

Stanisław Słowiński**; Marek Tyczyński**

Różnicowanie bodźców chemicznych przez receptory u przybyszki amerykańskiej (*Periplaneta americana* L.)*

Streszczenie

Określono niektóre charakterystyczne cechy reakcji receptorów na stosowane bodźce chemiczne. Badania elektrofizjologiczne wykonano metodą rejestracji elektroantenogramów (EAG).

Zastosowano następujące związki zapachowe: octan etylu, alkohol butylowy, hexan i heptan. Zinterpretowano otrzymane wyniki doświadczalne, biorąc do analizy: czas trwania reakcji po działaniu bodźca oraz kształt potencjału generatorowego.

Zaproponowano ogólny model przetwarzania bodźców w powiązaniu z "wrażliwością" chemoreceptorów oraz przedyskutowano możliwości reakcji na stosowane bodźce.

WSTĘP

Dla poznania procesów związanych z działaniem receptorów czuciowych badania przeprowadza się najczęściej na zwierzętach bezkręgowych - głównie stawonogach. Zwierzęta te mają prostą budowę morfologiczną i posiadają duże elementy układu nerwowego w porównaniu ze zwierzętami kręgowymi (Birch i Haynes, 1982; Lambin, 1973; Fudalewicz-Niemczyk, 1967). Łatwość

* Pracę wykonano w ramach Centralnego Programu Badań Podstawowych Nr 04.01.

** Zakład Fizjologii Zwierząt, Instytut Biologii, Uniwersytet M. Kopernika w Toruniu.

hodowli i dobrze poznana budowa zwierząt pozwalają na ustawienie stosunkowo prostych wariantów doświadczalnych.

W wielu pracach próbowano wykazać i ocenić podstawowe cechy przetwarzania bodźców oraz doświadczalnie wskazywano na istnienie podobnych mechanizmów przetwarzania energii bodźców na wyładowania bioelektryczne (Atema, 1973; Boeckh, 1967; Deutsch, 1971; Janiszewski i Słowiński, 1980; Schneider, 1974).

Ze względu na wiele rodzajów bodźców wyróżniono u zwierząt bezkręgowych - głównie owadów - charakterystyczne morfologicznie i specyficzne elementy czuciowe zwane sensilla (Bullock i Horridge, 1965). Spełniają one funkcje receptorów czuciowych, wyspecjalizowanych w przyjmowaniu m.i. bodźców chemicznych, i są zlokalizowane głównie na czułkach, jakkolwiek spotyka się je na innych częściach kutikuli.

Większość receptorów chemicznych łączy wspólna cecha morfologiczna, a mianowicie system porów. Są to cienkie struktury łączące stronę zewnętrzną włosa z jego wnętrzem. Wewnątrz znajduje się przedłużona wypustka dendrytyczna neuronu. Dendryty mają małe rozmiary i wewnętrzną strukturę typu rzęskowego w postaci cienkich włókienek (filaments), które łączą się w porach.

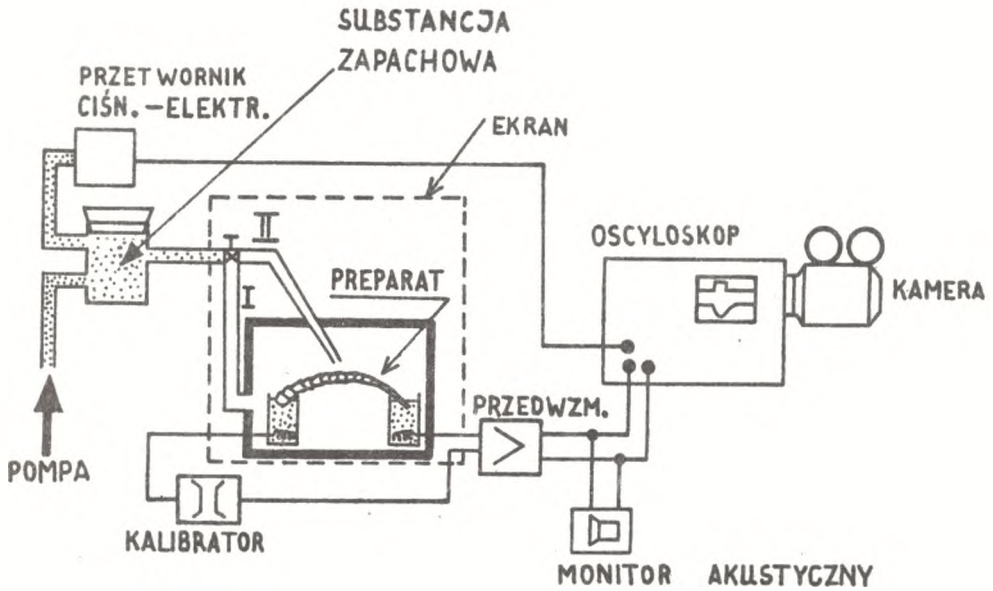
Teorie recepcji bodźców chemicznych (przy całej swojej złożoności) bazują na wzajemnym oddziaływaniu cząsteczki zapachowej ze strukturą neuronu czuciowego. Istotą procesu chemorecepcji nie jest chemiczne wiązanie, lecz raczej fizyczna interakcja. W ostatecznej fazie cząsteczka zapachowa jest w tym procesie metabolizowana.

Celem niniejszej pracy są badania chemoreceptorów poddanych działaniu preparatów "nieseksualnych", a mianowicie: octanu etylu, alkoholu butylowego, hexanu, heptanu.

MATERIAŁ I METODYKA BADAŃ

Zapisy wyładowań elektrycznych otrzymywano z czułków przybyszki amerykańskiej (*Periplaneta americana* L.). Przeprowadzono 14 doświadczeń, w ramach których zanalizowano 59 zarejestrowanych potencjałów receptorowych.

Na rycinie 1 przedstawiono schemat układu do rejestracji potencjałów receptorowych. Zilustrowano tu również zasadę podawania zapachu na obszar receptorów anteny owada. Substancję zapachową włączano ze zbiornika (o stałej objętości) wg wersji I lub II. Każdorazowo podawano takie same ilości substancji stymulującej. Końce czułki owada umieszczono w naczyniach będących niepolaryzującymi się elektrodami typu Ag-AgCl.



Ryc. 1. Schemat układu do rejestracji elektroantenogramów

Dla oceny wpływu bodźca zapachowego na chemoreceptory zastosowano metodę badań polegającą na wykorzystaniu tzw. elektroantenogramów (EAG) (Kozłowski, 1982; Nagai, 1983; Roelofs i inni, 1971; Schneider 1967). W tej metodzie rejestrowano wszystkie zmiany potencjałów pomiędzy obu końcami anteny i dowolnie przyjętym miejscem wpływu bodźca. Obserwowane potencjały są sumą wszystkich istniejących potencjałów. Podanie bodźca chemicznego powodowało zmianę rejestrowanego obrazu elektrycznego i tym samym świadczyło o wpływie podawanego bodźca zapachowego.

WYNIKI

Interpretacja i analiza wyników doświadczalnych została oparta na danych otrzymanych w 14 doświadczeniach, w których przebadano wielokrotnie różne warianty procedury doświadczalnej. Każdorazowo ilości analizowanych biopotencjałów - dla danej grupy doświadczalnej - przedstawiono w tabeli 1.

Zakres zmienności ocenianych cech określa dyspersja (wychylenie standardowe), która nie przekraczała 10% mierzonych wielkości.

Tabela 1

Tabela otrzymanych względnych depolaryzacji (opis w tekście) w kolejnych odcinkach czasowych (min) dla czterech rodzajów bodźców chemicznych. Wyróżniono także różne sposoby podawania bodźca w danej grupie zapachowej oraz podano czas wystąpienia pierwszej reakcji na początek bodźca

RODZAJ BODŹCA CHEM.	LICZBA PRÓB	TYP BODŹCA CHEM.	REAKCJA PO BODŹCU [S]	MIEJSCE ANALIZY PO [min]							
				0,5	1	1,5	2	3	4	5	6
OCTAN ETYLU	12	B ₀	20,4	0,44	0,65	0,34	0,22	0,26	0,12	0,10	0,07
	2	B ₁	19,0	0,40	1,00	0,50	0,45	0,50	0,40	0,30	0,10
	12	B ₂	19,1	0,51	0,73	0,73	0,64	0,33	0,15	0,10	0,10
ALKOHOL BUTYLOWY	9	B ₀	18,5	0,55	1,00	1,00	0,90	0,60	0,35	0,25	0,20
	12	B ₂	19,4	0,52	0,70	0,60	0,60	0,52	0,12	0,10	0,00
HEXAN	2	B ₀	16,0	0,40	0,50	0,70	0,80	0,90	0,20	0,10	0,00
	5	B ₂	18,2	0,36	0,74	0,84	0,62	0,44	0,14	0,04	0,00
HEPTAN	4	B ₀	12,0	0,62	1,00	0,77	0,52	0,30	0,27	0,15	0,05
	3	B ₂	14,0	0,40	0,73	0,80	0,80	0,26	0,10	0,00	0,00

Dla uściślenia wniosków końcowych otrzymane wielkości amplitudy w dalszej części analizy poddano procedurze interpretacyjnej. W każdym z uwzględnionych doświadczeń maksymalną depolaryzację oceniano jako jeden, a w punktach pomiarowych (odległości czasowe: 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 3,0; 4,0; 5,0; 6,0) oceniano każdorazowo względną depolaryzację. Zabieg ten pozwala na pominięcie wymagań związanych z zachowaniem szczegółów geometrii układu pomiarowego. Pomija się wtedy trudne do ustalenia rozmiary anten, a przez to i liczbę obejmowanych bodźcem chemoreceptorów. Wartość amplitudy (depolaryzacja EAG) zależy jedynie od długości anteny poddanej stymulacji określonym bodźcem - w przypadku tego samego gatunku (Nagai, 1981). Natomiast ogólnie u owadów amplituda zależy od rodzaju podanego bodźca i jego stężenia.

Warto dodać, że w jednostkach bezwzględnych amplituda depolaryzacji dla wszystkich analizowanych potencjałów zawarta jest w przedziale 0,8 do 1,2 mV (\pm 0,2 mV).

DYSKUSJA

W założeniu tej pracy spróbowano określić niektóre prawdopodobne cechy związane z recepcją bodźca chemicznego przez odpowiadające mu receptory.

Praktycznie zakłada się, że struktury receptorów nie są dokładnie znane, chociaż wiele z nich zidentyfikowano. Roboczo można założyć, że receptor stanowi strukturę przestrzenną, zaś cząsteczka zapachowa właściwa dla danego receptora powinna odpowiadać mu podobną konfiguracją. Zakłada się również związanie tylko częścią swoich powierzchni. Ścisłość dopasowania warunkuje swoistość działania receptora. Taki model działania receptora wykorzystywany jest w teorii receptorowej, opisującej mechanizm działania leków w farmakologii (Danysz i Gryglewski, 1982).

Teoria receptorowa związana z chemicznym działaniem leku zakłada, że cząsteczka leku łączy się z wybiórczo reagującymi strukturami stanowiącymi część składową biofazy (najczęściej komórki) - nazywanymi tu również receptorami błonowymi. Leki - cząsteczki obdarzone dużym powinowa-

ctwem (stopień "przylegania") do receptora i dużą aktywnością wewnętrzną (zdolność do pobudzenia receptora) są agonistami i pobudzają czynność komórek w sposób zaprogramowany przez receptor. Leki, które nie mają aktywności wewnętrznej, lecz mają powinowactwo do receptora, blokują receptor i nazywają się antagonistami. Gdy receptor jest zajęty przez antagonistę, wtedy agonista nie może dotrzeć do receptora i wyzwoić efektu farmakologicznego. Powstaje wtedy tzw. antagonizm kompetycyjny.

W przedstawionym powyżej schemacie interakcji leku ze strukturą receptorową zobserwować można podobieństwo reakcji cząsteczki zapachowej w chemoreceptorze.

Dodatkowo w badaniach zasad przetwarzania bodźców w receptorach otrzymane wyniki doświadczalne (potencjały receptorowe) można interpretować opierając się na analogiach z poznanymi mechanizmami synaptycznymi (Schneider, 1969).

Model przetwarzania w chemoreceptorze zakłada, że cząsteczka zapachowa jest przyjęta przez receptor. Dalej, poprzez pory i tubule zostaje doprowadzona do dendrytu komórki czuciowej. Stosunkowo prawdopodobne hipotezy zostały zaproponowane dla zapachów, których cząsteczki spełniają m. innymi rolę bodźców seksualnych tzw. feromonów (Birch i Haynes, 1982).

Przykładowo, cząsteczka aktywna (Z) bombykolu reaguje z błoną dendrytyczną komórki receptorowej poprzez "akceptor" zlokalizowany w regionie przetwarzania. Związane z nim mechanizmy powodują zmiany w rozkładzie ładunków elektrycznych na zewnątrz i wewnątrz błony dendrytycznej na poziomie molekularnej struktury neuronu (Janiszewski i Słowiński, 1980; Schneider i inni, 1967; Schneider, 1969, 1974).

Opisane teorie chemorecepcji pozwalają na przedstawienie niektórych cech takiego modelu i wysunięcie uogólnień roboczych.

W tej pracy zastosowano cztery związki zapachowe zróżnicowane działaniem i strukturą. Teoretycznie powinny one reagować z receptorami chemicznymi (nieseksualnymi) znajdującymi się na czułku owada.

Związkami tymi są:

1. Octan etylu, będący estrem etylowym kwasu octowego ($C_4H_8O_2$). Estry są stosunkowo pospolite w przyrodzie, będąc jednym z najważniejszych związków nadających cechy smakowo-zapachowe owoców i innych pokarmów.

2. Alkohol butylowy - ($C_4H_{10}O$), który należy do grupy związków dających wyprowadzić się z węglowodorów przez zastąpienie jednego atomu wodoru grupą OH. Alkohole spotyka się najczęściej w procesach fermentacji.

3. n-Heptan - (C_7H_{16}).

4. Hexan - (C_6H_{14}).

Dwa ostatnie węglowodory w odróżnieniu od estrów i alkoholi rzadziej występują w przyrodzie.

W tabeli 1 przedstawiono niektóre parametry zmian potencjału generatorowego w funkcji czasu dla kilku punktów pomiarowych. Statystycznie uchwytne różnice dla wyróżnionych powyżej rodzajów bodźców dotyczą czasu wystąpienia pierwszej reakcji na bodziec oraz czasu trwania całej odpowiedzi.

Wykorzystując uzyskane wyniki doświadczalne zanalizowano niektóre cechy i parametry związane bezpośrednio z pracą chemoreceptorów. Wykorzystano dane dotyczące zmian czasowych odpowiedzi depolaryzacyjnej, wyróżniając charakterystyczne interakcje cząsteczki zapachowej i receptora. Możliwość oceny uwzględniają jej formy: agonista, antagonistą oraz antagonizm kompetycyjny. Ostatnia forma zachodzi gdy receptor trwale wiąże cząsteczki i agonista nie może wyzwolić efektu chemorecepcji.

Ogólna ocena chemorecepcji

W świetle otrzymanych wyników jakościowe stwierdzenie czucia jest stosunkowo proste. Podanie "zapachu" powoduje zmianę kształtu obrazu elektrycznego. Można więc określić próg absolutny związany z chemorecepcją (przyjęcie zapachu przez receptor). W założeniu są to badania wpływu mieszaniny powietrza obojętnego dla danego typu receptora z substancją wonną. Analizowano odpowiedzi receptorów chemicznych reagujących na zapach w sposób "bierny". Cząsteczka zapachowa wędruje w sposób fizycznie niewymuszony, poprzez układ porów i kanalików, wchodząc jak opisano wyżej w kontakt ze strukturą neuronalną receptora. Podawane tu cząsteczki zapachowe do pojemnika z anteną owada działają w sposób niewymuszony na receptory - charakterystyczny jest tu brak wymuszania mechanicznego. Pozwala to na jednoznaczny ocenę procesu chemorecepcji.

W obrazie elektrycznym istotną cechą jest więc czas wystąpienia reakcji od chwili zadziałania bodźcem i wynosi on od 12 do 20 s, w zależności od typu bodźca zapachowego. Czas pierwszej reakcji z grupy przebadanych związków jest najdłuższy dla octanu etylu i wynosi 19,7 s, zaś dla heptanu 13 s.

"Wrażliwość" chemoreceptorów

W procesie chemorecepcji cząsteczka zapachowa po przyłączeniu do receptora blokuje powierzchnię wrażliwą. Występująca depolaryzacja pokazuje początek i zanikanie przyjętej informacji o bodźcu. Ocenić można również czas od max. depolaryzacji do jej zaniku— czas oczyszczania (metabolizowanie cząsteczki zapachowej). Początek reakcji oraz czas "samooczyszczania" są krótsze dla zapachów, które działają na receptory wyspecjalizowane na dany rodzaj bodźca. Występuje wtedy zgodność strukturalna i energetyczna cząsteczki zapachowej z typem jej receptora. Istotą "prawidłowej" chemorecepcji jest szybkie związanie i podobne oczyszczenie receptora.

Cechy czasowe działającego receptora

a) Czas "zablokowania" receptorów

Po pierwszej fazie wzrostu odpowiedzi na bodziec następuje okres jego maksimum, a następnie zaniku. W tym czasie podanie nowego bodźca (nawet długo trwającego) nie ma wpływu na zmianę potencjału generatorowego. Tę właściwość stwierdzono wielokrotnie w czasie doświadczeń. Dlatego czas wystąpienia odpowiedzi jest okresem refrakcji bezwzględnej i wynosi on w badanych przypadkach około 4 min. Czas refrakcji względnej (okres od następnej reakcji) wymaga już osobnych ustaleń.

Czas zablokowania receptorów jest okresem właściwej reakcji elektrofizjologicznej. W badaniach z feromonami czas związania (wg obrazu depolaryzacji) wynosi około 3 s (Schneider, 1969). Odpowiednio dla związków syntetycznych stosowanych w tej pracy wynosi on około 4 min. Reakcja na bodziec jest stosunkowo długa i wynosi około 16 s. Dla związków swoistych reakcje receptora są prawie natychmiastowe.

b) Czas trwałego "zablokowania" receptora

Wielokrotnie w doświadczeniach obserwowano sytuację ciągłego (trwałego) zablokowania receptorów pod wpływem działania podanego bodźca zapachowego. Jest to przypadek, gdy receptor ma silne powinowactwo do cząsteczki zapachowej. Nie jest to specyficzna chemorecepcja, jedynie wspomniana forma antagonizmu kompetycyjnego. Przypuścić można, że również w normalnych warunkach ta forma wpływu bodźca na receptor występuje, a dotyczy to głównie nieadekwatnych bodźców na istniejące receptory.

W rozwoju ewolucyjnym zwierzęta w warunkach naturalnych środowiska przystosowały swoje struktury receptorowe do najczęściej występujących bodźców. Przykładowo stosowany heptan działa jak bodziec chemiczny, ale nie jest swoisty dla receptorów znajdujących się na antenach.

Dla związków stosunkowo "niefizjologicznych" można założyć brak wyspecjalizowanych chemoreceptorów. Dla "syntetyków" przyroda wprawdzie nie wytworzyła swoistych receptorów, jednak zapachy "podobne" będą wychwycone, jeżeli mają skład chemiczny przylegający chociaż częściowo do struktury receptora.

W proponowanym modelu działania bodźca na receptor trudno ocenić, czy jego wpływ ma formy bardziej fizyczne czy chemiczne. Wiadomo na pewno, że wpływ na wrażliwe pole receptora istnieje i w tym regionie zmienia się przepuszczalność dla jonów na błonie komórkowej. Rejestrowanym obrazem tych zmian są potencjały neuronów czuciowych.

Prawdopodobnie każdy zapach ma możliwości (choć częściowe) dołączenia się do istniejących receptorów. Możliwości te są proporcjonalne do liczby wszystkich receptorów oraz ich zróżnicowania morfologicznego. Jednak skutki fizjologiczne będą uwarunkowane ich "jednoznacznością" funkcjonalną. Nie wyklucza się reakcji rozróżniania czy cząstkowej analizy bodźca nieswoistego.

Powyższe rozważania zmian dotyczą tylko pierwszego etapu przetwarzania, związanego z powstawaniem potencjału generatorowego. Ocena informacji przenoszonej dalej pod postacią potencjału czynnościowego wymaga dalszych ustaleń i innych wariantów doświadczalnych.

Literatura

- Atema J., 1973. Microtubule theory of sensory transduction. *J. Theor. Biol.* 38, 181-190.
- Birch M. C., Haynes K. F., 1982. Insect pheromones. *Studies in Biology* No 147, ed. E. Arnold, London.
- Boeckh J., 1967. Reaktionsschwelle, Arbeitsbereich und Spezifität eines Geruchsrezeptors auf Heuschreckenantenne, *Z. f. verg. Physiol.* 55, 378-406.
- Bullock T. H., Horridge G. A., 1965. Structure and function in the nervous systems of invertebrates. ed. by W. H. Freeman, San Francisco
- Danysz A., Gryglewski R., 1982. *Farmakologia*. PZWL, Warszawa.
- Deutsch S., 1971. A model of sensory receptor transducers. III. *J. of Life Sciences*. Vol.1, No 2, 29-40.
- Fudalewicz-Niemczyk W., 1967. Narządy zmysłowe owadów. *Przegląd Zool.* XI, 3, 246-262.
- Janiszewski L., Słowiński S., 1980. Współczesne badania nad receptorami włosowymi u owadów. *Przegląd Zool.* XXIV, 1, 69-80.
- Kozłowski M., 1982. Elektroantennogram - metoda wglądu w zdolności percepcyjne owadów względem zapachowych składników środowiska. *Kosmos* 5-6, 335-348.
- Lambin M., 1973. Les sensilles de l'antenne chez quelques blattes et en particulier chez *Blaberus craniifer* (Burn). *Z. Zellforsch.* 143, 183-206.
- Nagai T., 1981. Electroantennogram response gradient on the antenna of the European corn borer, *Ostrinia nubilalis*. *J. Insect Physiol.* Vol. 27, No 12, 889-894.
- Nagai T., 1983. On the relationship between the electroantennogram and simultaneously recorded single sensillum response of the european corn borer, *Ostrinia nubilalis*. *Arch. of Insect Biochem. and Physiol.* Vol. 1, 85-91.
- Roelofs W., Comeau A., Hill A., Milicevic G., 1971. Sex attractant of the codling moth. Characterization with electroantennogram technique. *Science*. Vol. 174, 297-299.

- Schneider D., Block B. C., Boeckh J., Priesner E., 1967. Reaktion der Männlichen Seidenspinner auf Bombykol und seine isomeren. Elektroantennogram und Verhalten. Z. f. verg. Physiol. 54, 192-209.
- Schneider D., 1969. Insect olfaction. Deciphering system for chemical messages. Science, Vol. 163, 1031-1037.
- Schneider D., 1974. The sex-attractant receptor of moths. Scientific American. Vol. 231, No 1, 28-35.

THE DIFFERENTIATION OF CHEMICAL STIMULI IN THE RECEPTORS
OF THE AMERICAN COCKROACH (PERIPLANETA AMERICANA L.)

Summary

The aim of the study was to characterize the reaction of the receptors to chemical stimuli in American cockroach. The electrophysiological research was performed by using the electroantennogram's (EAG) registration.

In the experiments the following chemicals were applied: ethyl acetate, butyl alcohol, hexan and heptan. The experimental results were analyzed in term of the duration of the response and form of the generator potentials. A general stimulus transducer model was proposed and the possible reaction to applied stimuli was discussed.

Станислав Словиньски, Марек Тычиньски

Дифференцирование химических стимулов в рецепторах
американского таракана (Periplaneta americana L.)

Резюме

Определено некоторые характерные свойства рецепторной реакции на применяемые химические стимулы. Электрофизиологичес-

кие исследования совершено по методу записи электроантеннограммов /ЭАГ/.

Применены следующие запаховые вещества: этилацетат, бутанол, гексан и гептан. Полученные результаты были обсуждены с учетом продолжительности реакции на применяемый стимул, а также формы генерирующего потенциала.

Предложено общую модель переработки стимулов в связи с "чувствительностью" хеморецепторов, а также обсуждено возможность различных реакций на примененные стимулы.