura opisana w neuronach w początkach lat siedemdziesiątych. Stosunkowo złączną ilość tych niewielkich struktur stwierdzono w komórkach Schwanna oraz w komórkach satelitarnych towarzyszących neurocytom zwojowym. Nie zawierają w swojej macierzy rdzeni — nukleoidów. Funkcja ich prawdopodobnie polega na modyfikowaniu aminokwasowych neuroprzekazników.

Częstym składnikiem perykarionu a także czasami dendrytów jest lipofuscyna zbudowana z lipidów, węglowodanów i białka, barwiąca się karbofuksyną, zielenią metylenową, błękitem Nilu, Sudanem czarnym B, a także dająca pozytywną reakcję paS. Na elektronogramach przedstawia się w postaci osmofilnych ziaren. Co prawda zawartość lipofuscyny w neuronach wzrasta z wiekiem, lecz wydaje się, iż nazwanie omawianego pigmentu, pigmentem starczym lub zużycia jest zbyt pochothane. Stwierdzono bowiem obecność lipofuscyny w neuronach zwojów układu autonomicznego człowieka już w okresie rozwoju płodowego. W wieku, natomiast, starczym część neuronów nie zawiera pigmentu wcale lub ma go w minimalnej ilości. Wykazano, iż u starych psów lipofuscyna występuje zaledwie w 4% komórek warstwy

ziarnistej kory mózdzku, w 8% komórek Purkiniego i w 98% komórek piramidalnych kory mózgu.

Kolejnym pigmentem obecnym w neuronach jest melanina pojawiająca się u człowieka w *locus coeruleus* koło pierwszego roku życia, a w *substantia nigra* – w roku drugim. Uprzywilejowanym miejscem lokacji barwnika oprócz miejsc już wymienionych są neurocyty jądra grzbietowego nerwu trójdzielnego oraz jądra podkorowe. Melanina neurocytów składa się z: białka, 1-5% lipidów, 5-10% węglowodanów, 0,3% RNA a także żelaza, cynku, miedzi. Wydaje się, iż istotną rolę w syntezie melaniny w komórkach nerwowych pełni aparat Golgiego.

Wakuole lipidowe, nazwane w neuronach lipochondriami, zazwyczaj przyjmują postać struktur okrągłych, ograniczonych pojedynczą błoną o bardzo zróżnicowanej średnicy, gęstości i zawartości. W żywych neuronach wybarwić je można czerwienią obojętną. U osobników młodych drobne wakuole tłuszczowe równomiernie rozłożone są w całym perykarionie, natomiast w wiekowych neuronach wykazują tendencję do gromadzenia w jego strefach obwodowych. Oceny cytochemiczne sugerują, iż u młodych ludzi krople lipidowe neuronów zawierają przede wszystkim fosfolipidy z niewielką domieszką lipoproteidów. Wraz z wiekiem są wypierane przez lipidy obojętne.

Wszystkie dotąd omówione organela, struktury i ziarnistości ulokowane zarówno w obrębie perykarionu, jak i w wypustkach, zawieszone są na wysoko wyspecjalizowanym cytoszkieletcie. Już od bardzo dawna, stosując specjalne techniki barwienia, np. metodę Bielschowskyego, w mikroskopie świetlnym dostrzeżono w ciele komórki i w wypustkach drobne włókninkowate struktury, które nazwano neurofibrylami. Potem analizowano ich budowę w mikroskopie fazowo-kontrastowym, barwiono przyżyciowo błękitem metylenowym. Ostateczne rozstrzygnięcia, co do faktycznej obecności w neuronach a także organizacji strukturalnej, dokonano w latach sześćdziesiątych, i siedemdziesiątych za pomocą mikroskopu elektronowego.

Odpowiednikami neurofibryli na poziomie ultrastrukturalnym okazały się neurotubule i neurofilamenty należące do tzw. filamentów pośrednich. Neurotubule to wydłużone i zaopatrzone w bocznice, nierozgałęzione cylindry o zmiennej długości i ustabilizowanej średnicy 20-30 nm. Opisywano także w neuronach tubule o średnicy większej od 35 nm. W ich wnętrzu znajduje się jasny elektronowo kanał o średnicy 15 nm, ograniczony 5-8 nm ścianką zewnętrzną. Ścianę buduje zazwyczaj 13 protofilamentów układających się w lewoskrętną spiralę odchyloną od osi tubuli o 10-25°. Każdy z protofilamentów składa się z kolei z globularnych podjednostek białkowych zbudowanych z α i β tubuliny o ciężarze cząsteczkowym 110-120 kDa i stałej sedymentacji 5,8 S. Oprócz tubuliny, stanowiącej około 80-90% wszystkich białek mikrotubul, występują tzw. białka towarzyszące mikrotubulom, wśród których wyróżniamy białka wysokocząsteczkowe o ciężarze około 300-350 kDa oraz białka niskocząsteczkowe o około 70 kDa, odgrywające fundamentalną rolę

w procesach polimeryzacji mikrotubul. Wśród białek towarzyszących mikrotubulom zidentyfikowano: fosfatę zasadową, adenozynotrójfosfatę, kinazę zależną od cAMP oraz kinazę zależną od jonów Ca.

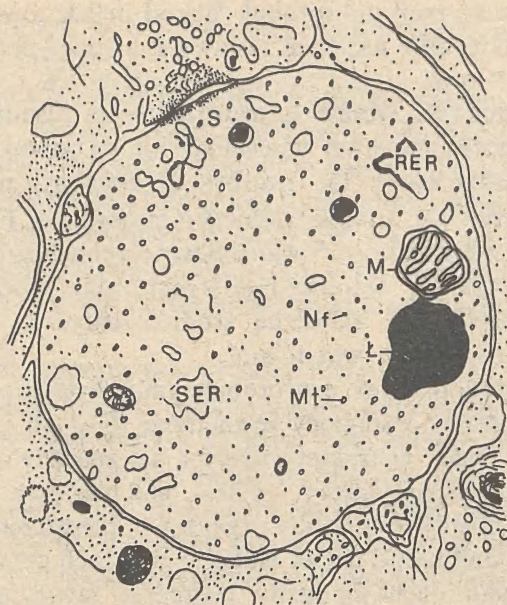
Jak już wspomniałem wcześniej, neurotubule są zasadniczym składnikiem cytoszkieletu komórki nerwowej zapewniającym jej odpowiedni kształt, formę, plastyczność i elastyczność. Do neurotubul docierają neurofilamenty oraz mikrofilamenty aktynowe, a także włókienka miozynowe. Formują one ponadto tory ruchu dla wielu transportowanych w neuronach substancji. Wykazano, iż neurotubule wykazują bezpośrednie strukturalne powiązanie z aparatem Golgiego, mitochondriami, siateczką śródplazmatyczną szorstką i gładką, lizosomami i różnego typu wakuolami.

Neurofilamenty, podobnie jak neurotubule, mają kształt prostej, gładkościennej rurki z bocznicami o średnicy zewnętrznej 7-10 nm i wewnętrznej 3 nm. Zbudowane są z białek charakteryzujących się znacznym odsetkiem aminokwasów kwaśnych: asparaginowy — 20%, glutaminowy — 10%. Od 30 do 50% łańcucha polipeptydowego ma organizację przestrzenną α -helisy. Z neurofilamentów wyodrębniono triplet białek o ciężarach cząsteczkowych 65, 150 i 200 kDa. W neuronach filamenty pośrednie łatwo ulegają solubilizacji w fizjologicznym przedziale pH oraz w roztworach o prawidłowej sile jonowej, rozpadając się do protofilamentów o średnicy 2 nm.

BUDOWA DENDRYTÓW

Dendryty, zwane również wypustkami protoplazmatycznymi, ze względu na bogactwo organeli zlokalizowanych w obrębie cytoplazmy zazwyczaj są mnogie. Odchodzą od perykarionu szeroką podstawą o średnicy 5-15 μm . Początkowy odcinek dendrytu przed wytworzeniem rozgałęzień nosi nazwę dendrytu pierwszorzędowego. Wyposażony jest w liczne mitochondria, siateczkę śródplazmatyczną szorstką i gładką, polisomy, a także diktiosomy aparatu Golgiego i lizosomy. W miarę oddalania się od ciała komórki średnicy dendrytu maleje w rezultacie drugo-, trzecio- i kolejno-rzędowych rozgałęzień. Podobnie kształtuje się liczba zawartych w dendroplazmie organeli poza mitochondriami, których dużo występuje w obrębie zakończeń. Stałym wybitnie rozbudowanym składnikiem wypustek protoplazmatycznych są neurotubule, które liczebnością wielokrotnie przewyższają neurofilamenty (rys. 11). Mając układ równoległy do długiej osi wypustki, narzucają wszystkim innym strukturom zlokalizowanym w dendrytach uporządkowany układ. Neurotubule, neurofilamenty oraz mikrofilamenty wytwarzają przestrzenną siateczkę, zapewniającą dendrytom zarówno zachowanie kształtu, jak i stanowią morfologiczne podłoże transportu neuronalnego, odbywającego się z szybkością około 3 mm na dobę.

Na powierzchni całego dendrytu oraz telodendriów lokalizują się liczne



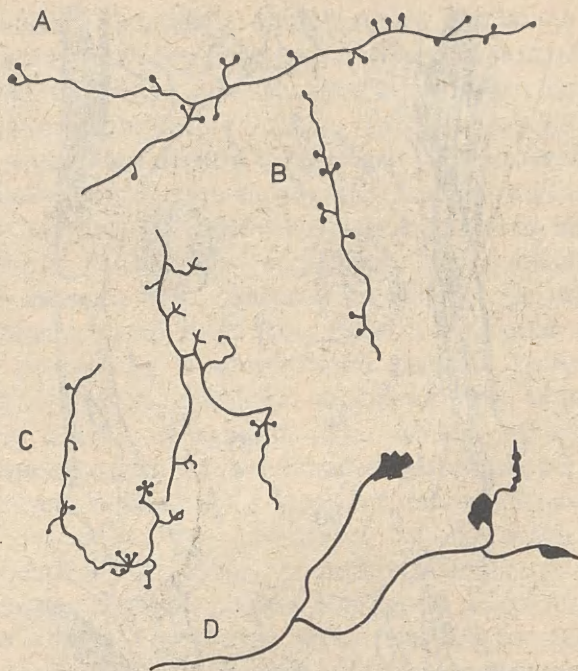
Rys. 11. Przekrój poprzeczny przez dendryt. Mt — duża ilość neurotubul, Nr — neurofilamenty, M — mitochondria, L — lizosomy, SER — siateczka śródplazmatyczna gładka, RER — siateczka śródplazmatyczna szorstka, S — synapsyna aksodendrytyczna

0,7- μm uwypuklenia zwane kolcami lub pączkami dendrytycznymi, mające strukturę synaps. W korze mózgowej dendryty większości neuronów wyposażone są w bardzo dużą liczbę koców dendrytycznych. Na przeciętnej komórce piramidalnej kory mózgu występuje ich około 4 tysiące. W komórkach Purkiniego mózdzku na 10- μm odcinku dendrytu lokalizuje się przecitnie 15 koców, a całkowitą ich liczbę ocenia się na 400 000. Kolce dendrytyczne powiększają wydatnie strefę receptorową, która w wypadku wspomnianych komórek gruszkowatych wynosi 220 000 μm^2 . Kolce mogą również pełnić funkcję regulatorową, modyfikując ilość dopływających bodźców. W każdym kolcu dendrytycznym wyróżniamy rozszerzoną część szczytową zwaną główką lub guziczkiem oraz zwężoną część podstawową — nóżkę.

Najbardziej obwodowe odgałęzienia dendrytów kończą się kolbkami synaptycznymi zlokalizowanymi na innych komórkach nerwowych lub ich wypustkach. Dendrytów z zasady nie pokrywa osłonka mielinowa.

BUDOWA NEURYTU (AKSON, WALEC OSIOWY)

Jest to zwykle pojedyncza odkomórkowo przewodząca wypustka nerwowa o bardzo zróżnicowanej długości i stabilnej średnicy, z rzadka tylko oddająca kolaterale, tworzące z aksonem kąt prosty (rys. 12). Długość oraz średnica

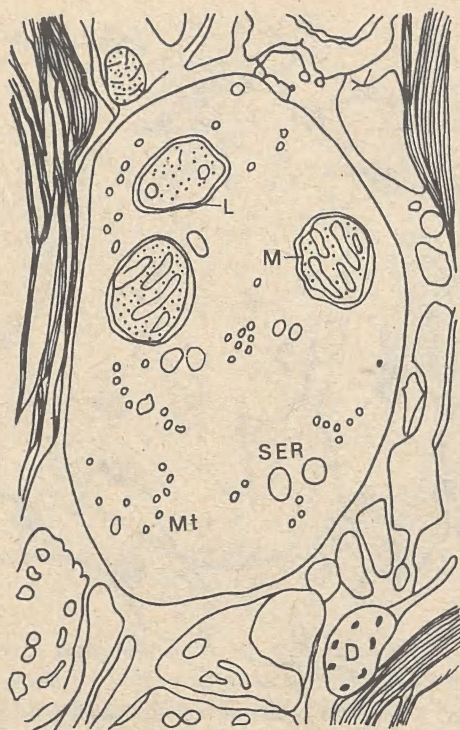


Rys. 12. A — cienki neuryt z krótkimi bocznymi kolateraliami, B — prosty neuryt z krótkimi bocznymi kolateraliami, C — neuryt z mnogimi kolateraliami, D — neuryt z guziczkami synaptycznymi

aksonu jest podporządkowana wielkości komórki, z której się wywodzi. I tak np. aksony wielkich komórek piramidalnych Betza osiągają długość około $200\ \mu\text{m}$ i średnicę kilku μm . Akson opuszcza perikarion w szczególnym pod względem strukturalnym miejscu, zwanym stożkiem początkowym aksonu lub stożkiem aksonu. Miejsce to uderza charakterystyczną ubogością wyposażenia w organela komórkowe. Obserwujemy tam wyłącznie wolne rybosomy oraz neutrotubule i neurofilamenty przebiegające równolegle w stosunku do aksonu (rys. 13).

Pod aksolemą o średnicy 7-8 nm, w odcinku stożka aksonalnego, a także w węzłach Ranviera występują skupiska drobnowłóknistej, osmofilnej substancji o bliżej nieznannej roli. Być może bierze ona udział w wyzwaniu potencjału czynnościowego. Początkowy odcinek aksonu nie jest otoczony osłonami oraz wypustkami komórek glejowych i nosi nazwę segmentu inicjującego. Plazmolema wspomnianego segmentu wyposażona jest w olbrzymią liczbę kanałów jonowych różnego typu.

Organizacja morfologiczna aksonu jest w istotny sposób uzależniona od jego średnicy, a także obecności i grubości osłonki mielinowej. Neurony małe nie mają osłonki mielinowej. Charakteryzuje je spora ilość neurotubul, w konsekwencji ich struktura, w minimalnym stopniu różniącą się od dendrytu sprawia poważne kłopoty identyfikacyjne.



Rys. 13. Przekrój poprzeczny przez segment inicjujący aksonu. Mt — neurotubule, SER — siateczka śródplazmatyczna gładka, M — mitochondria, L — lizosomy, D — dendryt, As — astrocyt

W miarę wzrostu średnicy aksonu, a także pokrywania się włókna osiowego osłonką mielinową, dotąd regularny przebieg neurotubul zostaje zakłócony przez pojawiające się wiązki neurofilamentów. W aksonach o dużych średnicach neurofilamenty stanowią dominujący składnik aksoplazmy, natomiast liczba neurotubul ulega znacznemu zredukowaniu. Tak więc możemy powiedzieć, iż liczba neurotubul jest odwrotnie proporcjonalna do średnicy aksonu, a liczba neurofilamentów wykazuje zależność wprost proporcjonalną. Przewężenia Ranviera oraz zakończenia nerwowe to miejsca o zwiększonej liczbie mitochondriów oraz gładkich cystern siateczki śródplazmatycznej. Praktycznie wszystkie neuryty, zwane dalej włóknami nerwowymi, poza segmentem inicjującym oraz synaptycznym pokryte są osłonkami nerwowymi. Pokrywa ta może być zbudowana z mieliny i taką osłonkę nazywamy mielinową lub też może być utworzona przez komórki Schwanna i wówczas nosi nazwę bezzrdzennej, czyli neurolemy. Wyjątkową pod tym względem pozycję zajmują włókna nerwu węchowego, które w początkowym odcinku nie mają żadnych osłonek, a więc są nagie. Wszystkie zatem włókna nerwowe dzielimy na:

- a. rdzenne (mielinowe) pokryte osłonką mielinową,
- b. bezzrdzenne (szare, Remaka) pokryte plazmolemą i warstwą cytoplazmy komórek Schwanna,

c. nagie — pozbawione wszelkich osłonek (nerw węchowy) lub też tylko częściowo zanurzone w neuropłazmie komórek Schwanna.

Włókna rdzenne pokryte osłonką mielinową występują w centralnym systemie nerwowym (substancja biała), a także w obwodowym układzie nerwowym, w większości nerwów ruchowych i czuciowych. Blisko 60% wszystkich aksonów znajdujących się w organizmie człowieka pokrywa mielina. Na poziomie mikroskopu świetlnego polecana metodą barwienia aksonu i omawianej osłonki jest metoda Haggqvista. Proces mielinizacji, trwający począwszy od 4 miesiąca życia płodowego, nasilający się tuż po urodzeniu, kończy się ostatecznie około 10-12 roku życia. Komórkami niezbędnymi dla przebiegu tego procesu są w obwodowym układzie nerwowym komórki Schwanna (lemmocyty), a w centralnym oligodendrocyty. W pewnym momencie kształtowania układu nerwowego, nagie włókno nerwowe zanurza się w cytopazmie wspomnianych powyżej komórek glejowych, nie przerywając ich błon plazmatycznych. W rezultacie końcowym plazmolema komórki glejowej, ściśle otaczając włókno nerwowe, wytwarza tzw. mezakson czyli zdwojone włókno plazmolemalne. Mezakson, początkowo krótki, w miarę postępu procesu mielinizacji wydłuża się, zagina, a następnie wielokrotnie owija wokół mielinizowanego włókna. Najbardziej zewnętrzna blaszka osłonki mielinowej rozdwaja się i przechodzi na powierzchnię komórki glejowej jako jej błona komórkowa. W rezultacie końcowym, zewnętrzną blaszkę osłonki mielinowej pokrywa komórka glejowa, tę zaś błona podstawna zawierająca włókna retikulino- i kolagenowe. Do chwili obecnej nie udało się ostatecznie rozstrzygnąć, czy mielinizacja następuje w wyniku ruchu rotacyjnego komórek glejowych, czy też mielinizowanych włókien. Przypuszcza się, iż systematyczna rozbudowa mezaksonu wymusza przesuwanie uprzednio powstałych odcinków plazmolemy i owijanie ich na powierzchni włókna nerwowego. Na elektromonogramach osłonę rdzenną tworzą naprzemiennie, koncentrycznie ułożone blaszki jasne i ciemne o średnicach odpowiednio 10 nm i 2,5 nm, oddalone od siebie o około 8 nm. Liczba blaszek w pełni ukształtowanych włóknach dochodzi do 50. W połowie szerokości blaszek jasnych można dostrzec czasami blaszkę ciemną pośrednią lub międzyokresową. Blaszki jasne tworzą: fosfolipidy, cerebrozydy, sulfatydy, glikolipidy i cholesterol, natomiast ciemne — substancje białkowe. Mielina będąca podstawowym składnikiem osłonki zbudowana jest w 40% z białek i 60% z lipidów.

Osłonka mielinowa podzielona jest tzw. przewężeniami, węzłami Ranviera, na odcinki internodalne, międzywęzłowe, segmenty o długościach od 50 do 2000 μm . Obserwuje się przy tym proporcjonalność między średnicą i długością aksonu i długością segmentu. Każdemu odcinkowi osłonki mielinowej odpowiada jedna komórka Schwanna, która zazwyczaj uczestniczy w mielinizacji 6-12 aksonów. Zatem węzły Ranviera to miejsca kontaktu zarówno dwóch najbliższych komórek glejowych Schwanna, jak i segmentów osłonki mielinowej. Węzeł Ranviera ma złożoną i ciekawą budowę, bowiem tu właśnie

kończą się liczne wzbogacone w cytoplazmę sfałdowania osłonki mielinowej. Ten właśnie rozluźniony układ blaszek sprzyja lepszemu odżywieniu i efektywniejszej wymianie szeregu substratów między włóknami nerwowymi i komórkami glejowymi. W obrębie przewężeń Ranviera następuje dichotomiczny podział aksonu oraz znajdują się synapsy aksonalne.

Na przestrzeni międzywęźli, segmentów, odcinków internodalnych występują także lokalne rozluźnienia układu blaszek osłonki rdzennej zwane wcięciami Schmidt-Lantermanna. Prawdopodobnie są to również miejscażywionej wymiany metabolicznej (duża ilość pęcherzyków pinocytarnych).

WŁÓKNA BEZRDZENNE (REMAKA, SZARE)

Występują w substancji szarej centralnego systemu nerwowego oraz w układzie autonomicznym. Osłonkę nerwową aksonu budują wyłącznie komórki Schwanna oraz błona podstawna wzbogacona w włókienka retikulino- i kolagenowe. Zwykle jedna komórka Schwanna tworzy osłonkę kilku aksonów.

TRANSPORT AKSOPLAZMATYCZNY

Przez transport aksoplazmatyczny rozumiemy ruch wielu integralnych składników dendrytów i neurytów, odbywający się albo ortogradowo, to jest od perykarionu w kierunku zakończenia nerwowego lub też retrogradowo, to jest w kierunku przeciwnym. Tą drogą przesuwane są: aminokwasy, cukry, neuroprzekazniki, lipidy, 4 sRNA, mukopolisacharydy, proteiny, elementy cytoszkieletu, białka błonowe, glikoproteiny, mitochondria, siateczka śródplazmatyczna gładka, ciała wielopęcherzykowe i lamelarne, pęcherzyki synaptyczne, wakuole zawierające neurohormony, a także materiały egzogenne typu: złota koloidalnego, fekrytyny, peroksydazy chrzanowej, toksyny tężcowej, wirusów. Bardzo powierzchowna ocena obserwowanego zjawiska składniałaby do wniosku, że takie parametry transportowanych substancji, jak: wymiar, kształt, ładunek nie decydują o jego przebiegu, a więc że wspomniany transport ma charakter wysoce niespecyficzny. Bliższa analiza zjawiska a przede wszystkim zróżnicowana szybkość transportu poszczególnych składników w neuronach, każą jednak myśleć inaczej. Transport ten ma szereg cech i właściwości, które pokrótce omówię.

Po pierwsze, wykazuje on znaczną selektywność. Pomimo, iż lista transportowanych substancji, struktur jest długa to jednak nie wszystkie proteiny i organella mu podlegają. Po wtóre, transport ma charakter wektorowy, o czym już wspominałem (ruch ortogradowy i retrogradowy). Po trzecie, wymaga całości strukturalnej perykarionu, aksonu lub dendrytu. Uszkodzenie wypustek nerwowych w postaci przecięcia lub podwiązania powoduje zahamowanie lub zwolnienie jego przebiegu. Po czwarte, optycznie dostrzegalne w neuronach

organela — mitochondria, lizosomy pierwotne i wtórne — w czasie transportu wykonują ruch skokowy, składający się z fazy ruchu i fazy spoczynkowej. Wypadkowa prędkość takiego ruchu jest zdecydowanie mniejsza niż samej fazy ruchu, 1-3 μm na s A, a prędkość skoku nie zależy od wielkości organeli. Po piąte, prędkość transportowanych substancji zależy liniowo od temperatury, nie jest modyfikowana przez długość i średnicę aksonu. Po szóste, różne typy organeli i cząstek poruszają się w neuronach w temperaturze 37°C z bardzo różnymi prędkościami od 0,5 do 410 mm na dzień. W tabeli 1 przedstawiłem przegląd prędkości transportu różnych substratów w neuronach zwojowych siatkówki oka ssaków.

Transport aksoplazmatyczny wymaga adenozynotrójfosforanu, neurotubul (dowody farmakologiczne, morfologiczne, teoretyczne), neurotubul (dowody farmakologiczne) oraz jonów Ca, które umożliwiają formowanie aparatu Golgiego z pęcherzyków tranzytowych oraz siateczki gładkiej w aksonie. Nadal nie znane jest podłoże molekularne mechanizmu uzyskiwania energii koniecznej do procesu transportu. Przypuszcza się iż, kluczową rolę w tym względnie odgrywają ATP-aza aktyno-miozynowa oraz ATP-aza dyneinowa. Dostępną pulę energii dla transportu aksoplazmatycznego ocenia się na $5 \times 10^{-9} \text{ erg S}^{-1}$ na 1 m³ aksoplazmy. Ruch i jego kierunek w aksonach wyznaczają: siateczka śródplazmatyczna gładka, mitochondria, neurotubule, neurofilamenty i mikrofilamenty. W grupie najszybciej transportowanych materiałów w aksonie (I grupa transportowa) sugeruje się, iż istnieje z punktu widzenia prędkości i efektywności transportu optymalna wielkość cząsteczki podlegającej przesuwaniu i wynosi ona około 80 nm.

Przechodząc do rozważenia różnych możliwych teoretycznie modeli transportu aksonalnego, należy wziąć pod uwagę dwa z nich. Pierwszy, wywodzący się z myśli, iż każda cząsteczka białkowa poruszająca się w aksonie jest zarazem jednostką transportową i przesuwa się dzięki własnemu ciężarowi lub oddziaływaniu prądu aksoplazmy. Oraz drugi model — alternatywny zakładający grupowanie się protein w bardziej złożone struktury, które są jednocześnie jednostkami transportowymi. Zacytowana już informacja, mówiąca, iż poszczególne klasy substancji przesuwały się w aksonie z różnymi prędkościami, rozstrzygnęła wieloletnie spory na korzyść modelu drugiego.

Zatem poszczególne cząsteczki są aktywnie transportowane w aksonie albo jako składowe integralne dużych struktur, np. siateczki śródplazmatycznej gładkiej, lizosomów lub mitochondriów, lub też znajdują się z nimi w długotrwałych stabilnych kontaktach. I tak w pierwszej grupie — FC (fast compartment) — ortogradowo transportowanych substratów, przesuwanym przez gładkie pęcherzyki otoczone pojedynczą błoną lipoproteinową, a być może przez cysterny siateczki gładkiej z szybkością do 410 mm na dobę, znajdują się wszystkie niezbędne składowe do rekonstrukcji aksolemy, błony presynaptycznej zakończenia nerwowego oraz neuroprzekązniki. Białka mitochondrialne transportowane są w nośniku mitochondrialnym. W tej samej

Tabela 1

Szybki i wolny transport aksonalny komórki zwojowej siatkówki oka

Grupy transportowe	Typ struktury	Szybkość	Kierunek	Skład białkowy
transport oparty na elementach błonowych				
FC (fast component) lub I	pęcherzyki, ziarnistości (SER)	250-400 mm na dobę	ortogradowy	glikoproteiny, glikolipidy, peptydy, katecholaminy
II	ciałka wielopęcherzykowe,	200 mm na dobę	retrogradowy	hydrolizy lizosomalne
	mitochondria	40 mm na dobę	ortogradowy	białka mitochondrialne, fodryna
transport oparty na elementach cytoskieletu				
III	protofilamenty miozynowe?	15 mm na dobę	ortogradowy	białka podobne do miozyny
Scb (slow component b-proteins) lub IV	macierz granularno-włóknista	2-5 mm na dobę	ortogradowy	aktyna, klatyna, enolaza mózgowa, kalmodulina, fodryna, białka współpracujące z aktyną
Scs (slow component a-proteins) lub V	neurotubule, neurofilamenty	0,2-1 mm na dobę	ortogradowy	tubulina, triplet białkowy neurofilamentów, białka niskocząsteczkowe towarzyszące mikrotubulom, fodryna

grupie ulokowało się także inne białko, białko sieciujące zbliżone do spektyny — fodryna. Trzecia grupa transportowanych protein, przesuająca się z szybkością 15 mm na dobę w kierunku ortogradowym, zawiera miozynę, białka do niej podobne i związana jest z jakąś pochodną filamentu grubego. Grupa czwarta — SCb (slow component b-proteins) — grupuje różnorodne substraty: aktynę, klatrynę, enolazę mózgową, kinazę fosfokeratynową, kalmodulinę, białka wiążące aktynę i ponownie fodrynę. Wspomniane substraty przesuwane są w wypustkach dzięki mikrofilamentom aktynowym. W końcu piąta grupa transportowa — SCa (slow component a-protein) — wędrująca w aksonie i dendrytach ortogradowo z szybkością 0,2—1 mm na dobę, grupuje tubulinę, triplet neurofilamentów, białka typu τ neurotubul oraz po raz trzeci fodrynę. Transport ten realizowany jest przez neurotubule i neurofilamenty. Ruch retrogradowy, stosunkowo szybki (200 mm na dobę), odbywa się dzięki ciałkom wielopęcherzykowym i lamelarnym, a więc ponownie dzięki strukturom błonowym. Związany jest z transportem enzymów lizosomalnych. W pewnych sytuacjach może on być specyficzny i dotyczyć wybranych peptydów, NGF i innych.

Konkludując, każda grupa transportowa charakteryzuje się nie tylko indywidualnością składu proteinowego i szybkości, ale oparta jest na innym nośniku morfologicznym. Wyjątek stanowi jedno białko — fodryna, której ruch obserwuje się równocześnie w II, IV i V grupie transportowej. Wydaje się więc, że uzasadnione jest wprowadzenie trzeciego wyróżnika opisującego transport aksonalny. Obok kryterium: a) szybkości transportu, b) jakości przesuanych substratów, należy wskazywać na c) typ struktur, które transport ten realizują. Z tego punktu widzenia transport należałoby podzielić na dokonujący się dzięki strukturom błoniastym neuronu oraz dzięki składnikom cytoszkieletu.

SZYBKI TRANSPORT AKSOPLAZMATYCZNY

Z dotychczasowych rozważań jednoznacznie wynika, iż drogą szybkiego transportu aksonalnego z perykarionu, a właściwie z siateczki śródplazmatycznej szorstkiej, do zakończenia nerwowego, błony presynaptycznej, aksolemy przekazywane są fosfolipidy, cholesterol, białka strukturalne, a także neuroprzekazniki. Inicjacja biochemiczna tego procesu odbywa się na rybosomach siateczki śródplazmatycznej szorstkiej, skąd białka wyposażone w hydrofobową sekwencję sygnałową, przez otwarcie kanałów czynnościowych, zanurzają się w przestrzeń lumenalną retikulum endoplazmatycznego szorstkiego, a następnie gładkiego. Wyniki badań autoradiograficznych z użyciem znakowanych gangliozydów, cholesterolu, aminokwasów, wydają się jednoznacznie wskazywać, iż szybkość transportu składników białkowych i lipidowych oraz czas ich pojawienia się w poszczególnych organelach komórki nerwowej jest

zbliżony. Zahamowanie syntezy fosfolipidów, drogą podania do perykarionu fenfluraminy lub cholesterolu przez jego analog, blokuje równocześnie szybki transport znakowanych białek. Co więcej rysuje się zależność między wielkością obniżenia akumulacji znakowanego białka na ligaturze nerwu i zdolnością do wbudowania choline w lecytynę. Komentując przedstawione fakty należałoby domniemywać, iż transport szybki polega na syntezie i przekazywaniu do zakończeń nerwowych zindywidualizowanych białek, fosfolipidów czy cholesterolu, lecz ich kompleksów bądź wysokozorganizowanych podjednostek błon prekursorowych.

Kolejną ważną strukturą uczestniczącą w inicjacji szybkiego transportu aksonalnego jest aparat Golgiego, związany z siateczką śródplazmatyczną zarówno przez system pęcherzyków transportowych, jak i gładkich tubul docierających do bieguna cis. Jednym z ostatnio intensywnie badanych problemów, bezpośrednio łączących się z mechanizmami szybkiego transportu aksonalnego, jest zagadnienie niezbędności aparatu w tym procesie. Chciałbym przedstawić dwie obserwacje, które tę niezbędność eksponują. Umieszczenie hodowanych neuronów w płynie Ringera pozbawionym jonów wapniowych lub z dodatkiem kobaltu, już po kilkunastu godzinach wywołuje uderzające zmiany w organizacji aparatu Golgiego. Struktura ta stopniowo zmniejsza zajmowaną przez siebie objętość w neuronie, zanikają pęcherzyki zlokalizowane w biegunie trans, maleje aktywność pirofosfotazy tiaminowej, markera enzymatycznego cystern środkowej części diktiosomu. Zupełnie zmienia swoje oblicze także biegun cis aparatu, w którym obserwuje się nagromadzenie pakietów rozerwanych lub rozbitych tubul i wakuoli. Zatem usunięcie z medium hodowanego jonów wapniowych, niezbędnego składnika do fuzji pęcherzyków transportowych z powierzchnią cis aparatu, zaburza proces jego permanentnej odbudowy przez składniki generowane w siateczce szorstkiej i gładkiej, a następnie przekazywane drogą transportu aksonalnego do aparatu Golgiego. Jonofor sodu — mnesina — w stężeniu 10^{-7} M podany do perykarionu wywołuje silną inhibicję transportu aksonalnego (zahamowanie w 70%), nie wpływając praktycznie na przebieg syntezy białka. Badania biochemiczne pozwoliły ustalić lokację bloku transportowego — jest nim aparat Golgiego, a kontretnie jego fragment położony dystalnie od miejsca fukozytacji oraz proksymalnie od glikozylacji przekazywanych białek. Jednoczesna ocena morfologiczna potwierdziła powyższe spostrzeżenia przez wskazanie, iż część pośrednia pakietu cystern aparatu, a więc odcinek, w którym transferazy glikozylowe są zlokalizowane, jest poszerzona, a jednocześnie biegun trans zredukowany. Opisane efekty biochemiczne i morfologiczne następnie umiejętnie wykorzystano weryfikując tezę, czy wszystkie białka transportowane w neuronie drogą szybką przechodzą przez diktiosomy aparatu Golgiego, czy też tylko te z nich, które wymagają posttranslacyjnej modyfikacji, np. terminalnej glikosylacji. Analiza 48 różnych białek metodą elektroforezy dwukierunkowej na żelu poliakrylamidowym dowiodła, iż wszystkie białka transpor-

towane drogą szybką muszą nieodzownie przejść przez aparat Golgiego. Podsumowując dotychczasowe rozważania na temat szybkiego transportu aksonalnego, należałoby podkreślić następujące fakty:

a. Synteza szybko transportowanych substratów następuje na rybosomach siateczki śródplazmatycznej.

b. Powstałe substancje prekursorowe przez przestrzeń lumenalną RER i SER, a następnie drogą pęcherzyków transportowych lub tubularnych kanałów łączących, przekazywane są do strefy kreującej aparatu Golgiego.

c. Fuzja pęcherzyków transportowych z aparatu Golgiego zależy od jonów Ca.

d. Po obligatoryjnym przejściu omawianych substancji przez aparat i dokonaniu niezbędnych modyfikacji posttranslacyjnych, są one „pakowane” w pęcherzyki na jego powierzchni dojrzalej.

e. Z kolei pęcherzyki te ponownie podlegają zależnej od jonów Ca fuzji w aksonie w siateczkę śródplazmatyczną gładką, biegnącą w bezpośrednie pobliże zakończenia nerwowego.

Należy sądzić, iż analogiczną drogą przekazywane są niezbędne składniki do aksolemy, bowiem siateczka śródplazmatyczna aksonu, będąca wraz z falami pęcherzyków tranzytowych „wektorem” odkomórkowego szybkiego transportu aksonalnego, na bezpośrednio z nią połączenia przez bocznicę.

Istnienie ciągłego retikulum gładkiego w aksonie potwierdzono zarówno w zwykłych, transmisyjnych mikroskopach elektronowych na skrawkach ultracienkich, jak i w mikroskopach wysokonapięciowych, które umożliwiają obserwację skrawków materiału o znacznej grubości. Wspomniane badania przekonują nie tylko o ciągłości siateczki śródplazmatycznej gładkiej w aksonie, lecz również pozwalają ustalić, iż koncentruje się ona w aksoplazmie tuż pod akslemą. Siateczka gładka, a zwłaszcza jej kanały leżące w bezpośrednim sąsiedztwie aksolemy, mają liczne poprzeczne odgałęzienia tworzące z nią połączenia. W ostatnich latach również lansuje się oparte na dowodach biochemicznych i morfologicznych przekonanie, wskazujące na aksolemę jako możliwą drogę szybkiego transportu aksonalnego.

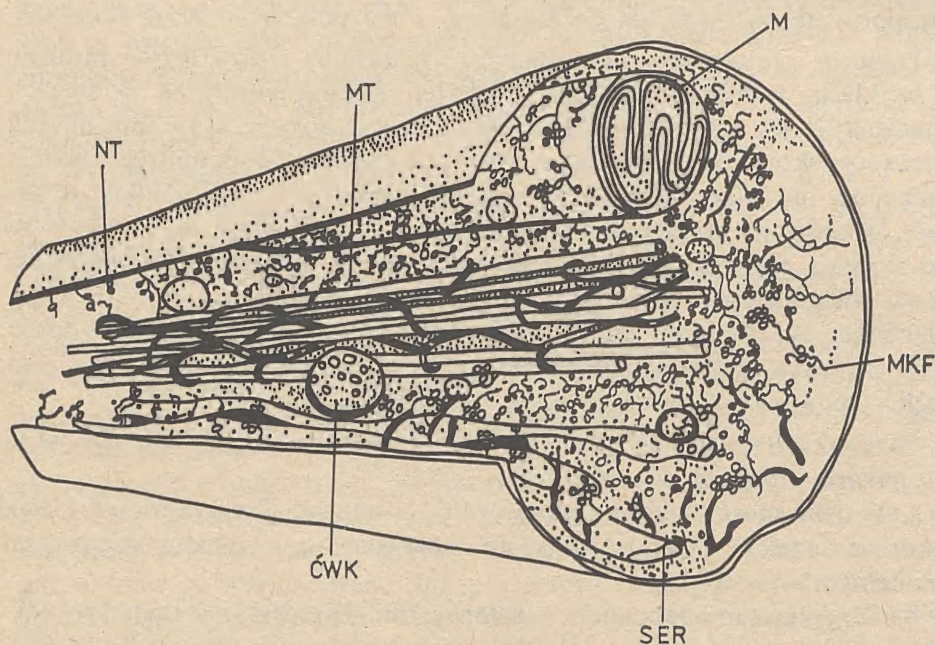
Niezwykle frapującymi i nadal dalekimi od zadowalającego rozwiązania są następujące zagadnienia:

a. W jaki sposób wśród tysięcy syntetyzowanych w perykarionie białek dokonuje się selekcja tych z nich, które są przekazywane szybkim transportem aksonalnym?

b. Dzięki czemu wspomniane substancje trafiają precyzyjnie do przewidzianych miejsc w neuronie, np. do błon presynaptycznych, do aksolemy itp.? Odpowiadając na drugie pytanie, może należałoby sięgnąć do informacji opisujących zjawiska transportowe w komórkach gruczołowych i poszukiwać w nowosyntetyzowanych białkach krótko- lub długołańcuchowych sekwencji polipeptydowych spełniających rolę adresową.

WOLNY TRANSPORT AKSOPLAZMATYCZNY

W dojrzałej komórce nerwowej służy on głównie ciągłej odbudowie składników aksoplazmy. Jest inicjowany zarówno na polisomach, jak i prawdopodobnie na siateczce śródplazmatycznej szorstkiej perykarionu. Ruch wolny całej aksoplazmy opiera się na podstawowych składnikach cytoszkieletu — neurotubulach, neurofilamentach, mikrofilamentach. Cytoszkielet można uważać za złożoną sieć włóknistą obdarzoną zdolnością do kurczenia się. Ten dynamiczny system różnego typu mikrowłókiełek podlega procesowi permanentnego zespalandia i rozpadu, wynikającego z aktualnie kształtującej się, stale zmiennej równowagi między składnikami cytosolowymi i cytoszkieletu (np. tubulina wolna cytosolu i tubulina wchodząca w skład neurotubul). Wydaje się, iż “kołem napędowym” wolnego transportu aksonalnego są aktyna, filamety miozynowe oraz białka z nimi współpracujące. Energii dostarczają mitochondria, natomiast jej dystrybucję zapewnia adenozyntotrójfosfataza zależna od jonów Mg i K. Można sobie wyobrazić, iż mikrofilamety na krótko łączą się z transportowaną substancją, obkurczają się, przesuują, a po uwolnieniu przekazują następnym mikrofilamentom. Na rysunku 14



Rys. 14. Model przestrzenny neurytu przedstawiający przypuszczalną lokalizację organeli składników cytoszkieletu. M — mitochondria, SER — siateczka śródplazmatyczna gładka, CWP — ciało wielopęcherzykowe, MT — neurotubule, NT — neurofilamenty, MKF — mikrofilamenty aktynowe

przedstawiłem współczesne dane na temat lokacji w aksonie składników cytoskieletu i organeli komórkowych. Część centralną aksonu zajmuje układ wzajemnie ze sobą powiązanych neutrotubul oraz neurofilamentów ułożonych równolegle do przebiegu aksonu. Te same struktury rozmieszczone są również i w innych odcinkach neurytu lecz w znacznie mniejszej koncentracji. Włókienka aktywowe, miozynowe, będące prawdopodobnie nośnikiem morfologicznym SCb, tworzą zgrupowania w trzech odcinkach — tuż pod aksolemą, w bezpośrednim otoczeniu cystern siateczki śródplazmatycznej gładkiej oraz wokół neurotubul i, w mniejszym stopniu, neurofilamentów. Siateczka śródplazmatyczna gładka, mitochondria i ciała wielopęcherzykowe lub lamelarne lokują się bezpośrednio pod aksolemą wykazując z nią wysoki stopień zintegrowania (bezpośrednie bocznie docierające do aksolemy).

LESZEK JANISZEWSKI¹

Instytut Biologii
Uniwersytet M. Kopernika
Toruń

JONOWE ZJAWISKA BŁONOWE W KOMÓRKACH POBUDLI- WYCH *

WSTĘP

Przełomowe badania H o d g k i n a i H u x l e y a z lat 1939/1940, wprowadzające możliwość wewnątrzkomórkowej rejestracji zjawisk bioelektrycznych, stały się punktem wyjścia szeroko zakrojonych, interdyscyplinarnych badań nad czynnością komórek pobudliwych [15, 16]. Jednym z zasadniczych osiągnięć tych badań było ustalenie sekwencji procesów biorących udział w odbiorze bodźca, jego obróbce i zakodowaniu, a wreszcie przesyłaniu w obrębie komórek pobudliwych. Sekwencję tę można przedstawić w następujący sposób:

1. Bodziec działający na określoną komórkę.

1. Procesy w obrębie błony komórkowej zainicjowane przez działanie bodźca. Do nich należeć może m.in. (w wypadku działania bodźca chemicznego) połączenie substancji bodźczącej z odpowiednim receptorem błonowym. Innym przykładem tego typu działań może być proces uczynniania kanałów błonowych i inicjowanie zmienionych przepływów jonowych przez błonę. Działania określane tutaj jako "procesy w obrębie błony" można nazwać procesem przetworzenia (transduction), w którym w wyniku działania różnego rodzaju bodźców dochodzi w błonie do zmian przepuszczalności dla jonów.

3. Procesy jonowe będące wynikiem mechanizmów opisanych w punkcie 2.

4. Zjawiska bioelektryczne.

5. Kodowanie informacji za pomocą zjawisk elektrycznych.

6. Przesyłanie informacji.

7. Dekodowanie informacji.

Powyższe etapy, znaczące drogę od momentu zadziałania bodźca aż do chwili wystąpienia odpowiedzi, są w różny sposób poznane. Wydaje się, że najwięcej niewiadomych niesie z sobą grupa zjawisk określonych w punkcie 2 jako "procesy w obrębie błony".

* Praca finansowana przez CPBP 04.01, koordynowany przez Polską Akademię Nauk.

Niniejsze opracowanie zajmuje się trzecim z wymienionych punktów, a więc zjawiskami jonowymi w komórkach pobudliwych. Głównym celem tego opracowania jest wykazanie różnorodności jakościowej w odniesieniu do jonów uczestniczących w genezie zjawisk bioelektrycznych u różnych zwierząt [19, 20, 21, 22, 27].

POTENCJAŁ SPOCZYNKOWY

Charakterystyka elektryczna błony komórkowej w spoczynku wynika z nierównomiernego rozłożenia jonów po obu jej stronach. Znak i wielkość różnicy potencjałów (nazywanej potencjałem spoczynkowym lub membranowym) w poprzek błony określane są przede wszystkim przez przepuszczalność błony dla danych jonów w warunkach transportu biernego i czynnego [3].

W związku z tym, że potencjał membranowy zbliżony jest (jak się okazało w większości badanych układów) do potencjału równowagi dla jonów K^+ , powstała hipoteza elektrody potasowej, zakładająca, że potencjał membranowy jest nieco zmodyfikowanym potencjałem dyfuzyjnym dla jonów K^+ . W niektórych komórkach wielkość spoczynkowej różnicy potencjałów jest wynikiem zależności między zewnątrz- i wewnątrzkomórkowym stężeniem jonów potasowych i może być określona na podstawie równania Nernsta. W większości badanych komórek występują jednakże różnice między potencjałem równowagi dla jonów K^+ i potencjałem membranowym. Różnice te spowodowane są modyfikującym wpływem przepuszczalności błony komórkowej dla innych jonów, a także działaniem pompy sodowo-potasowej [3].

W świetle zasadniczego znaczenia spoczynkowej różnicy potencjału w poprzek błony dla wszystkich wynikających stąd procesów komórkowych, badania nad jonową genezą potencjału membranowego trwają nieprzerwanie od wielu lat. Większość tych prac potwierdza hipotezę elektrody potasowej. Wachlarz doświadczeń, jeśli chodzi o obiekty jest olbrzymi. Hipotezę elektrody potasowej potwierdziły m.in. pomiary potencjału membranowego *Paramaecium caudatum* [13], mięśni patyczaka *Carausius morosus* [25], mięśniówki gładkiej naczyń krwionośnych świnki morskiej [14] oraz kubków smakowych żaby [33].

W 1962 roku Belton i Grundfest [2] dostarczyli danych wskazujących na to, że włókna mięśniowe larw mącznika *Tenebrio molitor* nie zmieniają swojego potencjału membranowego w szerokim zakresie stężeń jonów potasowych (0-100 mmol).

Powyższe badania stały się punktem wyjścia dla wzmożonych poszukiwań porównawczych w zakresie jonowej genezy potencjału spoczynkowego. Wyniki uzyskane, przede wszystkim na mięśniach owadów, wskazują na bardziej złożony, niż w wypadku elektrody potasowej, charakter podłoża jonowego potencjału błonowego [24, 31]. W związku z tymi badaniami wysunięta została

przez Usherwooda hipoteza "elektrody wielojonowej". Hipoteza ta zakłada udział wielu jonów zarówno kationów, jak i anionów w kształtowaniu spoczynkowej różnicy potencjałów [35]. Jedną z prób wyjaśnienia tego złożonego charakteru podłoża jonowego jest hipoteza tzw. bariery jonowej wysunięta przez Piekę [31]. Piekę sugeruje, że środowisko jonowe zewnątrz włókna mięśniowego różni się swym składem od znajdującego się wewnątrz kanalikula T. Ten stan rzeczy spowodowany jest istnieniem bariery jonowej funkcjonującej na granicy tych dwóch środowisk.

Współczesne badania dostarczyły niezmiernie ciekawych danych, wskazujących na możliwość zmiany charakteru podłoża jonowego dla potencjału membranowego w ontogenezie. W doświadczeniach na mączniku *Tenebrio molitor* wykazano, że mięśnie larw funkcjonują jak elektrody wielojonowe, natomiast mięśnie postaci imaginalnych można określić jako zbliżone do elektrody potasowej [23].

POTENCJAŁ CZYNNOŚCIOWY

Potencjał czynnościowy występujący w komórkach pobudliwych można zdefiniować jako nagłą, krótkotrwałą i odwracalną depolaryzację. Geneza potencjałów czynnościowych i ich podłoża jonowe były i są przedmiotem szeroko zakrojonych badań [4, 5, 6].

W 1949 roku Hodgkin i Katz wykazali, że zmiany w pozakomórkowym stężeniu jonów sodowych wpływają na amplitudę potencjału czynnościowego [15]. Ta obserwacja stała się punktem wyjścia dalszych badań Hodgkina i Huxleya [16]. Doprowadziły one do szczegółowych ustaleń dotyczących jonowych mechanizmów potencjału czynnościowego. Elementem wspierającym te badania są wyniki prac nad strukturą i czynnością błonowych kanałów jonowych [26]. Stwierdzono, że potencjał czynnościowy zależy od następujących po sobie wzrostów (aktywacja) i spadków (inaktywacja) przepuszczalności błony komórkowej dla jonów sodowych i potasowych.

Nie ulega wątpliwości, że opisany mechanizm jest najczęściej występującym modelem jonowym potencjału czynnościowego. Intensywne badania porównawcze dostarczyły jednak danych o innych mechanizmach jonowych leżących u podstaw potencjału czynnościowego. Jednym z pierwszych sygnałów, były prace nad potencjałami czynnościowymi olbrzymich neuronów ślimaków *Helix pomatia* i *Planorbis corneus* [11, 30]. Okazało się, że u *Helix pomatia* zablokowanie wzrostu przepuszczalności błony olbrzymich neuronów dla jonów sodowych za pomocą uretanu nie zahamowało generowania potencjałów czynnościowych. Wysunięto stąd właściwy wniosek, iż komórkowy prąd depolaryzacyjny niesiony jest przez inne, niż sodowe, jony. Późniejsze badania przy zastosowaniu bardzo specyficznego związku blokującego kanały sodowe — tetrodotoksyny [32] potwierdziły te dane, a następnie doprowadziły

do ustalenia, iż prąd depolaryzacyjny w neuronach *Helix pomatia* niesiony jest przez jony wapniowe [11].

Opisane powyżej, a także i inne wyniki rozpoczęły okres badań i gromadzenia danych dotyczących tzw. czynnościowych potencjałów wapniowych. W pierwszym okresie wydawało się, że ten typ potencjału czynnościowego występuje głównie u zwierząt bezkręgowych. I tak np. czynnościowe potencjały wapniowe stwierdzono u *Paramecium caudatum* [13], w mięśniach patyczaka *Carausius morosus* [1], w mięśniach różnych gatunków *Lepidoptera* [36], w komórkach gruczołów ślinowych pijawek [28], a także w mięśniach *Nereidae* [18]. Są to tylko wybrane przykłady z długiej listy komórek u zwierząt bezkręgowych, w których prąd dokomórkowy potencjału czynnościowego niesiony jest przez jony wapniowe.

Ostatnie lata dostarczają coraz więcej danych wskazujących na występowanie potencjałów wapniowych także u ssaków. W roku 1985 stwierdzono istnienie tych potencjałów m.in. w komórkach neurosekrecyjnych szczura [7], w korze węchowej świnki morskiej [8, 10], oraz w komórkach glejowych siatkówki szczura [29].

Godny do odnotowania fakt stwierdzili w 1976 roku Spitzer i Lomborgini [34]. Okazało się, że w hodowli neuronów płazów dochodzi do zmiany podłoża jonowego potencjałów czynnościowych. W pierwszym okresie hodowli są to czynnościowe potencjały wapniowe, następnie zaś w miarę upływu czasu występować zaczynają czynnościowe potencjały sodowe. Jest to jeszcze jeden dowód, obok przytoczonego poprzednio [23], na to, że wymagania jonowe dla potencjałów bioelektrycznych mogą zmieniać się w ontogenezie.

Bardzo unikalną i rzadką grupę potencjałów czynnościowych stanowią potencjały chlorkowe. Grundfest i wsp. wykryli je po raz pierwszy w 1962 roku w płytkach narządu elektrycznego płaszczki *Raja erinacea* [12]. W płytkach tych źródłem depolaryzacji w czasie potencjału czynnościowego jest wpływ jonów chlorkowych z komórki. W roku 1974 Fukuda stwierdził występowanie czynnościowych potencjałów chlorkowych w mięśniach zarodka kurczęcia [9]. Ostatnio zwrócono także uwagę na udział jonów chlorkowych w kształtowaniu potencjałów czynnościowych w olbrzymich włóknach nerwowych kałamarnicy [17].

PODSUMOWANIE I WNIOSKI

Dzięki nowym, precyzyjnym metodom elektrofizjologicznym i farmakologicznym zgromadzono znaczny materiał porównawczy dotyczący różnych mechanizmów jonowych w elektrogeniezie potencjału membranowego i potencjału czynnościowego. Dane te wskazują na różnorodność tych mechanizmów a także na możliwość zmiany wymagań jonowych w czasie ontogenezy. Jak zaznaczono we wstępie, procesy jonowe są jednym z kilku etapów składających

się na pracę komórek pobudliwych. Wydaje się, że dane porównawcze na ten temat, chociaż nie odegrają zasadniczej roli w rozwiązaniu problemu pobudliwości, stanowią jednak ważny wkład w zrozumieniu elektrogenety w tkankach pobudliwych w odniesieniu do środowiska i biologii zwierząt.

LITERATURA

1. Ashcroft F. M. — *Calcium action potentials in the skeletal muscle fibres of the stick insect Carausius morosus*. J. Exp. Biol. 93: 257-267, 1981.
2. Belton P., Grundfest H. — *Potassium activation and K spikes in muscle fibres of mealworm larva (Tenebrio molitor)*. Amer. J. Physiol. 203: 588-594, 1962.
3. Borkowska M. J. — *Geneza potencjału spoczynkowego w świetle struktury i czynności błony*. Post. Biol. Kom. 4: 185-220, 1977.
4. Borkowska M. J. — *Geneza potencjałów czynnościowych i ich podłoże jonowe. I. Ogólna charakterystyka potencjałów czynnościowych w świetle badań porównawczych*. Post. Biol. Kom. 10: 165-196, 1983.
5. Borkowska M. J. — *Geneza potencjałów czynnościowych i ich podłoże jonowe. II. Hipoteza sodowa i jej sprawdzanie*. Post. Biol. Kom. 10: 197-238, 1983.
6. Borkowska M. J. — *Geneza potencjałów czynnościowych i ich podłoże jonowe. III. Główne teorie pobudzenia. Elektryczne właściwości błony*. Post. Biol. Kom. 10: 239-258, 1983.
7. Bourque C. W., Renaud L. P. — *Calcium-dependent action potentials in rat supraoptic neurosecretory neurones recorded in vitro*. J. Physiol. 363: 419-428, 1985.
8. Constanti A., Galvan M., Franz P., Sim J. A. — *Calcium-dependent inward currents in voltage-clamped guinea-pig olfactory cortex neurones*. Pflügers Arch. 404: 259-265, 1985.
9. Fukuda I. — *Chloride spike, a third type of action potential in tissue-cultured skeletal muscle cells from the chick*. Science 185: 76-78, 1974.
10. Galvan M., Constanti A., Franz P. — *Calcium-dependent action potentials in guinea-pig olfactory cortex neurones*. Pflügers Arch. 404: 252-258, 1985.
11. Gierasimow V. D., Janiszewski L. — *The effect of urethane on some electrical properties of molluscan giant neurons*. Experientia 23: 1-3, 1967.
12. Grundfest H., Aljure E., Janiszewski L. — *The ionic nature of conductance increases induced in Rajid electroplaques by depolarizing and hiperpolarizing currents*. J. Gen. Physiol. 45: 598 A, 1962.
13. Hildebrand E., Dryl S. — *Significance of Ca^{2+} and K^{+} ions for the excitation of the protozoan membrane*. Bioelectrochem. Bioenergetics 3: 543-544, 1976.
14. Hirst G. D. S., Helden-Van D. F. — *Ionic basis of the resting potential of submucosal arterioles in the ileum of the guinea-pig*. J. Physiol. 333: 53-67, 1982.
15. Hodgkin A. L., Katz B. — *The effect of sodium ions on the electrical activity of giant axon of the squid*. J. Physiol. 108: 37-77, 1949.
16. Hodgkin A. L., Huxley A. F. — *A quantitative description of membrane current and its application to conductance and excitation in nerve*. J. Physiol. 117: 500-544, 1952.
17. Inoue I. — *Voltage-dependent chlorine conductance of the squid axon membrane and its blockade by some disulfonic stilbene derivatives*. J. Gen. Physiol. 85: 519-537, 1985.
18. Ito Y., Tashiro N. — *Calcium spike in the longitudinal muscle of the lobworm, Tylorhynchus heterochaetus, (Nereidae)*. J. Exp. Biol. 53: 597-609, 1970.
19. Janiszewski L. — *Electrophysiology of the neurone*. Acta Physiol. Pol. 23: 979-990, 1972.
20. Janiszewski L. — *Ionic requirements for neuromuscular transmission in insects*. Adv. Physiol. Sci. 22: 69-79, 1981.
21. Janiszewski L. — *Ionic mechanisms in excitable membranes*. Sixth School on Biophysics of Membrane Transport. str. 151-162, 1981.

22. Janiszewski L. — *Badania porównawcze nad udziałem jonów w elektrogenezie*. Folia Soc. Sci. Lublinensis 26: 153-160, 1984.
23. Janiszewski L., Grajpel B. — *The influence of KCl on the resting potential of Tenebrio molitor larva and imago muscle*. Gen. Physiol. Biophys. 4: 537-540, 1985.
24. Janiszewski L., Olszewska E., Borkowska M. J. — *Udział jonów potasowych w kształtowaniu mięśniowego potencjału membranowego u bezkręgowców*. W: Materiałach Ogólnopolskiego Sympozjum Szkoleniowego na Temat Błon Biologicznych. Ustronie k/Kępna, Warszawa, 1978.
25. Janiszewski L., Skubalanka E. — *Wpływ stężenia jonów potasowych na potencjał spoczynkowy w mięśniach tułowiowych patyczaka (Carausius morosus Br.)*. Acta Physiol. Pol. 17: 367-375, 1967.
26. Keynes D. R. — *Voltage-gated ion channels in the nerve membrane*. Proc. R. Soc. Lond. 220: 1-30, 1983.
27. Kusano K., Janiszewski L. — *Neuromuscular transmission in mealworm larvae (Tenebrio molitor)*. W: *Electrobiology of nerve, synapse and muscle*. Raven Press, New York. str. 93-103, 1976.
28. Marshall G. C., Lent M. Ch. — *Calcium-dependent action potentials in leech giant salivary cells*. J. Exp. Biol. 113: 367-380, 1984.
29. Newman E. A. — *Voltage-dependent calcium and potassium channels in retinal glial cells*. Nature 317: 809-811, 1985.
30. Olszewska E., Janiszewski L., Goj H. — *The influence of tetrodotoxin (TTX) on the action potentials of the neurons of Planorbis corneus*. Bull. Acad. Pol. 22: 523-525, 1974.
31. Piek T. — *Isonic and electrical properties*. W: *Insect muscle*. Usherwood R.N.P. (red.), Academic Press, London, str. 281-336, 1985.
32. Ritchie I. M., Rogart R. B. — *The binding of saxitoxin and tetrodotoxin to excitable tissue*. Physiol. Biochem. Pharmacol. 79: 1-50, 1977.
33. Sato T., Sugimoto K., Okada Y., Miyamoto T. — *Isonic basic of resting membrane potential in frog taste cells*. Jap. J. Physiol. 34: 973-983, 1984.
34. Spitzer C. N., Lamborgini E. J. — *The development of the action potential mechanism of amphibian neurons isolated in culture*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 73: 1641-1645, 1976.
35. Usherwood P. N. R. — *Electrochemistry of insect muscle*. Adv. Insect Physiol. 6: 205-276, 1969.
36. Yamamoto D., Fukami J. I. — *Isonic requirements for non-synaptic electrogenesis in the muscle fibres of a Lepidopterus insect*. J. Exp. Biol. 70: 41-47, 1977.

REMIGIUSZ TARNECKI

Instytut Biologii Doświadczalnej im. Nenckiego
Warszawa

TECHNIKI STYMULACJI I REJESTRACJI STOSOWANE W BADANIACH UKŁADU NERWOWEGO

Lawinowy rozwój mikroelektroniki stworzył szerokie możliwości badań mechanizmów funkcjonowania, zasad organizacji połączeń i transmisji informacji w układzie nerwowym, dając techniczne i technologiczne podstawy do powszechnego stosowania nowoczesnych metod drażnienia układu nerwowego oraz precyzyjnych technik rejestracji i pomiaru zjawisk bioelektrycznych występujących w jednostkach strukturalnych mózgu.

Na wstępie omówione zostaną, w dużym skrócie, techniki stosowane do aktywacji — okresowego pobudzania układu nerwowego. W drugiej kolejności — podstawowe metody rejestracji i pomiaru zjawisk bioelektrycznych na poziomie pojedynczego neuronu oraz zasygnalizowane najnowsze techniki pozwalające na rejestrację tych zjawisk na poziomie molekularnym.

Podział technik aktywacji układu nerwowego, zgodnie z ogólnie przyjętą zasadą, oparty jest na charakterze fizycznym bodźca stosowanego do drażnienia oraz na bezpośrednich efektach jego działania. Na tej podstawie sposoby aktywacji układu nerwowego dzielimy na drażnienie “naturalne” i drażnienie “sztuczne”. O drażnieniu naturalnym mówimy wtedy, gdy zastosowany przez nas bodziec działa na wyspecjalizowane elementy czujnikowe układu nerwowego — receptory, wrażliwe wybiórczo na ściśle określony rodzaj energii fizycznej stanowiącej bodziec (np. fala akustyczna lub fala elektromagnetyczna).

Do drażnienia sztucznego zaliczamy bezpośrednie drażnienie elektryczne układu nerwowego oraz drażnienie chemiczne polegające na mechanicznej, ciśnieniowej lub jontoforetycznej, aplikacji substancji chemicznych do układu nerwowego. Należy zaznaczyć, że zwolennicy drażnienia chemicznego uważają metodę chemiczną za naturalną, argumentując swój punkt widzenia tym, że aby jakiś związek chemiczny był efektywny, musi on działać wybiórczo na określony nueroreceptor.

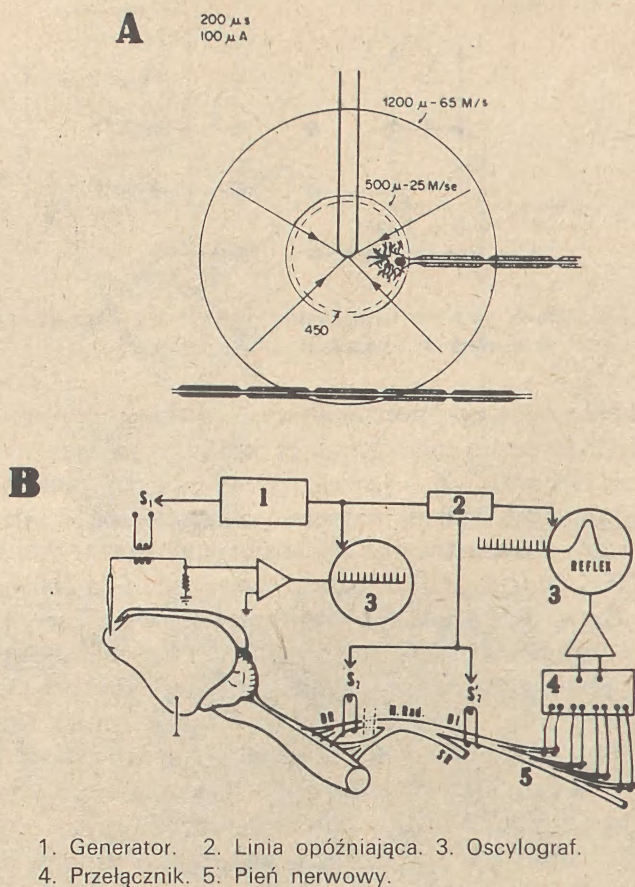
Techniki drażnienia naturalnego są stosunkowo łatwe w użyciu, gdyż bodźce naturalne są bezpieczne dla organizmu, a ich działanie, uszkadzające

lub niszczące, występuje rzadko i to tylko w przypadkach znacznego przekroczenia progowych wartości, właściwych danemu bodźcowi. Kontrola i pomiary parametrów fizycznych bodźców naturalnych, takich jak bodziec świetlny lub bodziec akustyczny prowadzone przy użyciu specjalnych aparatów pomiarowych, są stosunkowo proste. Ten rodzaj drażnienia najczęściej jest stosowany w badaniach prowadzonych na zwierzętach czuwających. Pewne niedogodności związane ze stosowaniem bodźców naturalnych, takie jak trudności z określeniem ich wartości progowych lub też częste kłopoty z synchronizacją czasu zadziałania i okresu trwania bodźca z zapisem efektów jego działania są obecnie technicznie łatwe do pokonania.

Znaczna część naszej obecnej wiedzy o układzie nerwowym, własnościach neuronów, ich cechach funkcjonalnych, potencjałach zewnątrz- i wewnątrzkomórkowych, organizacji łuków odruchowych, strukturze połączeń neuronalnych i mechanizmach transmisji, została nagromadzona w wyniku badań wpływu synchronicznej salwy aferentnej na stan pobudliwości neuronów i ruchów odruchowych. Ze sztucznej natury synchronicznej salwy aferentnej wywoływanej elektrycznym drażnieniem elementów neuronalnych zdawano sobie sprawę już dawno (Creed i wsp. 1932). Ta nienaturalność synchronicznej salwy aferentnej, wynikająca z jednoczesnego pobudzenia włókien unerwiających np. różne receptory, zaburza w pierwszym rzędzie mechanizmy integracji.

Bezpośrednie drażnienie elektryczne w badaniach na zwierzętach czuwających ma bardzo ograniczone zastosowanie. Obecnie w badaniach ostrych efekty nienaturalnej synchroniczności salw aferentnych minimalizuje się, stosując stymulację "stochastyczną". Bodźce "stochastyczne" są zbliżone efektami działania do bodźców naturalnych, pozwalają na kontrolowanie ilości i typu pobudzonych włókien i tym samym sterowanie częstością i rozkładem salw aferentywnych. To z kolei pozwala na analizę rozkładów składowych tonicznych i fazowych we wzorach odpowiedzi neuronów i tym samym na badania, na przykład, mechanizmów sumacji i transmisji w warunkach zbliżonych do naturalnych. Na rys. 1 przedstawiono schematyczne układy bezpośredniego, elektrycznego drażnienia zarówno nerwów obwodowych, jak i mikrostymulacji kory mózgowej wraz z układem pomiarowo-kontrolnym i układem rejestrującym efekty drażnienia. Należy zdawać sobie jednakże sprawę z tego, że parametry impulsów prądowych stosowanych w drażnieniu elektrycznym muszą być bardzo precyzyjnie kontrolowane. Nawet nieznaczne przekroczenie wielkości napięcia, prądu, czy też czasu trwania impulsu prowadzi do nieodwracalnych, trwałych uszkodzeń tkanki nerwowej.

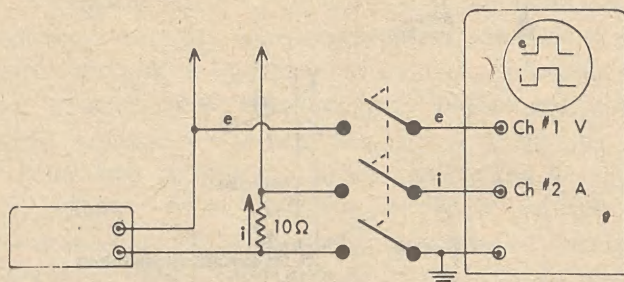
Prąd elektryczny płynący przez tkankę nerwową może powodować co najmniej dwa, najczęściej występujące i różniące się od siebie w sposób istotny rodzaje uszkodzeń: uszkodzenia termiczne (odwracalną koagulację białek) lub uszkodzenia elektrolityczne (mechaniczno-chemiczne przez wydzielanie się gazu na końcu elektrody stosowanej do drażnienia oraz lokalnych zaburzeń homeostazy, głównie pH). Każdego z tych uszkodzeń można stosunkowo



Rys. 1. A — obszary bezpośredniej stymulacji tkanki nerwowej technikami mikro- i makro-stymulacji prądem elektrycznym. Zaznaczono obszary efektywnego i bezpiecznego działania prądu przy stosowaniu, podanych na rysunku, wartości impulsów prądu; B — schemat połączeń aparatury rejestracyjnej, stymulującej i pomiarowo-kontrolnej stosowanej w badaniach elektrofizjologicznych

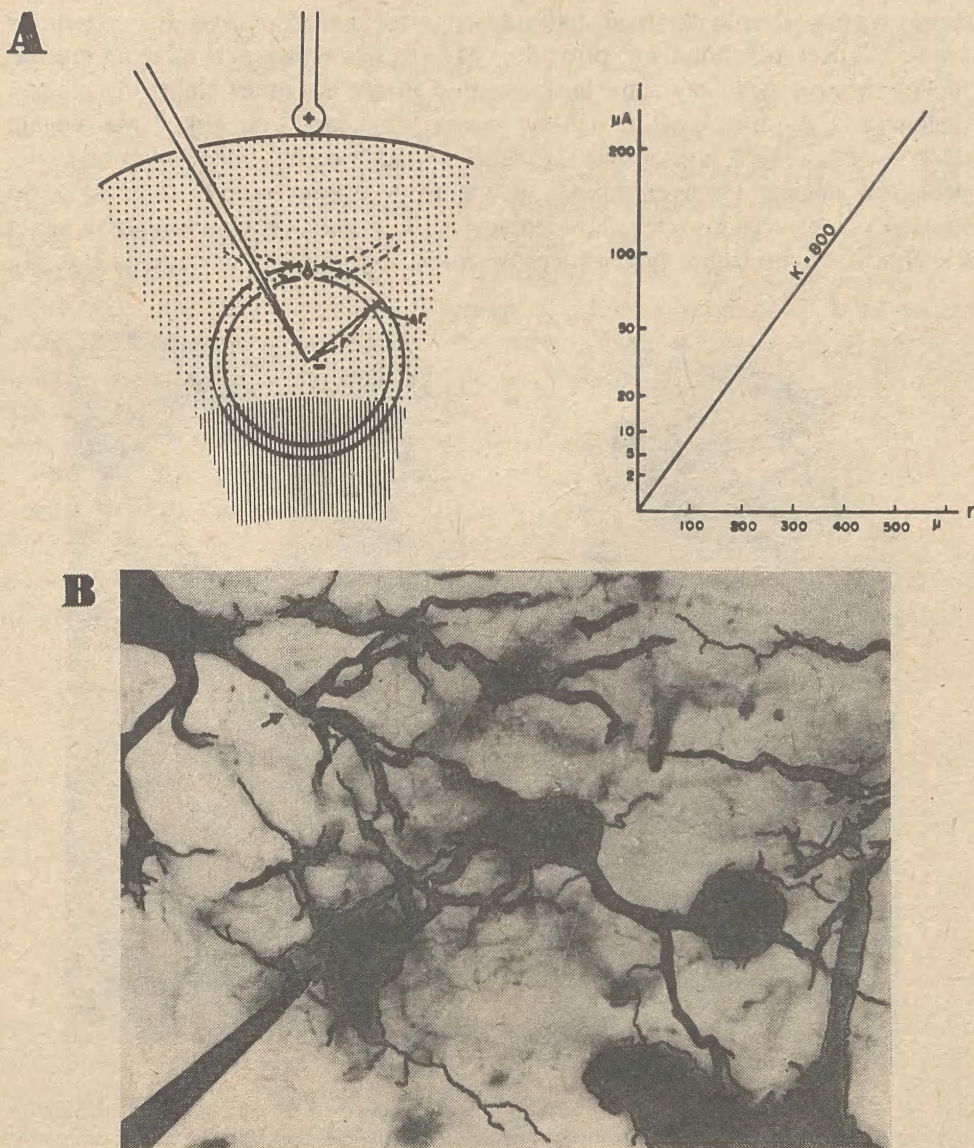
łatwo uniknąć dobierając parametry impulsu tak, że zapewnione jest stopniowanie poziomu pobudzenia od wartości progowych do ponadprogowych (a nawet wielokrotnych wartości progu) w zakresie poniżej siły prądów niszczących.

Proponowano różne warianty pomiaru wartości skutecznych progowych impulsów elektrycznych, stosowanych do drażnienia elementów pobudliwych centralnego układu nerwowego, takie jak pomiar napięcia, siły, energii, czy też ładunku. Doświadczenie wykazało, że najskuteczniejszy jest pomiar wielkości prądu płynącego przez tkankę wyrażony w μ A, mierzonego zgodnie z prawem Ohma, spadkiem napięcia na oporze o znanej wartości włączonym w szereg z elektrodą drażniącą (rys. 2). W przypadku elektrod drażniących o dużym obszarze czynnym, jakie stosowane są do makrostymulacji, uważa się, że prąd



Rys. 2. Jeden z najprostszych układów stosowanych do pomiaru wartości napięć i prądów używanych do stymulacji tkanki nerwowej

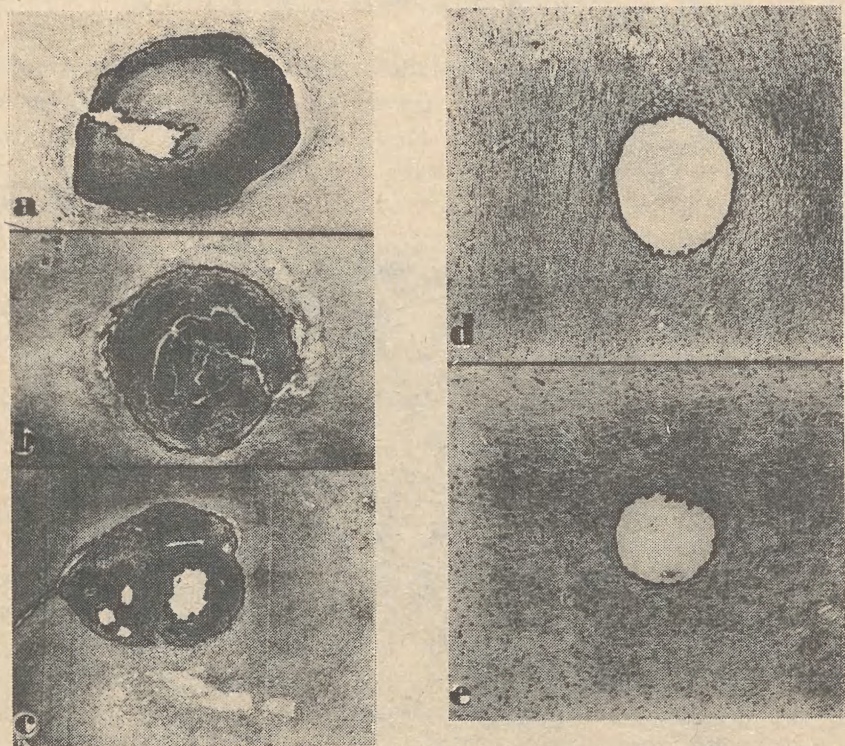
płynący przez tkankę maleje proporcjonalnie do odległości od końca elektrody, a jego rozkład przestrzenny ma charakter kulisty i niezależny od kształtu czynnego końca elektrody. Z wyliczeń, prowadzonych podczas specjalnie w tym celu wykonanych badań, wiadomo, że skuteczne działanie $100 \mu\text{A}$ impulsu katodowego o czasie trwania $200 \mu\text{s}$ obejmuje obszar tkanki o promieniu od 500 do $2000 \mu\text{m}$ (rys. 3). W obszarze o promieniu do $500 \mu\text{m}$ drażnione są wszystkie rodzaje włókien i neuronów niezależnie od ich usytuowania przestrzennego w stosunku do końca elektrody. Przy makrostymulacji bezpieczne wartości prądu zawarte są w granicach od 50 do $200 \mu\text{A}$ w krótkim czasie trwania impulsu prądu wynoszącym od $0,1$ do $0,3$ msek i częstością nie przekraczającą 500 imp/sek oraz w krótkich kilkuimpulsowych seriach. Szereg impulsów występuje natomiast przy długotrwałej mikrostymulacji za pomocą elektrod implantowanych. W doświadczeniach chronicznych bowiem często trudno jest ustalić warunki, które pozwalają na progowe drażnienie z utrzymaniem stałości parametrów i ponadprogowe drażnienie bez wywoływania efektów ubocznych. Ustalenie optymalnych warunków wymaga z reguły, oprócz określenia wymienionych parametrów, doboru odpowiedniego kształtu i polaryzacji impulsu. Do drażeń długotrwałych, chronicznych zwykle stosujemy drażnienie impulsami bipolarnymi. Średnia siła bodźców trwale uszkadzających tkankę wyrażona w watach wynosi dla bodźca monopolarnego $0,0048 \text{ W/cm}^2$, podczas gdy dla drażnienia bipolarnego jest ona prawie dwukrotnie wyższa i wynosi $0,0078 \text{ W/cm}^2$. Poza tym impulsy jednokierunkowe — prąd monopolarny — znacznie szybciej niż bipolarne wywołują uszkodzenia elektrolityczne, zmiany stężenia jonów, zmiany pH i są przy tym stosunkowo mało efektywne jako czynnik pobudzający. Szczególnie przy stosowaniu długich serii, w czasie trwania których zachodzi polaryzacja elektrod i tkanki nerwowej, wywołująca tzw. „akomodację” na podłożu efektów prostowniczych, niwelująca efektywność pobudzeniową znacznej części impulsów długiej serii. Z powyższych względów, w badaniach wymagających długotrwałego stosowania prądu jako czynnika pobudzającego tkankę nerwową wskazane jest stosowanie serii impulsów bipolarnych, w których parametry impulsów o przeciwnych polaryzacjach są możliwie identyczne.



Rys. 3. A — rozkłady prądów stymulujących tkankę oraz wykres zależności wartości skutecznej prądu od parametrów impulsu i odległości od elektrody czynnej; B — lokalizacja miejsca drażnienia i rejestracji techniką barwnego znakowania

Przy uważnym stosowaniu takiego drażnienia, suma algebraiczna efektów elektrolitycznych wywoływanych parą impulsów o przeciwnej polaryzacji jest równa zeru, nie występują więc zjawiska polaryzacji elektrod i szkodliwe dla tkanki efekty elektrolityczne. Również wartość graniczna, powyżej której występują zjawiska elektrolityczne dla prądu monopolarnego, jest niebezpiecznie mała i wynosi ona 0,5 microculomba na impuls o czasie trwania 1 msec.

Samo wprowadzenie elektrod, natomiast, nawet o stosunkowo dużej średnicy rzędu kilkuset mikrometrów, powoduje zadziwiająco małe uszkodzenia mechaniczne mózgu, tylko neurony bezpośrednio niszczone przez elektrodę ulegają degeneracji, natomiast włókna nerwowe są "spychane" na boki i nie ulegają uszkodzeniu. Skala występowania efektów toksycznych, będących przyczyną procesów degeneracyjnych zależy od wielu czynników: metali używanych do konstrukcji elektrod, materiałów izolacyjnych, w głównej mierze jednak skala i szybkość zachodzenia tych procesów zależy od techniki drażnienia (rys. 4).



Rys. 4. Skala efektów toksycznych i zniszczeń tkanki nerwowej w zależności od materiałów używanych na elektrody przy tych samych wartościach prądu: a — elektroda ze srebra, drażnienie anodą; b — elektroda z miedzi, drażnienie katodą; c — elektroda z miedzi, drażnienie anodą; d — elektroda ze stali, drażnienie anodą; e — elektroda ze stali, drażnienie katodą

Mikrostymulacja została wprowadzona do badań elektrofizjologicznych przez Walla i wsp. w 1956 roku. W krótkim czasie nastąpił intensywny rozwój technik mikrostymulacji, w wyniku którego bardzo duża dokładność pomiaru i kontroli prądu oraz efektów jego działania na tkankę dały elektrofizjologom do ręki precyzyjną metodę pozwalającą na selektywną aktywację poszczególnych populacji włókien nerwowych, a nawet pojedynczych neuronów centralnego układu nerwowego. Do zagadnień związanych

z możliwościami eksperymentalnymi, wynikających z precyzji i selektywności mikrostimulacji powrócimy w dalszej części naszych rozważań. Obecnie zaś zajmujemy się regułami technicznymi rządzącymi mikrostimulacją.

Do mikrostimulacji stosowane są zwykle mikroelektrody metalowe. Aby zapobiec uszkodzeniom obszaru czynnego czubka mikroelektrody na skutek ucieczki jonów metalu stosowane jest drażnienie katodowe, drugi biegun — anodę stanowi makroelektroda umieszczona z dala, zwykle na obojętnym obszarze tkanki. Ze względu na konfigurację elektrod, ten system drażnienia nazywamy jednobiegunowym (a w przypadkach mikrostimulacji kory mózgowej powierzchniowo-anodowym). Drażnienie tkanki nerwowej prądem katodowym jest stosowane również i z tego względu, że jest ono od 7 do 10 razy efektywniejsze niż drażnienie anodowe. W takim też stosunku zmniejsza się niebezpieczeństwo uszkodzenia tkanki prądem.

W czasie drażnienia elektrycznego, tkanka nerwowa ze względu na jej własności fizyko-chemiczne jest traktowana jako przewodnik przestrzenny (volume conductor). W związku z czym, do obliczeń rozkładu napięć (V) w obszarze tkanki, a tym samym przestrzeń w której elementy pobudliwe układu nerwowego będą aktywowane, stosowane jest następujące równanie:

$$V = \frac{iS}{4\pi r^2},$$

gdzie: i — prąd, r — odległość od źródła (bieguna który stanowi elektrodę), S — oporność właściwa przewodnika (tkanki).

Gradient napięć na ciele komórki nerwowej wyraża się następującą zależnością:

$$\frac{\Delta V}{\Delta r} = \frac{dV}{dr} = \frac{-iS}{4\pi r^2}.$$

Przy założeniu jednakże, że: 1) wartość skuteczna prądu pobudzenia neuronu jest równa prądowi, który płynie przez błonę neuronu; 2) gęstość prądu jest proporcjonalna do różnicy napięć (V) po obu stronach błony ciała komórki (r). Przy drażnieniu progowym ta różnica napięć jest stała, ponieważ prąd progowy dla danej komórki jest wartością stałą. W związku z tym zależność V/r jest stała dla r równego średnicy komórki. W tym przypadku gradient napięć na ciele komórki, determinujący progowy prąd drażnienia wynosi:

$$K = \frac{i}{r^2}.$$

Zarówno z wyliczeń teoretycznych jak i danych doświadczalnych wynika, że prąd o sile od 1,5 do 5 μA jest prądem, który nie uszkadza błon biologicznych, a obszar jego efektywnego działania jest w przybliżeniu kulą o średnicy 50 μm .

Stosując technikę mikrostymulacji możemy, bez obawy uszkodzenia tkanki nerwowej, skutecznie pobudzić 9 neuronów, gdyż zgodnie z danymi anatomicznymi, w takim obszarze znajduje się średnio 7-9 neuronów.

Wyniki badań, w których stosowano technikę mikrostymulacji rutynowo (Gustafsson i Jankowska 1976) wskazują na to, że podana wartość $5\mu A$ może być, przy stosowaniu krótkich nie przekraczających 0,2 msek impulsów i krótkotrwałym drażnieniu, bez szkody dla tkanki nerwowej przekroczona nawet kilkakrotnie (do $15-25\mu A$). Jednakże przy stosowaniu dłuższych impulsów, przy dłuższych i częstych drażnieniach nieniszczące wartości prądu są o rząd wielkości mniejsze i wynoszą od 4 do $10\mu A$ (Asanuma i Sasaki 1967).

Reasumując, przyjęto ogólnie, że w procesie mikrostymulacji występuje zależność liniowa między odległością włókna nerwowego (a właściwie jego przewężenia Ranviera) od czubka elektrody drażniącej i wielkością progową prądu oraz, że obszar efektywnego działania impulsu prądu jest liniowo proporcjonalny do intensywności prądu (Bement i Rancek 1969). Zależność ta wyrażona jest wzorem:

$$i = \sqrt[3]{r \min^2 + d^2},$$

gdzie: i — prąd w μA , r — minimalna odległość nerwu od elektrody, d — odstęp między elektrodami.

O ile zależności te są w pełni słuszne przy drażnieniu nerwów obwodowych, dla centralnego układu nerwowego są one słuszne tylko dla przestrzeni ograniczonych do $300\mu m$ od końca elektrody. Różni autorzy podają różne, niejednokrotnie nawet znacznie różniące się od siebie wartości prądu niszczących trwale tkankę. Przyczyną tych różnic jest stwierdzony doświadczalnie fakt, że przy drażnieniu mikroelektrodą zarówno gęstość prądu, jak i kształt obszaru i jego nasycenie zależą od geometrycznego końca mikroelektrody, jej oporności i pojemności. Dlatego też obowiązuje eksperymentatora wykonanie własnych pomiarów.

Umiejętne połączenie mikrostymulacji z rejestracją mikroelektrodową efektów drażnienia pozwala na pełne wykorzystanie walorów technicznych tej metody, takich jak selektywność i precyzja w określeniu rodzaju elementów drażnionych, charakteru drażnienia — bezpośrednie, transsynaptyczne, czy antydromowe — jak również do określenia pozycji mikroelektrody rejestrującej w stosunku do neuronu, którego czynność bioelektryczną analizujemy. Możliwość wykorzystania tych walorów techniki mikrostymulacji daje znajomość kilku prostych faktów umożliwiających analizę rejestrowanych potencjałów czynnościowych.

Stosując technikę mikrostymulacji możemy mieć do czynienia z następującymi efektami drażnienia: 1) bezpośrednie elektryczne pobudzenie komórki, 2) transsynaptyczne pobudzenie komórki, 3) bezpośrednie pobudzenie włókna nerwowego, 4) antydromowe pobudzenie komórki.

I tak, wiadomo, że występuje znaczna różnica między efektami mikro-stymulacji wewnątrzkomórkowej i zewnątrzkomórkowej. Wewnątrzkomórkowe impulsy prądu powodują równomierną depolaryzację błony komórkowej, podczas gdy zewnątrzkomórkowe — polaryzują błonę komórki lokalnie. W związku z tym najniższe wartości progowe prądu pobudzają neuron bezpośrednio przez depolaryzację wzgórka aksonalnego. W przypadku gdy elektroda jest zlokalizowana w pobliżu wzgórka, wartości progowe są niskie z reguły od 0,15 do 0,40 μA , podczas gdy wartość progu dla pobudzenia transsynaptycznego wynosi zwykle 3-5 μA . Generacja potencjału czynnościowego, na co istnieją niezbite dowody, zapoczątkowana jest zawsze depolaryzacją błony wzgórka niezależnie od miejsca i sposobu drażnienia. Wiadomo również, że na wejściu neuron jest pobudliwy tylko chemicznie, zaś na wyjściu tylko elektrycznie. Potencjały generowane przez neuron w wyniku bezpośredniego drażnienia neuronu mają te same kształty co potencjały wywoływane drażnieniem antydromowym lub wewnątrzkomórkowym.

Ad. 1. Potencjały czynnościowe, wywoływane bezpośrednim drażnieniem komórki, występują zgodnie z prawem “wszystko albo nic”, mają stałą, krótką latencję (z reguły mniejszą niż 0,5 msek (Eccles 1957)) i są sygnałem, że komórka znajduje się w bezpośrednim sąsiedztwie elektrody drażniącej.

Ad. 2. Potencjał czynnościowy generowany w procesie drażnienia transsynaptycznego, poprzedzany jest potencjałem postsynaptycznym podlegającym prawom sumacji, występującym z latencją ok. 0,7 msek, wyższym progiem pobudzenia; wartość tego progu maleje przy powtarzającym się drażnieniu. Potencjały generowane transsynaptycznie blokują generację “bezpośrednich” potencjałów czynnościowych. Efekty drażnienia transsynaptycznego mogą być wywoływane nawet w bardzo odległych obszarach, do których pobudzone neurony, jak również włókna pobudzone bezpośrednio mają projekcję.

Ad. 3. Potencjały generowane przez bezpośrednio pobudzone włókna są łatwe do zidentyfikowania, są one bowiem z reguły jednofazowe, mają bardzo krótką latencję, krótki okres refrakcji i nawet przy długotrwałym drażnieniu nie wykazują zmian amplitudy.

Ad. 4. Potencjały generowane antydromowo podlegają prawu “wszystko albo nic”, mają stałą latencję i amplitudę, podlegają prawu kolizji z potencjałami spontanicznymi oraz mają znacznie wyższy próg.

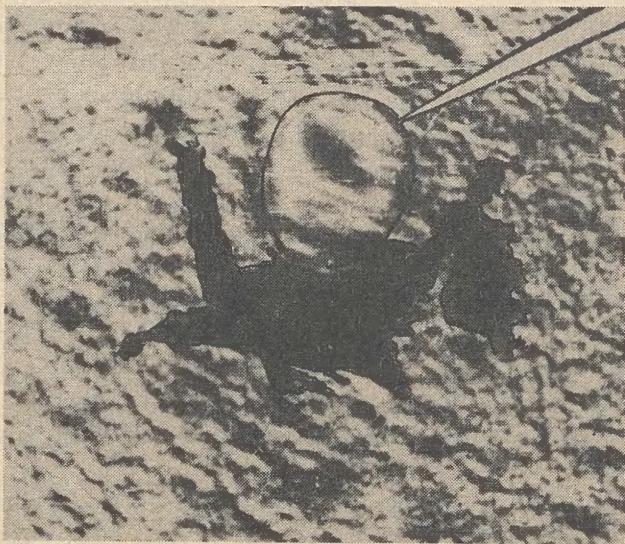
Znajomość opisanych cech potencjałów czynnościowych generowanych przez “różne drażnienia” pozwala nam np. na dokładną analizę mechanizmu działania substancji chemicznych, organizacji projekcji i połączeń sieci neuronalnej, własności funkcjonalnych poszczególnych jednostek strukturalnych układu nerwowego.

Jontoforeza — drażnienie chemiczne poprzez wprowadzenie substancji zjonizowanych w bezpośrednie sąsiedztwo komórek nerwowych lub mięśniowych za pomocą prądu elektrycznego zostało zastosowane w badaniach elektrofizjologicznych po raz pierwszy w 1953 roku przez N a s t u k a. Najogól-

niej mówiąc, technika ta polega na przepuszczaniu prądu elektrycznego przez mikropipetę wypełnioną zjonizowanym roztworem. Przeptywający przez pipetę prąd wymusza wpływ tej substancji do tkanki. Technika jontoforetyczna aplikacji substancji chemicznych do tkanki nerwowej, szczególnie iniekcji dokomórkowych, jest techniką stosunkowo trudną, ale jednocześnie ze względu na jej ogromne zalety (o których tak samo jak i trudnościach poniżej) znajduje szerokie zastosowanie, praktycznie we wszystkich badaniach nad układem nerwowym.

Szczególną zaletą techniki iniekcji jontoforetycznych są możliwości łatwego i bardzo dokładnego, praktycznie natychmiastowego, oznaczania czasu, ilości oraz miejsca aplikacji substancji. Mikropipeta jest zwykle wprowadzona do mózgu stereotaktycznie przy użyciu mikromanipulatora, najczęściej pod równoczesną kontrolą pozycji końca mikropipety przez zapis potencjałów czynnościowych drugim kanałem pipety, który rejestruje również momenty włączania i wyłączania prądu. Przy stosowaniu ścisłej kontroli prądu i czasu trwania iniekcji — metoda jontoforetyczna jest metodą ilościową, gdyż ilość wypływającej z pipety substancji jest proporcjonalna do całkowitego ładunku płynącego przez pipetę.

Technika mikrojontoforetyczna umożliwia wprowadzenie wręcz minimalnych ilości substancji, np. neurotransmitera w bezpośrednie otoczenie pojedynczego neuronu (rys. 5). Taka procedura eliminuje nie tylko problemy związane z dyfuzją i bariery enzymatyczne ograniczające lub umożliwiające dostęp transmittera do neuroreceptorów, ale pozwala również na ograniczenie obszaru działania i tym samym ilości neuronów uczestniczących w reakcji. Umożliwia



Rys. 5. Jontoforetyczne wprowadzenie substancji w bezpośrednie sąsiedztwo badanego neuronu. Na rysunku zachowane są rzeczywiste proporcje wielkości między neuronem i mikropipetą

porównanie mechanizmów działania synaps aktywowanych salwami aferentnymi. W ten sposób przełamano impas w rozwiązywaniu jednego z podstawowych zagadnień neurofizjologii, a mianowicie identyfikacji neurotransmiterów uczestniczących w procesach synaptycznych.

Fizyko-chemiczne podstawy jontoforezy są zawarte w prawie elektrolizy podanym przez Faraday'a:

$$M = nIT/ZF,$$

gdzie M jest ilością jonów określonej substancji obliczoną w molach, podczas przepływu prądu I liczonego w amperach (znaku o tej samej polarności co molekuly substancji wypełniającej mikropipetę) w czasie trwania iniekcji mierzonego w sekundach T . Ilość jonów, która wypłynęła z pipety jest oczywiście zależna od wartości ładunku jonów Z i stałej Faraday'a F . Zależność ta jest warunkowana współczynnikiem n nazywanym zwykle współczynnikiem wielkości transportu. Współczynnik wielkości transportu jest parametrem kompleksowym, zależnym od indywidualnych cech fizyko-chemicznych składników roztworu, takich jak rozpuszczalność, stopień dysocjacji, ładunek i jego znak (polarność), jak również od charakteru fizyko-chemicznego środowiska, do którego cząsteczki danej substancji mają być wprowadzone. Ze względu na te złożone zależności, wyliczanie współczynnika transportu dla poszczególnych substancji jest bardzo uciążliwe i komplikuje je fakt, że bezpośrednio wyliczenia fizyko-chemiczne współczynnika n dla prądów rutynowo stosowanych w jontoforezie są bardzo zawodne. Dla niektórych substancji wprowadzanych jontoforetycznie do mózgu (np. dla katecholamin współczynnik ten wynosi 0,04) są dostępne katalogowe wartości współczynnika transportu, wyliczone metodami radioaktywnymi. Powyższy fakt należy więc brać pod uwagę, szczególnie przy planowanym wprowadzeniu do badań nowych, niestosowanych dotychczas substancji.

Jednym z podstawowych mankamentów technik iniekcji jontoforetycznej jest fakt, że substancje trudno rozpuszczalne, słabo zdysocjowane mogą pod wpływem prądu być uwalniane z mikropipety elektro-osmotycznie (lub tylko częściowo elektroforetycznie). W takich przypadkach cząsteczki substancji są przenoszone przez prąd "pasywnie" w otocze wodnej. Co powoduje, że w przypadku cząsteczek o ładunku ujemnym, potencjał zeta (ujemny potencjał czubka mikropipety) zmniejsza znacznie liczbę cząsteczek uwalnianych pod wpływem prądu, tym samym uniemożliwia kontrolowanie szybkości i ilości uwalnianej substancji. Pogarsza sytuację jeszcze i to, że substancje trudno rozpuszczalne mają z reguły bardzo mały współczynnik wielkości transportu, zwykle słabo dyfundują, wymagają dużych prądów iniekcji i podlegają silnemu przeciwdziałaniu enzymatycznemu. Czynniki te powodują, że określenie wartości prądu uwalniającego progowe ilości substancji aktywującej receptory jest problematyczne. Tym samym niemożliwa jest analiza efektów iniekcji substancji testowanej, gdyż z jednej strony zbyt duże jej ilości mogą spowodować

znane zjawisko desensytyzacji neuroreceptorów, a zbyt duży prąd iniekcji może wywołać efekty uboczne lub uszkodzić tkankę w bezpośrednim obszarze końca pipety. Desensytyzacja neuro-receptorów powoduje, że neurony będą raczej pobudzane bezpośrednim działaniem prądu zamiast reagować specyficznie poprzez działanie substancji testowej na receptory.

Stosując specjalne układy elektryczne, można uniknąć niektórych wad techniki iniekcji jontoforetycznej. Spontaniczną ciągłą ucieczkę jonów z mikropipety (której wielkość jest możliwa do przewidzenia na podstawie oporu mikropipety) można zatrzymać wprowadzając stałe napięcie między mikropipetą i tkanką powodujące przerwanie prądu płynącego między tkanką a pipetą przez wyrównanie różnicy napięć. Pełna skuteczność tego zabiegu jest jednak ograniczona rozmiarami czynnego końca mikropipety (w granicach od 0,5 do 0,3 μm średnicy o oporności od 100 do 150 ΩM). Dla pipet o większej średnicy zabieg ten jest nieskuteczny, a wręcz szkodliwy, zahamowanie prądem ucieczki jonów z takiej pipety wymaga bowiem stosowania dużych napięć, i tak np. dla pipety o średnicy 3 μm i oporności ok. 1 ΩM wielkość spontanicznej ucieczki jonów będzie wynosiła ok. 3×10^{-10} mol/sek, jej zahamowanie (przez wyrównanie prądu skierowanego do wnętrza pipety) wymagałoby napięcia równego 100 V. Ciągła ucieczka jonów z elektrody, przeszkadzająca jednym badaniom, może być nieoceniona w badaniach długotrwałych efektów działania transmitterów na reaktywność neuronów. W badaniach w których powtarzalne, wielokrotne iniekcje są stosowane wielokrotnie, zarówno czas trwania pojedynczej iniekcji, jak i spontaniczny wpływ substancji testowanej są kontrolowane prądem o kierunku przeciwnym do prądu wypływu substancji. Należy pamiętać, że stosowany prąd powstrzymujący będzie powodował jednak ciągłe uwalnianie pewnej ilości jonów. Efekty działania tych jonów na czynność bioelektryczną tkanki muszą być również kontrolowane. Powyższe efekty są kontrolowane automatycznie przez układ elektroniczny, który za pośrednictwem specjalnej pipety, lub częściej za pomocą zarezerwowanego dla potrzeb rejestracji jednego kanału pipety, lub częściej za pomocą zarezerwowanego dla potrzeb rejestracji jednego kanału pipety wielokanałowej (wypełnionego elektrolitem), monitoruje te niepożądane uboczne zjawiska jontoforezy i automatycznie przepuszcza przez ten kanał prąd równy co do wielkości i przeciwny co do kierunku prądom uwalniania i powstrzymywania, płynącym przez kanały napełnione substancjami testowymi.

Do parametrów, które mogą mieć znaczenie zasadnicze dla interpretacji iniekcji jontoforetycznych są zaliczane również pH substancji testowej i pH tkanki, ponieważ prądy uwalniania i zatrzymywania mogą uwolnić więcej jonów H^+ lub OH^- niż jednostek substancji farmakologicznej. A wiele spośród tych substancji wywołuje sobie właściwe efekty przy określonym pH. Bywa i tak, że ujemny wpływ prądów stosowanych w jontoforezie na skuteczność testowanej substancji może być zneutralizowany przez chemicznie wywołane "odwrócenie" znaku ładunku cząsteczek.

Technika iniekcji mikrojontoforetycznej jest coraz częściej zastępowana mikroiniekcją ciśnieniową zarówno zewnątrz- jak i wewnątrzkomórkową. Główne wady techniki ciśnieniowej to: trudna i mało precyzyjna kontrola szybkości wypływu substancji z mikropipety oraz trudne w realizacji, choć proste technicznie, wyliczenie objętości "wypchniętej" substancji. Do tych obliczeń potrzebne są takie parametry, jak: ciśnienie, średnica końca pipety lub jej oporność mierzona w $M\Omega$, czas trwania wypływu oraz własności fizyko-chemiczne substancji. Na przykład można podać, że z mikropipety o oporności rzędu $25 M\Omega$ wypełnionej $3 M ACh$ pod ciśnieniem $140 mmHg$ wypłynie $15 pmola/sek$.

Cenną zaletą tej techniki iniekcji jest całkowita eliminacja prądu elektrycznego. Dlatego iniekcje ciśnieniowe stosowane są zawsze jako iniekcje testowe dla wykluczenia efektów bezpośredniego działania prądu. Metoda ta jest również niezastąpiona w tych przypadkach, w których chcemy stosować substancje nie dysocjujące, słabo zjonizowane lub takie, które nie występują w czystej postaci. Technika ciśnieniowa jest również najwygodniejsza dla barwnego znakowania pojedynczych neuronów w celu ich precyzyjnej identyfikacji, gdyż pozwala na całkowitą eliminację z procesu rejestracji artefaktów prądowych.

Efekty działania substancji przekąźnikowej (transmitera) na neuron, wprowadzonej w jego bezpośrednie sąsiedztwo, są określane jej wpływem na parametry charakteryzujące aktywność bioelektryczną tej komórki, rejestrowaną zewnątrz- lub wewnątrzkomórkowo. I tak, w przypadku komórek wykazujących spontaniczną aktywność elektryczną, mogą to być zmiany wzorca wyładowań, łatwe do oceny ilościowej na podstawie histogramów przerw między-iglicowych, lub autokorelogramów. W przypadku, w którym jesteśmy w stanie pobudzić okresowo komórkę, znanym wejściem monosynaptycznym, najłatwiejszym sposobem detekcji wpływów testowanej substancji na reakcję neuronu jest konstrukcja histogramów wzorca odpowiedzi na salwę aferentną. Analogicznie, wpływy "drugu" na stosunki funkcjonalne między dwoma równocześnie badanymi neuronami możemy precyzyjnie określić stosując techniki kroskorelacyjne. Aby powyższe analizy przedstawiały wartość dowodową muszą być dokładne. Ich dokładność w pierwszym rzędzie zależy od dokładności konwersji iglicowych potencjałów czynnościowych na elektryczne impulsy standardowe. Należy pamiętać, że w powyższych technikach obrazowania wyników badań, potencjały są zmienione na impulsy standardowe i w związku z tym są traktowane jako stochastyczne procesy punktowe, które mogą służyć li tylko do pomiaru czasu i nie upoważniają do wysuwania żadnych wniosków zarówno z kształtu, jak i amplitudy iglicowych potencjałów czynnościowych.

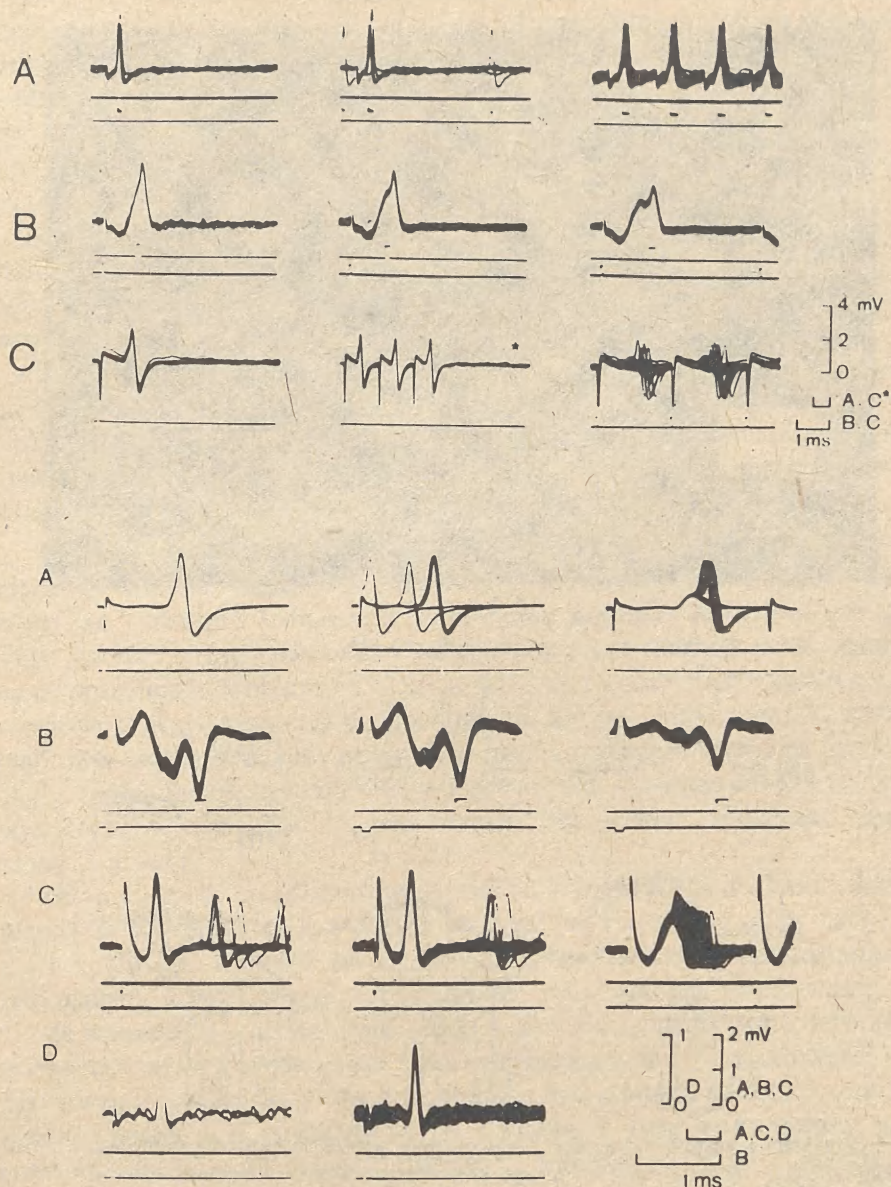
Badania bardziej intymnych, wewnątrzkomórkowych, czy też błonowych efektów działania transmiterów wymagają zastosowania precyzyjnych i skomplikowanych technik rejestracji wewnątrzkomórkowej umożliwiających analizę

i pomiary potencjałów transneuronalnych, parametrów charakteryzujących przewodnictwo błony i jego fluktuacji.

W badaniach, których celem jest analiza roli danego transmitera w określonym obszarze, lub anatomicznie określonej strukturze mózgu, musi być również dokonana identyfikacja funkcjonalna neuronu testami elektrofizjologicznymi, tj. drażnieniem orto- i antydromowym, określającymi pozycję neuronu w strukturze połączeń badanego obszaru mózgu oraz identyfikacja cytologiczna neuronu i obszaru w którym on występuje, możliwa po badaniu w trakcie którego neuron został barwnie oznakowany. Taka kompleksowa identyfikacja pozwala na zaszeregowanie neuronów do grup funkcjonalnych i określenie ich pozycji w łuku transmisyjnym i tym samym umożliwia zbadanie funkcji i lokalizacji miejsca działania testowanego transmitera (rys. 6).

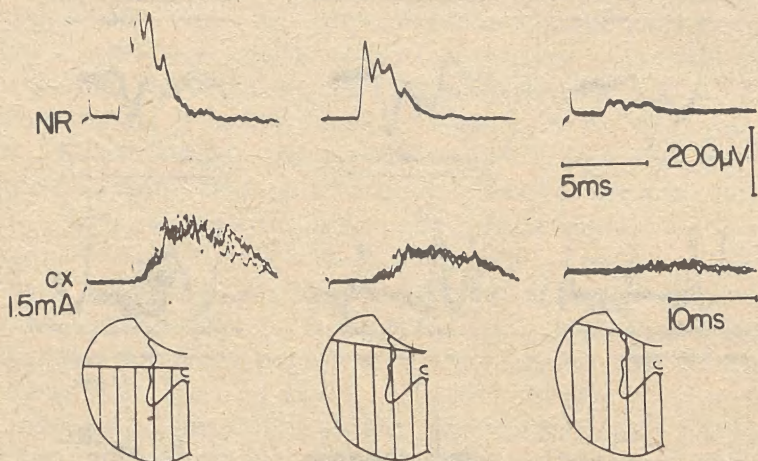
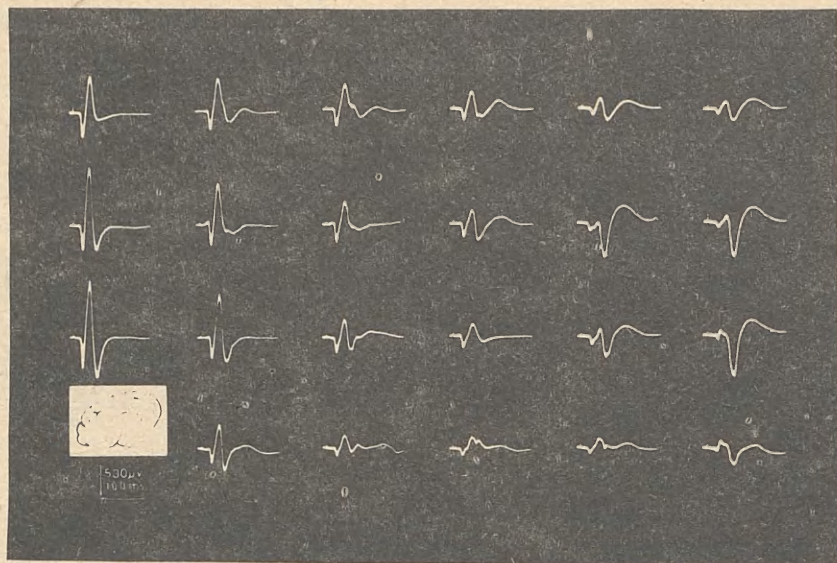
REJESTRACJA

W pierwszej części, przy okazji omawiania technik stymulacji elementów pobudliwych układu nerwowego, przedstawiono również podstawowe cechy potencjałów jednostkowych, rejestrowanych przy użyciu mikroelektrod z pojedynczego neuronu w postaci impulsów bioelektrycznych. Metody rejestracji zewnątrzkomórkowej są na tyle proste technicznie, że nie wymagają specjalnego opisu. Mikroelektroda szklana lub metalowa wprowadzona układem mikromanipulacyjnym, rejestruje zewnątrzkomórkowe potencjały polowe powstające pod wpływem generowanych przez neuron impulsów. Potencjały te dostarczają nam informacji o wzorcach wyładowań — rozkładach czasowych generowanych iglic bądź to “spontanicznie” bądź też w odpowiedzi na aktualnie działający bodziec — a amplituda i kształt potencjału iglicowego dostarczają nam informacji o położeniu czubka mikroelektrody w stosunku do neuronu (Gustafsson i Jankowska 1976). Stosując przy tej metodzie rejestracji odpowiednie drażnienie testowe, otrzymujemy także dokładne dane o pozycji neuronu w strukturze badanej sieci neuronalnej oraz o obszarze z którego otrzymuje i do którego daje on projekcję. Często mówi się, że jest to podstawowa metoda rejestracji do “geograficznych” badań nad układem nerwowym, wyznaczających kierunki i obszary projekcji poszczególnych systemów układu nerwowego (rys. 7). Metoda ta jest równie powszechnie stosowana w badaniach prowadzonych na zwierzętach czuwających, u których aktywność neuronów różnych struktur mózgu jest korelowana np. z wykonywaniem przez zwierzę określonego, wyuczonego zadania, a z wyników tych korelacji wyciągane są wnioski dotyczące funkcji danej okolicy mózgu. Tak bardzo wygodna pod wieloma względami metoda, nie dostarcza nam lub dostarcza tylko pośrednie dane o mechanizmach i prawach rządzących pobudliwością neuronu.



Rys. 6. Kompleksowe testowanie pozycji neuronu w łuku transmisyjnym, klasyfikacja neuronu oraz rozróżnianie neuronu i włókna na podstawie testów antydromowych

Jedną z najprecyzyjniejszych technik rejestracji zjawisk bioelektrycznych, których przebieg jest podstawowym wskaźnikiem stanu funkcjonalnego neuronu, jest wewnątrzkomórkowa rejestracja potencjałów czynnościowych w warunkach stabilizacji napięcia wnętrza komórki. Technika ta zwana voltage-clamp technique, została opracowana dla badań zjawisk elektrycznych występujących w błonie komórki nerwowej. W warunkach stabilizacji napięcia wnętrza



Rys. 7. Przykład zastosowania techniki potencjałów wywołanych do mapowania obszaru projekcji do kory czuciowo-ruchowej mózgu kota. Zastosowanie tej techniki do oceny wielkości lezji

komórki, wartość napięcia błony komórki jest tym samym kontrolowana elektrycznie przez eksperymentatora. Zapewnia to możliwość utrzymania określonego napięcia na całym obszarze błony przez który przepływa prąd (a więc i utrzymanie stałego napięcia błony postsynaptycznej w czasie salwy presynaptycznej), jak również wprowadzania natychmiastowych zmian tego napięcia do żądanej wielkości. Taki natychmiastowy skok napięcia wywoła krótkotrwały przepływ prądu jonowego przez błonę komórki na skutek przejściowych zmian pojemności. Możliwości kontroli i pomiaru prądu płyną-

cego przez błonę powodują, że metoda ta jest przydatna do badań parametrów elektro- i fizyko-chemicznych błon komórkowych. Jest to jednak metoda trudna i "kapryśna", jej poprawne stosowanie wymaga pewnego doświadczenia. Do pracy z nią konieczne są specjalne wysokooporowe wzmacniacze z układem do kompensacji i iniekcji prądu umożliwiające precyzyjne dopasowanie parametrów elektrody do aktualnych warunków pomiaru.

Technika voltage-clamp szczególnie nadaje się do badań nad mechanizmami działania transmiterów, gdyż dostarcza dokładnych danych ilościowych określających wpływ substancji przekąźnikowej na poszczególne parametry charakteryzujące pobudliwość neuronu.

Precyzyjniejszą od voltage-clamp jest tylko technika "patch clamp", technika rejestracji pozwalająca na pomiary rzędu 10^{-12} , czyli bilionowych części wolta. Stwarza to możliwości badania własności fizyko-chemicznych błony neuronu, a tym samym i mechanizmów jej pobudliwości na poziomie molekularnym.

Podstawowy fizjologiczny mechanizm pobudliwości neuronu stanowi napięciowo zależna, napięciowo sterowana, jonoselektywna przepuszczalność błony komórkowej. Jednakże niecała błona komórki nerwowej posiada te własności. Rezultaty wielu badań wskazują na to, że własności te są ograniczone do specyficznych obszarów błony, w których to obszarach rozmieszczone są wyspecjalizowane struktury białkowe, zwane kanałami jonowymi. Te struktury białkowe, sprzęgające całą przestrzeń między dwoma warstwami lipidowymi błony, spełniają rolę czynnika ułatwiającego ruch uwalnianych jonów poprzez wysokoenergetyczną zaporę jaką stanowi dla jonów środowisko lipidowe błony komórki.

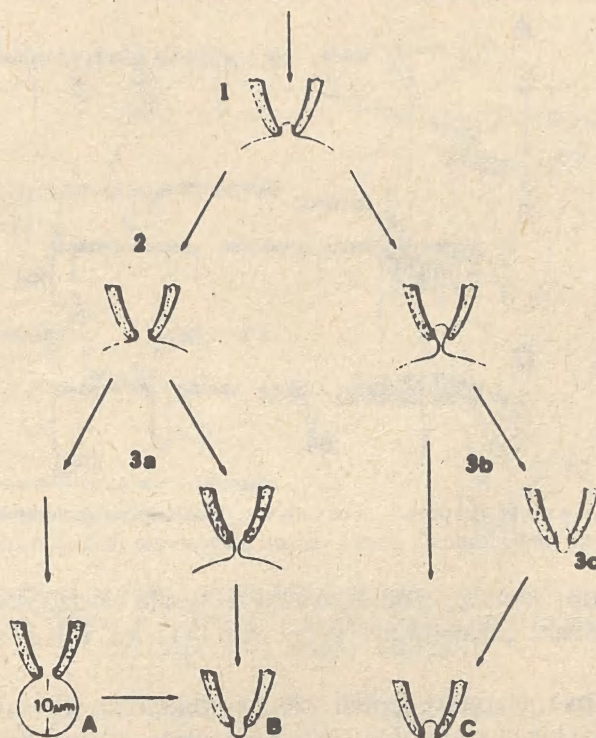
Na podstawie dotychczasowych badań wiadomo, że w błonie komórki nerwowej występuje szereg rodzajów kanałów jonowych, znane są niektóre z ich cech, np. kinetyka bramkowania, przewodnictwo, wpływy substancji blokujących lub zmieniających ich cechy, takie jak np. selektywność.

Ze względu na znaczenie własności fizyko-chemicznych błon komórkowych zarówno w terapii lekowej, jak i analizie mechanizmów pobudliwości tkanki nerwowej, prowadzono intensywne badania nad błonami biologicznymi. Ograniczenia techniczne powodowały, że badania te były wykonywane na wybranych, dużych obiektach. Sytuację tę zmieniło radykalnie zastosowanie patch clamp technique (techniki łatkowej), która umożliwia badania również i małych obiektów, z badaniem elementów komórkowych płynów tkankowych łącznie. Przy użyciu tej techniki po raz pierwszy zaobserwowano ruch jonów przez pojedyncze kanały błon biologicznych. Została ona wprowadzona do badań w 1976 roku przez Nehera i Sakmana. Aby tak dokładna rejestracja, o tak dużej rozdzielczości pomiarów, rzędu pikoamperów (10^{-12}) była możliwa musi być spełnionych kilka warunków: badany obszar błony musi być ograniczony do takiej wielkości, aby znajdowało się w nim co najmniej kilka kanałów; ten obszar błony ("łatka błonowa") musi być

doskonale izolowany elektrycznie od środowiska w którym znajduje się badana komórka; ze względu na pikoamperowy rząd mierzonych wartości układ rejestrujący musi być układem praktycznie "bezzsumowym". Powyższe wymagania spełnia właśnie patch clamp technique.

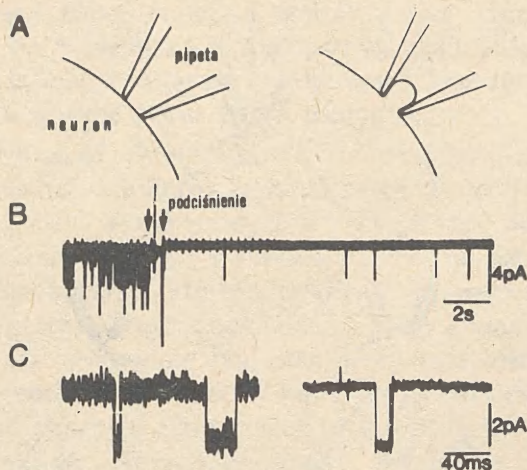
Obecnie, zależnie od określonych zadań badawczych, stosowany jest jeden z czterech podstawowych wariantów techniki patch clamp. Te cztery warianty oraz kolejność czynności, wykonywanych w celu ich otrzymania przedstawia rysunek 8. Niezależnie jednak od wybranego wariantu, należy przygotować "łatkę" — fragment błony, z którego będziemy rejestrować prąd jonowy. Dokonuje się tego przez dotknięcie powierzchni błony komórki pipetą (zwykle o średnicy ok. $1\mu\text{m}$). Następnie pod ciśnieniem (wielkości $10\text{--}20\text{ ml H}_2\text{O}$) wytworzonym w pipecie, wprowadzamy błonę do jej wnętrza. Zabieg ten ma głównie na celu jak najlepsze uszczelnienie pipety przez przylegającą do niej błonę (często w tym celu stosuje się jeszcze dodatkowe zabiegi takie jak enzymatyczne "czyszczenie" powierzchni błony komórki i wewnętrznych ścianek pipety). Jest on bardzo ważny, gdyż zmniejsza szczelinę między ścianą pipety i błoną do ok. $2\text{ \AA}$ i tym samym zwiększa oporność tego złącza do ok. 200 G . Tak wielka oporność łączy zapobiega ucieczce przez nią prądu i powstaniu różnicy potencjałów między wnętrzem pipety i środowiskiem komórki; cały prąd płynie więc przez łatkę, zwiększa to znacznie dokładność pomiarów i zapobiega powstaniu szumów w układzie pomiarowym, powodowanych głównie przepływem prądu między ścianą pipety i błoną do środowiska komórki. Obliczono, że przy średnicy pipety ok. $1\mu\text{m}$ obszar łatki wynosi ok. $15\mu\text{m}^2$. Opisana operacja stanowi tzw. wariant podstawowy metody patch clamp, zapewniający rejestrację w połączeniu z komórką — nazywany on jest patch clamp on cell lub cell attached configuration (rys. 9). Jest on łatwy do zrobienia, nie powoduje przy tym uszkodzeń w strukturze błony, zapewnia stabilne, długotrwałe pomiary prądu. Jest stosowany w badaniach charakterystyk prądowych kanałów jonowych sterowanych zarówno napięciowo, jak i kanałów sterowanych transmitterem zależnie od tego czy wywołujemy zmiany potencjału błony analogicznie, jak to robimy w metodzie voltage clamp, czy też stosujemy pipety wypełnione różnymi transmitterami. Wariant ten został również z powodzeniem użyty do badań nad znaczeniem drugorzędowych nośników informacji (second messengers).

Przerwanie błony wciągniętej do pipety stwarza połączenie elektryczne między wnętrzem pipety i wnętrzem komórki. Ten wariant nazywamy "whole-cell measurement" jest analogiczny do konwencjonalnej rejestracji wewnątrzkomórkowej. Ma jednakże zdecydowaną przewagę nad metodą konwencjonalną, gdyż powoduje znacznie mniejsze uszkodzenie komórki i pozwala na rejestrację z małych i najmniejszych komórek, niedostępnych przy użyciu metody wewnątrzkomórkowej. Jest on szczególnie wykorzystywany w badaniach nad rolą drugiego nośnika informacji w bramkowaniu pracy kanałów oraz integrowaniu i koordynowaniu funkcji różnych obszarów błony



1. Mikropipeta przyssana do powierzchni komórki, oporność błony plazmatycznej mierzy się w Giga omach/cm².
- A. Zasklepienie się uszkodzonego fragmentu błony plazmatycznej pozwalające na rejestrację przepływu jonów przez całą powierzchnię komórki ze środowiska do jej wnętrza.
- B. Kolejne etapy odrywania fragmentu błony plazmatycznej prowadzące do otrzymania "łatki" zwróconej stroną zewnętrzną na zewnątrz, a wewnętrzną do środowiska wypełniającego mikropipetę (outside-out patch); umożliwia to rejestrację przepływu jonów odzwierciedlającego ich ruch ze środowiska do wnętrza komórki.
- C. Kolejne etapy odrywania fragmentu błony plazmatycznej prowadzące do otrzymania "łatki" zwróconej stroną zewnętrzną do środowiska wypełniającego mikropipetę (inside-out patch), umożliwia to rejestrację przepływu jonów odzwierciedlającego ich ruch z wnętrza komórki do środowiska.
- 2/3. Odrywanie mikrofragmentów błony przy wykorzystaniu siły podciśnienia, lub napięcia elektrycznego:
 - a. w środowisku pozbawionym KCl/Ca,
 - b. w środowisku o niskim poziomie wapnia,
 - c. ekspozycja oderwanego fragmentu błony na działanie powietrza.

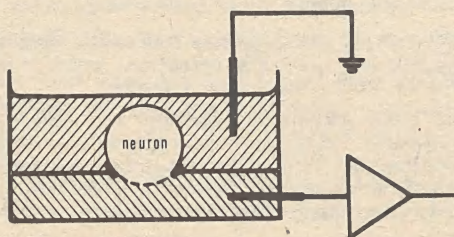
Rys. 8. Zasadnicze warianty rejestracji własności biofizycznych błon komórkowych stosowanych w technice patch clamp



Rys. 9. Podstawowy wariant (uchodzący za najłatwiejszy) metody patch clamp określany terminem "cell attached configuration", umożliwiający długotrwałe (kilkugodzinne) pomiary

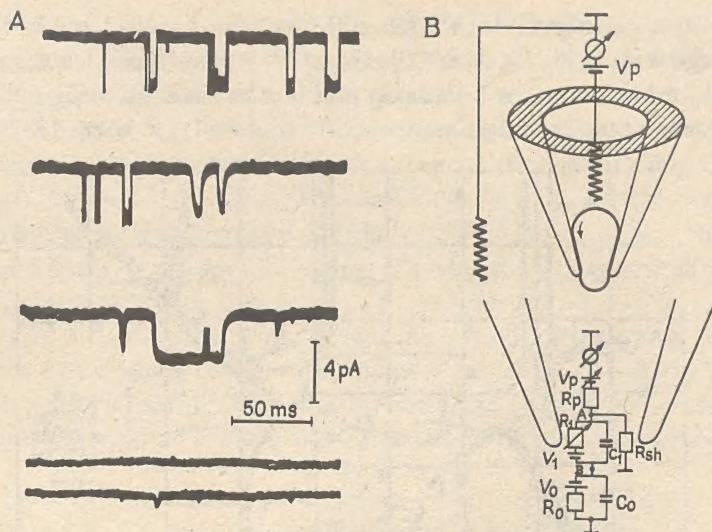
przez mechanizmy wewnątrzkomórkowe. Prosty, ale bardzo skuteczny wariant patch clamp został zastosowany przez Kostiuka i Krishtala (1977) (rys. 10).

Dwa następne warianty patch clamp technique, to rejestracja pracy kanałów jonowych z obszaru błony wypreparowanej z komórki, przez analogię można powiedzieć, że są to rejestracje *in vitro*. W terminologii anglosaskiej przyjęto dla tej odmiany nazwę "cell-free membrane patches". W tym wariantcie



Rys. 10. Metoda pomiaru zjawisk błonowych zaproponowana przez Kostiuka, stosowana również do pomiarów wewnątrzkomórkowych

możliwe są dwa sposoby rejestracji, gdy cytoplazmatyczna wewnętrzna powierzchnia błony ma kontakt z kąpielą — wariant zwany "inside-out" lub wariant "outside-out", i gdy zewnętrzna powierzchnia błony komórkowej ma kontakt z otaczającym ją środowiskiem (rys. 11). Ponieważ złącze błona-mikroelektroda jest nie tylko bardzo wysoko-oporowe, stabilne elektrycznie ale i odporne mechanicznie, możliwe jest mechaniczne oderwanie od ciała komórki fragmentu błony złączonego z mikropipetą. Zabieg ten wykonywany jest mechanicznie albo przez oderwanie elektrody albo przez zwiększenie podciśnienia i wciągnięcie błony w głąb pipety (Hamill i Sakmann 1981, Neher 1981). Gdy

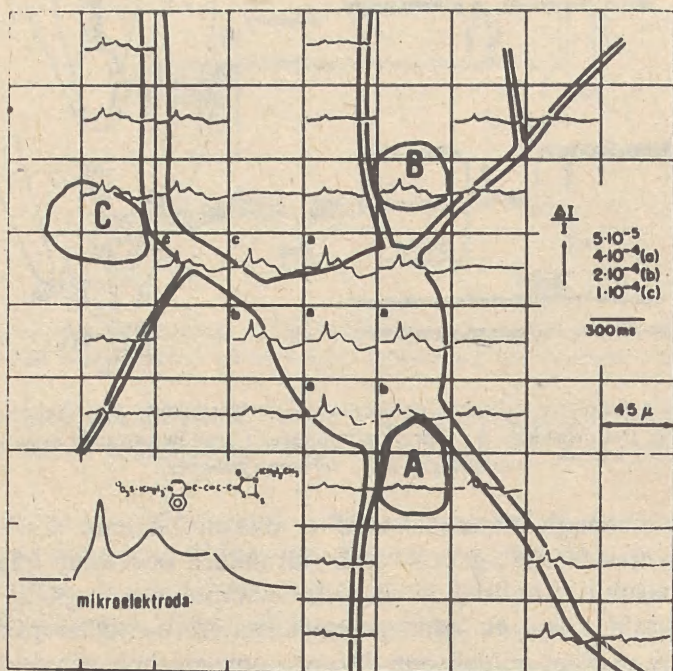


Rys. 11. Metoda pomiaru techniką "patch clamp" w warunkach gdy komórka ma kontakt z otaczającym ją środowiskiem. A — przykłady pomiaru prądów otwarcia pojedynczego kanału jonowego, B — schemat zastępczy

proces ten przebiega w środowisku o niskim stężeniu Ca^{++} , powstaje konfiguracja "inside-out", gdyż w tych warunkach oderwany fragment błony nie tworzy struktury kulistej. W kąpeli bezwapniowej fragment błony oderwanej od ciała komórki, tworząc zmniejszające się przewężenie, zamyka koniec pipety tworem półkulistym, którego powierzchnię zewnętrzną stanowi zewnętrzna powierzchnia błony komórkowej. Jest to konfiguracja zwana "outside-out". Możliwość badania receptorów kanałów jonowych od strony cytoplazmatycznej — wewnątrzkomórkowej, jak również od strony zewnątrzkomórkowej, są obecnie szeroko wykorzystywane do analizy kinetyki, przewodnictwa, selektywności, przepuszczalności i innych fizyko-chemicznych własności błon biologicznych.

Jedną z ciekawszych i, jak się powszechnie uważa, przyszłościowych metod rejestracji jest optyczne monitorowanie potencjałów błonowych (optical monitoring of membrane potentials). Optyczna, a właściwie opto-elektryczna technika rejestracji potencjałów błonowych ma, w stosunku do konwencjonalnych technik rejestracji, szereg istotnych zalet. Jest to technika bezelektrodowa, potencjały są monitorowane bezkontaktowo, nie występują więc mechaniczne uszkodzenia błony komórkowej. Technika ta może być stosowana w warunkach, w których użycie elektrod jest niemożliwe, bądź to ze względu na rozmiary obiektu, topografię błony, bądź też — dużą wrażliwość mechaniczną. Jak żadna z konwencjonalnych technik, rejestracja optyczna pozwala na równoczesne monitorowanie procesów bioelektrycznych na ciele komórki i jej wypustkach, na odległych od ciała dendrytach, co dotychczas było niemożliwe.

To równoczesne, wielopunktowe (ze 100, a nawet i więcej punktów obszaru pojedynczego komórki, Cohen 1981) monitorowanie elektrycznie czynnych obszarów komórki umożliwia badania nad mechanizmami integracji informacji na poziomie pojedynczego neuronu (Grinvald i wsp. 1981) (rys. 12).

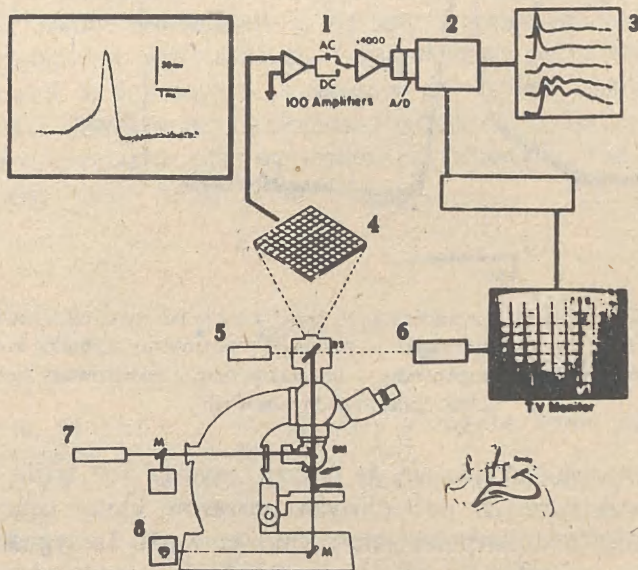


Rys. 12. Przykłady optycznego monitorowania czynnych obszarów błony pojedynczego neuronu

Metoda ta pozwala także na równoczesną rejestrację z wielu neuronów, stwarzając tym samym możliwości prowadzenia badań nad organizacją i funkcjonowaniem sieci neuronalnych na poziomie komórkowym, jak również badań nad wpływem różnych czynników na zmiany aktywności sieci neuronalnej jako całości lub wybranych jej fragmentów, np. poszczególnych złączy synaptycznych. Na zwierzętach bezkręgowych, o stosunkowo prostej organizacji układu nerwowego, metoda monitorowania optycznego pozwala na badania czynności neuronów zaangażowanych w kontroli prostych aktów behawioralnych. Inne techniki stosowane obecnie do badań aktywnych obszarów mózgu mają wiele cech ujemnych w stosunku do monitorowania optycznego. I tak np. doskonała metoda 2-deoksyglukozowa (Sokoloff 1977) ma wysoką rozdzielczość przestrzenną, jednakże jej rozdzielczość czasowa (rzędu godzin) nie pozwala na stosowanie do analizy dynamiki procesów nerwowych. Tomografia pozytonowa (Raichle 1979), dając możliwości trójwymiarowej lokalizacji aktywnych elektrycznie rejonów mózgu, ma niewystarczającą rozdzielczość do badań nad dynamiką procesów mózgowych zarówno przestrzenną, jak i czasową. Również najnowsze metody, jak tomo-

grafia infradźwiękowa i tomografia magnetyczna (Kaufman i Williamson 1982), mają te same wady. Nadzieje wiąże się więc z dalszym rozwojem technik rejestracji optycznej, gdyż zarówno rozdzielczość czasowa rzędu mikrosekund, jak i bardzo duża rozdzielczość przestrzenna rzędu 1 mikrometra oraz prostota predysponują je do szerokiego stosowania w badaniach procesów integracyjnych zachodzących w układzie nerwowym.

Monitorowanie optyczne aktywności bioelektrycznej układu nerwowego przy użyciu substancji chemicznych, których własności optyczne są zależne od zmian napięcia elektrycznego, zastosował po raz pierwszy T a s a k i i wsp. 1968 roku. Podstawy teoretyczne i techniczne szerokiego stosowania tej metody w badaniach nad tkanką nerwową opracował zespół C o h e n a w 1974 roku. Fizyko-chemiczne i techniczne podstawy optycznego monitorowania potencjałów czynnościowych są zresztą proste (rys. 13). Napięciowo czuły barwnik,

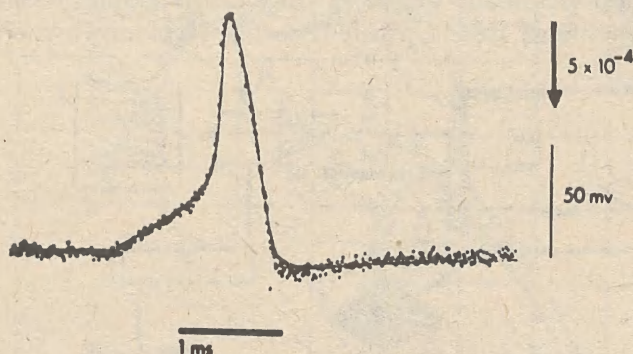


1. Wzmacniacz. 2. Komputer. 3. Monitor graficzny.
4. System diod. 5. Fotopowielacz. 6. Kamera TV.
7. Laser. 8. Lampa mikroskopowa.

Rys. 13. Stanowisko do rejestracji prądów czynnościowych metodą monitorowania optycznego wspomaganego komputerem

najczęściej nazywany napięciowo-czułym próbnikiem molekularnym (molekularny ze względu na bardzo wysoką, rzędu wielkości cząsteczki barwnika, rozdzielczość przestrzenną) jest stosowany do przyżyciowego barwienia tkanki nerwowej. Cząsteczki barwnika są wiązane na zewnętrznej powierzchni pobudliwej błony neuronu i działają jako przetworniki molekularne, które przetwarzają zmiany napięcia potencjałów błonowych na sygnały optyczne. W wyniku zmian napięcia potencjałów błonowych występują zmiany w absorpcji

lub, zależnie od typu zastosowanego próbnika molekularnego, zmiany w poziomie emitowanej fluorescencji zabarwionej tkanki ściśle skorelowane z jej aktywnością bioelektryczną. Zmiany te są monitorowane za pomocą urządzeń stosowanych do pomiarów punktowych źródeł światła. Większość obecnie stosowanych molekularnych próbników optycznych jest nietoksyczna dla tkanki nerwowej, umożliwia więc długotrwałą rejestrację, a amplituda sygnałów optycznych jest liniowo zależna od zmian potencjałów błonowych i czasu ich trwania. Liniowość ta jest zawarta w szerokich granicach napięć od -400 do $+400$ mV. Podobieństwo sygnałów zarejestrowanych optycznie i konwencjonalną, mikroelektrodową techniką wewnątrzkomórkową przedstawia rys. 14. Ponieważ obydwie te pomiary mają bardzo podobne przebiegi



Rys. 14. Porównanie potencjałów czynnościowych pojedynczego neuronu, rejestrowanych równocześnie z tego samego obiektu; linia ciągła — potencjał rejestrowany techniką konwencjonalną przy użyciu mikropipety; wykres kropkowany — ten sam potencjał rejestrowany metodą optyczną (konkretnie metodą absorbcji)

amplitudowo-czasowe, zakłada się, że sygnał optyczny jest ściśle zależny od zmian napięć elektrycznych pobudliwych obszarów błony neuronu, które występują w czasie trwania potencjału czynnościowego. Te sygnały optyczne nie mają ścisłego związku z występującymi prądami jonowymi i nie mają również związku ze wzrostem przepuszczalności błony, który występuje podczas potencjału czynnościowego.

Obecnie istnieje wiele wariantów technicznych optycznego monitorowania elektrycznych zjawisk błonowych. Adaptacja jednego z nich do własnych potrzeb zależy li tylko od inwencji autora badań. Na przykład, użycie do rejestracji sygnałów optycznych zestawu foto-detektorów ustawionych bezpośrednio w przestrzeni obrazu mikroskopowego tkanki pozwala na równoczesną rejestrację aktywności wielu neuronów. Za pomocą skomputeryzowanej analizy obrazu aktywności neuronalnej, Cohen i wsp. (1974) byli w stanie badać równocześnie aktywność ponad 100 neuronów (Grinvald i wsp. 1981). Zastosowanie większego wzmocnienia mikroskopu, bez żadnych dalszych zmian technicznych, pozwoliło na monitorowanie 100-150 aktywnych

punktów z obszaru jednego neuronu (rys. 12), zaś zmniejszenie wzmocnienia do rozdzielczości 200 mikrometrów — na wielopunktową rejestrację potencjałów zbiorczych z powierzchni kory mózgowej.

Metoda optycznej detekcji aktywności molekularnej, ze względu na niewrażliwość próbników molekularnych na działanie substancji chemicznych, zaczyna być coraz częściej stosowana w badaniach biochemicznych i neurofarmakologicznych, szczególnie tam gdzie badania prowadzone są *in vitro* na skrawkach tkanki nerwowej.

*

*

*

Celem niniejszego przeglądu było ogólne zapoznanie czytelnika z możliwościami i ograniczeniami podstawowych technik stymulacji i rejestracji aktywności bioelektrycznej, obecnie stosowanych w badaniach nad organizacją i funkcjonowaniem układu nerwowego. Należy zaznaczyć, że każda z omówionych metod oprócz wymienionych, ma jeszcze szereg innych cech ujemnych, których wystąpienie jest związane z charakterem preparatu, własnościami i parametrami technicznymi stosowanej do badań aparatury pomiarowo-kontrolnej, charakterystyką elektrod używanych do drażnienia i rejestracji. W związku z powyższym, przy wprowadzaniu metody do badań należy zawsze wykonać serię badań kontrolnych.

LITERATURA

- Asanuma H., Sasaki P. — *Noxious effect of excessive current used for intracortical microstimulation*. Brain Res. 96: 103-123, 1967.
- BeMent S. L., Ranck J. B. — *A quantitative study of electrical stimulation of central myelinated fibers*. Exp. Neurol. 24: 147-170, 1969a.
- BeMent S. L., Ranck J. B. — *A model for electrical stimulation of central myelinated fibers with monopolar electrodes*. Exp. Neurol. 24: 171-186, 1969a.
- Cohen L. B., Salzberg B. M., Dabila H. V., Ross W. N. — *Changes in axon fluorescence during activity. Molecular probes of membrane potential*. J. Membr. Biol. 19: 1-36, 1974.
- Creed A. — *Reflex activity of the spinal cord*. Oxford Press, 1932.
- Eccles J. C. — *The physiology of nerve cell*. John Hopkins Univ. Press, 1957.
- Grinvald A., Cohen L. B., Lester S., Boyle M. B. — *Simultaneous optical monitoring activity of many neurons in invertebrate ganglia, using a 124 element "photodiode array"*. J. Neurophysiol. 45: 829-840, 1981.
- Hamill O. P., Sakmann B. — *A cell-free method for recording single-channel currents from biological membranes*. J. Physiol. 312: 41-42, 1981.
- Kaufman L., Williamson S. J. — *Magnetic location of cortical activity*. Ann. NY. Acad. Sci. 388: 197-213, 1982.
- Kostiuk P. G., Krishtal O. A. — *Separation of sodium and calcium current in the somatic membrane of mollusc neurons*. J. Physiol. 270: 546-568, 1977.
- Nastuk W. L. — *Membrane potential changes at a single muscle endplate produced by transitory application of acetylcholine with an electrically controlled micro-jet*. Fed. Proc. 12: 102, 1953.

- Neher E. — *Unit conductance studies in biological membranes. Techniques in cellular physiology.* W: Baker P.F. (red.), Elsevier North-Holland, Amsterdam, 1981.
- Neher E., Sakmann B. — *Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibers.* Nature 206: 799-802, 1976.
- Raichel M. E. — *Quantitative in vivo autoradiography with positron emission tomography.* Brain Res. Rev. 1: 47-68, 1979.
- Sokoloff L. — *Relation between physiological function and energy metabolism in the control nervous system.* J. Neurochem. 29: 13-26, 1977.
- Tasaki J., Watanabe A., Sadler R., Caray L. — *Changes in fluorescence turbidity and birefringence associated with nerve excitation.* Proc. Nat. Acad. Sci. USA 61: 883-888, 1968.
- Wall P. D., McCulloch W. S., Pitts W. H. — *The terminal arborization of the cat's pyramidal tract determined by a new technique.* Yale J. Biol. Med. 28:457-464, 1956.

JOLANTA SKANGIEL-KRAMSKA

Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego
PAN, Warszawa

BUDOWA CHOLINERGICZNEGO RECEPTORA NIKOTYNOWEGO

WSTĘP

W latach osiemdziesiątych nastąpił niezwykle szybki rozwój badań nad strukturą i funkcją neuroreceptorów. Do największych sukcesów tego okresu można zaliczyć rozszyfrowanie struktury jednego z najintensywniej badanych receptorów neurotransmiterowych — cholinergicznego receptora nikotynowego (AChR). Stało się to możliwe dzięki zastosowaniu nowoczesnych, niezwykle owocnych technik badawczych, a mianowicie techniki rekombinowania i klonowania DNA. Niebagatelne znaczenie, ponadto, miało otrzymanie przeciwciał monoklonalnych do identyfikacji nie tylko specyficznych polipeptydów ale również określonych fragmentów łańcucha polipeptydowego oraz udoskonalenie metod analizy struktury krystalicznej białek. Niniejsze opracowanie poświęcono omówieniu obecnego stanu wiedzy na temat budowy cholinergicznego receptora nikotynowego. O wadze i aktualności tego zagadnienia świadczy między innymi fakt, że podczas zjazdów Międzynarodowych Towarzystw Neurochemicznych I. S. N. w roku 1985 [43] i E. S. N. w 1986 roku [3] jeden z referatów plenarnych dotyczył właśnie struktury AChR.

Już w 1907 roku Langley wysunął przypuszczenie, że za efekt działania nikotyny i kurary na mięśnie jest odpowiedzialna wyspecjalizowana substancja receptorowa [29]. AChR aktywowany jest przez acetylocholinę (ACh) i nikotynę, a blokowany kompetycyjnie przez (+) turbokurarynę i heksamethonium. Związaną ACh przez receptor powoduje zmianę przepuszczalności błony postsynaptycznej dla kationów, przede wszystkim sodowych i potasowych

Wykaz stosowanych skrótów: I. S. N. — the International Society for Neurochemistry, E. S. N. — the European Society for Neurochemistry, AChR — cholinergiczny receptor nikotynowy, ACh — acetylocholina, α -BTX — α bungarotoksyna.

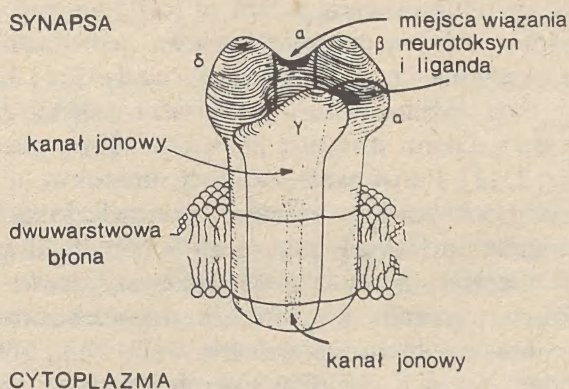
[19, 58]. W odpowiedzi na ACh kanał jonowy otwiera się w ciągu 1 msek około 20 tys. jonów Na^+ wnika do komórki. Zatem transport jest niezwykle szybki, bo rzędu 10^7 jonów na sekundę, a zatem 1000 razy szybszy od transportu nośnikowego (por. Kandel [24]).

Aktywacja AChR przez acetylocholinę wywołuje bezpośrednio zmianę potencjału postsynaptycznego, bez udziału wtórnych substancji przekaźnikowych z jakimi mamy do czynienia w przypadku działania większości receptorów neurotransmiterowych [49]. Sądzi się, że niektóre receptory neurotransmiterów o charakterze aminokwasowym działają podobnie jak AChR, tj. są kanałami jonowymi, np. receptor GABAergiczny A jest kanałem dla jonów chlorkowych.

Powstaje pytanie jakie okoliczności spowodowały tak intensywny rozwój badań właśnie nad receptorem nikotynowym. Trzeba zdać sobie sprawę, że zawartość neuroreceptorów w mózgu jest niezwykle mała i odpowiada ilości 1-100 pmoli związanego liganda na g świeżej tkanki [60], co ogranicza możliwości ich izolacji i charakterystyki. W przypadku AChR, jednakże istnieją obfite źródła pochodzenia mięśniowego, stanowią je narządy elektryczne niektórych ryb chrzęstnoszkieletowych (drętwy — *Torpedo*) i kostnoszkieletowych (węgorza elektrycznego — *Electrophorus electricus*). Na przykład narząd elektryczny *Torpedo* zawiera około 0,2 mg białka receptora na g świeżej masy. Fakt ten wykorzystano do uzyskania oczyszczonych preparatów AChR. Dodatkowe ułatwienie badań nad AChR stanowi wyodrębnienie z jadu niektórych węży toksyn: α neurotoksyny i α bungarotoksyny (α -BTX). Te krótkie polipeptydy, działają podobnie jak (+) tubokuraryna, tj. blokują działanie receptora. Wiążą się one z receptorem pseudoodwracalnie, tzn. blokowanie może trwać godziny a nawet dni. Można zatem było wykorzystywać te substancje zarówno do detekcji, jak i do oczyszczenia AChR na drodze chromatografii powinowactwa, sprzęgając np. Sepharose z α neurotoksyną i eluując następnie związany receptor roztworem zawierającym substancję agonistyczną — karchachol. Również niektóre związki zawierające czwartorzędową aminę oraz przeciwciała skierowane przeciw AChR wykorzystywano do wyodrębnienia białka receptorowego, stosując również chromatografię powinowactwa [26, 30, 17].

Jako ciekawostkę warto podać informację, że natura chemiczna AChR była przedmiotem różnych spekulacji. Jeszcze na początku lat siedemdziesiątych niektórzy badacze, między innymi De Robertis, byli zwolennikami poglądu, że AChR ma charakter proteolipidowy [por. 48]. Wysuwano też przypuszczenie, że AChR i enzym rozkładający ACh-acetylocholinoesteraza — to ta sama cząsteczka białkowa [63]. Okazało się jednak, że esteraza i receptor to dwa odrębne białka. Receptor jest bowiem integralnym składnikiem błony, acetylocholinoesteraza natomiast jest tzw. białkiem peryferycznym [26]. Co zatem było wiadomo o strukturze receptora nikotynowego na

przełomie lat 1970/1980? Stan wiedzy na ten temat omówiono w artykułach przeglądowych [26, 15], wobec czego przytoczę tylko najistotniejsze dane. AChR może występować w błonie postsynaptycznej w postaci monomeru o ciężarze około 500 000 i stałej sedymentacji 13,7 S. Częsteczka monomeru zbudowana jest z czterech rodzajów podjednostek, które określono jako α , β , γ , δ . Ciężar cząsteczkowy poszczególnych podjednostek wynosi odpowiednio 40 000, 50 000, 60 000 i 65 000. Podjednostki te różnią się składem aminokwasowym i występują w cząsteczce receptora w stosunkach 2α , β , γ , δ . Wszystkie cztery podjednostki są glikoproteinami. Sekwencja aminokwasowa N-końca poszczególnych podjednostek i porównanie ich map peptydowych świadczą, że podjednostki receptora są homologicznymi polipeptydami. Wiadomo było również, że miejsce wiązania acetylocholino znajduje się w podjednostce α . Każda z podjednostek α wiąże 1 cząsteczkę ACh. Do powstania elementarnego prądu konieczne jest związanie dwu cząsteczek ACh. Miejsce wiązania α -BTX znajduje się w podjednostce α w pobliżu miejsca wiązania ACh. Wiązanie ACh uzależnione jest od występowania mostków dwusiarczkowych w podjednostce α . Udowodniono poza tym, że receptor jest białkiem transbłonowym, ponieważ przeciwciała skierowane przeciwko AChR łączą się zarówno z zewnętrzną, jak i wewnętrzną powierzchnią błony postsynaptycznej w preparatach pęcherzyków z narządu elektrycznego. Wszystkie cztery podjednostki przenikają przez błonę, na co wskazuje ich podatność na trawienie trypsyną zarówno po zewnętrznej, jak i wewnętrznej stronie błony (rys. 1).



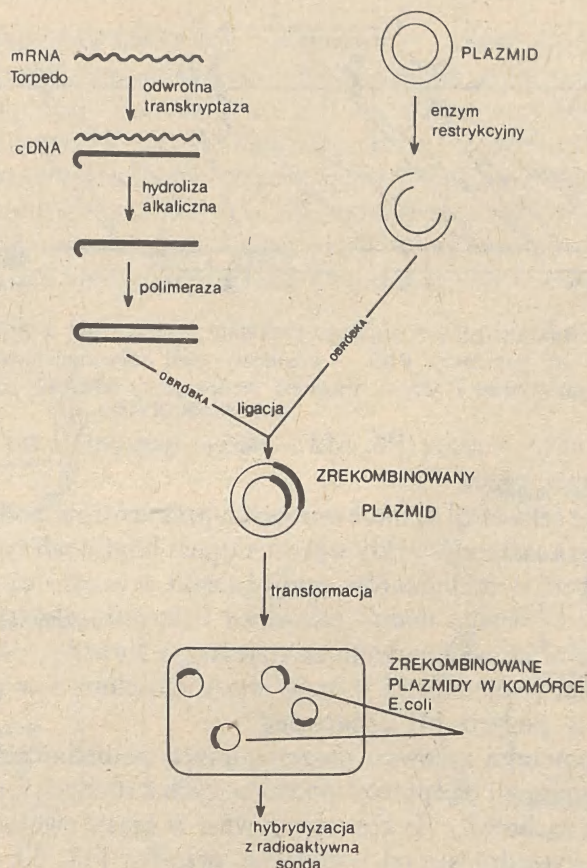
Rys. 1. Model AChR *Torpedo californica* (wg [18] zmodyfikowany)

Formy monomeryczna i dimeryczna AChR w narządach elektrycznych są funkcjonalnie równocenne [1]. Mostki dwusiarczkowe między podjednostkami δ monomerów zespalały je w dimer.

STRUKTURA PIERWSZORZĘDOWA PODJEDNOSTEK AChR
POCHODZENIA MIĘŚNIOWEGO

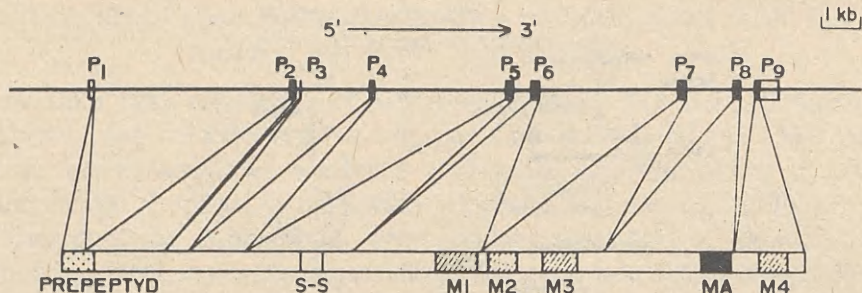
W roku 1982 niezależnie od siebie dwa zespoły: Num y z Uniwersytetu w Kyoto [40] i Barnarda z Imperial College w Londynie [54] rozszyfrowały pierwszorzędową strukturę prekursora podjednostki α z narządu elektrycznego *Torpedo* na podstawie sekwencji klonowanego cDNA.

Oto strategia zastosowana przez badaczy japońskich. Skonstruowano bibliotekę cDNA, wykorzystując poli(A)RNA z narządu elektrycznego *Torpedo californica* i używając jako wektora DNA plazmidu. Do identyfikacji klonów zawierających cDNA kodujące mRNA podjednostki α użyto syntetycznych, radioaktywnych sond molekularnych. Sondami tymi były oligodezoksyrybonukleotydy reprezentujące wszystkie możliwe sekwencje cDNA przewidziane na podstawie znanych sekwencji aminokwasowych występujących we fragmencie N-końca podjednostki α . Zastosowano dwojaki rodzaj sondy. Sekwencja pierwszej odpowiadała pentapeptydowi zbudowanemu z reszt 25-29 podjednostki α , sekwencja drugiego typu sondy odpowiadała sekwencji heksapeptydu złożonego z reszt 13-18. Następnie izolowano klony, które tworzyły hybrydy z obydwojema typami sond i określano sekwencję cDNA. Stanowiła ona podstawę do odtworzenia pierwszorzędowej struktury mRNA kodującego prekursor podjednostki α i dedukcji sekwencji aminokwasowej tego polipeptydu. Rysunek 2 przedstawia schemat postępowania użyty w celu otrzymania klonowanego cDNA dla podjednostki α AChR. Na podstawie tych badań wynioskowano, że prekursor podjednostki α AChR *Torpedo californica* zawiera 461 reszt aminokwasowych, w tym 24 reszty aminokwasowe stanowią sekwencję sygnałową. Sekwencja aminokwasowa podjednostki α AChR *Torpedo marmorata* określona przez zespół Barnarda [54] była niemal identyczna, minimalne zaś różnice można przypisać różnicom gatunkowym [4]. W podobny sposób ustalono strukturę pierwszorzędową pozostałych podjednostek AChR [42, 2; 12]. Porównanie sekwencji aminokwasowych poszczególnych podjednostek potwierdziły wcześniejszy wniosek, że są to homologiczne polipeptydy. Stwierdzono bowiem prawie 50% homologii sekwencji między podjednostkami receptora narządu elektrycznego *Torpedo californica* [41]. Analiza hydrofobowości ujawniła ponadto, że wszystkie cztery podjednostki zawierają cztery obszary hydrofobowe, M1, M2, M3, M4. Fragmenty te złożone są z ponad 20 reszt aminokwasowych i są wystarczająco długie by przeniknąć przez błonę [41, 16]. Okazało się również, że wszystkie podjednostki AChR zawierają obszar o amfipatycznej strukturze drugorzędowej, tj. występuje w nich struktura α heliks, po jednej jej stronie znajdują się grupy hydrofobowe po drugiej zaś hydrofilowe. Fragment amfipatyczny usytuowany jest między dwoma obszarami hydrofobowymi M3 i M4, i występuje w pobliżu obszaru M4 [20, 18]. O homologii podjednostek AChR świadczy również krzyżowe reagowanie z przeciwsurowicami skierowanymi przeciw każdej z podjednostek [por. 30, 4].



Rys. 2. Schemat klonowania cDNA kodującego podjednostkę α AChR *Torpedo californica* (wg procedury zastosowanej przez Nodę i wsp. [40])

Poznanie struktury pierwszorzędowej podjednostek AChR z *Torpedo* umożliwiło rozszyfrowanie pierwszorzędowej struktury podjednostki α z mięśni. W tym celu wykorzystano jako sondy molekularne cDNA z *Torpedo* do identyfikacji odpowiadającej im sekwencji w bibliotece utworzonej z mRNA mięśni krowy [38]. Uzyskano również cDNA kodujące podjednostkę α AChR mięśni myszy [8] i mięśni kurczęcia [3, 4]. Z kolei cDNA podjednostki α mięśni krowy posłużyło jako sonda hybrydyzacyjna do badania biblioteki ludzkiego, genowego DNA [38] i w konsekwencji do poznania pełnej struktury egzon/intron genu kodującego podjednostkę α . Sekwencja kodująca tę podjednostkę dzieli się na 9 egzonów i 8 intronów. Sekwencje aminokwasowe białka kodowane przez poszczególne egzony wydają się odpowiadać różnym strukturalnym i funkcjonalnym domenom prekursorowej podjednostki α (rys. 3). Większość sekwencji sygnałowej kodowana jest przez egzon P1; domniemany obszar, w którym zachodzi wiązanie ACh — przez egzon P5; segmenty



Rys. 3. Schemat struktury genu kodującego prekursor podjednostki α AChR mięśni ludzkich (wg [38]). Kb — 10^3 par zasad, P1-9 — fragmenty genu odpowiadające egzonom, M1-4 — fragmenty hydrofobowe i MA — fragment amfipatyczny łańcucha polipeptydowego

transbłonowe M1 — przez P6; M2 i M3 — przez P7, zaś M4 i C-koniec peptydu — przez egzon P9.

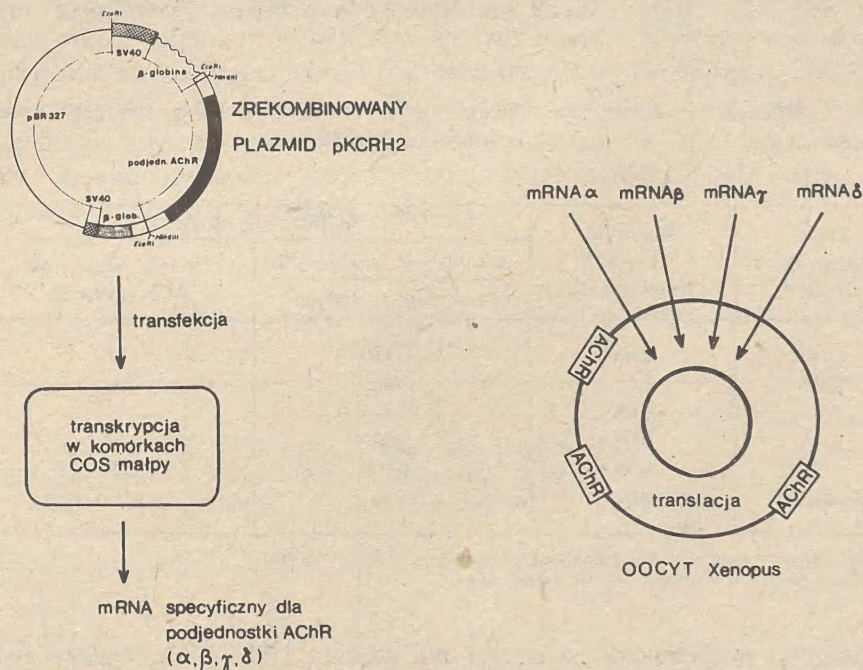
Porównanie sekwencji aminokwasowych prekursorów podjednostki α z różnych źródeł wykazało niezwykle wprost stopień homologii tych polipeptydów [38]. W przypadku prekursorów podjednostki z mięśni człowieka i krowy wynosi ona aż 97%, dla mięśni człowieka i narządu elektrycznego *Torpedo* 80%, a dla mięśni krowy i narządu elektrycznego *Torpedo* — 81%. Niezależnie od pochodzenia, podjednostki α mają reszty cysteinowe w pozycji 128, 142 i 192, a w pozycji 141 asparaginę.

Dane o homologii zarówno poszczególnych podjednostek danego receptora, jak i o homologii receptorów pochodzących z różnych źródeł świadczą, że polipeptydy te zachowały się konserwatywnie w czasie ewolucji i że wszystkie podjednostki wywodzą się od wspólnego przodka [17, 30, 41, 46].

EKSPRESJA KLONOWANYCH cDNA PODJEDNOSTEK AChR

Określenie struktury pierwszorzędowej na podstawie sekwencji cDNA stanowi jednakże dopiero jeden z początkowych etapów poznania molekularnych podstaw działania AChR, nie wiadomo bowiem czy otrzymane cDNA dla poszczególnych podjednostek AChR, które uzyskano przez rekombinację plazmidów, mogą kierować syntezą funkcjonalnego receptora. Badania zespołu Barnarda wykazały, że oocyty *Xenopus* po iniekcji nieoczyszczonego mRNA z narządu elektrycznego *Torpedo* syntetyzują receptor nikotynowy [55]. Jego obecność w błonie oocytów można wykryć przez wiązanie ^{125}I α -bungarotoksyny. Nowosyntetyzowany receptor ma identyczny skład podjednostkowy jak receptor rodzimy. Co więcej odpowiada on na podaną jontoforetycznie ACh i jego charakterystyka elektrofizjologiczna jest podobna do rejestrowanej w przypadku rodzimego receptora z *Torpedo* [6, 56]. Oocyty innych płazów mogą również stanowić dobry system translacji mRNA kodującego receptory neurotransmiterów [28]. Można było zatem wykorzys-

tać oocyty w celu sprawdzenia czy rzeczywiście określone dla poszczególnych podjednostek specyficzne sekwencje mRNA kierują syntezą funkcjonalnego AChR [35]. W tym celu izolowano mRNA, kodujące specyficzne podjednostki receptorowe, z komórek linii COS małpy, które transfekowano uprzednio zrekombinowanymi plazmidami zawierającymi cDNA poszczególnych podjednostek. Do oocytów wstrzykiwano mieszaninę tych specyficznych mRNA w stosunkach odpowiadających stechiometrii występowania danych podjednostek w rodzimym receptorze (rys. 4). Okazało się, że oocyty produkowały



Rys. 4. Ekspresja specyficznych cDNA kodujących podjednostki AChR *Torpedo californica* w oocytach żaby. Zrekombinowany plazmid pKCRH2 zawierał, oprócz obszaru z wprowadzonym cDNA kodującym podjednostkę AChR, wkładki genu β globiny królika oraz fragmenty genomu wirusa SV 40. Na mapie plazmidu zaznaczono również miejsca rozpoznawane przez enzymy restrykcyjne $E_{co}R$ I i Hind III (wg [35])

funkcjonalny receptor, który reagował na ACh tak, jak to miało miejsce w przypadku iniekcji poli(A)RNA. Nowo zsyntetyzowany receptor zawierał 4 polipeptydy, które ulegały precypitacji z przeciwsurowicami skierowanymi na AChR *Torpedo*. Polipeptydy te miały zbliżoną ruchliwość elektroforetyczną do ruchliwości podjednostek uzyskanych z oczyszczonego rodzimego AChR *Torpedo*.

Zdolność oocytów do ekspresji cDNA kodujących AChR wykorzystano do stwierdzenia w jakiej mierze poszczególne podjednostki warunkują działanie receptora. Homologie między poszczególnymi podjednostkami nasuwały przypuszczenie, że mogą się one częściowo zastępować. Wyłoniło się zatem

zagadnienie na ile pominięcie niektórych podjednostek upośledzi syntezę i funkcję receptora. Niestrudzony zespół z Kyoto rozwikłał ten problem, wstrzykując do oocytów żaby *Xenopus* mieszaninę trzech spośród czterech mRNA specyficznych dla podjednostek AChR [36]. Kontrolowano następnie, czy zachodzi synteza podjednostek identyfikując znakowane ^{35}S metioniną produkty translacji przez immunoprecypitację mieszaniną 4 przeciwciał monoklonalnych, z których każde wykazywało swoistość wobec odpowiedniej podjednostki. Okazało się, że dla powstania funkcjonalnego receptora konieczne są wszystkie cztery podjednostki (tab. 1). W przypadku pominięcia mRNA

Tabela 1

Wpływ pominięcia poszczególnych podjednostek na funkcje cholinergicznego receptora nikotynowego [wg 35]

Skład podjednostkowy AChR *	Wiązanie ^{125}I α -BTX (fmol/oocyt)	Odpowiedź na ACh	
		n oocytów reagujących	
		n oocytów badanych	średnia wrażliwość na ACh ($\text{mV}\mu\text{C}^{-1}$)**
$\alpha\beta\gamma\delta$	2,06	126/170	37
$\beta\gamma\delta$	0,01	0/82	-
$\alpha\gamma\delta$	0,06	0/82	-
$\alpha\beta\delta$	0,09	2/82	1
$\alpha\beta\gamma$	0,33	3/105	2
Kontrola	0,01	0/80	-

* Specyficzne dla poszczególnych podjednostek AChR mRNA podane do oocytu.

** Zmiana potencjału błonowego na ilość podanej ACh.

kodującego podjednostkę α oocyty nie wiązały ^{125}I α -BTX. Należy zwrócić uwagę, że brak odpowiedzi na ACh w przypadku pominięcia w układzie translacyjnym mRNA jednej z 4 podjednostek potwierdziły również badania innych autorów [61]. Jeszcze dodatkowa informacja płynie z tych doświadczeń, a mianowicie wydaje się, że brak pełnego zestawu podjednostek powoduje, że pozostałe nowosyntetyzowane podjednostki łatwiej podlegają degradacji. Obserwacje innych autorów prowadzone na hodowlach komórek mysich pochodzenia mięśniowego również wydają się wskazywać, że nowosyntetyzowane podjednostki szybko się rozpadają, jeżeli nie zespola się w kompleks receptorowy [34].

HYBRYDY AChR

Udział poszczególnych podjednostek w funkcjach receptorowych określono przez badanie właściwości hybryd utworzonych z podjednostek pochodzących z różnych źródeł. W tym celu do oocytów *Xenopus* wstrzykiwano różne

kombinacje mRNA dla podjednostek α , β , γ i δ AChR z narządu elektrycznego *Torpedo* oraz mięśni krowy [47]. mRNA syntetyzowano *in vitro*, używając jako matrycy cDNA specyficznego dla poszczególnych podjednostek. Badano następnie właściwości elektrofizjologiczne powstałych hybryd AChR (tab. 2). Stwierdzono, że zastąpienie podjednostki δ w receptorze z *Torpedo* przez podjednostkę δ z mięśni krowy powoduje wyraźną zmianę charakterystyki elektrofizjologicznej AChR. Wzrasta bowiem aktywność kanału jonowego i czas przepływu prądu, upodabniając się do wartości rejestrowanych dla kanału receptora mięśniowego. Podstawienie podjednostki α *Torpedo* przez podjednostkę α mięśni zmieniało również czas trwania elementarnego prądu, aczkolwiek w mniejszym stopniu i w sposób niezależny od napięcia. Substytucje nie zmieniały natomiast przewodności kanału. W związku z czym wydaje się, że podjednostka δ określa właściwości związane z etapem zamknięcia kanału jonowego, podjednostka α natomiast może regulować inne etapy, takie jak otwarcie kanału i dysocjację agonisty.

Tabela 2

Niektóre właściwości AChR z narządu elektrycznego *Torpedo* (T) i AChR z mięśni krowy (K) oraz hybryd [wg 47]

Skład podjednostkowych AChR*	Wiązanie ^{125}I α -BTX** (fmol/oocyt)	Prąd całej komórki aktywność kanału receptora (nA)	Prąd pojedynczego kanału	
			przewodność (pS)	średni czas trwania (ms)
$\alpha_T, \beta_T, \gamma_T, \delta_T$	7,6	23	42	0.6
$\alpha_K, \beta_K, \gamma_K, \delta_K$	7,9	1600	40	7.6
$\alpha_K, \beta_T, \gamma_T, \delta_T$	10,4	80	42	2.5
$\alpha_T, \beta_T, \gamma_T, \delta_K$	5,4	1400	35	8.6

* Specyficzne dla poszczególnych podjednostek AChR mRNA podane do oocytu.

** Wiązanie ^{125}I α -BTX przez powierzchnię oocytu.

Podobne doświadczenia z hybrydami, powstałymi z kombinacji podjednostek AChR *Torpedo* i podjednostek AChR mięśni myszy, wskazywały na zwiększenie odpowiedzi na ACh w mieszańcach, w których δ_T zastąpiono δ_M w porównaniu z receptorem *Torpedo* [61]. Natomiast hybryda, w której podjednostkę γ *Torpedo* zastąpiono przez podjednostkę δ myszy ($\alpha_T, \beta_T, \gamma_T, \delta_M$), nie była zdolna do reagowania na ACh.

Nowe możliwości badania wpływu struktury pierwszorzędowej podjednostek na funkcję receptora dostarczają receptory z mięśni zarodkowych i mięśni dojrzałych. Od dawna już wiadomo, że mają one różną charakterystykę elektrofizjologiczną i są odmiennie rozmieszczone w błonie powierzchniowej. Wynika to prawdopodobnie z różnic w składzie obu receptorów. Wykryto

bowiem, badając bibliotekę cDNA mięśni krowy, sekwencję, która potencjalnie może kierować syntezą jeszcze jednej podjednostki. Tę podjednostkę określono jako ε [57]. Różni się ona składem aminokwasowym od pozostałych "klasycznych" podjednostek i wykazuje największy stopień homologii z podjednostką γ . Co więcej, podjednostka ε może zastępować podjednostkę γ w hybrydach utworzonych z podjednostek α , β , δ *Torpedo* i ε mięśni krowy. Dalsze badania wykazały, że mRNA dla podjednostki γ przeważa w mięśniach zarodkowych. Zawartość mRNA kodującego podjednostkę ε wzrasta w czasie rozwoju, co sugeruje, że w miarę dojrzewania podjednostka ta zastępuje podjednostkę γ i w związku z tym zmieniają się właściwości elektrofizjologiczne kanału receptorowego [37]. Oocyty *Xenopus* po iniekcji mieszaniny mRNA kodujących poszczególne podjednostki, tj. α , β , γ , δ i ε , wytwarzają dwie klasy receptorów, jedną o składzie 2α , β , γ , δ i drugą — 2α , β , ε , δ . W doświadczeniach tych mRNA specyficzne dla poszczególnych podjednostek AChR

Tabela 3

Właściwości pojedynczego kanału jonowego dwóch form AChR mięśni wołu [wg 37]

Układ ekspresji	Przewodność (pS)	Średni czas depolaryzacji	
		r (ms)	H (mV)
Oocyt z AChR γ	39	10,4	106
Oocyt z AChR ε	59	5,3	83
Mięśnie zarodkowe	40	11,0	108
Mięśnie dojrzałe	59	5,6	93

r — Czas trwania elementarnego prądu przy napięciu błony 100 mV.

H — Zmiana potencjału błonowego, która powoduje e-krotną zmianę trwania prądu.

syntetyzowano *in vitro* na matrycach specyficznych cDNA. Zestawienie właściwości kanału AChR z mięśni zarodkowych i kanału receptora z mięśni dojrzałych z właściwościami zsyntetyzowanych przez oocyty ich odpowiedników wyraźnie wykazują, że za zmianę charakterystyki receptora odpowiedzialne jest zastąpienie podjednostki γ przez podjednostkę ε (tab. 3). Co jeszcze sugeruje to porównanie? Otóż okazuje się, że receptory zsyntetyzowane przez oocyty do złudzenia przypominają receptory rodzime, można zatem przypuszczać, że skład błony nie jest w przypadku AChR krytyczny dla jego funkcjonalnych właściwości [por. 13].

NEURONALNY RECEPTOR NIKOTYNOWY

W przeciwieństwie do AChR pochodzenia mięśniowego receptor nikotynowy neuronalny nie wiąże lub wiąże słabo α -BTX. Wyjątek stanowi m.in. płąt wzrokowy kurcząt [por. 23]. Jednakże badania immunologiczne z za-

stosowaniem przeciwciał monoklonalnych wyraźnie wskazują, że receptor neuronalny reaguje krzyżowo z przeciwciałami uzyskanymi przeciwko receptorowi mięśniowemu [4, 5, 32, 33]. Brak zdolności do wiązania α -BTX znacznie utrudnia badania nad receptorem neuronalnym. Podjęto zatem próby wyizolowania podjednostek receptora, wykorzystując ich zdolność do reagowania z przeciwciałami skierowanymi przeciw podjednostkom pochodzenia mięśniowego. Okazało się, że AChR mózgu kurczęcia ma znaczny stopień homologii aminokwasowej z receptorem mięśniowym, jednakże jest to odmienne białko [14]. Ostatnio zastosowano z sukcesem technikę klonowania cDNA, która umożliwiła badania nad podjednostką α pochodzenia neuronalnego [7, 23]. Wykazano, że cDNA neuronalnej podjednostki α jest związany z innym genem niż ten, który koduje podjednostkę α mięśni. Ekspresja obu tych genów zachodzi niezależnie. Różnice zatem w strukturze pierwszorzędowej między obydwiema podjednostkami α winny uwidocznić, które z sekwencji warunkują zdolność do wiązania α -BTX. Porównanie składu aminokwasowego wskazuje, że homologia sekwencji wynosi około 50%. Neuronalna podjednostka α , podobnie jak jej odpowiedniki z innych źródeł, zawiera w pozycji 192 i 193 cysteinę, a więc reszty zaangażowane w wiązaniu agonisty, jednakże pewne różnice występują we fragmentach obejmujących sekwencje 125-142 i 185-196. Wydaje się jednak, że neuronalny AChR kryje w sobie jeszcze wiele tajemnic. Okazuje się na podstawie badań autoradiograficznych, że występują dwie populacje miejsc receptorowych. Jedne miejsca wiążą ^3H ACh i ^3H nikotynę, inne zaś znakowaną α -BTX [11]. Istnieją również przesłanki, że do ekspresji receptorowego kanału jonowego dla Na^+ przez oocyty wystarcza jedynie mRNA kodujący neuronalną podjednostkę α [22]. Czyżby zatem neuronalny AChR zbudowany był według innego wzorca?

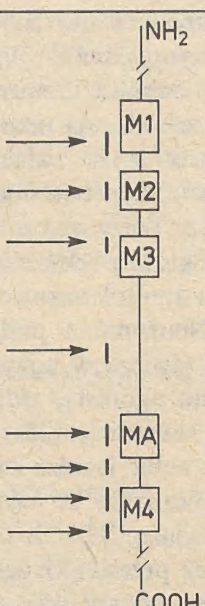
MODYFIKACJE W OBRĘBIE PODJEDNOSTKI α AChR

Konsekwencją poznania struktury komplementarnych DNA kodujących poszczególne podjednostki AChR i uzyskania funkcjonalnego receptora w układzie ekspresji, jaki stanowią oocyty *Xenopus*, były próby ustalenia, które fragmenty łańcucha polipeptydowego podjednostki α warunkują działanie receptora [36, 51]. W tym celu posłużono się zarówno delecjami różnych loci DNA kodującego podjednostkę, jak i ukierunkowaną mutagenezą [por. 50].

W tabeli 4 zestawiono wpływ niektórych wewnętrznych delecji cDNA powodujących pominięcie niektórych fragmentów C-końca łańcucha polipeptydowego podjednostki α na właściwości AChR. Delecje fragmentów kodujących obszary o charakterze hydrofobowym oraz niektóre delecje w obrębie fragmentu amfipatycznego powodują zanik funkcji receptorowych. Utworzone AChR nie dają bowiem odpowiedzi na ACh. W przypadku delecji przypadających we fragmencie hydrofobowym M1 obserwuje się dodatkowo upośledzenie zdolności do wiązania α -BTX.

Tabela 4

Wpływ niektórych delekcji w podjednostce α na właściwości receptora nikotynowego *Torpedo californica* [wg 36]

Obszar delekcji	Wiązanie $^{125}\text{I}-\alpha\text{BTX}$ %	Powinowactwo do agonisty	Wrażliwość na ACh %
	0,5	nie badano	nie wykryto
	17	bez zmian	nie wykryto
	8	bez zmian	nie wykryto
	71	bez zmian	55
	36	bez zmian	nie wykryto
	40	bez zmian	nie wykryto
	23	bez zmian	nie wykryto
	80	bez zmian	15

100% — wartość badanego parametru dla AChR typu dzikiego.

Właściwości receptora ulegają również dramatycznym zmianom w wyniku zastosowania mutacji punktowych (tab. 5). Obserwuje się bowiem zróżnicowany wpływ zastąpienia cysteiny przez serynę w zależności od pozycji w łańcuchu. Na przykład zastąpienie cysteiny przez serynę w pozycji 192 powoduje zanik zdolności AChR do odpowiedzi na ACh. Podobnie jest w przypadku mutantu, w którym cysteinę w pozycji 193 zastąpiono seryną. W obydwu mutantach wyraźnie zmniejszyło się powinowactwo do substancji agonistycznej, aczkolwiek ich zdolność do wiązania $^{125}\text{I}\alpha\text{-BTX}$ jest obniżona tylko w niewielkim stopniu w porównaniu z receptorem typu dzikiego. Mutanty z zamienioną na serynę cysteiną w pozycji 128 lub w pozycji 142 mają bardzo zmniejszoną zdolność do wiązania $^{125}\text{I}\alpha\text{-BTX}$ lub wcale jej nie mają. Zastąpienie cysteiny przez serynę w pozycji 222 nie wpływa natomiast na właściwości receptora. Zamiana asparaginy w pozycji 141, potencjalnego miejsca wiązania N-glikozydowego, na kwas asparaginowy powodowała spadek zdolności do wiązania $^{125}\text{I}\alpha\text{-BTX}$ oraz zanik wrażliwości na ACh. Dodatkowo obserwowano, że w przypadku iniekcji mRNA z tą właśnie mutacją wraz z mRNA specyficznymi dla podjednostek β , γ i δ typu dzikiego

wyraźnie była zmniejszona zawartość podjednostki δ w oocytach. Wynik ten sugeruje, że upośledzenie N-glikozylacji podjednostki α może wpływać na zdolność podjednostki δ do zespalania się w kompleks receptorowy. Na udział N-glikozylacji podjednostki α w procesie tworzenia się kompleksu AChR wskazują również badania nad syntezą AChR w mysich komórkach linii BC3-H1 pochodzenia mięśniowego [34].

Tabela 5

Wpływ mutacji punktowych w podjednostce α na właściwości receptora nikotynowego *Torpedo californica* [wg 36]

Pozycja mutacji	Zastąpienie	Wiązanie ^{125}I -BTX %	Powinowactwo do agonisty	Odpowiedź na ACh %
128 NH ₂ C	Cys → Ser	0,08	nie badano	nie wykryto
141 142 =NC	Aspn → Asp Cys → Ser	0,09 nie wykryto	nie badano nie badano	nie wykryto nie wykryto
192 193 =CC	Cys → Ser Cys → Ser	39 28	obniżone obniżone	nie wykryto nie wykryto
222 C	Cys → Ser	79	bez zmian	107

100% — wartość badanego parametru dla AChR typu dzikiego.

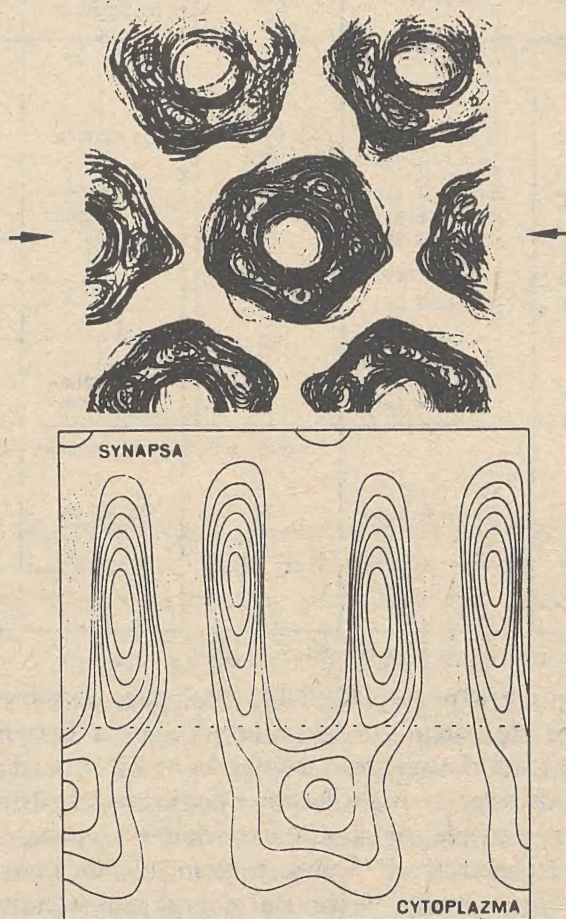
Reszty cysteinowe w pozycji 128 i 142 występują we wszystkich 4 podjednostkach, wydaje się zatem, że ich rola polega na utrzymaniu właściwej konformacji pozakomórkowej części cząsteczki AChR. Prawdopodobnie reszty te tworzą mostki dwusiarczkowe w każdej z podjednostek. Również asparagina w pozycji 141 zachowuje się konserwatywnie i występuje we wszystkich podjednostkach receptorowych. Sądzić więc można, że utrata funkcji receptorowych przez te mutanty wiąże się z brakiem właściwej konformacji podjednostki α . Reszty cysteinowe w pozycji 192 i 193 występują jedynie w podjednostce α . Wydaje się zatem, że właśnie one biorą udział bezpośredni w specyficznym wiązaniu agonisty. Z badań zespołu Karlina [25], w których jako znacznika miejsc wiązania ACh użyto soli ^3H 4-(N-maleinimido)benzyltrimetyloamoniowej (MBTA), wynika, że reszty cysteinowe w pozycji

192 i 193 znajdują się w pobliżu miejsca wiązania ACh, natomiast cysteina 128 i 142 nie ulega alkilacji.

Opracowanie metody syntezy podjednostki α AChR przez transformowanie plazmidem drożdży, umożliwi otrzymanie dużych ilości tego peptydu, co niewątpliwie przyczyni się do dalszego pogłębienia naszej wiedzy o niej [21].

PORTRET AChR

Udoskonalenie metod analizy krystalograficznej umożliwiło uzyskanie obrazów AChR z mikroskopu elektronowego oraz ich trójwymiarowych

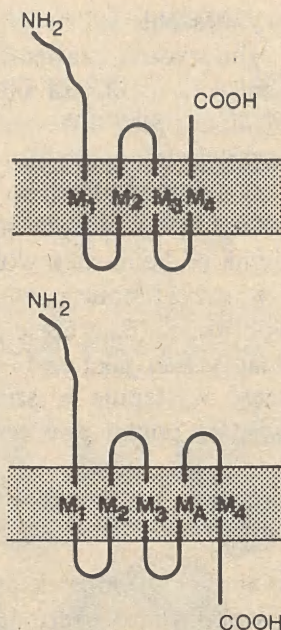


Rys. 5. Czwartorzędowa budowa AChR. U góry — trójwymiarowa rekonstrukcja obrazów z mikroskopu elektronowego widzianych od strony szczeliny synaptycznej. U dołu — mapa ułożenia cząsteczek receptora w błonie w płaszczyźnie prostopadłej do powierzchni błony odpowiadającej linii zaznaczonej strzałkami na rysunku górnym. Przedrukowano za zezwoleniem z Nature 315, 474-427, Copyright 1985 Macmillan Journal Limited

rekonstrukcji [9]. Daje to wyobrażenie o czwartorzędowej strukturze receptora (rys. 5). Receptor jest cylindryczną cząsteczką o prawie stałej średnicy wynoszącej około 85 Å. Średnica ta zmniejsza się w części eksponowanej po stronie cytoplazmatycznej. Cylinder jest utworzony przez 5 pałeczkowatych podjednostek ukierunkowanych prostopadle do powierzchni błony. Każda z podjednostek ma długość około 140 Å. Przekroje poprzeczne uwiadcniają, że podjednostki mają zbliżoną średnicę i ułożone są regularnie wokół centralnego pora. Regularność ułożenia podjednostek wokół centralnej osi implikuje, że struktura receptora ma w przybliżeniu pentagonalną symetrię. Badania biofizyczne dają również wyobrażenie, jaka część cząsteczki receptora umiejscowiona jest w błonie postsynaptycznej, jaka część eksponowana jest po stronie cytoplazmatycznej i jaka część występuje w szczelinie. Wynika z nich, że fragment o długości 55 Å wystaje ponad powierzchnię błony [27].

BUDOWA KANAŁU AChR

Duża homologia strukturalna podjednostek receptorowych oraz ich pentagonalna symetria ułożenia wokół pora sugerują, że łańcuchy polipeptydowe wszystkich podjednostek ułożone są podobnie w dwuwarstwie błony lipidowej. Opierając się na powyższych spostrzeżeniach zaproponowano alternatywne modele budowy kanału jonowego receptora nikotynowego [por. 52]. Pierwszy z nich zakładał, że jeden z fragmentów hydrofobowych, które mają strukturę α heliks i które penetrują przez błonę, zawiera pewną liczbę grup OH^- eksponowanych po jednej stronie α heliksu. Kanał jonowy zatem wysłany byłby grupami OH^- , co zapewniałoby wystarczającą hydrofilność wnętrza kanału aby woda i kationy mogły wnikać przez kanały [44, 45, 10, 11, por. 52]. Drugi model uwzględniał udział fragmentu amfipatycznego każdej z podjednostek w tworzeniu ścian kanału [18, 20]. Fragment ten o strukturze α heliks ma jedną powierzchnię naładowaną, natomiast powierzchnie boczne i tylna są hydrofobowe. Powierzchnia amfipatycznych obszarów każdej z 5 podjednostek z eksponowanymi naprzemiennie ładunkami zarówno dodatnimi, jak i ujemnymi wyścielałaby kanał. Pierwszy model zakładał zatem, że łańcuch polipeptydowy każdej z podjednostek przenika przez błonę czterokrotnie, według drugiego polipeptyd każdej z podjednostek przenika przez błonę nieparzystą liczbę razy, tj. pięciokrotnie, gdyż fragment amfipatyczny również przenikałby błonę. Wiadomo, że fragmenty zawierające N-końce podjednostek wystają ponad powierzchnię błony. W przypadku założenia prawidłowości modelu pierwszego, końcowa grupa karboksylowa polipeptydu winna znajdować się po tej stronie co końcowa grupa aminowa, tj. na zewnątrz komórki. W drugim wariacie grupa karboksylowa winna znajdować się we wnętrzu komórki (rys. 6). Słuszność koncepcji zakładającej udział fragmentu amfipatycznego w tworzeniu ścian wyścielających kanał jonowy potwierdzono używając przeciwciał skierowanych przeciw fragmentowi polipeptydu zawierają-



Rys. 6. Modele ułożenia podjednostki AChR wydedukowane na podstawie analizy sekwencji aminokwasowych i przewidywanej struktury drugorzędowej

cemu C-koniec [31, 62]. Doświadczenie wykonano na pęcherzykach uzyskanych z narządu elektrycznego *Torpedo*. Powierzchnia zewnętrzna tych pęcherzyków odpowiada zewnętrznej powierzchni błony. Okazało się, że przeciwciała skierowane na fragment zawierający C-koniec wiążą się z pęcherzykami dopiero po potraktowaniu ich detergentem (saponiną), który dziurawi błonę pęcherzyków, umożliwiając wnikięcie przeciwciał do wnętrza. Użycie przeciwciał monoklonalnych skierowanych na fragment polipeptydu, który leży między fragmentami M3 i MA w podjednostce β , wykazuje, że ten odcinek łańcucha znajduje się wewnątrz błony, co świadczy o tym, że między tym obszarem i C-końcem łańcuch przenika błonę parzystą liczbę razy. Przemawia to dodatkowo za koncepcją o udziale fragmentu amfipatycznego w budowie ścian kanału, gdyż wskazuje na występowania końcowej grupy karboksylowej we wnętrzu komórki.

UWAGI KOŃCOWE

Naszuwa się pytanie, jakie znaczenie ma poznanie struktury jednego określonego typu receptora. Co wnoszą tego typu badania do ogólnej wiedzy o neuroreceptorach?

Przed wszystkim badania te przetrwały drogę do badania struktury funkcjonalnej tych neuroreceptorów, które jednocześnie stanowią kanał jonowy.

Metodyka zastosowana do rozszyfrowania struktury AChR została użyta z powodzeniem do badań struktury receptora GABA_A [3, 4], jak również budowy napięciowo zależnego kanału jonowego dla Na⁺ [39]. Ponadto badania nad AChR stały się zaczynem do wysunięcia ogólnych koncepcji dotyczących budowy kanałów jonowych. Unwin zastanawia się na łamach *Nature* [59], czy istnieje wspólny wzorzec dla struktury kanałów błon komórkowych, które uczestniczą w przekazywaniu elektrycznych sygnałów. Jego odpowiedź brzmi — tak. Porównanie bowiem budowy różnych kanałów wskazuje na szereg podobieństw strukturalnych. Do najbardziej wyraźnych należy podobieństwo profili hydrofobowości sekwencji aminokwasowych, przynajmniej jeśli rozważać podjednostkę α AChR, polipeptyd zależnego od napięcia kanału Na⁺ oraz podjednostkę kanału złącza szczelinowego. Każdy z tych kanałów charakteryzuje się ponadto pewną symetrią. W przypadku kanału złącza szczelinowego, jest on utworzony z 6 identycznych podjednostek. Napięciowo zależny kanał Na⁺ zawiera cztery podobne domeny peptydowe. Receptor nikotynowy jest zbudowany z homologicznych podjednostek. Unwin uważa zatem, że symetria strukturalna determinuje funkcję.

Na rolę symetrii strukturalnej w pełnieniu przez białko funkcji kanału dla jonów wskazują również badania hybryd receptora nikotynowego. Skłoniły one Stevensa [53] do zwrócenia uwagi na rolę symetrii w budowie AChR i kanałów jonowych. Podobnie jak Unwin, sugeruje on, że symetria struktury może być właściwością wspólną dla rodziny kanałów jonowych. Specyficzność kanału mogą determinować niesymetryczne części struktur. W biologii znane są przykłady, że kształt cząsteczki może warunkować jej funkcję. Otóż lizozym bakteriofaga i lizozym jaja kurzego mają odmienny skład aminokwasowy, jednakże kształt obu cząsteczek jest podobny i funkcje również.

Przedstawiony w niniejszym artykule obraz receptora nikotynowego ukazuje receptor jako strukturę statyczną. Poznanie dynamicznych aspektów działania AChR jest jeszcze dalekie od pełnego sukcesu.

LITERATURA

1. Anholt R., Lindstrom J., Montal M. — *Functional equivalence of monomeric and dimeric forms of purified acetylcholine receptors from *Torpedo californica* in reconstituted lipid vesicles.* Eur. J. Biochem. 109: 481-487, 1980.
2. Ballivet M., Patrick J., Lee J., Heinemann S. — *Molecular cloning of cDNA coding for the γ subunit of *Torpedo* acetylcholine receptor.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79: 4466-4470, 1982.
3. Barnard E. A. — *Clones genes for receptors and their interpretation.* W: *Molecular basis of neuronal function.* S. Tuček, S. Stipek, F. Stastný, J. Křivánek (red.), Abstracts of the Sixth ESN General Meeting in Prague, str. 8, 1986.
4. Barnard E. A., Beeson D., Bilbe G., Brown D. A., Constanti A., Conti-Tronconi B. M., Dolly J. O., Donn S. M. J., Mehraban F., Richards B. M., Smart T. G. — *Acetylcholine and GABA receptors: subunits of central and peripheral*

- receptors and their encoding nucleic acids. W: 48th Cold Spring Harbor Symposium: Molecular Neurobiology, CSH Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, str. 109-124, 1983.
5. Barnard E. A., Dolly J. O. — *Peripheral and central nicotinic ACh receptors-how similar are they.* Trends Neurosci. 5: 325-327, 1982.
 6. Barnard E. A., Miledi R., Sumikawa K. — *Translation of exogenous messenger RNA coding for nicotinic acetylcholine receptor produces functional receptors in Xenopus oocytes.* Proc. R. Soc. Lond B, 215: 241-246, 1982.
 7. Boulter J., Evans K., Goldman D., Martin D., Treco D., Heinemann S., Patrick J. — *Isolation of a cDNA clone coding for a possible neural nicotinic acetylcholine α subunit.* Nature 319: 368-374, 1986.
 8. Boulter J., Luylen W., Evans K., Mason P., Ballivet M., Goldman D., Stengelin S., Martin G., Heinemann S., Patrick J. — *Isolation of a clone coding for the α subunit of a mouse acetylcholine receptor.* J. Neurosci. 5: 2545-2552, 1985.
 9. Brisson A., Unwin P. N. T. — *Quaternary structure of the acetylcholine receptor.* Nature 315: 474-477, 1985.
 10. Changeux J.-P., Bon F., Cartaud J., Devillers-Thiery A., Giraudat J., Heidmann T., Holton B., Nghi  m H.-O., Popot J.-L., Van Rapenbusch R., Tzartos S. — *Allosteric properties of the acetylcholine receptor protein from Torpedo marmorata.* W: 48th Cold Spring Harbor Symposium: Molecular Neurobiology. CSH Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, str. 35-52, 1983.
 11. Clarke P. B. S., Schwartz R. D., Paul S. M., Pert C. B. — *Nicotinic binding in rat brain: autoradiographic comparison of [3 H] acetylcholine, [3 H] nicotine and [125 I] α bungarotoxin.* J. Neurosci. 5: 1307-1315, 1985.
 12. Claudio T., Ballivet M., Patrick J., Heinemann S. — *Nucleotide and deduced amino acid sequences of Torpedo californica acetylcholine receptor γ subunit.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80: 1111-1115, 1983.
 13. Colquhoun D. — *Structure and function of acetylcholine-receptor ion channels.* Nature 321: 382-383, 1986.
 14. Conti-Tronconi B. M., Dunn S. M. J., Barnard E. A., Dolly J. O., Lay F. A., Ray N., Raftery M. A. — *Brain and muscle nicotinic acetylcholine receptors are different but homologous protein.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 5208-5212, 1985.
 15. Conti-Tronconi B. M., Raftery M. A. — *The nicotinic cholinergic receptor: Correlation of molecular structure with functional properties.* Ann. Rev. Biochem. 51: 491-530, 1982.
 16. Devillers-Thiery A., Giraudat J., Bentaboulet M., Changeux J.-P. — *Complete mRNA coding sequence of the acetylcholine binding α -subunit of Torpedo marmorata acetylcholine receptor: a model for the transmembrane organization of the polypeptide chain.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:2067-2071, 1983.
 17. Dolly J. O., Barnard E. A. — *Nicotinic acetylcholine receptors an overview.* Biochem. Pharmacol. 33: 841-858, 1984.
 18. Fairclough R. H., Finer-Moore J., Love R. A., Kristofferson D., Desmeules P. J., Stroud R. M. — *Subunit organization and structure of an acetylcholine receptor.* W: 48th Cold Spring Harbor Symposium: Molecular Neurobiology. ASH Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, str. 9-20, 1983.
 19. Fatt P., Katz B. — *An analysis of the endplate potential recorded with an intracellular electrode.* J. Physiol. (London) 115: 320-370, 1951.
 20. Finer-Moore J., Stroud R. M. — *Amphipatic analysis and possible formation of the ion channel in an acetylcholine receptor.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81: 155-159, 1984.
 21. Fujita N., Nelson N., Fox T. D., Claudio T., Lindstrom J., Riezman H., Hess G. P. — *Biosynthesis of the Torpedo californica acetylcholine receptor α subunit in yeast.* Science 231: 1284-1287, 1986.
 22. Goldin A. L., Snutch T., L  bbert H., Dowsett A., Marschall J., Auld V., Douney W., Fritz L. C., Lester H. A., Dunn R., Catterall W. A., Davidson N.

- Messenger RNA coding for only the α subunit of the rat brain Na channel is sufficient for expression of functional channels in *Xenopus* oocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83: 7503-7507, 1986.
23. Hall Z. W. — A neuronal acetylcholine receptor subunit cloned. *Trends Neurosci.* 9: 138-139, 1986.
24. Kandel E. R. — *Neurobiology and molecular biology: the second encounter*. W: 48th Cold Spring Harbor Symposium: *Molecular Neurobiology*. CSH Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, str. 891-908, 1983.
25. Kao P. N., Dwork A. J., Kaldany R.-R. J., Silver M. L., Wideman J., Stein S., Kawlin A. — Identification of the α subunit half-cystine specifically label by affinity reagent for the acetylcholine receptor binding site. *J. Biol. Chem.* 259: 1162-1165, 1984.
26. Karlin A. — *Molecular properties of nicotinic acetylcholine receptors*. W: *The cell surface and neuronal function*. C. W. Cotman, G. Poste, G. L. Nicolson (red.), str. 191-260, 1980.
27. Kistler J., Stround R., Klymkowsky M., Lalancette R., Fairclough R. — Structure and function of an acetylcholine receptor. *Biophys. J.* 37: 371-383, 1982.
28. Kobayashi S., Iio H., Aoshima H. — New translation system of mRNA coding for neurotransmitter receptors using oocytes of the newt, *Cynops pyrrhogaster*. *Mol. Brain Res.* 1: 93-96, 1986.
29. Langley J. N. — On the contraction of muscle chiefly in relation to the presence of receptive substances. Part 1. *J. Physiol. (London)* 36: 347-384, 1907.
30. Lindstrom J. — *Techniques for studying the biochemistry and cell biology of receptors*. W: *Neurotransmitter receptor binding*. H. J. Yamamura, S. J. Enna, M. J. Kuhar (red.), str. 123-152, Raven Press, New York, 1985.
31. Lindstrom J., Criado M., Hochschwender S., Fox J. L., Sarin V. — Immunological tests of acetylcholine receptor subunit models. *Nature* 311: 573-575, 1984.
32. Lindstrom J., Tzartos S., Gullick W., Hochschwender S., Swanson L., Sargent P., Jacob M., Montal M. — Use of monoclonal antibodies to study acetylcholine receptors from electric organs, muscle, and brain and the autoimmune response to receptor in myasthenia gravis. W: 48th Cold Spring Harbor Symposium, *Molecular Neurobiology*. CSH Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, str. 89-99, 1983.
33. Lukas R. J. — Interactions of anti-nicotinic acetylcholine receptor antibodies at α -bungarotoxin binding sites across species tissues. *Mol. Brain Res.* 1: 119-125, 1986.
34. Merlie J. P., Sebbane R., Gardner S., Olson E., Lindstrom J. — The regulation of acetylcholine receptor expression in mammalian muscle. W: 48th Cold Spring Harbor Symposium: *Molecular Neurobiology*. CSH Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, str. 135-146, 1983.
35. Mashima M., Kurosaki T., Tobimatsu T., Morimoto Y., Noda M., Yamamoto T., Terao M., Lindstrom J., Takahashi T., Kuno M., Numa S. — Expression of functional acetylcholine receptor from cloned cDNAs. *Nature* 307: 604-608, 1984.
36. Mishina M., Tabimatsu T., Imoto K., Tanaka K., Fujita Y., Fukuda K., Kurosaki M., Takahashi H., Morimoto Y., Hirose T., Inayama S., Takahashi T., Kuno M., Numa S. — Localization of functional regions of acetylcholine receptor α subunit by site-directed mutagenesis. *Nature* 313: 364-369, 1985.
37. Mishina M., Takai T., Imoto K., Noda M., Takahashi T., Numa S., Methfessel C., Sakmann B. — Molecular distinction between fetal and adult forms of muscle acetylcholine receptor. *Nature* 321: 406-411, 1986.
38. Noda M., Furutani Y., Takahashi H., Toyosato M., Tanabe T., Shimizu S., Kikyotani S., Kayano T., Hirose T., Inayama S., Numa S. — Cloning and sequence analysis of calf cDNA and human genomic DNA encoding α subunit precursor of muscle acetylcholine receptor. *Nature* 305: 818-823, 1983.
39. Noda M., Shimizu S., Tanabe T., Takai F., Kayano F., Ikeda T., Takahashi H., Nakayama H., Minamino N., Kangawa K., Matsuo H., Raftery M. A.,

- Hirose T., Inayama S., Hayashido H., Miyato T., Numa S. — *Primary structure of electrophorus electricus sodium channel deduced from cDNA sequence*. *Nature* 312: 121-127, 1984.
40. Noda M., Takahashi H., Tanabe T., Toyosato M., Furutani Y., Hirose T., Asai M., Inayama S., Miyata T., Numa S. — *Primary structure of α subunit precursor of *Torpedo californica* acetylcholine receptor deduced from cDNA sequence*. *Nature* 299: 793-797, 1982.
 41. Noda M., Takahashi H., Tanabe T., Toyosato M., Kikyotani S., Furutani Y., Hirose T., Takashima H., Inayama S., Miyata T., Numa S. — *Structural homology of *Torpedo californica* acetylcholine receptor subunits*. *Nature* 302: 528-532, 1983.
 42. Noda M., Takahashi H., Tanabe T., Toyosato M., Kikyotani S., Hirose T., Asai M., Takashima H., Inayama S., Miyato T., Numa S. — *Primary structures of β and δ subunit precursors of *Torpedo californica* acetylcholine receptor deduced from cDNA sequence*. *Nature* 301: 251-254, 1983.
 43. Numa S. — *Structural and functional studies on the nicotinic acetylcholine receptor using the molecular cloning technique*. *Abstr. J. Neurochem.* 44 (Suppl) S1, 1985.
 44. Numa S., Noda M., Takahashi H., Tanabe T., Toyosato M., Furutani Y., Kikyotani S. — *Molecular structure of the nicotinic acetylcholine receptor*. W: 48th Cold Spring Harbor Symposium: *Molecular Neurobiology*. CSH Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, str. 57-69, 1983.
 45. Raftery M. A., Dunn S. M. J., Conti-Tronconi B. M., Middledmas D. S., Crawford R. D. — *The nicotinic acetylcholine receptor: subunit structure, functional binding sites, and ion transport properties*. W: 48th Cold Spring Harbor Symposium: *Molecular Neurobiology*. CSH Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, str. 21-33, 1983.
 46. Raftery M. A., Hunkapiller M. W., Stader C. D., Hood L. E. — *Acetylcholine receptor: complex of homologous subunits*. *Science* 208: 1454-1457, 1980.
 47. Sakmann B., Methfessel C., Mishina M., Takahashi T., Takai T., Kurosaki M., Fukuda K., Numa S. — *Role of acetylcholine receptor subunits in gating of the channels*. *Nature* 318: 538-543, 1985.
 48. Silver A. — *Relation of AChE to the acetylcholine receptor*. W: *The biology of cholinesterases*. str. 42-47, North Holland Publishing Company, Amsterdam, 1974.
 49. Skangiel-Kramska J. — *Neuroreceptory*. *Post. Bioch.* 33: 45-83, 1987.
 50. Stevens C. F. — *Site-directed mutagenesis*. *Trends Neurosci.* 7: 306-307, 1984.
 51. Stevens C. F. — *Molecular tinkering that tailor the acetylcholine receptor*. *Nature* 313: 350-351, 1985.
 52. Stevens C. F. — *AChR structure: a new twist in the story*. *Trends Neurosci.* 8: 1-2, 1985.
 53. Stevens C. F. — *AChRs: five-fold symmetry and the ϵ subunit*. *Trends Neurosci.* 8: 335-336, 1985.
 54. Sumikawa K., Houghton M., Smith J. L., Bell L., Richards B. M., Barnard E. A. — *The molecular cloning and characterization of cDNA coding the α subunit of acetylcholine receptor*. *Nucleic Acids Res.* 10: 5809-5822, 1982.
 55. Sumikawa K., Houghton M., Emtage J. S., Richards B. M., Barnard E. A. — *Active multi-subunit ACh receptor assembled by translation of heterologous mRNA in *Xenopus* oocytes*. *Nature* 292: 862-864, 1981.
 56. Sumikawa K., Miledi R., Houghton M., Barnard E. A. — *A study of the mRNA and genes coding for the nicotinic acetylcholine receptor*. W: *Cell surface receptors*. P. G. Strange (red.), Ellis Horwood Ltd., str. 249-269, 1983.
 57. Takai T., Noda M., Mishina M., Shimizu S., Furutani Y., Kayano T., Ikeda T., Kubo T., Takahashi H., Takahashi T., Kuno M., Numa S. — *Cloning, sequencing and expression of cDNA for a novel subunit of acetylcholine receptor from calf muscle*. *Nature* 315: 761-764, 1984.

58. Takeuchi A., Takeuchi N. — *On the permeability of endplate membrane during the action acetylcholine*. J. Physiol. (London) 154: 52-62, 1960.
59. Unwin N. — *Is there a common design for cell membrane channels?* Nature 323: 12-14, 1986.
60. Vetulani J. — *Biochemiczne metody badania receptorów w mózgu*. W: *Nowe metody w badaniach mózgu*. B. Żarnicki (red.), Ossolineum, str. 81-105, 1983.
61. White M. M., Mayne K. M., Lester H. A. — *Mouse-Torpedo hybrid acetylcholine receptors: functional homology does not equal sequence homology*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 4852-4856, 1985.
62. Young E. F., Ralston E., Blake J., Ramachadran J., Hall Z. W., Strou R. M. — *Topological mapping of acetylcholine receptor: evidence for a model with five transmembrane segments and cytoplasmic COOH-terminal*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 626-630, 1985.
63. Zupančič A. O. — *Evidence for the identity of anionic centers of cholinesterases with cholinoreceptors*. Ann. N.Y. Acad. Sci. 144: 689-693, 1967.

W. J. H. Kunicki-Goldfinger — Genetyka — wizje urzekające i groźne. Wydawnictwo „Alfa”, Warszawa, 1987, str. 158, rys. 51.

W roku 1906 Królewskie Towarzystwo Ogrodnicze w Londynie zorganizowało konferencję naukową na temat hodowania i hybrydyzacji roślin, na której rozważano możliwość wykorzystania praw Mendla dla lepszego zrozumienia mechanizmu dziedziczności. Na tejże konferencji w końcowej konkluzji stwierdzono, że przekazywanie cech dziedzicznych musi zachodzić w równym stopniu u roślin, jak i u zwierząt. W tym miej więcej czasie wykazano, że czynniki określające dane cechy sugerowane przez Mendla, nazwane przez Johansena genami, są zlokalizowane w chromosomach. Był to zatem czas ponownego odkrywania praw Mendla i narodziny nowej dyscypliny biologii — genetyki.

Równocześnie coraz więcej biologów widziało związki nowopowstającej dyscypliny z teorią ewolucyjną Darwina, z czego narodziła się później neodarwinowska teoria, powszechnie uznana dziś za teorię genetyczną. W następnych latach obserwuje się już bardzo szybką penetrację koncepcji genetyki do innych dyscyplin naukowych, jak mikrobiologia, biochemia, fizyka radiacyjna czy teoria informacji — tworząc podstawy fascynujących badań międzydyscyplinarnych poszerzających znacznie horyzonty rozwoju tych dyscyplin. Dzięki powyższemu związkowi międzydyscyplinowemu, z początkiem lat pięćdziesiątych narodziła się **biologia molekularna**, która dziś leży u podstaw współczesnej biotechnologii, i która uzyskała ostatnio tak wielki rozgłos w świecie.

O wszystkich powyższych zagadnieniach, właśnie w ujęciu historycznym, mówi książka Kunickiego-Goldfingera. Jasnym, dowcipnym i nacechowanym erudycją wykładem, autor wprowadza czytelnika w obszar skomplikowanych procesów dziedziczenia cech i kształtowania fenotypu poprzez złożony mechanizm oddziaływań molekularnych. Szczególnie ciekawie napisane są takie rozdziały, jak: „Człowiek wobec zagadki dziedziczenia”, „O dziwnych drogach nauki”, „Kariera kwasów nukleinowych”, „Nasze własne dziedzictwo” czy też „Owoce genetyki i jej przyszłość”. Poza rzetelną informacją naukową zawarte są tu osobiste refleksje autora na temat genetyki i jej związków z innymi dyscyplinami nauki, a także konsekwencji praktycznych rozwoju tej dziedziny biologii w życiu współczesnych i następnych pokoleń.

Książka Kunickiego-Goldfingera jest bardzo potrzebną pozycją na naszym rynku wydawnictw popularno-naukowych. Zapoznanie społeczeństwa z osiągnięciami współczesnej biologii, która dziś opiera się głównie na genetyce i biologii molekularnej, stanowi ważny proces przygotowywania współczesnych pokoleń do wejścia w epokę technologii biologicznych, która musi nadejść, jeśli chcemy zachować znośne warunki egzystencji, ochronić środowisko naturalne, zmienić podejście przy leczeniu schorzeń atakujących rośliny, zwierzęta i ludzi oraz zapewnić wystarczające środki żywności dla coraz większych rzesz ludzkich zamieszkujących naszą planetę. Książka prof. Kunickiego-Goldfingera powinna się znaleźć, moim zdaniem, w spisie obowiązkowych lektur przy nauczaniu biologii we wszystkich szkołach średnich naszego kraju, aby nasza młodzież była coraz lepiej przygotowana do rozumienia otaczającej nas przyrody żywej, jej związków z naszą egzystencją i lepszego poznania samych siebie.

Włodzimierz S. Ostrowski

Krzysztof Łastowski — Rozwój teorii ewolucji. Studium metodologiczne. Wydawnictwo Naukowe Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza, Poznań, 1987, str. 215.

Wydawnictwo Naukowe Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza opublikowało ostatnio ważną dla biologów i metodologów biologii książkę Krzysztofa Łastowskiego „Rozwój teorii ewolucji.

Studium metodologiczne". Praca ta stanowi niejako podsumowanie dotychczasowych osiągnięć naukowych autora, którego niewątpliwie trzeba obecnie zaliczyć do najwybitniejszych w Polsce teoretyków zajmujących się ewolucją biologiczną. Praca Łastowskiego jest stosunkowo obszerna, dzięki czemu możliwe było przedstawienie najważniejszych problemów teorii ewolucji. Można w niej wyróżnić dwie podstawowe części. W pierwszej z nich główne zadanie polega na przesłedzeniu drogą analizy metodologicznej, jakie związki diachroniczno-metodologiczne łączą się z kolejnymi koncepcjami teoretycznymi, które pojawiały się w toku historycznego rozwoju teorii ewolucji biologicznej. W tym celu podjął się Łastowski zrekonstruowania ciągów rozwojowych, historycznego i metodologicznego, kolejno pojawiających się biologicznych koncepcji ewolucyjnych, poczynawszy od I połowy XIX wieku, aż do czasów nam współczesnych. W części pierwszej zrekonstruowano następujące koncepcje ewolucyjne: Linneusza, Lamarcka, Darwina, Mendla, ewolucjonizmu syntetycznego, a także ekologiczno-populacyjną. W rozdziale pierwszym zaznacza Łastowski, że w rozwoju biologii wyróżnić można dwa wyraźne stadia rozwojowe: przeddarwinowskie i darwinowskie. Cezurę wyznacza przy tym precyzyjnie data wydania dzieła „O powstawaniu gatunków” (1859). Zasadniczym przedmiotem biologii przeddarwinowskiej było opisywanie tego, co było dane obserwacyjnie oraz dostarczanie doraźnych korzyści medycznych, czy agrotechnicznych. Najwybitniejszym osiągnięciem była tu statyczno-taksonomiczna koncepcja Linneusza odnośnie do świata ożywionego (zasady klasyfikacji obiektów biologicznych, pojęcie gatunku biologicznego, reguły postępowania w badaniach morfologiczno-taksonomicznych).

Według Lamarcka tok przemian ewolucyjnych wyznaczony jest przez zmiany warunków środowiska, ale jedynie pod warunkiem silnego ich „zarejestrowania” w organizmie. Natomiast Saint Hilaire’owie przyjmowali podstawowy wpływ środowiska na ewolucję, a nurt ekologiczny przekonywał o ważności problemu genezy źródeł różnych przystosowań organizmów (reguły Bergmanna, Glogera, Allena itp.).

Właściwym twórcą teorii ewolucji był jednak dopiero Darwin, który potraktował dobór naturalny jako czynnik główny, od którego zależy proces ewolucji. Łastowski wyraża pogląd, że sens metodologiczny przełomu Darwinowskiego polegał na zerwaniu z indukcjonizmem. Jednakże Darwin nie prowadził systematycznej refleksji metodologicznej, dlatego też trzeba się odwołać do rekonstrukcji jego trybu postępowania badawczego. W tym celu niezbędne okazuje się wykorzystanie zasad rozwiniętych w idealizacyjnej teorii nauki. W oparciu o analizę tekstów Darwina, przeprowadza Łastowski rekonstrukcję podstawowej struktury darwinowskiej teorii ewolucji (prawa doboru naturalnego i jego konkretyzacje). Okazuje się, że już Darwin uświadamiał sobie, że w proponowanej przez niego koncepcji ewolucji zawarte były dwa obrazy: wyidealizowany i rzeczywisty. Koncepcja Darwinowska zachowała do dzisiaj swoje znaczenie teoretyczne i metodologiczne. Do niej nawiązują bowiem wszystkie późniejsze teorie ewolucji. Główna teza teorii Darwina głosi bowiem, że z gatunku biologicznego żyjącego w danych warunkach środowiskowych, przeżywa tylko pewna jego część, mianowicie ta, która maksymalizuje wartość przystosowawczą (fitness) do tych warunków.

W następnym rozdziale rekonstruuje Łastowski teoretyczne ujęcie ewolucjonizmu syntetycznego. Przy tej rekonstrukcji autor opiera się głównie na poglądach Szmalhauzena oraz Simpsona. Rekonstruowana tu koncepcja jest kontynuacją myśli Darwina (koncepcji doboru naturalnego) z uwzględnieniem genetyki, tj. mechanizmu dziedziczenia. Proponuje on rekonstrukcję metodologiczną ewolucjonizmu syntetycznego, która składa się z dwudziestu sześciu najważniejszych twierdzeń. Głównym twierdzeniem jest — podobnie jak w koncepcji Darwinowskiej — prawo doboru naturalnego. Rozwój historyczny biologii wyraził się więc wprowadzeniem w strukturę teorii ewolucji czynników genetycznych (rekombinacje, mutacje) oraz rozszerzeniem opisu mechanizmu doboru naturalnego. Ewolucjonizm syntetyczny jest więc kontynuacją „linii Linneusza”, gdyż za swój cel uważa on ustalenie warunków równowagi populacji biologicznych, a zarazem „linii Darwina”, gdyż za „motor rozwoju” uznaje właśnie naruszanie tej równowagi.

Alternatywną wobec ewolucjonizmu syntetycznego jest teoria ekologiczno-populacyjna. Nawiązuje ona do klasycznego ujęcia Darwina, a szczególnie do jego koncepcji „walki o byt”. Bada ona zmienność ewolucyjną gatunku (populacji) ze względu na takie własności, jak: liczebność,

stosunki międzygatunkowe itp. Koncepcja ta zajmuje się przede wszystkim stabilnością i mechanizmami prowadzącymi do stabilności populacji. Rekonstrukcji metodologicznej tej teorii ewolucji poświęcony jest rozdział V. Również najważniejsze twierdzenie tego ujęcia ewolucji, jak pokazuje Łastowski, mają charakter idealizacyjny (prawo Verhulsta-Pearla, pierwsze prawo Lotki-Volterry, drugie prawo Lotki-Volterry).

Odkrycia Mendla przyczyniły się do rozwoju badań nad rozkładami i frekwencją genów w populacji. Punktem wyjścia do rozważań Łastowskiego jest tu prawo Hardy'ego-Weinberga, które traktuje się ogólnie jako podstawowe twierdzenie genetyki populacyjnej. Problematyka ta zawarta jest w ostatnim rozdziale w części pierwszej. Autor książki analizuje w niej strukturę metodologiczną prawa Hardy'ego-Weinberga i jego konkretyzacje w genetyczno-populacyjnej teorii ewolucji. Teoria ta odwołuje się do pojęcia stanu równowagi populacji w sensie genetycznym, analizując w rozwinięciach (są to konkretyzacje prawa Hardy'ego-Weinberga) procesy ewolucyjne zachodzące w genetycznej strukturze populacji (selekcja, mutacje, migracje).

Odmiennej charakter — par excellence metodologiczny — ma druga część pracy, a jej przedmiotem jest analiza oraz odrzucenie pewnych twierdzeń ograniczających dotychczasową idealizacyjną teorię nauki. Wykazuje się tu, że pomiędzy składnikami zasadniczych twierdzeń biologii ewolucyjnej zachodzą pewne zależności metodologiczne, określające ich wzajemny stosunek. Rozważane są w tej części trzy takie okoliczności: agregacja i dezagregacja ukazująca wielopoziomowość desygnatów pojęć i twierdzeń biologicznych (rozdział VII); korespondencja dezagregująca przedstawiająca związki między teoriami w zakresie różnych poziomów struktury rzeczywistości w badaniach biologicznych (rozdział VIII) oraz korespondencja dopuszczająca ewolucję pojęć w strukturach teorii biologicznych (rozdział IX). Rekonstrukcja metodologiczna, przeprowadzona w części pierwszej, pokazuje, że pewne dotychczasowe pojęcia idealizacyjnej koncepcji nauki są zbyt wąskie w zastosowaniach biologicznych. Ta część pracy zasługuje także na szczególną uwagę metodologów i filozofów nauki, gdyż autor proponuje interesujące modyfikacje idealizacyjnej teorii nauki.

Rozważania w części drugiej są niezbędne, aby opracować „mapę” teorii ewolucyjnych, ukazującej diachroniczną strukturę systematyczno-metodologiczną kolejnych koncepcji ewolucyjnych. Elementami tej mapy są wymienione koncepcje biologii ewolucyjnej, a relacjami — wewnętrzne związki metodologiczne przebiegające między odnośnymi prawami i teoriami tej dziedziny biologii.

Ponadto pracę uzupełniają dodatki będące rozwinięciami wybranych zagadnień przedstawionych w części pierwszej pracy (spór o uniwersalia a biologiczne koncepcje gatunku, Darwinowskie pojmowanie doboru sztucznego, nieświadomego i naturalnego, pojęcie przystosowania populacji, gradualistyczny i punktualistyczny model ewolucji populacji). Problemy te pominięto wcześniej, aby rekonstrukcja koncepcji ewolucyjnych była maksymalnie przejrzysta. Pracę kończy bogata literatura, poświęcona teorii ewolucji oraz streszczenie najważniejszych tez w języku angielskim.

Książka Łastowskiego stanowi niewątpliwie oryginalny dorobek polskiej biologii teoretycznej. Reprezentuje ona studium metodologiczne na wysokim poziomie teoretycznym. Autor zna dobrze poglądy czołowych teoretyków biologii i przedstawia własne oryginalne idee i koncepcje, nawiązuje do najwybitniejszych osiągnięć współczesnej biologii teoretycznej. Praca Łastowskiego stanowi niewątpliwie ciekawą lekturę zarówno dla biologów, jak i dla filozofów nauki. Aby poszerzyć krąg czytelników tej ciekawej pracy, niezbędne byłoby jej szybkie przetłumaczenie na język angielski. Książka Łastowskiego inspirowała bowiem do krytycznego spojrzenia na całość dokonań współczesnej biologii ewolucyjnej. Wskazane byłoby też opracowanie przez autora książki popularno-naukowej o rozwój teorii ewolucji, gdyż odczuwa się dotkliwy brak lektur z tej dziedziny.

Na zakończenie kilka uwag krytycznych. Właściwiej byłoby, ze względu na tradycję historyczną w biologii, stosować termin „syntetyczna teoria ewolucji” zamiast „ewolucjonizm syntetyczny”. Pierwszy z nich jest lepiej ugruntowany w myśleniu biologów, niżeli drugi, za którym optował G. G. Simpson, a do której to tradycji odwołuje się Łastowski. Wydaje się również, że treść rozdziału

X zbyt lapidarnie prezentuje konsekwencje biologiczno-teoretyczne związków metodologicznych przebiegających między koncepcjami i teoriami ewolucyjnymi. Jak sądzę, można byłoby rozwinąć ten fragment pracy bardziej szczegółowymi wnioskami co do wewnętrznych związków zachodzących między poszczególnymi koncepcjami ewolucyjnymi. Na przykład, wskazane byłoby dokładniejsze objaśnienie aproksymacyjnego charakteru relacji przebiegających w linii teoretycznej Linneusza-Darwina-Lotki-Volterry. Przypuszczam, że to samo dotyczyć może również linii Mendla-Hardy'ego-Weinberga.

Podane wyżej uwagi nie umniejszają wymowy i znaczenia pracy. Dlatego też warto jeszcze raz podkreślić wyjątkowość i oryginalność omawianej tu książki Łastowskiego w polskiej biologii teoretycznej.

Eugeniusz Kośmicki

D. Jánossy — Pleistocene vertebrate faunas of Hungary. Akadémiai Kiadó, Budapest, 1986, 208 str.

W roku 1979 wybitny paleontolog prof. Denes Jánossy opublikował w języku węgierskim książkę o plejstocenijskich kręgowcach Węgier. Angielska wersja tej książki, która ukazała się 7 lat później jest przedmiotem niniejszej recenzji. Część nakładu została wydana na Węgrzech, a część w Holandii przez Elsevier Science Publishers B. V., jako 8 numer serii „Developments in Palaeontology and Stratigraphy”.

Autor podjął trudną próbę podsumowania wiedzy o kopalnych kręgowcach plejstocenu Węgier. Należy w tym miejscu zaznaczyć, że Węgrzy mogą poszczycić się wielkimi osiągnięciami i ponad stuletnią tradycją badań w tej dziedzinie, a takie nazwiska jak Petényi, Kormos, Ehik, Méhely, Mottl, Kretzoi weszły na stałe do literatury przedmiotu. Autor książki również wydatnie przyczynił się do rozwoju tej dziedziny odkrywając szereg nowych faun kopalnych, szczególnie ze środkowego plejstocenu i opisując wiele nowych dla nauki teksonów ptaków i gryzoni.

Książka składa się z sześciu części. W pierwszej autor krótko charakteryzuje (na 9 stronach) plejstocenijskie skały osadowe z terenu Węgier, w których znajdowane są szczątki kopalnych kręgowców. Trzy następne rozdziały poświęcone są, kolejno, opisowi faun kręgowców dolnego (52 strony), środkowego (44 strony) i późnego plejstocenu (54 strony). Za granicę między pliocenem a plejstocenem Jánossy przyjmuje Kalabrian, odpowiadający „środkowemu Villafranszowi” (= Villanian) w osadach lądowych, czyli jest zwolennikiem „długiego plejstocenu” trwającego ok. 5 milionów lat. Obecnie większość stratygrafów i paleontologów skłania się do przyjęcia koncepcji „krótkiego plejstocenu”, który rozpoczyna się na przełomie Villanian/Biharian ok. 1,8 miliona lat temu. Przy czytaniu książki trzeba o tym pamiętać.

W rozdziale o faunach kręgowców z wczesnego plejstocenu (obejmującym Villanian i Biharian) autor opisuje kolejno około 40 stanowisk, podając informację o ich położeniu geograficznym, dane sedymentologiczne, historię badań danego stanowiska i inne szczegóły. Przy ważniejszych z nich umieszcza spisy stwierdzonych taksonów, często z podaniem propozycji ilościowych. Listy faunistyczne są jednymi z najcenniejszych informacji zawartych w książce, lecz najczęściej mają one charakter wstępny i niewiele z nich jest zrewidowanych, co wprowadza dosyć duże zamieszanie w terminologii. Czytelnik, nie będący specjalistą, może pogubić się nie rozumiejąc co które nazwy oznaczają (np. dla określenia szczątków nornicy używane są zamiennie, w różnych częściach tekstu nazwy: *Myodes*, *Myodes* (*Clethrionomys*) lub *Clethrionomys*). Autor dyskutuje skład faunistyczny ważniejszych stanowisk przedstawiając wnioski paleoekologiczne, zoogeograficzne itp. oraz określa najbardziej bliskie zespoły faunistyczne z innych stanowisk. W identyczny sposób opracowane są rozdziały omawiające fauny kopalne ze środkowego i późnego plejstocenu.

W przedostatnim rozdziale (15 stron) autor daje przegląd plejstocenijskich zespołów faunistycznych kręgowców na Węgrzech na tle biochronologii tego okresu. Osiem rycin w tym rozdziale (Fig. 41-48) przedstawia zasięg w czasie poszczególnych stanowisk lub zasięg stratygraficzny

charakterystycznych i ważniejszych taksonów kręgowców. Ryciny te jedynie ogólnie mogą zorientować czytelnika w interesujących go zagadnieniach, ponieważ skala czasowa jest podana ze stosunkowo małą precyzją. W rozdziale można również znaleźć opis poszczególnych faz faunistycznych z podaniem gatunków przewodnich oraz uwag paleoekologicznych i paleoklimatycznych.

Książka kończy się podsumowaniem (3 strony), które zawiera ogólne uwagi na temat znaczenia węgierskich materiałów kopalnych kręgowców dla odtworzenia historii przemian faunistycznych w pleistocenie i kreśli perspektywy oraz możliwości rozwoju tej dziedziny w przyszłości.

Autor w niewielkim stopniu wykorzystuje najnowsze piśmiennictwo. Książka przedstawia właściwie stan wiedzy w tej dziedzinie sprzed 10 lat i nie uwzględnia ważniejszej literatury światowej z lat osiemdziesiątych (cytowanych jest jedynie 6 pozycji literatury węgierskiej). Autor wprowadza wprawdzie uzupełnienia w stosunku do tekstu węgierskiego, wydanego w 1979 roku, lecz dotyczą one głównie opisu nowych materiałów lub stanowisk (np. Somssich i Süttő), a rzadziej ogólnych problemów. Książka stanowi, moim zdaniem, przykład publikacji wydanej powtórnie w innym języku, bez wystarczającego uwzględnienia postępu wiedzy w danej dziedzinie.

Pomimo dosyć wielu uwag krytycznych prezentowana książka stanowi całościowe i cenne podsumowanie przemian fauny kręgowców plejstocenijskich Węgier. Dużą jej zaletą jest to, że można w niej znaleźć pełne informacje o stanowisku i jego faunie, które są często rozproszone w literaturze geologicznej, paleontologicznej i archeologicznej. Książka ta powinna zainteresować każdego paleontologa lub geologa zajmującego się plejstocenem, natomiast w mniejszym stopniu polecałbym ją szerszemu ogółowi czytelników.

Adam Nadachowski

PRZYSTOSOWANIE POPULACJI LUDZKICH DO ŚRODOWISKA¹

Począwszy od lat realizacji Międzynarodowego Programu Biologicznego (IBP) (1964-1974), w Związku Radzieckim nastąpiło ożywienie badań i publikacji w dziedzinie tzw. ekologii człowieka. Jednak poważne publikacje na ten temat spotkać można było już w latach dwudziestych. Pionierem tego kierunku był jeden z ojców radzieckiej antropologii W. W. Bunak („O aklimatyzacji ras ludzkich i porównawczym znaczeniu wywołujących to czynników” — 1924). Realizacja programu IBP w zakresie procesów przystosowawczych człowieka zakończyła się publikacją 2 zbiorowych dzieł: „Adaptacja człowieka” (1972) i „Człowiek i środowisko” (1975). Znany pracownikiem naukowym, z racji udziału w morfofizjologicznym programie badań prowadzonych w wielu republikach ZSRR od tropików po obszary arktyczne, stała się Tatiana I. Aleksiejewa. W 1977 roku ukazała się jej pierwsza syntetyczna książka „Środowisko geograficzne i biologia człowieka”, w 1986 roku — rozszerzone i bardziej syntetyczne dzieło pt. „Procesy adaptacyjne w populacjach ludzkich”.

W tej drugiej książce autorka stawia problemy z dziedziny ekologii człowieka, nawiązując do dyskusji Preobrażńskiego i Raicha (1974), Kaznaczejewa (1984) i in. Niestety przychyła się do przestarzałego już poglądu, że ekologia człowieka jest „systemem naukowych poglądów” (a więc dziedziną multidyscyplinarną) wobec poglądu, że jest samodzielną wiedzą interdyscyplinarną o człowieku jako części ekosystemów (jak np. genetyka), idącą w poprzek tradycyjnego podziału nauk: od geologii i geografii poprzez biologię, antropologię, ku etnologii i socjologii.

Recenzowaną książkę autorka poświęca roli czynnika klimatycznego w kształtowaniu właściwości przystosowawczych populacji ludzkich. Książka dzieli się na 11 rozdziałów, które tematycznie można zamknąć w 4 częściach: 1) wstęp zawierający także informacje historyczne, 2)

¹ Aleksiejewa T. I. Adaptatiwnyje processy w populacijach czelowieka. Izd. Moskovskogo Uniwersiteta, Moskwa, 1986.

geograficzne zróżnicowanie cech człowieka w skali świata, 3) biologię człowieka w różnych regionach klimatycznych (6 rozdziałów) i wreszcie 4) podsumowanie w formie rozwiniętej hipotezy o ewolucji typów przystosowań i przystosowywaniu się organizmu w ontogenezie.

Rozdział 2 pracy poświęcony jest przedstawieniu średnich wielkości cech somatycznych i biochemicznych rdzennej i tubelczej ludności na świecie. Najwięcej danych zestawiono dla równikowej Afryki, Indii, Europy, Ameryki Środkowej i dorzecza Amazonki, najmniej — dla Ameryki Północnej. Wynika to z faktu referowania badań dla pramieszkańców, których niewielu pozostało na terytorium np. USA, gdzie zasiedlenie miało charakter kolonizacyjny i niszczyło miejscową ludność indiańską (kolonizacja przez całe rodziny angielskie i francuskie), podczas gdy w wyniku wypraw Hiszpanów po złoto i inne dobra, następowało krzyżowanie się z ludnością miejscową, co sprzyjało ocaleniu tubylców. Podane w pracy mapki dotyczą następujących cech głównie u ludności płci męskiej: wysokość ciała, masy ciała, wskaźnika Rohrera, powierzchni ciała, względnej długości kończyn dolnych, względnej długości kończyn górnych, szerokości barków i bioder, poziomu cholesterolu w surowicy krwi, stosunku albumin do globulin oraz, dla terytorium ZSRR, mineralizacji kości trzeciego palca. Autorka wnioskuje, że niewielki jest związek przemiany materii z budową ciała, jednak związek taki można odnotować w przypadku zwiększenia procesów utleniania ze zwiększeniem długości i masy ciała, masy kostno-mięśniowej i zmniejszaniem masy tłuszczu. Powyższe związki są szczególnie wyraźne na terytoriach arktycznych, w tropikach natomiast następuje obniżenie przemiany podstawowej wraz ze zwiększaniem się masy ciała. Daje się zaobserwować związek poziomu cholesterolu z masą ciała i tkanki tłuszczowej w korelacji wewnątrzgrupowej, jednak stopień zależności jest inny na terenach północnych i południowych. Wraz z obniżeniem poziomu albumin i z podwyższeniem poziomu gamma-globulin idzie w parze zmniejszenie masy ciała itp. cech, związek ten jest silniejszy w tropikach. Autorka stwierdza związek gracylizacji i wydłużenia (smukłości) kości ze zwiększoną mineralizacją szkieletu, a te cechy oraz dolichocefalizacja czaszki wiąże się z glebami bogatszymi w minerały. Ogólnie jednak autorka nie stwierdza związku między żywieniem a temperaturą środowiska oraz geochemicznymi składnikami środowiska. Autorka uważa, że obecny stan badań pozwala stwierdzić, że prawa Bergmana, Allena i Glogera znajdują potwierdzenie dla populacji ludzkich, a geograficzne rozprzestrzenianie pigmentacji ciała, formy włosów, szerokości nosa, grubości warg itp. wskazuje na ich przystosowawcze znaczenie dla gatunku *Homo sapiens*.

W kolejnych rozdziałach autorka analizuje specyfikę procesów rozwoju budowy ciała, właściwości fizjologicznych i struktury populacji na obszarach tropikalnych (robi to szczególnie obszernie, uważając ten teren za wyjściowy dla dalszej ewolucji człowieka), pustynnych, na dużych wysokościach nad poziomem morza, w klimatach umiarkowanych, w kontynentalnej Syberii i w Arktyce (rozdziały 3-8).

Powołując się na innych badaczy autorka wskazuje, że największe zróżnicowanie form przystosowania występuje na obszarze tropików i jest ono związane z różnicami wilgotności, a mniej temperatury, lecz także z niedoborami białka, i nadmiarem spożywanych węglowodanów i niektórymi chorobami endemicznymi o powszechnym występowaniu. Budowa ciała mieszkańców tropików charakteryzuje się dużą powierzchnią względem masy, dużą liczbą gruczołów potowych na jednostkę powierzchni ciała, dużym wdzielaniem potu, specyficzną gospodarką wodno-mineralną, obniżeniem poziomu metabolizmu, zmniejszeniem masy mięśniowej, redukcją syntezy tłuszczów endogennych i obniżeniem stężenia ATP, do czego dodać należy ciemną pigmentację skóry, silnie skręcone włosy, wydłużoną i wysoką czaszkę. Istnieje jednak w tropikach znaczne zróżnicowanie cech, np. wysokoci ciała, stężenia transferyn i cholesterolu, występowania laktozy itp., które lokalnie (Pigmeje, Masajowie, Arabowie) osiągają skrajne wielkości.

Przystosowanie do obszarów pustynnych jest w zasadzie podobne jak do tropikalnych, jednak ma tu miejsce zwiększenie masy ciała.

Dość dobrze udokumentowana jest adaptacja do dużych wysokości, w czym jednak występuje pewna specyfika dla różnych kontynentów (Pyżuk i Wolański 1972), co prowadzi do wniosku, że przystosowanie ma raczej charakter fenotypowych zmian w ontogenezie (Krus-Kok 181), a więc aklimatyzacji (typ adiustacji). Być może, że efekt Bora umożliwiający szybszy transport tlenu do

tkanek ma genetyczne podłoże. Cechmi właściwymi dla mieszkańców wysokich gór są: zwiększenie liczby i wymiarów naczyń włosowatych, zwiększenie wentylacji płuc, maksymalnej pojemności tlenowej krwi, stężenia hemoglobiny i mioglobiny. Hurtado (1964) wierzy, że dotyczy to zmian na poziomie komórkowym, Krus-Kok (1981) — że jest to typowa aklimatyzacja. Jednak większość autorów uważa, że wiele powyższych cech ma charakter zmian nieodwracalnych w ontogenezie.

Przystosowanie do obszarów o klimacie umiarkowanym ma charakter pośredni między właściwościami mieszkańców tropików i obszarów arktycznych, a lokalnymi cechami specyficznymi dla danego terenu. Na podstawie własnych badań ludności kontynentalnych obszarów Syberii autorka wskazuje na lokalne właściwości i zmienność budowy ciała, np. między Czukczami i Tuwińcami, między mieszkańcami obszarów leśnych i tajgi. Uważa za specyfikę tych rejonów ową znaczną różnorodność form przystosowania lokalnego.

Charakterystykę mieszkańców dalekiej północy autorka zaczyna od porównania sposobu żywienia ludności tych terenów i tropikalnej Afryki, stwierdzając w Arktyce w porównaniu z tropikami bardzo duże spożycie tłuszczu, wyżej przeciętnej — białka i większą wartość kaloryczną pokarmu oraz niskie spożycie węglowodanów. Mineralizacja kości na terenach północno-wschodniej Azji jest znacznie mniejsza (szczególnie u mężczyzn), niż na terytorium europejskim ZSRR. Autorka ma trudność z jednoznacznym scharakteryzowaniem mieszkańców Arktyki, wskazując na wiele lokalnych właściwości. Jest to, jak sądzę, wynikiem stosunkowo niedawnego zasiedlenia tych terenów w skali istnienia ludności oraz kulturowych raczej niż biologicznych form przystosowania (tzw. kultury circumpolarne). Ogólnie ludność Północy charakteryzuje muskularna budowa ciała, duże rozmiary cylindrycznej klatki piersiowej, silny rozwój mięśni oddechowych, znaczna wentylacja płuc, szybki obieg krwi, duże stężenie hemoglobiny we krwi i duża pojemność tlenowa krwi, małe stężenie kwasu askorbinowego, znaczne zasoby tkanki tłuszczowej i znaczna mineralizacja kości.

W kolejnych rozdziałach autorka omawia mechanizmy zmian przystosowawczych u człowieka, uważając że gatunek ten charakteryzuje przystosowawczy charakter większości zmian zachodzących w czasie. Wysuwa hipotezę istnienia adaptatywnych typów u człowieka, które charakteryzują się specyficzną normą reakcji biologicznych na zespół właściwości otaczającego środowiska, co prowadzi do występowania stanu równowagi organizm-populacja-środowisko. Ów typ adaptatywny, zdaniem autorki, nie zależy od rasowej i etnicznej przynależności. Wskazuje ona przy tym na istnienie pewnych terenów z analogicznym zespołem warunków, chociaż leżących w różnych obszarach geograficznych (np. terenów arktycznych i wysokogórskich), w których występują takie same typy. Reakcje przystosowawcze mają wg niej dwie formy: ogólną i specyficzną. Ogólna dotyczy masy kostno-mięśniowej, podczas gdy specyficzna ma dotyczyć energetyki organizmu itp., które pozwalają na wydzielenie typów: arktycznego, wysokogórskiego, kontynentalnego, tropikalnego itp. Na terenach tropikalnych występuje znaczna dyspersja cech morfologicznych człowieka, która zmniejsza się w populacjach żyjących dalej na północ. Dzieje się tak dlatego, że obszar tropikalny charakteryzuje się wielką różnorodnością odmiennych siedlisk (nisz), i jest on prakolebką ludzkości. Autorka wyróżnia dyskusyjny podział na typy adaptatywne I-IV rzędu, które wyróżniane są na podstawie zespołu cech morfo-fizjologicznych. Można tu przypomnieć, że koncepcję zespołu cech przystosowawczych oddechowo-krażeniowych do różnych nisz wysunęliśmy już przed laty (Pyżuk i Wolański 1972). Do tych cech biologicznych, autorka dodaje także potrzebę analizy ekonomiczno-kulturowych form przystosowania.

W kolejnych rozdziałach rozważane są relacje procesów adaptacyjnych i ewolucyjnych. Autorka wymienia szereg radzieckich autorów, którzy od ponad półwiecza wskazywali na potrzebę wyróżnienia „feno-” i „geno-aklimatyzacji”.

Procesami aklimatyzacji nazywa autorka zmiany „morfotyczne” niedziedziczne, np. gestasierć u zwierząt północy czy podwyższenie stężenia hemoglobiny u mieszkańców gór. We współczesnej terminologii, nie tylko polskiej, ten zakres zmian rozbijamy zazwyczaj na 3 typy: odwracalnych krótkotrwałych reakcji, odwracalnych dłużej trwających adiustacji oraz nieodwracalnych ontogenetycznych zmian plastycznych. Wśród wymienianych przez autorkę form (morfozy i modyfikacje) fenotypowego przystosowania istotne jest to, że zmiany te mogą stać się

nieodwracalne na drodze doboru stabilizującego. Modyfikacje są sposobem realizacji genotypu w danych warunkach środowiskowych. Fenotypowe efekty modyfikacji i mutacji mogą być nierozpoznawalne, staje się to dopiero możliwe wobec „morfogenetycznej” stabilności „genetycznej aklimatyzacji” (Gause 1984, Sziszkin 1984). Dobór stabilizujący zamienia „zewnętrzne czynniki morfogenetyczne na wewnętrzne zmiany adaptacyjne”. Aklimatyzacja stanowi pierwszą bezpośrednią biologiczną reakcję organizmu o charakterze przystosowawczym.

Autorka omawia przykłady różnych zmian przystosowawczych: transferyn, ACP, białek surowic krwi itp. do różnych stref geograficznych. Genetyczne uwarunkowanie przemiany podstawowej, mineralnej, witaminowej i węglowodanowej uważa za dowody trwałości tych przystosowań, za także dowody uważa rasowe różnice poziomu białek i lipidów. Sprawy te są omówione w dziele „Ekologiczna fizjologia człowieka” opublikowanym w 1980 roku w ZSRR. Autorka uważa, że zmiany aklimatyzacyjne jakie obserwuje się u nowoprzybyłych są zgodne z właściwościami specyficznymi dla stałych mieszkańców, z wyjątkiem ciśnienia krwi, co nie w pełni odpowiada naszym obserwacjom (Pyżuk i Wolański 1972).

Na podstawie obserwacji prymitywnych plemion oraz porównując je z różnymi gatunkami zwierząt, można dostrzec biologiczne prawidłowości wtórnego (po aklimatyzacji) przystosowania do środowiskowych zasobów energetycznych, szczególnie niedostatku żywności. Wyróżniane są: sposób aktywny (szybki i intensywny rozwój oraz rozmnażanie, wysoki poziom przemiany materii) i pasywny (obniżenie poziomu procesów energetycznych) (Szwarc 1963, Czernow 1974); u człowieka typowe są aktywne formy morfofizjologicznego przystosowania. Niekiedy występujące formy pasywne charakteryzują się podwyższeniem oporności organizmu na niekorzystne warunki (np. utraty ciepła). Charakterystyczne jest, że formy przystosowania człowieka do warunków geograficznych nie mają charakteru ekologicznej specyfikacji wykluczające szansę życia w innych obszarach ziemi. Typ ekologiczny (TE) miałby być genotypowym przystosowaniem populacji do danych warunków, typ adaptacyjny (TA) — dziedziczną normą reakcji, typ zaś ekonomiczno-kulturowy (TEK) autorka uważa za normę społecznej reakcji na dane warunki środowiskowe. Kształt nosa jest więc właściwością typu ekologicznego, stężenie hemoglobiny — typu adaptacyjnego, a zwykczaje — typu ekonomiczno-kulturowego, upraszczając sprawę. Analiza typów EK, zapoczątkowana przez Tolstowa (1932), rozwijana przez Lewina, Czeboksarowa, Andrianowa i Aleksiejewa, znajduje podsumowanie w recenzowanej książce w powiązaniu z modelami związków antropoekologicznych sformułowanych przez Bakera (1979) i Little’a (1976) z USA oraz Boydena (1981) z Australii. W tych ostatnich badaniach wykazano, że takie cechy jak budowa ciała, przemiana materii, zdrowie, struktura genetyczna i demograficzna populacji ludzkich zależą od energetyki. Zostało to przeanalizowane dotychczas na podstawie małych izolowanych populacji w Andach (Peru), wyspach Pacyfiku i w Hong Kongu — nie wszystkie jednak badania są cytowane. Przedstawiona synteza i mapa dla całego terytorium ZSRR oparta jest na ponad 60 populacjach, w znacznej części zbadanych pod kierownictwem autorki, która nawiązuje także do etnogenezy badanych ludów i ich związków „antropoekologicznych”, opartych na współczynnikach korelacji: typu gospodarki, spożycia kalorii, białka, tłuszczów, węglowodanów, współczynnika „surowości klimatu”, wysokości nad poziomem morza i pH gleby. Wykazuje także dla każdej płci powiązania z niektórymi cechami morfologicznymi (wymiary ciała i głowy, tkanka tłuszczowa, mineralizacja kości) oraz poziomem cholesterolu, ciśnieniem krwi i przemianą podstawową (tab. 21-23). Są to wyniki o wielkiej wartości dowodowej i unikalne w skali światowej literatury. Okazuje się, że spożycie tłuszczów i węglowodanów oraz wskaźnik surowości klimatu koreluje ze wszystkimi pozostałymi danymi, podczas gdy typ gospodarki jedynie z żywieniem i klimatem, spożycie kalorii i białka z pozostałymi elementami żywienia, pH gleby i klimatem, wysokość nad poziomem morza koreluje ze spożyciem tłuszczy i węglowodanów oraz surowością klimatu, zaś pH gleby koreluje jedynie z żywieniem i wskaźnikiem surowości klimatu. Na cechy morfofizjologiczne najsilniej wpływa u mężczyzn średnia roczna temperatura powietrza i wskaźnik ostrości klimatu, następnie typ gospodarki. U kobiet odbiór jest znacznie słabszy i podobnie odbierany wpływ typu gospodarki, średniej temperatury i ostrości klimatu. Cechami, które mają największe znaczenie jako bioidykatory populacji ludzkich są: u mężczyzn — długość ręki, wysokość ciała, grubość

tkanki tłuszczowej, poziom cholesterolu i przemiana podstawowa, u kobiet — szerokość klatki piersiowej i poziom cholesterolu. U obu płci niewielkie jest znaczenie ciśnienia krwi jako miernika zmian środowiska wewnętrznego, a wysokość nad poziomem morza dla mężczyzn i rocznej amplitudy wahań temperatury dla kobiet, jako mierników środowiska zewnętrznego.

Autorka czyni szereg rozważań nad przystosowaniem do życia w mieście, przy czym badania te są daleko w tyle za polskimi badaniami, a w wielu przypadkach kontrowersyjne lub nietrafne. Ciekawe jest natomiast stwierdzenie, na podstawie wielu własnych badań materiałów średniowiecznych, że ludność miejska była wówczas wyższa, o szerszej twarzy i bardziej brachycefaliczna niż wiejska oraz żyła krócej. Ten ostatni fakt, jak wiemy, nie miał miejsca już na przełomie XIX i XX wieku i aż po lata 1960-70 ludność miejska żyła (w Polsce) dłużej, dopiero ostatnie dekady zmieniły ten porządek na „średniowieczny”. Podobnie z wielu danych wiemy, że pod koniec XIX wieku i w pierwszej dekadzie XX wieku w większości państw wyższa była ludność wiejska niż spauperyzowana ludność miast, dopiero od drugiej dekady XX wieku wróciliśmy do „średniowiecznego” porządku lepszego rozwoju ludności miast niż wsi. Autorka konkluduje, że ludność miejska nie reprezentuje odrębnego typu adaptatywnego.

Jedenasty rozdział poświęcony jest zmianie w czasie właściwości adaptatywnych człowieka w procesie onto- i filogenezy. Zmiany ontogenetyczne były dotychczas omawiane w wielu pracach, a próba ich podsumowania została dokonana przez Eveleth i Tannera (1976) w monografii IBP. Obecna próba jest bardziej trafna, ale także daleka od rzeczywistości syntezy, brak też podsumowania danych fizjologicznych. Synteza oparta jest na 6 cechach somatycznych i ich pochodnych u typowych przedstawicieli odmian białej, czarnej i żółtej w wieku 6-18 lat (wiekości średnie i współczynniki zmienności). Zmiany z wiekiem nie przebiegają jednocześnie u poszczególnych odmian, jednak w wieku 8-14 lat charakteryzować można odmiany żółtą i czarną jako przeciwstawne (z wyjątkiem wysokiego wzrostu i dużej klatki piersiowej odmiany białej). Przedstawiciele odmiany żółtej są niscy o dużej względnej masie ciała, względnie szerokich barkach i biodrach oraz obfitej tkance tłuszczowej, podczas gdy przedstawiciele odmiany czarnej przy pośredniej wysokości ciała mają małą masę ciała, wąskie barki i biodra, małą klatkę piersiową i skąpą podściółkę tłuszczową. U odmiany żółtej po okresie pokwitania wysocy są Chińczycy, niscy Indianie, ci pierwsi mają jednak najmniejszą względną masę ciała, wąskie barki i pośrednio szerokie biodra, podczas gdy Indianie mają dużą masę, a najszerze i barki i biodra (względem wysokości) wykazują Eskimosi. Znaczące są więc różnice adaptacyjne w obrębie odmiany żółtej zależnie od klimatu. Autorka opisuje cechy przystosowawcze poszczególnych odmian, które w wielu przypadkach zmieniają się po okresie dojrzewania. Kontrowersyjna jest teza o najbardziej oszczędnym energetycznie przystosowaniu do środowiska mieszkańców wysokich gór na drodze powolnego wzrastania, tezie tej przeciwstawiał się między innymi Gopalan (1985), gdy tak tłumaczono małe wymiary ciała zabiedzonych Hindusów. Na podstawie piśmiennictwa autorka stwierdza istnienie cech odmianowych już w okresie płodowym, z czego wnosi, że zmiany przystosowawcze tego rodzaju są dziedziczone. Wskazuje także na fakt, że typowe dla poszczególnych odmian proporcje ciała utrzymują się także przy różnej kaloryczności diety. Podkreśla, że niektóre cechy (np. pojemność życiowa płuc) u ludzi przeniesionych w dzieciństwie z terenów nizinnych w góry są podobnie duże jak u tubylców, podczas gdy takimi się nie stają u przesiedlonych po okresie młodości.

W ostatnim rozdziale autorka podsumowuje wiadomości dotyczące warunków ekologicznych australopiteków oraz form przedludzkich i ludzkich. Uważa, że ucłowieczenie nastąpiło na obszarze tropikalnych sawann, przy zmianie zasiedlenia tropikalnych lasów na odkryte przestrzenie. Towarzystwo mu przejście z żywności roślinnej na spożycie mięsa (początek już w tropikalnych lasach), co wiązało się także z przestrojeniem termoregulacji w związku ze wzrostem usłonecznienia, suchością klimatu i ruchami powietrza (wiatrami). W najwcześniejszym okresie formował się więc typ przystosowania do tropików, który trwał od 5 mln do 0,5 mln lat temu. Praczułowiek dolnego paleolitu (500—120 tys. lat temu) żył już w zróżnicowanym klimacie (w tym i w tropikalnych lasach Jawy) oraz na znacznych wysokościach (ponad 2000 m na Kaukazie), co rozpoczęło przystosowania typu wilgotnego i wysokogórskiego. Dopiero jednak

w środkowym paleolicie człowiek dotarł na obszary o znacznych sezonowych różnicach klimatu, wytwarzając przystosowanie do obszarów umiarkowanych-kontynentalnych. W tych warunkach jego przystosowanie nie mogło być jedynie biologiczne, lecz w tej fazie opracowaniu nowych obszarów pomagało wykorzystanie istniejących drzew, liści, skór itp. do budowy mieszkań i wytwarzania odzieży. Było to więc przystosowanie kulturowe. Ono umożliwiło człowiekowi w górnym paleolicie opanowanie terenów arktycznych, a biologiczne zmiany przystosowawcze były tu wtórne. Zdaniem autorki proces przemian filogenetycznych u współczesnego człowieka nie jest zakończony, aczkolwiek niewielka jest już rola doboru kierunkowego, a wzrasta rola metyzacji i zmian przystosowawczych w proces ontogenezy utrwalonych przez dobór stabilizujący.

Książkę należy ocenić jako ważny etap w formułowaniu syntez w ekologii człowieka z pozycji antropologii. Autorka podkreśla znaczenie tego rodzaju badań wobec zasiedlania nowych terenów, na których, jak podaje, w analogicznych strefach klimatycznych stwierdza się nawet dziesięciokrotnie wyższą zachorowalność.

Napoleon Wolański

DRUGI MIĘDZYNARODOWY KONGRES EDUKACJI ŚRODOWISKOWEJ UNEP I UNESCO (MOSKWA 17-21 SIERPNIA 1987)

Na Kongres w Moskwie — oprócz piszącego te słowa — z Polski zaproszeni byli: prof. A. Urbanek — przewodniczący Komitetu „Człowiek i środowisko”, prof. A. Dylik, prof. R. Olaczek i doc. D. Cichy. Zadania podzielono między polskich uczestników w ten sposób, aby uzyskać możliwie pełny obraz obrad.

W niniejszym artykule zajmę się przede wszystkim spotkaniami, w których sam brałem udział, a także bogatą dokumentacją kongresową.

Na pierwszym plenarnym posiedzeniu Kongresu obradom przewodniczył, z ramienia Komitetu Organizacyjnego ZSRR, wiceminister szkolnictwa wyższego M. Jegorow. Po wygłoszeniu przemówienia powitalnego przez ministra szkolnictwa wyższego i średniego specjalnego, M. Jagodina, zabrał głos dyrektor generalny UNESCO M. Amadou M. Bow, który pokrótce scharakteryzował prace wykonane przez UNESCO od czasów konferencji w Tbilisi w roku 1977 i wezwał do opracowania w czasie Kongresu nowej międzynarodowej strategii edukacji środowiskowej do 1990 roku. Podkreślił on m.in. ścisłą współpracę w dziedzinie EE między UNESCO i UNEP, postulował konieczność opracowania wspólnego planu do 1990 roku. Zwrócił także uwagę na wzrost zagrożeń, takich jak kryzys demograficzny, pustynnienie, podkreślił rolę i znaczenie programu MaB, programów hydrologicznego, geologicznego oraz międzyrządowej komisji oceanicznej.

UNESCO wydaje informacje o wspólnych akcjach, m.in. dotyczących problemów metodologicznych EE. Rośnie lista „Dziedzictwa światowego”, organizowane są kursy i seminaria naświetlające międzydiscyplinarny charakter EE. Sprawozdania z nich obejmują m.in. problemy nowych metodyk (np. modelowanie), opublikowano wielojęzyczny słownik terminów używanych przez EE. M. Bow poruszył także sprawę obecnie rosnących zagrożeń przyrody (zagrożenie istnienia ponad 25000 gatunków roślin i przeszło tysiąca gatunków zwierząt). Sprawy te zostały bliżej omówione w specjalnym dokumencie Kongresu. Konieczne jest doskonalenie i rozszerzanie kształcenia osób nauczających na różnych szczeblach oraz systemu ich ciągłego informowania. EE powinna mieć nie tylko międzydiscyplinarny charakter, ale także uwzględniać współpracę międzynarodową. Jednocześnie konieczne jest zróżnicowanie EE w zależności od potrzeb i sytuacji w różnych krajach. Mówca podkreślił także — na zakończenie — decydującą rolę utrzymania pokoju, jako wciąż podstawowego warunku samego istnienia biosfery.

Przedstawiciel UNEP M. Mansfield (w zastępstwie prof. M. Tolby) przedstawił poglądy tej organizacji zarówno na stan aktualny środowiska na świecie (stale pogarszający się), jak też UNEP w dziedzinie ochrony środowiska. Po kongresie w Tbilisi powstał wspólny program edukacji środowiska UNEP i UNESCO (PIEE). W jego realizacji obecnie uczestniczą przeszło 74 kraje, 10000 nauczających oraz 250000 „uczniów”. Scharakteryzował on, komentując odpowiedni dokument dostarczony uczestnikom Kongresu, m.in. obecny stan środowiska na świecie. Podkreślił rolę opublikowanej przez Międzynarodową Unię Ochrony Przyrody i Jej Zasobów „Światowej Strategii Ochrony”. Zwrócił uwagę na „zanieczyszczenia demograficzne” i rolę EE w ich zwalczaniu, na pogarszanie się stanu zdrowia nie tylko wskutek tzw. chorób cywilizacyjnych, ale także — zwłaszcza w krajach Trzeciego Świata — wskutek parazytoz, na sześć wielkich chorób powodowanych przez wirusy oraz na braki stanu sanitarnego w wielu krajach. Z przeszło 5 milionów substancji chemicznych produkowanych na świecie, niektóre stanowią poważne zagrożenie dla środowiska.

Od czasów konferencji w Tbilisi nastąpiło dalsze pustynnienie wielu obszarów, wzrosła erozja gleb, wyginęło wiele gatunków organizmów, wzrosło gromadzenie się odpadów i żywołowa

urbanizacja. Zwrócono uwagę na nowe zagrożenie w postaci uszczuplenia warstwy ozonu w stratosferze. W tych warunkach upowszechnienie EE na świecie ma poważne znaczenie. UNEP aktywnie uczestniczy w związanych z tym pracach.

W dalszych przemówieniach podkreślano doskonałe przygotowanie dokumentacji Kongresu, którego liczba uczestników wyniosła ok. 500 osób.

Dokonano wyboru Prezydium Kongresu w składzie: prezydent M. N. Jegorow (ZSRR), 5 wiceprezesów z pięciu krajów, sprawozdawca M. J. Smyth (W. Brytania), 3 przewodniczących komisji oraz 5 przewodniczących sympozjów.

Podczas II sesji plenarnej wygłoszono 4 referaty (G. N. Gołubiew — UNEP, A. Chiba — UNECSO, S. Dimitrescu — UNESCO, N. Egorow — ZSRR), charakteryzujące osiągnięcia w dziedzinie edukacji środowiskowej po konferencji w Tbilisi. Podkreślano w nich konieczność doskonalenia informacji o EE i postępach w tej dziedzinie na świecie. Osiągnięcia te przedstawiono także w obszernych, uprzednio rozesłanych, 4 dokumentach oraz w podstawowym dokumencie pt. „Elementy strategii międzynarodowej w dziedzinie edukacji środowiskowej na lata 1990”. Przytoczono wiele danych, m.in. dotyczących zanieczyszczeń atmosfery: w 1980 roku na półkuli północnej wyemitowano do atmosfery 115 mln ton tlenków siarki i 35 mln ton tlenków azotu. W 1985 roku 30 krajów (w tym USA i ZSRR) ratyfikowało konwencję o zanieczyszczaniu atmosfery (Genewa 1979). Konsekwencją zanieczyszczeń atmosfery jest m.in. ocieplenie klimatu i uszczuplenie grubości warstwy ozonu w stratosferze. W troposferze (do 15 km wysokości) ozon stanowi zanieczyszczenie, natomiast w stratosferze (20-30 km) osłania Ziemię przed promieniowaniem ultrafioletowym Słońca. W marcu 1985 roku 20 państw podpisało w Wiedniu pierwszą konwencję o ochronie warstwy ozonu. Wielką troskę i odpowiednie działanie międzynarodowe powoduje sprawa uszczuplania zasobów wody i jej zanieczyszczanie. W dokumentach wykazano działania międzynarodowe w celu ochrony wód. Wielki nacisk położono na związek między sprawami zachowania pokoju i ochrony środowiska („wojna jest najgorszą postacią zanieczyszczeń”). Edukacja środowiskowa sprzyja zrozumieniu i porozumieniom międzynarodowym.

Problematyka ochrony środowiska jest jedną z najważniejszych spraw o charakterze globalnym. W załączniku do jednego z dokumentów Kongresu podano wykaz międzynarodowych „instrumentów prawnych” dotyczących ochrony środowiska (50 dokumentów). W jednym z dokumentów szczegółowo omówiono akcje podjęte w ramach Międzynarodowego Programu Edukacji Środowiskowej od 1975 roku, m.in. wydawnictwa (np. tezaurus terminów EE, słownik EE). Wyliczono wszystkie konferencje międzynarodowe i regionalne organizowane przez program, główne kierunki badań i eksperymentów (48), projekty pilotowe (36), takie przedsięwzięcia, jak: międzynarodowy kurs w 1982 roku w Czechosłowacji, seminaria regionalne (6), subregionalne (9), narodowe (w Afryce — 13, w krajach arabskich 6, w Azji i krajach Pacyfiku — 6, w Europie 7, w Ameryce Łacińskiej 16). Wymieniono publikacje programu o charakterze dydaktycznym (22), oraz serię „Edukacja Środowiskowa” (27 numerów), a także materiały audiowizualne. Należy żałować, że materiały te nie są kompletowane w żadnym ośrodku w Polsce.

Referenci odwoływali się także do obszernego dokumentu pt. „Elementy międzynarodowej strategii działania na rzecz edukacji środowiskowej na lata 1990”. Dokument ten został sporządzony w ten sposób, że przy odpowiednim fragmencie „Deklaracji z Tbilisi” (1977) omawiano osiągnięcia w realizacji zawartych w nim postulatów, formułowano zadania na przyszłość oraz wymieniano niezbędne akcje. Nie sposób tu omówić w całości tego obszernego dokumentu, warto jedynie zwrócić uwagę na niektóre postulaty nawołujące do podejmowania nowych akcji. Postulowano więc podejmowanie dalszych eksperymentów w dziedzinie EE, podjęcie porównawczych badań nad ich wynikami, opracowywanie typowych programów studiów, kształcenie ich realizatorów, wykorzystywanie nowoczesnych metod upowszechniania wiedzy, stworzenie „banku” programów audiowizualnych, mobilizację zasobów technicznych i finansowych. Uznano za konieczne zwołanie w 1997 roku nowego kongresu międzynarodowego w celu oceny osiągniętych wyników oraz opracowanie planu działania w XXI stuleciu.

W dyskusji, jaka rozwinęła się po referatach, zabrałem głos jako pierwszy, zwracając uwagę na: konieczność oceny zmian, jakie zaszły na świecie w ciągu ostatnich lat (m.in. wzrost zagrożeń

środowiskowych na świecie, a jednocześnie wzrost powszechnej świadomości ekologicznej); potrzebę rozwijania ekonomiki środowiska, zwłaszcza dla uświadomienia jej roli decydującej o różnym szczęble; uznanie przez Kongres Intelktualistów w Warszawie (1986) celowości zastąpienia dotąd używanej terminologii „ochrona środowiska” itp. terminem „bezpieczeństwo ekologiczne”, wskazującym m.in. na związek między walką o pokój i walką o przezwycięzenie kryzysu ekologicznego. Wystąpienie to znalazło dość obszernie odzwierciedlenie w projekcie końcowego sprawozdania Kongresu.

Inni mówcy zwracali uwagę na postępy w ekologicznej świadomości społeczeństw, walkę o pokój i ochronę środowiska (globalny problem nr 2). Wystąpiono także z propozycją (jakże mało realną!) utworzenia ponadrządowej światowej rady na najwyższym szczęble, która zajmowałaby się sprawą przeżycia ludzkości.

W następnych dniach pracowały trzy komisje do spraw:

1. Edukacji środowiskowej personelu nauczania szkolnego i pozaszkolnego oraz priorytetów w tej dziedzinie do 1990 roku.
2. Edukacji środowiskowej w uniwersytetach i priorytetów do 1990 roku.
3. Kształcenia specjalistów edukacji środowiskowej, priorytetów rozwoju w tej dziedzinie do 1990 roku.

Uczestniczyłem w pracach drugiej Komisji (przewodniczył M. Douguerra — Turcja), w której zajmowano się następującymi sprawami: 1) dostęp do informacji, 2) badania i eksperymenty, 3) edukacja i informacja publiczna, 4) ogólna edukacja uniwersytecka. Zabierając głos w tej ostatniej sprawie przedstawiłem poglądy polskiej delegacji na kształcenie ogólne wszystkich studentów oraz na wyższym poziomie, specjalistycznym, zależnym od kierunku studiów, a także na trudności podręcznikowe i personalne. W tych warunkach specjalnego znaczenia nabierają w Polsce studia podyplomowe realizowane w kilku uczelniach wyższych.

W dyskusji wiele mówiono o potrzebie ujednolicenia systemu informacji o EE, o rozszerzeniu zasięgu działania istniejących środków informacji (m.in. o zwiększeniu nakładu czasopisma UNESCO „Connexion”) i o innych typach informacji (kursy, turystyka, muzea). Podkreślano konieczność „ekologizacji nauczania geografii”, ujednolicenia pojęć, terminologii, trudności przygotowania „interdyscyplinarnego” nauczycieli i wykładowców, rolę „etyki ekologicznej” i estetyki w edukacji środowiskowej. Prof. Płatonow z ZSRR złożył projekt specjalnego „kodeksu” ujętego w 10 zasad lub poczynań. Postulowano podjęcie badań nad terminologią, słownikami, badań realnej interdyscyplinarności EE. Mówiono o cenie efektywności różnych środków nauczania. Przedstawiono także stan nauczania o środowisku na różnych poziomach nauczania w różnych krajach. Występując ponownie, podniosłem sprawę realizacji uchwały „Deklaracji w Tbilisi” o powołaniu w poszczególnych krajach ośrodków informacji i wysunąłem postulat opracowania przez UNESCO i rozesłania do krajów pełnego, stale uzupełnianego i aktualizowanego wykazu tych ośrodków wraz z adresami.

Podczas trzeciej sesji plenarnej dyskutowano nad międzynarodową i regionalną współpracą w dziedzinie edukacji środowiskowej. Po wprowadzeniu wygłoszonym przez sprawozdawcę generalnego, prof. Smytha, poszczególni mówcy omawiali sprawy seminariów międzynarodowych, publikacji i rozpowszechniania materiałów, a także ogłoszenia Dekady Światowej Edukacji Środowiskowej w latach 1990—2000. Omawiano także stan i potrzeby EE w krajach Trzeciego Świata, związek tej sprawy z żądaniami wprowadzenia na świecie nowego porządku ekonomicznego. Jak dotąd — mimo specjalnej sesji ONZ poświęconej tej sprawie — żądanie nowego porządku ekonomicznego pozostaje tylko postulatem. Powoływano się na sytuację w Europie jako modelową w tej dziedzinie EE (ale chyba tylko w porównaniu ze stanem EE w krajach pozaeuropejskich?). Poruszano sprawę ujednolicenia terminologii „ochrony środowiska”. Podano m.in. informację o stanie nauczania i informacji o EE w Chinach. Informowano także o stanie zagrożenia środowiska w różnych krajach (np. Nepalu).

Poza pracami trzeciej komisji odbyły się także zebrania pięciu sympozjów. Ich tematami były:

1. Międzynarodowe zrozumienie potrzeby współpracy w dziedzinie EE.
2. Związek EE z rozwojem społeczno-ekonomicznym krajów i świata.

3. Rola środków masowego przekazu.

4. Rola rezerwatów biosfery w EE.

5. Rola i doświadczenia organizacji pozarządowych w EE. W tym miejscu warto wspomnieć, że prof. Olaczek zorganizował oglądanie przez uczestników Kongresu wystawy obrazującej prace Polskiej Ligi Ochrony Przyrody.

Uczestniczyłem w obradach czwartego sympozjum. W dyskusji przedstawiono m.in. ciekawe dane o wyspach Galapagos, jako najśłynniejszych rezerwach biosfery oraz przedstawiono konieczność ich ratowania (m.in. przed „zanieczyszczeniami turystycznymi”). Informację przedstawił przedstawiciel Ekwadoru. Opisywano akcje EE w rezerwach biosfery. O sytuacji w Polsce mówiła doc. D. Cichy. Uprzednio powielona informacja o EE w Polsce rozdana została członkom Prezydium Kongresu; około 40 egzemplarzy zabrali z wystawy uczestnicy Kongresu.

Ostatnie (IV) posiedzenie plenarne poświęcone było sprawozdaniom z pracy trzech komisji i podjęciu uchwały o strategii EE do 1990 roku. Uprzednio rozdano sprawozdania z prac wszystkich trzech komisji. Znalazły się także odpowiednie teksty w „Raporcie Końcowym” Kongresu. Ponieważ uprzednio obszerniej omówiłem prace drugiej Komisji, odnotuję jedynie ważniejsze sprawy przedstawione na pozostałych dwóch komisjach.

W pierwszej Komisji (przewodniczący — Orlando Hall Ruse z Kostaryki) dyskusja koncentrowała się wokół głównych problemów kształcenia personelu do nauczania o środowisku. Podkreślano znaczenie kształcenia pozaszkolnego, konieczność uwzględnienia tradycji i zwyczajów poszczególnych krajów, opracowania podręczników narodowych i międzynarodowych oraz wykorzystania tendencji kształcenia ustawicznego i konieczność „ekologizacji” techniki.

W raporcie trzeciej Komisji (przewodniczący — M. Francis, Francja) wymieniono następujące kierunki kształcenia specjalistów EE: a) kształcenie początkowe ogólne, b) zmiany i zastępowanie się specjalistów, c) kształcenie w toku badań, d) stałe opracowywanie programów studiów, e) nasilenie możliwości wszelkich form kształcenia.

Omawiano także różne metody kształcenia i aprobowano kierunki działań wymienione w dokumencie o strategii ogólnej EE. Skierowano także 18 postulatów do innych komisji.

W końcowej części ostatniego posiedzenia plenarnego złożono podziękowania UNESCO i UNEP za doskonałe przygotowanie Kongresu i uprzednio udostępnionych materiałów, oraz Komitetowi Radzieckiemu za wzorowe zorganizowanie Kongresu i doskonałe warunki pracy.

Jako aktywny uczestnik I Kongresu w 1977 roku (Tbilisi) poświęconego edukacji środowiskowej, mogę „na gorąco” przeprowadzić porównanie obu kongresów. Kongres w Tbilisi, do którego uchwalił obecnie ciągle się odwoływano, miał nieco inny charakter. Uczestniczyły w nim delegacje rządowe, nie zaś — jak w Moskwie — osoby zaproszone indywidualnie. Miał on naprawdę charakter „burzy mózgów”, kiedy omawiano podstawowe idee, formułowano nowe postulaty, często bardzo daleko idące (np. że sprawy ochrony środowiska winny być główną osią programową szkół). Że pozostały one aktualne dowodzi fakt, że w podstawowych dokumentach kongresu moskiewskiego odwoływano się — niemal paragraf po paragrafie — do poszczególnych uchwał Deklaracji z Tbilisi. Obecny Kongres miał już z natury rzeczy bardziej sprawozdawczy charakter (może nawet nieco biurokratyczny); odnotował nowe zjawiska na świecie, m.in. podkreślał związek walki o pokój z problematyką ochrony środowiska (bezpieczeństwa ekologicznego). Być może za mało na tym Kongresie mówiono o nowych metodach nauczania, choć przedstawiono uczestnikom odpowiedni ciekawy dokument. Jak się wydaje, Kongres moskiewski był pod wpływem nowej sytuacji na świecie, był bardziej konkretny oraz wykazał całkowite zrozumienie, także krajów Trzeciego Świata, dla sprawy bezpieczeństwa ekologicznego — czego nie było jeszcze po apelu U'Thanta w 1969 roku i po konferencji sztokholmskiej. Nakreślono także nowe konkretne plany i strategię do 1990 roku.

W sumie był to więc kongres potrzebny, udany i mający wielkie znaczenie dla walki o bezpieczeństwo ekologiczne świata. Należy obecnie skutecznie wykorzystać jego bogate materiały w Polsce.

III ŚRÓDZIEMNOMORSKA KONFERENCJA PARAZYTOLOGICZNA W JEROZOLIMIE (24-27 SIERPNIA 1987 R.)

Oprócz wielkich światowych kongresów, na których spotyka się tysiące uczonych z całego świata, niezwykle ważną rolę odgrywają także niewielkie konferencje naukowe gromadzące specjalistów z określonej dziedziny lub pracujących na dość ograniczonym i najczęściej niezbyt zróżnicowanym obszarze. Spotkania te cechuje najczęściej duża kameralność oraz ciekawe i twórcze dyskusje naukowe. Do takich zebrań naukowych należała niewątpliwie III Śródziemnomorska Konferencja Parazytologiczna, która odbyła się w dniach 24-27 sierpnia w Jerozolimie. Poprzednie konferencje miały miejsce: pierwsza w Izmirze w Turcji i była zorganizowana w 1977 r. przez Wydział Medycyny Uniwersytetu, a druga w Grenadzie w Hiszpanii i była zorganizowana w 1981 r. przez Hiszpańskie Towarzystwo Parazytologiczne i Instytut Parazytologii Lopez-Neyra. Dłuższy, sześcioletni okres między II i III Konferencją był wynikiem trudności organizacyjnych, których źródłem jest złożona sytuacja polityczna w rejonie Morza Śródziemnego. Ostatecznie III Konferencję zorganizowało Izraelskie Towarzystwo Parazytologiczne przy udziale Uniwersyteu Hebrajskiego w Jerozolimie, Centrum Kuvina dla Badań Chorób Zakaźnych i Tropikalnych oraz resortu zdrowia. Prezydentem Konferencji była prof. B. Feldman-Mühsam z Uniwersytetu Hebrajskiego, a głównym organizatorem prof. D. T. Spira z Wydziału Medycyny tegoż Uniwersytetu.

Konferencja zgromadziła ponad 100 uczestników, z których więcej niż połowę stanowili gospodarze. Najliczniejsze grupy zagraniczne to Hiszpanie — 12 osób i Francuzi — 11 osób. Z Wielkiej Brytanii przybyło 5 osób, Republiki Federalnej Niemiec — 4 osoby, Kanady — 3 osoby. Z Australii, Grecji, Kenii, USA po 2 osoby, a z Belgii, Polski, Szwajcarii, Szwecji, Włoch, Brazylii i Australii po jednej osobie.

Na Konferencji przedstawiono łącznie 98 komunikatów. Dominowały prace wiążące się z medycyną, głównie poruszające zagadnienia ważne dla zdrowia ludzi na obszarach tropikalnych i subtropikalnych. Tendencja ta zaznaczyła się już na sesji plenarnej, na której przedstawiono dwa referaty zamówione przez organizatorów. Prof. D. Mirelman przedstawił współczesne aspekty amebiazy, ze szczególnym uwzględnieniem różnic w patogenicznych właściwościach poszczególnych szczepów o różnej charakterystyce izoenzymatycznej. Dr D. F. Kuvin omówił znaczenie chorób pasożytniczych dla zdrowia człowieka oraz strategię ich zwalczania we współczesnym świecie.

Z doniesień szczegółowych, najliczniejsze były poświęcone: *Leishmania* i leiszmaniozom (23 komunikaty), *Plasmodium* — głównie *P. falciparum* i malarii (14 komunikatów), *Schistosoma* i schistomozom (8 komunikatów). Po kilka doniesień omawiało *Trypanosoma cruzi* i hydratidozy, zaś pojedyncze komunikaty dotyczyły trypanosom afrykańskich, pneumocystozy, kryptosporidiozy, toksoplazmozy, toksokarozy, strongylidozy, trichinellozy i innych. Komunikaty te były przedstawione na następujących sesjach: Biochemia pasożytów, Chemioterapia i leczenie chorób pasożytniczych, Immunologia i serologia, Interakcja pasożyt-komórka żywiciela, Antygeny i przeciwciała w chorobach pasożytniczych, Patologia tkanek w chorobach pasożytniczych. Ponadto odbyła się sesja poświęcona pamięci wybitnego parazytologa żydowskiego dr. Saula Adlera (1895-1966), powiązana z sesją na temat leiszmaniozy.

Drugi nurt Konferencji, omawiający pasożyty środowiska wodnego oraz zwierząt gospodarczych i dzikich, był obsadzony słabiej i zgromadził zaledwie ok. 1/4 wszystkich komunikatów, które były prezentowane na trzech sesjach: Pasożyty niższych kręgowców i bezkręgowce jako przenosiciele, Epizoocjologia chorób pasożytniczych i Pasożytnicze stawonogi i stawonogi jako przenosiciele.

Na Konferencji odbyła się także niewielka sesja posterowa.

Obrady Konferencji odbywały się w nowym ośrodku Uniwersytetu Hebrajskiego na Górze Scopus w północno-wschodniej części Jerozolimy ze wspaniałym widokiem na dolinę Cedronu, Stare Miasto i panoramę Jerozolimy, szeroko rozłożonej na licznych wzgórzach. Miejscem obrad były wygodne i funkcjonalne sale Klubu Uniwersyteckiego Maersdorffów, gdzie mieszkała również

większość uczestników. Stworzyło to dodatkowe wygody i sprzyjało przyjacielskiej atmosferze Konferencji, owocującej ożywionymi dyskusjami kularowymi. Należy tu także podkreślić wielką serdeczność gospodarzy, a szczególnie organizatora Konferencji Prof. D. T. Spira, oraz sekretarza biura organizacyjnego pani Sary Sher, która służyła pomocą w załatwianiu wszelkich trudnych spraw uczestników Konferencji.

Wszystkie wymienione czynniki i ciekawe obrady, przyjacielska i serdeczna atmosfera oraz niezwykle interesujące miejsce sprawiły, że III Śródziemnomorska Konferencja Parazytologiczna w Jerozolimie pozostała na trwałe w pamięci jej uczestników.

Stanisław L. Kazubski

PIERWSZA POLSKA KONFERENCJA APIDOLOGICZNA (TUREW, 22-24.04.1987)

W dniach 22-24 kwietnia 1987 r., odbyła się pierwsza konferencja poświęcona dziko żyjącym pszczołowatym (*Apoidea*). Miejscem obrad była Stacja Badawcza Zakładu Biologii Rolnej i Leśnej PAN w Turwi k. Kościana (woj. leszczyńskie).

Wzrastające zainteresowanie tymi owadami jako zapylaczami upraw, a co za tym idzie zwiększona intensywność badań nad ich biologią i ekologią stworzyła sytuację, w której konieczna jest okresowa wymiana doświadczeń i poglądów w tym zakresie. Konferencja w Turwi była pierwszym tego typu spotkaniem, a jej przebieg, interesujące referaty i ciekawe dyskusje pozwalają żywić nadzieję, że zapoczątkuje ona systematyczne spotkania grupy polskich apidologów. W spotkaniu uczestniczyło 20 osób. Wygłoszono 9 referatów. Odbyła się projekcja przezroczy i pokaz sprzętu badawczego Stacji w Turwi.

Merytoryczną część konferencji poprzedziło wystąpienie kierownika Zakładu Biologii Rolnej i Leśnej PAN w Poznaniu, prof. L. Ryszkowskiego, który zapoznał uczestników obrad z problematyką kierowanej przez siebie placówki. Z kolei kierownik Stacji Badawczej w Turwi dr J. Karg, przedstawił niektóre wyniki badań entomologicznych prowadzonych na obszarze projektowanego Parku Krajobrazowego w Turwi.

Po wstępnych referatach zabrał głos doc. J. Banaszak, którego referat był już ściśle związany z tematyką apidologiczną i omawiał metody określania liczebności pszczołowatych. Badania tego typu podjęto po drugiej wojnie światowej. Wcześniej badacze rejestrowali jedynie skład gatunkowy fauny, ewentualnie podając liczbę złowionych okazów. Wzrost zainteresowania produkcją nasion roślin pastewnych spowodował podjęcie licznych badań nad zapylaniem tych roślin. Dla praktyki rolniczej ważna jest znajomość liczebności owadów zapylających. Autor referatu przedstawił metody ilościowe pozwalające na określenie zagęszczenia *Apoidea*, a szczegółowo omówił opracowaną przez siebie metodę pasów (transektów liniowych). Polega ona na przejściu przez badany teren i liczeniu (ewentualnie odławianiu) napotkanych owadów z powierzchni 200 m². Liczenie pszczół z określonej powierzchni nie jest rzeczą nową, jednak do tej pory powierzchnię objętą liczeniem przyjmowano dość dowolnie. Raz było to 50 m², u innego autora 100 m² itp. Dlatego też wyniki uzyskane przez różnych badaczy były rozbieżne i nierzadko wręcz błędne. Uwzględniając skupiskowy rozkład owadów autor ustalił doświadczalnie, że wielkość jednej, powtarzalnej próby powinna obejmować owady z powierzchni 200 m². Owady liczy się przechodząc odcinek 200 m o szerokości 1 m. Tempo marszu wynosi około 10 m/min i jest zależne od struktury roślinności i zagęszczenia owadów. Badania należy wykonywać przy słonecznej pogodzie, niezbyt silnym wietrze i w temperaturze powyżej 20°C, w godzinach 10-16. Należy też uwzględnić specyfikę kwitnienia i nektarowania roślin. W referacie przedstawiono też inne stosowane metody określania zagęszczenia, m.in. metodę kwadratów i metodę wybierania owadów spod izolatorów. Metody te są jednak zbyt pracochłonne, zważywszy że dane powtarzalnie uzyskuje się, jak udowodnił referujący, przy objęciu liczeniem dopiero powierzchni 200 m². Omówiono też metody wspomagające, z których metoda pułapek barwnych (misek Mericiego)

wydaje się najlepsza, dostarczając danych o składzie gatunkowym oraz dynamice pojawu poszczególnych gatunków.

Referat doc. Banaszaka wywołał żywą dyskusję dotyczącą metod określania zagęszczeń zwierząt. Niespełnionym dotąd marzeniem biologów jest możliwość określania bezwzględnych liczebności i zagęszczeń wielu grup zwierząt i dlatego każda nowa metoda pozwalająca zbliżyć się do takich wyników jest bardzo pożądana. Jednocześnie zwrócono uwagę na takie problemy przy liczeniu *Apoidea* jak miąższość badanego biotopu. Jak porównywać wyniki uzyskane np. na łące i w wielopiętrowym lesie? W takich wypadkach metoda pasów powinna być modyfikowana lub wspomagana innymi metodami, np. w wypadku lasu pułapkami barwnymi.

Kolejny referat przedstawił prof. F. Wójtowski. Omawiał on problemy reintrodukcji dziko żyjących pszczół jako funkcjonalnego elementu krajobrazu. W liczebności tych owadów obserwuje się znaczne wahania w poszczególnych latach, które są uwarunkowane kompleksem czynników klimatyczno-ekologicznych, na ogół jednak liczba tych pożytecznych owadów ustawicznie maleje wskutek stosowania nowoczesnych metod agrotechnicznych i chemicznych oraz likwidowania naturalnych ostoi tych owadów. Dla zapobieżenia temu zjawisku stosuje się ochronę naturalnych siedlisk, uprawę roślin entomofilnych oraz prowadzi się sztuczne rozmnażanie pszczół samotnych i trzmieli. Najlepsze rezultaty uzyskano w sztucznej hodowli trzmieli oraz *Megachile rotundata* i *Nomia meanderi*. W przeciwieństwie do introdukcji nie stosowano dotąd planowo reintrodukcji. Szczególnie nadają się do tego celu pszczoły z rodziny *Megachilidae*. Przy reintrodukcji tych owadów muszą być dobrze znane wymagania pokarmowe. Najlepiej poznano je u polielektycznych gatunków *Osmia rufa* i *O. coerulea*. I tak np. *O. rufa* dla zaprowiantowania ok. 20 komór lęgowych musi odwiedzić 8360-12320 kwiatów jabłoni, a *O. coerulea* analogicznie — 81312-89200 kwiatów. Materiał hodowlany uzyskuje się z pułapek gniazdowych (sztuczne gniazda) rozstawionych w miejscach bytowania poświadczonych gatunków pszczół. Zasiedlone pułapki pozostawia się do pierwszych przymrozków, a następnie przenosi do miejsc zabezpieczonych przed wilgocią i przed ptakami. Zimą przeprowadza się selekcję oprzędów (usuwa się martwe i spasożytowane). Wyselekcjonowane, zdrowe oprzędy przechowuje się w chłodniarce w temperaturze +4°C. Metoda ta pozwala w szerokim zakresie czasu regulować terminy wylotu pszczół, stosownie do zakwitów roślin żywicielskich. O określonej porze — głównie w marcu — oprzędy przekłada się do inkubatora, gdzie następuje wylot *imagines*. Inkubator umieszcza się między sztucznymi gniazdami tak, aby pszczoły mogły w nich znaleźć schronienie. Pułapki można zlokalizować w centrum gospodarstwa rolnego na nasłonecznionej ścianie budynku, gdzie okap dachu zabezpieczy pszczoły przed deszczem. Chociaż rozródność omawianych gatunków jest duża, to jednak przystępując do reintrodukcji należy dysponować liczbą przynajmniej kilkuset oprzędów, aby zagwarantować samodzielną reprodukcję i przyrost pogłowia. W dwóch pierwszych latach należy śledzić dynamikę zasiedlania sztucznych gniazd oraz wzrostu liczebności w naturalnym siedlisku. Coroczny przyrost będzie świadczył o zaadaptowaniu się reintrodukowanej populacji. Podsumowując rozważania na temat reintrodukcji dzikich pszczołowych prof. Wójtowski podkreślił podstawowe cele jakie ma do spełnienia reintrodukcja pszczół samotnych, a mianowicie: przywrócenie krajobrazowi rolniczemu jego nieodłącznego i funkcjonalnego elementu jakim są dziko żyjące pszczołowate; stworzenie im możliwości egzystencji w środowisku, do którego się w przeszłości przystosowały; doprowadzenie do samodzielnej reprodukcji reintrodukowanych populacji, które mogą stać się źródłem ekspansji tych owadów do nowych środowisk.

Podobną tematyką zajął się w swoim wystąpieniu dr M. Biliński, który omówił badania nad chowem i wykorzystaniem pszczół samotnic. Stwierdził on, że mała liczba dziko żyjących pszczołowych nie wystarczy do uzyskiwania opłacalnych plonów nasion roślin, których pszczoła miodna nie potrafi zapylać, np. lucerny (rocznie sprowadza się 2000 ton nasion za ok. 6 milionów dolarów). Istnieje więc konieczność hodowania gatunków zapylających te rośliny. Z uwagi na trudności w hodowaniu pszczół gnieźdzących się w ziemi, zajęto się głównie niektórymi mieszkami (*Megachilidae*). Początkowo gniazda budowano z różnych materiałów. Obecnie w Polsce podjęto produkcję nowoczesnych gniazd roboczych, według wzorów amerykańskich.

Materiał hodowlany uzyskiwano początkowo przez wystawianie pułapek gniazdowych, a potem przez odławianie na kwiatach i przenoszeniu do izolatorów ustawionych na lucernie, nostryku białym i facelli. Zimowanie kokonów odbywa się w chłodniarce, w temperaturze $+4^{\circ}\text{C}$ i wilgotności względnej 40%. Komórki zawierające larwy przenosi się na około trzy tygodnie przed spodziewanym kwitnieniem lucerny do pomieszczeń o temperaturze 30°C i wilgotności 70% i przetrzymuje się tam aż do wylotu dorosłych owadów. Pszczoły wypuszcza się na plantacjach lucerny koło megachilników (specjalne konstrukcje ze sztucznymi gniazdami). Z plantacji megachilniki zabiera się po zakończeniu kwitnienia lucerny, a wyselekcjonowane komórki z larwami przenosi do zimowli. Chów w namiotach z siatki daje rocznie trzy-sześciokrotny przyrost wielkości populacji. Są natomiast jeszcze trudności z chowem wolnym. Na osiem doświadczeń tylko w jednym wypadku otrzymano wzrost liczby pszczoł. Hodowane miesierki mogą zapylać również wykę, koniczynę białą i czerwoną oraz mogą być wykorzystywane w szklarniach. Obecnie prowadzone badania w Puławach skupiają się na zwiększaniu procentu samic, możliwości przerywania lub przedłużania inkubacji oraz nad opracowaniem chowu różnych gatunków miesierek. Referujący stwierdził, że aby uzyskać konkretne efekty ekonomiczne należałoby stworzyć specjalną stację zajmującą się hodowlą miesierek lub innych pszczoł i świadczącą usługi plantatorom. Na zakończenie autor przedstawił produkowane w Polsce gniazda, a na prezencjach zaprezentował warunki hodowli w terenie.

Kolejnym referatem, traktującym o praktycznym wykorzystaniu dzikich pszczołowatych, był referat dr Z. Wilkańca na temat możliwości wykorzystania pszczoły *Osmia rufa* w zapylaniu roślin uprawnych. Gatunek ten jest polifagiczny. Zbiera pyłek i nektar z kwiatów większości gatunków drzew i krzewów owocowych. Z gospodarczego punktu widzenia ważna jest nie tylko znajomość gatunków roślin odwiedzanych przez pszczoły, lecz głównie wydajność i efektywność ich pracy na kwiatach roślin uprawnych. Autor przeprowadził badania na koniczynie czerwonej i soi. Stwierdził, iż *O. rufa* nie ustępuje w skuteczności zapylania koniczyny tak dobrym zapylaczom jak trzmiele, a nawet przewyższa je równomiernością zapylania kwiatów. Równie korzystne wyniki uzyskano w doświadczeniu z soją, w którym rośliny oblatywane przez *O. rufa* dawały czterokrotnie większą liczbę strąków niż rośliny kontrolne nie zapylane przez owady. Dr Wilkaniec przedstawił również wstępne wyniki badań nad zapylaniem jabłoni przez *O. rufa*. Największą liczbę związków i dojrzałych owoców miały rośliny zapylane przez *O. rufa*, która wyprzedziła w skuteczności zapylania pszczołę miodną. Tak więc wartość użytkowa tego gatunku pszczoły predysponuje go do kontrolowanego chowu na większą skalę i stosowania jako czynnika uzupełniającego działalność zapylającą pszczoły miodnej.

Zagadnienie pasożytnictwa, które pojawiało się często w referatach dotyczących hodowli pszczoł samotnych rozszerzyła w swoim wystąpieniu dr B. Szymaś. Pszczoły dziko żyjące mają wyjątkowo dużo pasożytów, nawet przedstawicieli własnej rodziny. W miejscach dużej koncentracji populacji, np. w pułapkach gniazdowych pojawia się znaczna liczba pasożytów. Ich szkodliwa działalność może z czasem doprowadzić do osłabienia, a nawet wyniszczenia populacji hodowanych pszczoł. Zwalczanie pasożytów jest dużym problemem i stosuje się tu różne sposoby, mniej lub bardziej skuteczne. Dla niszczenia *Coelioxys* i bleskotek (*Chalcididae*) skonstruowano pułapkę z lampą ultrafioletową. Pasożyty mogą być przynęcane do powierzchni pokrytych lepem, a sztuczne lęgowiska, w których spędzają noc nasycą się insektycydem. Dla wychwytywania chrząszczy stosuje się specjalne urządzenia pułapkowe w inkubatorach, uniemożliwiające im równoczesne wyjście z wygryzającymi się z oprzędów pszczołami. W tępieniu barciela (*Trichodes*) skuteczna jest pułapka przynętowa z pyłkiem kwiatowym umiejscowiona na trasie lotu pszczoł do pułapek gniazdowych. Skutecznym sposobem jest zastosowanie rozbieralnych pułapek gniazdowych, co umożliwia selekcję oprzędów i likwidowanie oprzędów pasożytowanych. Wystąpienie było ilustrowane zdjęciami różnych gatunków pasożytów. Referat dr B. Szymaś zamknął serię referatów o hodowli i praktycznym wykorzystaniu dziko żyjących Apoidea.

Badania podstawowe reprezentował referat doc. J. Banaszaka omawiający wpływ struktury krajobrazu rolniczego na zróżnicowanie i zagęszczenie pszczoł. W mozaice różnorodnych

elementów krajobrazu referujący wyróżnił dwie grupy: miejsca refugialne (ostojowe) pszczoł, jak lasy, zadrzewienia śródpolne, miedze, przydroża i biotopy pokarmowe — użytki rolne. Układ ten — pola jako źródła obfitego pokarmu oraz środowiska ostojoye jako refugia fauny — decyduje o bogactwie i przetrwaniu pszczołowatych. Przedstawione prawidłowości mogą mieć praktyczne znaczenie w kształtowaniu krajobrazu rolniczego. Należy dążyć do skonstruowania odpowiednio bogatej struktury krajobrazu: pól uprawnych, łąk, zadrzewień, zachowania przydroży, miedzi i innych tzw. nieużytków. Powstaje pytanie w jakich proporcjach powinny występować poszczególne elementy krajobrazu aby zapewnić przeżycie, odpowiednią ilość i zróżnicowanie gatunków owadów zapylających. Autor, wykorzystując wcześniejsze oceny zagęszczeń *Apoidea* biotopów refugialnych na obszarze Niziny Wielkopolsko-Kujawskiej, przedstawił próbę odpowiedzi na to pytanie. Dla trzech typów krajobrazu rolniczego o jednakowej powierzchni (1406 ha), różniących się jednak stosunkiem środowisk refugialnych do powierzchni pokarmowych, wyliczono całkowitą liczbę żyjących tu *Apoidea*. Są to dane szacunkowe, mogą jednak zilustrować wpływ struktury krajobrazu na zasoby fauny danego obszaru. Następstwem dziesięciokrotnej przewagi pól i łąk nad środowiskami refugialnymi (tylko 9% powierzchni) są niższe o ok. 100% zasoby pszczołowatych w stosunku do krajobrazów, gdzie refugia zajmowały 22% i 38% powierzchni. W krajobrazie takim zasoby fauny pszczołowatych są niewystarczające (ok. 25 os/ha). Powiększenie areалу środowisk ostojoych do ok. 20% powierzchni powoduje podwojenie ogólnej liczby zapylaczy. Dalsze zwiększanie powierzchni tych środowisk (zwłaszcza leśnych) nie daje już tak znacznych rezultatów. Można więc przyjąć, że najkorzystniejszy dla bogactwa fauny owadów zapylających jest krajobraz, w którym udział obszarów refugialnych wynosi ok. 25%. Autor podkreślił również, że duże znaczenie, obok przydroży i zadrzewień, mają tereny samych wsi, które należy także traktować jako tereny refugialne dla *Apoidea*. Występujące tam parki podworskie, przydroża, środowiska ruderalne, ogródki przydomowe stwarzają bogatą bazę pokarmową i doskonałe warunki dla gniazdowania pszczoł.

Z powyższym referatem ściśle korespondował referat dr. T. Pawlikowskiego p.t. „Wpływ organizacji siedliska na strukturę zgrupowań dzikich pszczołowatych (*Hymenoptera*, *Apoidea*)”. Autor przedstawił w swoim wystąpieniu badania prowadzone na obszarach leśnych Kotliny Toruńskiej. Badania obejmowały dwie grupy biocenoz różniące się przestrzenną organizacją roślinności: rozległe murawy kserotermiczne z uwzględnieniem odsłoniętych wydmy i wrzosowisk oraz zbiorowiska leśne monokultury sosnowych i rezerwatu łąkowego. Z biocenoz murawowych odsłonięta wydma stanowiła najprostszą formę siedliska wydmowego. W wyniku sukcesji wkraczał pionierski zespół *Spergulo-Corynephorum* w stadium inicjalnym i optymalnym, następnie dochodziło do wytworzenia muraw trawiasto-turzycowych zespołu *Festuco-Koelerietum*. W zbiorowiskach leśnych wytypowano 5 biocenoz stanowiących ciąg rozwojowo-sukcesyjny, a mianowicie: murawę z sadzonkami sosny, 10-20-letni młodnik sosnowy, 80-letni bór suchy, 160-180-letni bór mieszany i 200-letni łąk. W wyznaczonych typach biocenoz w pięciu sezonach wegetacyjnych przeprowadzono badania jakościowe i ilościowe (m.in. metodą pasów). Wyodrębnione zgrupowania przedstawiały różne zmiany kierunkowe sukcesji. Etap zmian progresywnych obejmowały wszystkie typy muraw począwszy od odsłoniętej wydmy, a skończywszy na zespole *Festuco-Koelerietum*. W tym etapie zmian liczba gatunków wzrosła dziesięciokrotnie, podczas gdy zagęszczenie kształtowało się na podobnym poziomie. Jako etap zmian regresywnych w sukcesji uwzględniono wrzosowisko *Arctostaphylo-Callunetum*. Odnotowano tutaj trzy- do pięciokrotny spadek liczby gatunków względem zgrupowań z ukształtowanych muraw, podczas gdy zagęszczenia pozostały podobne. Analizując podobieństwo struktury wyodrębnionych zgrupowań metodą dendrytu autor stwierdził, że ulegają one podobnej koncentracji w wyraźną grupę charakterystyczną dla muraw wydmowych. W drugiej grupie biocenoz (biocenozy leśne) autor wykazał następujące zależności: od fazy nieleśnej do leśnego zespołu klimakсового (*Tilio-Carpinetum*) występował wyraźny spadek liczebności gatunków i ich zagęszczeń. Na podstawie wartości zagęszczeń z siedlisk tego szeregu rozwojowego stwierdzono, że istotna zmiana w organizacji zgrupowań pszczołowatych następuje dopiero po całkowitym przeorganizowaniu się zespołu roślinnego z murawowo-zaroślowego na leśny. Autor zasugerował, że opisaną zależność

struktury zgrupowań dzikich pszczołowatych od organizacji ich siedlisk można wykorzystać do optymalizacji mozaikowości krajobrazu kulturowego.

Przedstawiona wyżej tematyka referatów uwidacznia kierunki i stan badań w zakresie dziko żyjących *Apoidea*. Obejmuje szerokie spektrum problemów, jakie poruszano na tej konferencji, poczynając od badań nad wykorzystaniem wybranych gatunków pszczół a skończywszy na zagadnieniach konstruowania krajobrazu. Istotne wydaje się to, że przedstawione tu badania reprezentowały oprócz wartości teoretyczno-naukowych konkretne dane do wykorzystania w praktyce rolniczej i ekologicznej.

Tomasz Cierznia

JERZY BAŃBURA

SELEKCJA PROPORCJI PŁCI*

R. A. Fisher jest twórcą akceptowanych do dzisiaj poglądów na kształtowanie się proporcji płci. Głównym wynikiem jego rozważań jest to, że dobór naturalny działa zasadniczo w kierunku ustabilizowania się w populacjach proporcji płci 1:1. Do takiego wyniku prowadzi następujące, dobrze przemawiające do intuicji rozumowanie. Jest oczywiste, że każda zygota ma jednego ojca i jedną matkę. Jeśli wyobrazimy sobie sytuację, w której jedna płeć dominuje ilościowo to musimy uznać, że przeciętny osobnik płci rzadszej zostawia więcej potomków niż osobnik należący do płci o większej częstotliwości. Osobniki płci rzadszej uzyskują w ten sposób oczywistą przewagę selekcyjną, która prowadzi do zwiększenia się ich częstotliwości i ostatecznie do osiągnięcia stanu równowagi. Takie rozumowanie, ujęte w ramy formalnych modeli genetyki populacyjnej, okazało się słuszne w szerokim spektrum cykli życiowych roślin i zwierząt.

Kolejnym krokiem w analizie kształtowania się proporcji płci było włączenie do modeli możliwości asymetrycznej migracji między subpopulacjami. Można tu podać przykład szczególnego przypadku takiego zjawiska. Wyobrazmy sobie dwie subpopulacje jakiegoś hermafrodytycznego gatunku roślin, z których pierwsza wysyła pyłek do drugiej, ale na skutek dominującego kierunku wiatru przenoszącego pyłek zjawisko przeciwne jest bardzo ograniczone. Doprowadza to do konkurencji o zapylenie między pyłkiem lokalnym i pyłkiem imigracyjnym. Przy braku wymiany nasion między subpopulacjami można oczekiwać, że selekcja powinna doprowadzić w populacji drugiej do intensyfikacji funkcji rozrodczych żeńskich (produkcja nasion) i obniżenia funkcji męskich (produkcja pyłku), gdyż nasiona nie konkurują. Taki przypadek asymetrycznej migracji może być uogólniony na gatunki dwupienne z jedną płcią migrującą.

Warunki uwzględnione w modelach z jednokierunkową migracją są krytyczne dla testowania teorii Fishera i jego następców. Jeśli bowiem wynik będzie odbiegał od stosunku 1:1 to ogólność wyników wspomnianych teorii uległaby podważeniu. Analiza odpowiedniego modelu genetycznego podzielonej populacji haploidalnego hermafrodytycznego gatunku z dwoma allelami wpływającymi na proporcję płci wskazuje, że stosunek 1:1 jest ogólnym wynikiem uzyskiwanym w bardzo szerokim zakresie warunków wstępnych, naśladujących różne wzorce migracji. Model ten jest również ogólny w odniesieniu do genetycznego i środowiskowego systemu determinacji płci. Wynika to z faktu, że w stanie równowagi częstości alleli w obydwu subpopulacjach są równe, co powoduje brak zmiany równowagowej proporcji płci na skutek przepływu genów.

JERZY BAŃBURA

DLACZEGO ŻÓŁWIE ŻYJĄ TAK DŁUGO?*

Znaczna część okazów różnych gatunków żółwi osiąga ponad 50 lat. Wiadomo, że w ogrodach zoologicznych maksymalny wiek żółwia greckiego (*Testudo grecca*) wynosi 54-57 lat, żółwia olbrzymiego (*Geochelone gigantea*) 62-63 lata, a żółwia błotnego (*Emys orbicularis*) ponad

*M. Kirkpatrick i J. J. Bull. Sex-ratio selection with migration: does Fisher's result hold? *Evolution* 41:218-221, 1987.

* J. W. Gibbons. Why do turtles live so long? *BioScience* 37: 272-269, 1987.

70 lat. Skrupulatne notatki pozwalają sądzić, że żółw olbrzymi schwytany jako dorosły już okaz w 1766 r. osiągnął w warunkach hodowlanych w brytyjskim forcie na wyspie Mauritius (Ocean Indyjski) ponad 150 lat, kiedy padł w 1918 r.

Długość trwania życia w warunkach naturalnych jest jednak wypadkową fizjologicznej długowieczności i pewnych procesów demograficznych, jak zależny od wieku przebieg śmiertelności. W efekcie ustala się maksymalny wiek ekologiczny. Badanie tego zagadnienia w wolno żyjących populacjach żółwi polega na obserwacjach zwierząt znakowanych i wnioskowaniu, na podstawie informacji, o wieku zwierząt ustalonym w oparciu o struktury morfologiczne zmieniające się z wiekiem. Do takich struktur należą płytki pancerza, odznaczające się rocznymi przyrostami wykształconymi w postaci kolejnych pierścieni.

Długoterminowe badania prowadzone w stanach Południowa Karolina i Michigan (USA) pozwoliły na skonstruowanie tabel przeżywania i określenie długości życia takich gatunków żółwi, jak *Trachemys scripta*, *Chrysemys picta*, *Deirochelys reticularia*, *Kinostemon subrubrum*, *Chelydra serpentina* i *Emydoidea blandingi*. Zasadniczy wynik był nieco zaskakujący, gdyż jak się okazało ogromna większość osobników ginie przed osiągnięciem wieku 30 lat. Ustalono, że do najistotniejszych czynników kształtujących śmiertelność tych gatunków należy działanie drapieżców, niskie temperatury oraz susza. W zasadzie nie ma faktów świadczących o tym, że żółwie starzeją się fizjologicznie.

Można się zatem zastanawiać czy długowieczność żółwi jest tylko mitem. Obserwacje w ogrodach zoologicznych mogą bowiem odzwierciedlać tylko wyjątkową zdolność żółwi do znoszenia warunków niewoli, a nie długowieczność, którą odznaczają się w naturze. Chociaż dostępne obecnie dane nie umożliwiają pełnego rozstrzygnięcia tego problemu, to wydaje się jednak jasne, że żółwie mają rzeczywiście wiele cech sprzyjających długiemu życiu. Jako zwierzęta zmienneocieplne mają one niskie tempo metabolizmu w porównaniu z ptakami i ssakami. Tempo metabolizmu jest niewątpliwie związane z procesami starzenia. Ponadto zwierzęta te spędzają w stanie braku jakiejkolwiek aktywności około pół roku. Dokonują również inwestycji fizjologicznych prowadzących do zabezpieczenia dorosłych osobników przed drapieżcami. Wymienimy tu duże rozmiary dojrzałych płciowo okazów osiągane dzięki dłuższemu okresowi dojrzewania oraz wykształcenie potężnego pancerza. Ponadto, długie trwanie życia umożliwia także bilansowanie, zmieniających się w surowych (zmiennych) warunkach naturalnych, efektów rozrodu.

JERZY BAŃBURA

ZMIENNOŚĆ PRZYSTOSOWAWCZA GENETYCZNEJ I ŚRODOWISKOWEJ DETERMINACJI PŁCI U RYBY *MENIDIA MENIDIA**

Ateryna (*Menidia menidia*) jest niewielką rybą z rzędu okoniokształtnych, zasiedlającą przybrzeżne wody Atlantyku. Gatunek ten charakteryzuje się środowiskową determinacją płci. Ściśle mówiąc, środowiskowa determinacja płci ma zwykle komponent genetyczny i wynika z interakcji genów płci ze środowiskiem. Ta cecha biologii ateryny stwarza bardzo dogodną okazję do testowania hipotez wyjaśniających kształtowanie się proporcji płci drogą doboru naturalnego. Adaptacyjna interpretacja proporcji płci może tu być klarowniejsza niż wtedy, gdy wchodzi w grę mechanizm chromosomalny. Mechanizm chromosomalnej determinacji płci działa bowiem jak rodzaj ograniczenia konstrukcyjnego, które niejako wymusza stosunek 1:1 w związku z faktem, że zapłodnienie komórki jajowej dające w wyniku zygotę o kariotypie homo- bądź heterogamicznym jest równie prawdopodobne.

* D. O. Conover i S. W. Heins. Adaptive variation in environmental and genetic sex determination in a fish. *Nature* 326: 496-498, 1987.

Uważa się, że środowiskowa determinacja płci ma wartość adaptacyjną wtedy, gdy środowisko, do którego wprowadzane jest potomstwo ma zależny od płci wpływ na dostosowanie (fitness) osobników. W przypadku ateryiny (i wielu innych ryb) duże rozmiary ciała mają większe znaczenie dla sukcesu rozrodczego samic niż samców, toteż optymalną taktyką osobników natrafiających na warunki dogodne dla wzrostu jest zostanie samicą, zaś w warunkach niekorzystnych samcem. Krytycznym czynnikiem środowiskowym jest to zmieniająca się sezonowo temperatura panująca podczas rozwoju larwalnego. Powoduje to, że potomstwo produkowane we wczesnym okresie sezonu rozrodczego składa się głównie z samic, a w późniejszym czasie z samców. Samice zyskują w ten sposób dłuższy czas na wzrost.

Zastosowanie teorii doboru naturalnego do wyjaśniania kształtowania się proporcji płci pozwala na wyprowadzenie dwóch poddających się testowaniu empirycznemu przewidywań: 1) gdy populacje zasiedlają regiony geograficzne różniące się przeciętną temperaturą, to powinny one wykształcić mechanizmy umożliwiające odpowiednio zróżnicowaną reakcję proporcji płci na temperaturę; 2) znaczenie środowiskowej składowej determinacji płci (tzn. maksymalna zmiana proporcji płci związana z temperaturą) powinno się zmniejszać z rosnącą szerokością geograficzną. Inaczej mówiąc, można się spodziewać, że populacje ateryiny z różnych części jej areалу występowania (na wschodnim wybrzeżu Ameryki występuje od Florydy do Quebecu) powinny reagować wykształceniem proporcji płci 1:1 na różne temperatury i, przy przesuwaniu się z południa na północ, udział temperatury w determinacji płci powinien się zmniejszać na korzyść komponentu genetycznego.

Obydwa przypuszczenia zostały w pełni potwierdzone. Badane eksperymentalnie w różnych temperaturach osobniki pochodzące z różniących się populacji geograficznych wykazywały odmienną, zależną od temperatury reakcję proporcji płci. W grupie osobników pochodzących z najbardziej na północ wysuniętej populacji proporcja płci nie wykazywała zależności od temperatury. Ten ostatni fakt znalazł wyjaśnienie, gdy testowano drugie z wymienionych przewidywań. Okazało się, że poziom środowiskowej determinacji płci jest zależny od długości sezonu wzrostu, który w przypadku Nowej Szkocji jest tak krótki, że taktyka czasowej segregacji płci traci znaczenie i komponent genetyczny rośnie do wartości bliskiej 100%.

СОДЕРЖАНИЕ

Ежи З. Новак — Мембранные рецепторы а превращения фосфоинозитидов: трифосфат инозитола и диацетоглицерол как вторичные передатчики информации	339
Мирослава Мельзацка — Плавность мембраны а состояние мембранного рецептора	379
Анджей Шмигельски — Циклические нуклеотиды и фосфорилирование мембран . .	393
Марцин Каминьски — Нейроцит	411
Лешек Янишевский — Йонные мембранные феномены в возбудимых клетках . .	443
Ремигюш Тарнецки — Техники стимуляции и регистрации применяемые в исследованиях нервной системы	449
Иоланта Скангель-Крамска — структура никотинового холинергического рецептора	475

CONTENTS

Jerzy Z. Nowak — Membrane receptors and metabolism of phosphoinositides: inositol triphosphate and diacylglycerol as second messengers	339
Mirosława Melzacka — Membrane fluidity and membrane receptors	379
Andrzej Szmigielski — Cyclic nucleotides and phosphorylation processes in the cell membrane	393
Marcin Kamiński — The neurocyte	411
Leszek Janiszewski — Membrane ionic mechanisms in excitable cells	443
Remigiusz Tarnecki — Stimulation and registration techniques in application to the nervous system	449
Jolanta Skangiel-Kramska — The structure of nicotinic acetylcholine receptor	475

SPIS TREŚCI

<i>Jerzy Z. Nowak</i> — Receptory błonowe a przemiany fosfoinozydów: trifosforan inozytolu i diacyloglicerol jako drugie przekaźniki informacji	339
<i>Mirosława Melzacka</i> — Płynność membrany a stan receptora błonowego	379
<i>Andrzej Szmigielski</i> — Cykliczne nukleotydy i fosforylacja błon	393
<i>Marcin Kamiński</i> — Neuron	411
<i>Leszek Janiszewski</i> — Jonowe zjawiska błonowe w komórkach pobudliwych	443
<i>Remigiusz Tarnecki</i> — Techniki stymulacji i rejestracji stosowane w badaniach układu nerwowego	449
<i>Jolanta Skangiel-Kramska</i> — Budowa cholinergicznego receptora nikotynowego	475

RECENZJE

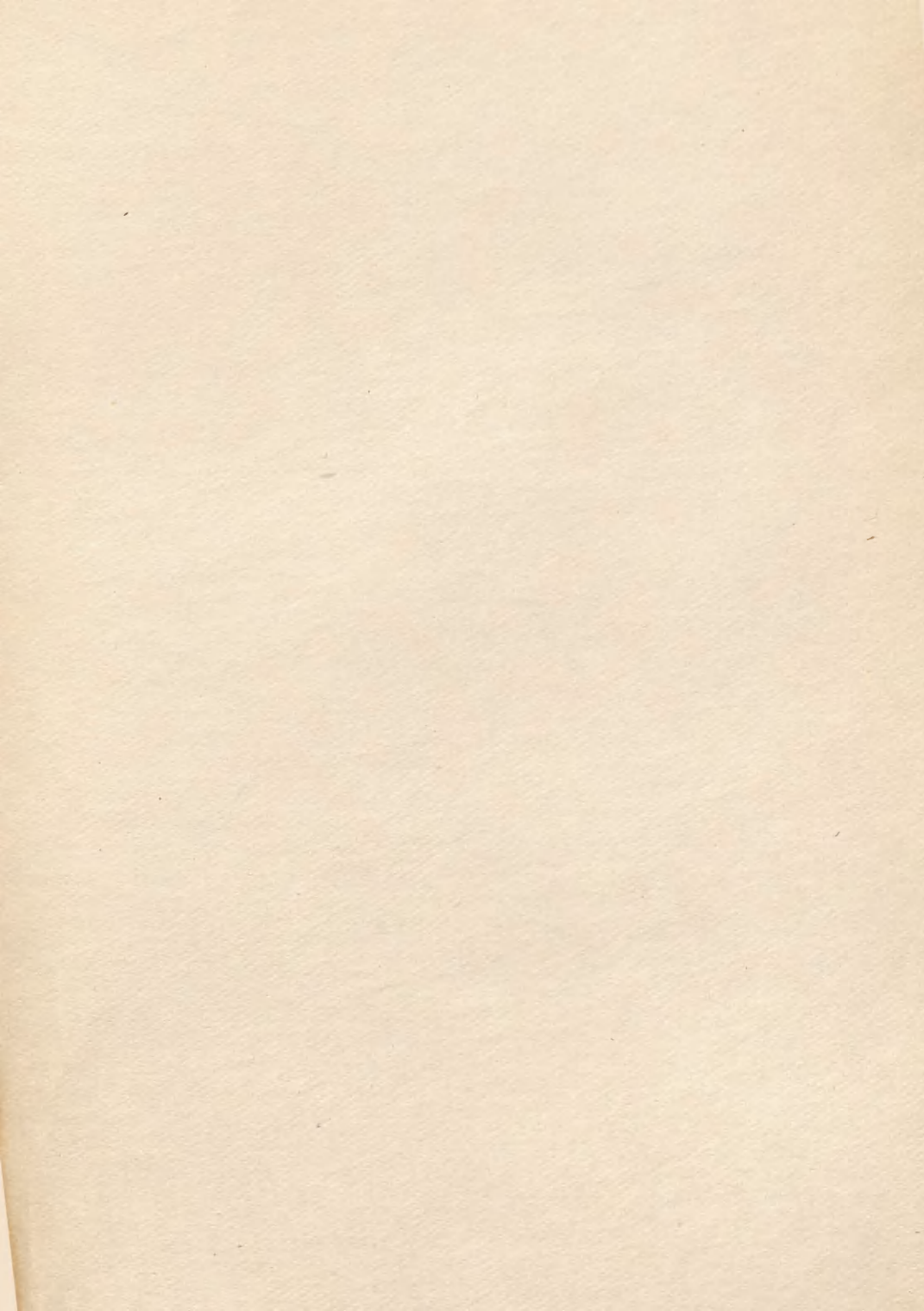
<i>Włodzimierz S. Ostrowski</i> — W. J. H. Kunicki-Goldfinger: Genetyka — wizje urzekające i groźne	497
<i>Eugeniusz Kośmicki</i> — K. Łastowski: Rozwój teorii ewolucji. Studium metodologiczne	497
<i>Adam Nadchowski</i> — D. Jánossy: Pleistocene vertebrate faunas of Hungary	500
<i>Napoleon Wolański</i> — Przystosowanie populacji ludzkich do środowiska	501

ZEBRANIA, ZJAZDY I KONFERENCJE NAUKOWE

<i>Włodzimierz Michajłow</i> — Drugi Międzynarodowy Kongres Edukacji Środowiskowej UNEP i UNESCO, Moskwa	507
<i>Stanisław L. Kazubski</i> — III Śródziemnomorska Konferencja Parazytologiczna w Jerozolimie	511
<i>Tomasz Cierzniaś</i> — Pierwsza polska konferencja apidologiczna, Turew	512

Z INNYCH CZASOPISM

<i>Jerzy Bańbura</i> — Selekcja proporcji płci	517
<i>Jerzy Bańbura</i> — Dlaczego żółwie żyją tak długo?	517
<i>Jerzy Bańbura</i> — Zmienność przystosowawcza genetycznej i środowiskowej determinacji płci u ryby <i>Menidia menidia</i>	518



**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 doręczyciele na wsi oraz Oddziały „Praca-Książka-Ruch” w miastach.

Prenumeratę ze zleceniem wysyłki za granicę przyjmuje RSW „Praca-Książka-Ruch”, Centrala Kolportażu Prasy i Wydawnictw, ul. Towarowa 28, 00-958 Warszawa, konto PKO BP XV Oddział w Warszawie Nr 1658-201045-139-11. Wysyłka za granicę pocztą zwykłą jest droższa od prenumeraty krajowej o 50% dla zleceniodawców 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 Ośrodka 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
