

Magdalena Greczek-Stachura*, Ryszard Pado*

Reaktywność orzęska *Paramecium aurelia* na działanie wybranych hormonów

Streszczenie

Jednokomórkowe organizmy, szczególnie orzęski *Paramecium*, są wygodnym modelem w badaniach stanu pobudzenia komórki, gdyż wykazują charakterystyczne odpowiedzi ruchowe.

Zbadana została rola dopaminy, serotoniny i glutaminianu sodu na ruch *Paramecium aurelia*. Stwierdzono, że substancje te działają zależnie od dawki, a ich efekt był blokowany przez antagonistów poszczególnych receptorów. Uzyskane wyniki sugerują istnienie u orzęsków charakterystycznych receptorów, wskazując jednocześnie funkcję tych substancji w przekazywaniu międzykomórkowej informacji.

Wstęp

Panuje pogląd, że system międzykomórkowego przekazywania informacji u organizmów wyższych wzięł swój początek biochemiczny i funkcjonalny na poziomie jednokomórkowców i został utrwalony na drodze ewolucji. Ostatnio ukazało się wiele doniesień o obecności tych samych hormonów u kręgowców i organizmów jednokomórkowych. Uczestniczą one w przekazywaniu informacji w obrębie jednej komórki, jak i międzykomórkowo. U orzęska, *Tetrahymena pyriformis*, występuje insulina, podobna immunologicznie do tej, która u kręgow-

*Zakład Mikrobiologii Wyższej Szkoły Pedagogicznej w Krakowie

ców stymuluje metabolizm glukozy w adipocytach izolowanych ze szczurów. Ekstrakty pierwotniaków zawierają substancje przypominające ACTH (hormon adrenokortykotropowy) o wysokiej aktywności biologicznej. Stwierdzono również obecność β -endorfiny i proopiomelanokortyny (prekursora ACTH i β -endorfiny, Le Roith 1984). Obecne są również i inne biogenne aminy w komórkach pierwotniaków, jak np. katecholaminy (Janakidevi i wsp. 1966).

Interesująca wydaje się funkcja tych hormonów na tak niskim poziomie ewolucyjnym. Peptydy opioidowe hamują np. pinocytozę u *Amoeba proteus*, który to efekt był znoszony lub obniżany przez antagonistę opioidowego nalokson (Joseffsson 1979). Serotonina i katecholaminy stymulują fagocytozę u *Tetrahymena thermophila*. Procesy seksualne u orzęsków są również stymulowane przez substancje przypominające hormony kręgowców. *Blepharisma japonicum* występująca w dwóch typach koniugacyjnych (I i II), może wzajemnie koniugować wówczas, jeżeli typ II wydziela związek przypominający serotoninę (Miyake, Rivola 1987).

Istnieją dowody na to, że receptory błonowe u pierwotniaków są identyczne z analogicznymi strukturami u organizmów wyższych. Aktywacja receptorów komórkowych u pierwotniaków wiąże się ze zmianą poziomu wapnia w komórce. Elementem regulującym ten poziom są ligandy cytoplazmatyczne, jak np. kalmodulina, kwas fosfatydowy, który, mając własności jonoforu, może otwierać kanały wapniowe w błonie plazmatycznej (Kuźnicki 1989).

U pierwotniaków bodźce zewnętrzne powodują depolaryzację komórki, a to prowadzi do otwierania się kanałów wapniowych w błonie. Rezultatem tego jest wzrost stężenia wolnych jonów wapnia w cytoplazmie pierwotniaka. Następnie aktywacja kalmoduliny powoduje aktywację ATP-azy dyneinowej i kanałów potasowych zależnych od wapnia. W rezultacie tego rzęski zaczynają poruszać się szybciej i pod innym kątem niż zwykle, co określane jest jako tzw. „rewersja rzęskowa”, która umożliwi orzęskowi ucieczkę od niekorzystnych warunków środowiska. Po wypompowaniu Ca^{++} z cytoplazmy, układ powraca do stanu wyjściowego – orzęski pływają do przodu.

Metoda

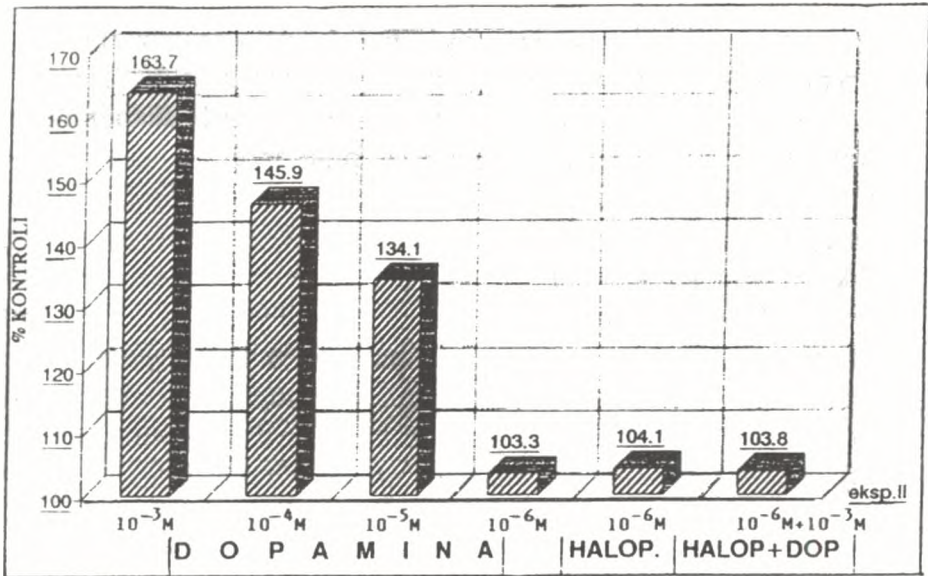
Hodowlę *Paramecium aurelia* prowadzono na pożywce sporządzonej wg przepisu Sonneborna (1950), którą szczepiono bakteriami *Enterobacter aerogenes*. Orzęski były przetrzymywane w termostacie świetlnym w cyklu dobowym 12 h D/L, w temperaturze 22°C. Hodowlę pierwotniaków zagęszczano na 24 godziny przed eksperymentem wirując (1000 obrotów na sekundę), następnie przepłukiwano buforem Tris-HCl (pH = 7.3) i pozostawiano w komorze wilgotnej w buforze do następnego dnia.

Mikropipetą przenoszono po 10 orzęsków na „szkiełko z łezką”, dodawano 20 μ l badanego roztworu i inkubowano przez 10 minut. Tak przygotowany preparat umieszczano pod mikroskopem MSt-130 połączonym z kamerą i monitorem. Na monitorze obserwowano reakcje orzęsków, typ ruchu komórek oraz dokonywano pomiaru szybkości ruchu. Wyniki były liczone testem „T-Studenta”.

Do badań wykorzystano następujące związki: Cyproheptadine-HCl (Sigma) CPH; 5-hydroxytryptamine-HCl (Sigma) 5HT; Arterenol-HCl (Sigma) Na; 5-hydroxytyramine-HCl (Sigma) Da; Apomorfine-HCl (Sigma) APG; Haloperidol (Sigma); Citalopram; Tris-(hydroxymethyl)-methylamin (Aldrich); Sodium L-glutamate (Fluka).

Wyniki

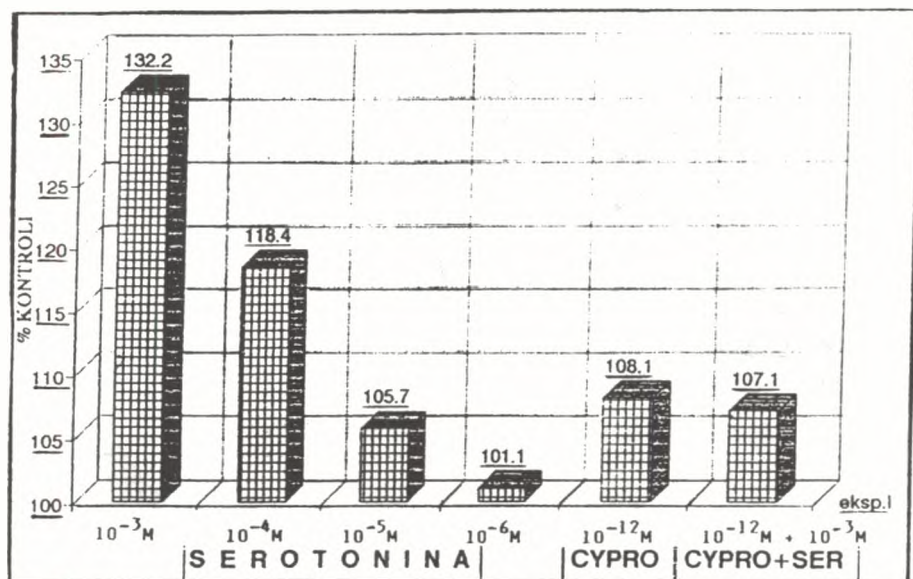
Badano wpływ dopaminy, serotoniny i glutaminianu sodu na zachowanie *Paramecium aurelia*. W komórkach orzęsków można stwierdzić obecność serotoniny i katecholamin. Interesujące wydaje się być działanie tych substancji podanych egzogennie do medium na ruch *Paramecium*. Substancje te działają zależnie od dawki, a efekt ten blokowany jest przez antagonistów poszczególnych receptorów. Dopamina w koncentracji 10^{-3} M powodowała zwiększenie szybkości ruchu orzęsków do 136% wartości kontrolnej, dopamina w stężeniu 10^{-4} M zwiększała szybkość ruchu do 146% wartości kontrolnej, a koncentracja 10^{-5} M dawała efekt wzrostu szybkości pływania do



Ryc. 1. Wpływ dopaminy i haloperidolu na prędkość pływania *Paramecium aurelia*

134% wartości kontrolnej, natomiast koncentracja dopaminy poniżej $10^{-6} M$ dawała reakcje orzęsków zbliżone do zachowań w grupie kontrolnej (ryc. 1). Haloperidol w stężeniu $10^{-6} M$ (antagonista receptora α_1 i 5HT) znosił efekt dopaminy $10^{-3} M$ (ryc. 1).

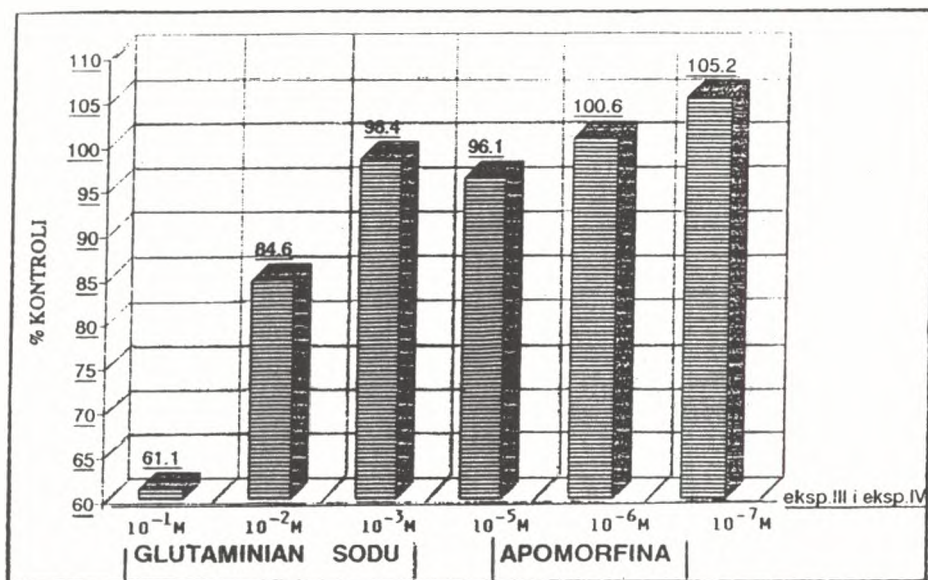
Efekt serotoniny był proporcjonalny do stężenia w medium inkubacyjnym. Serotonina w koncentracji $10^{-3} M$ powoduje wzrost szybkości ruchu orzęsków do 132% wartości kontrolnej, $10^{-4} M$ obniża szybkość pływania do 118% wartości kontrolnej, $10^{-5} M$ zwiększa jedynie bardzo nieznacznie szybkość pływania w stosunku do grupy kontrolnej osiągając 106% wartości kontrolnej. Poniżej tej koncentracji orzęski zachowywały się tak, jak w grupie kontrolnej. Efekt serotoniny był znoszony poprzez cyproheptadynę (antagonista receptora 5HT) w koncentracji $10^{-12} M$ (ryc. 2).



Ryc. 2. Wpływ serotoniny i cyproheptadyny na prędkość pływania *Paramecium aurelia*

Badano również efekt apomorfiny. Orzęski przeżywały w medium, gdzie koncentracja apomorfiny wynosiła $2 \times 10^{-4}M$, obserwowano wówczas ruch obrotowy orzęsków wokół własnych osi, ale też i pływanie po torach spiralnych. W stężeniu apomorfiny $10^{-5}M$ i niższych orzęski zachowywały się tak, jak w grupie kontrolnej (ryc. 3).

Glutaminian sodu w koncentracji $2 \times 10^{-1}M$ powodował wyraźną zmianę zachowań orzęsków. Wykazywały one zmniejszoną prędkość ruchu i bardzo silną spiralizację torów pływania. W stężeniu $10^{-2}M$ *paramecia* poruszały się z prędkością wynoszącą 84% wartości kontrolnej, a w stężeniu $10^{-3}M$ orzęski zachowywały się tak, jak w grupach kontrolnych (ryc. 3).

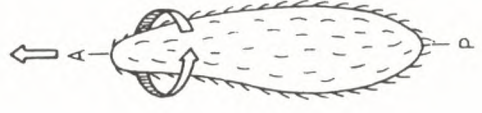
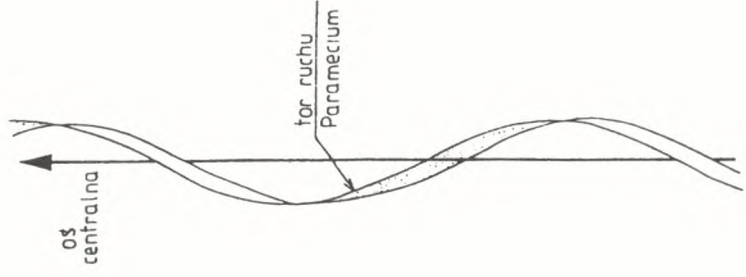


Ryc. 3. Wpływ glutaminianu sodu i apomorfiny na prędkość pływania *Paramecium aurelia*

Dyskusja

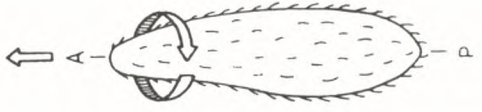
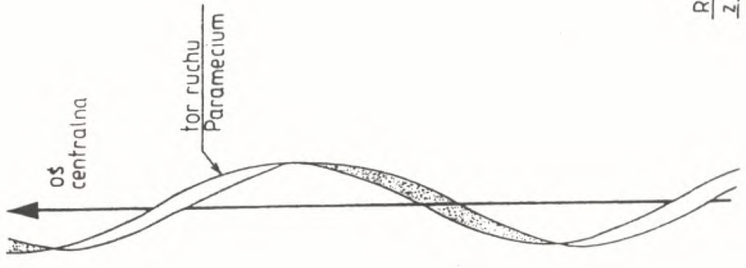
Pierwotniaki, szczególnie zaś z rodzaju *Paramecium* (orzęski), stanowią wygodny model do badań stanu pobudzenia komórki, gdyż objawiają charakterystyczne odpowiedzi ruchowe. Dryl i Grębecki (1966) wyodrębnili szereg reakcji ruchowych orzęsków (ryc. 4 i 5), stwierdzając przy tym, że depolaryzacji błony komórkowej orzęska towarzyszy rewersja rzęsek, natomiast hiperpolaryzacja przyspiesza bicie rzęsek w normalnym kierunku.

Bonini i inni (1986) stwierdzili, że substancje, które powodują wzrost cyklicznego AMP zwiększają szybkość pływania *Paramecium* do przodu 2–3-krotnie, co jest związane z hiperpolaryzacją komórki. U *Paramecium* ruch jest regulowany zarówno przez jony wapnia, jak



„FRS”

Ruch do przodu
z prawoskrętną
spiralizacją

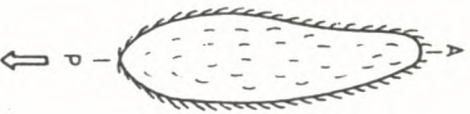


„FLS”

Ruch do przodu
z lewoskrętną
spiralizacją

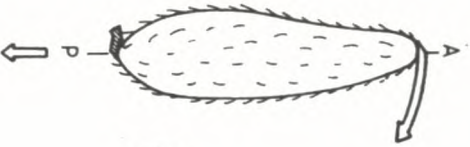
A - przód
P - tył } Paramecium

Ryc. 4



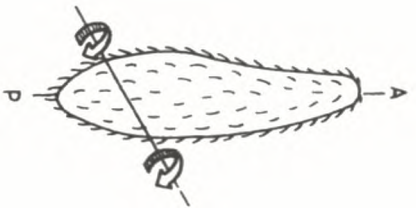
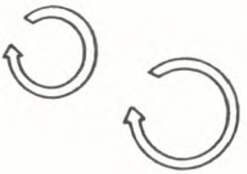
„CCR..”

Ciągłe odwrócenie
biała rzęsek



„PaCR..”

Częstotliwe odwrócenie
biała rzęsek



„PCR..”

Chwilowe odwrócenie
biała rzęsek

Ryc. 5

i przez c-AMP i może być to działanie antagonistyczne, choć nie zostało do tej pory wyjaśnione, czy należy to wiązać z tym samym miejscem w rzęście.

Stężenie wewnątrzkomórkowego wapnia jest regulowane podczas działania niektórych hormonów na receptory błonowe. Zakłada się, że pierwotny efekt katecholamin typu α , podobnie jak serotoniny jest związany z hydrolizą fosfatydoinozytoli pociągającą za sobą otwarcie kanału wapniowego. Dzięki temu jony wapnia mogą zmieniać swoje stężenie w cytoplazmie i pełniąc rolę drugiego informatora wywoływać określone reakcje w komórce (Kawiak 1985).

Badania przeprowadzone w niniejszej pracy wykazują, że endogenne substancje mają wpływ na zachowanie się orzęsków, co wiąże się ściśle ze stanem pobudzenia komórki. Może to sugerować istnienie u pierwotniaków charakterystycznych receptorów i wskazywać na funkcje tych substancji w przekazywaniu informacji.

Literatura

- Bonini N.M., Gustin M.C., Nelson L.D., 1986, *Regulation of Ciliary Motility by Membrane Potential in Paramecium: A role for Cyclic AMP*. Cell Motility and the Cytoskeleton 6: 256–272
- Csaba G., 1980, *Phylogeny and ontogeny of hormone receptors the selection theory of receptor formation and hormonal imprinting*. Biol. Rev., 55: 47–63
- Dryl S., Grębecki A., 1966, *Progress in the Study of Excitation and Response in Ciliates*. In *Protoplasma*, 225–284
- Janakidevi K., Dewey V.C., Kidder G.W., 1966, *The biosynthesis of catecholamines in two genera of Protozoa*. J. Biol. Chem. 241(11): 2576–2578
- Josefsson J.O., Johanson P., 1979, *Naloxone – reversible effect of opioids on pinocytosis in Amoeba proteus*. Nature 282: 78–80
- Le Roith D., Roth J., 1984, *Vertebrate hormones and neuropeptides in microbes: evolutionary origin of intercellular communication* In: *Frontiers in Neuroendocrinology*. Vol. 8, Edited by L. Martini and W.F. Ganong. Raven Press. New York
- Miyake A., Rivola V., 1987, *Dualism in macronuclear anlagen in Blepharisma*. Abstr. 6-th Europ. Confer. On Ciliate Biology: 10
- Kawiak J., 1985, *Podstawy cytofizjologii*. PWN, Warszawa

Kuźnicki J., 1989, *Transport i funkcje jonów wapnia u Eukariota*, w: *Fizjologia i farmakologia błony komórkowej*. Ossolineum 1989. red. B. Przewłocka, s. 103–122

Sonneborn T.M., 1950, *Methods in the general biology and genetics of Paramecium aurelia*. J. Exp. Zool, 113: 87–148

Magdalena Greczek-Stachura, Ryszard Pado

Reactivity of *Paramecium Aurelia* on the Action of Some Hormones

Summary

Unicellular organisms, particularly *Paramecium*, can be used as a model for studying physiological mechanism involved with the excitability of the living cell. The excitation phenomena in the membrane of protozoan cell is connected with the motor response of ciliary apparatus. In examining the role of serotonin, dopamine and sodium L-glutamate the cells were incubated in different concentrations of these compounds. The swimming speed and behaviour of these organisms were observed after 30 min of incubation.

The effect of these substances was dose-related and blocked by antagonists of respective receptors. The results suggest the presence of some specific receptors in *Paramecium*, and indicate the function of these hormones in the intracellular communication.