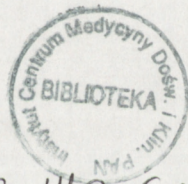


Robert Piotr Strosznajder

DEGRADACJA FOSFOLIPIDÓW INOZYTOŁOWYCH W MECHANIZMIE CHEMORECEPCJI
KŁĘBKÓW SZYJNYCH U KOTA



XS 140 (dublet)
H3103

Praca na stopień doktora nauk przyrodniczych

Promotor: doc. dr hab. n. med. Mieczysław Pokorski

Zakład Neurofizjologii, Instytut - Centrum Medycyny
Doświadczalnej i Klinicznej Polskiej Akademii Nauk

Warszawa 1995

Praca składa się z:

114 stron tekstu

19 rycin

4 schematów

6 tabel

175 pozycji piśmiennictwa

Badania przedstawione w tej pracy finansowane
były z działalności statutowej Zakładu Neurofizjologii
Instytutu C M D i K PAN oraz częściowo z grantu
Komitetu Badań Naukowych nr 1355/P2/92/02.

S P I S T R E Ś C I

I.	WSTĘP.....	1
1.	Kłębki szyjne.....	1
2.	Anatomia kłębków szyjnych.....	2
3.	Funkcja kłębków szyjnych.....	4
4.	Mechanizm przekaźnictwa sygnałów w kłębkach szyjnych.....	6
4.1	Hipoteza metaboliczna.....	6
4.2	Hipoteza uwzględniająca udział kanałów potasowych.....	8
4.3	Hipoteza wapniowa.....	11
4.4	Hipoteza dopaminergiczna.....	14
5.	Fosfolipidy inozytolowe w wewnątrzkomórkowych procesach przekaźnictwa sygnału.....	17
5.1	Występowanie fosfolipidów inozytolowych.....	20
5.2	Hydroliza fosfolipidów inozytolowych.....	20
5.3	Udział białek G w procesie degradacji fosfolipidów inozytolowych.....	22
5.4	Przekaźniki informacji drugiego rzędu powstające z fosfolipidów inozytolowych i ich udział w procesie przekaźnictwa sygnału.....	23
6.	Wpływ hipoksji na degradację fosfolipidów inozytolowych.....	24
II.	CEL PRACY.....	29

III.	MATERIAŁ I METODY.....	31
1.	Wstępna część in vivo.....	31
1.1	Warunki doświadczalne dla uzyskania normoksji, hipoksji, hiperoksji, kwasicy metabolicznej i oddechowej.....	32
2.	Badania in vitro.....	33
2.1	Przygotowanie materiału do doświadczeń i analiz biochemicznych.....	33
2.1.1	Przygotowanie do badań z neurotransmiterami na całych organach.....	33
2.1.2	Przygotowanie homogenatu tkankowego.....	33
2.2	Preparatyka frakcji podkomórkowych.....	34
2.3	Warunki eksperymentalne do badań reakcji enzymatycznych.....	35
2.3.1	Oznaczenia aktywności fosfolipazy C degradującej ([³ H] inozytol) fosfatydyloinozytol (PtdIns).....	35
2.3.2	Oznaczenie aktywności fosfolipazy C degradującej ([³ H] inozytol) fosfatydyloinozytolo-4,5-bisfosforan [PtdIns(4,5)P ₂].....	36
2.4	Badanie udziału białek G w regulacji aktywności fosfolipazy C degradującej fosfatydyloinozytolo-4,5- bisfosforan.....	37
2.5	Pomiar aktywności fosforylacji endogennych lipidów inozytolowych w homogenacie kłębków szyjnych.....	38
2.6	Ekstrakcja lipidów.....	40
2.6.1	Ekstrakcja lipidów według metody Bligh i Dyer (1959)....	40

2.6.2	Ekstrakcja lipidów inozytolowych i wodnorozpuszczalnych metabolitów inozytolu.....	40
2.7	Rozdział i analiza fosfolipidów inozytolowych oraz ich metabolitów.....	41
2.7.1	Rozdział chromatograficzny i analiza radioaktywności fosfatydyloinozytolu i polifosfoinozytydów. Chromatografia cienkowarstwowa wysokosprawna.....	41
2.7.2	Rozdział i analiza wyznakowanych inozytolofosforanów, produktów degradacji lipidów inozytolowych. Chromatografia kolumnowa.....	42
3.	Analiza danych.....	43
IV.	WYNIKI.....	45
1.	Charakterystyka aktywności PLC degradującej PtdIns(4,5)P ₂ i PtdIns w normoksyjnych kłębkach szyjnych kota.....	45
1.1	Wstępne badania metodyczne.....	45
1.2	Podkomórkowa lokalizacja PLC.....	46
1.3	Analiza wodnorozpuszczalnych produktów hydrolizy lipidów inozytolowych.....	48
1.4	Wpływ jonów Ca ²⁺ oraz GTPγS na aktywność PLC degradującej PtdIns(4,5)P ₂ i PtdIns.....	49
1.5	Wpływ dopaminy i karbacholu na aktywność PtdIns(4,5)P ₂ -PLC.....	51
1.6	Wpływ ATP na aktywność PLC degradującej PtdIns(4,5)P ₂	52

2.	Wpływ zmian ciśnienia parcjalnego tlenu oraz jonów wodorowych we krwi tętniczej na aktywność fosfolipazy C degradującej PtdIns(4,5)P ₂ i PtdIns.....	53
2.1	Wpływ hipoksji i hiperoksji na aktywność PLC.....	53
2.2	Wpływ kwasicy oddechowej i metabolicznej.....	55
2.3	Badania nad modyfikacją aktywności fosfolipazy C degradującej lipidy inozytolowe w warunkach hipoksyjnych.....	56
3.	Sezonowa zmienność aktywności fosfolipazy C kłębków szyjnych degradującej PtdIns(4,5)P ₂	58
V.	DYSKUSJA.....	60
VI.	WNIOSKI.....	79
VII.	STRESZCZENIE	80
VIII.	PIŚMIENNICTWO.....	86

WYKAZ SKRÓTÓW STOSOWANYCH W PRACY

ADP	- adenzyno-5'-difosforan
ATP	- adenzyno-5'-trifosforan
BP	- ciśnienie tętnicze krwi
białka G	- białka wiążące GTP
cAMP	- cykliczny adenzyno-3'5'-fosforan
cGMP	- cykliczny guanozyno-3'5'-fosforan
DA	- dopamina
DAG	- diacyloglicerol
DOC	- dezoksycholalan sodu
DTT	- ditiotreitol
EDTA	- kwas etylenodiaminotetraoctowy
EGTA	- kwas etylenoglikolodiaminotetraoctowy
GPI	- glicerofosfoinozytol
GTP	- guanozyno-5'-trifosforan
GTP γ S	- guanozyno-5-0-3-thiotrifosforan
HR	- częstotliwość skurczów serca
Ins(1)P ₁	- inozytolo(1)fosforan
Ins(1,4)P ₂	- inozytolo(1,4)bisfosforan
Ins(1,4,5)P ₃	- inozytolo(1,4,5)trisfosforan
KA	- kwas arachidonowy
KBC	- kinaza białkowa C
KS	- kłębki szyjne
KF	- kwas fosfatydowy
NA	- noradrenalina

OUN	- ośrodkowy układ nerwowy
PM	- pień mózgu
PLC	- fosfolipaza C
PtdIns	- fosfatydyloinozytol
PtdIns(4)P	- fosfatydyloinozytolo-4-fosforan
PtdIns(4,5)P ₂	- fosfatydyloinozytolo-4,5-bisfosforan
Pi	- reszta kwasu ortofosforowego
poli-Pi	- polifosfoinozytydy lub fosforany fosfatydyloinozytolu
PO ₂	- ciśnienie parcjalne tlenu
PaO ₂	- ciśnienie parcjalne tlenu we krwi tętniczej
PaCO ₂	- ciśnienie parcjalne dwutlenku węgla we krwi tętniczej
pHa	- ujemny logarytm ze stężenia jonów wodorowych we krwi tętniczej
TLC	- chromatografia cienkowarstwowa
Tris	- tris(hydroksymetylo)aminometan
ZSG	- zwoje szyjne górne

I. WSTĘP

1. Kłębki szyjne

Kłębki szyjne (KS) są organami czuciowymi, których naczelną rolą polega na wychwytywaniu zmian ciśnienia parcjalnego tlenu w krwi tętniczej (PaO_2). Informacja o zmianach PaO_2 jest przekazywana zakończeniami czuciowymi nerwu zatokowego do ośrodkowej sieci neuronów oddechowych, które powodują niezbędne z punktu widzenia potrzeb metabolicznych zmiany wentylacji płucnej. Odpowiedź oddechowa na hipoksję jest jednym z najważniejszych chemoodruchów oddechowych i zachodzi praktycznie wyłącznie za pośrednictwem chemoreceptorów tętniczych kłębków szyjnych.

Podstawowe mechanizmy przekaźnictwa sygnału w kłębkach szyjnych, mimo że przyciągają uwagę badaczy od kilku dziesięcioleci, pozostają nie wyjaśnione. Przyczyną powolnego postępu badań nad tym zagadnieniem mogą być małe rozmiary organu (np. u kota, masa < 1 mg, wielkość < 1 mm), jego lokalizacja oraz skomplikowana struktura, która ciągle jeszcze nie jest do końca poznana. Badania nad molekularnymi mechanizmami przekaźnictwa sygnału w kłębkach szyjnych są nieliczne.

Poznanie tych mechanizmów jest ważne nie tylko dla zrozumienia fizjologicznych podstaw regulacji oddychania, ale także mogłoby w przyszłości umożliwić farmakologiczną modulację tej regulacji, co może mieć istotne znaczenie w stanach patologicznych.

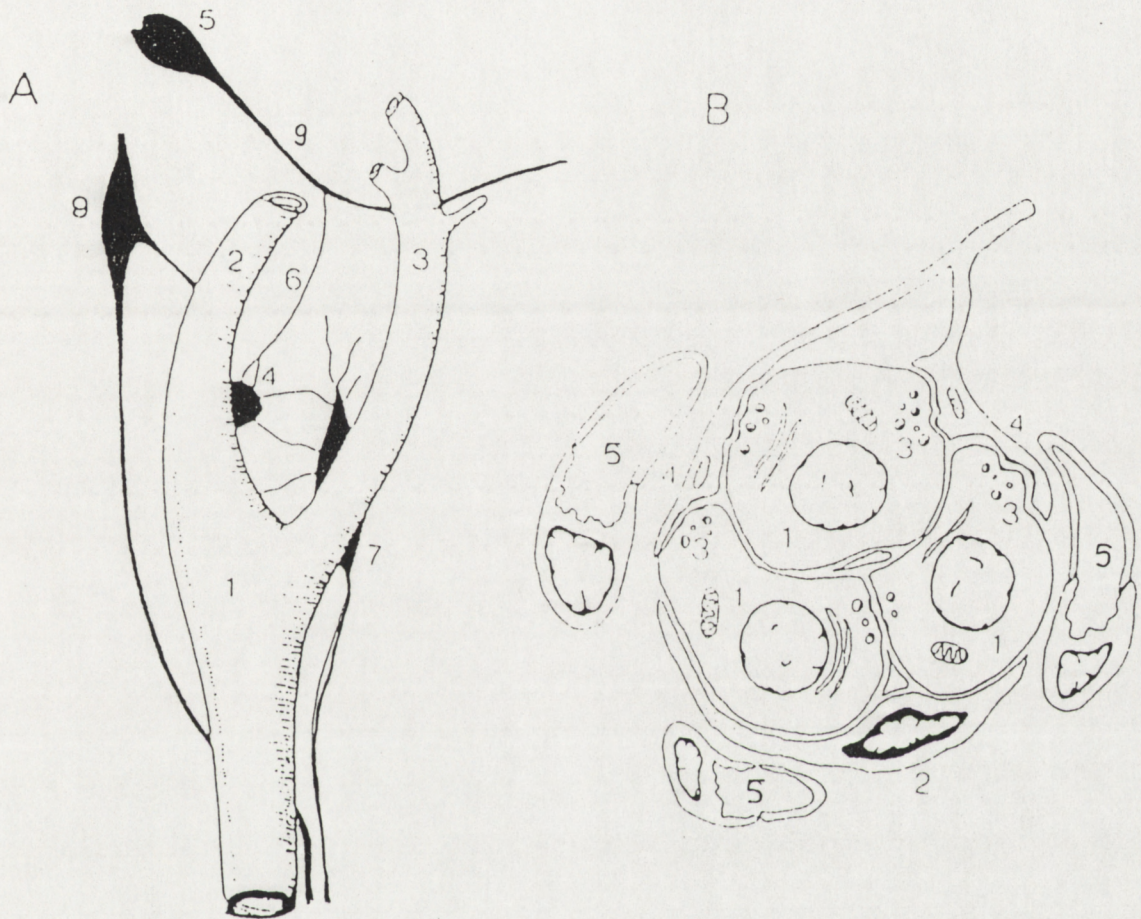
2. Anatomia kłębków szyjnych

Kłębki szyjne są zlokalizowane obustronnie na szyi w okolicy rozgałęzienia tętnicy szyjnej wspólnej na tętnicę zewnętrzną i wewnętrzną. Kłębki szyjne zawierają dwa typy komórek. Typ I, komórki kłębkowe lub chemoreceptorowe wywodzą się z cewy nerwowej i posiadają w swojej cytoplazmie heterogenną populację ziarnistości wypełnionych neurotransmiterami, w szczególności dopaminą (DA). Komórki I-go typu składają się z trzech podtypów (A, B, C), różniących się między sobą wielkością pęcherzyków sekrecyjnych i zawartością katecholamin. Typ II, to komórki podporowe, porównywane są do komórek Schwanna i komórek glejowych w centralnym układzie nerwowym (schemat 1).

Kłębki szyjne są unaczynione przez jedną lub kilka tętniczek kłębkowych, będących odgałęzieniami tętnicy szyjnej zewnętrznej. Przepływ krwi przez ciała szyjne w przeliczeniu na gram tkanki jest największy w porównaniu z innymi organami i wynosi 2000ml/min/100g tkanki. Według badań McDonalda i Haskella (1984) w KS są dwa rodzaje kapilar różniących się między sobą ilością połączeń tętniczo-żylnych. Naczynia te posiadają unerwienie sympatyczne i wobec tego zachodzi autoregulacja przepływu krwi. Przedkapilarne zwieracze regulują przepływ krwi przez kłębki. Krew z KS odprowadzana jest do żyły szyjnej wewnętrznej.

Unerwienie kłębków szyjnych jest: czuciowe, parasympatyczne i sympatyczne. Unerwienie czuciowe kłębka stanowi nerw zatokowy, inaczej zwany nerwem Heringa, będący odgałęzieniem nerwu

TOPOGRAFIA I STRUKTURA KŁĘBKA SZYJNEGO.



A

1. tętnica szyjna wspólna
2. tętnica szyjna wewnętrzna
3. tętnica szyjna zewnętrzna
4. kłębek szyjny
5. zwój skalisty
6. nerw zatokowy
7. zwój szyjny górny
8. zwój nerwu błędnego
9. nerw podjęzykowo-gardłowy

B

1. komórki typu pierwszego (komórki chemoreceptorowe)
2. komórki typu drugiego (komórki podporowe)
3. ziarnistości neurosekrecyjne w komórkach typu I
4. zakończenie synaptyczne nerwu zatokowego
5. naczynia krwionośne

Schemat 1

językowo-gardłowego. Badania McDonalda i Mitchella (1975) wykazały, że ponad 95% tych włókien stanowią aksony aferentne, których ciała komórkowe znajdują się w zwoju skalistym nerwu językowo-gardłowego.

Unerwienie współczulne pochodzi ze zwoju szyjnego górnego i dociera do KS poprzez nerw zwojowo-kłębkowy. Większość włókien tego nerwu jest odpowiedzialna za regulację przepływu krwi w kłębkach szyjnych. Istnieją ponadto dane o sympatycznym unerwieniu komórek I-go typu. Jakkolwiek przecięcie nerwu zwojowo-kłębkowego nie ma wpływu na aktywność nerwu zatokowego, to jednak powoduje obniżenie poziomu noradrenaliny w kłębku szyjnym o około 90%.

Zakończenia nerwu zatokowego tworzą połączenia synaptyczne z komórkami I-go typu. Większość tych połączeń przypomina synapsy odprowadzające, a część doprowadzające. Obustronne synapsy, zwane recyprokalnymi, mają odprowadzająco-doprowadzającą specjalizację błon. Występują one w 5% u szczura i w 1.5% u kota. Pęcherzyki synaptyczne w zakończeniach doprowadzających (aferentnych) są o 15% większe, ale o około 60% mniej liczne niż te w zakończeniach odprowadzających (eferentnych).

Dla chemorecepcji niezbędne jest współdziałanie zakończeń nerwowych z komórkami typu I. Istotne znaczenie odgrywają też drogi naczyniowo-ruchowe regulujące przepływ krwi. Jedną z tych dróg jest droga typu "współczulnego", a drugą typu "przywspółczulnego". Droga typu "współczulnego" może prowadzić do zwężenia naczyń (Purves 1970). Składa się ona z aksonów

przedzwojowych, które mają zakończenia w komórkach zwojowych w zwoju szyjnym górnym (a kilka w samych kłębkach szyjnych), i zazwojowych aksonów, unerwiających kłębki szyjne.

Droga "przywspółczulna" może powodować rozszerzenie naczyń i składa się z aksonów przedzwojowych, biorących początek w mózgu, schodzących następnie wzdłuż nerwu językowo-gardłowego i nerwu zatokowego i mających zakończenia w komórkach zwojowych w kłębku szyjnym. Do tej grupy zaliczamy również aksony zazwojowe, które unerwiają mięśnie gładkie naczyń.

3. Funkcja kłębków szyjnych

De Castro (1928) pierwszy wysunął sugestię, że kłębki szyjne są czuciowym organem "testującym" krew. Zostało to potwierdzone przez Heymansa i Neila (1958). Udział chemoreceptorów kłębków szyjnych w spoczynkowej wentylacji u zwierząt i ludzi w normoksji jest stosunkowo mały. Kłębki szyjne są tonicznymi receptorami z niską częstością wyładowań (poniżej 2 impulsów/sekundę/włókno nerwu zatokowego), przy normalnym ciśnieniu krwi oraz przy $\text{PaO}_2 \approx 100 \text{ mmHg}$, $\text{PaCO}_2 \approx 40 \text{ mmHg}$, $\text{pH} \approx 7.4$ (Gonzalez i wsp. 1992).

Kłębki szyjne są przede wszystkim odpowiedzialne za wzrost oddychania w odpowiedzi na hipoksję, która jest dla nich najsilniejszym, naturalnym bodźcem. Ulegają one aktywacji także pod wpływem wzrostu PaCO_2 , czyli hiperkapnii (kwasica oddechowa) oraz spadku pH (kwasica metaboliczna).

Krzywa odpowiedzi chemoreceptora na PaO_2 przy stałym PaCO_2 jest hiperboliczna. Wzrost aktywności nasila się, kiedy PaO_2 spada poniżej 70 Torr. Odpowiedź na wzrost PaCO_2 przy stałym PaO_2 jest liniowa i może wykazywać efekt "plateau" na wysoko stymulowanych poziomach. Stymulacja chemoreceptorów szyjnych przez hipoksję i hiperkapnię wykazuje potęgującą interakcję. Kłębki szyjne są odpowiedzialne za około 90% hiperwentylacji w hipoksji i za 20-50% hiperwentylacji obserwowanej podczas oddechowej i metabolicznej kwasicy (Lahiri i DeLaney 1975a). W przypadku kwasicy metabolicznej i hiperkapnii pozostała część odpowiedzi oddechowej związana jest z aktywacją ośrodkowych chemoreceptorów.

W badaniach stwierdzono, że wzrost PaCO_2 przy stałym pH powoduje wzrost aktywności chemoreceptora. Wysłunięto więc hipotezę, że CO_2 oddziałuje nie tylko za pośrednictwem pH (Pokorski i Lahiri 1983). Mechanizm działania CO_2 pozostaje do chwili obecnej nie całkowicie wyjaśniony.

Badania wykazały, że zahamowanie aktywności anhidrazy węglanowej w KS zmniejsza ich odpowiedź na zmiany w PaCO_2 . Stwierdzono, że anhidraza węglanowa jest zlokalizowana w komórkach I-go i II-go typu. Do chwili obecnej pozostaje nie w pełni wyjaśniony problem, jak zmiany pH, spowodowane przez wzrost PaCO_2 , mogą oddziaływać na procesy chemorecepcji (Gonzalez i wsp. 1992).

4. Mechanizm przekaźnictwa sygnału w kłębkach szyjnych

Wewnątrzkomórkowe mechanizmy przekaźnictwa sygnału w komórce chemoreceptorowej, prowadzące do jego przekształcenia w zwiększoną impulsację w nerwie zatokowym, a co za tym idzie informującą ośrodkowy układ nerwowy (OUN) o konieczności zwiększenia wentylacji płucnej, pozostają nie wyjaśnione.

Do chwili obecnej znanych jest kilkanaście hipotez dotyczących procesów chemorecepcji. Wiodące z nich to:

hipoteza: metaboliczna,

uwzględniająca udział kanałów potasowych,

wapniowa,

dopaminergiczna.

4.1 Hipoteza metaboliczna

Jest najstarszą hipotezą próbującą wyjaśnić mechanizm przekaźnictwa sygnału w kłębkach szyjnych. Istotną rolę w tym procesie badacze przypisują od lat udziałowi związków wysokoenergetycznych (Heymans i Neil 1958).

W ostatnim dziesięcioleciu Obeso i wsp. (1985) zaobserwowali 21% obniżenie poziomu ATP w KS in vitro po 5 min ekspozycji na niską zawartość tlenu w płynie superfuzyjnym. Poddane tym samym warunkom eksperymentalnym zwoje szyjne górne nie wykazywały zmian w poziomie ATP. Wyniki tych badań wskazywały, że zmiany w

poziomie ATP w kłębkach szyjnych są specyficznie związane z procesami przekaźnictwa bodźca chemicznego. Dodatkowo badacze ci zaobserwowali, że analog glukozy, 2-dezoksyglukoza (2mM) w obecności pirogronianu i cyjanku (0.1 mM) powoduje obniżenie poziomu ATP, któremu towarzyszy uwalnianie dopaminy i zwiększone wyładowania nerwu szyjnego zatokowego. Te wyniki zdawały się potwierdzać słuszność metabolicznej hipotezy przekaźnictwa sygnału, sugerowanej wcześniej przez Mulligan i Lahiri (1981, 1982), a wskazującej na fakt, że obniżenie poziomu ATP może być czynnikiem zapoczątkowującym ten proces.

Biscoe i Duchen (1990) stwierdzili, że obniżenie ciśnienia parcjalnego tlenu w KS powoduje zahamowanie produkcji ATP w KS poprzez ograniczony transport elektronów w mitochondriach.

Pomiary poziomu ATP w kłębkach szyjnych wykazały rozbieżności w ocenie znaczenia metabolizmu energetycznego. Acker i Starlinger (1984) stwierdzili, że poziom ATP w KS kota pozostaje nie zmieniony w przypadku wentylacji hipoksyjną lub hiperkapniczną mieszanką gazową. Ponadto Verna i wsp. (1990) nie zaobserwowali zależności pomiędzy poziomem ATP w kłębkach szyjnych a stężeniem PO_2 w płynie superfuzyjnym.

Wykazano ponadto, że metaboliczne rozprzegacze oksydacyjnej fosforylacji nie wpływając na poziom ATP w KS powodują uwalnianie dopaminy i wzrost wyładowań nerwu zatokowego. Przytoczone dane doświadczalne pozwoliły na wysunięcie wniosku, że obniżenie poziomu ATP nie jest konieczne dla aktywacji chemoreceptora (Fidone i Gonzales 1986, Gonzales i wsp. 1992). Badacze ci

podważyli więc istotę hipotezy metabolicznej.

Hipoteza metaboliczna została ostatnio poddana modyfikacji. Lahiri (1994) oraz Wilson i wsp. (1994) przedstawili dane wskazujące, że sensorem dla tlenu może być cytochrom a_3 w mitochondrialnym łańcuchu oddechowym. Autorzy zastosowali tlenek węgla (CO), jako molekularną sondę w badaniach nad procesami chemorecepcji *in vitro*, wykorzystując szybkość tworzenia kompleksów CO z białkiem hemowym, jak również możliwość rozpadu tego kompleksu pod wpływem światła. Takie połączenie uniemożliwia reakcję cytochromu a_3 z O_2 , działa więc jak hipoksja i pobudza wyładowania czuciowe z KS. W konkluzji pracy Lahiri (1994) podkreśla ewentualny udział jonów Ca^{2+} uwalnianych z wewnątrzkomórkowych magazynów, kładąc dużo mniejszy nacisk na rolę kanałów potasowych czułych na tlen, określając je mianem zjawiska towarzyszącego. Użycie sondy CO oraz światła nie mają jednak swojego odpowiednika w fizjologicznych badaniach nad KS. Wiadomo też, że ewentualny udział cytochromu a_3 nie odpowiada za całość pobudzenia aktywności chemoreceptora. Mechanizm ten nie byłby specyficzny dla chemoreceptorów kłębków szyjnych, lecz dotyczyłby również innych tkanek. Badania te nie wyjaśniają w pełni mechanizmów chemorecepcji KS.

4.2 Hipoteza uwzględniająca udział kanałów potasowych

Ostatnie obserwacje Gonzaleza i wsp. (1992) wskazują na obecność i znaczenie wyspecjalizowanych kanałów potasowych w

izolowanych komórkach I-go typu. Przewodnictwo tych kanałów ulega obniżeniu wraz ze zmianami PO_2 . Lopez-Lopez i wsp. (1989) zwracają uwagę, że selektywne zahamowanie aktywności kanałów potasowych przez zmiany PaO_2 jest fenomenem bez precedensu w literaturze, co uzasadnia chemorecepcyjne właściwości komórek I-go typu kłębków szyjnych.

Badania Lopez-Lopez i wsp. (1989) wykazały, że obniżenie aktywności kanałów potasowych wywołanych hipoksją powoduje dramatyczne zmiany w pobudliwości komórek I-go typu. Badacze ci powołując się na pracę Fidona i Gonzaleza (1986) sugerują, że ten wzrost aktywności w komórkach I-go typu może być czynnikiem zwiększającym napływ jonów Ca^{2+} poprzez kanały wapniowe zależne od potencjału, co w konsekwencji według autorów wpływałoby bezpośrednio na zwiększony poziom uwalniania neurotransmiterów w trakcie trwania hipoksji w kłębkach szyjnych. Proces interakcji pomiędzy molekularnym O_2 a białkiem kanałów potasowych jest obecnie nie znany. Autorzy stwierdzili, że zahamowanie aktywności kanałów potasowych przez obniżenie PaO_2 jest niezależne od obecności niehydrolizujących analogów GTP. Wskazywałoby to, że sensor czuły na O_2 w komórkach I-go typu znajduje się w błonie komórkowej i że środowiskowy O_2 wchodzi bezpośrednio w interakcję z kanałami potasowymi bez udziału białek G.

Badania Ganforniny i Lopez-Barneo (1991, 1992) wykazały, że zahamowanie otwarcia kanałów potasowych przez hipoksję jest niezależne od poziomu wewnątrzkomórkowego wapnia czy też

obecności kompleksu Mg^{2+} -ATP na wewnętrznej powierzchni błony. Ponadto zahamowanie to nie zmieniało się po dodaniu $20 \mu M$ GTP γ S. Warto tu zwrócić uwagę, że ta bezpośrednia interakcja O_2 z kanałem potasowym ma być specyficzna dla komórek I-go typu KS. Odpowiedź chemoreceptorów KS różni się od odpowiedzi komórek węchowych czy też smakowych, w których naturalne bodźce modulują kanały jonowe poprzez działanie wewnątrzkomórkowych cyklicznych nukleotydów. Autorzy sugerują możliwość interakcji O_2 -kanał potasowy poprzez grupy prostetyczne, podobne do hemowych, związane z białkiem kanałów.

Gonzalez i wsp. (1992) sugerują udział cAMP, który miałby modulować wrażliwość białka kanałów potasowych na zmiany w poziomie PaO_2 . Byłby to wtórny efekt dodatniego działania niskiego PaO_2 na cyklazę adenylanową (prowadzący do zwiększenia poziomu cAMP). Gonzalez i wsp. (1992) sugerują także, że cAMP może zwiększać wydzielanie katecholamin z komórek I-go typu przy współdziałaniu jonów Ca^{2+} . Poziom cAMP, jako jedyne (poza Ca^{2+} i słabo poznanym działaniem NO) przekaźnika drugiego rzędu, opisanego w procesach chemorecepcji w kłębku szyjnym w badaniach *in vitro*, wynosi 0.79 ± 0.1 pmoli na kłębek szyjny (Delpiano i Acker 1991). Wyniki badań tych autorów wskazują, że obniżenie PO_2 w medium do poziomu 20 mmHg na 2 min znacząco podwyższało poziom cAMP do 1.13 ± 0.14 pmoli na kłębek szyjny.

Należy podkreślić, że zwiększony poziom cAMP poprzez aktywację kinazy białkowej A może być odpowiedzialny za obniżenie wskaźnika otwarcia kanałów potasowych, co w konsekwencji może

prowadzić do depolaryzacji komórki (Gonzalez i wsp. 1992).

Badacze ci sugerują, że komórki I-go typu są depolaryzowane przez hipoksję, co prowadzi do otwarcia zależnych od potencjałów kanałów wapniowych i uwalniania neurotransmiterów.

Największym zastrzeżeniem dotyczącym znaczenia kanałów potasowych jest to, że prawdopodobieństwo ich otwarcia maleje w zakresie PaO_2 150-90 mmHg, a więc w zakresie, który odpowiada warunkom normoksyjnym, a nie hipoksyjnym *in vivo*. Na kanały te mogą też wpływać różne inne czynniki, jak jony H^+ , inhibitor NADPH oksydazy i cGMP. W związku z tym kanały te mogą nie odgrywać specyficznej roli w chemorecepcji.

4.3 Hipoteza wapniowa

Obecnie sugerowane są dwie hipotezy dotyczące udziału jonów Ca^{2+} w początkowych etapach procesu przekaźnictwa sygnału w KS. Pierwsza z nich dotyczy aktywowanych przez depolaryzację kanałów wapniowych w błonie komórkowej i napływu jonów wapnia tą drogą (Fidone i Gonzalez 1986, Hescheler i wsp. 1989). Druga wskazuje na możliwość istotnego wzrostu cytoplazmatycznego stężenia jonów Ca^{2+} na skutek uwalniania ich z organelli wewnątrzkomórkowych (Biscoe i Duchen 1990). Jeżeli ta druga hipoteza byłaby słuszna, należałoby wyjaśnić udział $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ w mobilizacji wewnątrzkomórkowego Ca^{2+} w KS. Istnieje szereg argumentów przemawiających za pierwszą hipotezą. Wiadomo, że depolaryzacja wywołana obniżeniem prądu potasowego może aktywować zależne od

potencjału kanały wapniowe i zwiększać uwalnianie neurotransmiterów. Zjawisko to było opisane przez Heschelera i wsp. (1989), Lopez-Lopez i wsp. (1989), Urena i wsp. (1989), niemniej jednak nie było dokładnie zbadane w KS. Z badań na innych organach wiadomo, że istnieje kilka różnych typów kanałów wapniowych, które różnią się kinetyką i farmakologią (Bean 1989, Kostyuk 1981). Kanały typu T mają niski próg pobudliwości i aktywowane są przy negatywnym potencjale do -20 mV. Ponieważ kanały wapniowe w KS aktywowane są przy bardziej dodatnim potencjale, muszą należeć do typu kanałów o wysokim progu pobudliwości (Fieber i McCleskey 1993). Do tego ostatniego typu kanałów należą przynajmniej trzy pod względem farmakologicznym scharakteryzowane kanały określone jako L, P i N.

Badania Shirahaty i Fitzgeralda (1991) z użyciem blokerów kanałów wapniowych (verapamil, diltiazem, nifedipina) wykazały obniżenie wzrostu aktywności chemorecepcyjnej wywołanej hipoksją, proporcjonalne do stosowanej dawki (10-100 μM). Sugeruje to, że aktywność kanałów wapniowych zależnych od potencjału jest jednym z elementów biorących istotny udział w odpowiedzi chemorecepcyjnej KS. Shirahata i Fitzgerald (1991) zwracają uwagę, że zastosowanie agonisty kanałów wapniowych BAY K 8644 (10 μM) w trakcie trwania hipoksji nie powoduje dalszego wzrostu aktywności chemorecepcyjnej. Autorzy sugerują, że sama hipoksja zwiększa na tyle poziom wewnątrzkomórkowego Ca^{2+} , że dodatkowy wzrost jego poziomu nie odgrywa już znaczącej roli. Sekwencja zdarzeń według Shirahaty i Fitzgeralda (1991) jest następująca:

hipoksja wywołuje depolaryzację, wejście Ca^{2+} do komórek I-go typu przez zależne od potencjału kanały wapniowe i w konsekwencji uwalnianie dopaminy.

Ostatnie badania z użyciem metody fluorometrycznej pokazały, że hipoksja, anoksja oraz użycie cyjanków wywołują stopniowy wzrost wewnątrzkomórkowego Ca^{2+} w komórkach I-go typu (Biscoe i wsp. 1989, Sato i wsp. 1991). Badania Sato i wsp. (1993) wykazały różnice w dynamice wzrostu wewnątrzkomórkowego Ca^{2+} w odpowiedzi na zmiany zewnątrzkomórkowego pH lub na obniżenie PaO_2 . W pierwszym przypadku był to wzrost gwałtowny i krótkotrwały, natomiast w przypadku hipoksji zmiany były stopniowo narastające w czasie.

Podsumowując należy podkreślić, że wapń jest bardzo ważnym przekaźnikiem informacji. Dyskusje o jego znaczeniu i umiejscowieniu w sekwencji zjawisk procesu neuroprzekaźnictwa w niedokrwieniu mózgu toczą się od dłuższego czasu (Siesjo i Bengtsson 1989, Siesjo 1993, Hossmann i wsp. 1983, 1985). Badacze są zgodni, że jony wapnia odgrywają istotną rolę w patologii niedokrwienno-hipoksyjnej, niezależnie od występujących w ich poglądach rozbieżności, czy zapoczątkowują one zmiany, czy też je nasilają. Rola jonów wapnia wydaje się też istotna w mechanizmie przekaźnictwa sygnału w KS, aczkolwiek nie jest ona całkowicie wyjaśniona w świetle obecnych badań.

4.4 Hipoteza dopaminergiczna

Dopamina (DA) jest obecna w normoksyjnych kłębkach szyjnych w wysokim stężeniu w porównaniu np. do zwojów szyjnych górnych (Starlinger i wsp. 1983).

Od kilku dziesięcioleci neurotransmitterowi temu przypisuje się istotne znaczenie w procesach przekazywania sygnału w kłębkach szyjnych (Mills i wsp. 1978, Goldman i Eyzaguirre 1984, Nolan i wsp. 1985, Ponte i Sadler 1989, Obeso i wsp. 1992, Katz i wsp. 1993, Donnely 1993). Istnieje jednak szereg kontrowersji dotyczących poziomu i działania dopaminy w hipoksji.

Badania Zapaty i wsp. (1969) wykazały, że 3 godzinna hipoksja *in vivo* (5% O₂/N₂) oraz 2 godzinna anoksja *in vitro* nie zmieniały zawartości katecholamin w KS. Z drugiej strony Mills i Slotkin (1975) zauważyli znaczące zmiany w zawartości katecholamin po 40 min umiarkowanej hipoksji (14% O₂/N₂). Fitzgerald i wsp. (1983) stwierdzili również obniżenie zawartości DA u kotów poddawanych 30 minutowej ostrej hipoksji (PaO₂ ≈ 25 torr). Starlinger i wsp. (1983) zaobserwowali, że godzinna hipoksja (16% O₂/N₂) powoduje tylko niewielkie obniżenie zawartości katecholamin w KS. Niezależnie od przytoczonych rozbieżności została stwierdzona pozytywna korelacja pomiędzy wzrostem aktywności nerwu zatokowego przy obniżeniu PaO₂ a uwalnianiem dopaminy w KS (Rigual i wsp. 1986). Spośród wszystkich neurotransmitterów występujących w KS jedynie DA jest uwalniana proporcjonalnie do siły hipoksyjnego czy też kwasiczego

bodźca (Fidone i wsp. 1982, Rigual i wsp. 1986, Rigual i wsp. 1991). Te same relacje obserwowano też po zastosowaniu farmakologicznych bodźców dla kłębków, takich jak cyjanek, dinitrofenol czy 2-dezoksyglukoza (Obeso i wsp. 1986, Obeso i wsp. 1989). Wyniki Riguala i wsp. (1986) wskazują, że hipoksja powoduje wzrost zarówno syntezy, jak i uwalniania DA z kłębków szyjnych kota.

W doświadczeniach *in vitro* stosując metodę superfuzji stwierdzono też, że bodziec hipoksyjny zwiększa uwalnianie zarówno noradrenaliny (NA), jak i DA (Shaw i wsp. 1989). Zaobserwowano, że zarówno hipoksja, jak i analog strukturalny acetylocholinyl-karbachol stymulują uwalnianie DA i że atropina, antagonistą receptora muskarynowego, znacząco obniża tę odpowiedź. Uwalnianie DA i NA z KS pod wpływem karbacholu sugeruje obecność receptorów cholinergicznym w komórkach I-go typu. Zniesienie efektu karbacholu przez atropinę wskazuje na rolę receptorów muskarynowych w tym procesie. Uwalnianie DA w odpowiedzi na hipoksję było zmniejszone przy braku zewnątrzkomórkowego Ca^{2+} . Rezultaty te są zgodne z wcześniejszymi wynikami Fidone i wsp. (1982), którzy stwierdzili, że dla uwalniania katecholamin z kłębków szyjnych królika potrzebna jest obecność zewnątrzkomórkowego Ca^{2+} . Nitrenolipina, antagonistą kanałów wapniowych, hamuje uwalnianie katecholamin przez hipoksję.

Wpływ DA na proces chemorecepcji kłębków szyjnych wiąże się ze stężeniem jonów K^+ . Badania Almaraz i wsp. (1986) wykazały,

że superfuzja kłębków szyjnych roztworami bogatymi w K^+ wywołuje zależne od jego stężenia uwalnianie DA z komórek I-go typu. Stwierdzono, że najsilniejsza stymulacja uwalniania DA zachodzi przy stężeniu 20-60 mM zewnątrzkomórkowego K^+ i jest zależna od jonów Ca^{2+} . Wydaje się, że w komórkach I-go typu, podobnie jak i w innych komórkach wydzielniczych i zakończeniach nerwowych, wysoki poziom potasu aktywuje wejście jonów wapnia poprzez kanały zależne od potencjału i zwiększa proces wydzielniczy. Medium bezwapniowe hamuje 80% uwalniania DA (Gonzalez i wsp. 1992).

Badania in vivo Okajimy i Nishi (1981) z egzogennie podaną dopaminą wykazały możliwość zarówno hamującego, jak i pobudzającego jej działania na aktywność czuciową nerwu zatokowego w zależności od stosowanej dawki i techniki doświadczalnej. Stwierdzono, że niskie stężenie DA powoduje hamowanie, a wysoki wzrost aktywności nerwowej. Autorzy sugerują, że endogenna DA, jeżeli osiągnie wysokie stężenie w przestrzeni synaptycznej i zadziała na receptor, może spowodować wzrost aktywności nerwowej.

Farmakologiczne badania wykazały obecność receptorów D_2 w kłębkach szyjnych (Zapata i wsp. 1983). Perez-Garcia i wsp. (1990) oraz Schamel i Verna (1993) stwierdzili sprzężenie receptorów dopaminergicznych z układem cykazy adenylnowej w KS. Badania Perez-Garci i wsp. (1991) wskazują, że forskolin, aktywator cykazy adenylnowej, powoduje zależny od dawki wzrost uwalniania DA w hipoksji. Autorzy wysunęli wniosek, że uwalnianie DA pod wpływem niskiego PaO_2 może być skorelowane ze

wzrostem poziomu cAMP. Zigmond i wsp. (1989) zwracają uwagę na zależną od cAMP fosforylację hydroksylazy tyrozynowej, która może być w części odpowiedzialna za zwiększoną syntezę dopaminy. Badania McQueena i Mira (1984) oraz Mira i wsp. (1984) wykazały obecność receptorów D₂, które nie działają przez układ cykazy adenylanowej. Analogiczne sugestie wysunęli Keabian i Calne (1979). Badania wiązania radioaktywnych antagonistów receptora D₂ (Dinger i wsp. 1981) sugerują, że receptory D₂ związane są z komponentą czuciową, natomiast lokalizacja innych receptorów dopaminergicznych pozostaje nie znana. Do chwili obecnej nie został w pełni wyjaśniony mechanizm przekazywania informacji przez receptor D₂. Wyniki badań nad ośrodkowym układem nerwowym początkowo wskazywały na sprzężenie receptora D₂ z PLC degradującą lipidy inozytolowe. Obecnie uważa się, że jest to raczej receptor D₁ (Mahan i wsp. 1990, Undie i Friedman 1990).

5. Fosfolipidy inozytolowe w wewnątrzkomórkowych procesach przekaźnictwa sygnału

Omówione hipotezy dotyczące mechanizmu przekaźnictwa sygnału w kłębkach szyjnych w pewnym zakresie uzupełniają się wzajemnie. Analizowane oddzielnie, nie tłumaczą w całości tego skomplikowanego procesu, który do chwili obecnej pozostaje nie wyjaśniony.

Brak jest danych w literaturze, które brałyby pod uwagę degradację fosfolipidów inozytolowych i w konsekwencji

mobilizację wewnątrzkomórkowego Ca^{2+} w hipotezie neurotransmitterowo-wapniowej.

W pracach badawczych na innych organach i komórkach stwierdzono, że hipoksja powoduje degradację fosfolipidów inozytolowych w wyniku interakcji agonistów ze specyficznymi dla nich receptorami. Agoniści wywierają swoje działanie na komórki poprzez wpływ na błonowe systemy przekaźnictwa sygnału, które kontrolują produkcję przekaźników metabolicznych drugiego rzędu. Następuje to między innymi poprzez modulacje aktywności cyklicznych nukleotydów, fosfolipaz, kinaz i fosfataz białkowych. Fosforylacje lub też defosforylacje reszt serynowych, treoninowych, czy tyrozynowych powodują zmiany konformacyjne w regulowanych białkach, które zmieniają ich własności. Prowadzi to do fizjologicznych odpowiedzi komórkowych (Cohen 1992, Lissovitch 1992, Nishizuka 1992).

Hipoksja w zależności od siły działania, czyli poziomu PaO_2 , oraz czasu jej trwania powoduje odwracalne lub nieodwracalne zmiany w procesach wewnątrzkomórkowych. Hipoksja OUN powoduje zwiększone, a w ciężkich postaciach masywne, uwalnianie neurotransmitterów, nadmierne pobudzenie receptorów, a w konsekwencji zaburzenia równowagi jonowej i metabolicznej. Jednym z najwcześniejszych zjawisk zaobserwowanych w hipoksji jest degradacja polifosfatydyloinozytoli, które stanowią niewielki procentowo, lecz aktywny czynnościowo, udział w składzie fosfolipidowym błon. W procesie ich degradacji dochodzi do uwalniania związków o charakterze przekaźników informacji

drugiego rzędu, a w wyniku ich metabolizmu np. kwasu arachidonowego do powstania przekaźników informacji pierwszego rzędu. Powstające związki biorą udział w krótkotrwałych, odwracalnych odpowiedziach komórki na hipoksję oraz zapoczątkowują długotrwałą odpowiedź komórki na przewlekłą hipoksję. Wiadomo na podstawie dotychczasowych badań, że zmiany fosfolipidów błon są istotnym czynnikiem warunkującym wrażliwość licznych typów komórek na niedotlenienie. Zagadnienie to omówiono szeroko w pracach poglądowych (Hochachka 1986, Kehren i wsp. 1990, Farooqui i wsp. 1994).

Znaczenie fosfolipidów inozytolowych w przekaźnictwie informacji w komórkach eukariotycznych pozostaje do dziś jednym z najintensywniej badanych zagadnień biologii komórki. Pomimo że przebadano do tej pory nie tylko aktywację metabolizmu fosfolipidów inozytolowych, ale i ich fizjologiczne efekty, to jednak molekularne mechanizmy leżące u podstaw tych procesów nie są dokładnie znane. W ostatnim okresie zwrócono szczególną uwagę na molekularną charakterystykę i regulację trzech kluczowych etapów w przekaźnictwie sygnału zależnych od fosfolipidów inozytolowych: fosfolipazę C, kinazy fosfolipidów inozytolowych oraz działanie receptora inozytolo-1,4,5- trisfosforanu.

Wiadomo, że trzy podstawowe lipidy inozytowe są prekursorami wewnątrzkomórkowych przekaźników metabolicznych drugiego rzędu, i to zarówno w tkance nerwowej, jak i w innych tkankach. Są to: fosfatydyloinozytol (PtdIns), fosfatydyloinozytolo-4-fosforan [PtdIns(4)P],

fosfatydyloinozytolo-4,5-bisfosforan [PtdIns(4,5)P₂]. Rola fosfolipidów inozytolowych i powstających w wyniku ich degradacji przekaźników informacji II-go rzędu w kłębkach szyjnych nie była dotychczas badana.

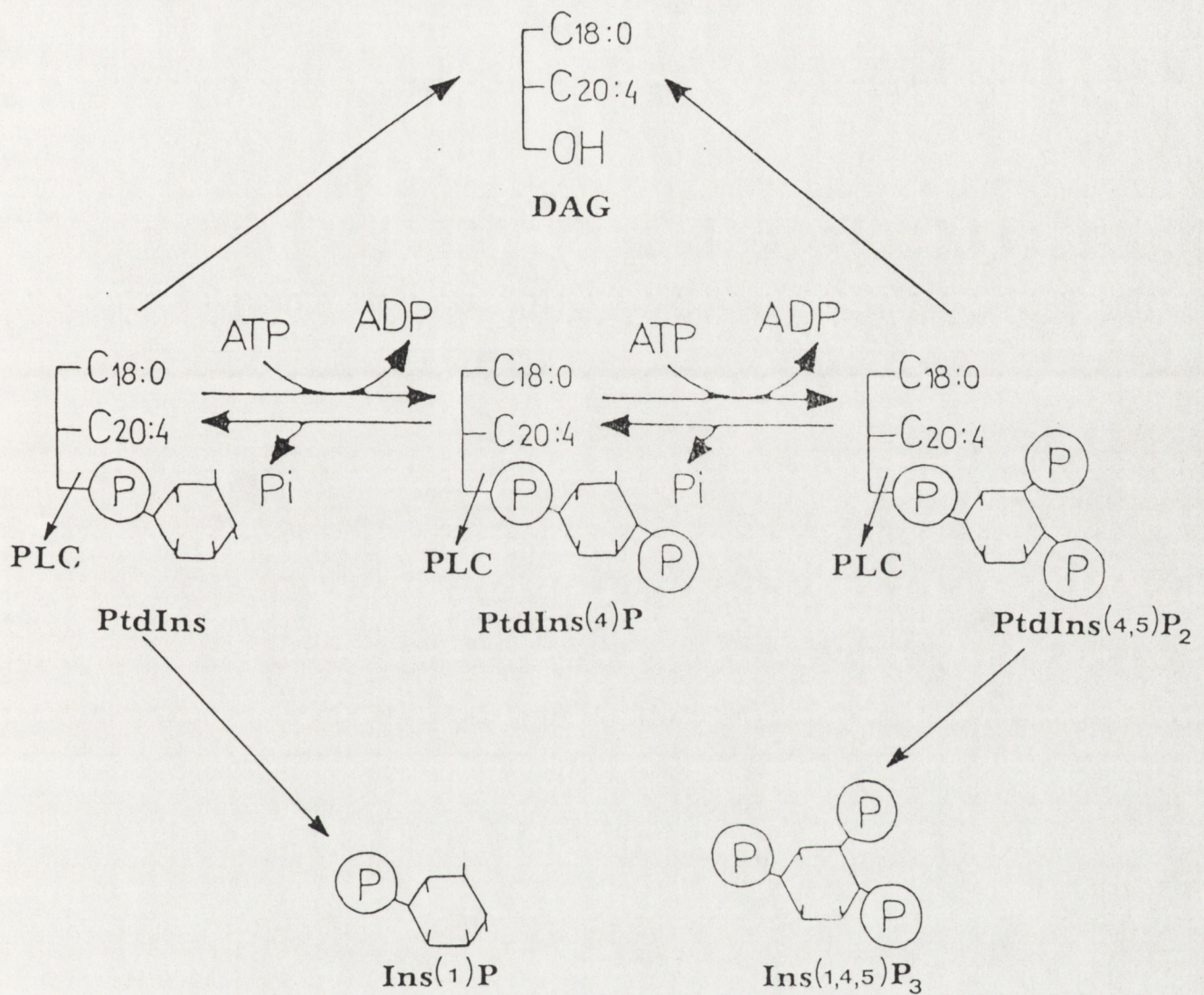
5.1 Występowanie fosfolipidów inozytolowych

Lipidy inozytolowe stanowią około 5%-8% wszystkich fosfolipidów błon komórki. Wśród nich głównym związkami jest fosfatydyloinozytol (90%), pozostałe 10% przypada na PtdIns(4)P i PtdIns(4,5)P₂. Cechą charakterystyczną tych fosfolipidów jest występowanie w drugiej pozycji szkieletu glicerolowego kwasu arachidonowego. W tkance nerwowej około 80% reszt kwasów tłuszczowych fosfatydyloinozytoli stanowią stearynian i arachidonian, pozostałe 20% to reszty acylowe innych kwasów tłuszczowych. Specyficzne kinazy fosforylują PtdIns do PtdIns(4)P, a następnie do PtdIns(4,5)P₂.

5.2 Hydroliza fosfolipidów inozytolowych

Schemat 2 obrazuje uproszczony przebieg hydrolizy fosfolipidów inozytolowych i powstawanie lipidowych przekaźników II-go rzędu (Berridge i wsp. 1983, Berridge i Irvine 1984). We wszystkich badanych tkankach zwierząt stwierdzono, że pod wpływem licznych substancji sygnałowych następuje gwałtowne obniżenie poziomu PtdIns(4,5)P₂, podczas gdy poziom PtdIns i

FOSFORYLACJA I DEGRADACJA FOSFOLIPIDÓW INOZYTOŁOWYCH.



Schemat 2

PtdIns(4)P obniża się znacznie wolniej (Berridge i wsp. 1983, Berridge 1987 a i b). W wyniku degradacji PtdIns(4,5)P₂ w komórce pojawia się inozytolo(1,4,5)trisfosforan [Ins(1,4,5)P₃] i diacyloglicerol (DAG) (Berridge i wsp. 1983, Wikieł H., Strosznajder J. 1988, Nishizuka 1984, Fisher i wsp. 1992, Shinomura i wsp. 1992, Berridge i Irvine 1984).

Rodzaj powstających produktów hydrolizy PtdIns(4,5)P₂ świadczy o udziale fosfolipazy C (PLC) w tym procesie. W tkankach zwierzęcych występują różne izoformy fosfolipazy C (Rhee i wsp. 1989). Wszystkie one hydrolizują PtdIns, PtdIns(4)P i PtdIns(4,5)P₂ w procesie zależnym od jonów Ca²⁺. Hydroliza PtdIns(4,5)P₂ zachodzi jednak przy niskich fizjologicznych stężeniach tego jonu (0.1-1.0 μM), występujących w komórce przed pobudzeniem. Obecnie wiadomo, że istnieją trzy główne typy fosfolipazy C, różniące się ciężarem cząsteczkowym i dające się rozróżnić przy pomocy metod immunologicznych (Rhee i wsp. 1989, Fisher i wsp. 1992). Wydaje się, że typ α i ε to produkty proteolitycznego rozpadu pozostałych typów. Wiadomo także, że fosfolipaza Cβ wykazuje swoją aktywność hydrolityczną wobec PtdIns(4,5)P₂ po związaniu z białkiem G (Guillon i wsp. 1992, Fisher i wsp. 1992), natomiast fosfolipaza Cγ jest aktywowana przez kinazę tyrozynową. Uważa się, że ta forma PLC występuje specyficznie w mózgu, gdzie jest bogato reprezentowana (Fisher i wsp. 1992, Guillon i wsp. 1992). Mechanizm aktywacji fosfolipazy Cα nie jest znany.

Aktywacja hydrolizy PtdIns(4,5)P₂ była obserwowana w

skrawkach mózgu i błonach plazmatycznych (Brown i wsp. 1984, Kendall i Nahorski 1984, Strosznajder i Strosznajder 1989, Audigier i wsp. 1988) oraz w zwojach obwodowych i komórkach (Fisher i wsp. 1992, Guillon i wsp. 1992, Lauder 1993).

Przy użyciu pierwotnych hodowli stwierdzono, że spośród dużej ilości neurotransmiterów i neuropeptydów tylko niektóre są zdolne aktywować hydrolizę $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ w komórkach nerwowych (Fisher i wsp. 1992). Wiadomo, że w ośrodkowym układzie nerwowym pobudzeniu, między innymi, receptorów D_2 lub D_1 , muskarynowych, α -adrenergicznych i serotonergicznymi 5HT_1 i 5HT_2 towarzyszy wzrost degradacji fosfolipidów inozytolowych (Fisher i wsp. 1992).

5.3 Udział białek G w procesie degradacji fosfolipidów inozytolowych

Białka G tworzą rodzinę homologicznych białek, wiążących i hydrolizujących GTP. Składają się z trzech podjednostek: α , β , γ i charakteryzują się ogromną różnorodnością (Ross 1989, Simon i wsp. 1991, Fain i wsp. 1988). W roku 1990 udało się wyizolować z wątroby szczura i mózgu wołu oraz częściowo oczyścić białko G, regulujące specyficznie fosfolipazę C hydrolizującą $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ (Taylor i wsp. 1991, Cockroft 1992, Hepler i Gilman 1992). Ponadto w ciągu ostatnich dwóch lat oczyszczono do homogenności wiele podjednostek α , a także β i γ białek G. Istnieje ponad 1000 możliwości oligomerycznych kombinacji tych podjednostek.

Okazało się, że nie tylko podjednostka α , lecz także kompleks podjednostek $\beta\gamma$ jest zdolny do wiązania i modulowania efektorów. Mogą one działać na różne efekторы lub też synergistycznie czy antagonistycznie na ten sam efektor. Wykazano, że zarówno podjednostka α , jak i kompleks $\beta\gamma$ mogą aktywować fosfolipazy C typu β , działając hydrolitycznie na $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ (Hepler i Gilman 1992).

5.4 Przekazniki informacji drugiego rzędu powstające z fosfolipidów inozytolowych i ich udział w procesie przekazywania sygnału

W wyniku działania fosfolipazy C na $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ powstają $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ i DAG, wtórne przekazywanie informacji w komórce (Berridge i Irvine 1984, 1989, Berridge 1987a). DAG pozostaje w błonie plazmatycznej i aktywuje białkową kinazę C (Nishizuka 1984). Od czasu odkrycia Nishizuki (1984), który opisał kinazę białkową C zależną od DAG, lipidowi temu przypisuje się duże znaczenie jako naturalnemu aktywatorowi tej kinazy w komórce. DAG zwiększa powinowactwo kinazy wobec Ca^{2+} , co powoduje jej pełną aktywność już w fizjologicznych stężeniach tego jonu (Nishizuka 1984).

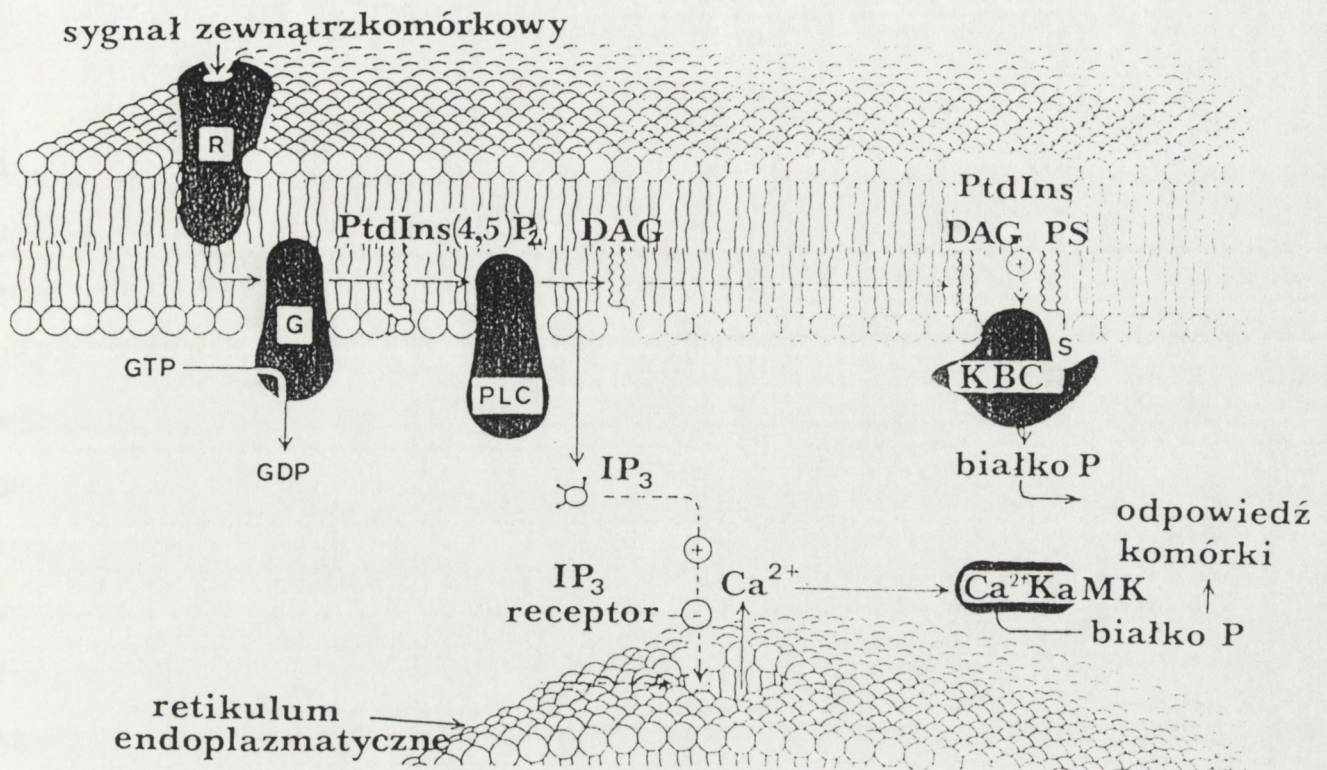
Główna rola $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ polega na mobilizacji wewnątrzkomórkowego Ca^{2+} . Pozwoliło to na wysunięcie przypuszczenia (Berridge i Irvine 1984), powszechnie obecnie przyjętego, że $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ jest odpowiedzialny za uwalnianie

Ca^{2+} z wewnątrzkomórkowych, pozamitochondrialnych magazynów (Berridge i Irvine 1984, Berridge 1987a). Udział omówionych przekaźników w procesie przekaźnictwa sygnału przedstawia schemat 3. Mobilizacja wapnia w komórce jest procesem dwufazowym. Pierwszą fazę stanowi uwolnienie Ca^{2+} z wewnątrzkomórkowych magazynów, drugą indukowana tym zjawiskiem aktywacja kanałów jonowych w błonie plazmatycznej i wnikanie wapnia do cytozolu z przestrzeni pozakomórkowych. Czas, w którym $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ wywołuje mobilizację Ca^{2+} , jest rzędu sekund. Przekaznik ten szybko ulega defosforylacji do związków nieaktywnych: InsP_2 , InsP i myo-inozytolu. W procesie regulacji uwalniania $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ i DAG istotną rolę może odgrywać interakcja pomiędzy różnymi drogami przekaźnictwa sygnału, i to na poziomie receptora, jak również procesów pozareceptorowych.

6. Wpływ hipoksji na degradację fosfolipidów inozytolowych

Badania wielu ośrodków stwierdzają, że hipoksja lub anoksja nasila degradację błonowych fosfolipidów w licznych organach i tkankach, np. w mózgu, sercu, nerkach, wątrobie (Bazan 1970, 1990, Strosznajder i wsp. 1987, Łazarewicz i wsp. 1972, Farber i Young 1981, Sun 1989, Siesjo i Katsura 1992). Obniżenie poziomu błonowych fosfolipidów zaobserwowano w różnych modelach hipoksji: niedokrwiennej, anoksyjnej, hipoksyjnej, substratowej, cytotoksycznej zarówno w badaniach *in vitro*, jak i *in vivo*. W niektórych przypadkach obserwowano jedynie wzrost poziomu wolnych

UPROSZCZONY SCHEMAT PRZEDSTAWIAJĄCY UDZIAŁ FOSFOLIPIDÓW INOZYTOŁOWYCH W PROCESIE PRZEKAŹNICTWA SYGNAŁU W KOMÓRCIE.



- R - białko receptorowe
- G - białko błonowe G
- PLC - fosfolipaza C
- KBC - kinaza białkowa C
- Ca²⁺/KCaMK - zależna od wapnia i kalmoduliny kinaza białkowa
- białko P - ufosforylowane białko
- PS - fosfatydylocholina
- PtdIns - fosfatydyloinozytol
- PtdIns(4,5)P₂ - bisfosfofosfatydyloinozytol
- DAG - diacyloglicerol
- IP₃ = Ins(1,4,5)P₃

Schemat 3

kwasów tłuszczowych i eikozonoidów bez uchwytnych zmian w poziomie fosfolipidów. Zagadnienie to omówiono w pracach poglądowych (Siesjo i Katsura 1992, Van der Vusse i wsp. 1994, Farooqui i wsp. 1994).

Hokin-Neaverson i Sadeghian (1984) zwrócili uwagę, że degradacja $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ i PtdIns prowadzi do uwalniania przekaźników metabolicznych drugiego rzędu, które mogą brać udział w różnych fazach procesu przekaźnictwa informacji. Stymulacja degradacji $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ w niedokrwieniu jest zjawiskiem początkowym, przejściowym i często kończącym się gwałtownie. Hydroliza tej puli fosfoinozytydów dostarcza nie tylko $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ i DAG, ale również odpowiedzialna jest za wczesny wzrost kwasu arachidonowego w wyniku współdziałania fosfolipazy C i diacyloglicerydowej lipazy (Yoshida i wsp. 1986, Abe i wsp. 1987, Ikeda i wsp. 1986). Z drugiej strony degradacja PtdIns rozpoczyna się później i może brać udział w podtrzymaniu sygnału lub w jego modulacji poprzez dostarczanie diacyloglicerolu i jego działania w późniejszej fazie przekaźnictwa sygnału. Zjawiska te tłumaczą dwufazowy wzrost lipidowych przekaźników informacji w początkowej i późniejszej fazie w wyniku niedokrwienia mózgu (Sun 1992).

Dynamika procesów zachodzących w początkowej fazie niedokrwienia wskazuje, że degradacja $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ powoduje wzrost poziomu wewnątrzkomórkowego Ca^{2+} w ciągu pierwszych 15 sek. Wzrost poziomu wolnych kwasów tłuszczowych, a w szczególności kwasu arachidonowego, zaobserwowano w pierwszych

30-60 sek (Bazan 1970). W tym samym czasie obserwowano również obniżenie poziomu ATP (Abe i wsp. 1987). Zależny od depolaryzacji napływ jonów Ca^{2+} do komórki ma natomiast miejsce w ciągu 60-70 sek (Siesjo 1988, Siesjo i Bengtsson 1989).

Analizowana przez Siesjo i Katsure (1992) dynamika i wzajemne zależności omawianych zjawisk wykazały brak zależności pomiędzy zaburzeniami energetycznymi, napływem jonów Ca^{2+} ze środowiska zewnątrzkomórkowego i degradacją polifosfatydyloinozytoli.

Autorzy ci postawili pytanie, które do chwili obecnej pozostaje bez odpowiedzi, jaki mechanizm odpowiedzialny jest za aktywację $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ -PLC w pierwszych sekundach niedokrwienia, kiedy to nie dochodzi jeszcze do masywnego uwalniania neurotransmiterów i pobudzenia specyficznych receptorów sprzężonych z PtdIns -PLC.

W analizie zjawisk, zachodzących w niedokrwieniu i hipoksji, należy zwrócić uwagę na sugerowaną rolę jonów K^+ i Na^+ w degradacji fosfolipidów inozytolowych. Wiadomo z badań *in vitro*, że wywołana przez jony K^+ depolaryzacja synaptozomów aktywuje metabolizm fosfatydyloinozytoli (Audigier i wsp. 1988), zwiększa napływ jonów Ca^{2+} , uwalnianie neurotransmiterów i kwasu arachidonowego (Łazarewicz i wsp. 1983, Shinomura i wsp. 1992). Badania Huanga i Gibsona (1989) wykazały, że histotoksyczna hipoksja wywołana 0.5 mM KCN (doświadczenia *in vitro*, przeprowadzane na skrawkach mózgu szczura) zwiększa stymulowany przez jony potasu metabolizm polifosfatydyloinozytoli w okresie pierwszych 10-60 sekund.

Wzrost degradacji fosfolipidów tłumaczony jest wzrostem

aktywności fosfolipaz. Można więc podsumować, że zwiększona degradacja fosfolipidów w trakcie hipoksji i anoksji jest konsekwencją wzrostu aktywności związanych z błonami endogennych fosfolipaz. Badania nad aktywnością fosfolipaz wykazały jednak rozbieżności. Stwierdzono zarówno wzrost (Moraru i wsp. 1994, Farooqui i wsp. 1994), jak i spadek aktywności tych enzymów (Grynberg i wsp. 1988, Van der Vusse i wsp. 1994). Badania Bhata i Blocka (1992) na komórkach śródbłonna tętnicy płucnej wykazały, że anoksja wywołuje aktywację fosfolipaz i degradację fosfolipidów. Stwierdzono, że 24 godzinna ekspozycja komórek na hipoksję powoduje prawie 90% wzrost aktywności fosfolipazy A₁ oraz 75% wzrost aktywności fosfolipazy C i DAG-lipazy (Bhat i Block 1992). Badacze ci nie zaobserwowali zmian w aktywności fosfolipazy A₂. Tretyakov i Farber (1993) zaobserwowali brak zmian w aktywności PLA₂ i PLC w krócej trwającej hipoksji (4h w 3% O₂/N₂) w komórkach śródbłonna tętnicy płucnej. Ci sami badacze stwierdzili wzrost aktywności wymienionych fosfolipaz w chronicznej hipoksji (2-4 miesiące). W badaniach nad OUN stwierdzono wzrost PLC oraz szeregu innych fosfolipaz w wyniku krótkotrwałego niedokrwienia (Farooqui i wsp. 1994). Można przytaczać przykłady na wzrost, brak zmian, a nawet obniżenie aktywności fosfolipaz w wyniku działania hipoksji. Rozbieżności wyników, dotyczących aktywności fosfolipaz w wyniku działania hipoksji, mogą wynikać z różnic gatunkowych, tkankowych i komórkowych, rodzaju i czasu trwania hipoksji.

Możliwość oddziaływania hipoksji na komórkowy metabolizm

fosfoinozytydów w ośrodkowej tkance nerwowej, a z drugiej strony nieznane mechanizmy, zachodzące w tkance chemorecepcyjnej kłębaka szyjnego będącej pochodzenia neuroektodermalnego, doprowadziły do postawienia hipotezy badawczej w mojej pracy, że przekaźnictwo sygnału hipoksyjnego w kłębku szyjnym może być modulowane poprzez metabolizm lipidów inozytolowych.

II. CEL PRACY

Cel Ogólny

Głównym celem pracy było zbadanie regulacji degradacji egzogennych fosfolipidów inozytolowych przez fosfolipazę C kłębków szyjnych oraz próba określenia udziału tego procesu w mechanizmie przekaźnictwa sygnału chemicznego. Badania skoncentrowały się wokół oddziaływania hipoksji, najsilniejszego naturalnego bodźca chemicznego dla kłębków szyjnych. Do badań wybrano kota, zwierzę doświadczalne, na którym wykonano większość badań nad kłębkami szyjnymi w literaturze światowej.

Cele szczegółowe

1. Podstawowa charakterystyka degradacji fosfatydyloinozytoli w niestymulowanych, normoksyjnych kłębkach szyjnych.
2. Zbadanie wpływu naturalnych bodźców dla kłębków szyjnych: hipoksji, kwasicy oddechowej i metabolicznej na proces degradacji fosfolipidów inozytolowych.
3. Zbadanie aktywności procesu fosforylacji endogennych fosfolipidów inozytolowych w kłębkach szyjnych.
4. Określenie udziału jonów wapnia i wpływu $GTP\gamma S$ (niehydrolizującego analogu nukleotydów guaninowych) na proces hydrolizy $PtdIns$ i $PtdIns(4,5)P_2$ przez fosfolipazę C kłębków szyjnych. Określenie rodzaju białek G biorących udział w degradacji lipidów inozytolowych.

5. Zbadanie możliwej modulacji degradacji fosfolipidów inozytolowych przez dopaminę i acetylocholinę.
6. Porównanie zmian degradacji fosfolipidów w kłębkach szyjnych z procesami zachodzącymi w pniu mózgu, gdzie znajdują się ośrodki oddechowe, oraz w zwoju współczulnym szyjnym górnym, leżącym w bezpośrednim sąsiedztwie kłębka, co służyło do określenia specyficzności obserwowanych zmian w kłębkach.

III. MATERIAŁ i METODY

Badania składały się z dwóch części: części wstępnej in vivo służącej do uzyskania kłębków szyjnych i części biochemicznej in vitro. Badania wykonano na kotach, na co uzyskano zgodę Komisji Etycznej Instytutu CMDiK.

1. Wstępna część in vivo

Badania zostały wykonane na 150 parach kłębków szyjnych pobranych od kotów obojga płci, o wadze 2.8-4 kg, uśpionych chloralożą z uretanem w dawce odpowiednio 35 i 800 mg/kg masy ciała. Po przecięciu skóry powięzi i mięśni szyi w linii środkowej wykonywano tracheostomię. Cewnikowano żyłę i tętnicę udową. Przez cewnik żylny uzupełniano płyny solą fizjologiczną, a w wypadku wystąpienia kwasicy metabolicznej stosowano 8,4% roztwór dwuwęglanów sodu (Polfa). Przez cewnik tętniczy pobierano beztlenowo próbki krwi do badań gazometrycznych na oznaczenia PaO_2 , $PaCO_2$, pH w temperaturze 37°C (Ciba Corning 238).

Zwierzęta przygotowywane były do usunięcia kłębków szyjnych zgodnie z preparatyką wg metody Lahiriego i DeLaney (1975b). Preparatykę tą wykonywano w odcinku szyjnym u podstawy czaszki, uzyskując bezpośredni obustronny dostęp do kłębków szyjnych. Badanie w tej fazie krwi tętniczej pozwalało na ocenienie stanu fizjologicznego zwierzęcia i ewentualną korektę równowagi

kwasowo-zasadowej. Następnie zwierzęta były zwiotczane bromkiem pankuranium (Pavulon, Oss NI) w dawce 0.1 mg/kg/godz i podłączone poprzez rurkę tracheostomijną do respiratora (VGO Basilelyp 6025), którego parametry wentylacyjne ustawiono odpowiednio tak, aby zapewnić wymianę gazową w granicach prawidłowych dla kota.

1.1 Warunki doświadczalne dla uzyskania normoksji, hipoksji, hiperoksji, kwasicy metabolicznej i oddechowej

Zwierzęta wentylowane były przez okres 20 minut powietrzem w przypadku normoksji, mieszką hipoksyjną (7% O₂ + 93% N₂) w przypadku hipoksji, czystym tlenem (100% O₂) w przypadku hiperoksji oraz mieszaniną 5% CO₂ w powietrzu w przypadku kwasicy oddechowej. Kwasicę metaboliczną uzyskiwano podając dożylnie roztwór kwasu mlekowego w dawce 7 mmol/kg wagi ciała. Parametry krwi dla wymienionych powyżej warunków przedstawiono w rozdziale Wyniki, tabela 5.

Eksperymenty kończono perfuzją przez aortę lodowatym płynem Krebsa-Ringera o pH 7.4, a następnie kłębki szyjne były wycinane i oczyszczane z otaczającej tkanki łącznej. Oczyszczanie odbywało się w tym samym ochłodzonym płynie perfuzyjnym. Następnie KS były zamrażane w -70°C w 10 mM Tris-HCl pH 7.4. Procedura wycięcia i oczyszczania KS zabierała nie więcej niż kilka minut. Do badań porównawczych pobierano także zwoje szyjne górne i pień mózgu, stosując tą samą procedurę.

2. Badania in vitro

2.1 Przygotowanie materiału do doświadczeń i analiz biochemicznych

2.1.1 Przygotowanie do badań z neurotransmiterami na całych organach

Do doświadczeń tych użyto bezpośrednio wyizolowane i oczyszczone z tkanki łącznej kłębki szyjne. Preinkubowano je w roztworze Krebsa-Ringera w obecności 100 μM dopaminy z dodatkiem 10 μM pargyliny. W przypadku stymulacji receptora cholinergicznego preinkubację prowadzono w obecności 1 mM karbacholu. Podobną procedurę stosowano dla zwojów szyjnych górnych.

2.1.2 Przygotowanie homogenatu tkankowego

Po odmrożeniu homogenizowano kłębki szyjne w homogenizatorze szklanym w roztworze 10 mM buforu Tris-HCl pH 7.4 lub w 0.32 M sacharozie z 10 mM Tris-HCl pH 7.4 w 0-4°C. Każdą parę kłębków szyjnych o sumarycznej wilgotnej masie około 2 mg homogenizowano w 200 μl roztworu, a następnie rozcieńczano do końcowej objętości 400 μl , otrzymując homogenat. Pień mózgu i zwój szyjny górny

homogenizowano w homogenizatorze szklanym w wymienionych wyżej roztworach, przygotowując 10% homogenat i używano bezpośrednio do doświadczeń lub zamrażano do -70°C .

2.2 Preparatyka frakcji podkomórkowych

Wyizolowane kłębki szyjne, zwoje szyjne górne oraz pień mózgu homogenizowano ręcznie w szklanym homogenizatorze w medium izolacyjnym 0.32 M sacharoza z 10 mM Tris-HCl pH 7.4 w $0-4^{\circ}\text{C}$. Homogenat wirowano przez 3 min przy 900 g. Osad P_1 zawieszano w buforze i używano do oznaczeń. Zebrany nadsącz S_1 wirowano następnie przez 10 min przy 17 000 g w celu otrzymania frakcji synaptosomalno-mitochondrialnej, osad P_2 . Zebrany nadsącz S_2 wirowano następnie przy 100 000 g przez 60 min w celu otrzymania frakcji mikrosomalnej i frakcji cytozolowej. W celu uzyskania błon synaptoplazmatycznych, frakcję P_2 poddawano szokowi hipoosmotycznemu, tzn. zawieszano ją w 1 mM buforze Tris-HCl pH 7.4 i homogenizowano. Następnie doprowadzano do stężenia 0.32 mM sacharozy roztworem 1.2 M sacharozy z buforem Tris-HCl pH 7.4. Wirowano 20 min przy 48000 g. Frakcje subkomórkowe zawieszano w medium izolacyjnym, oznaczano białko (Lowry i wsp. 1951) i używano do badania aktywności enzymatycznej.

2.3 Warunki eksperymentalne do badań reakcji enzymatycznych

2.3.1 Oznaczenie aktywności fosfolipazy C degradującej ($[^3\text{H}]$ inozytol) fosfatydyloinozytol (PtdIns)

Aktywność PLC w homogenacie tkankowym określano przez pomiar radioaktywności inozytolofosforanu powstającego w wyniku degradacji egzogenego substratu $[^3\text{H}]$ inozytol fosfatydyloinozytolu, wg metody opisanej przez Hoffmanna i Majerusa (1982) w modyfikacji Strosznajder i Haeffner (1989).

Substrat lipidowy przygotowywano w następujący sposób: na dnie próbówki umieszczano w przeliczeniu na jedno naczynko inkubacyjne 20 nmoli PtdIns $20-30 \times 10^3$ cpm w roztworze chloroform metanol 2:1. Po odparowaniu rozpuszczalników pod strumieniem azotu do próbówki inkubacyjnej dodawano 1% dezoksyholanu sodu (DOC) oraz 100 mM Tris-HCl pH 7.4, mieszano i wytrząsano przez 2 min. Enzymatyczną degradację znakowanego fosfatydyloinozytolu badano w roztworze 10 mM Tris-HCl pH 7.8, 0.1% DOC, 10 mM LiCl, w obecności EGTA lub 0-2 mM CaCl_2 oraz białka 30-50 μg . Próba zerowa nie zawierała białka i służyła do oznaczenia nieenzymatycznej degradacji substratu. Objętość inkubacyjna wynosiła 200 μl . Inkubacje prowadzono przez 30 min w 37°C w łaźni wodnej z wytrząsaniem. Czas inkubacji, ilość białka oraz substratu wybrano na podstawie doświadczeń wstępnych. Reakcję degradacji PtdIns przerywano mieszaniną chloroform:

metanol:stężony HCl w stosunku objętościowym 100:100:6, a następnie dodawano 0.3 ml wody, mieszano energicznie i wirowano celem oddzielenia faz.

Aktywność enzymu określano przez pomiar znakowanego produktu reakcji inozytolofosforanu w fazie wodnej. Pobierano 0.4 ml z określonej objętości fazy wodnej i dodawano do 8 ml płynu scyntylicyjnego Bray'a. Radioaktywność mierzono w liczniku scyntylicyjnym (Beckman LS 9000 lub LKB Wallach 1409).

2.3.2 Oznaczenie aktywności fosfolipazy C degradującej [³H inozytol] fosfatydyloinozytol-4,5-bisfosforan [PtdIns(4,5)P₂]

Aktywność enzymu oznaczano przez pomiar radioaktywnych inozytolofosforanów powstających w wyniku degradacji radioaktywnego substratu PtdIns(4,5)P₂, wg Hoffmana i Majerusa (1982). Lipidowy substrat przygotowywano analogicznie jak w przypadku PtdIns z tym, że w przeliczeniu na jedno naczynko inkubacyjne dodawano 10 nmoli PtdIns(4,5)P₂, 20-30 x 10³ cpm, następnie po odparowaniu pod strumieniem azotu odczynników organicznych, w których rozpuszczony był PtdIns(4,5)P₂, dodawano do próbki bufor 100 mM Tris-HCl pH 6.6 oraz 1% DOC, mieszano przez 2 min. Następnie dodawano do próbek inkubacyjnych. Mieszanina inkubacyjna w końcowej objętości 200 μl zawierała substrat PtdIns(4,5)P₂, 10 nmoli 20-30 x 10³ cpm, 10 mM Tris-HCl pH 6.6, 10 mM LiCl, 0.2 mM EGTA lub 0-2 mM CaCl₂ oraz

białko 25-50 μg . Inkubację prowadzono w łaźni wodnej z wytrząsaniem przez 15 min w 37°C . Reakcję przerywano mieszaniną chloroform:metanol:HCl w stosunku objętościowym 100:100:6. Następnie postępowano analogicznie jak w przypadku oznaczenia degradacji PtdIns.

2.4 Badanie udziału białek G w regulacji aktywności fosfolipazy C degradującej fosfatydyloinozytolo-4,5-bisfosforan

Do badań używano niehydrolizujący analog GTP, $\text{GTP}\gamma\text{S}$. Dodawany był on do mieszaniny inkubacyjnej zawierającej homogenat w stężeniu 100 μM . W celu stwierdzenia obecności oraz roli dwóch podtypów białek G: G_s oraz G_i zastosowano odpowiednio toksynę cholery oraz toksynę krztuśca.

Protokół doświadczeń z zastosowaniem toksyny cholery.

Toksynę cholery (Cholera Toxin, *Vibrio cholerae*, Calbiochem) rekonstruowano w wodzie destylowanej zbuforowanej Tris-HCl 50 mM do pH 7.4. Białko homogenatu (30-40 μg) preinkubowano z toksyną cholery w dawce 2.0 μg toksyny na próbę a następnie inkubowano w środowisku inkubacyjnym do oznaczenia degradacji $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ w obecności 100 μM $\text{GTP}\gamma\text{S}$. Inkubację prowadzono przez 15 min w 37°C w łaźni wodnej z bardzo delikatnym wytrząsaniem. Następnie reakcję zatrzymywano przez dodanie mieszaniny chloroform:metanol:HCl w stosunku objętościowym 100:100:6 i poziom degradacji $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ -PLC oznaczano wg opisanej metody.

Protokół doświadczeń z toksyną krztuśca.

Toksynę krztuśca (*Bordetella pertussis*, Sigma) rekonstruowano w wodzie destylowanej. Stosowano preinkubację tej toksyny z 5 mM ATP, 5 mM DTT i 1 mM NAD przez 30 min w 30°C. Następnie do każdej próbki inkubacyjnej zawierającej 30-40 µg białka dodawano roztwór zawierający 2 µg toksyny krztuśca, zgodnie z warunkami opisanymi przez Deckmyna i wsp. (1986). Inkubację właściwą prowadzono według metody opisanej w p. 2.3.

2.5 Pomiar aktywności fosforylacji endogennych fosfolipidów inozytolowych w homogenacie kłębków szyjnych

Homogenat był źródłem substratu (lipidy inozytowe) i enzymów (kinazy lipidów inozytowych). Fosforylacje endogennych lipidów inozytowych badano poprzez oznaczanie poziomu radioaktywnego [³²P] w PtdIns(4)P, PtdIns(4,5)P₂ i KF po inkubacji homogenatu w środowisku zawierającym radioaktywny ³²PγATP. Środowisko inkubacyjne zawierało 15 µCi ³²PγATP, 0.5 mM ATP, 10 mM MgCl₂ 20 mM Tris-HCl pH 7.4, 30 µg białka w końcowej objętości 100 µl. Inkubacje prowadzono przez 90 sek w 30°C. Reakcję przerywano podając 1.5 ml chloroformu i metanolu w stosunku objętościowym 1:2. Po dokładnym wymieszaniu próby były inkubowane w 25 °C przez 10 min celem lepszej ekstrakcji lipidów. Następnie dodawano 25 mM ATP w 100 µl na jedną próbę oraz

standardy lipidów inozytolowych (PtdIns 20 μg , PtdIns(4)P 10 μg , PtdIns(4,5)P₂ 12 μg). Dokładnie mieszano i dodawano 0.5 ml 2.4 M HCl i 0.5 ml chloroformu, mieszano i wirowano 5 minut przy 1000g. Odbierano dolną fazę do próbki i do górnej fazy dodawano 1 ml chloroformu, mieszano i wirowano w warunkach podanych wyżej. Połączone dolne fazy chloroformowe płukano 2 ml metanolu z 1 M HCl w stosunku objętościowym 1:1, mieszano i wirowano jak podano powyżej. Kolejno odrzucano górną fazę i odbierano dolną do suchych próbek, pobierano 100 μl do naczynek scyntylicyjnych, odparowywano, zalewano płynem scyntylicyjnym i liczono radioaktywność w liczniku scyntylicyjnym. Uzyskany wynik wskazywał na aktywność fosforylacji endogennych lipidów kłębka. Pozostałą część próby odparowywano do sucha i następnie zawieszano w małej objętości chloroformu, metanolu i wody w stosunku objętościowym 7.5:2.5:0.2. Tak rozpuszczone lipidy nakładano na płytkę chromatograficzną. Przed nałożeniem lipidów płytkę chromatograficzną zanurzano w 2% szczawianie sodu, następnie suszono na wolnym powietrzu, z kolei aktywowano termicznie w 110 °C przez 15 min. Po nałożeniu na płytkę chromatogram rozwijano w solwencie chloroform:metanol:4N NH₄OH w stosunku objętościowym 45:35:10. Po zidentyfikowaniu lipidów w parach jodu w oparciu o standardy, plamy lipidów zeszkrobywano z płytki do naczynek scyntylicyjnych. Radioaktywność lipidów liczono w liczniku scyntylicyjnym (LKB Wallach 1409).

2.6 Ekstrakcja lipidów

2.6.1 Ekstrakcja lipidów według metody Bligh i Dyer (1959)

Mieszaninę inkubacyjną ekstrahowano chloroformem:metanolem 1:2 (v/v). Ekstrakt pozostawiano na 15 min w 4°C, a następnie dodawano chloroform oraz wodę w ilości 1/5 objętości mieszaniny ekstrakcyjnej. Całość wytrząsano i pozostawiano na 15 min w 4°C. W celu dokładnego rozdzielenia się faz próby wirowano przy 3500 rpm przez 10 min. Dolną fazę, zawierającą lipidy, po odparowaniu w atmosferze azotu zawieszano w niewielkiej ilości mieszaniny chloroform:metanol, 9:1 v/v, i nakładano na płytki chromatograficzne.

2.6.2 Ekstrakcja lipidów inozytolowych i wodnorozpuszczalnych metabolitów inozytolu

Mieszaninę inkubacyjną ekstrahowano mieszaniną chloroform:metanol:stężony HCl w stosunku objętościowym 100:100:6, następnie dodawano 0.3 ml wody destylowanej, mieszano energicznie przez 10 min i odwirowywano (1000 g przez 5 min).

Fazę organiczną przenoszono do suchej probówki. Górną fazę wraz ze zdenaturowanym białkiem ekstrahowano ponownie mieszaniną chloroform:metanol, 4:1 v/v, z 0.3 N HCl. Ekstrakt wirowano i odbierano fazę organiczną, którą neutralizowano 1 kroplą 25%

amoniaku, a następnie obie fazy organiczne łączono i odparowywano. Suche lipidy rozpuszczano w mieszaninie chloroform:metanol, 2:1 v/v, i наносono na płytkę chromatograficzną. Górną fazę wodną delikatnie zbierano, neutralizowano 1 kroplą NH_4OH i odwirowywano przy 2000 g przez 10 min.

W celu oznaczenia całkowitej radioaktywności fazy wodnej mierzono jej objętość i pobierano 0.4 ml do naczynka scyntylacyjnego. Wodną fazę, zawierającą rozpuszczalne w wodzie metabolity, produkty degradacji fosfolipidów inozytowych, przechowywano w temperaturze -20°C . Do rozdziału i analizy wodnorozpuszczalnych produktów degradacji lipidów inozytowych stosowano metodę chromatografii kolumnowej.

2.7 Rozdział i analiza fosfolipidów inozytowych oraz ich metabolitów

2.7.1 Rozdział chromatograficzny i analiza radioaktywności fosfatydyloinozytolu i polifosfoinozytydów. Chromatografia cienkowarstwowa wysokosprawna

Ekstrakt lipidowy odparowywano do sucha pod strumieniem azotu i zawieszano w niewielkiej objętości chloroformu z metanolem, 2:1 v/v, i nakładano na płytkę do wysokosprawnej chromatografii cienkowarstwowej, którą uprzednio impregnowano 2% roztworem szczawianu sodu i aktywowano w $100-110^\circ\text{C}$ przez 15 min.

Po nałożeniu ekstraktu lipidowego płytkę dokładnie suszono pod suszarką i chromatogram rozwijano w kamerze zawierającej chloroform, metanol, 4 N NH_4OH w stosunku objętościowym 9:7:2. Po rozwinięciu i odparowaniu rozpuszczalników płytkę wywoływano w jodzie, identyfikowano $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$, $\text{PtdIns}(4)\text{P}$ i PtdIns przy pomocy wzorców. Plamy lipidów zeszkrobywano z płytki do naczynek scyntylicyjnych, dodawano płynu scyntylicyjnego i mierzono radioaktywność w liczniku scyntylicyjnym (Beckman LS/9000 lub LKB Wallach 1409).

2.7.2 Rozdział i analiza wyznakowanych inozytolofosforanów, produktów degradacji lipidów inozytowych. Chromatografia kolumnowa

Górną wodną fazę uzyskaną po ekstrakcji fosfolipidów inozytowych, zawierających rozpuszczalne w wodzie metabolity fosfoinozytydów, używano do analizy wg metody opisanej przez Berridge'a i wsp. (1983). Inozytol, glicerofosfoinozytol (GPI) i fosforanowe pochodne [^3H] inozytolu: $\text{Ins}(1)\text{P}_1$, $\text{Ins}(1,4)\text{P}_2$, $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$, rozdzielano na kolumnie o wymiarach 0.5 x 7 cm, której wypełnienie stanowił Dowex AG-1 (0.4 g 200-400 mesh). Cały eluat zbierano do probówek. Wymywano z kolumny kolejno: inozytol (I) zużywając 20 ml wody bidestylowanej. Frakcję inozytolu zbierano do probówek w czterech porcjach po 5 ml każda. GPI eluowano 15 ml roztworu tertraboranu sodowego w mrówczanie sodu (5 mM $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ w 60 mM HCOONa). Eluat zbierano po 5 ml do

trzech kolejnych probówek. Inozytolo fosforany $\text{Ins}(1)\text{P}_1$, $\text{Ins}(1,4)\text{P}_2$, $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ wmywano używając wzrastających stężeń buforu mrówczanowego odpowiednio 0.2 M $\text{HCOONH}_4/0.1$ M HCOOH , 0.4 M $\text{HCOONH}_4/0.1$ M HCOOH , 1 M $\text{HCOONH}_4/0.1$ M HCOOH . Zbierano je w trzech porcjach po 8, 4, 2 ml. Z każdej porcji eluatu odbierano 0.5 ml w celu policzenia całkowitej radioaktywności rozdzielonych metabolitów.

W przypadku analizy rozpuszczonych w wodzie znakowanych produktów degradacji fosfatydylo-2- ^3H inozytoli postępowano w podobny sposób. Reakcję przerywano mieszaniną chloroform:metanol:HCl, 100:100:6 v/v/v, i 0.7 ml wprowadzano na kolumnę, której wypełnienie stanowił Dowex AG-1 (200-400 mesh), 0.4 g. Po zebraniu eluatu wmywano z kolumny kolejno inozytol w 20 ml wody destylowanej, glicerofosfoinozytol w 15 ml roztworu tertraboranu sodowego w mrówczanie sodu (5 mM $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7/60$ mM HCOONa). Inozytolo-1-monofosforan wmywano buforem mrówczanowym 0.2 M $\text{HCOONH}_4/0.1$ M HCOOH i zbierano w trzech porcjach po 8, 4, 2 ml. Eluat odbierano w porcjach 0.5 ml bezpośrednio do naczynek scyntylacyjnych, dodawano płyn scyntylacyjny Bray'a i radioaktywność liczono w liczniku scyntylacyjnym (Beckman LS/9000 lub LKB Wallach 1409).

3. Analiza danych

Wyniki przedstawiono w postaci wartości średnich \pm błąd standardowy (SE). Zmiany aktywności PLC określano w wartościach

mianowanych (nmol/mg białka/min). Określano również mianowaną wartość różnicy pomiędzy wartościami średnimi w badanych grupach, a także różnicę wyrażoną w % wartości kontrolnej.

Porównanie parametrów, wykazujących podobieństwo zmienności (wysoka korelacja) i/lub pochodzących z tej samej grupy badanej w odmiennych warunkach, przeprowadzano z użyciem testu Studenta dla danych sparowanych. W szczególności porównań takich dokonywano dla zmiennych procentowych.

Dla oceny wpływu zmian stężenia jonów H^+ wywoływanych drogą oddechową i metaboliczną stosowano analizę regresji liniowej. Ze współczynnika nachylenia linii regresji oceniano zmianę aktywności PLC na jednostkową zmianę stężenia jonów wodorowych.

W przypadku porównywania więcej niż dwóch grup stosowano analizę wariancji, w tym test Fishera (F). Przy stwierdzeniu, że zespół grup nie jest homogenny, $p < 0.05$ dla testu F, stosowano metodę Scheffe'go w celu ustalenia, które grupy różniły się.

IV. WYNIKI

1. Charakterystyka aktywności PLC degradującej PtdIns(4,5)P₂ i PtdIns w normoksyjnych kłębkach szyjnych kota

1.1 Wstępne badania metodyczne

W prowadzonych badaniach stosowano substrat egzogeny, radioaktywne fosfolipidy inozytolowe: PtdIns(4,5)P₂ oraz PtdIns. Substraty te przeprowadzono do fazy wodnej w obecności dezoksycholenu sodu (DOC), którego końcowe stężenie wynosiło 0.1%. Stosowano metodę podobną do tej używanej przez takie grupy badaczy, jak: amerykańską Majerusa (1982) oraz angielską Irvina i Dawsona (1986). Stwierdzono generalnie niską aktywność PLC w KS. Zdażały się doświadczenia, w których aktywność ta była niewykrywalna w standardowych warunkach inkubacyjnych, natomiast można ją było oznaczyć w obecności 100 μM GTPγS. W każdym układzie dodatek dezoksycholenu był konieczny dla oznaczenia PLC. W badaniach na KS, ZSG i PM stwierdzono istotną zależność PLC od stężenia DOC. Optymalne końcowe stężenie DOC wynosiło 0.1%. Przy niższym stężeniu aktywność enzymu była wyraźnie niższa lub nieoznaczalna, natomiast przy wyższym była znacznie hamowana. Obecność tego detergentu umożliwiała więc interakcję substratu z enzymem.

Przebadano dodatkowo inne sposoby przygotowania substratu lipidowego do oznaczenia aktywności PLC w używanym materiale:

sonifikację oraz układ fosfolipidy inozytolowe w stosunku molowym 1:1 z fosfatydyloetanoliną bez sonifikacji i z sonifikacją. W żadnym z tych układów nie stosowano detergentu. We wszystkich wymienionych układach doświadczalnych aktywność enzymu była bardzo niska lub nieoznaczalna w warunkach normoksyjnych. Stosowanie dezoksyholanu wydaje się więc konieczne do badań regulacji i modyfikacji aktywności PLC w KS i ZSG.

Źródłem enzymu był homogenat KS, ZSG i PM. Za użyciem homogenatu tkankowego w przeprowadzonych badaniach przemawiało kilka argumentów. Przy stosowaniu homogenatu uzyskany wynik winien obrazować wypadkową zmian aktywności enzymatycznej w wymienionych organach pod wpływem zmian chemizmu krwi. Ważnym argumentem jest również bardzo mała wilgotna masa całego organu, około 1 mg, co odpowiada średnio $113.8 \pm 29.8 \mu\text{g}$ białka na jeden kłębek szyjny (opracowano na podstawie danych z 100 KS).

1.2 Podkomórkowa lokalizacja PLC

Wyniki badań bilansu białkowego oraz analizy aktywności całkowitej i specyficznej $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ -PLC we frakcjach subkomórkowych KS, przeprowadzonych w dwóch niezależnych doświadczeniach, przedstawiono w Tabeli 1.

Z doświadczeń tych wynika, że około 40% białka osadza się we frakcji P_1 uzyskanej w wyniku wirowania homogenatu KS przy 900 g przez 3 min. Frakcja ta zawiera nie rozbite komórki, tkankę łączną, naczynia oraz frakcję jąder komórkowych i stanowi ona

Tabela 1

Rozkład białka i aktywności fosfolipazy C degradującej PtdIns(4,5)P₂ w homogenacie i frakcjach podkomórkowych kłębków szyjnych

Frakcje	białko		aktywność PtdIns(4,5)P ₂ -PLC			
	μg	%	A.S nmol/mg białka	A.C nmol/B.C	A.C %	F
Homogenat	596	100.0	1.61	0.96	100	1.0
Frakcja jąder (900g, 3min P ₁)	259	43.6	0.62	0.16	16.7	0.39
Frakcja błon SP (48000g, 20min)	84	14.1	3.75	0.32	32.9	2.33
Cytozol	140	23.4	2.93	0.41	42.6	1.82
Odzysk		81.1			92.2	

Około 30-50 μg białka homogenatu oraz frakcji podkomórkowych inkubowano w obecności substratu [³H]PtdIns(4,5)P₂ i endogennych stężeń Ca²⁺, jak opisano w Materiałach i Metodach. Dane przedstawiają wyniki średnie z dwóch doświadczeń. Każde z nich było prowadzone na materiale 6 KS. We frakcji mikrosomalnej P₃ (100000g, 1 godz) aktywność była nieoznaczalna.

Oznaczenia:

- A.S -aktywność specyficzna odpowiada nmol/mg białka/min.
- A.C -aktywność całkowita odpowiada nmol/białko całkowite homogenatu i frakcji podkomórkowych.
- B.C -białko całkowite homogenatu i poszczególnych frakcji podkomórkowych.
- F -odpowiada wskaźnikowi wzbogacenia, czyli A.S frakcji/do A.S homogenatu.

około 17% całkowitej aktywności enzymu. Aktywność specyficzna jest niska, a wskaźnik wzbogacenia tej frakcji w aktywność enzymatyczną wynosi 0.39 wskaźnika aktywności homogenatu przyjętego za 1.

Wirowanie frakcji pierwszego nadsącza (S_1) i uzyskanie frakcji P_2 i błon synaptoplazmatycznych (BSP) oraz wirowanie S_2 przy 100000 g przez 1h i uzyskanie frakcji mikrosomalnej i frakcji cytozolu komórkowego pozwoliło na dokładniejsze zbadanie lokalizacji i aktywności tego procesu. Stwierdzono, że frakcja błon synaptoplazmatycznych stanowi 14% całkowitej zawartości białka i zawiera około 33% całkowitej aktywności enzymu w KS. Frakcja cytozolu komórkowego stanowi 23% całkowitej zawartości białka i zawiera około 43% całkowitej aktywności enzymu. Obie frakcje wykazały znaczną aktywność specyficzną enzymu i wyraźne wzbogacenie w aktywność enzymatyczną w porównaniu do homogenatu. Wskaźnik wzbogacenia wynosi 2.3 i 1.82 odpowiednio dla frakcji BSP i cytozolu.

Wyniki wskazują, że około 80% całkowitej aktywności enzymatycznej odpowiedzialnej za degradację $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ jest zlokalizowane we frakcji BSP i w cytozolu. Aktywność enzymatyczna we frakcji mikrosomalnej była nieoznaczalna. Wyniki te potwierdzone zostały dodatkowo w dwóch doświadczeniach prowadzonych w uproszczony sposób. Postanowiono więc, że badania prowadzone będą na homogenacie, odzwierciedlającym głównie aktywność enzymu w BSP i cytozolu. Dodatkowym argumentem są dane literaturowe wskazujące, że szereg czynników, w tym hipoksja,

może powodować zmiany właściwości błon i modyfikować proces sedimentacji białka podczas wirowania, i wpływać na dyslokację enzymu. Wobec powyższego wydawało się w pełni uzasadnione prowadzenie badań na frakcji homogenatu.

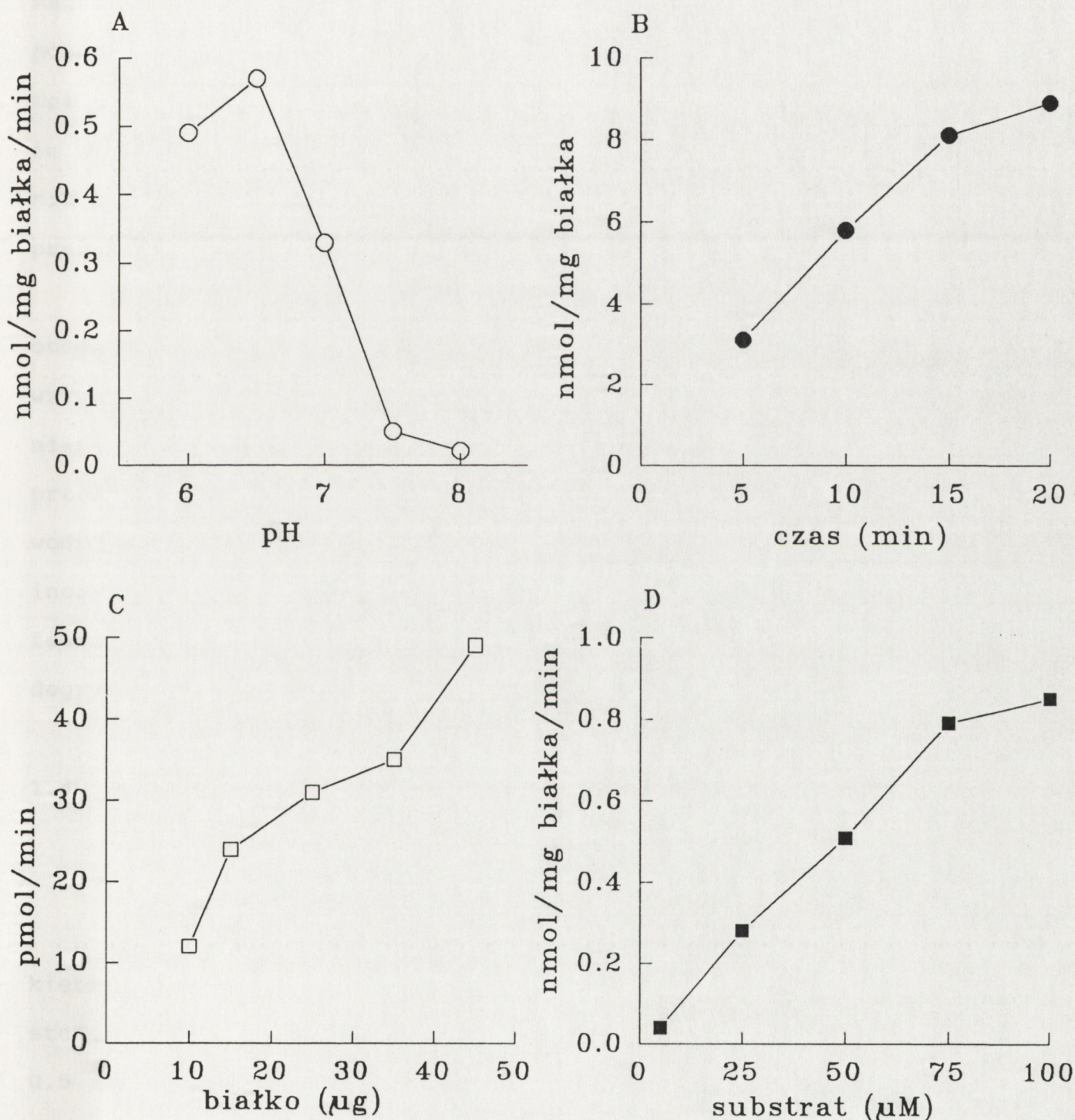
Stwierdzono zależność degradacji PtdIns(4,5)P₂ i PtdIns od ilości użytego białka, czasu inkubacji oraz stężenia substratu (Rycina 1). Warunki te były zbliżone do stosowanych wcześniej w badaniach nad aktywnością tego procesu w mózgu (Strosznajder i Strosznajder 1989). Hydroliza PtdIns(4,5)P₂ przez PLC wykazuje zależność od pH, najaktywniejsza jest w pH kwaśnym, optimum przypada na pH 6.5-6.6. Aktywność enzymu jest liniowa w czasie 15 min do 50 μg białka i do 75 μM stężenia substratu, co odpowiada 15 nmoli PtdIns(4,5)P₂ w 200 μl końcowej objętości inkubacyjnej. W przypadku PtdIns-PLC optimum pH przypadało na pH 7.8 a badana aktywność enzymu była liniowa w czasie 30 min do 50 μg białka i do 100 μM stężenia substratu. W rozdziale Materiał i Metody podano dokładnie skład podstawowego środowiska inkubacyjnego używanego do oznaczania aktywności PtdIns(4,5)P₂-PLC i PtdIns-PLC.

1.3 Analiza wodnorozpuszczalnych produktów hydrolizy lipidów inozytolowych

W badaniach degradacji PtdIns przez enzym(y) KS stwierdzono, że produktem degradacji był wyłącznie inozytolomonofosforan IP₁, natomiast w przypadku degradacji PtdIns(4,5)P₂ były to wszystkie

CHARAKTERYSTYKA KINETYKI AKTYWNOŚCI PLC DEGRADUJĄCEJ

PtdIns(4,5)P₂ W KŁĘBKACH SZYJNYCH.



Rycina 1. Zależność aktywności PtdIns(4,5)P₂-PLC od:

- A - pH
- B - czasu inkubacji
- C - stężenia białka
- D - stężenia substratu

trzy fosforany inozytowe: $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$, $\text{Ins}(1,4)\text{P}_2$ i InsP_1 . W stosowanym środowisku inkubacyjnym w badaniach nad enzymatyczną degradacją fosfolipidów inozytowych nie stwierdzono nagromadzenia glicerofosfoinozytolu (poza śladowymi ilościami w pojedynczych doświadczeniach) i jego pochodnych fosforanowych ani też obecności radioaktywnego inozytolu. Wyniki te potwierdziły, że w stosowanych układach inkubacyjnych w KS badano aktywność PLC nie stwierdzając działania innych fosfolipaz (A,D). Tabela 2 prezentuje wyniki z trzech typowych doświadczeń.

W badaniach, gdzie źródłem enzymu był homogenat pnia mózgu, obserwowano wyłącznie w przypadku degradacji PtdIns nieznaczny wzrost poziomu radioaktywności we frakcji glicerofosfoinozytolu i niekiedy inozytolu. Był to jednak niewielki procent (1-5%), nie przekraczający w sumie 10% całej puli radioaktywności wodorozpuszczalnych produktów degradacji fosfolipidów inozytowych. Wyniki te mogą wskazywać na niewielki udział fosfolipaz typu A i współdziałającej z nimi lizofosfolipazy w degradacji fosfolipidów inozytowych przez enzymy pnia mózgu.

1.4 Wpływ jonów Ca^{2+} oraz $\text{GTP}\gamma\text{S}$ na aktywność PLC degradującej $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ i PtdIns

Aktywność degradacji fosfolipidów inozytowych przez enzymy kłębków szyjnych kota badano w obecności 2 mM EGTA, endogennych stężeń jonów Ca^{2+} oraz w środowisku inkubacyjnym zawierającym 0.5 mM i 2 mM CaCl_2 . Stwierdzono istotną aktywność degradacji

Tabela 2

Analiza wodnorozpuszczalnych produktów hydrolizy lipidów inozytolowych.

nr dośw.	1	2	3	x (średnia)
Inozytol	0	0	0	0
GPI	2.7	0	0	0.9
Ins(1)P ₁	24.3	3.6	2.3	10.1
Ins(1,4)P ₂	35.9	43.1	49.3	42.8
Ins(1,4,5)P ₃	38.1	53.2	49.4	46.9

Rozdział wodnorozpuszczalnych metabolitów inozytolu przeprowadzono zgodnie z metodą opisaną przez Berridge'a i wsp.(1983), przy zastosowaniu chromatografii kolumnowej jonowymiennej jak opisano w rozdziale Materiał i Metody. Wyniki przedstawiają % udział radioaktywności poszczególnych metabolitów w całej radioaktywności wszystkich metabolitów inozytolu.

Wyjaśnienia :

- I - inozytol
- GPI - glicerofosfinozytol
- Ins(1)P₁ - inozytolomonofosforan
- Ins(1,4)P₂ - inozytolobisfosforan
- Ins(1,4,5)P₃ - inozytolotrisfosforan

PtdIns(4,5)P₂ w obecności 2 mM EGTA. Endogenny poziom Ca²⁺, jak również wyższe jego stężenia nie wpływały w istotny sposób na aktywność degradacji PtdIns(4,5)P₂ przez PLC w porównaniu do wartości obserwowanych w środowisku z 2mM EGTA (Rycina 2).

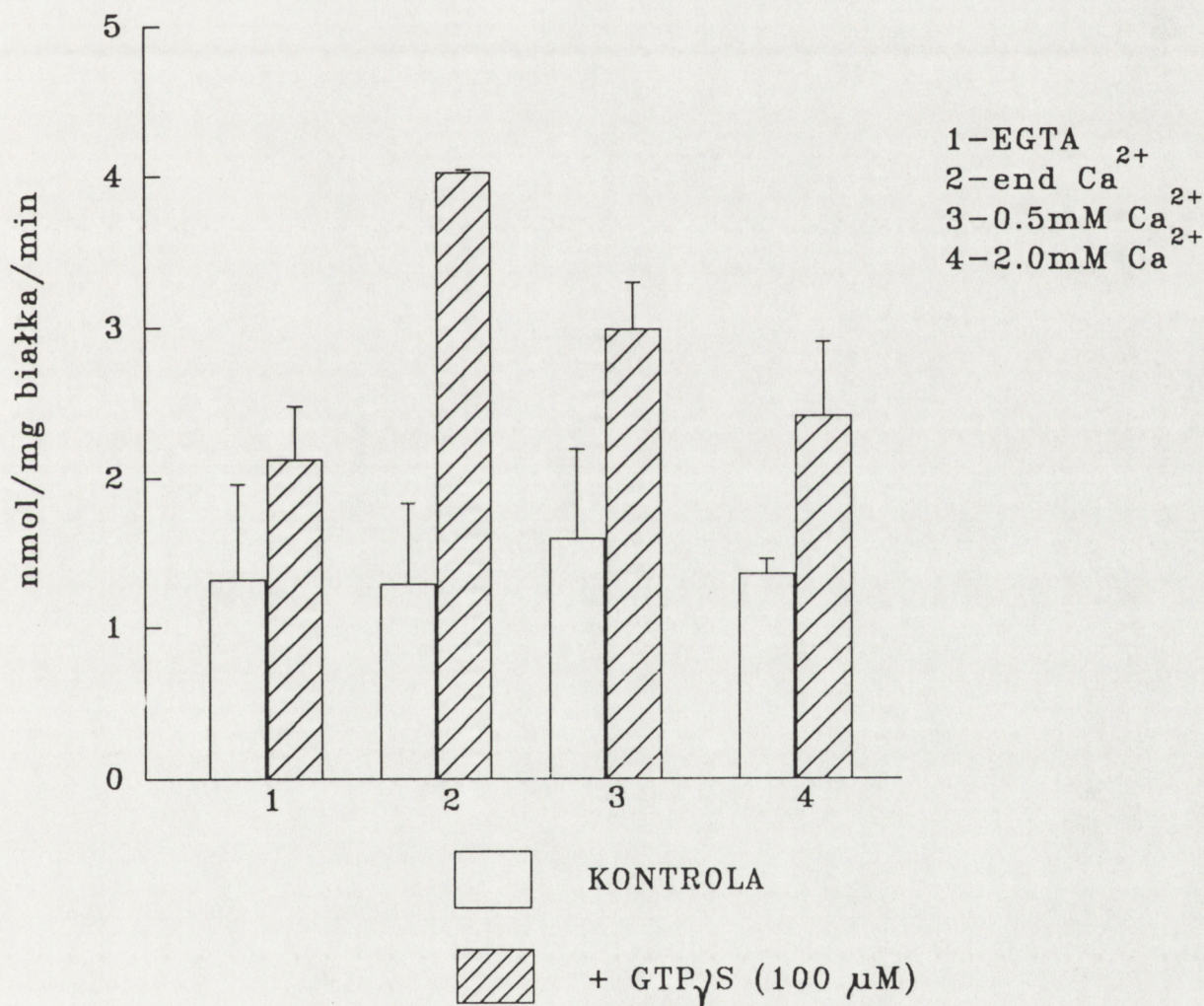
W badaniu wpływu niehydrolizującego analogu GTP, GTPγS stwierdzono, że aktywuje on hydrolizę PtdIns(4,5)P₂ przez PLC w obecności EGTA oraz w obecności różnych stężeń Ca²⁺ (Rycina 2). Przedstawione dane są wartościami średnimi z dwóch doświadczeń prowadzonych w 3 powtórzeniach, a wyniki każdego doświadczenia odzwierciedlają wartości z 8 KS. Największy stymulacyjny efekt GTPγS zaobserwowano w obecności endogennych stężeń CaCl₂.

Tabela 3 przedstawia wyniki 6 niezależnych doświadczeń prowadzonych w 2-3 powtórzeniach, dotyczących wpływu GTPγS na aktywność PtdIns(4,5)P₂-PLC w KS w obecności endogennych stężeń jonów wapnia. Stwierdzono wyraźny aktywujący wpływ tego nukleotydu na degradację PtdIns(4,5)P₂. Proces ten aktywowany był średnio o ponad 100%, a uzyskany wynik wskazuje na udział białek G w aktywacji PLC.

W badaniach porównawczych, dotyczących wpływu GTPγS na aktywność PtdIns(4,5)P₂-PLC, uwzględniono zwoje szczyjne górne oraz pień mózgu. Wyniki przedstawione na Rycinie 3 wskazują na słabszą choć znamienne aktywację tego enzymu przez GTPγS, w ZSG średnio o około 70%, a w pniu mózgu o 50%.

W kolejnych badaniach oceniano regulacyjny wpływ jonów Ca²⁺ i GTPγS na aktywność degradacji PtdIns przez PLC w KS i uzyskane wyniki porównywano z danymi z homogenatów ZSG i PM. Rycina 4

WPŁYW $GTP\gamma S$ NA AKTYWNOŚĆ $PtdIns(4,5)P_2$ -PLC W ZALEŻNOŚCI
OD Ca^{2+} W NORMOKSYJNYCH KŁĘBKACH SZYJNYCH



Rycina 2. Kontrola jest to wartość aktywności PLC w obecności różnych stężeń Ca^{2+} bez $GTP\gamma S$. Wyniki stanowią średnie \pm SE z 2 doświadczeń prowadzonych w 3 powtórzeniach.

Tabela 3

Wpływ GTP γ S na aktywność fosfolipazy C degradującej fosfatydyloinozytol-4,5-bisfosforan w kłębkach szyjnych kota w obecności endogennych stężeń Ca²⁺

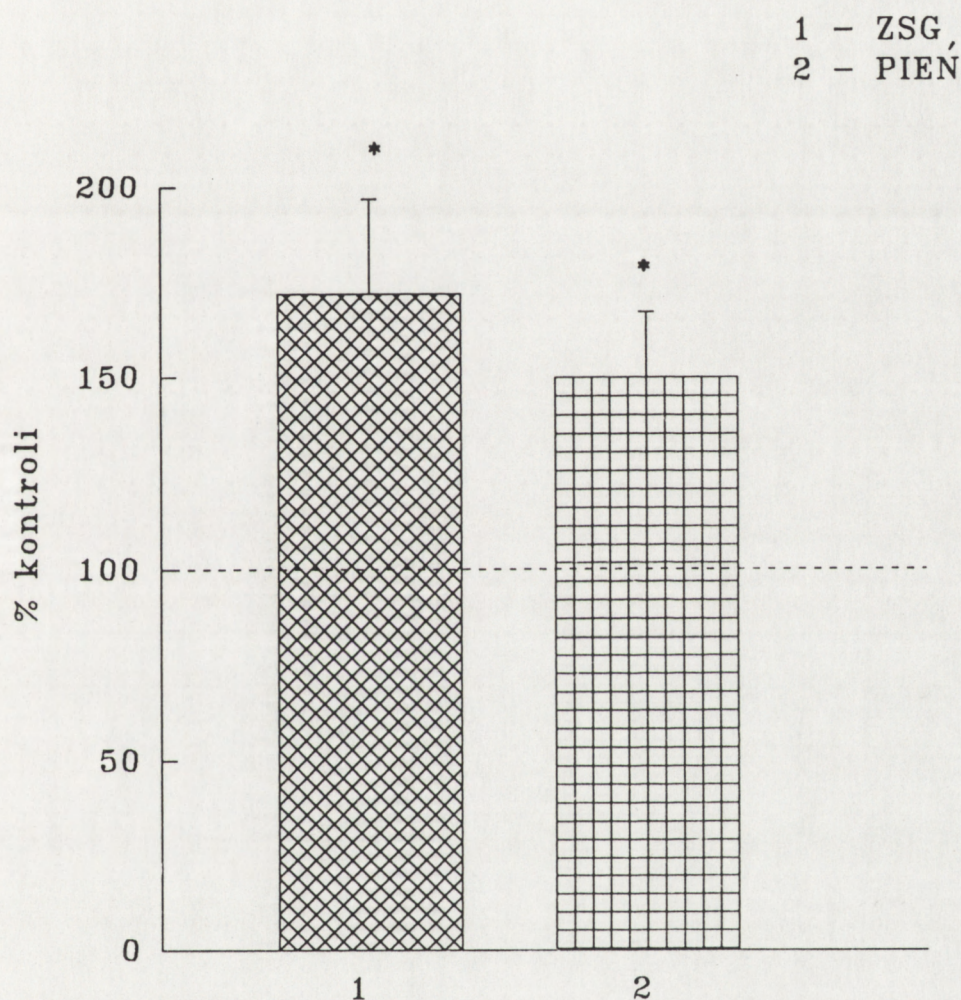
PtdIns(4,5)P₂-PLC
nmol/ mg białka/ min

Nr dośw.	end Ca ²⁺ (kontrola)	end Ca ²⁺ GTP γ S	Δ	Δ %
1	1.75 (2)	4.67 (3)	2.92	167
2	2.68 (2)	4.08 (2)	1.4	52
3	1.29 (3)	4.01 (3)	2.72	211
4	0.89 (2)	1.94 (2)	1.05	118
5	2.38 (3)	3.68 (3)	1.3	55
6	0.98 (2)	2.11 (3)	1.13	115
x	1.66	3.41 *	1.75 *	120 *
SE	0.33	0.50	0.37	27.8

Warunki inkubacji i oznaczania PtdIns(4,5)P₂-PLC podano w rozdziale Materiał i Metody. GTP γ S stosowano w stężeniu 100 μ M. Wyniki przedstawiają dane z poszczególnych doświadczeń przeprowadzonych na homogenatach kłębków szyjnych kotów normoksyjnych. Każde doświadczenie prowadzono na 4-6 kłębkach. Liczba powtórzeń w nawiasach.

* - p < 0.05 vs kontrola

WPLYW $GTP\gamma S$ NA AKTYWNOŚĆ $PtdIns(4,5)P_2$ -PLC W NORMOKSYJNYCH
ZWOJACH SZYJNYCH GÓRNYCH I PNIU MÓZGU



Rycina 3. Kontrola jest to wartość normoksyjna aktywności PLC przyjęta za 100% (linia przerywana). $GTP\gamma S$ stosowano w stężeniu $100 \mu M$. Warunki inkubacji i oznaczenia aktywności PLC podano w rozdziale Materiał i Metody. Wyniki stanowią średnie \pm SE z 8 doświadczeń prowadzonych na ZSG i 10 doświadczeń prowadzonych na pniu mózgu. Każde doświadczenie prowadzono w 2-3 powtórzeniach.

* - $p < 0,05$ versus kontrola

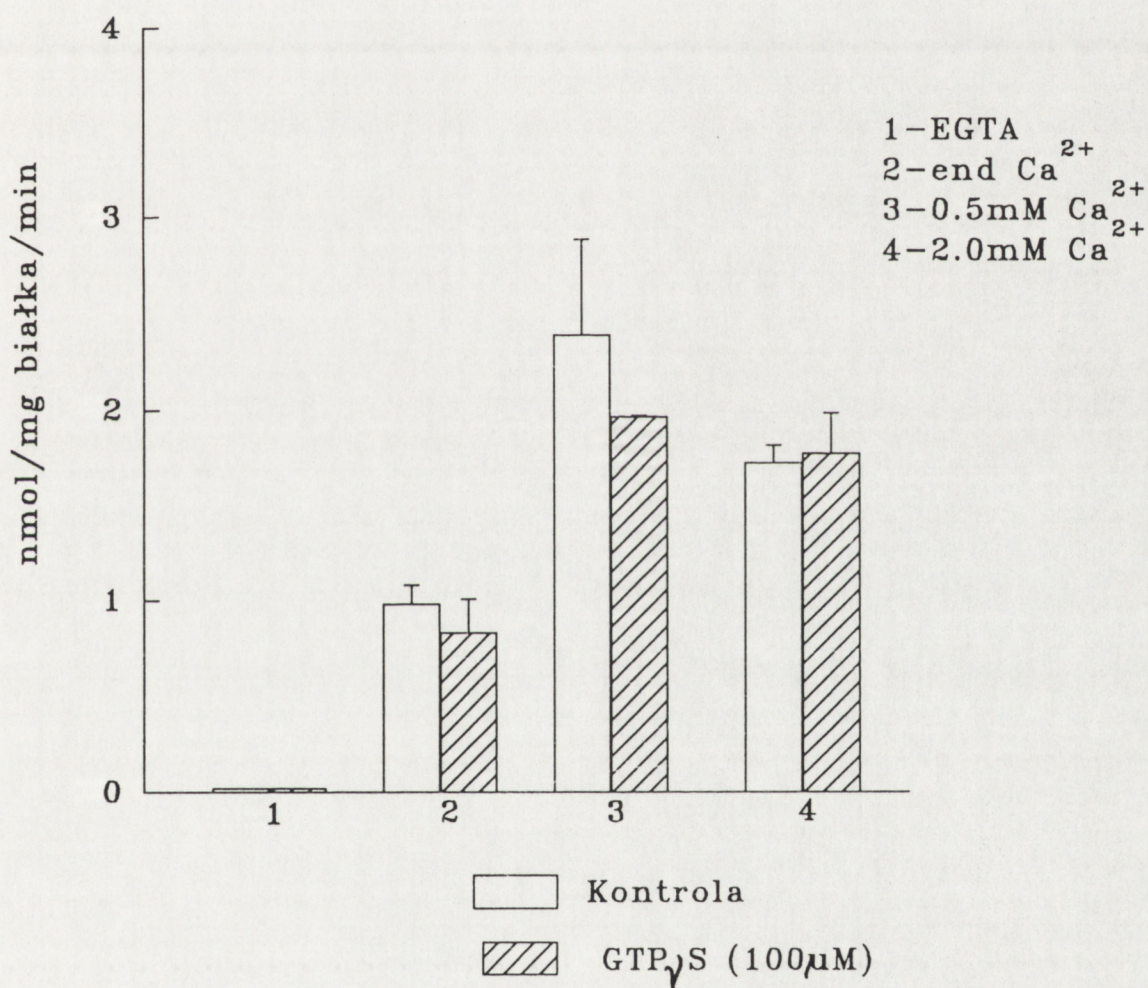
przedstawia wyniki z dwóch niezależnych doświadczeń. Wskazują one na brak oznaczalnej aktywności PtdIns-PLC w KS w obecności 2 mM EGTA zarówno bez, jak i z 100 μ M GTP γ S. Aktywność degradacji PtdIns obserwowano w obecności endogennych stężeń jonów Ca²⁺. Wzrastała ona w obecności 0.5 mM CaCl₂. Dalsze zwiększenie Ca²⁺ nie powodowało już zwiększenia aktywności PLC. GTP γ S nie wywierał wpływu na aktywność PtdIns-PLC w żadnym układzie doświadczalnym.

Wyniki z 6-ciu niezależnych doświadczeń nad wpływem GTP γ S na aktywność degradacji PtdIns w obecności 0.5 mM CaCl₂ przedstawione są w Tabeli 4. Dodanie GTP γ S powodowało wzrost aktywności PLC o około 7-8%. Wskazuje to na brak regulacyjnego wpływu tego nukleotydu na aktywność PtdIns-PLC w KS. Podobne wyniki uzyskano w badaniach na ZSG i pniu mózgu.

1.5 Wpływ dopaminy i karbacholu na aktywność PtdIns(4,5)P₂-PLC

W kolejnych doświadczeniach badano wpływ dopaminy oraz karbacholu w KS i ZSG. W 3 doświadczeniach stosowano preinkubację całych KS w środowisku zawierającym 100 μ M dopaminę i 10 μ M pargylinę. W 3 następnych doświadczeniach stosowano 1 mM karbachol (Rycina 5 i 6). Stwierdzono około 40 % aktywację degradacji PtdIns(4,5)P₂ przez PLC KS w wyniku działania dopaminy i około 20% w przypadku karbacholu. Aktywacja ta nie była znamienna statystycznie. W obecności GTP γ S dopamina i karbachol powodują nieznamienny wzrost degradacji PtdIns(4,5)P₂ przez PLC

WPŁYW $GTP_{\gamma}S$ NA AKTYWNOŚĆ PtdIns-PLC W ZALEŻNOŚCI OD Ca^{2+}
W NORMOKSYJNYCH KŁĘBKACH SZYJNYCH.



Rycina 4. Kontrola jest to wartość aktywności PLC w obecności różnych stężeń Ca^{2+} bez $GTP_{\gamma}S$. Warunki inkubacji i oznaczania aktywności PtdIns-PLC podano w rozdziale Materiał i Metody. Wyniki przedstawiają średnie \pm SE z 2 doświadczeń wykonanych w 2-3 oznaczeniach.

Tabela 4

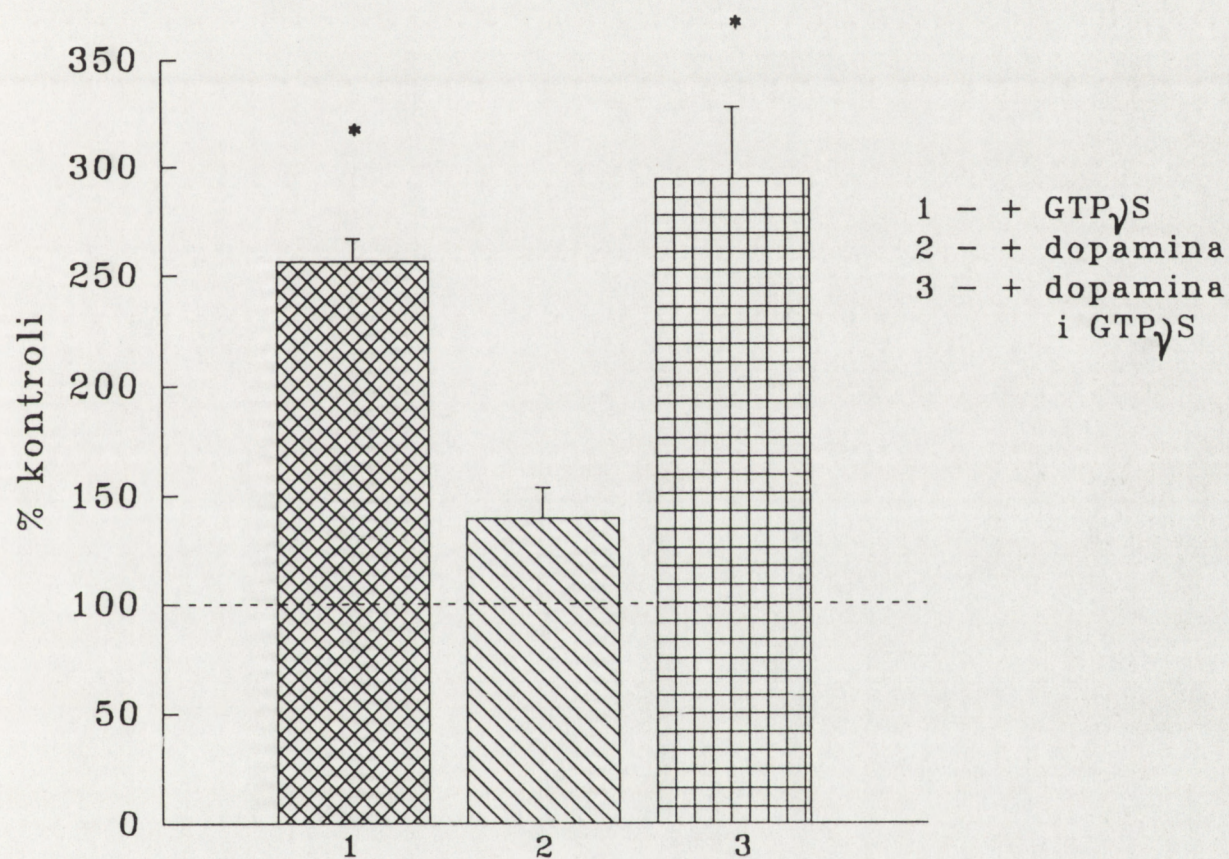
Wpływ GTP γ S na aktywność fosfolipazy C degradującej fosfatydylinozytol w kłębkach szyjnych kota

PtdIns-PLC
nmol/mg białka/min

Nr dośw.	0.5 mM CaCl ₂ (kontrola)	0.5 mM CaCl ₂ GTP γ S	Δ	Δ %
1	2.34 (2)	1.97 (3)	-0.37	-16
2	1.73 (2)	1.95 (2)	0.22	13
3	1.50 (3)	1.59 (2)	0.09	6
4	1.68 (2)	1.52 (3)	-0.16	-10
5	0.21 (3)	0.24 (3)	0.03	14
6	0.17 (2)	0.23 (3)	0.06	35
x	1.27	1.25	-0.02	7
SE	0.39	0.36	0.09	8.25

Warunki inkubacji i oznaczania PtdIns-PLC podano w rozdziale Materiał i Metody. GTP γ S stosowano w stężeniu 100 μ M. Wyniki przedstawiają dane z poszczególnych doświadczeń przeprowadzonych na homogenatach kłębków szyjnych kotów normoksyjnych. Każde doświadczenie prowadzono na homogenatach z 4-6 kłębków. Liczba powtórzeń w nawiasach.

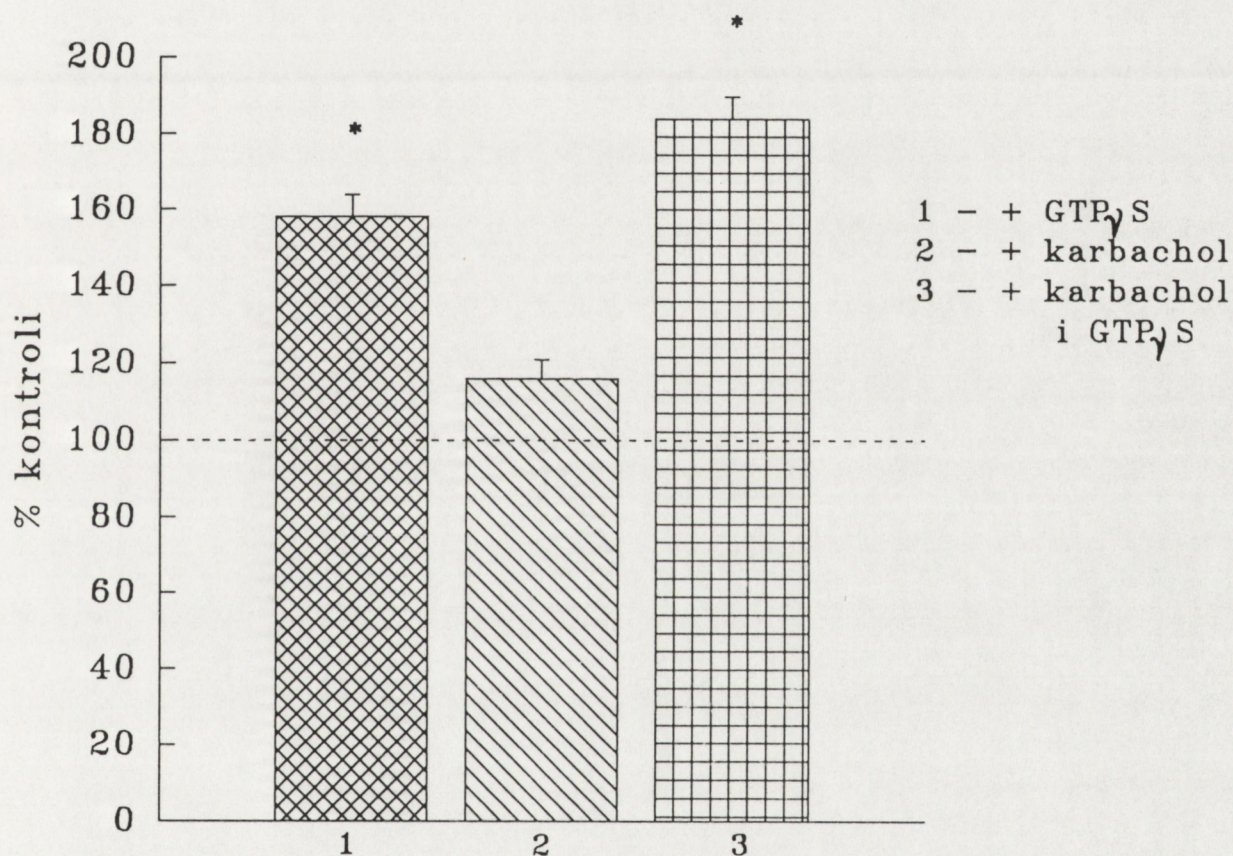
WPŁYW DOPAMINY NA AKTYWNOŚĆ PtdIns(4,5)P₂-PLC W
NORMOKSYJNYCH KŁĘBKACH SZYJNYCH



Rycina 5. Kontrola jest to wartość aktywności PLC przyjęta za 100% (linia przerywana), badana po preinkubacji niestymulowanych KS w roztworze Krebsa-Ringera. Kłębki szyjne preinkubowano 5 min w obecności 100 μ M dopaminy i 10 μ M pargyliny. GTP γ S stosowano w stężeniu 100 μ M. PtdIns(4,5)P₂-PLC oznaczono jak podano w rozdziale Materiał i Metody. Wyniki stanowią średnią \pm SE z 3 doświadczeń w 1-3 powtórzeniach.

* - $p < 0.01$ versus kontrola

WPŁYW KARBACHOLU NA AKTYWNOŚĆ $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ -PLC W
NORMOKSYJNYCH KŁĘBKACH SZYJNYCH



Rycina 6. Kontrola jest to wartość aktywności PLC przyjęta za 100% (linia przerywana), badana po preinkubacji niestymulowanych KS w roztworze Krebsa-Ringera. Kłębki szyjne preinkubowano 5 min w obecności 1mM karbacholu. $\text{GTP}\gamma\text{S}$ stosowano w stężeniu 100 μM . $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ -PLC oznaczano jako opisano w rozdziale Materiał i Metody. Wyniki stanowią średnie \pm SE z 3 doświadczeń prowadzonych w 1-3 powtórzeniach.
* - $p < 0.05$ versus kontrola

KS w porównaniu z efektem samego GTP γ S.

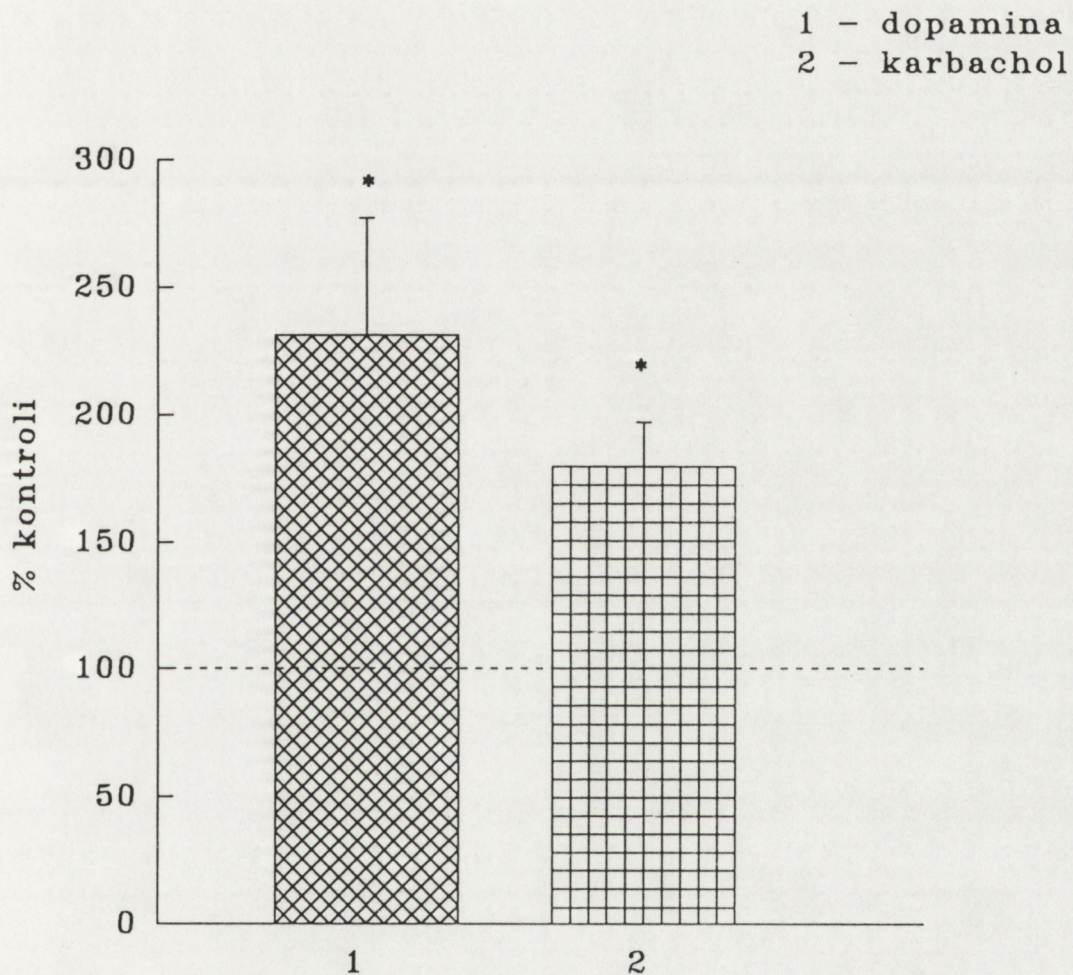
W badaniach porównawczych, dotyczących działania wymienionych agonistów na aktywność PtdIns(4,5)P₂-PLC w normoksyjnych ZSG, stwierdzono znamienne stymulujący wpływ dopaminy i karbacholu (Rycina 7).

1.6 Wpływ ATP na aktywność PLC degradującej PtdIns(4,5)P₂

W kolejnych badaniach weryfikowano hipotezę, w myśl której ATP poza swoją funkcją związku wysokoenergetycznego może odgrywać także rolę w degradacji fosfolipidów inozytolowych, biorących udział w procesie przekazywania informacji. Badano wpływ ATP na aktywność degradacji PtdIns(4,5)P₂ przez PLC w KS i porównywano go z efektem w ZSG. Badania prowadzono w obecności endogennych stężeń jonów Ca²⁺. Stosowano dwa stężenia ATP: 0.25 mM i 1 mM.

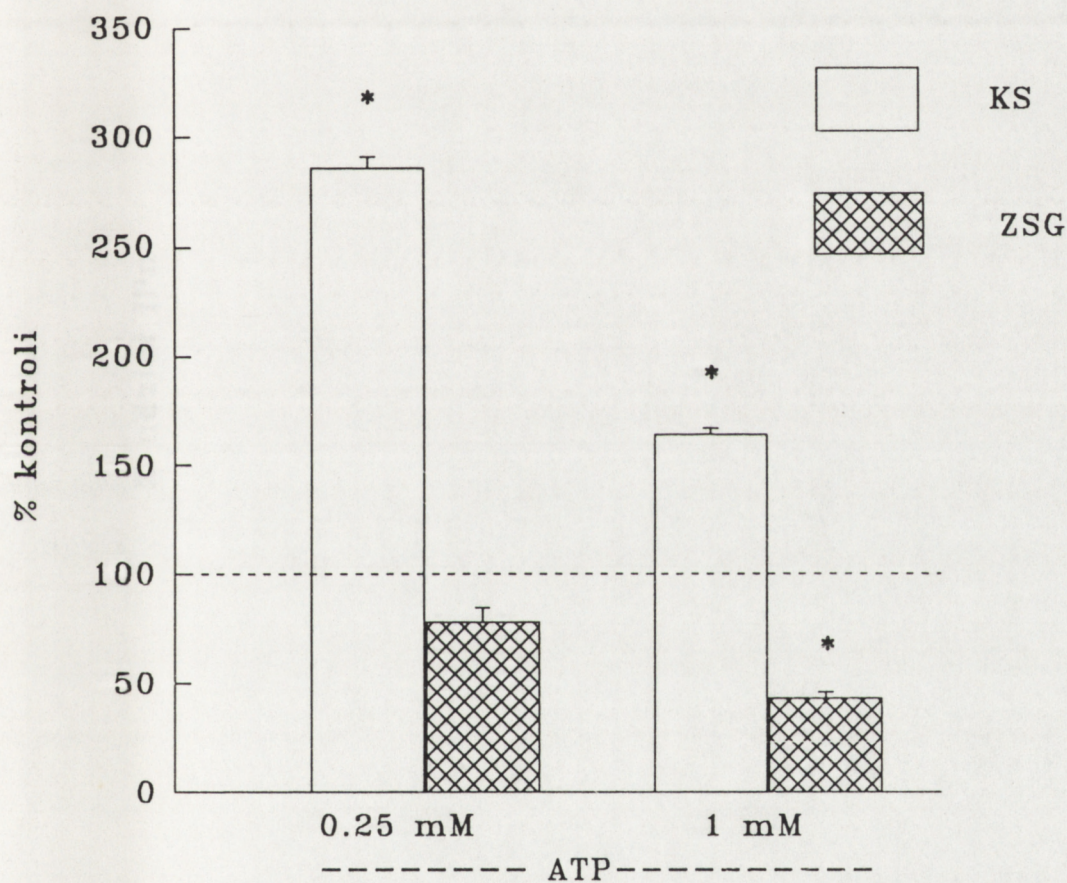
Stwierdzono stymulujący efekt ATP w KS, który był silniejszy w obecności niższego stężenia ATP (0.25mM) i wynosił około 200 % kontroli. Nukleotyd ten w stężeniu 1.0 mM powodował tylko około 50 % wzrost degradacji PtdIns(4,5)P₂ przez PLC w KS (Rycina 8). Stymulujący wpływ ATP na degradację PtdIns(4,5)P₂ przez PLC był specyficzny dla KS. W zwojach szyjnych górnych ATP powodował obniżenie hydrolizy PtdIns(4,5)P₂ przez PLC (Rycina 8). W obecności ATP stwierdzono znacznie wyższy procentowy udział Ins(1,4,5)P₃ w całej puli inozytolofosforanów w KS oraz spadek udziału IP₂ i IP₁ (Rycina 9). Przedstawione wyniki 4 doświadczeń

WPŁYW DOPAMINY I KARBACHOLU NA AKTYWNOŚĆ $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ -PLC
W NORMOKSYJNYCH ZWOJACH SZYJNYCH GÓRNYCH



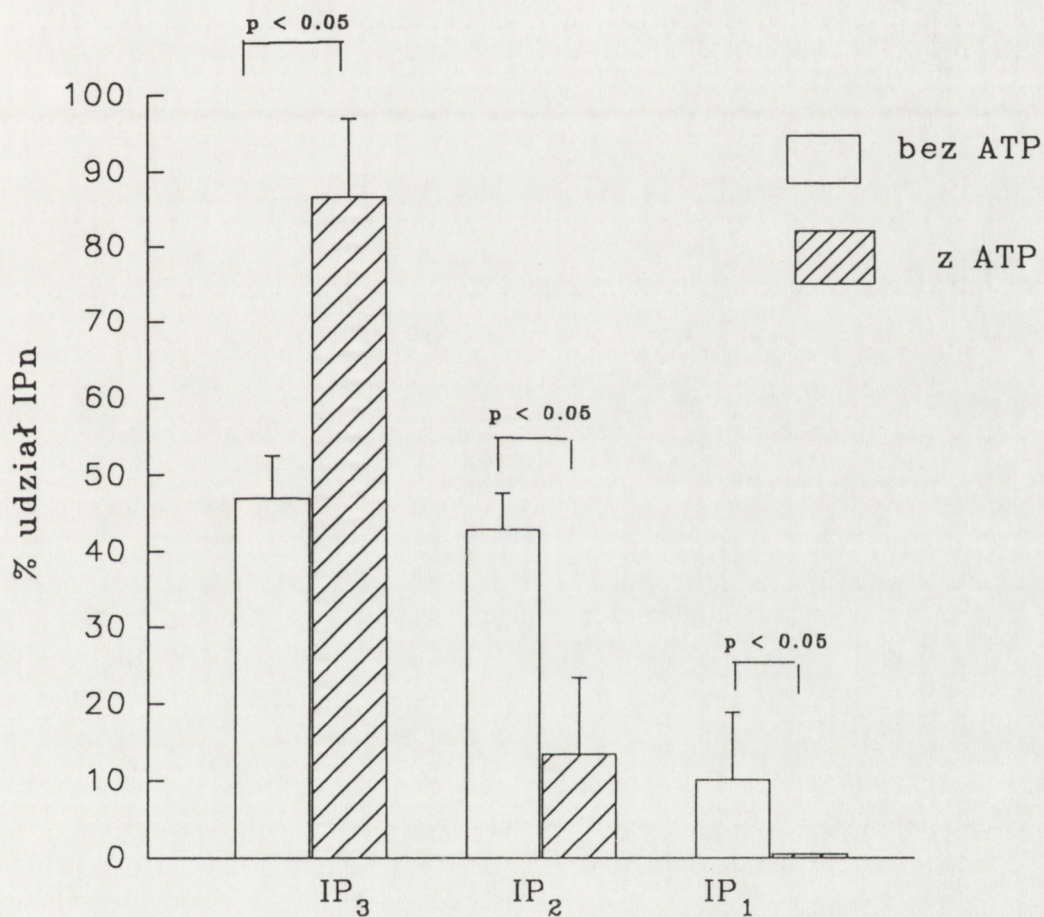
Rycina 7. Kontrola jest to wartość aktywności PLC przyjęta za 100% (linia przerywana), badana bez agonistów po preinkubacji w roztworze Krebsa-Ringera. Prowadzono 5 min preinkubację ZSG w obecności 100 μM DA z 10 μM pargyliną lub z 1 mM karbacholem. Wyniki stanowią średnie \pm SE z 5 doświadczeń z zastosowaniem DA i 3 doświadczeń z karbacholem. Każde doświadczenie prowadzono w 2-3 powtórzeniach.
* - $p < 0,05$ versus kontrola

WPLYW ATP NA AKTYWNOŚĆ PtdIns(4,5)P₂-PLC W NORMOKSYJNYCH
KŁĘBKACH SZYJNYCH I ZWOJACH SZYJNYCH GÓRNYCH.



Rycina 8. Kontrola jest to wartość aktywności PLC przyjęta za 100% (linia przerywana), bez ATP. Warunki inkubacji i oznaczania PtdIns(4,5)P₂-PLC podano w rozdziale Materiał i Metody. Wyniki stanowią średnie ± SE z 3 doświadczeń prowadzonych w 1-3 powtórzeniach.
* - p < 0,05 versus kontrola

WPŁYW ATP NA PROCENTOWY ROZKŁAD RADIOAKTYWNYCH
INOZYTOLOFOSFORANÓW W CAŁEJ PULI WODNOROZPUSZCZALNYCH
METABOLITÓW INOZYTOLU



Rycina 9. Oś Y prezentuje % udział poszczególnych IPn w całkowitej puli wodnorozpuszczalnych metabolitów inozytolu. Inozytolofosforany rozdzielono przy zastosowaniu chromatografii kolumnowej jonowymiennej jak opisano w rozdziale Materiał i Metody. Wyniki są średnimi \pm SE z 4 doświadczeń prowadzonych w 3 powtórzeniach.

wskazują na istotną rolę ATP w regulacji uwalniania wtórnych przekaźników informacji pochodzących z degradacji PtdIns(4,5)P₂.

2. Wpływ zmian ciśnienia parcjalnego tlenu oraz jonów wodorowych we krwi tętniczej na aktywność fosfolipazy C degradującej PtdIns(4,5)P₂ i PtdIns

2.1 Wpływ hipoksji i hiperoksji na aktywność PLC

Skład gazowy i pH krwi tętniczej przy stosowanych bodźcach podane są w Tabeli 5.

W kłębkach szyjnych, pochodzących od kotów poddanych in vivo działaniu ostrej hipoksji przez 20 min, stwierdzono znamienne wzrost aktywności fosfolipazy C. W Tabeli 6 przedstawiono w wartościach bezwzględnych wyniki dotyczące wpływu hipoksji. Przedstawione wartości są wynikami z 6 niezależnych doświadczeń prowadzonych w 2 lub 3 powtórzeniach.

W kolejnych doświadczeniach przeprowadzono badania dotyczące zależności aktywności PtdIns(4,5)P₂-PLC od zmian PaO₂. Wzięto pod uwagę trzy stany: normoksję, hipoksję i hiperoksję. Przeprowadzono 8 doświadczeń w grupie normoksyjnej i hipoksyjnej oraz 4 doświadczenia w grupie hiperoksyjnej (Rycina 10). Stwierdzono istotną zależność aktywności PLC od PaO₂. Aktywność ta wzrastała w hipoksji oraz była zahamowana w hiperoksji (Rycina 10).

Obserwowany wzrost aktywności PLC w KS w wyniku działania

Tabela 5

Skład gazowy krwi, równowaga kwasowo-zasadowa i parametry sercowo-krażeniowe zwierząt przy stosowanych bodźcach.

	NORMOKSJA	HIPOKSJA	HIPEROKSJA	KWASICA METAB.	KWASICA ODDECHOWA
PaO ₂ (mmHg)	92.5±6.2	19.4±3.8	533.4±28.9	85.6±8.9	90.8±7.5
PaCO ₂ (mmHg)	35.2±2.1	31.3±3.7	35.0±2.6	38.5±2.21	64.7±6.9
pHa	7.42±0.03	7.42±0.0	7.42±0.03	7.13±0.05	7.22±0.02
BP (mmHg)	120±25	117±30	106±22	131±23	125±14
HR (min ⁻¹)	225±39.3	217±41.3	218.7±16.6	234.2±40	232±24.7

Wartości przedstawiają średnie wraz z odchyleniami (SE) dla 12 doświadczeń w każdej z badanych grup. W poszczególnych grupach zmianie ulegał tylko jeden parametr.

Objaśnienia:

HR - częstotliwość skurczów serca

BP - ciśnienie tętnicze krwi

Tabela 6

Wpływ hipoksji na aktywność fosfolipazy C degradującej PtdIns(4,5)P₂ w kłębkach szyjnych kota

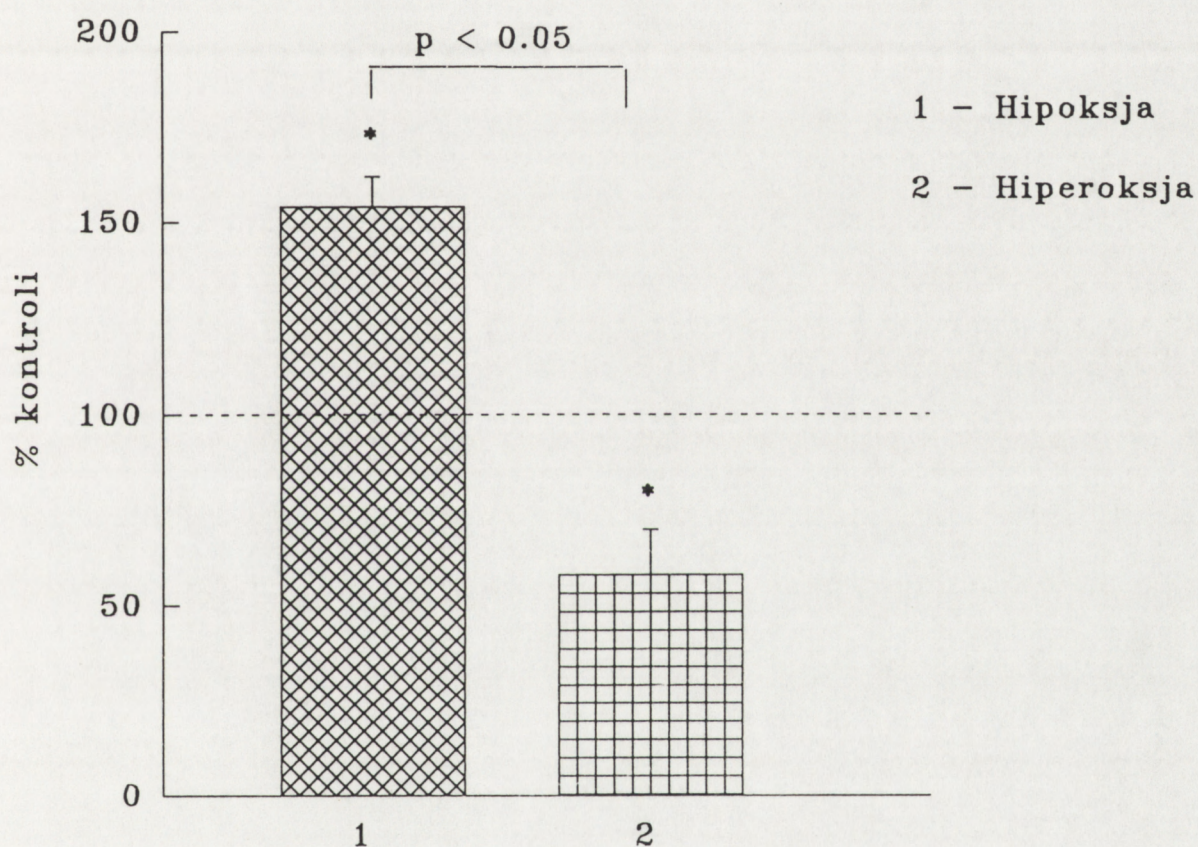
PtdIns(4,5)P₂-PLC
nmol/mg białka/ min

Nr dośw.	Kontrola	Hipoksja	Δ	Δ %
1	1.83 (2)	3.07 (2)	1.24	67
2	2.52 (2)	3.50 (3)	0.98	39
3	2.06 (3)	2.36 (2)	0.30	15
4	2.49 (3)	3.51 (3)	1.02	41
5	1.51 (2)	2.64 (3)	1.13	75
6	1.50 (2)	2.33 (2)	0.83	55
x	1.98	2.90 *	0.91 *	49 *
SE	0.20	0.24	0.14	9.7

Warunki inkubacji i oznaczania PtdIns(4,5)P₂-PLC podano w rozdziale Materiał i Metody. Wyniki przedstawiają dane z doświadczeń przeprowadzonych na homogenatach kłębków szyjnych. Każde doświadczenie prowadzono na 2-4 kłębkach. Liczba powtórzeń w nawiasach.

* - p < 0.05 vs kontrola

AKTYWNOŚĆ PtdIns(4,5)P₂-PLC W KŁĘBKACH SZYJNYCH
W ZALEŻNOŚCI OD PaO₂



Rycina 10. Kontrola jest to wartość normoksyjna aktywności PtdIns(4,5)P₂-PLC przyjęta za 100% (linia przerywana). Skład gazowy krwi i równowagę kwasowo-zasadową przedstawiono w Tabeli 5. Warunki doświadczenia, a następnie sposób oznaczania PLC opisano w rozdziale Materiał i Metody. Wyniki przedstawiają średnie \pm SE dla 8 doświadczeń w grupie normoksyjnej i hipoksyjnej, oraz 4 doświadczeń w grupie hiperoksyjnej. Każde doświadczenie prowadzono w 2-3 powtórzeniach.

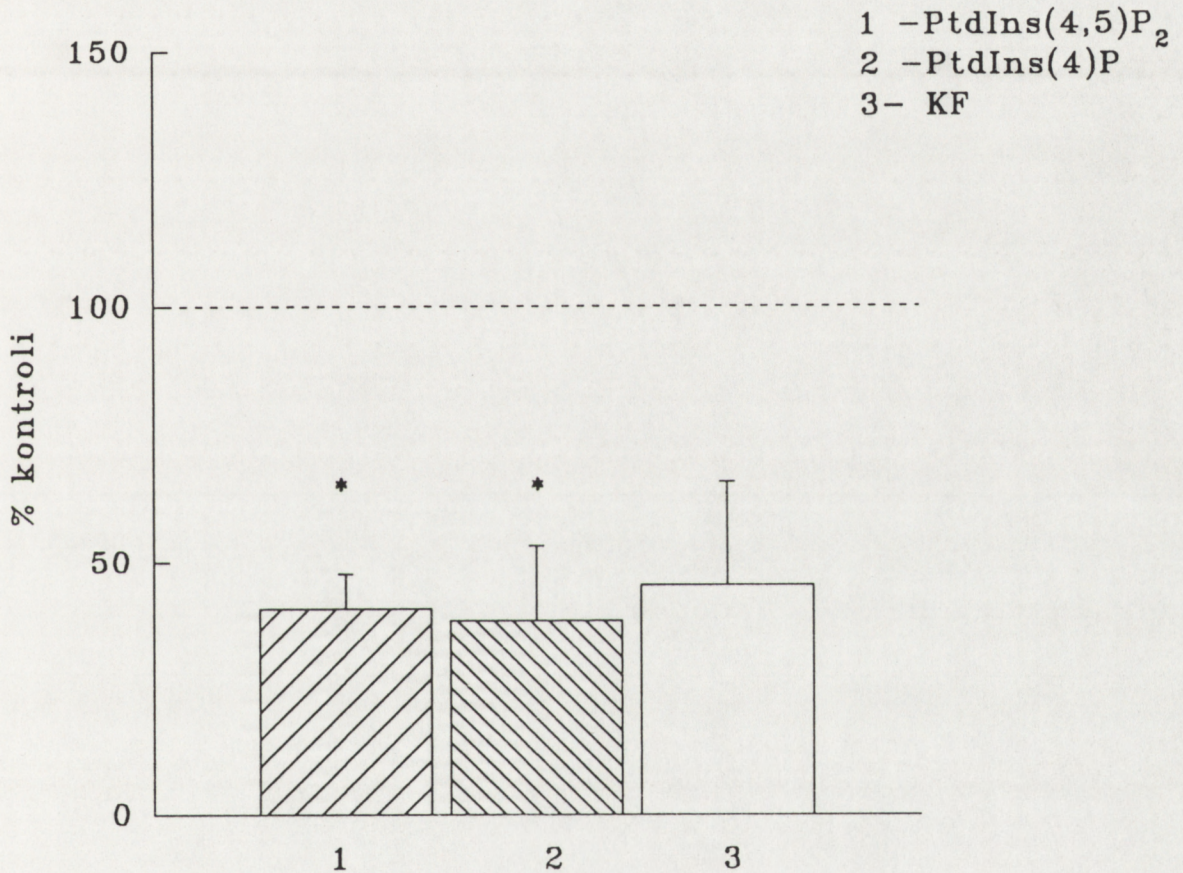
* - $p < 0.05$ - versus kontrola

hipoksji powinien doprowadzić do znacznej degradacji endogennych lipidów inozytolowych. Weryfikację tej hipotezy dokonano poprzez zbadanie procesu fosforylacji endogennych lipidów inozytolowych, stosując ocenę poziomu radioaktywności ^{32}P z $\gamma^{32}\text{P}$ -ATP w PtdIns(4,5) P_2 i PtdInsP oraz w kwasie fosfatydowym (KF). Przeprowadzono 5 doświadczeń z wbudowaniem ^{32}P do PtdIns(4,5) P_2 i PtdIns(4)P oraz 4 doświadczenia z wbudowaniem do KF. Warunki opisano w Materiałach i Metodach. Wyniki wskazują na znamienne obniżenie poziomu radioaktywności ^{32}P w PtdIns(4,5) P_2 i PtdIns(4)P w hipoksyjnych KS (Rycina 11). Wyniki te sugerują wyczerpywanie się endogennych lipidów w wyniku działania hipoksji. Mając na uwadze fakt, że badania prowadzono w obecności endogennych lipidów, a nie w obecności egzogennych optymalnych stężeń substratów potrzebnych dla określenia aktywności kinaz fosfolipidów inozytolowych, możemy wnioskować o obniżonym poziomie tych lipidów w KS w wyniku zadziałania hipoksji.

Porównywano dalej aktywność hipoksyjną PtdIns(4,5) P_2 -PLC w kłębkach szyjnych z tą w ZSG i PM. Stwierdzono, że hipoksja pozostaje bez wpływu na aktywność tego enzymu w PM, natomiast w ZSG powoduje nieznamienny wzrost PtdIns(4,5) P_2 -PLC (Rycina 12).

W kolejnych doświadczeniach porównywano zmiany PtdIns-PLC przy różnych poziomach PaO_2 . Zależność aktywności PtdIns-PLC od zmian PaO_2 obrazuje Rycina 13, która przedstawia wyniki z 11 doświadczeń w grupie hipoksyjnej i z 4 doświadczeń w grupie hiperoksyjnej. Stwierdzono brak znamienych różnic w porównaniu

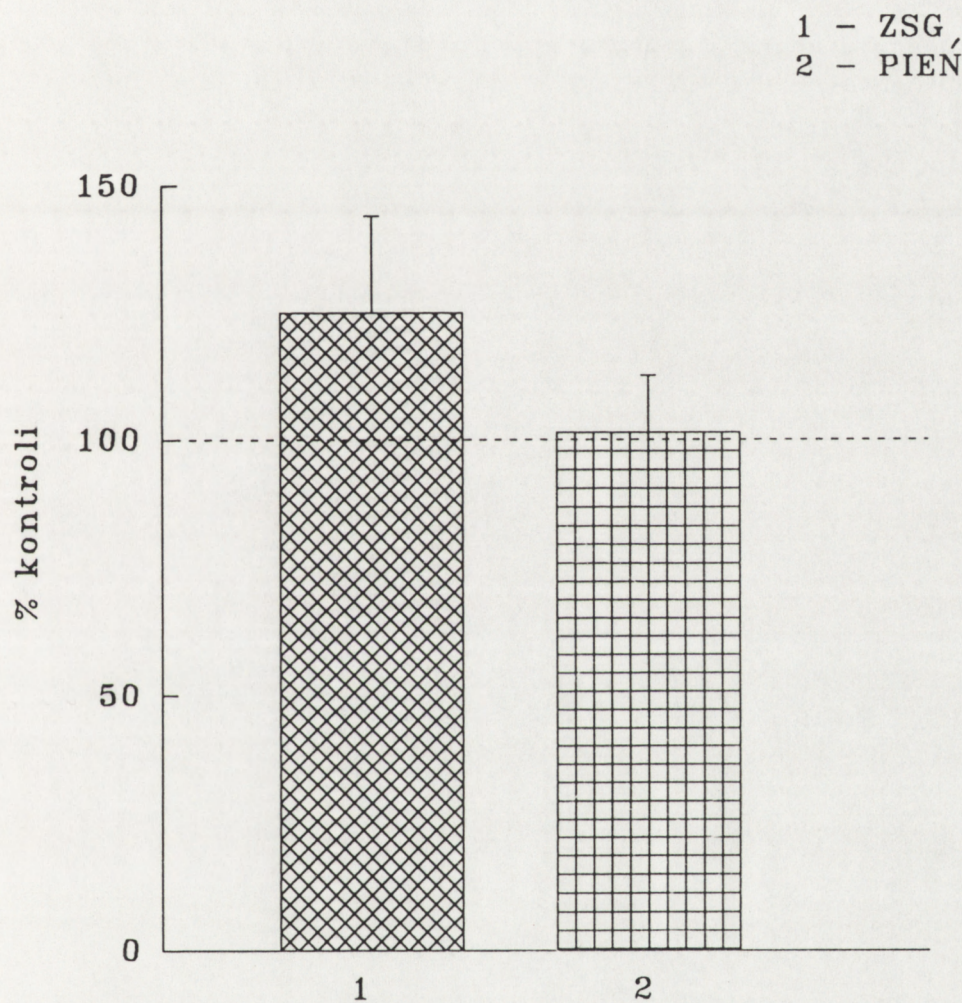
WBUDOWYWANIE ^{32}P z [^{32}P] ATP DO ENDOGENNYCH FOSFOLIPIDÓW
INOZYTOLOWYCH I DO KWASU FOSFATYDOWEGO KLĘBKÓW SZYJNYCH
HIPOKSYJNYCH



Rycina 11. Kontrola jest to wartość poziomu radioaktywności [^{32}P] w endogennych lipidach normoksyjnych klębków szyjnych, przyjęta za 100% (linia przerywana). Warunki doświadczalne dla wbudowywania [^{32}P] z ^{32}P ATP do fosfolipidów inozytolowych podano w rozdziale Materiał i Metody. Wyniki stanowią średnie \pm SE₃₂ z 5 doświadczeń dla wbudowania ^{32}P do PtdIns(4,5)P₂ i PtdIns(4)P oraz 4 doświadczeń do KF. Każde doświadczenie prowadzono w 2 powtórzeniach.

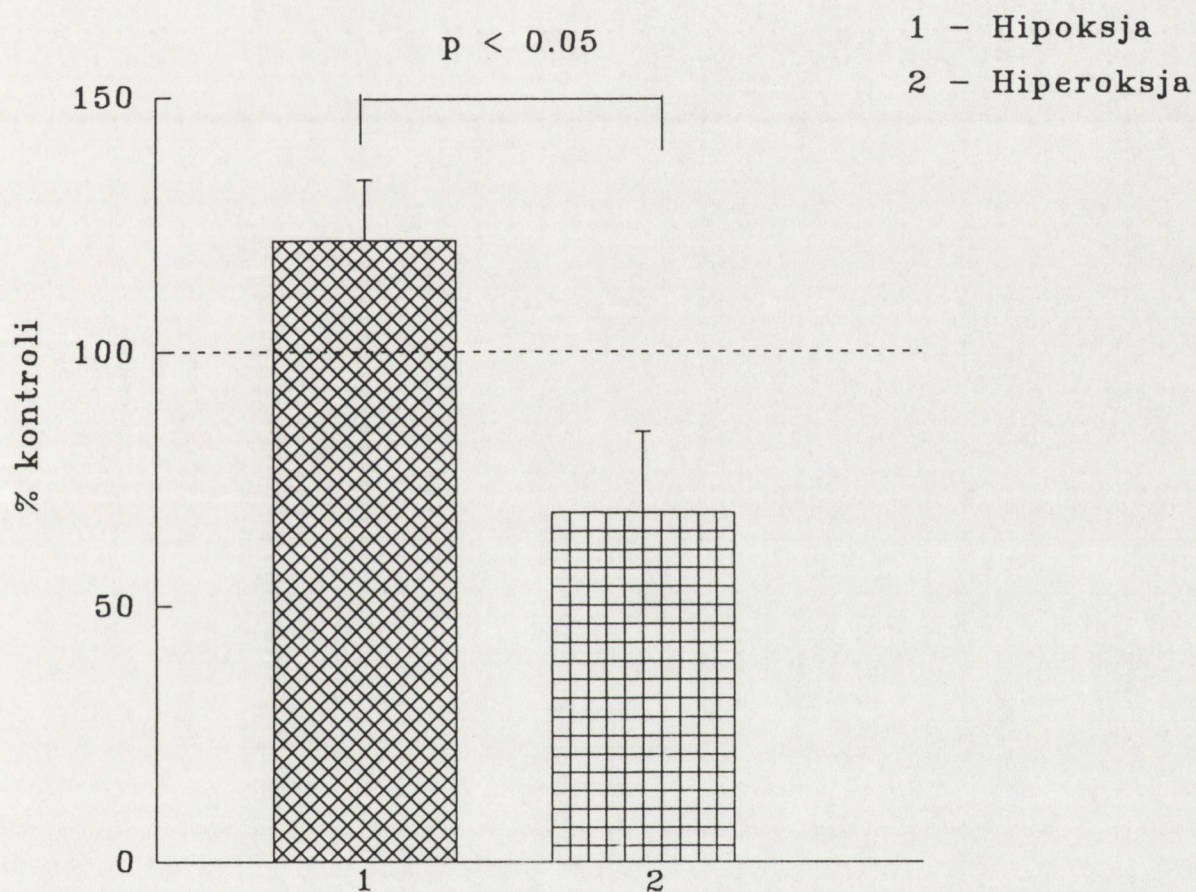
* - $p < 0.05$ - versus kontrola

WPŁYW HIPOKSJI NA AKTYWNOŚĆ $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ -PLC W
ZWOJACH SZYJNYCH GÓRNYCH I PNIU MÓZGU



Rycina 12. Kontrola jest to wartość normoksyjna aktywności $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ -PLC przyjęta za 100% (linia przerywana). Wyniki przedstawiają wartości średnie \pm SE z 6 doświadczeń dla ZSG i 4 dla PM. Każde doświadczenie prowadzono w 1-3 powtórzeniach.

AKTYWNOŚĆ PtdIns-PLC W KŁĘBKACH SZYJNYCH
W ZALEŻNOŚCI OD PaO₂



Rycina 13. Kontrola jest to wartość normoksyjna aktywności PtdIns-PLC przyjęta za 100% (linia przerywana). Wyniki przedstawiają wartości średnie \pm SE z 11 doświadczeń w grupie hipoksyjnej i 4 doświadczeń w grupie hiperoksyjnej. Każde doświadczenie prowadzono w 2-3 powtórzeniach.

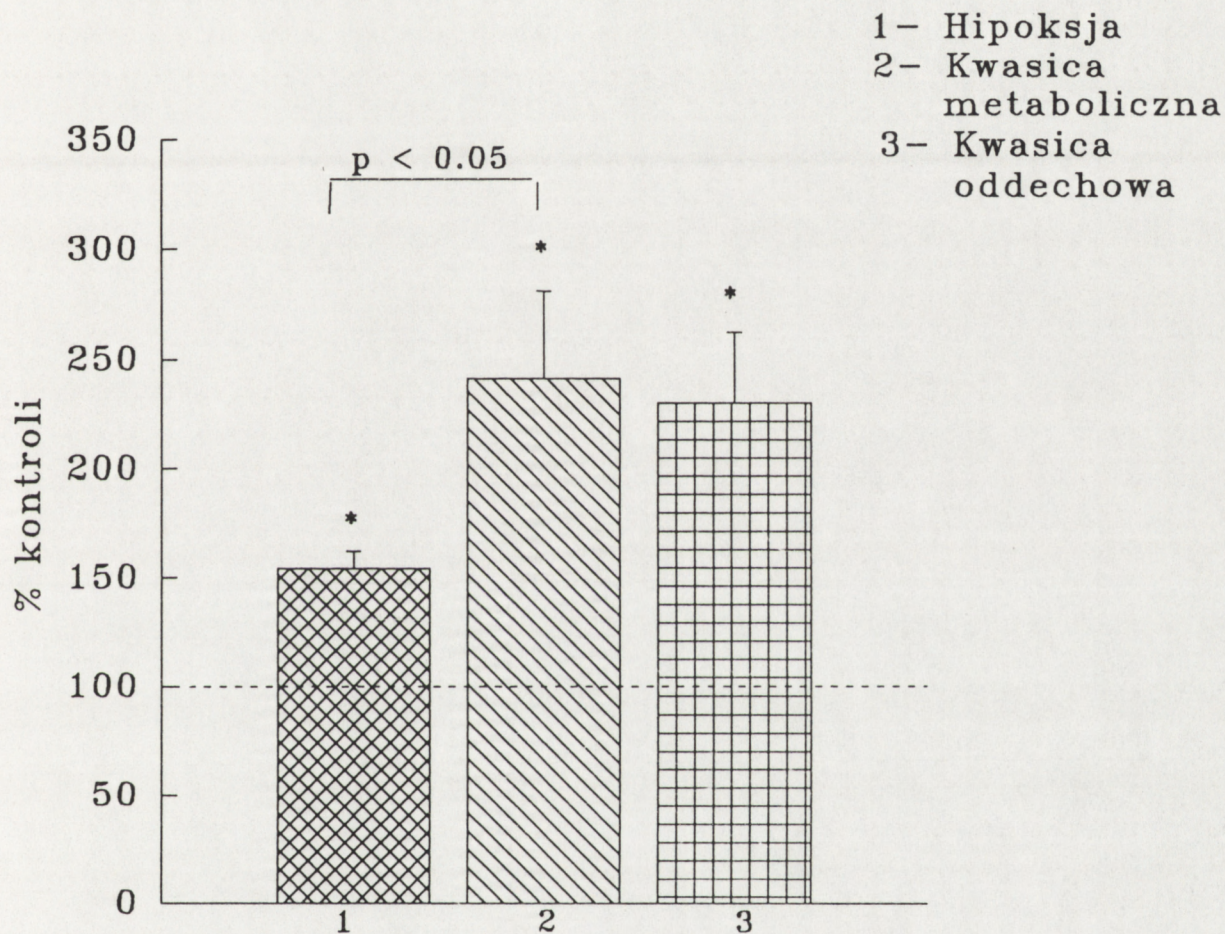
z kontrolą, natomiast istotną różnicę między aktywnością PtdIns w hipoksyjnych i hiperoksyjnych KS. Zmiany te były znacznie słabsze od tych dla PtdIns(4,5)P₂-PLC. Nie stwierdzono takich zmian zależnych od PaO₂ w aktywności enzymu degradującego PtdIns w ZSG i PM.

2.2 Wpływ kwasicy oddechowej i metabolicznej

Stwierdzono, że zarówno kwasica oddechowa wywołana hiperkapnią, jak i kwasica metaboliczna spowodowana podaniem dożylnym 1 M kwasu mlekowego w dawce 7 mmol/kg (Tabela 5) powodują znamienne wzrost aktywności PtdIns(4,5)P₂-PLC w stosunku do kontroli (Rycina 14). Analiza wariancji wykazała istotne różnice między grupami ($p < 0.02$). Testem Scheffe'go stwierdzono, że źródłem tej różnicy jest grupa hipoksyjna i grupa kwasicy metabolicznej ($p < 0.05$) (Rycina 14). Hipoksja oraz obie kwasice zwiększają aktywność PtdIns-PLC w KS, lecz jest to wzrost nieznamienne w porównaniu z kontrolą (Rycina 15).

Badania fizjologiczne wskazują, że CO₂ wpływa na wyładowania chemoreceptorów kłębkowych częściowo w sposób niezależny od stężenia H⁺. Podjęto wobec tego doświadczenia w celu wyjaśnienia, czy te obserwacje fizjologiczne mogą pozostawać w związku z metabolizmem fosfolipidów inozytolowych. Rycina 16 przedstawia porównanie zmian aktywności PtdIns(4,5)P₂-PLC w zależności od zmian stężenia H⁺ we krwi tętniczej spowodowanych kwasicą oddechową i metaboliczną. Kwasica oddechowa powoduje

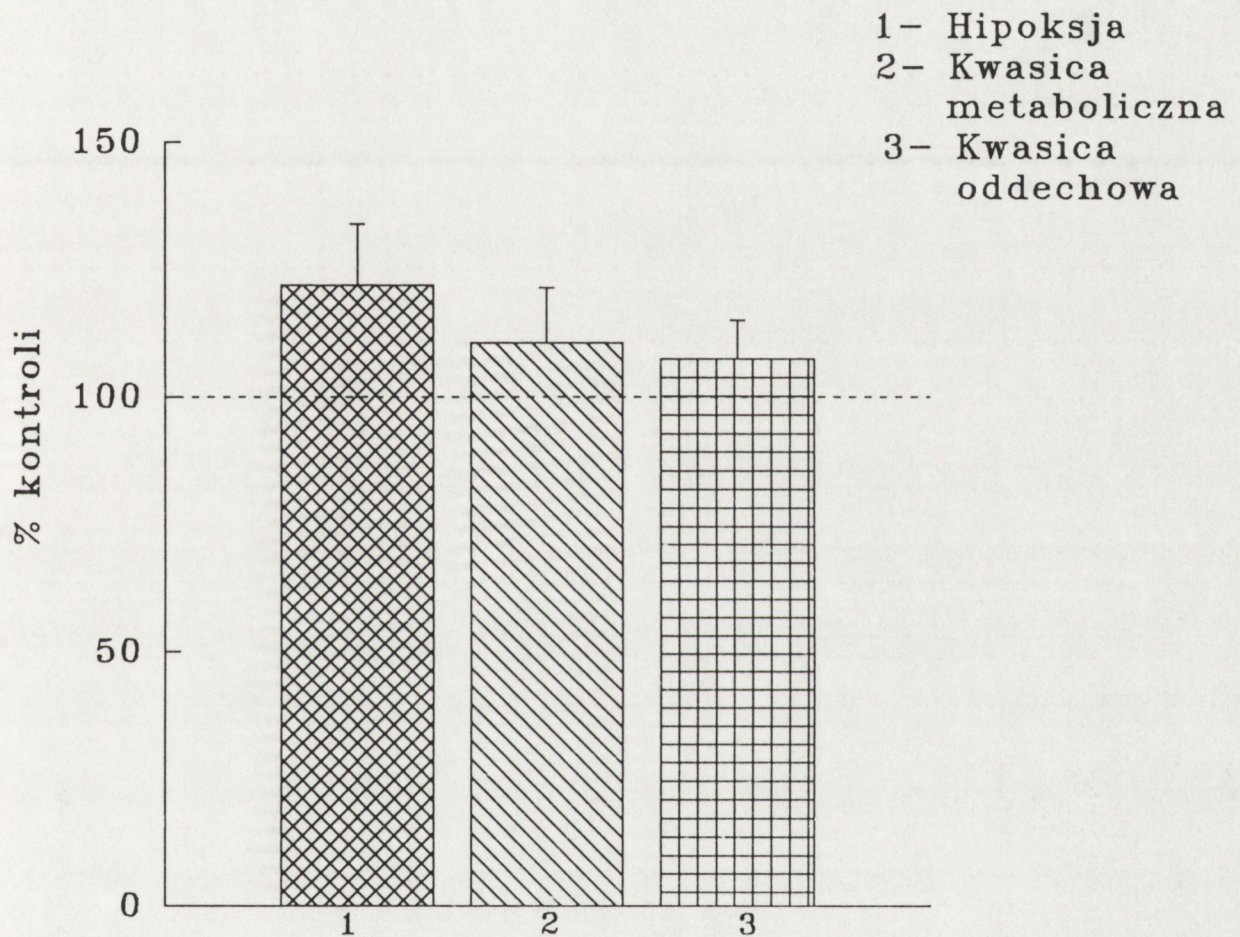
WPŁYW KWASICY METABOLICZNEJ, ODDECHOWEJ I HIPOKSJI
NA AKTYWNOŚĆ PtdIns(4,5)P₂-PLC W KŁĘBKACH SZYJNYCH



Rycina 14. Kontrola jest to wartość normoksyjna aktywności PLC przyjęta za 100% (linia przerywana). Skład gazowy krwi, równowaga kwasowo-zasadowa i parametry sercowo-kръżeniowe przedstawiono w Tabeli 5. Wyniki stanowią średnie \pm SE z 8 doświadczeń w grupie hipoksyjnej, 5 doświadczeń w grupie z kwasicą metaboliczną i 4 doświadczeń w grupie z kwasicą oddechową. Każde doświadczenie prowadzono w 2-3 powtórzeniach.

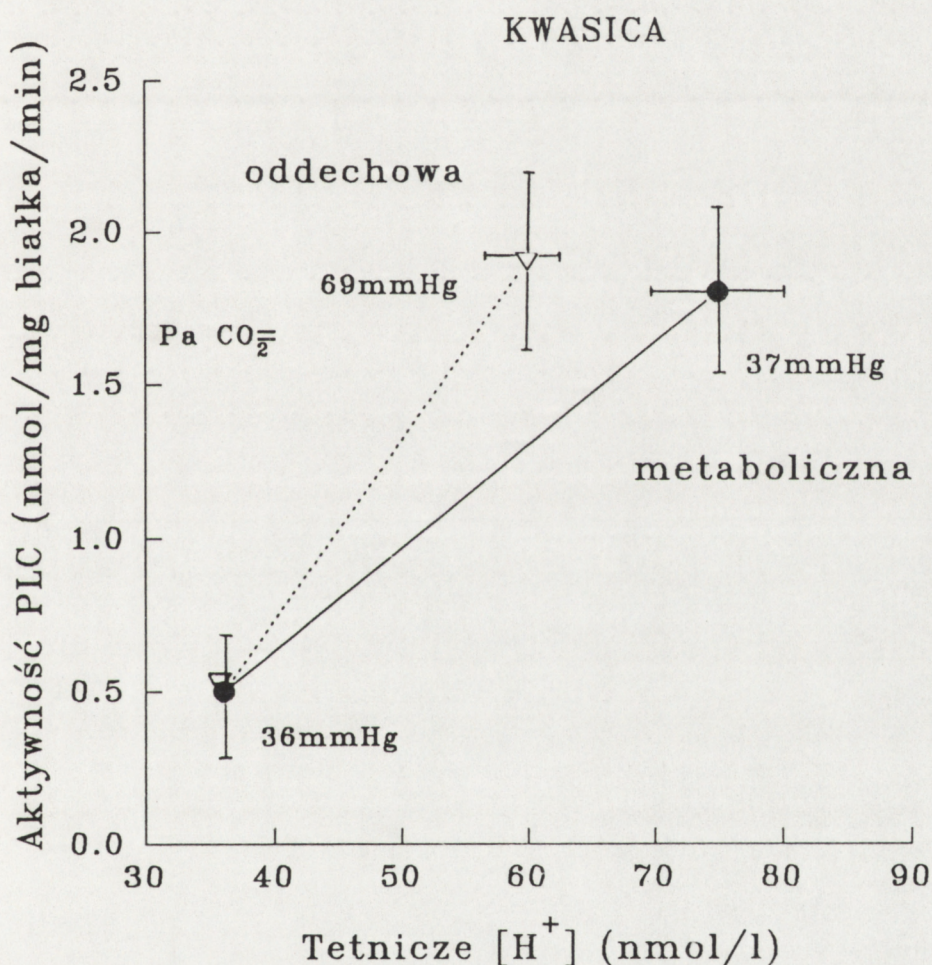
* - $p < 0.05$ versus kontrola

WPŁYW KWASICY METABOLICZNEJ, ODDECHOWEJ I HIPOKSJI
NA AKTYWNOŚĆ PtdIns-PLC W KŁĘBKACH SZYJNYCH



Rycina 15. Kontrola jest to wartość normoksyjna aktywności PLC przyjęta za 100% (linia przerywana). Warunki doświadczalne części wstępnej in vivo oraz oznaczania aktywności PtdIns-PLC, opisano w rozdziale Materiał i Metody. Wyniki stanowią średnie \pm SE z 4 doświadczeń w każdej badanej grupie. Każde doświadczenie prowadzono w 1-3 powtórzeniach.

WZROST AKTYWNOŚCI PtdIns(4,5)P₂-PLC POD WPŁYWEM ZMIAN
 JONÓW [H⁺] WYWOŁANYCH KWASICĄ ODDECHOWĄ
 I METABOLICZNĄ



Rycina 16. Warunki doświadczalne części wstępnej in vivo oraz warunki oznaczania aktywności PtdIns(4,5)P₂-PLC podano w rozdziale Materiał i Metody. Wyniki stanowią średnie ± SE z 4 doświadczeń w każdej badanej grupie przed i po bodźcu. Prezentowane linie są średnimi liniami regresji.

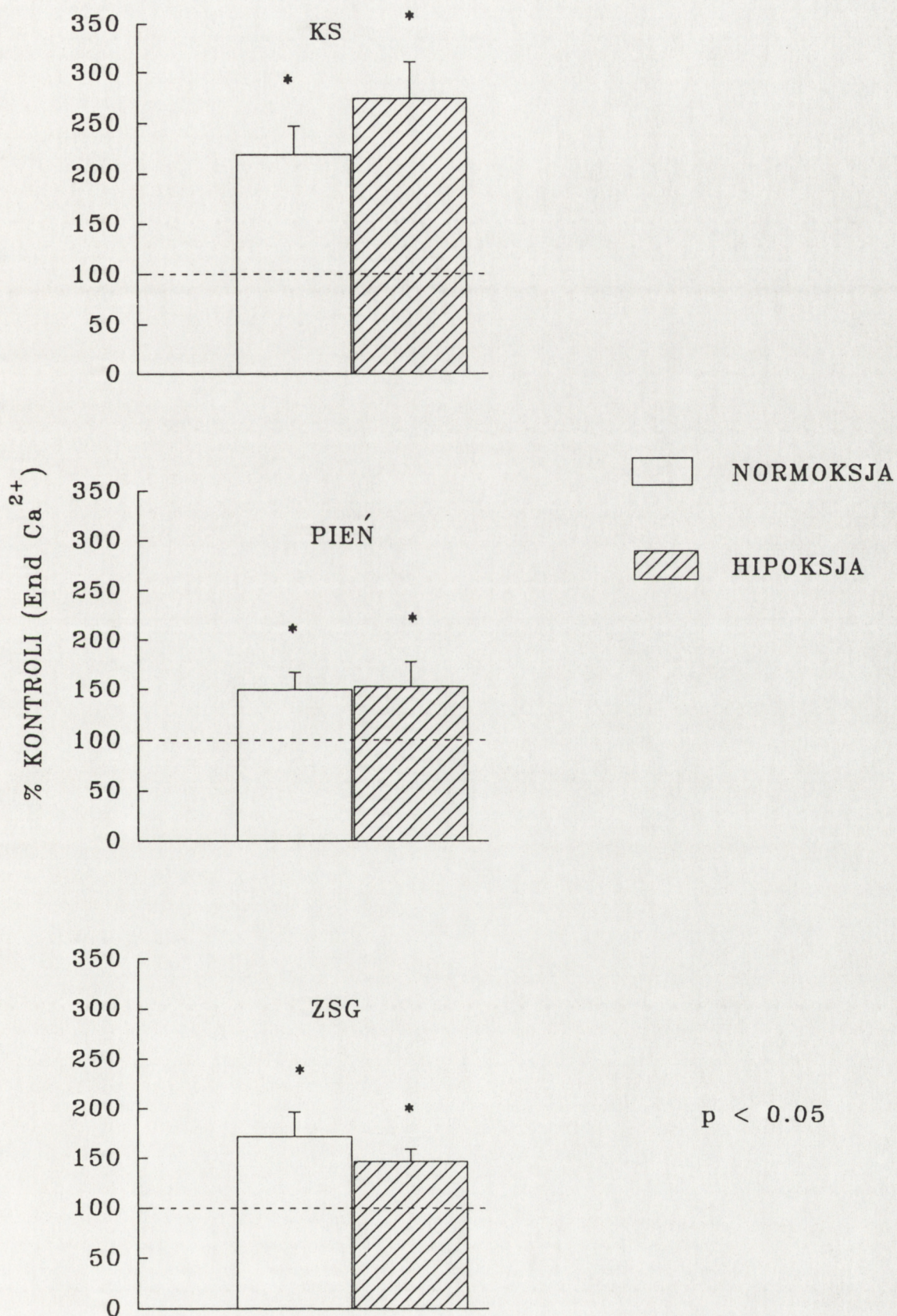
większy wzrost aktywności PLC niż kwasica metaboliczna przy tym samym poziomie stężenia H^+ . Średnia wartość nachylenia prostej, opisującej zależność aktywności PLC od stężenia H^+ , wynosi odpowiednio 0.06 i 0.03 mg białka $min^{-1} l$ dla kwasicy oddechowej i metabolicznej. Uzyskane dane potwierdzają obserwacje fizjologiczne i wskazują, że pobudzający wpływ CO_2 nie jest wyłącznie spowodowany zmianami pH, a może zależeć również od innych czynników.

Przedstawione dotychczas wyniki wskazują, że naturalne bodźce takie jak obniżenie PaO_2 , obniżenie pH i wzrost $PaCO_2$ powodują zwiększenie aktywności PLC degradującej lipidy inozytolowe. Wyraźniejszej zmianie ulega aktywność PLC degradującej $PtdIns(4,5)P_2$. Umiarkowany wzrost PLC degradującej PI wskazuje, że degradacja tego lipidu może odgrywać raczej rolę w procesie podtrzymania sygnału, zapoczątkowanego degradacją $PtdIns(4,5)P_2$.

2.3 Badania nad modyfikacją aktywności fosfolipazy C degradującej lipidy inozytolowe w warunkach hipoksyjnych

Z badań nad wpływem jonów Ca^{2+} i $GTP\gamma S$ na aktywność fosfolipazy C, degradującej fosfolipidy inozytolowe w kłębkach normoksyjnych, można wnioskować, że białka G regulują aktywność $PtdIns(4,5)P_2$ -PLC. Rycina 17 (górny panel) przedstawia badania porównawcze dotyczące wpływu $GTP\gamma S$ na aktywność degradacji $PtdIns(4,5)P_2$ w hipoksyjnych i normoksyjnych KS. Obserwowano

WPŁYW $GTP_{\gamma}S$ NA AKTYWNOŚĆ $PtdIns(4,5)P_2$ -PLC
W KLĘBKACH SZYJNYCH, PNIU MÓZGU, ZWOJACH
SZYJNYCH GÓRNYCH W NORMOKSJI I HIPOKSJI



Rycina 17. Opis doświadczeń w tekście pracy.

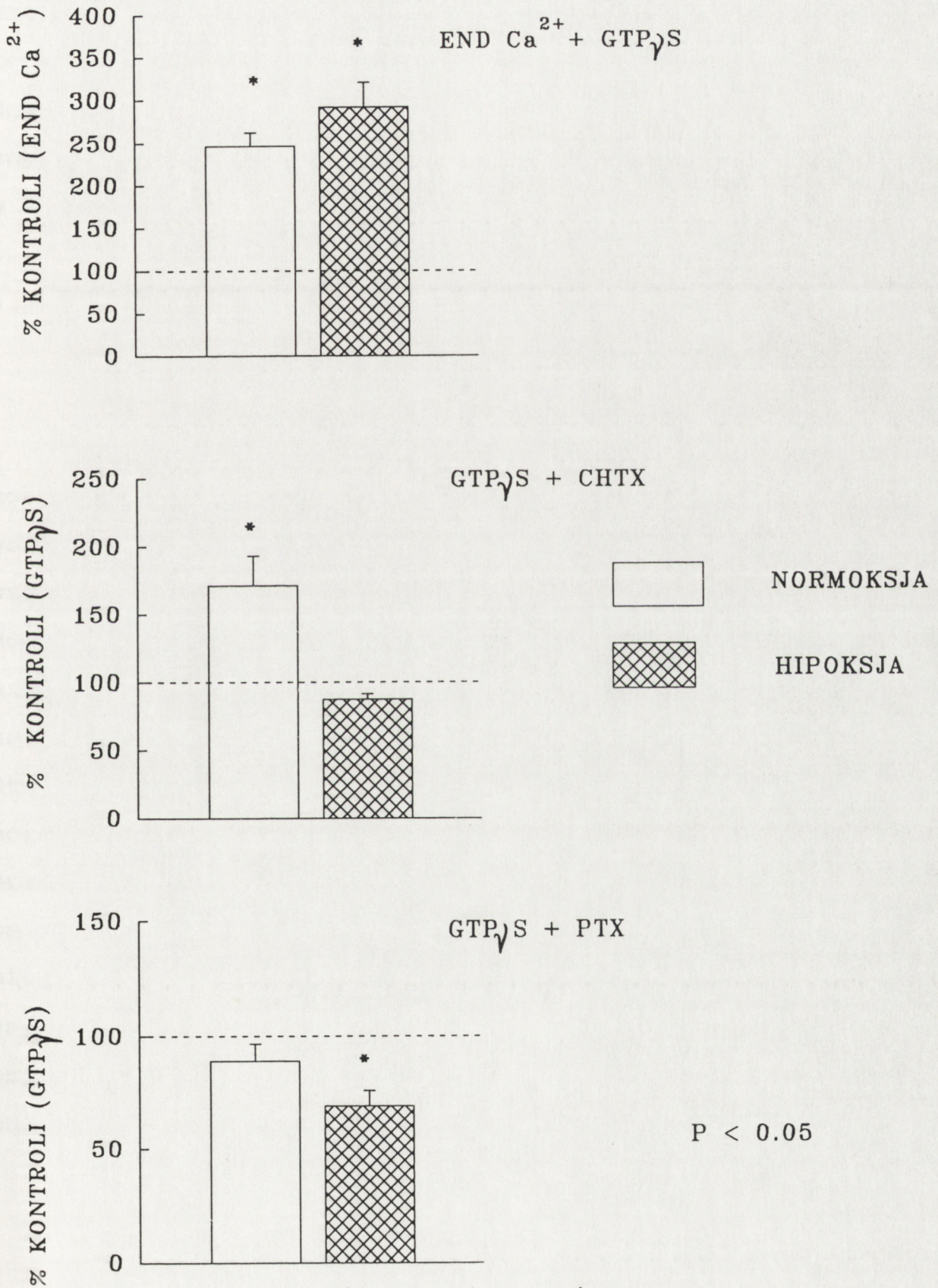
podobnie silny wzrost degradacji $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ przez $\text{GTP}\gamma\text{S}$ przy endogennym stężeniu jonów Ca^{2+} (kontrolą jest linia przerywana odpowiadająca aktywności $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ -PLC w badanych KS bez $\text{GTP}\gamma\text{S}$). Wyniki reprezentują 6 doświadczeń w grupie normoksyjnej i 4 w hipoksyjnej. Każde doświadczenie prowadzono w 1-3 powtórzeniach.

W badaniach prowadzonych nad wpływem $\text{GTP}\gamma\text{S}$ na aktywność degradacji tego fosfolipidu w PM i ZSG (po 4 doświadczenia w każdej grupie) stwierdzono także podobną stymulację tego procesu w normoksji i hipoksji, jednak efekt ten był generalnie mniejszy w porównaniu do KS (Rycina 17, środkowy i dolny panel). Stwierdzono brak wpływu $\text{GTP}\gamma\text{S}$ na degradację PtdIns we wszystkich badanych układach doświadczalnych, zarówno w tkankach normoksyjnych, jak i hipoksyjnych.

W dalszych badaniach, zmierzających do weryfikacji hipotezy o udziale białek G w modulacji aktywności PLC degradującej $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ w hipoksji, zbadano wpływ toksyny krztuśca i toksyny cholery na aktywowany przez $\text{GTP}\gamma\text{S}$ proces degradacji $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ i porównano go z wynikami uzyskanymi w normoksyjnych KS.

Stwierdzono, że toksyna cholery pozostaje bez wpływu na aktywowaną przez $\text{GTP}\gamma\text{S}$ degradację $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ przez PLC w hipoksyjnych kłębkach szyjnych, natomiast aktywuje ją w kłębkach normoksyjnych. Toksyna krztuśca, odwrotnie, obniża aktywowaną przez $\text{GTP}\gamma\text{S}$ degradację $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ przez PLC kłębków szyjnych hipoksyjnych, natomiast pozostaje bez wpływu na aktywowaną przez

WPŁYW TOKSYNY CHOLERY I KRZTUŚCA NA AKTYWOWANĄ PRZEZ
GTP γ S PtdIns(4,5)P $_2$ -PLC W KLĘBKACH SZYJNYCH



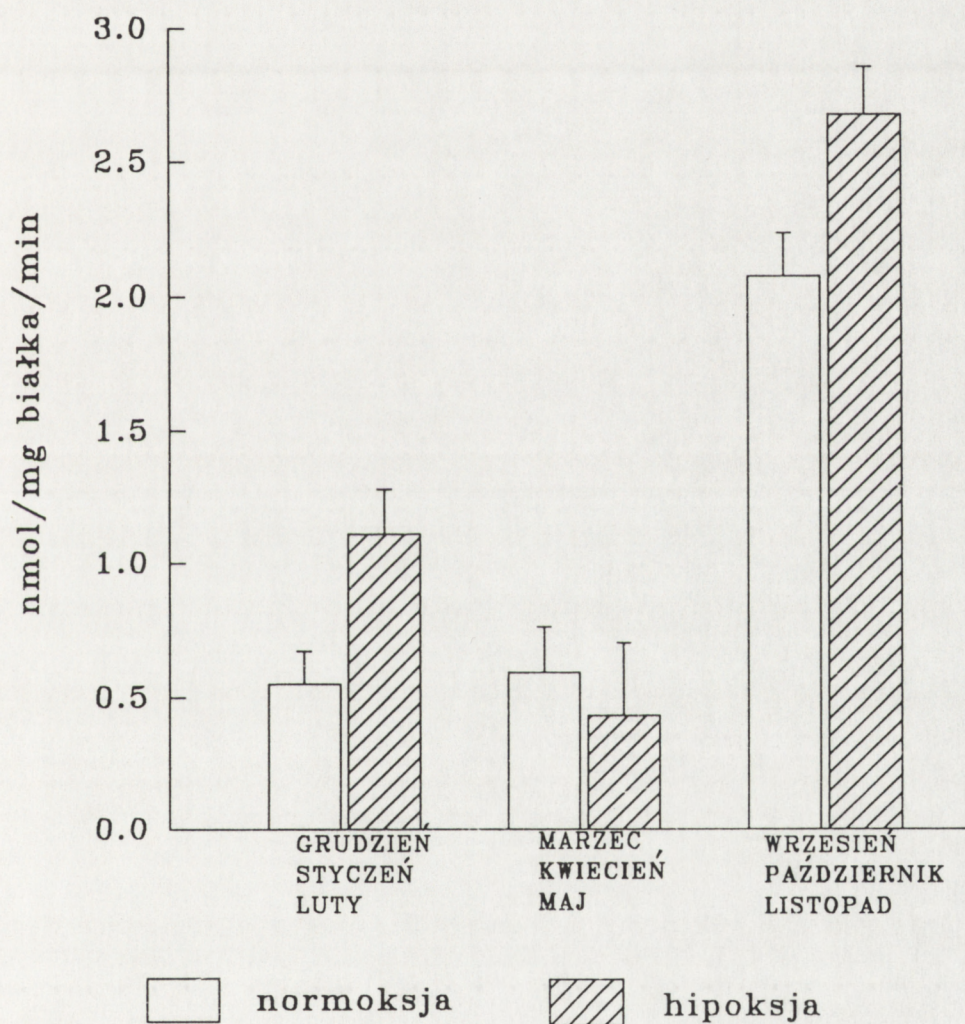
Rycina 18. Opis doświadczeń w tekście pracy.

GTPγS degradację PtdIns(4,5)P₂ w KS normoksyjnych (Rycina 18, kontrolą jest linia przerywana odpowiadająca aktywności PtdIns(4,5)P₂-PLC w tkance inkubowanej z samym GTPγS). Wyniki reprezentują 3-5 doświadczeń dla każdej grupy. Każde doświadczenie prowadzono w 2-3 powtórzeniach. Uzyskane wyniki sugerują udział białek G w modulacji aktywności PtdIns(4,5)P₂-PLC w hipoksji.

3. Sezonowa zmienność aktywności fosfolipazy C kłębków szyjnych degradującej PtdIns(4,5)P₂

Stwierdzono różnicę w aktywności PtdIns(4,5)P₂-PLC w normoksyjnych KS, która wahała się od 3.85 nmol/mg białka/min do wartości nieoznaczalnych w warunkach standardowych. W przypadku wartości nieoznaczalnych stwierdzono mierzalność tego procesu po dodaniu do środowiska inkubacyjnego 100 μM GTPγS. Uporządkowano uzyskane wyniki aktywności degradacji PtdIns(4,5)P₂ przez PLC w zależności od sezonu, w którym były pobierane kłębki (Rycina 19). Stwierdzono najwyższą aktywność PtdIns(4,5)P₂-PLC w grupie normoksyjnej w miesiącach wrzesień-listopad. W tym okresie średnia aktywność enzymu wynosiła 2.19 nmol/mg białka/min. Mimo osobniczych różnic w aktywności PLC w tym okresie była ona zawsze mierzalna i osiągała stosunkowo najwyższe wartości. Aktywność enzymu w miesiącach grudzień-luty (normoksja) była niższa i osiągała średnią wartość 0.55 nmol/mg białka/min. Aktywność enzymu w tym okresie była też zawsze oznaczalna w środowisku

AKTYWNOŚĆ PtdIns(4,5)P₂-PLC W KŁĘBKACH SZYJNYCH
W RÓŻNYCH PORACH ROKU



Rycina 19. Warunki oznaczania aktywności PtdIns(4,5)P₂-PLC podano w rozdziale Materiał i Metody. Wyniki stanowią średnie z następującej liczby doświadczeń w kolejności dla grupy normoksyjnej i hipoksyjnej: w okresie grudzień-luty 12 i 15, marzec-maj 8 i 6, wrzesień-listopad 18 i 15. Każde doświadczenie prowadzono w 2-3 powtórzeniach.

inkubacyjnym podstawowym. Natomiast w miesiącach marzec - maj aktywność specyficzna enzymu, choć osiągała podobne wartości 0.55-0.49 nmol/mg białka/min, była w kilku przypadkach nieoznaczalna przy braku GTPγS. Podobne zależności co do wahań sezonowych dotyczą grupy hipoksyjnej, przy czym potwierdza się znamienne wzrost aktywności PtdIns(4,5)P₂-PLC w grupie hipoksyjnej w porównaniu z grupą normoksyjną w okresie grudzień-luty i wrzesień-listopad.

V. DYSKUSJA

Przeprowadzone badania dotyczyły molekularnych mechanizmów przekaźnictwa sygnału w kłębkach szyjnych. Skoncentrowano się na badaniu szlaku fosfatydyloinozytolowego w związku z jego znaną w innych tkankach rolą w zapoczątkowaniu odpowiedzi komórkowych na bodźce.

Badania demonstrują istnienie podstawowej aktywności PLC w kłębkach szyjnych kota w normalnych warunkach składu gazowego krwi tętniczej. Istnienie tej podstawowej aktywności PLC sugeruje, że może ona odgrywać rolę w przekaźnictwie sygnału chemicznego w kłębkach szyjnych. Zostało to potwierdzone w dalszych badaniach, w których wykazano zależność pomiędzy aktywnością PLC, działającej na $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ i PtdIns , a zmianami w poziomie PaO_2 . Stwierdzono związek pomiędzy obniżeniem PaO_2 a wzrostem aktywności $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ -PLC. Podobną zależność, choć słabiej wyrażoną, obserwowano w przypadku PtdIns -PLC. Zależność między spadkiem PaO_2 a aktywnością $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ -PLC wydaje się być cechą swoistą dla czynności KS, gdyż w przeprowadzonych badaniach porównawczych na tkankach pobranych z tego samego zwierzęcia hipoksja pozostawała bez znamienego wpływu na aktywność tego enzymu w ZSG i pniu mózgu.

Specyficzność odpowiedzi $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ -PLC na zmiany chemizmu krwi potwierdzają również wyniki doświadczeń, gdzie stosowano kwasicę oddechową oraz metaboliczną. Te inne, naturalne dla kłębków szyjnych bodźce powodowały także wyraźny

wzrost aktywności PtdIns(4,5)P₂-PLC.

W dalszej części badań przeprowadzono charakterystykę degradacji PtdIns(4,5)P₂ i PtdIns przez PLC w KS. Degradacja PtdIns(4,5)P₂ jest procesem niezależnym od wzrastających stężeń jonów wapnia, natomiast aktywowanym poprzez dodanie GTPγS, niehydrolizującego analoga GTP. Badania z toksynami pozwoliły stwierdzić stymulujące działanie toksyny cholery na zależny od białka G proces degradacji PtdIns(4,5)P₂ przez PLC normoksyjnych kłębzków szyjnych. Enzym ten podlegał statystycznie nieznamiennej stymulacji w wyniku pobudzenia receptora cholinergicznego i dopaminergicznego. Zaobserwowano ponadto, że ATP może być modulatorem aktywności enzymu. Stwierdzono, że hydroliza PtdIns w KS jest procesem zależnym i aktywowanym przez wapń, i nie podlega regulacji przez GTPγS.

Badania ostatnich lat wykazały, że przynajmniej dwa różne typy molekuł przewodzących bodźce biorą udział w sprzężeniu receptora z aktywacją fosfolipazy C, a mianowicie: kinaza tyrozynowa i białka wiążące nukleotydy guaninowe (Guillon i wsp. 1992, Hepler i Gilman 1992). Złożoność mechanizmów przekaźnictwa sygnału spowodowana jest wzrastającą ilością i różnorodnością izoform PLC. Obecnie znanych jest 5-7 izoenzymów PLC w komórkach ssaków, które przynależą do trzech typów β, γ, δ, uporządkowanych na podstawie struktury pierwszorzędowej (Rhee i wsp. 1989, Guillon i wsp 1992, Kaziro i wsp. 1991). Różna struktura różnych typów PLC wydaje się być związana ze specyficznym mechanizmem, leżącym u podstaw zależnej

od receptorów aktywacji enzymu. Izoenzym PLC γ 1 i PLC γ 2 są specyficznie aktywowane przez związaną z receptorem kinazę tyrozynową. Natomiast PLC β jest aktywowana specyficznie przez białko G, konkretnie przez podjednostkę α białka G $_q$ (Taylor i wsp. 1991, Smrcka i wsp. 1991, Hepler i Gilman 1992). Uważano, że podjednostka α białka G $_q$ nie jest substratem dla ADP-rybozylacji katalizowanej przez toksynę krztuśca (PTX) (Strathmann i Simon 1990a i b, Simon i wsp. 1991). Wobec powyższego sugerowano, że podjednostka α białek G $_q$ przedstawia aktywną komponentę białka G niewrażliwego na PTX i pośredniczącego w degradacji PtdIns(4,5)P $_2$. Należy zwrócić jednak uwagę, że w niektórych komórkach np. neutrofilach, makrofagach i ludzkich HL-60 granulocytach zależna od receptora degradacja PtdIns(4,5)P $_2$ może być zahamowana poprzez uprzednie zadziaływanie na komórki toksyny krztuśca, co sugeruje jednak udział białek G czułych na PTX w regulacji PLC (Cockroft 1987, Fain 1990). Podjednostka α białek G $_o$, G $_i$, i G $_t$ zawiera miejsca wrażliwe na ADP-rybozylację katalizowaną przez PTX, wskazując na udział czulej na PTX drogi przekaźnictwa sygnału (Brandt i wsp. 1985, Gilman 1987, Park i wsp. 1993). Podjednostka α_o jest sugerowana jako PTX-czuły regulator PLC w oocytach żaby (Park i wsp. 1993). Jednakże dotychczasowe wysiłki, zmierzające do wykazania regulacji PLC ssaków przez podjednostkę α czułą na PTX, w wielu przypadkach kończyły się niepowodzeniem (Park i wsp. 1993).

Badania dotyczące niehydrolizującego analogu GTP, GTP γ S,

wykazały, że związek ten jest ogromnie cennym narzędziem w badaniu funkcji białek G. Analog ten, odporny na hydrolizę przez GTP-azę podjednostki α , powoduje nieodwracalną aktywację białek G. Równocześnie, blokując miejsce wiązania nukleotydów guaninowych, uniemożliwia wiązanie GDP, ponadto zapobiega reasocjacji podjednostek $\beta\gamma$ (Cockroft 1992, Fisher i wsp. 1992, Guillon i wsp. 1992, Gilman 1987).

Jednoznaczne wyniki badań z GTP γ S prezentowane w obecnej pracy przy stosowaniu 2 mM EGTA oraz różnych stężeń Ca^{2+} wskazują na udział białek G w stymulacji fosfolipazy C. Dodatkowo ważną informację dostarczyły badania dotyczące działania toksyn. Okazało się, że preinkubacja homogenatu normoksyjnych kłębzków szyjnych z toksyną cholery powodowała większą aktywację PtdIns(4,5)P₂-PLC w obecności GTP γ S w porównaniu do efektu samego GTP γ S, przy braku tej odpowiedzi w kłębkach hipoksyjnych. Wyniki te wskazują, że toksyna cholery wyłącznie w normoksyjnych KS hamuje aktywność endogennej GTP-azy i zwiększa aktywność PLC prawdopodobnie w wyniku działania endogennego GTP. W hipoksji toksyna cholery nie aktywuje PLC najprawdopodobniej w wyniku wcześniejszej modyfikacji aktywności GTP-azy. Sama hipoksja może aktywować proces endogennej ADP-rybozylacji.

Stwierdzono, że rodzina białek G_i posiada resztę argininową, która może ulegać modyfikacji przez toksynę cholery (Cockroft 1992, Vergheze i wsp. 1987). Dane te wskazują, że właściwości białek G biorących udział w regulacji PLC są bardzo skomplikowane i nie są w pełni wyjaśnione. W ciągu ostatnich paru lat

opublikowano szereg danych dotyczących obecności PLC i stymulacji jej zarówno przez GTP γ S, jak również przez agonistów działających za pośrednictwem białek G (Cockroft 1987, 1992, Gilman 1987, Hepler i Gilman 1992, Fisher i wsp. 1992).

W badaniach nad wpływem toksyny krztuśca na aktywowaną przez GTP γ S PtdIns(4,5)P₂-PLC w kłębkach normoksyjnych i hipoksyjnych stwierdzono około 25% obniżenie aktywności PLC wyłącznie w kłębkach hipoksyjnych. Wiadomo z licznych badań na innych tkankach i komórkach, że PLC aktywowana przez szereg ligandów, takich jak PAF, ATP, UTP, itd. jest hamowana w wyniku działania PTX (Cockroft i Stutchfield 1988, Brant i wsp. 1985). W szeregu przypadków to hamowanie jest częściowe. Uważa się, że w grę wchodzi wówczas białka G nieczułe na PTX (Cockroft 1992). Zjawisko to może także dotyczyć KS. Modyfikacja aktywności PLC poprzez endogenną ADP-rybozylotransferazę wymienionych toksyn służy do indentyfikacji rodzaju białek G w regulacji aktywności tego enzymu.

Warto tu podkreślić, że PLC podlega regulacji przez szereg innych białek enzymatycznych, związków i procesów zachodzących w komórce. Aktywność jej jest modulowana przez zależną od cAMP kinazę białkową A, przez kinazę białkową C oraz inne kinazy (cGMP, wapniową), jak również proteazy (Guillon i wsp. 1992, Cockroft 1992).

Z przeprowadzonych w tej pracy badań na KS można wnioskować o udziale PLC typ β , bowiem enzym ten jest regulowany przez nukleotydy guaninowe. Efekty działania toksyn sugerują rolę

białka G_s w regulacji degradacji $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ w KS. Wyniki sugerują też, że hipoksja poprzez aktywację procesów ADP-rybozylacji białek G może modulować aktywność $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ -PLC. Wydaje się jednak, że poza stwierdzeniem udziału białek G w regulacji aktywności PLC w KS, w ocenie rodzaju białek G należy zachować daleko idącą ostrożność.

Przedstawione badania wykazują, że aktywność specyficznej dla $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ fosfolipazy C w KS jest związana z poziomem PaO_2 . Aktywność ta znamienne wzrasta w hipoksji i obniża się w hiperoksji. Przeciwny efekt hipoksji i hiperoksji sugeruje, że wchodzi tutaj w grę specyficzne, a nie przypadkowe sprzężenie pomiędzy aktywnością PLC a ciśnieniem parcjalnym tlenu. Dodatkowym argumentem, podkreślającym specyficzność regulowanej przez białka G PLC, jest znacznie mniejsza reakcja ze strony PtdIns -PLC w KS oraz brak znamienych różnic w aktywności $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ -PLC w ZSG i PM.

W moich badaniach stwierdziłem aktywację PLC w kwasicy metabolicznej i oddechowej. KS odpowiadają na bodźce kwasiczne w sposób niezależny od odpowiedzi na hipoksję. Zarówno obniżenie PO_2 , jak i pH w komórkach chemoreceptorowych zapoczątkowuje zmiany w wewnątrzkomórkowym stężeniu jonów wapnia, a w konsekwencji uwalnianie neurotransmiterów i odpowiedzi komórki (Lahiri i Iturriaga 1993). Istnieje możliwość wzajemnego potęgowania oddziaływania bodźca hipoksyjnego i kwasicznego na odpowiedź z KS (Biscoe i Duchen 1990).

Mechanizm przekaźnictwa bodźca kwasicznego w KS nie jest w

pełni poznany. Zwiększenie stężenia jonów H^+ wewnątrz komórek chemoreceptorowych może stymulować wymiennicze jonowy: Na^+-H^+ , co prowadzi do wzrostu stężenia wewnątrzkomórkowego jonów Na^+ , odwrócenia normalnej funkcji wymiennicza Na^+-Ca^{2+} i w efekcie końcowym do wzrostu wewnątrzkomórkowego Ca^{2+} . Wymiennicze takie stwierdzono w komórkach chemoreceptorowych (Gonzalez i wsp. 1992). Potencjał błonowy i gradient stężeń jonów K^+ , Na^+ , Ca^{2+} mogą wpływać na metabolizm lipidów inozytolowych, a z drugiej strony PLC może także regulować czynność wymienniczy jonowych poprzez uwalnianie DAG i aktywację kinazy białkowej C (Benuck i wsp. 1989, Ma i wsp. 1994). Bez względu na mechanizm aktywacji PLC w KS moje wyniki upoważniają do podkreślenia roli tego enzymu w przekaźnictwie bodźca kwasowego w KS.

Wyniki prezentowane w tej pracy wskazują na udział PLC w dwóch różnych drogach degradacji fosfolipidów inozytolowych w KS. Jedną z tych dróg, czułą na zmiany składu chemicznego krwi, jest $PtdIns(4,5)P_2$ -PLC, regulowana przez białka G i niezależna od jonów wapnia. Druga droga, znacznie mniej wrażliwa na zmiany składu chemicznego krwi, to $PtdIns$ -PLC, zależna i aktywowana przez wapń, natomiast nie regulowana przez białka G.

Hydroliza $PtdIns(4,5)P_2$ powoduje uwalnianie dwóch bardzo ważnych przekaźników informacji drugiego rzędu: $Ins(1,4,5)P_3$ i DAG. Stwierdzono w KS również degradację $PtdIns$ przez PLC, co prowadzi do uwalniania diacyloglicerolu w procesie regulowanym przez wapń. Fosfolipaza C degradująca $PtdIns$ może przyczyniać się do podtrzymania sygnału w KS. Warto tu wspomnieć, że w

ośrodkowym układzie nerwowym DAG aktywuje kinazę białkową C, jest czynnikiem fuzogennym, może istotnie wpływać na uwalnianie neurotransmiterów, ulega aktywnemu metabolizmowi przez DAG-lipazę do kwasu arachidonowego i przez DAG-kinazę do kwasu fosfatydowego (Eberhard i wsp. 1990, Agranoff i Fisher 1994, Murphy i wsp. 1992, Nahorski i wsp. 1986). Kwas arachidonowy i kwas fosfatydowy to kolejne ważne przekaźniki informacji. Rolę diacyloglicerolu w procesach przekaźnictwa sygnału omawia Haeffner (1993) w swojej pracy przeglądowej. Podtrzymywany poziom DAG przez działającą PtdIns-PLC w KS może odgrywać bardzo istotną rolę w procesie przekaźnictwa sygnału. Znaczenie tych przekaźników pochodzenia lipidowego w dalszych etapach przekazywania informacji w KS nie jest do tej pory poznane. Z licznych badań w ośrodkowym układzie nerwowym, sercu, wątrobie i innych organach wiadomo, że do podstawowych ich funkcji należy uwalnianie jonów wapnia z pozamitochondrialnych magazynów komórki przez $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ oraz aktywacja kinazy białkowej C przez DAG. Badania wskazują na istnienie szeregu niejasności dotyczących udziału receptorów dopaminergicznych oraz innych agonistów, jak również właściwości i rodzaju białek G w przekazywaniu informacji za pośrednictwem fosfolipazy C, degradującej fosfolipidy inozytolowe. Zagadnienia te omówiono w licznych pracach poglądowych (Nishizuka 1984, Fisher i wsp. 1992, Murphy i wsp. 1992, Guillon i wsp. 1992).

W mózgu, podobnie jak w KS, istnieją dwie oddzielne drogi degradacji fosfolipidów inozytolowych (Chandler i Crews 1990;

Cockroft 1992). Stwierdzono, że niektóre typy receptorów, jak np. receptory muskarynowe układu cholinergicznego, preferencyjnie wykorzystują drogę związaną z białkami G. Natomiast inne receptory, jak np. α_1 adrenergiczny, wykorzystują obie drogi w procesie degradacji fosfolipidów (Chandler i Crews 1990). W obecnej pracy stwierdzono, że w KS podczas preinkubacji z karbacholem dochodzi do statystycznie nieznamiennej stymulacji PLC. Aktywacja tego enzymu była słaba, w każdym przypadku efekt ten ulegał wzmocnieniu po dodaniu GTP γ S. Podobne zależności stwierdzono w przypadku aktywacji receptorów dopaminergicznych. Podobną do obecnie obserwowanej charakterystykę PLC stwierdzili inni badacze w ośrodkowym układzie nerwowym (Chiu i wsp. 1988, Claro i wsp. 1989 a i b, Carter i wsp. 1990). W przytoczonych badaniach karbachol powodował także nieznaczną aktywację PLC, niemniej jednak dodanie GTP γ S zwiększało aktywność enzymu. Do chwili obecnej znanych jest około 25 farmakologicznie scharakteryzowanych receptorów w komórkach nerwowych i glejowych, powodujących degradację fosfolipidów inozytolowych. Należą do nich między innymi receptory muskarynowe układu cholinergicznego m_1 i m_2 , adrenergicznego α_{1a} i α_{1b} , czy też metabotropowe układu glutamatergicznego, które aktywują procesy przekaźnictwa sygnału w niedokrwieniu lub hipoksji (Chen i wsp. 1988, Seren i wsp. 1989). Informacje dotyczące udziału receptorów dopaminergicznych w procesie przemian metabolicznych fosfatydyloinozytoli są sprzeczne. Kelly i wsp. (1988) oraz Rubinstein i Hitzemann (1990) wykazali brak udziału receptorów dopaminergicznych w

hydrolizie fosfatydyloinozytoli w skrawkach prążkowie mózgu. Natomiast Dyck (1990) stwierdził aktywujący wpływ receptorów dopaminergicznych na hydrolizę fosfolipidów inozytolowych w prążkowie i korze mózgu. Efekt ten był blokowany przez prazosin, antagonistę receptora D_1 . Szereg innych badaczy uzyskało natomiast wyniki wskazujące na udział receptora D_2 w działaniu dopaminy na zależną od agonistów hydrolizę fosfoinozytydów (Enjalbert i Bockaert 1983, Wallace i Claro 1990). Badacze ci stwierdzili negatywny wpływ dopaminy na zależną od karbacholu degradację fosfolipidów inozytolowych. Undie i Friedman (1990) oraz Mahan i wsp. (1990) przy zastosowaniu technik biologii molekularnej wykazali, że ekspresja receptora D_1 jest związana z uwalnianiem $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ i mobilizacją jonów Ca^{2+} . Uzyskane w mojej pracy wyniki, aczkolwiek nieznamiennie statystycznie, mogą wskazywać na pewien udział obu agonistów w aktywacji $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ -PLC. Wpływ tych agonistów jest znacznie słabiej wyrażony w KS niż w ZSG, natomiast $\text{GTP}\gamma\text{S}$ wzmacnia ten efekt w KS.

Wiadomo, że receptor D_2 jest obecny w KS oraz że dopamina jest uwalniana w odpowiedzi na hipoksję. Wpływ samej DA na odpowiedzi oddechowe na hipoksję jest jak dotąd kontrowersyjny. Obserwowano pobudzenie lub hamowanie aktywności oddechowej w zależności od stosowanej dawki, czy też gatunku zwierzęcia (Okajima i Nishi 1981). Aktywacja $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ -PLC obserwowana w mojej pracy może sugerować nową rolę DA poprzez jej wpływ na regulację szlaku fosfatydyloinozytowego.

Badania nad działaniem układu cholinergicznego i

dopaminergicznego w degradacji fosfolipidów inozytolowych w KS i ZSG prowadzono na całych organach, a następnie homogenizowano i oznaczano aktywność PLC w homogenacie. Liczni badacze używali homogenat tkankowy do badań nad regulacją procesu degradacji fosfatydyloinozytoli, i to nawet do badań odpowiedzi receptorowych. Badania Litoscha i wsp. (1985) prowadzone na homogenacie wykazały zależną od serotoniny stymulację produkcji inozytolofosforanów w obecności GTP w homogenacie gruczołów ślinowych muchy. Już wcześniej Durell i Garland (1969) zaobserwowali, że acetylocholina aktywuje uwalnianie i nagromadzenie inozytolofosforanów $\text{Ins}(1)\text{P}_1$ i $\text{Ins}(1,4)\text{P}_2$ w homogenacie mózgu świnek morskich. W badaniach na homogenacie mięśni gładkich aorty Roth (1987) zaobserwował, że w tej tkance, podobnie jak w przypadku prezentowanych w tej pracy wynikach dotyczących KS, wyłącznie PLC degradująca $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ jest regulowana przez nukleotydy guaninowe, i że maksymalny efekt tych nukleotydów na hydrolizę $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ jest obserwowany przy fizjologicznym stężeniu jonów wapnia.

W obecnej pracy stwierdzono, że $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ -PLC ulega aktywacji również poprzez ATP dodany do homogenatu KS. Działanie ATP było silniej wyrażone przy jego niższym 0.25 mM stężeniu niż przy 1 mM. Ponadto stwierdzono, że ATP wpływa na podtrzymanie wyższego procentowego udziału $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ w całej puli inozytolofosforanów. Zupełnie odmienny wpływ wywiera ATP w ZSG, gdzie powoduje obniżenie uwalniania $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ z $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ w sposób zależny od stężenia.

Aktywujący wpływ ATP na fosfolipazę C degradującą PtdIns(4,5)P₂ był również obserwowany w siatkówce oka (Ghalayini i Anderson 1987). Badacze Ci sugerowali udział białek wiążących ATP w regulacji PtdIns(4,5)P₂-PLC. Wydaje się jednak, że ATP może wywierać działanie w wieloraki sposób. Należy wziąć pod uwagę, że grupa fosforanowa ATP może być wykorzystywana do podtrzymania poziomu GTP w komórce i poprzez ten nukleotyd aktywować PtdIns(4,5)P₂. ATP może powodować zmiany allosteryczne enzymu, wpływać na powinowactwo enzymu do substratu (Huang i Sun 1988). Ponadto ATP może aktywować PLC poprzez receptor purynergiczny sprzężony z tym enzymem (Gordon 1986, Dubyak 1991). Badania na skrawkach i frakcjach podkomórkowych kory mózgu wykazały, że ATP może wywierać swój wpływ na PtdIns(4,5)P₂-PLC niezależnie przez kilka mechanizmów (Strosznajder i Strosznajder 1995). ATP w przypadku uszkodzenia ośrodkowego układu nerwowego, postępującej anoksji, jest wydzielany z komórki najczęściej równocześnie z wydzielaniem adrenaliny i acetylocholiny jako kotransmitter. Istnieje możliwość, że uwalnia się razem z dopaminą w KS, podobnie jak w płytkach krwi uwalnia się z serotoniną (Dubyak 1991). Niezależnie od mechanizmu działania ATP w KS uzyskane wyniki wskazują, że związek ten jest ważnym endogennym modulatorem aktywności PtdIns(4,5)P₂-PLC, a więc i poziomu ważnych dla przekaźnictwa sygnału metabolicznych przekaźników informacji drugiego rzędu jak Ins(1,4,5)P₃ i DAG w KS.

Badania dotyczące wpływu hipoksji hipoksyjnej na aktywność

PLC w tkance nerwowej i w innych tkankach są raczej skromne i niejednoznaczne. Huang i Gibson (1989) wykazali, że histotoksyczna hipoksja nie zmienia podstawowego cyklu przemian fosfolipidów inozytolowych w tkance nerwowej, natomiast aktywuje ich hydrolizę w obecności wysokich stężeń potasu. W modelu hipoksji *in vivo* stosowanego w mojej pracy dochodzi do obniżenia poziomu parcjalnego tlenu oraz może dochodzić do przemieszczeń jonowych, tzn. napływu jonów sodu do komórki i wzrostu stężenia jonów potasu w środowisku zewnątrzkomórkowym. Zjawiska te mogą, podobnie jak wysokie stężenie potasu w modelu *in vitro* Huanga i Gibsona (1989), brać udział w aktywacji degradacji fosfolipidów inozytolowych. Badania Blocka i wsp. (1989) oraz Bhata i Blocka (1992) wykazały wzrost aktywności fosfolipazy C w komórkach endotelialnych poddanych 24 godzinnej hipoksji. Tretyakov i Farber (1993) zaobserwowali brak zmian aktywności PLC w komórkach śródbłonkowych w hipoksji (3% O₂/N₂) trwającej 4 godziny, natomiast wzrost aktywności PLC i PLA₂ w hipoksji przewlekłej.

Stwierdzono w badaniach na mózgu, że regulowana przez białka G fosfolipaza C występuje w cytozolu i błonach, i posiada podobne właściwości (Lee i wsp. 1987). Badacze ci wykazali, że aktywność PLC uzyskana z błon i cytozolu posiada tą samą charakterystykę i enzymy te są rozpoznawane przez te same monoklonalne przeciwciała. Taka podkomórkowa lokalizacja wskazuje, że enzym może podlegać translokacji szczególnie w przypadku hipoksji i niedokrwienia. Niemniej jednak nie istnieją na ten temat bezpośrednie dane doświadczalne. Obecnie uważa się, że forma

cytozolowa enzymu jest ważna w procesie przekaźnictwa sygnału. Może ona być przemieszczana z cytozolu do błon za pośrednictwem białek G (Cockroft 1992).

Z przeprowadzonych w tej pracy badań dotyczących procesu wbudowywania [^{32}P] z ATP do lipidów inozytolowych błon kłębków normoksyjnych i hipoksyjnych wynika, że w rezultacie hipoksji dochodzi do obniżenia poziomu radioaktywności w PtdIns(4)P i PtdIns(4,5)P₂. Badania wbudowywania [^{32}P] z ATP do fosfolipidów inozytolowych prowadzono w obecności endogennego substratu. Celem prowadzonych doświadczeń nie była ocena aktywności kinaz (badania należałoby prowadzić w warunkach optymalnego stężenia substratu), a badanie procesów fosforylacji endogennych lipidów inozytolowych w reakcji aktywowanej przez kinazę fosfatydyloinozytolu i kinazę fosfofosfatydyloinozytolu. Uzyskane wyniki wskazywać mogą na obniżenie metabolicznie aktywnej puli endogennych lipidów inozytolowych na skutek zwiększonej ich degradacji w hipoksji w porównaniu z normoksją. Wydaje się, że obniżenie poziomu radioaktywności [^{32}P] w fosfolipidach inozytolowych PtdIns(4)P i PtdIns(4,5)P₂ w hipoksji wskazywać może na trudności w utrzymaniu poziomu PtdIns(4,5)P₂ w KS. Należy pamiętać, że jest to proces bardzo kosztowny energetycznie i w efekcie 20 minutowej hipoksji dochodzić może do obniżenia poziomu metabolicznie aktywnej puli fosfatydyloinozytolu i fosfofosfatydyloinozytolu, a w konsekwencji poziomu PtdIns(4,5)P₂. Wniosek ten opieram na podstawie wyników doświadczeń, które poza optymalnym stężeniem

wymienionych lipidów prowadzone były w optymalnych warunkach dla procesów fosforylacji. Obniżenie aktywności procesu fosforylacji niezależnie jednak od przyczyny, czy byłoby to sugerowane obniżenie poziomu endogennego substratu, czy też obniżenie aktywności kinaz w hipoksji, wydaje się być zjawiskiem bardzo ważnym dla funkcjonowania KS w hipoksji. Obniżenie aktywności wbudowywania [^{32}P] z ATP do lipidów inozytolowych może wskazywać na pewne procesy adaptacyjne. Może zabezpieczać te komórki przed nadmiernym działaniem przekaźników metabolicznych drugiego rzędu, pochodzących z degradacji fosfolipidów inozytolowych, jak również zabezpieczać je przed nadmiernym wyczerpaniem związków wysokoenergetycznych. Wniosek ten może podbudować wynik świadczący o obniżonym, ale statystycznie nieznamionym wbudowywaniu $^{32}\gamma\text{P}$ z ATP do kwasu fosfatydowego. Może to wskazywać, że nie dochodzi do nagromadzenia DAG w warunkach hipoksji, aczkolwiek może on być degradowany przez DAG-lipazę. Podsumowując można by sugerować, że stwierdzony w hipoksji wzrost aktywności PLC działającej na $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ ma istotne znaczenie w zapoczątkowaniu procesów przekaźnictwa, natomiast stwierdzone obniżenie poziomu radioaktywności [^{32}P] w $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ po inkubacji z ($\gamma^{32}\text{P}$) ATP wskazywałoby na obniżenie poziomu $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$, a więc jego degradacji przez PLC.

Uzyskane w tej pracy wyniki wskazują, że aktywność fosfolipazy C podlega modulacji w zależności od pór roku. Stwierdzono istotne różnice w aktywności PLC w różnych miesiącach roku. Podobne sezonowe różnice w poziomie cAMP w KS opisali

Delpiano i Acker (1991). Najwyższe średnie wartości cAMP 1.31 ± 0.24 pmoli/kłębek szyjny były obserwowane wiosną (marzec), natomiast najniższe wartości 0.31 ± 0.08 pmoli/kłębek szyjny jesienią (październik). Pomimo tych indywidualnych, jak i sezonowych zmienności znaczący wzrost poziomu cAMP został stwierdzony podczas stymulacji kłębków szyjnych krótkotrwałą, ostrą hipoksją. Warto podkreślić, że w okresie obserwowanej przez mnie najwyższej aktywności PLC, degradującej $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ (od września do listopada), Delpiano i Acker obserwowali najniższe wartości cAMP w KS. Natomiast w okresie najniższej aktywności $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ -PLC, obserwowanej w naszych badaniach w miesiącach styczeń-maj, Dolpiano i Acker uzyskiwali najwyższy poziom cAMP. Można wysunąć hipotezę, że zależna od cAMP kinaza białkowa A może być odpowiedzialna za sezonową modyfikację $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ -PLC w KS.

Z badań na innych komórkach (Lazarowski i Lapetina 1989, Guillon i wsp. 1988, Guillon i wsp. 1992) wiadomo, że pomiędzy tymi dwoma najważniejszymi drogami przekazywania, a więc pomiędzy układem cyklicznej adenylanowej a fosfolipazą C, zachodzi szereg zależności. Guillon i wsp. (1992) przedstawili szereg dróg regulacji PLC przez zależną od cAMP kinazę białkową A. W zależności od typu komórki stwierdzono, że wzrost cAMP może aktywować lub hamować uwalnianie $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$.

Liczni badacze próbowali skorelować aktywność PLC z odpowiedzią fizjologiczną komórki. Wyniki tych badań były bardzo zróżnicowane. W badaniach stosowano różnego rodzaju mniej lub

bardziej specyficzne inhibitory PLC, hamujące degradację fosfolipidów inozytolowych. Niektórym badaczom udało się wykazać istnienie zależności pomiędzy aktywnością fosfolipaz a funkcją wydzielniczą komórek (Cockroft 1992). Stwierdzono, że aminosteroid U-73122 hamuje regulowaną przez białka G fosfolipazę C (Bleasdale i wsp. 1980, Thompson i wsp. 1991, Smallridge i wsp. 1992, Smith i wsp. 1990). Craig i wsp. (1994) badali zależność pomiędzy aktywnością PLC a sekrecją insuliny przez wysepki Langerhansa. Badacze ci stosowali U-73122, który jednak okazał się inhibitorem niespecyficznym. Grupa badaczy japońskich wprowadziła do badań PMSF, który poza hamującym wpływem na proteazę wykazywał również działanie hamujące na PLC (Umemura i wsp. 1992a i b). Badacze ci stwierdzili zależność pomiędzy aktywnością PLC a śmiercią neuronów po epizodzie niedokrwienia mózgu. PMSF działał protekcyjnie na przeżywalność neuronów w polu CA1 hipokampa szczurów.

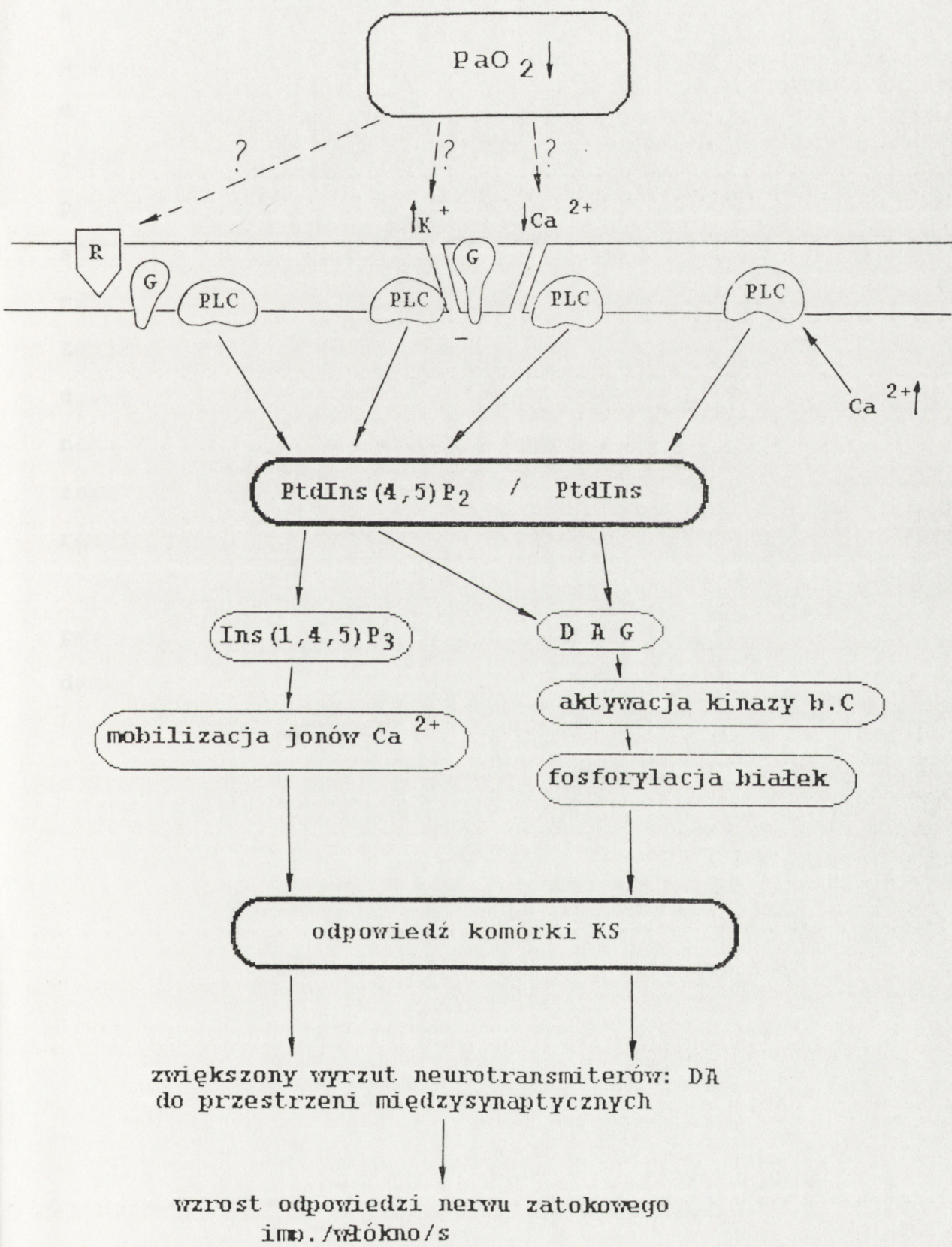
Podstawowym problemem we wszystkich wymienionych badaniach był brak specyficznego inhibitora dla PLC (Prentki i wsp. 1986). W mojej pracy podjęta została również próba zbadania odpowiedzi oddechowej zwierzęcia w doświadczeniach *in vivo* poprzez rejestrację zintegrowanej odpowiedzi z nerwu przeponowego na podanie inhibitora PLC, PMSF, jak również na podanie inhibitora receptora dla $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$, TMB-8, i inhibitora kinazy białkowej C, polimyksyny B. Otrzymane wyniki są niejednoznaczne, co w konsekwencji powoduje niemożność stwierdzenia bezpośredniej korelacji pomiędzy aktywnością PLC oraz działaniami dwóch

przebiegów informacji, uwalnianych podczas degradacji PtdIns(4,5)P₂, a bioelektryczną aktywnością nerwu przeponowego. W dużej mierze spowodowane to być może brakiem specyficzności stosowanych inhibitorów, trudnościami w ich penetracji, a co za tym idzie działania na określonym poziomie.

Do chwili obecnej rola fosfolipaz w tkance nerwowej nie jest całkowicie wyjaśniona. Uważa się, że w warunkach normalnych fosfolipazy podtrzymują funkcję komórek przez dostarczanie różnych przebiegów informacji drugiego rzędu (Dennis i wsp. 1991, Nozawa i wsp. 1991). Szereg badaczy uważa ponadto, że fosfolipazy C i A₂ mogą brać udział w utrzymaniu integralności błon komórki w warunkach fizjologicznych (Scott 1984, Van Kuijk i wsp. 1987).

Ze względu na brak danych dotyczących obecności i roli fosfolipaz w kłębkach szyjnych nie powstała dotąd hipoteza uwzględniająca udział lipidów inozytolowych w procesach chemorecepcji. Na podstawie otrzymanych wyników przedstawiam hipotetyczny model procesu przekazywania bodźca chemicznego w kłębkach szyjnych (schemat 4). Kluczowym punktem hipotezy jest aktywacja fosfolipazy C wywoływana działaniem bodźców naturalnych dla kłębków szyjnych na kanały błonowe (K⁺) lub też drogą związaną z receptorami metabotropowymi. Wzrost aktywności PLC prowadzi do zwiększonej degradacji lipidów inozytolowych a w konsekwencji do uwalniania przebiegów drugiego rzędu: Ins(1,4,5)P₃ i DAG. Ins(1,4,5)P₃ może zwiększać pulę wewnątrzkomórkowego Ca²⁺ poprzez uwalnianie go z magazynów

HIPOTETYCZNY MODEL AKTYWACJI PLC I UDZIAŁU PRODUKTÓW DEGRADACJI LIPIDÓW INOZYTOŁOWYCH W MECHANIZMIE PROCESÓW CHEMORECEPCJI ZACHODZĄCYCH W HIPOKSYJNEJ TKANCE KŁĘBKA SZYJNEGO



Schemat 4

siateczki endoplazmatycznej. Należy tu podkreślić, że w KS istnieje możliwość napływu jonów wapnia poprzez kanały jonowe zależne od potencjału (Gonzalez i wsp. 1992), jak i uwalniania go z magazynów mitochondrialnych (Biscoe i Duchen 1990). W świetle obecnych badań wiadomo, że mitochondria pełnią raczej rolę buforu dla jonów wapnia, wychytując ich nadmiar z cytoplazmy, tak więc rola $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ wydaje się tutaj istotna. Drugi z przekaźników, DAG poprzez aktywację kinaz białkowych, a w szczególności kinazy białkowej C, może wpływać na aktywność szeregu enzymów, a więc i na odpowiedź komórki chemoreceptorowej. Zwiększony poziom wewnątrzkomórkowego Ca^{2+} , jak również diacyloglicerolu może brać udział w uwalnianiu dopaminy i innych neurotransmiterów w kłębkach szyjnych, prowadząc do zapoczątkowania odpowiedzi z chemoreceptorów obwodowych, czego rezultatem jest wzrost aktywności aferentnej w nerwie zatokowym.

Rozpracowanie poszczególnych elementów molekularnych dróg przekaźnictwa sygnału chemicznego w kłębkach szyjnych wymaga dalszych badań.

VI. WNIOSKI

1. Stwierdzenie aktywności fosfolipazy C w kłębkach szyjnych w warunkach normalnych i jej stymulacja pod wpływem naturalnych dla kłębków bodźców wskazuje na udział szlaku fosfatydyloinozytowego w przekaźnictwie sygnału chemicznego w tym organie.
2. Badania porównawcze przeprowadzone na zwojach szyjnych górnych i pniu mózgu podkreślają specyficzność zmian fosfatydyloinozytoli zachodzących w kłębkach szyjnych.
3. Stwierdzenie dwóch oddzielnych dróg aktywacji fosfolipazy C, zależnej (degradacja $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$) i niezależnej (degradacja PtdIns) od białek G, wskazuje na możliwość ich udziału w różnych fazach procesu przekaźnictwa sygnału.
4. Produkty rozpadu fosfatydyloinozytoli: inozytolotrisfosforan i diacyloglicerol mogą brać udział w dalszych etapach procesu przekazywania informacji w kłębkach szyjnych. Dokładna rola kaskady fosfatydyloinozytowej oraz umiejscowienie jej w strukturze kłębka szyjnego wymagają dalszych badań.

VII. STRESZCZENIE

Kłębki szyjne, będące chemoreceptorami obwodowymi, pełnią istotną rolę w procesach regulacji oddychania. Położone przyczaszkowo na rozgałęzieniu tętnic szyjnych wspólnych modulują czynność ośrodków oddechowych zlokalizowanych w pniu mózgu, dostosowując wentylację płucną do bieżących potrzeb metabolicznych. Chemoreceptory reagują na zmiany składu gazowego (hipoksja, hiperkapnia) i równowagi kwasowo-zasadowej we krwi tętniczej, czego efektem jest pobudzenie zakończeń czuciowych nerwu zatokowego, unerwiającego kłębki.

Podstawowe mechanizmy przekazywania sygnału w kłębkach szyjnych, mimo że przyciągają uwagę badaczy od kilku dziesięcioleci, pozostają nie wyjaśnione. Przyczyną powolnego postępu badań nad tym zagadnieniem mogą być małe rozmiary organu (np. u kota, waga < 1mg, wielkość < 1 mm), jego lokalizacja oraz skomplikowana struktura, która ciągle jeszcze nie jest do końca poznana.

Degradacja lipidów inozytolowych inicjuje odpowiedzi komórkowe na bodźce poprzez wytwarzanie lipidowo-pochodnych przekaźników informacji drugiego rzędu w ośrodkowym układzie nerwowym. Kłębki szyjne są pochodzenia neuroektodermalnego. Stanowiło to przesłankę do powstania hipotezy badawczej, testowanej w obecnej pracy, że metabolizm fosfatydyloinozytoli może odgrywać rolę w przekazywaniu sygnału chemicznego w kłębkach szyjnych. Cel pracy polegał na zbadaniu występowania

i regulacji fosfolipazy C degradującej fosfolipidy inozytolowe w kłębkach szyjnych w warunkach normalnych oraz zmian aktywności tego enzymu pod wpływem naturalnych dla kłębków bodźców, w szczególności hipoksji, która jest bodźcem najsilniejszym i najważniejszym z punktu widzenia odruchowej regulacji oddychania.

Badania składały się z części *in vivo* i *in vitro*.

W pierwszej części pobierano kłębki od kotów uśpionych chloralozą z uretanem, po uprzednim wentylowaniu zwierząt przez okres 20 minut w przypadku normoksji powietrzem, hipoksji mieszanką hipoksyjną (7% O₂ + 93% N₂), hiperoksji czystym tlenem (100% O₂), kwasicy oddechowej mieszaniną 5% CO₂ w czystym tlenie (karbogen). Kwasicę metaboliczną uzyskiwano podając dożylnie roztwór kwasu mlekowego w dawce 7 mmol/kg wagi ciała. W każdym przypadku zmianie ulegał wyłącznie badany parametr, przy innych utrzymywanych na poziomie stałym.

Podstawa metodologiczna badań *in vitro* była następująca. Źródłem enzymu był homogenat kłębków szyjnych, zwojów szyjnych górnych i pnia mózgu. Substratem egzogennym były radioaktywne fosfolipidy inozytolowe: fosfatydyloinozytolo-4,5- bisfosforan [PtdIns(4,5)P₂] oraz fosfatydyloinozytol [PtdIns]. Aktywność fosfolipazy C w homogenacie tkankowym określano przez pomiar radioaktywności inozytolo fosforanów IP_n, powstających w wyniku degradacji egzogennych substratów, według metody opisanej przez Hoffmanna i Majerusa (1982), w modyfikacji Strosznajder i Haeffner (1989). Badano regulację aktywności enzymu pod wpływem: jonów Ca²⁺, GTPγS, toksyny krztuśca i cholery, ATP, dopaminy i

karbacholu.

Wyniki wskazują na istnienie dwóch dróg degradacji lipidów inozytolowych w kłębkach szyjnych. Jedna droga to zależna i aktywowana przez jony Ca^{2+} PLC degradująca PtdIns, druga niezależna od wzrastających stężeń jonów wapnia i aktywowana przez nukleotydy guaninowe PLC degradująca PtdIns(4,5) P_2 . Ta druga droga była znacznie aktywniejsza. Badania dotyczące subkomórkowej lokalizacji enzymu degradującego PtdIns(4,5) P_2 wykazały, że około 80% całkowitej aktywności enzymatycznej odpowiedzialnej za degradację PtdIns(4,5) P_2 jest zlokalizowana w frakcji błon synaptoplazmatycznych i w cytozolu. Frakcje te charakteryzuje również najwyższa aktywność specyficzna enzymu, a wskaźnik wzbogacenia wynosi 2.3 i 1.8 odpowiednio dla frakcji błon synaptoplazmatycznych i cytozolu (liczony w porównaniu do homogenatu przyjętego za 1). Stwierdzono zależność degradacji fosfolipidów inozytolowych od ilości użytego białka, czasu inkubacji oraz stężenia substratu. W przeprowadzonych badaniach stwierdzono, że produktem degradacji PtdIns był wyłącznie inozytolomonofosforan (IP_1), natomiast w przypadku degradacji PtdIns(4,5) P_2 były to wszystkie trzy fosforany inozytolu. Wyniki te potwierdziły, że w stosowanych układach badano wyłącznie aktywność fosfolipazy C, nie stwierdzono działania innych fosfolipaz A,D.

Badania przeprowadzone na normoksyjnych kłębkach szyjnych wykazały, że niehydrolizujący analog GTP, $\text{GTP}\gamma\text{S}$ aktywuje

PtdIns(4,5)P₂-PLC, natomiast nie ma wpływu na PtdIns-PLC.

Zaobserwowano, że ATP jest również istotnym czynnikiem aktywującym PtdIns(4,5)P₂-PLC. Rezultaty doświadczeń przeprowadzonych z dopaminą i karbacholem wykazują niewielki modulujący wpływ tych agonistów na aktywność PtdIns(4,5)P₂-PLC w kłębkach szyjnych.

Naturalne bodźce chemiczne stymulujące kłębki szyjne: hipoksja, kwasica metaboliczna i oddechowa powodują znamienny wzrost aktywności PtdIns(4,5)P₂-PLC w stosunku do normoksyjnej kontroli. Hiperoksja, która hamuje chemoreceptory kłębków, powodowała efekt odwrotny. Aktywność PtdIns-PLC ulegała podobnym zmianom, ale o mniejszym nasileniu.

Aktywacja degradacji fosfatydyloinozytoli przy pobudzeniu kłębków szyjnych wydaje się być specyficzną cechą dla tych organów czuciowych, ponieważ stosowane bodźce nie wywierały znamiennego wpływu na aktywność PLC degradującej PtdIns(4,5)P₂ i PtdIns w zwojach szyjnych górnych i pniu mózgu, stosowanych jako tkanki kontrolne.

Na podstawie doświadczeń z wbudowywaniem ³²P z [³²P]ATP do endogennych fosfolipidów kłębka stwierdzono znamienne obniżenie poziomu radioaktywności ³²P w PtdIns(4,5)P₂ i PtdIns(4)P w kłębkach poddanych działaniu hipoksji, co może wskazywać na obniżenie poziomu endogennych lipidów inozytolowych. W badaniach odpowiedzi PLC w hipoksyjnych kłębkach szyjnych stwierdzono podobną jak w kłębkach normoksyjnych stymulację PtdIns(4,5)P₂-PLC przez GTPγS w obecności endogennych stężeń jonów Ca²⁺.

Zastosowanie toksyny cholery i krztuśca wykazało zmianę odpowiedzi aktywowanej przez GTPγS PtdIns(4,5)P₂-PLC w kłębkach szyjnych poddanych hipoksji, w porównaniu z odpowiedzią PLC w kłębkach szyjnych normoksyjnych. Uzyskane wyniki mogą wskazywać na modyfikację białek G w hipoksji. Stwierdzony wzrost aktywności PLC w kłębkach szyjnych normoksyjnych w wyniku działania toksyny cholery i brak tego efektu w kłębkach hipoksyjnych może wskazywać na aktywację endogennej ADP-rybozylacji białek G w hipoksji i zmiany ich odpowiedzi na testowaną toksynę.

Podsumowując, przeprowadzone przeze mnie badania wykazały istnienie fosfolipazy C degradującej PtdIns(4,5)P₂ i PtdIns w normoksyjnych kłębkach szyjnych. Stwierdzono, że naturalne bodźce, powodujące aktywację chemoreceptorów kłębków szyjnych i wzrost odpowiedzi oddechowej, zwiększają w istotny sposób aktywność fosfolipazy C degradującej PtdIns(4,5)P₂. Badania te wykazały, że produkty rozpadu fosfatydyloinozytoli, będące przekaźnikami drugiego rzędu, które zapoczątkowują odpowiedzi komórkowe, a więc: inozytolotrójfosforan i diacyloglicerol, mogą odgrywać istotną rolę w mechanizmach chemorecepcji zachodzących w kłębkach szyjnych. Znaczenie fosfolipazy C oraz udział przekaźników informacji pochodzenia lipidowego nie był dotąd brany pod uwagę.

Szczegółowe umiejscowienie poszczególnych elementów kaskady fosfatydyloinozytolowej w strukturze kłębków szyjnych i w mechanizmie chemorecepcji wymaga dalszych badań. Rozpracowanie

tych mechanizmów może mieć istotne znaczenie nie tylko dla poznania fizjologicznych podstaw regulacji oddychania, ale także mogłoby w przyszłości umożliwić farmakologiczną ingerencję w patologicznych stanach procesu oddychania.

VIII. PIŚMIENNICTWO

Abe K., Kogure K., Yamamoto H., Imazawa M., Miyamoto K. Mechanism of arachidonic acid liberation during ischemia in gerbil cerebral cortex. *J. Neurochem.* 48:503-509, 1987.

Acker H., Starlinger H. Adenosine triphosphate content in the cat carotid body under different arterial O₂ and CO₂ conditions. *Neurosci. Lett.* 50:175-179, 1984.

Agranoff B.W., Fisher S.K. Phosphoinositides. *Molec. Cell. Med. Aspect Basic Neurochem.* ed. Siegel G. J., Raven Press Ltd N.Y. 5:417-428, 1994.

Almaraz L., Gonzalez C., Obeso A. Effects of high potassium on the release of [³H] dopamine from the cat carotid body in vitro. *J. Physiol.* 379:293-307, 1986.

Audigier S.M.P., Wang J.K.T., Greengard P. Membrane depolarization and carbamoylcholine stimulate phosphatidylinositol turnover in intact nerve terminals. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:2859-2863, 1988.

Bazan N.G. Effects of ischemia and electroconvulsive shock on free fatty acid pool in the brain. *Biochim. Biophys. Acta* 218:1-10, 1970.

Bazan N.G. Neuronal cell signal transduction and second messengers in cerebral ischemia. *Pharmacology of Cerebral Ischemia*, ed. Kriegstein J., Oberpichler H., 391-398, 1990.

Bean B.P. Classes of calcium channels in vertebrate cells. *Annu. Rev. Physiol.* 51:367-384, 1989.

Benuck M., Reith E.A., Lajtha A. Phosphoinositide hydrolysis induced by depolarization and sodium channel activation in mouse cerebrocortical slices. *Neuropharm.* 28:847-854, 1989.

Berridge M.J., Dawson R.M.C., Downes C.P., Heslop J.P., Irvine R.F. Changes in the levels of inositol phosphates after agonist-dependent hydrolysis of membrane phosphoinositides. *Biochem. J.* 212:473-482, 1983.

Berridge M.J., Irvine R.F. Inositol trisphosphate a novel second messenger in cellular signal transduction. *Nature* 312:315-321, 1984.

Berridge M.J. Inositol trisphosphate and diacylglycerol: two interacting second messengers. *Ann. Rev. Biochem.* 56:159-193, 1987a.

Berridge M.J. Inositol lipids and cell proliferation. *Biochim. Biophys. Acta* 907:33-45, 1987b.

Berridge M.J., Irvine R.F. Inositol phosphates and cell signalling. *Nature* 341:197-199, 1989.

Bhat G.B., Block E.R. Effect of hypoxia on phospholipid metabolism in porcine pulmonary artery endothelial cells. *Am. J. Physiol.* 262:L606-L613, 1992.

Biscoe T.J., Duchon M.R., Eisner D.A., O'Neill S.C., Valdeolmillos M. Measurements of intracellular Ca^{2+} in dissociated type I cells of the rabbit carotid body. *J. Physiol.* 416:421-434, 1989.

Biscoe T.J., Duchon M.R. Responses of type I cells dissociated from the rabbit carotid body to hypoxia. *J. Physiol.* 428:39-59, 1990.

Bleasdale J.E., Thakur N.R., Gremban R.S., Bundy G.L., Fitzpatrick F.A., Smith R.J., Bunting S. Selective inhibition of receptor-coupled phospholipase C- dependent processes in human platelets and polymorphonuclear neutrophils. *J. Pharmacol. Experimental. Therapeutics* 255:756-768, 1990.

Bligh E.G., Dyer W.J. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol* 37:911-917, 1959.

Block E.R., Patel J.M., Edwards D. Mechanism of hypoxic injury to pulmonary artery endothelial cell plasma membranes. Am. J. Physiol. 257:C223-C231, 1989.

Brandt S.J., Dougherty R.W., Lapetina E.G., Niedel J.E. Pertussis toxin inhibits chemotactic peptide - stimulated generation of inositol phosphates and lysosomal enzyme secretion in human leukemic (HL-60) cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:3277-3280, 1985.

Brown E., Kendall D.A., Nahorski S.R. Inositol phospholipid hydrolysis in rat cerebral cortical slices I. Receptor characterization. J. Neurochem. 42:1379-1387, 1984.

Carter H.R., Wallace M.A., Fain J.N. Activation of phospholipase C in rabbit brain membranes by carbachol in the presence of GTP γ S; effects of biological detergents. Biochim. Biophys. Acta. 1054:129-135, 1990.

Chandler L.J., Crews F.T. Calcium- versus G protein-mediated phosphoinositide hydrolysis in rat cerebral cortical synaptoneuroosomes. J. Neurochem. 55:1022-1030, 1990.

Chen C.K., Silverstein F.S., Fisher S.K., Statman D., Johnson M.V. Perinatal hypoxic-ischemic brain injury enhances quisqualic acid-stimulated phosphoinositide turnover. J. Neurochem. 51:353-359, 1988.

Chiu A.S., Li P.P., Warsh J.J. G-protein involvement in central nervous system muscarinic-receptor-coupled polyphosphoinositide hydrolysis. *Biochem. J.* 256:995-999, 1988.

Claro E., Garcia A., Picatoste F. Carbachol and histamine stimulation of guanine-nucleotide-dependent phosphoinositide hydrolysis in rat brain cortical membranes. *Biochem. J.* 261:29-35, 1989a.

Claro E., Wallace M., Lee H.M., Fain J.N. Carbachol in the presence of guanosine 5'-O-(3-thiotrisphosphate) stimulates the breakdown of exogenous phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate, phosphatidyl inositol 4-phosphate, and phosphatidylinositol by rat brain membranes. *J. Biol. Chem.* 264:18288-18295, 1989b.

Cockcroft S. Polyphosphoinositide phosphodiesterase regulation by a novel guanine nucleotide binding protein Gp. *TIBS* 12:75-78, 1987.

Cockcroft S., Stutchfield J. Effect of pertussis toxin and neomycin on G-protein-regulated polyphosphoinositide phosphodiesterase. *Biochem. J.* 256:343-350, 1988.

Cockcroft S. G-protein-regulated phospholipases C, D and A₂-mediated signalling in neutrophils. *Biochem. Biophys. Acta*, 1113:135-160, 1992.

Cohen P. Signal ingestion at the level of protein kinases, protein phosphatases and their substrates. TIBS 17:408-413, 1992.

Craig A.A., Amagasu M., Shah K., Jolly Y.C., Major Ch., Wolf B.A. U-73122 does not specifically inhibit phospholipase C in rat pancreatic islets and insulin-secreting β -cell lines. Life Sciences 54:PL 107-112, 1994.

De Castro F., Sur la structure et l'innervation de l'homme et des mammifères. Nouveaux faits sur l'innervation et la fonction du glomus cariticum. Etudes anatomiques et physiologiques. Trabajos del Laboratorio de Investigaciones Biologicas de la Universita de Madrid 25:331-380, 1928.

Delpiano M.A., Acker H. Hypoxia increases the cyclic AMP content of the cat carotid body in vitro. J. Neurochem. 57:291-297, 1991.

Dennis E.A., Rhee S.G., Billah M.M., Hannun Y.A. Role of phospholipases in generating lipid second messengers in signal transduction. FASEB J. 5:2068-2077, 1991.

Dinger B., Gonzalez C., Yoshizaki K., Fidone S. ^3H -spiroperidol binding in normal and denervated carotid bodies. Neurosci. Lett. 21:51-53, 1981.

Donnelly D.F. Electrochemical detection of catecholamine release from rat carotid body in vitro. *J. Appl. Physiol.* 74:2330-2337, 1993.

Dubyak G.R. Signal transduction by P₂-purinergic receptors for extracellular ATP. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 4:295-300, 1991.

Durell J., Garland J.T., Friedel R.O. Acetylcholine action; biochemical aspects. *Science* 165:862-866, 1969.

Dyck L.E. Effect of dopamine on phosphoinositide hydrolysis in slices of rat striatum and cortex. *Neurochem. Int.* 17:77-82, 1990.

Deckmyn H., Tu S.M., Majerus P.W. Guanine nucleotides stimulate soluble phosphoinositide-specific phospholipase C in the absence of membranes. *J. Biol. Chem.* 261:16553-16558, 1986. Eberhard D.A.,

Cooper C.L., Low M.G., Holtz R.W. Evidence that the inositol phospholipids are necessary for exocytosis. *Biochem. J.* 268:15-25, 1990.

Enjalbert A., Bockaert J. Pharmacological characterisation of the D₂ dopamine receptor negatively coupled with adenylate cyclase in rat anterior pituitary. *Mol. Pharmacol.* 23:576-584, 1983.

Fain J.N., Wallace A., Wojcikiewicz R.J.H. Evidence for involvement of guanine nucleotide-binding regulatory proteins in the activation of phospholipases by hormones. *FASEB* 2:2569-2574, 1988.

Fain J.N. Regulation of phosphoinositide-specific phospholipase C. *Biochim. Biophys. Acta* 1035:81-88, 1990.

Farber J.L., Young E.E. Accelerated phospholipid degradation in anoxic rat hepatocytes. *Arch. Biochem. Biophys.* 211:312-320, 1981.

Farooqui A.A., Haun S.E., Horrocks L.A. Ischemia and hypoxia. *Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular and Medical Aspects*, 5th ed. G.J. Siegel, i wsp. Raven Press Ltd N.Y. 867-883, 1994.

Fidone S.J., Gonzalez C., Yoshizaki K. Effects of low oxygen on the release of dopamine from the rabbit carotid body in vitro. *J. Physiol.* 333:93-110, 1982.

Fidone S.J., Gonzalez C. Initiation and control of chemoreceptor activity in the carotid body. In: *Handbook of Physiology, Section 3. The Respiratory System* ed. Cherniack N.S., Widdicombe J.G. 2:247-312, 1986.

Fieber L.A., McCleskey E.W. L-type calcium channels in type I cells of the rat carotid body. *J. of Neurophysiol.* 70: 1378-1383, 1993.

Fisher S.K., Heacock A.M., Agranoff B.W. Inositol lipids and signal transduction in the nervous system: an update. *J. of Neurochem.* 58:18-38, 1992.

Fitzgerald R.S., Garger P., Haner M.C., Raff M. Effect of hypoxia and hypercapnia on catecholamine content in cat carotid body. *J. Appl. Physiol: Respirat. Environ. Exercise Physiol.* 54:1408-1413, 1983.

Ganfornina M.D., Lopez-Barneo J. Single K⁺ channels in membrane patches of arterial chemoreceptor cells are modulated by O₂ tension. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 88:2927-2930, 1991.

Ganfornina M.D., Lopez-Barneo J. Potassium channel types in arterial chemoreceptor cells and their selective modulation by oxygen. *J. Gen. Physiol.* 100:401-426, 1992.

Ghalayini A.J., Anderson R.E. Activation of bovine rod outer segment phospholipase C by ATP and GTP. *Neurosci. Res. Commun.* 1:119-127, 1987.

Gilman A. G. G-protein: Transducers of receptor-generated signals. *Ann. Rev. Biochem.* 56, 615-649, 1987.

Goldman W.F., Eyzaguirre C. The effect of dopamine on glomus cell membranes in the rabbit. *Brain Res.* 321:337-340, 1984.

Gonzalez C., Almaraz L., Obeso A., Rigual R. Oxygen and acid chemoreception in the carotid body chemoreceptors. *Trends Neurosci.* 15:146-153, 1992.

Gordon J.L. Extracellular ATP; effects, sources and fate. *Biochem. J.* 233:309-319, 1986.

Grynberg A., Nalbone G., Degois M., Leonard J., Athias P., Lafont H. Activities of some enzymes of phospholipid metabolism in cultured rat ventricular myocytes in normoxic and hypoxic conditions. *Biochem. Biophys. Acta* 958:24-30, 1988.

Guillon G., Gallo-Payet N., Balestre M.N., Lombard C. Cholera-toxin and corticotropin modulation of inositol phosphates accumulation induced by vasopressin and angiotensin II in rat glomerulosa cells. *Biochem. J.* 253:765-775, 1988.

Guillon G., Mouillac B., Savage A.L. Modulation of hormone-sensitive phospholipase C. *Cellular Signalling* 4:11-23, 1992.

Haefner E.W. Diacylglycerol: formation and function in phospholipid-mediated signal transduction. *Comp. Biochem. Physiol.* 105C:337-345, 1993.

Hazen S.L., Ford D.A., Gross R.W. Activation of membrane associated phospholipase A₂ during rabbit myocardial ischemia which is highly selective for plasmalogen substrate. *J. Biol. Chem.* 266:5629-5633, 1991.

Hepler J.R., Gilman A.G. G proteins *TIBS* 17:383-387, 1992.

Hescheler J., Delpiano M.A., Acker H., Pietruschka F. Ionic currents on type-I cells of the rabbit carotid body measured by voltage clamp experiments and the effect of hypoxia. *Brain Res.* 486:79-88, 1989.

Heymans C., Neil E. Reflexogenic areas of the cardiovascular system. London:Churchill 192, 1958.

Hochachka P.W. Defense strategies against hypoxia and hypothermia. *Science Wash. DC* 231:234-241, 1986.

Hoffmann S.L., Majerus P.W. Modulation of phosphatidylinositol-specific phospholipase C activity by phospholipid interactions, diglycerides and calcium ions. *J. Biol. Chem.* 257:14359-14364, 1982.

Hokin-Neaverson M., Sadeghian K. Lithium-induced accumulation of inositol 1-phosphate during cholecystokinin octapeptide- and acetylcholine-stimulated phosphatidylinositol breakdown in dispersed mouse pancreas acinar cells. *J. Biol. Chem.* 259:4346-4352, 1984.

Hossmann K.A., Paschen W., Sciba L. Relationship between calcium accumulation and recovery of cat brain after prolonged cerebral ischemia. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 3:346-353, 1983.

Hossmann K.A., Grosse Ophoff B., Schmidt-Kastner R., Oschlies U. Mitochondrial calcium sequestration in cortical and hippocampal neurons after prolonged ischemia of the cat brain. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 68:230-238, 1985.

Huang H.M., Sun G.Y. Effect of ATP on phosphatidyl inositol phospholipase C and inositol-1-phosphate accumulation in rat brain synaptosomes. *J. Neurochem.* 50:366-374, 1988.

Huang H.M., Gibson G.E. Phosphatidylinositol metabolism during in vitro hypoxia. *J. Neurochem.* 52:830-834, 1989.

Ikeda M., Yoshida S., Busto R., Santiso M., Ginsberg M.D. Polyphosphoinositides as a probable source of brain free fatty acids accumulated at the onset of ischemia. *J. Neurochem.* 41:123-132, 1986.

Iturriaga R., Lahiri S. Role of Cl^- - HCO_3^- exchanger and anion channel in the cat carotid body function. ed. Honda Y., Plenum Press New York, London, 119-122, 1992.

Katz D.M., Finley J.C.W., Polak J. Dopaminergic and peptidergic sensory innervation of the rat carotid body: organization and development. Neurobiology and Cell Physiology of Chemoreception Edited by Data P.G. et al., Plenum Press, New York, 43-49, 1993.

Kaziro Y., Itoh H., Kozasa I., Nakafuku M., Satoh T. Structure and function of signal-transducing GTPbinding proteins. Annu. Rev. Biochem. 60:349-400, 1991.

Kebabian J.W., Calne D.B. Multiple receptors for dopamine. Nature. 277:93, 1979.

Kehrer J.P., Jones D.P., Lemasters J.J., Ferber J.L., Jeaschke H. Mechanism of hypoxic cell injury. Toxicol. and Appl. Pharmacol. 106:165-178, 1990.

Kelly E., Batty I., Nahorski S.R. Dopamine receptor stimulation does not affect phosphoinositide hydrolysis in slices of rat striatum. J. Neurochem. 51:918-942, 1988.

Kendall D.A., Nahorski S. Inositol phospholipid hydrolysis in rat cerebral cortical slices II. Calcium requirement. *J. Neurochem.* 42:1388-1394, 1984.

Kostyuk P.G. Calcium channels in the neuronal membrane. *Biochem. Biophys. Acta* 650:128-150, 1981.

Lahiri S., DeLaney R.G. Relationship between carotid chemoreceptor activity and ventilation in the cat. *Respir. Physiol.* 24:267-286, 1975a.

Lahiri S., DeLaney R.G. Stimulus interaction in the responses of carotid body chemoreceptor single afferent fibers. *Respir. Physiol.* 24:249-266, 1975b.

Lahiri S. Chromophores in O₂ chemoreception: the carotid body model. *NIPS* 9:161-165, 1994.

Lauder J.M. Neurotransmitters as growth regulatory signals: role of receptors and second messengers. *TINS* 16:233-239, 1993.

Łazarewicz J.W., Strosznajder J., Gromek A. Effect of ischemia and exogenous fatty acids on the energy metabolism in brain mitochondria. *Bull. Acad. Pol. Sci.* 20:599-603, 1972.

Łazarewicz J.W., Leu V., Sun A.Y. Arachidonic acid release from K^+ evoked depolarization of brain synaptoneurosomes. *Neurochem. Int.* 5:471-479, 1983.

Lazarowski E.R., Lapetina E.G. Activation of platelet phospholipase C by fluoride is inhibited by elevation of cyclic AMP. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 158:440-444, 1989.

Lee K.Y., Ryu S.H., Suh P.G., Choi W.C., Rhee S.G. Phospholipase C associated with particulate fractions of bovin brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:5540-5544, 1987.

Liscovitch M. Crosstalk among multiple signal-activated phospholipases. *TIBS*, 17:393-398, 1992.

Litosch I., Wallis Ch., Fain J.N. 5-Hydroxytryptamine stimulates inositol phosphate production in a cell-free system from Blowly Salivary glands. *J. Biol. Chem.* 260:5464-5471, 1985.

Lopez-Lopez J.R., Gonzalez C., Urena J., Lopez-Barneo J. Low PO_2 selectively inhibits K channel in chemoreceptor cells of the mammalian carotid body, *J. Gen. Physiol.* 93:1001-1015, 1989.

Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193:265-275, 1951.

Ma Y.H., Reusch H.P., Wilson E., Escobedo J.A., Fantl W.J., Williams L.T., Ives H.E. Activation of Na⁺/H⁺ exchange by platelet-derived growth factor involves phosphatidylinositol 3'-kinase and phospholipase C γ . J. Biol. Chem. 269:30734-30739, 1994.

Mahan L.C., Burch R.M., Monsma F.J.Jr., Sibley D.R. Expression of striatal D₁ dopamine receptors coupled to inositol phosphate production and Ca²⁺ mobilization in Xenopus oocytes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:2196-2200, 1990.

Malhotra R.K., Bhave S.V., Wakade T.O., Bhare A.S., Wakade A.R. Effects of neurotransmitters and peptides on phospholipid hydrolysis in sympathetic and sensory neurons. FASEB J. 4:2492-2498, 1990.

McDonald D.M., Mitchell R.A. The innervation of the glomus cells, ganglion cells and blood vessels in the rat carotid body: a quantitative ultrastructural analysis. J. Neurocytol. 4:177-230, 1975.

McDonald D.M., Haskell A. Morphology of connections between arterioles and capillaries in the rat carotid body analysed by reconstructing serial sections. The Peripheral Arterial Chemoreceptors, ed. Pallot D.J. London Croom Helm, 195-206, 1984.

McQueen D.S., Mir A.K. Changes in carotid body amine levels and effects of dopamine on respiration in rats treated neonatally with capsaicin. *Br. J. Pharmacol.* 83:909, 1984.

Mills E., Slotkin T. Catecholamine content of the carotid body in cats ventilated with 8-40% oxygen. *Life Sci. Oxford* 16: 1555-1562, 1975.

Mills E., Smith P.G., Slotkin T., Breese G. Role of carotid body catecholamines in chemoreceptor function. *Neuroscience* 3: 1137-1146, 1978.

Mir A.K., McQueen D.S., Pallot D.J., Nahorski S.R. Direct biochemical and neuropharmacological identification of dopamine D₂-receptors in the rabbit carotid body. *Brain Res.* 291:273, 1984.

Moraru I.J., Popescu L.M., Liu X., Engelman R.M., Das D.K. Role of phospholipase A₂ C and D activities during myocardial ischemia and reperfusion in Cellular Biochemical and Molecular Aspect of Reperfusion injury. *Ann. New York Acad. Science* 723:328-336, 1994.

Mulligan E., Lahiri S. Dependence of carotid chemoreceptor stimulation by metabolic agents on PaO₂ and PaCO₂. *J. Appl. Physiol.* 50:884-891, 1981.

Mulligan E., Lahiri S. Separation of carotid body chemoreceptor responses to O₂ and CO₂ by oligomycin and by antimycin A. *Am. J. Physiol.* 242:C200-C206, 1982.

Murphy T.H., Wright D.D., Baraban J.M. Phosphoinositide turnover associated with synaptic transmission. *J. Neurochem.* 59:2336-2339, 1992.

Nahorski S.R., Kendall D.A., Batty I. Receptors and phosphoinositide metabolism in the central nervous system. *Biochem. Pharmacol.* 35:2447-2453, 1986.

Nishizuka Y. Turnover of inositol phospholipids and signal transduction. *Science* 225:1365-1370, 1984.

Nishizuka Y. Signal transduction crosstalk. *TIBS* 17:367, 1992.

Nolan W.F., Donnelly D.F., Smith E.J., Dutton R.E. Haloperidol-induced suppression of carotid chemoreception in vitro. *J. Appl. Physiol.* 59:814-820, 1985.

Nozawa Y., Nakashima S., Nagata K.I. Phospholipid-mediated signaling in receptor activation of human platelets. *Biochim. Biophys. Acta* 1082:219-238, 1991.

Obeso A., Almaraz L., Gonzalez C. Correlation between adenosine triphosphate levels, dopamine release and electrical activity in the carotid body: support for the metabolic hypothesis of chemoreception. *Brain Res.* 348:64-68, 1985.

Obeso A., Almaraz L., Gonzalez C. Effects of 2-deoxy-D-glucose on in vitro cat carotid body. *Brain Res.* 371:25-36, 1986.

Obeso A., Almaraz L., Gonzalez C. Effects of cyanide and uncouplers on chemoreceptor activity and ATP content of the cat carotid body. *Brain Res.* 481:250-257, 1989.

Obeso A., Rocher A., Fidone S., Gonzalez C. The role of dihydropyridine-sensitive Ca^{2+} channels in stimulus evoked catecholamine release from chemoreceptor cells of the carotid body. *Neurosci.* 47:463-472, 1992.

Okajima Y., Nishi K. Analysis of inhibitory and excitatory actions of dopamine on chemoreceptor discharges of carotid body of cat in vivo. *Japanese J. of Physiol.* 31:695-704, 1981.

Park D., John D.Y., Lee C.W., Lee K.H., Rhee S.G. Activation of phospholipase C isozymes by G protein $\beta\gamma$ subunits. *J. Biol. Chem.* 268:4573-4576, 1993.

Perez-Garcia M.T., Almaraz L., Gonzalez C. Effects of different types of stimulation on cyclic AMP content in the rabbit carotid body: functional significance. *J. Neurochem.* 55:1287-1293, 1990.

Figure 2

Perez-Garcia M.T., Almaraz L., Gonzalez C. Cyclic AMP modulates differentially the release of dopamine induced by hypoxia and other stimuli and increases dopamine synthesis in the rabbit carotid body. *J. Neurochem.* 57:1992-2000, 1991.

Chemoreceptors

Pokorski M., Lahiri S. Aortic and carotid chemoreceptor responses to metabolic acidosis in the cat. *Am. J. Physiol.* 244:R652-R658, 1983.

Ross 2.

Ponte J., Sadler C.L. Interactions between hypoxia, acetylcholine and dopamine in the carotid body of rabbit and cat. *J. Physiol.* 410:395-410, 1989.

hydrolysis

Prentki M., Deeney J.T., Matschinsky F.M., Joseph S.K. Neomycin: a specific drug to study the inositol-phospholipid signalling system? *FEBS Lett.* 197:285-288, 1986.

coupling

Purves M.J. The effect of hypoxia, hypercapnia and hypotension upon carotid body blood flow and oxygen consumption in the cat. *J. Physiol. London* 209:395-416, 1970.

anoxia

carotid

Rhee S.G., Suh P.G., Ryu S.H., Lee S.Y. Studies of inositol phospholipid-specific phospholipase C. *Science* 244:546-550, 1989.

Rigual R., Gonzalez E., Gonzalez C., Fidone S.J. Synthesis and release of catecholamines by the cat carotid body in vitro: effects of hypoxic stimulation. *Brain Res.* 101-109, 1986.

Rigual R., Lopez-Lopez J.R., Gonzalez C. Release of dopamine and chemoreceptor discharge induced by low pH and high P_{CO_2} stimulation of the cat carotid body. *J. Physiol. Lond.* 433:519-531, 1991.

Ross E. M. Signal sorting and amplification through G protein-coupled receptors. *Neuron.* 3:141-152, 1989.

Roth B. Modulation of phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate hydrolysis in rat aorta by guanine nucleotides, calcium and magnesium. *Life Science* 629-634, 1987.

Rubinstein J.E., Hitzemann R.J. Further evidence against the coupling of dopamine receptors to phosphoinositide hydrolysis in rat striatum. *Biochem. Pharmacol.* 39:1965-1970, 1990.

Sato M., Ikeda K., Koyano H. Response of cytosolic calcium to anoxia and cyanide in cultured glomus cells of newborn rabbit carotid body. *Brain Res.* 55:327-330, 1991.

Sato M., Yoshizaki K., Koyano H. Elevation of cytosolic calcium induced by pH changes in cultured carotid body glomus cells. Neurobiology and Cell Physiology of Chemoreception Edited by Data P.G. et al., Plenum Press, New York, 205-216, 1993.

Schamel A., Verna A. Localization of dopamine D₂ receptor mRNA in the rabbit carotid body and petrosal ganglion by in situ hybridization. Neurobiology and Cell Physiology of Chemoreception Edited by Data P.G. et al., Plenum Press, New York, 85-92, 1993.

Scott J.A. Phospholipase activity and plasma membrane homeostasis. J. Theor. Biol. 111:659-665, 1984.

Seren M.S., Aldinio C., Zanoni R., Leon A., Nicoletti F. Stimulation of inositol phospholipid hydrolysis by excitatory amino acids is enhanced in brain slices from vulnerable regions after transient global ischemia. J. Neurochem. 53:1700-1705, 1989.

Shaw K., Montague W., Pallot D.J. Biochemical studies on the release of catecholamines from the rat carotid body in vitro. Biochim. Biophys. Acta. 1013-1042, 1989.

Shinomura T., Mishima H., Matsuchima S., Asaoka Y., Yoshida K., Oka M., Nishizuka Y. Degradation of phospholipids and protein kinase C activator for the control of neuronal function in Neurobiology of fatty acids. *Advances in experimental Medicine and Biology* ed. Bazan N.G., Murphy M.G., Toffono G. 361-375, 1992.

Shirahata M., Fitzgerald R.S. Dependency of hypoxic chemotransduction in cat carotid body on voltage-gated calcium channels. *J. Appl. Physiol.* 71:1062-1069, 1991.

Siesjo B.K. Historical overview. Calcium, ischemia and death of brain cells. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 522:638-661, 1988.

Siesjo B.K., Bengtsson F. Calcium fluxes, calcium antagonist, and calcium-related pathology in brain ischemia, hypoglycemia, and spreading depression: a unifying hypothesis. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 9:127-140, 1989.

Siesjo B.K., Katsura K. Ischemic brain damage Focus on lipids and lipid mediators. *Neurobiology of essential fatty acid.* ed. Bazan N.G., Murphy M.G., Tuffano G. 318:41-56, 1992.

Siesjo B.K. A new perspective on ischemic brain damage? *Brain Res.* 96:1-9, 1993.

Simon M.I., Strathmann M.P., Gutman N. Diversity of G proteins in signal transduction. *Science* 252:802-808, 1991.

Smallridge R.C., Kiang J.G., Gist I.D., Fein H.G., Galloway R.J. U-73122, an aminosteroid phospholipase C antagonist, noncompetitively inhibits thyrotropin-releasing hormone effect in GH₃ rat pituitary cells. *Endocrinol.* 131:1883-1888, 1992.

Smith R.J., Sam L.M., Justen J.M., Bundy G.L., Bala G.A., Bleasdale J.E. Receptor-coupled signal transduction in human polymorphonuclear neutrophils: effects of a novel inhibitor of phospholipase C -dependent processes on cell responsiveness. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 253:688-697, 1990.

Smrcka A.V., Hepler J.R., Brown K.O., Sternweis P.C. Regulation of polyphosphoinositide-specific phospholipase C activity by purified G_q. *Science* 251:804-807, 1991.

Stralinger H., Acker H., Heinrich R. Dopamine - β - hydroxylase activity of the cat carotid body under different arterial O₂ and CO₂ conditions. *Neurochem.*, 41: 1533-1537, 1983.

Strathmann M.P., Simon M.I. G protein diversity: a distinct class of α subunits is present in vertebrates and invertebrates. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 87:9113-9117, 1991a.

Strathmann M.P., Simon M.I. G 12 and G 13 subunits define a fourth class of G protein subunits. Proc. Natl. Acad. Sci. 88:5582-5586, 1991b.

Strosznajder J., Wikiel H., Sun G.Y. Effect of cerebral ischemia on [³H] inositol lipids and [³H] inositol phosphates in gerbil brain and subcellular fractions. J. Neurochem. 48:943-948, 1987.

Strosznajder J., Haeffner E.W. Effect of 1-oleoyl-2-acetyl-sn-glycerol on inositol lipid metabolism of ascites tumor cells in culture. J. Lipid Mediators 1:175-187, 1989.

Strosznajder J., Strosznajder P.R. Stimulation of phosphoinositides degradation and phosphatidylinositol-4-phosphate phosphorylation by GTP exclusively in plasma membrane of rat brain. Neurochem. Res. 14:717-723, 1989.

Strosznajder R. P., Strosznajder J. ATP a potent regulator of phosphoinositides-phospholipase C and lipid mediators of signal transduction pathway in brain. W druku: Neurochem. Int., 1995

Sun G.Y. Phospholipid metabolism in response to cerebral ischemia. In: Phospholipids in the nervous system. Biochemical and molecular pathology. ed. Bazan N.G., Horrocks L.A., Toffano G., Padova: Liriana Press 17:133-139, 1989.

Sun G.Y. Contributions to arachidonic acid release in mouse cerebrum by the phosphoinositide - phospholipase C and phospholipase A₂ pathways in Neurobiology of Essential Fatty acids. ed. Bazan N.G., Murphy M.G., Toffons G. 318:103-114, 1992.

Taylor S.J., Chae H.Z., Rhee S.G., Exton J.H. Activation of the β 1 isozyme of phospholipase C by α subunits of the G_q class of G protein. Nature 350:516-518, 1991.

Thompson A.K., Mostafapour S.P., Denlinger L.C., Bleasdale J.E., Fisher S.K. The aminosteroid U-73122 inhibits muscarinic receptor sequestration and phosphoinositide hydrolysis in SK-N-SH neuroblastoma cells: a role for G_q in receptor compartmentation. J. Biol. Chem. 1991.

Tretyakov A.V., Farber H.W. Endothelial cell phospholipid distribution and phospholipase activity during acute and chronic hypoxia. Am. J. Physiol. 265:C770-C780, 1993.

Umemura A., Mabe H., Nagai H., Sugino F. Action of phospholipases A₂ and C on free fatty acid release during complete ischemia in rat neocortex. J. Neurosurg. 76:648-651, 1992.

Umemura A., Mabe H., Nagai H. A phospholipase C inhibitor ameliorates postischemic neuronal damage in rats. Stroke 23:1163-1166, 1992.

Undie A.S., Friedman E. Stimulation of a dopamine D₁ receptor enhances inositol phosphate formation in rat brain. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 253:987-992, 1990.

Urena J., Lopez-Lopez J., Gonzalez C., Lopez-Barneo J. Ionic currents in dispersed chemoreceptor cells of the mammalian carotid body. *J. Gen. Physiol.* 93:979-999, 1989.

Wallace M.A., Claro E. A novel role for dopamine: inhibition of muscarinic cholinergic-stimulated phosphoinositide hydrolysis in rat brain cortical membranes. *Neurosci. Lett.* 110:155-161, 1990.

Wikieł H., Strosznajder J. Metabolizm i rola fosfoinozytydów w transdukcji sygnału. *Postępy Biologii Komórki* 1:1-21, 1988.

Wilson D.F., Mokashi A., Chugh D., Vinogradov S., Osanai S., Lahiri S. The primary oxygen sensor of the cat carotid body is cytochrome a₃ of the mitochondrial respiratory chain. *FEBS* 351:370-374, 1994.

Yoshida S., Ikeda M., Busto R., Santiso M., Martinez E., Ginsberg M. Cerebral phosphoinositide, triacylglycerol and energy metabolism in reversible ischemia: origin and fate of free fatty acids. *J. Neurochem.* 47:744-757, 1986.

Van der Vusse G.J., Van Bilsen M., Reneman R.S. Ischemia and reperfusion induced alterations in membrane phospholipids: An overview in Cellular, Biochemical and Molecular Aspects of Reperfusion Injury. Ann. New York Acad. Science 723:1-14, 1994.

Van Kuijk F.J.G.M., Sevanian A., Handelman G.J., Dratz E.A. A new role for phospholipase A₂: Protection of membranes from lipid peroxidation damage. Trends Biochem. Sci. 12:31-34, 1987.

Vergheze M.W., Charles L., Jakoi L., Dillion S.B., Snyderman R. Role of a guanine nucleotide regulatory protein in deactivation of phospholipase C by different chemoattractants. J. Immunol. 138:4374-4380, 1987.

Verna A., Talib N., Roumy M., Pradet A. Effects of metabolic inhibitors and hypoxia on the ATP, ADP and AMP content of the rabbit carotid body in vitro: the metabolic hypothesis in question. Neurosci. Lett. 116:156-161, 1990.

Zapata P., Hess A., Bliss E., Eyzaguirre C. Chemical, electron microscopic and physiological observations on the role of catecholamines in the carotid body. Brain Res. 14:473-496, 1969.

Zapata P., Serani A., Lavados M. Inhibition in carotid body chemoreceptors mediated by D-2 dopaminoreceptors: antagonism by benzamides. Neurosci. Lett. 42:179-185, 1983.

Zigmond R.E., Schwarzschild M.A., Rittenhouse A.R. Acute regulation of tyrosine hydroxylase by nerve activity and by neurotransmitters via phosphorylation. *Annu. Rev. Neurosci.* 12: 415-461, 1989.