



85

25

H3189

WŁODZIMIERZ MAŚLIŃSKI

RECEPTORY CHOLINERGICZNE LIMFOCYTÓW SZCZURA

Praca doktorska wykonana  
w Zakładzie Patofizjologii  
Instytutu Reumatologicznego  
w Warszawie

Promotor: Prof. dr hab. med. Jan Ryżewski

W A R S Z A W A , 1982

<http://rcin.org.pl>



Panu prof. J. Ryżewskiemu pragnę  
podziękować za wybór tak ciekawego  
tematu, cenne wskazówki oraz  
za stworzenie sprzyjającego klimatu  
w trakcie przebiegu całej pracy.



S P I S T R E Ś C I

	Strona
I. WSTĘP .....	1
II. CEL PRACY .....	13
III. MATERIAŁY .....	14
III.1. Materiał biologiczny .....	14
III.2. Radioizotopy .....	14
III.3. Odczynniki .....	14
III.4. Wykaz stosowanych skrótów .....	15
IV. METODY .....	16
IV.1. Przygotowanie zawiesiny limfocytów ...	16
IV.2. Hodowle limfocytów .....	16
IV.3. Przyłączenie $^3\text{H}$ -Acetylocholin do limfocytów .....	17
IV.4. Oznaczanie ilości radioaktywności przyłączonej do limfocytów rozbitych cyklem zamrażania i rozmrażania .....	18
IV.5. Odpłukiwanie $^3\text{H}$ -Acetylocholin przyłączonej do limfocytów .....	19
IV.6. Przyłączanie $^3\text{H}$ -QNB do limfocytów ....	20
IV.7. Rozdział supernatantu pochodzącego z nad limfocytów inkubowanych z $^3\text{H}$ -QNB na kolumnie wypełnionej sitem molekularnym typu Sephadex G-15 .....	21
IV.7.A. Przygotowanie kolumny z podłożem Sephadex G-15 .....	21



IV.7.B.	Przygotowanie supernatantu z nad limfocytów .....	21
IV.7.C.	Elucja i detekcja nałożonego na kolumnę materiału .....	21
IV.7.D.	Oznaczanie białka metodą Lowry'ego ..	22
IV.8.	Statystyczna ocena wyników .....	23
V.	WYNIKI .....	24
V.1.	Kinetyka przyłączania acetylocholin do limfocytów .....	24
V.2.	Wpływ temperatury na przyłączanie acetylocholin do limfocytów .....	25
V.3.	Wpływ zmian stężenia acetylocholin na jej przyłączanie do limfocytów .....	25
V.4.	Odpłukiwanie acetylocholin związanej z limfocytami .....	26
V.5.	Wpływ rozbicia limfocytów na poziom związanej z nimi radioaktywności .....	27
V.6.	Przyłączanie $^3\text{H}$ -Acetylocholin do limfocytów w obecności D-Tubokuraryny i atropiny .....	28
V.7.	Kinetyka przyłączania $^3\text{H}$ -QNB do limfocytów .....	29
V.8.	Zależność poziomu wiązania $^3\text{H}$ -QNB do limfocytów do rodzaju preinkubacyjnego medium .....	30
V.9.	Wpływ składu inkubacyjnego medium na żywotność limfocytów .....	31
V.10.	Odbudowa zdolności do specyficznego wiązania $^3\text{H}$ -QNB przez limfocyty .....	32



V.11.	Obecność kompleksu $^3\text{H-QNB}$ - białko w medium inkubacyjnym .....	33
V.12.	Wpływ temperatury na poziom przy- łączenia $^3\text{H-QNB}$ do limfocytów .....	34
VI.	OMÓWIENIE WYNIKÓW I DYSKUSJA .....	35
VII.	WNIOSKI .....	45
VIII.	STRESZCZENIE .....	46
IX.	PIŚMIENNICTWO .....	49



## I . W S T Ę P

Wyniki badań ostatnich lat ponownie zwróciły uwagę na możliwość wzajemnego oddziaływania układów nerwowego i immunologicznego. Współcześnie zaznaczają się trzy, wzajemnie uzupełniające się, kierunki poszukiwań.

Pierwszy dotyczy wpływu układu nerwowego na przebieg odpowiedzi immunologicznej /1,8/. W tym celu, zazwyczaj po stymulacji elektrycznej podwzgórza, bądź po jego chirurgicznym uszkodzeniu, bada się zmiany, które zachodzą w przebiegu wywołanej reakcji immunologicznej. Korneva i Khai /45,47/ zaobserwowali, że u królików po pobudzeniu elektrycznym podwzgórza, wzrasta ponad pięciokrotnie wytwarzanie przeciwciał przeciwko podanej surowicy końskiej, podczas gdy po jego uszkodzeniu chirurgicznym dochodzi do zahamowania /Tyrey i wsp.84, Spector 75/, a nawet zaniku /Korneva i Khai 46/ tworzenia przeciwciał. Do tego kierunku poszukiwań można również zaliczyć prace o ochronnym działaniu uszkodzeń podwzgórza na przebieg wstrząsu anafilaktycznego /Szentyvanyi i wsp.80,81, Maśliński i wsp.55/.

Drugi kierunek badań obejmuje wpływ reakcji immunologicznej na pewne czynności układu nerwowego /76/. Zaobserwowano, że po obwodowym podaniu antygeny zwierzętom, wzrasta u królików aktywność neurohormonów podwzgórza /Klimenko 43, Korneva 48/. Wykryto też możliwość skorelowania zmiany poziomu serotoniny w mózgu z przebiegiem reakcji immunologicznej /Vakshina i wsp.85/.

Trzeci kierunek poszukiwań wiąże się z oddziaływaniem



neurotransmitterów na niektóre składowe elementy układu immunologicznego /36/. Do tej grupy można włączyć nie tylko doświadczenia wykazujące modulujący wpływ neurotransmiterów na przebieg reakcji immunologicznej /Ryżewski, 64/, ale także i prace dotyczące jednego z zasadniczych problemów współczesnej biochemii, a mianowicie wyjaśniania mechanizmów przekazywania informacji przesyłanej przez neurohormon do wnętrza komórki. Poszukiwana jest odpowiedź na szereg sprzężonych logicznie pytań : w jaki sposób informacja /sygnał/, którą niesie cząsteczka neurohormonu może dotrzeć do komórki dla której jest przeznaczona ; jak ma zostać przez nią właściwie odczytana ; jakimi drogami i w jaki sposób ma zostać przekazana jako cała kaskada reakcji do aparatu wykonawczego komórki.

Obecnie można, choć nie ze wszystkimi szczegółami , prześledzić poszczególne fazy tych procesów, w których przebiegu zasadniczą rolę przypisać można błonie komórkowej. Zgodnie z modelem błony komórkowej jako płynnej mozaiki, zaproponowanym przez Singera i Nicolsona /69/, białka, które obejmują od 40 do 70 % jej masy, mogą stanowić bądź jej część integralną, bądź też być zaadsorbowane na jej powierzchni. Niektóre spośród tych białek błony, które mają bezpośredni kontakt z otoczeniem komórki, ze względu na pełnioną przez nie funkcje rozpoznawania i przekazywania informacji dochodzących do komórki, zostały nazwane receptorami /41, 58/. Podstawową ich cechą jest selektywność w rozpoznawaniu właściwego nośnika informacji. Zapewnia ona komórce możliwość odbierania różnych sygnałów, które mogą sterować odmiennymi



procesami odbywającymi się w komórce /83/. Selektywność, a więc wysoką specyficzną oddziaływania receptora z odpowiednim nośnikiem informacji zapewnia, podobnie jak w przypadku enzymów, struktura trzeciorzędowa receptora /41/. Do jego "centrum akceptorowego" ,/analogia do "centrum aktywnego " enzymu/, mogą się przyłączyć jedynie te cząsteczki , które mogą się dokładnie do niego dopasować. To przyłączenie polega na wytworzeniu między ligandem a receptorem niekowalencyjnego wiązania opartego na oddziaływaniu elektrostatycznym typu wiązań wodorowych, oddziaływań hydrofobowych czy nawet angażowaniu sił van der Waals'a /choć udział tych ostatnich sił nie jest jeszcze ostatecznie rozstrzygnięty/ /6/. Wytworzenie takich wiązań w centrum akceptorowym receptora powoduje pewne zmiany jego konformacji. Te zmiany konformacyjne przyczyniają się do wytworzenia stanu określanego jako "aktywacja receptora" , i w ostatecznym efekcie prowadzą do pojawienia się odpowiedzi charakterystycznej dla tej komórki.

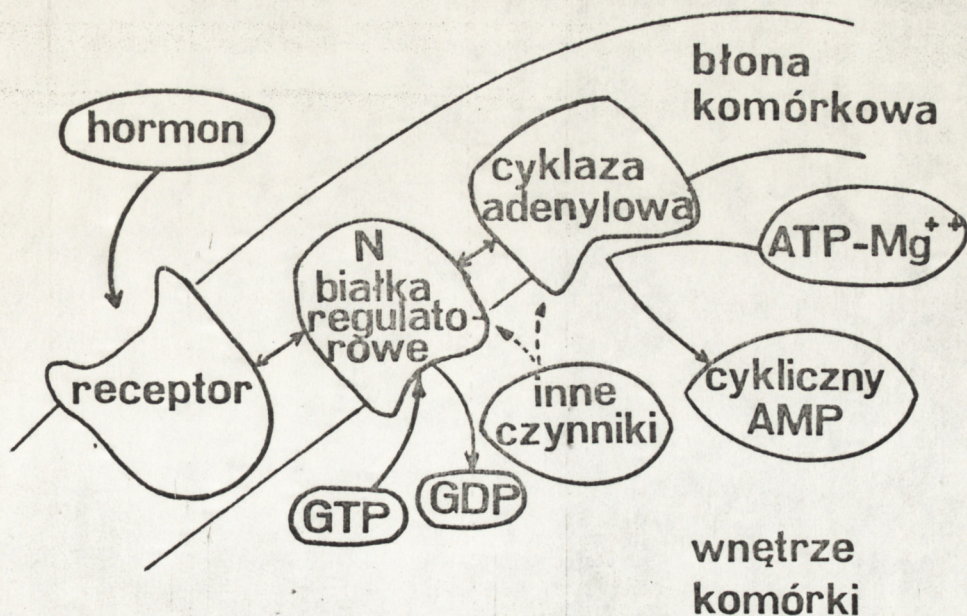
Ligandy, które po przyłączeniu się do receptora mogą indukować odpowiedź właściwą dla danej komórki, nazywane są agonistami. Istnieje jednakże grupa związków, które przy zachowaniu analogii do enzymów- pełnią rolę specyficznych inhibitorów receptorów komórkowych. Nie są one w stanie dokładnie dopasować się do centrum akceptorowego, nie mogą więc aktywować receptora ; mogą jednak łączyć się bardziej, lub mniej specyficznym z którymś z fragmentów receptora. Powoduje to przestrzenne zablokowanie dostępu do centrum akceptorowego, a tym samym częściową, lub całkowitą dezaktywację receptora /38/. Związki takie, nazywane antagonistami, lub inhibitorami receptorów, mogą być bardzo użyteczne w ba-



daniu obecności receptorów i ich bliższej charakterystyce. Wiązanie się antagonistów z receptorem jest zazwyczaj wystarczająco trwałe, aby w przypadku użycia radioaktywnego antagonisty, można było otrzymać kompleks: receptor - antagonistę nie tylko oznaczyć ilościowo, lecz nawet wyizolować i oczyścić. Obserwowany poziom przyłączenia antagonistów do receptorów i jego zależność od warunków zewnętrznych: temperatury, stężenia agonisty, stężenia antagonisty, obecności czynników modulujących przyłączanie etc. umożliwia scharakteryzowanie receptora. Opracowane zostały odpowiednie metody umożliwiające analizę i interpretację otrzymanych wyników /14,65/.

Po aktywacji receptora w wyniku przyłączenia antagonisty, dalsze procesy przekazywania informacji do wnętrza komórki bywają dość różnorodne i zazwyczaj zależą od typu receptorów. Niektóre receptory - przedstawione w Tabeli 1 - wykorzystują w tym celu cyklazę adenylową.

Proces ten został przedstawiony schematycznie na rys. 1.





Po aktywacji receptor reaguje z białkiem regulatorowym nukleotydów guaninowych /N/, które z kolei wiąże kwas guanozynotrójfosforowy /GTP/. Powstały kompleks GTP-białko regulatorowe oddziałuje dwukierunkowo. Z jednej strony aktywuje cyklazę adenylową, z drugiej zaś zmniejsza powinowactwo hormonu do receptora. Inne czynniki, takie jak jony  $Ca^{2+}$  czy  $Mg^{2+}$  są również niezbędne do aktywacji cyklazy adenylowej./6/. Cyklaza, po jej zaktywowaniu, pobudza przekształcenie kwasu adenozyotrójfosforowego /ATP/ do cyklicznego kwasu 3',5'-adenozyojednofosforowego /cAMP/. Zmiany stężenia cAMP, pełniącego funkcje "drugiego przekaźnika" informacji /second messenger/, uruchamiają łańcuch reakcji aktywujących kolejne enzymy - kinazy białkowe, prowadząc w konsekwencji do wytworzenia końcowego efektu różnego nie tylko przy różnych typach komórek, ale i przy różnych typach receptorów /53/.

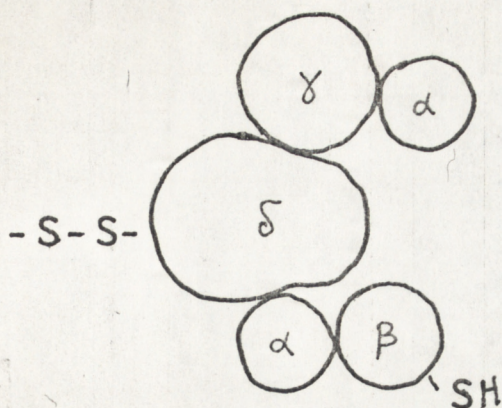
Są również typy receptorów, które nie wykorzystują cyklazy adenylowej do przekazania informacji /Tabela 1/. W większości tych przypadków, sekwencje zdarzeń zachodzących po przyłączeniu ligandu do receptora nie są w pełni wyjaśnione.

Jednym z lepiej poznanych receptorów, który nie wykorzystuje cAMP jako "drugiego przekaźnika" informacji, jest cholinergiczny receptor nikotynowy /63/. Badania, dzięki którym poznano mechanizm jego działania /52/, budowę /17,39,72/, a nawet zrekonstruowano aktywny receptor /3,40,88/ zostały przeprowadzone przede wszystkim na receptorach pochodzących z węgorzy elektrycznych, których błony organów elektrycznych zawierają duże skupiska tych receptorów. Receptor taki jest



Ligandy stymulujące cyklazę adenylową	Ligandy nie stymulujące cyklazy adenylowej
<p>hormon adrenokortykotropowy /ACTH/  kalcytonina  Katecholaminy / adrenergiczne/  gonadotropina łożyskowa  hormon folikulotropowy /FSH/  glukagon  hormon luteinizujący /LH/  hormon uwalniający hormon luteinizujący /LH-RH/  hormon lipotropowy /lipotropina/  hormon melanotropowy /MSH/  "nerve-growth factor"  parathormon /PTH/  prostaglandyna E<sub>1</sub>  hormon uwalniający hormon tyreotropowy /TRH/  hormon tyreotropowy/TSH/  wazopresyna</p>	<p>acetylocholina  angiotensyna  katecholaminy / adrenergiczne/  laktogeny łożyskowe  "epidermal-growth factor"  "fibroblast-growth factor"  hormon wzrostu /GH/  insulina  "insulin-like growth factor"  oksytocyna  prolaktyna  prostaglandyna F<sub>2</sub>  somatomedyna  somatostatyna</p>





Rys. 2 Struktura receptora nikotynowego wg Hucho /39/.

zbudowany /Rys.2/ z pięciu polipeptydowych podjednostek o masach cząsteczkowych odpowiednio 38 /  $\alpha$  /, 50 /  $\beta$  /, 58 /,  $\gamma$  / i 64 /  $\delta$  / kilodaltonów /50,60,61/, z których podjednostka  $\alpha$  występuje dwukrotnie. W tej też podjednostce znajduje się centrum akceptorowe receptora. Cały receptor jest zawieszony w błonie komórkowej poprzecznie, co zapewnia mu równoczesne połączenie z częścią wewnętrzną, jak i zewnętrzną komórki /16/. Giraudat i wsp. /24/ postulują, że w chwili aktywacji receptora, zmiany konformacji podjednostki  $\alpha$  powodują rozluźnienie połączeń między podjednostkami, co wywołuje powstanie między nimi szczeliny łączącej otoczenie komórki z jej wnętrzem. Tak powstały kanał jonowy, o wielkości wystarczającej do swobodnego przepływu małych jonów : $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ , otwiera się po jednokrotnej stymulacji acetylocholiną na 1-3 msek , co umożliwia przepływ  $10^4$  jonów sodu ; liczbę wystarczającą do depolaryzacji błony komórkowej /12,16/, Równocześnie z badaniami wyjaśniającymi budowę i mechanizm działania receptora



nikotynowego, przeprowadzono rekonstrukcję aktywnego receptora. Okazało się bowiem, że receptor nikotynowy wyizolowany z błon organów elektrycznych węgorza- torpedo californica- po wbudowaniu go do liposomów, odpowiada na stymulację cholinergiczną wzrostem przepływu jonów sodu /Anholt,4/.

Podobnie jak nikotynowe, również receptory muskarynowe /63/, nie wykorzystują cyklicznego AMP do przekazywania informacji. Receptory te znajdują się zarówno w ośrodkowym jak i obwodowym układzie nerwowym /2/, w komórkach mięśniowych jelit, serca oraz w komórkach sekrecyjnych trzustki/37/. Mogą one być specyficznym blokowane przez muskarynę i atropinę. Do tej pory, mimo przeprowadzanych prób /73/ nie tylko nie zdołano zrekonstruować tego receptora w formie aktywnej, ale mimo wykluczenia udziału cykazy adenylowej, nie zbliżono się zbytnio do wyjaśnienia mechanizmu, który bierze udział w przekazywaniu informacji od podrażnianego receptora do wnętrza komórki /42/. Na podstawie szeregu obserwacji Kuo i Greengard /49/ przedstawili hipotezę, według której - przez analogię do cykazy adenylowej- receptor muskarynowy ma być sprzężony z błonową cyklazą guanylową, która katalizuje tworzenie cyklicznego kwasu guanozynojednofosforowego cGMP/, pełniącego w tym układzie funkcję "drugiego przekaźnika" informacji. Za hipotezą tą przemawia zarówno wzrost wewnątrzkomórkowego poziomu cGMP po pobudzeniu cholinergicznym /23/, jak i obecność białkowej kinazy zależnej od cGMP /49/. Poważną luką w spójności tej hipotezy jest niemożliwość, jak dotychczas, przeprowadzenia aktywacji cykazy guanylowej w układzie bezkomórkowym /6/. Brak takiej aktywacji może świadczyć o tym, że do pobudzenia cykazy



guanylowej niezbędna jest obecność nieznanych dotychczas czynników. Jednym z nich może być, jak postuluje Sokolovsky /73/ zmiana stężeń jonów  $\text{Ca}^{2+}$  czy  $\text{Mg}^{2+}$ . Rozważa się także możliwość występowania sprzężonego z receptorami muskarynowymi wapniowego kanału jonowego /73/. Lecz i w tym przypadku nie można jeszcze ocenić, czy obserwowane zmiany stężenia jonów  $\text{Ca}^{2+}$  po drażnieniu receptorów muskarynowych są bezpośrednio związane z receptorem muskarynowym, czy też stanowią końcowy efekt uruchomienia nieznanych do tej pory mechanizmów aktywujących. Z receptorami muskarynowymi wiąże się również, niewyjaśnione do dziś, zjawisko zmiany wrażliwości na ligand. Badając centra aktywne tych receptorów zaobserwowano, że w zależności od zewnętrznych warunków badania, powinowactwo do agonistów muskarynowych może być zarówno wysokie jak i niskie. W obecności GTP lub jego trwałych analogów, centra o wysokim powinowactwie do agonistów przekształcają się w centra o niskim powinowactwie /74/. Podobny efekt był obserwowany po podniesieniu temperatury inkubacji /28/. Można również przekształcić centra o niskim powinowactwie w centra o wysokim powinowactwie; wymaga to obecności jonów  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$  lub  $\text{Ni}^{2+}$  /29/. Przypuszcza się, /73/, że przekształcenia te są wyrazem automodulacji wrażliwości receptorów na pojawiający się sygnał, co może, w konsekwencji, zmieniać skalę zmian wywołanych przez neurotransmitter. Inną możliwością regulacji wrażliwości komórek na pojawiający się neurohormon jest zmiana liczby receptorów muskarynowych eksponowanych na błonie komórkowej /10,11,68/. Barlow i wsp./5/ przypuszczają, że różnorodność obserwowanych zmian powinowactwa receptorów muskarynowych do agonistów



i antagonistów , a także zmiany ilości tych receptorów można wytłumaczyć występowaniem trzech , różniących się farmakologicznie typów receptorów muskarynowych.

Jak wynika z przedstawionych danych istnieje szereg bardziej lub mniej poznanych mechanizmów umożliwiających przekazywanie sygnałów przenoszonych przez niewielkie cząsteczki neurotransmiterów do wykonawczych komórek docelowych. Podejrzewając istnienie określonych mechanizmów, oraz stosując odpowiednie metody badania receptorów, próbowano sprawdzić czy na komórkach należących do układu immunologicznego można wykryć receptory specyficzne dla neurotransmiterów i czy w przypadku ich obecności zachowują one właściwości charakterystyczne dla danego typu receptorów, oraz, co najważniejsze, czy uczestniczą one aktywnie w procesie przekazywania informacji do wnętrza komórki.

Stwierdzono między innymi, że zarówno na limfocytach, jak i na makrofagach /9/ znajdują się receptory  $\beta$ -adrenergiczne sprzężone z cyklazą adenylową, a więc wykorzystujące cAMP jako "drugi przekaźnik" przekazywania sygnału /86/. Ten sam mechanizm uczestniczy w przekazywaniu podrażnienia przez znajdujące się na limfocytach specyficzne dla histaminy receptory H-2 /59/. Zaobserwowano ponadto, że limfocyty mogą, w pewnym zakresie, regulować odpowiedź na stymulację  $\beta$ -adrenergiczną. Okazało się, że w przeciwieństwie do limfocytów T, które posiadają na swojej powierzchni aktywny receptor  $\beta$ -adrenergiczny i to zarówno w fazie różnicowania komórkowego, jak i w wieku dojrzałym /70,71/, na limfocytach B aktywne receptory  $\beta$ -adrenergiczne pojawiają się jedynie wówczas, gdy komórki te aktywnie produkują przeciwciała /56,67/.



W ciągu ostatnich 10 lat stwierdzono, że podobnie jak tante aminy, acetylocholina - jeden z podstawowych neurotransmiterów - może zmieniać reaktywność limfocytów. Już w 1972 r. Strom i wsp. /77,78,79/ zaobserwowali, że acetylocholina podwyższa cytotoksyczność limfocytów T. Dokładny mechanizm tego pobudzenia nie jest znany. Po stwierdzeniu wzrostu poziomu cGMP w limfocytach poddanych działaniu acetylocholiny /25/, sugerowano **możliwość** udziału cykazy guanylowej /30-33/. Nie ma jednak, do chwili obecnej, wystarczających dowodów na przyjęcie tego mechanizmu, chociaż nie ulega wątpliwości, że wszelkie zmiany wewnątrzkomórkowe, niezależnie od tego, czy spowodowane pośrednio przez cGMP, czy też w inny, nieznanym jeszcze sposób, wywołane zostały przez acetylocholinę, i że acetylocholina jest silnym modulatorem aktywności limfocytów. Pod jej wpływem następuje bowiem w limfocytach znaczny wzrost syntezy RNA oraz białka / 30-33,87/. Limfocyty stymulowane mitogenami roślinnymi /np. fitohemaglutyniną-PHA/ zwiększają pod wpływem acetylocholiny wbudowywanie radioaktywnej tymidyny do DNA /33/. Działanie to zaznacza się szczególnie wyraźnie, gdy mitogeny stosuje się w dawkach suboptymalnych /Grąbczewska i wsp./27/. Acetylocholina wywiera stymulujące działanie na tworzenie rozetek E /20/, i produkcji PFC /Plaque forming cells/, /86/. Acetylocholina może też zmieniać ruchliwość /motility/ limfocytów B, a efekt ten **znosi** całkowicie atropina- specyficzny bloker receptorów muskarynowych /Schreiner i wsp.66/.

Różnorodność zmian wywoływanych przez acetylocholinę na limfocytach sugeruje, że mogą na nich się znajdować specyficzne dla acetylocholiny receptory /19/. Sugestia ta skłó-



niła Gordona i wsp./26/ do poszukiwania na limfocytach ludzkich receptorów cholinergiczných typu muskarynowego. W badaniach tych autorzy wykorzystali specyficzny bloker receptorów muskarynowych - benzylian 3-chinuklidylu /QNB/ - stosunkowo niedawno wprowadzony przez Yamamura /90/ do badania receptorów muskarynowych w mózgu. Związek ten ze względu na wysoką specyficzność łączenia się z receptorami muskarynowymi oraz relatywnie dużą trwałość powstałego kompleksu jest obecnie powszechnie używany w badaniach receptora cholinergicznego. Badania Gordona i wsp./26/ doprowadziły do odkrycia receptorów muskarynowych na limfocytach ludzkich, nie dostarczyły jednak danych niezbędnych dla pełnego opisu tych receptorów. Nie można bowiem wykluczyć istnienia na limfocytach receptorów cholinergiczných typu nikotynowego. Możliwość taka została zasygnalizowana przez Richman'a i wsp./62/ w odniesieniu do limfocytów myszy. Autorzy ci na podstawie badań wykonanych na hodowlach limfocytów sugerowali istnienie trzech typów receptorów cholinergiczných, z których jeden miał być farmakologicznie zbliżony do receptora nikotynowego.



## II . C E L P R A C Y

Przedstawione dane i obserwacje wskazują na duże znaczenie ,jakie ze względów poznawczych i praktycznych mogą mieć dane o bezpośrednim oddziaływaniu układu nerwowego na układ immunologiczny. Fragmentarycznie jedynie poznane elementy oraz luki w naszej wiedzy w tej dziedzinie skłaniają do podjęcia dalszych badań, celem których ma być pełniejsze poznanie praw rządzących obecnością i zachowaniem się receptorów dla neurohormonów znajdujących się na powierzchni limfocytów.

Celem niniejszej pracy było zbadanie obecności i przedstawienie danych o receptorach cholinergicznym typu nikotynowego i muskarynowego na limfocytach szczura.

Dla wykonania tego należało dokonać wyboru i przystosować do naszych warunków laboratoryjnych jedną z metod stosowanych do identyfikacji i badania powierzchniowych receptorów tkankowych.



### III. M A T E R I A Ł Y

#### III.1. MATERIAŁ BIOLOGICZNY

Badania wykonano na 3-4 miesięcznych szczurach obu płci szczepu wsobnego Wistar hodowanych w Zwierzętarńi Zakładu Patofizjologii Instytutu Reumatologicznego w Warszawie. Od zwierząt tych pobierano węzły chłonne podszczękowe, pachowe, pachwinowe, podkolanowe, kręzkowe, i po rozczesaniu otrzymywano z nich zawiesinę limfocytów.

#### III.2. RADIOIZOTOPY

$^3\text{H}$ -Acetylocholina, chlorek, akt.wł.100 mCi/mM oraz  $^3\text{H}$ -Benzylan 3-chinuklidylu, / $^3\text{H}$ -QNB/, akt.wł.5 Ci/mM pochodziły z The Radiochemical Centre, Amersham, Anglia.

#### III.3. ODCZYNNIKI

<u>Nazwa odczynnika</u>	<u>Produkcja</u>
Acetylocholina	VEB Berlin Chemie, NRD
Atropina, siarczan	Calbiochem, USA
Błękit trypanu	Michrome, Edward Gurr, Węgry
Dioksan	POCh
Eter do narkozy	Zakłady Tworzyw Sztucznych w Pionkach
Fizostygmina	Calbiochem, USA
Glikol etylenowy	POCh
Glutamina	Reanal, Węgry
Kanamycyna, siarczan	Calbiochem, USA
Naftalen	POCh



NCS	Nuclear Chicago, USA
PBS	Wytwórnia Surowic i Szczepionek Lublin
Podłoże Eagle'a	Wytwórnia Surowic i Szczepionek, Lublin
Podłoże Parker 199	Wytwórnia Surowic i Szczepionek, Lublin
POPOP	Fluka ,Szwajcaria
PPO	Hopkin Williams, Anglia
Saponina	Calbiochem, USA
Sephadex G-15	Pharmacia Fine Chemicals, Szwecja
Toluen	POCh
Tubokuraryna	Orion ,Finlandia

#### III.4. WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

ACh	- acetylocholina
cAMP	- cykliczny kwas adenozyjnofosforowy
cGMP	- cykliczny kwas guanozyjnofosforowy
DNA	- kwas dezoksyrybonukleinowy
RNA	- kwas rybonukleinowy
MEM	- podłoże Eagle'a 1959
NCS	- rozpuszczalnik tkanek firmy Nuclear Chicago, USA
PBS	- zbuforowany roztwór soli fizjologicznej
PHA	- fitohemaglutynina
POCh	- Polskie Odczynniki Chemiczne
POPOP	- 1,4-bis/5-fenylo-2-oksazolylo/-benzol
PPO	- 2,5 dwufenylookszol
QNB	- benzylan 3-chinuklidylu, /quinuclidinyl benzilate/
cpm-	- counts per minute /liczba impulsów na minutę/



#### IV. METODY

##### IV.1. PRZYGOTOWANIE ZAWIESINY LIMFOCYTÓW

3-4 miesięczne szczury obojga płci szczepu wsobnego Wistar skrwawiano w narkozie eterowej i w warunkach jałowych pobierano węzły chłonne podszczękowe, pachowe, pachwinowe, i krezkowe do umieszczonej na lodzie płytki Petri'ego z podłożem Parker 199. Po przepłukaniu, węzły rozczesywano w tym samym płynie igłami preparacyjnymi. Otrzymaną zawiesinę limfocytów sączono przez gazę młyńską aby pozbyć się nierozczesanych fragmentów tkanki łącznej. Jednorodną zawiesinę przenoszono do próbki wirowniczej i wirowano ją przez 10 min przy 2000 g. Po odwirowaniu usuwano supernatant znad osadu limfocytów i komórki zawieszano w określonej objętości pożywki. Liczono całkowitą liczbę komórek żywych w zawiesinie, używając świeżo sporządzonego 0,2% roztworu błękitu trypanu w PBS. Komórki liczone w kamerze Bürkera. Komórki żywe pozostają niezabarwione, a komórki martwe barwią się na niebiesko. Najczęściej od jednego szczura otrzymywano około  $2 \times 10^8$  komórek w 1 ml Płynu Parker 199. Następnie do peletki komórek dodawano taką objętość pożywki, aby końcowe stężenie komórek wynosiło  $2 \times 10^7$  w 1 ml płynu Parker 199.

##### IV.2. HODOWLE LIMFOCYTÓW

Limfocyty przygotowane w sposób opisany w punkcie IV.1. zawieszano w podłożu hodowlanym tak, aby końcowa gęstość komórek żywych wynosiła  $3 \times 10^6$  w 1 ml podłoża. Hodowle zawierające 2 ml zawiesiny komórek prowadzono w probówkach szklanych, zamkniętych korkami z waty, w inkubatorze Assab zapew-



niającym temperaturę  $37^{\circ}\text{C}$ ,  $5\%$   $\text{CO}_2$  oraz  $100\%$  wilgotności. Czas trwania hodowli wynosił do 48 godzin.

Po czasie określonym warunkami konkretnego doświadczenia pobierano próbkę zawiesiny limfocytów w celu zbadania ich żywotności metodą opisaną w p.IV.1 przy użyciu błękitu trypanu. Pozostałą część zawiesiny wirowano przez 10 min przy 2000 g. Po odwirowaniu supernatant odrzucano, zaś peletkę komórek zawieszano w 200  $\mu\text{l}$  płynu hodowlanego Parker 199 i inkubowano w inkubatorze Assab przez 15 min. W zawieszynie tak otrzymanych limfocytów oznaczano występowanie powierzchniowych receptorów zgodnie z p.IV.3 lub IV.6.

Do hodowli używano następujących płynów hodowlanych :

Parker 199, Parker 199 + 20% surowicy cielęcej + 10% glutaminy, MEM, MEM + 20% surowicy cielęcej + 10% glutaminy, PBS.

Do wszystkich płynów hodowlanych dodawano antybiotyki - siarczany Kanamycyny w ilości 3 mg na 100 ml płynu.

#### IV.3. PRZYŁĄCZANIE $^3\text{H}$ -ACETYLOCHOLINY / $^3\text{H}$ -ACh/ DO LIMFOCYTÓW

Próbki zawierające zawiesinę  $6-20 \times 10^6$  limfocytów w 200  $\mu\text{l}$  płynu hodowlanego Parker 199 w szklanych probówkach hodowlanych umieszczano na 15 min w inkubatorze Assab. Po tym czasie do każdej próbki dodawano 20  $\mu\text{l}$   $10^{-5}$  acetylocholinę zawierającej  $^3\text{H}$ -ACh / $10^{-11}\text{M}$ , 0,1  $\mu\text{Ci}$ / i przedłużano inkubację. Przyłączanie ACh przerywano przez dodanie do każdej próbki 2 ml zimnego / $4^{\circ}\text{C}$ / płynu hodowlanego i natychmiastowe wirowanie /2 min, 4000 g., temperatura pokojowa/. Supernatant odrzucano a otrzymany osad komórek zawieszano w 200  $\mu\text{l}$  0.1% roztworu wodnego saponiny. Całość ilościowo przenoszono do naczyń scyntylacyjnych. Do każdego naczynia dodawano 1 ml



rozpuszczalnika tkanek- NCS- i po dokładnym zamknięciu ogrzewano przez 18 godzin w temperaturze  $37^{\circ}\text{C}$ . Po tym czasie do każdej próbki dodawano 10 ml scyntylatora toluenowego o składzie:

0,1 g POPOP i 5g PPO w 1 litrze toluenu.

Radioaktywność próbek mierzono metodą płynnej scyntylacji w liczniku typu Mark II Nuclear Chicago, i wyrażano liczbą impulsów na minutę /cpm/.

W przypadku używania antagonistów cholinergicznym dodawano je na 10 min przed dodaniem izotopu w objętości 20  $\mu\text{l}$ . Używano następujących stężeń antagonistów cholinergicznym : atropina-  $10^{-2}\text{M}$ ,  $10^{-4}\text{M}$  ; tubokuraryna -  $10^{-4}\text{M}$  .

Do równoległych próbek stanowiących poziom przyłączenia bez antagonistów cholinergicznym dodawano w tym samym czasie 20  $\mu\text{l}$  wody.

#### IV.4. OZNACZANIE ILOŚCI RADIOAKTYWNOŚCI PRZYŁĄCZONEJ DO LIMFOCYTÓW ROZBITYCH CYKLEM ZAMRAŻANIA I ROZMRAŻANIA.

Próbki zawierające  $200 \times 10^6$  limfocytów w 2 ml płynu Parker 199, umieszczono w inkubatorze Assab na 30 min , a następnie do każdej próbki dodawano 200  $\mu\text{l}$   $10^{-5}\text{M}$  acetylocholino zawierającej  $^3\text{H-ACh}$  / $10^{-10}\text{M}$ , 1  $\mu\text{Ci}$ / i inkubację przedłużano o dalsze 2 godziny. Po tym czasie próbki wirowano przez 10 min , 2000 g. , w temperaturze pokojowej. Supernatant odrzucano, a pozostały w każdej próbce osad limfocytów zawieszano w 2 ml płynu Parker 199, Wszystkie próbki dzielono na dwie grupy. Pierwszą z nich poddawano 3 krotnemu cyklowi zamrażania w temp.  $-78^{\circ}\text{C}$  i rozmrażania w temp.  $24^{\circ}\text{C}$ . Druga grupa stanowiła kontrolę i przez cały czas była prze-



trzymywana w temp.  $24^{\circ}\text{C}$ . Po zakończeniu 3 krotnego cyklu zamrażania i rozmrażania limfocytów zawartych w pierwszej grupie próbek, z każdej próbki pobierano 100  $\mu\text{l}$  otrzymanej zawiesiny w celu pomiaru żywotności limfocytów metodą opisaną w punkcie IV.1. Resztę wirowano przez 10 min, 2000 g., w temp.  $4^{\circ}\text{C}$ . Supernatanty odrzucano, zaś do osadów dodawano 200  $\mu\text{l}$ , 0.1% roztworu saponiny. Otrzymaną w ten sposób zawiesinę rozbitych lub całych / w przypadku kontroli/ limfocytów przenoszono ilościowo do naczynek scyntylacyjnych, a następnie w celu pomiaru radioaktywności zawartej w osadzie, postępowano z nimi zgodnie ze schematem podanym w p. IV.3.

#### IV.5. ODPLUKIWANIE $^3\text{H}$ -ACETYLOCHOLINY PRZYŁĄCZONEJ DO LIMFOCYTÓW .

Próbki zawierające  $2 \times 10^7$  limfocytów w 200  $\mu\text{l}$  płynu Parker 199 umieszczano na 30 min w inkubatorze Assab, a następnie do każdej probówki dodawano 20  $\mu\text{l}$   $10^{-5}$  M acetylocholinę zawierającą  $^3\text{H}$ -ACh / $10^{-11}$  M, 0,1  $\mu\text{Ci}$ / i inkubację przedłużano o dalsze 2 godziny. Po tym czasie próbki wirowano przez 10 min, 2000 g. w temp.  $24^{\circ}\text{C}$ . Supernatant odrzucano, a pozostały w każdej probówce osad limfocytów zawieszano w 400  $\mu\text{l}$  płynu Parker 199 i całość ponownie umieszczano w inkubatorze Assab. W określonych odstępach czasowych / 5, 10, 15, 30, 50 min/ poszczególne grupy próbek wyjmowano z inkubatora, do każdej probówki dodawano 2 ml zimnego / $4^{\circ}\text{C}$ / płynu Parker 199 i natychmiast wirowano 2 min, 2000 g., w temp. pokojowej. Dalszy sposób postępowania w celu oznaczenia ilości radioaktywności związanej z osadem jak w p. IV.3.



#### IV.6. PRZYŁĄCZANIE $^3\text{H}$ -QNB DO LIMFOCYTÓW .

Próbki zawierające  $5 \times 10^6$  limfocytów w 200  $\mu\text{l}$  płynu Parker 199 umieszczano w inkubatorze Assab na 15 min, a następnie do części próbek stanowiących kontrolę poziomu niespecyficznego wiązania się  $^3\text{H}$ -QNB z limfocytami, dodawano 20  $\mu\text{l}$   $10^{-3}$  M atropiny, a do pozostałych - 20  $\mu\text{l}$  wody. Tak otrzymane zawiesiny limfocytów inkubowano przez następne 10 min w inkubatorze Assab, a następnie do wszystkich próbek dodawano 20  $\mu\text{l}$   $^3\text{H}$ -QNB / $10^{-9}$  M, 0,1  $\mu\text{Ci}$ /. W określonych odstępach czasowych /1, 3, 5, 10, 15, 30, 60, 90, 120 min/ wyjmowano z inkubatora grupy próbek zawierających kontrolę oraz próbki badane, do wszystkich dodawano 2 ml zimnego / $4^\circ\text{C}$ / płynu Parker 199 i natychmiast po tym próbki wirowano przez 2 min, 2000 g,  $24^\circ\text{C}$ , a otrzymane osady limfocytów poddawano cyklowi operacji opisanych w p. IV.3 w celu pomiaru przyłączonej do nich radioaktywności.

Po otrzymaniu krzywej kinetyki przyłączania  $^3\text{H}$ -QNB do limfocytów /krzywa prezentowana w p. V.7./, we wszystkich następnie przeprowadzanych doświadczeniach z tym radioligandem stosowano 5 min czas inkubacji limfocytów z  $^3\text{H}$ -QNB. Jest to czas umożliwiający pomiar maksymalnego poziomu przyłączenia tego ligandu do limfocytów.

Poziom wiązania specyficznego  $^3\text{H}$ -QNB do limfocytów obliczano wg. wzoru :

$$S_b = T_b - N_b$$

gdzie:

$S_b$  - Wiązanie specyficzne

$T_b$  - Wiązanie całkowite

$N_b$  - Wiązanie niespecyficzne /w obecności atropiny/



IV.6. ROZDZIAŁ SUPERNATANTU POCHODZĄCEGO ZNAD LIMFOCYTÓW  
INKUBOWANYCH Z  $^3\text{H-QNB}$  NA KOLUMNIE WYPEŁNIONEJ SITEM  
MOLEKULARNYM TYPU SEPHADEX G-15 .

A. Przygotowanie kolumny z podłożem Sephadex G-15.

20 g podłoża Sephadex G-15 zawieszono w 200  $\mu\text{l}$  wody destylowanej i pozostawiono na noc do napęcznienia w temp. pokojowej. Otrzymaną zawiesinę przemyto 2x200 ml wody destylowanej i odgazowano zgodnie z zaleceniem producenta, a następnie upakowano kolumnę 1,2 x 40 cm. Kolumnę umieszczono w chłodni /4°C/ i zrównoważono przez przemycie 500 ml PBS. Kolumna była gotowa do wykonywania rozdzielów.

B. Przygotowanie supernatantu znad limfocytów.

250 mln limfocytów umieszczono w 2 ml PBS i po 15 min inkubacji w inkubatorze Assab dodano 200  $\mu\text{l}$  roztworu  $^3\text{H-QNB}$  / $10^{-9}\text{M}$ , 4  $\mu\text{Ci}$ /. Inkubację przedłużono o dalsze 3 godziny. Po tym czasie próbkę zawierającą limfocyty wirowano przez 10 min, 3000 g., w temp. pokojowej, a otrzymany supernatant po oziębieniu do 4°C nakładano na kolumnę z podłożem Sephadex G-15 przygotowaną jak opisano w p. IV.6.A.

C. Elucja i detekcja nałożonego na kolumnę materiału.

Jako eluent stosowano PBS. Przy szybkości przepływu 1 ml/ 5 min zbierano frakcje po 500  $\mu\text{l}$ , z których pobierano próbki 200  $\mu\text{l}$  do oznaczania zawartej w nich radioaktywności. Próbki te przenoszono do naczyń scyntylicyjnych zawierających 10 ml scyntyлятора Bray'a o składzie :  
4 g PPO, 200 g POPOP, 60 g naftalenu, 100 ml alkoholu metylowego, 20 ml glikolu etylenowego, a całość uzupełniano dioksanem do objętości 1000 ml.

Naczynia scyntylicyjne przenoszono do licznika scyntylicyjacji



ciekłej typu Mark II, i mierzono zawartą w nich radioaktywność.

Z pozostałych 300  $\mu$ l eluatu pobierano 200  $\mu$ l do oznaczania zawartego w nich białka metodą Lowry'ego /51/.

D. Oznaczanie białka metodą Lowry'ego /51/.

a/ przygotowanie odczynników

1. Rozcieńczony odczynnik Folin'a- Ciocalteu

Odczynnik miareczkowano mianowanym 1N NaOH w obecności fenoloftaleiny, tak, aby kwasowość roztworu była równoważna 1N kwasowi /około 2-krotne rozcieńczenie/.

2. 2% roztwór  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  w 0.1N NaOH

3. 0,5% roztwór  $\text{CuSO}_4$  w 1% cytrynianie sodowym

4. Zasadowy roztwór siarczanu miedzi

Bezpośrednio przed użyciem zmieszano 100 ml odczynnika

2. z 2 ml odczynnika 3.

5. Wzorcowe roztwory białkowe.

50 mg krystalicznej albuminy surowiczej rozpuszczano w 100 ml wody destylowanej i rozcieńczano tak, aby otrzymać roztwory o następujących stężeniach : 500  $\mu$ g/ml, 400  $\mu$ g/ml, 100  $\mu$ g/ml, 40  $\mu$ g/ml.

b/ wyznaczenie krzywej wzorcowej

Przygotowano 11 suchych i ponumerowanych probówek. Do probówki 1 dodano 1 ml  $\text{H}_2\text{O}$  /ślepa odczynnikowa/, a do probówek 2-11/po dwa powtórzenia na próbę/ po 1 ml roztworów wzorcowych białka. Następnie do wszystkich probówek dodawano po 5 ml odczynnika 4 i zawartość mieszano. Po 10 min dodawano 0,5 ml odczynnika 1, energicznie mieszano i po 30 min mierzono absorbcję światła przy długości fali 650 nm na kolorymetrze spektralnym "Spekol", wobec



próbówki nr. 1. Odkładając na osi X mikrogramy białka, a na osi Y wartość absorpcji, wykreślono krzywą wzorcową.

c/ rozpuszczanie osadu białka po TCA do oznaczania odczynnikiem Folin'a .

Osad białka po TCA odwirowywano i zawieszano w 2,5 ml odczynnika 2. Jeżeli roztwór był za bardzo stężony, rozcieńczano go odpowiednio odczynnikiem 2. Do oznaczenia pobierano 0,25 ml roztworu i postępowano analogicznie jak przy wyznaczaniu krzywej wzorcowej. Ilość białka w próbie odczytywano z krzywej wzorcowej.

#### IV.8. STATYSTYCZNA OCENA WYNIKÓW

Dla każdej grupy wyników obliczano odchylenie standardowe. Otrzymane wyniki z przeprowadzonych badań opracowano statystycznie na podstawie testu "t"-Studenta. Istotność różnic pomiędzy odpowiednimi grupami doświadczeń oceniano przyjmując 5% poziom ufności we wszystkich przeprowadzonych porównaniach.

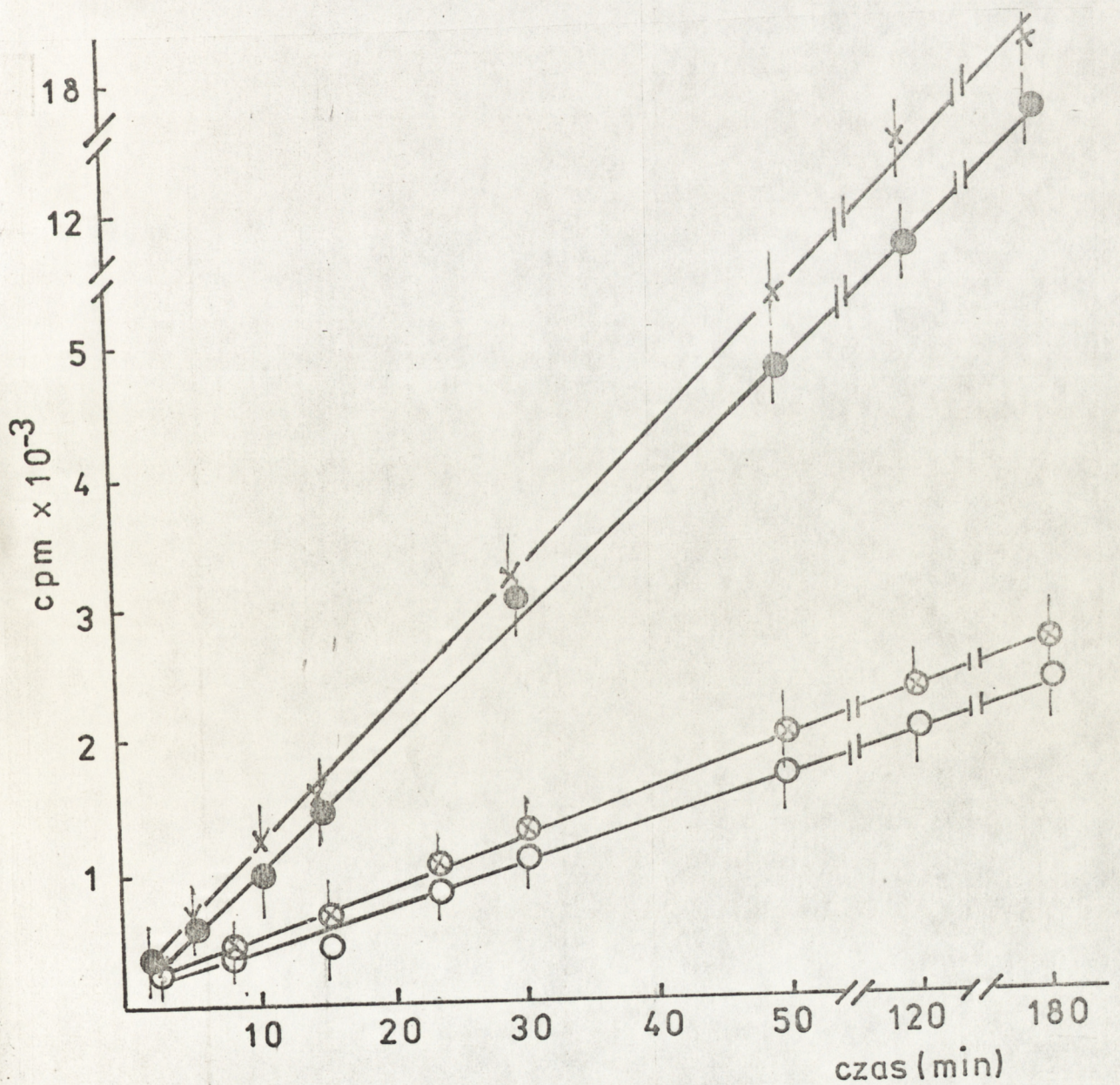


V. W Y N I K I

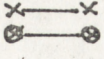
V.1. KINETYKA PRZYŁĄCZANIA ACETYLOCHOLINY DO LIMFOCYTÓW

W wyniku inkubacji limfocytów z  $^3\text{H-ACh} / 10^{-6}\text{M}$ , ●—●, oraz  $10^{-3}\text{M}$  ○—○ / obserwowano liniowy przyrost ilości radioaktywności związanej z komórkami. /Rys.1./

Rys. 1.





Przebieg krzywej nie zmienia się nawet w przypadku przedłużania inkubacji do 3 godzin. Zastosowanie fizostygminy  $/10^{-3}M$ ,  / jako specyficznego inhibitora esterazy acetylocholinowej, powoduje niewielki /do 5%/ wzrost ilości przyłączonej radioaktywności, pozostając bez wpływu na liniowy charakter krzywej.

## V.2. WPLYW TEMPERATURY NA PRZYŁĄCZANIE ACETYLOCHOLINY DO LIMFOCYTÓW

Wraz z obniżaniem temperatury ilość przyłączonej ACh maleje /Tabela 2/.

Tabela 2.

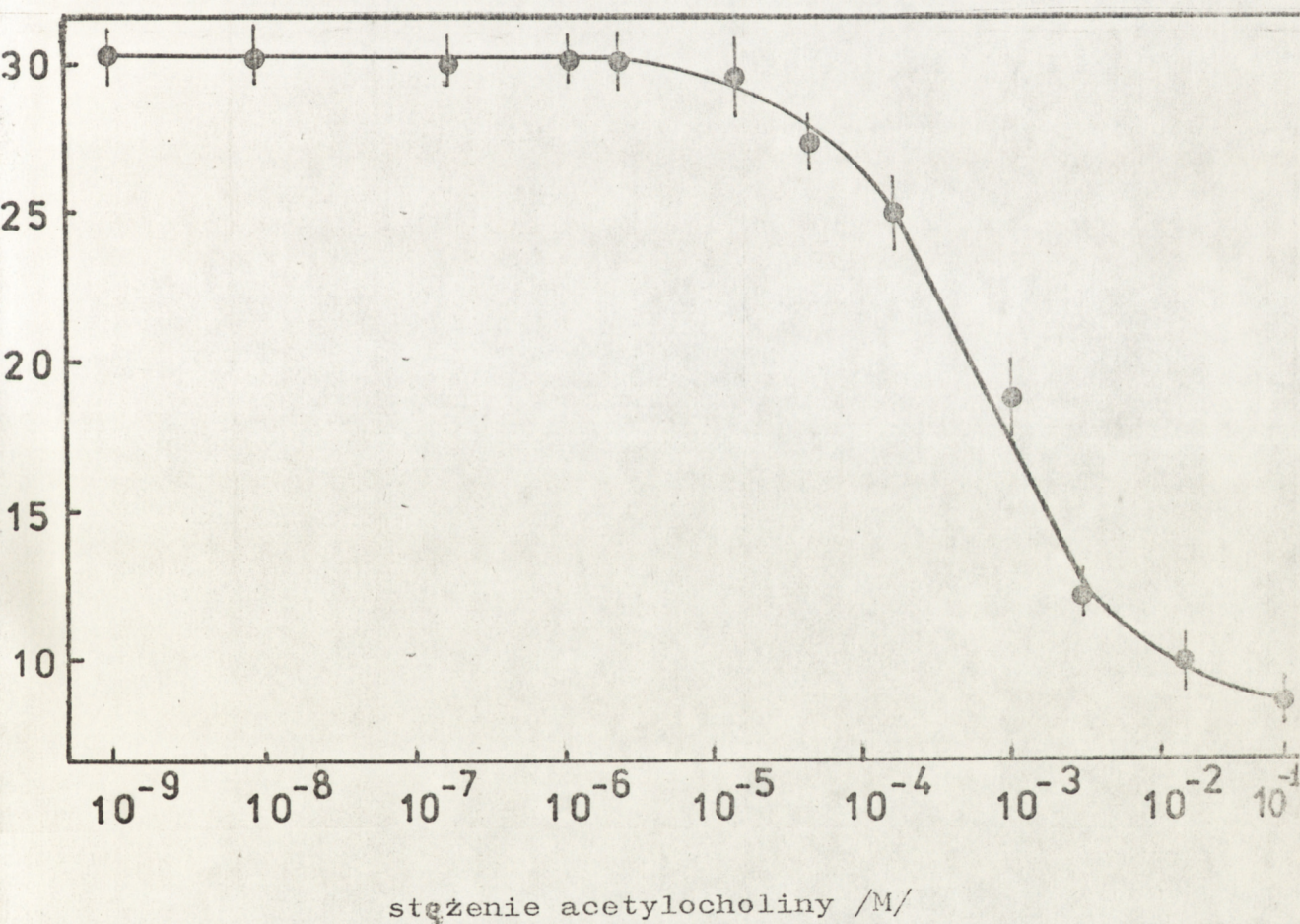
czas /min/	Temperatura / °C /		
	4	20	37
10	285 $\pm$ 35	437 $\pm$ 40	948 $\pm$ 42
30	655 $\pm$ 38	1660 $\pm$ 55	3069 $\pm$ 54
60	1360 $\pm$ 48	3010 $\pm$ 50	6120 $\pm$ 60



### V.3. WPŁYW ZMIAN STĘŻENIA ACETYLOCHOLINY NA JEJ PRZYŁĄCZANIE DO LIMFOCYTÓW

Zmiany poziomu przyłączenia acetylocholíny do limfocytów w zależności od stężenia ACh są przedstawione na rys.2.

Rys. 2.



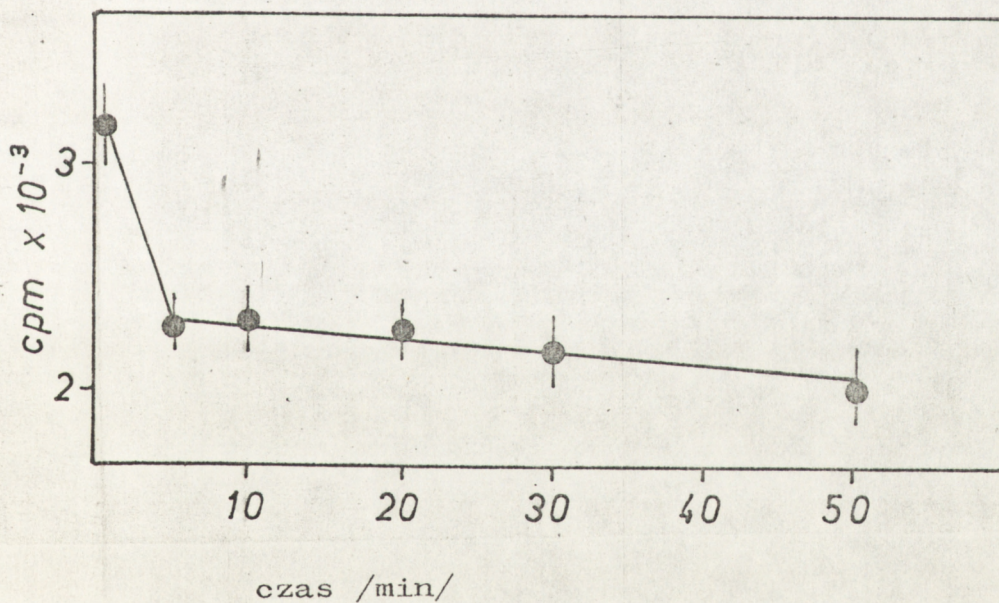
W zakresie stężeń  $10^{-11}$ M- $10^{-6}$ M obserwuje się jednakowy poziom przyłączonej do limfocytów radioaktywności. Po przekroczeniu stężenia  $10^{-5}$ M, w miarę wzrostu stężenia ACh, ilość związanej z limfocytami radioaktywności maleje.



#### V.4. ODPLUKIWANIE ACETYLOCHOLINY ZWIĄZANEJ Z LIMOCYTAMI

Komórki uprzednio inkubowane z  $^3\text{H}$ -ACh odwirowano i po oddzieleniu supernatantu zawieszono w świeżym medium. W tak otrzymanej zawieszynie limfocytów badano kinetykę zmian poziomu przyłączonej do komórek radioaktywności. Rys.3 przedstawia otrzymane wyniki.

Rys. 3.



W ciągu pierwszych pięciu minut obserwuje się odpłukanie 25-30% radioaktywności związanej z limfocytami. Przedłużanie czasu odpłukiwania do 50 min, nie powoduje dalszych zmian ilości związanej  $^3\text{H}$ -ACh.



### V.5. WPŁYW "ROZBICIA" LIMFOCYTÓW NA POZIOM ZWIĄZANEJ Z NIMI RADIOAKTYWNOŚCI

Komórki uprzednio inkubowane przez 30 min z  $^3\text{H}$ -ACh, po wirowaniu i oddzieleniu supernatantu, poddano trzykrotnemu zamrażaniu i rozmrażaniu. Postępowanie to, jak wykazuje tabela 3. powoduje uszkodzenie błony komórkowej, mierzone metodą błękitu trypanu, w ponad 90% badanych komórek.

Tabela 3.

	% żywych komórek
kontrola	99- 100
po 3 krotnym cyklu zamrażania i rozmrażania	5- 8

Po tak przeprowadzonym rozbiciu komórek, pozostałość wirowano i w otrzymanym osadzie mierzono poziom przyłączonej radioaktywności, który, jak wykazuje tabela 4 wynosi około 40% początkowej wartości.

Tabela 4.

	cpm w osadzie	% początkowej ilości
kontrola	5000 $\pm$ 60	100
po 3 krotnym cyklu zamrażania i rozmrażania	1900 $\pm$ 100	40 $\pm$ 5



V.6. PRZYŁĄCZANIE  $^3\text{H}$ -ACH DO LIMFOCYTÓW W OBECNOŚCI  
D-TUBOKURARYNY I ATROPINY

Po wstępnej inkubacji limfocytów z tubokuraryną lub z atropiną, do zawiesiny dodawano  $^3\text{H}$ -ACh i inkubację przedłużano o 50 min. Ilość przyłączonej w tych warunkach radioaktywności jest przedstawiona w tabeli 5.

Tabela 5

CZAS inkubacji/min/	kontrola /cpm/	Inhibitor			
		Atropina		D-Tubokuraryna	
		cpm	% hamowania	cpm	% hamowania
5	607 $\pm$ 30	600 $\pm$ 28	0	440 $\pm$ 30	27,5
30	3217 $\pm$ 80	3213 $\pm$ 60	0	2195 $\pm$ 50	31,8
50	5082 $\pm$ 76	5068 $\pm$ 70	0	3720 $\pm$ 62	26,8

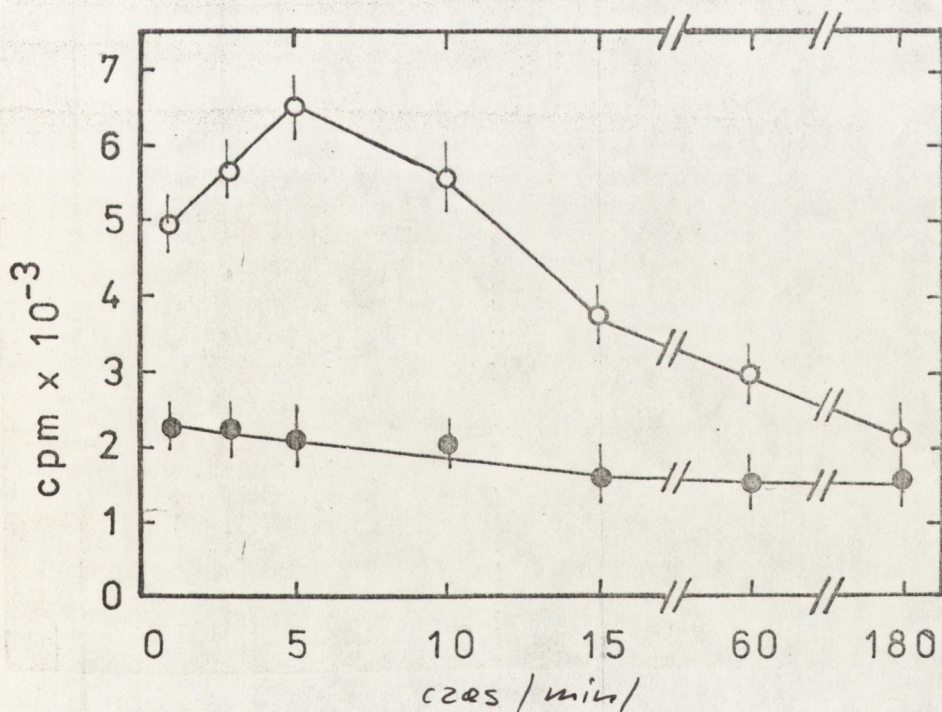
Niezależnie od czasu inkubacji limfocytów z acetylocholiną, D-tubokuraryna powoduje około 30% obniżenie poziomu radioaktywności przyłączonej do komórek. Atropina nie ma wpływu na poziom tego przyłączenia.



V.7. KINETYKA PRZYŁĄCZANIA  $^3\text{H-QNB}$  DO LIMFOCYTÓW

Przyłączenie  $^3\text{H-QNB}$  jest bardzo szybkie /Rys. 4/. Już w ciągu 5 minut poziom przyłączenia osiąga maksimum. Dalsze przedłużanie inkubacji w obecności nadmiaru wolnego  $^3\text{H-QNB}$  prowadzi do stopniowego obniżania ilości radioaktywności związanej z limfocytami. Poziom wiązania niespecyficznego / przyłączenie w obecności atropiny/ w trakcie całego doświadczenia wykazuje nieznaczną tendencję spadkową.

Rys.4.



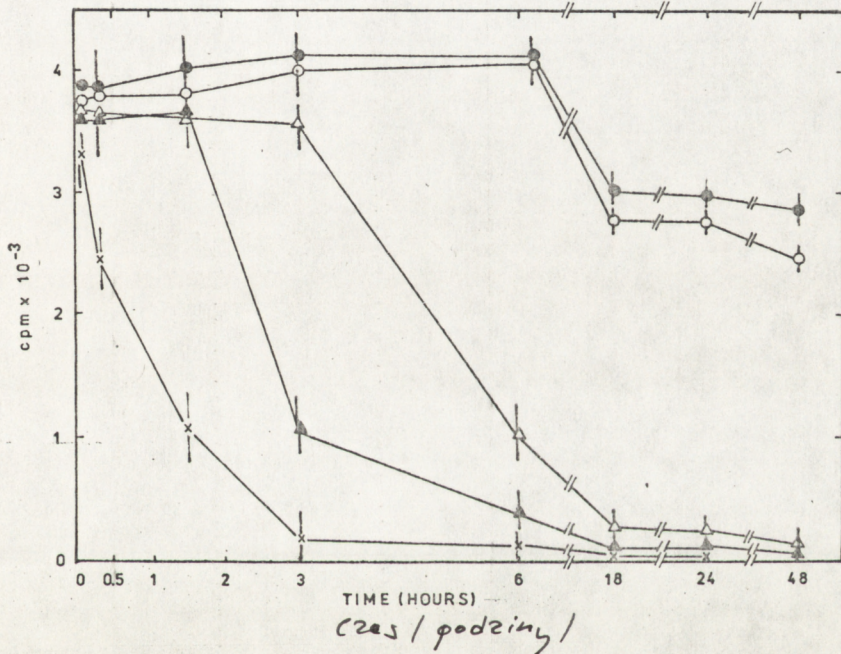
Wiązanie  $^3\text{H-QNB}$  : - w obecności  $10^{-4}\text{M}$  atropiny - ●—●  
- bez atropiny - ○—○



### V.8. ZALEŻNOŚĆ POZIOMU WIĄZANIA $^3\text{H}$ -QNB DO LIMFOCYTÓW OD RODZAJU PREINKUBACYJNEGO MEDIUM

Wpływ składu preinkubacyjnego medium na poziom przyłączenia  $^3\text{H}$ -QNB jest przedstawiony na Rys.5.

Rys.5



- Parker 199 +surowica cieleęca /20%/ + glutamina /10%/
- Parker 199
- △—△ MEM + surowica cieleęca /20%/ + glutamina /10%/
- ▲—▲ MEM
- ×—× PBS

Preinkubacje limfocytów prowadzone w medium Parker 199 z dodatkiem surowicy i glutaminy lub też w samym płynie Parker 199 nie wpływają w sposób istotny na poziom przyłączenia  $^3\text{H}$ -QNB do limfocytów.

Prowadzenie preinkubacji w płynie MEM z dodatkiem surowicy i glutaminy, w samym płynie MEM, czy w PBS, powoduje coraz szybszy spadek poziomu specyficznego przyłączenia  $^3\text{H}$ -QNB. Przy zastosowaniu

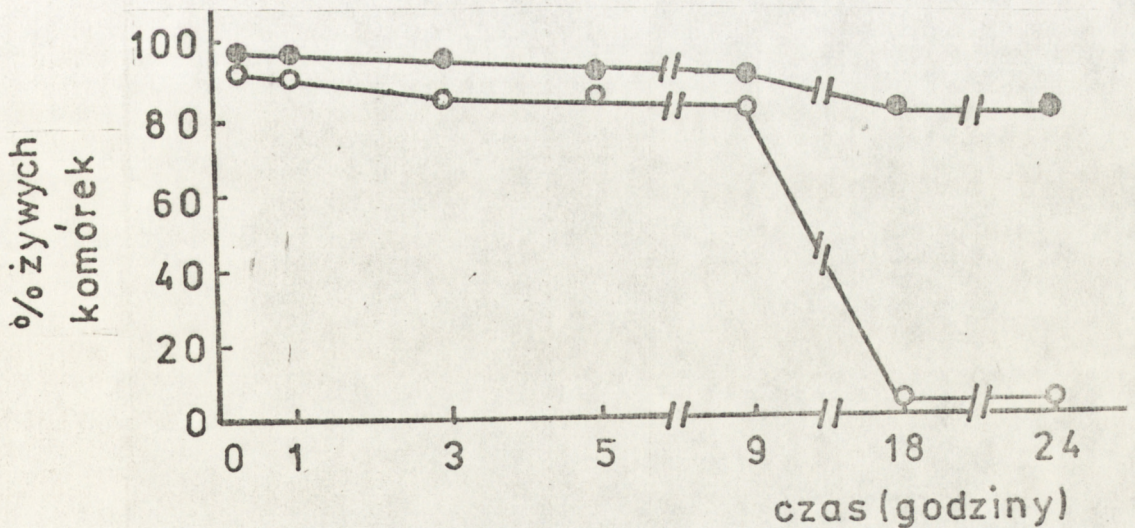


waniu PBS jako medium preinkubacyjnego poziom specyficznego przyłączenia  $^3\text{H}$ -QNB już po 3 godzinach preinkubacji spada do zera.

#### V.9. WPŁYW SKŁADU INKUBACYJNEGO MEDIUM NA ŻYWOTNOŚĆ LIMFOCYTÓW

Limfocyty inkubowane w medium Parker 199 z dodatkiem surowicy cielęcej i glutaminy przez 24 godziny zachowują żywotność mierzoną metodą z użyciem błękitu trypanu /Rys.6/. Limfocyty przetrzymywane w PBS po 10 godzinach wykazują gwałtowny spadek żywotności.

Rys.6.



Hodowle limfocytów prowadzone w :

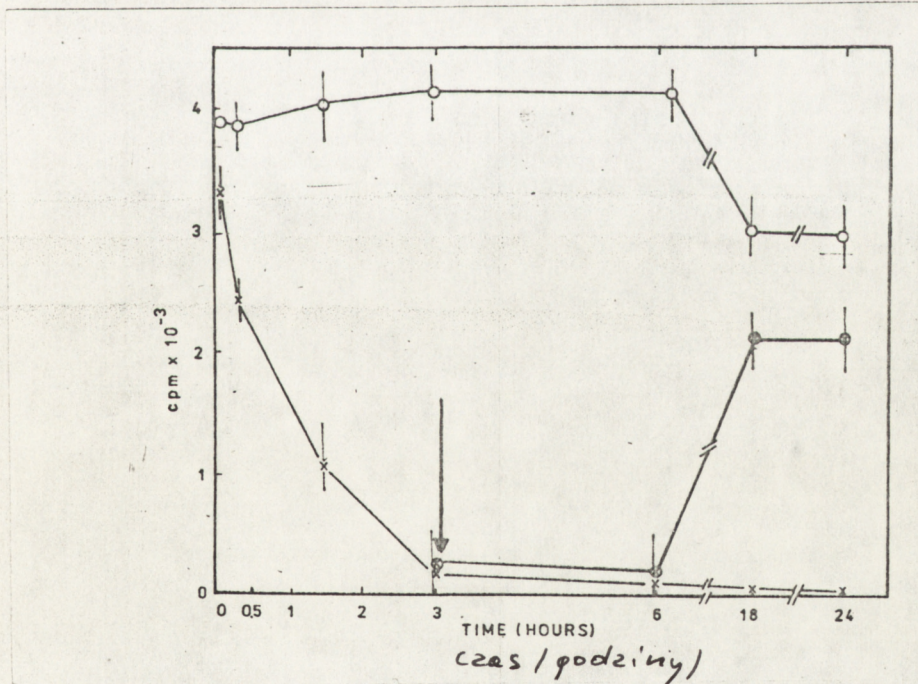
- Parker 199 + surowica cielęca /20%/ + glutamina /10%/
- PBS



### V.10. ODBUDOWA ZDOLNOŚCI DO SPECYFICZNEGO WIĄZANIA $^3\text{H-QNB}$ PRZEZ LIMFOCYTY

Limfocyty preinkubowane przez 3 godziny w PBS nie wykazują specyficznego wiązania  $^3\text{H-QNB}$  /Rys.7/. Zmiana medium preinkubacyjnego z PBS na Parker 199 /strzałka na rys.7/ powoduje, że w ciągu 10 godzin zdolność specyficznego wiązania  $^3\text{H-QNB}$  do limfocytów pojawia się ponownie.

Rys.7



Hodowle limfocytów prowadzone w:

- Parker 199 + surowica cieleńca /20%/ + glutamina /10%/
- ×—× PBS

Strzałką zaznaczono zmianę płynu preinkubacyjnego.



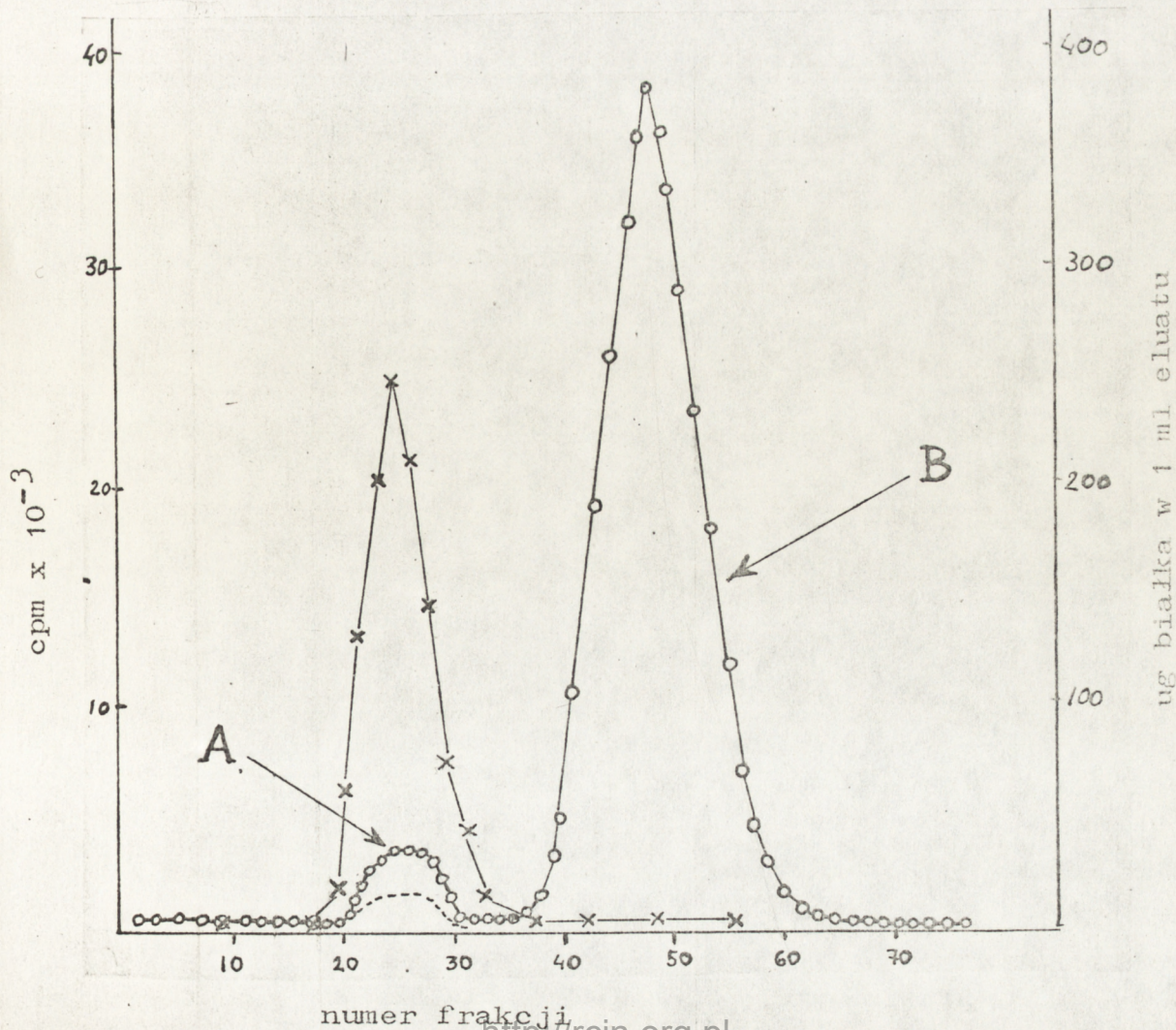
V.11. OBECNOŚĆ KOMPLEKSU  $^3\text{H-QNB}$  - BIAŁKO W MEDIUM  
INKUBACYJNYM

Rozdział supernatantu otrzymanego w wyniku wirowania limfocytów inkubowanych przez 3 godziny z  $^3\text{H-QNB}$  na kolumnie sephadex G-15 wykazuje obecność dwóch szczytów radioaktywności  $\circ-\circ$  ,/rys.8/. Pierwszy z nich stanowi kompleks białko- $^3\text{H-QNB}$ , /pik A/, drugi jest identyfikowany jako wolny  $^3\text{H-QNB}$ , - /pik B/.

----- , linią przerywaną jest zaznaczony profil elucyjny analogicznie przeprowadzonego doświadczenia, z tym, że  $^3\text{H-QNB}$  dodano do supernatantu pochodzącego z limfocytów inkubowanych w płynie Parker 199 przez 3 godziny.

x---x , krzyżykami oznaczono ilość białka obecną w eluacie.

Rys.8.

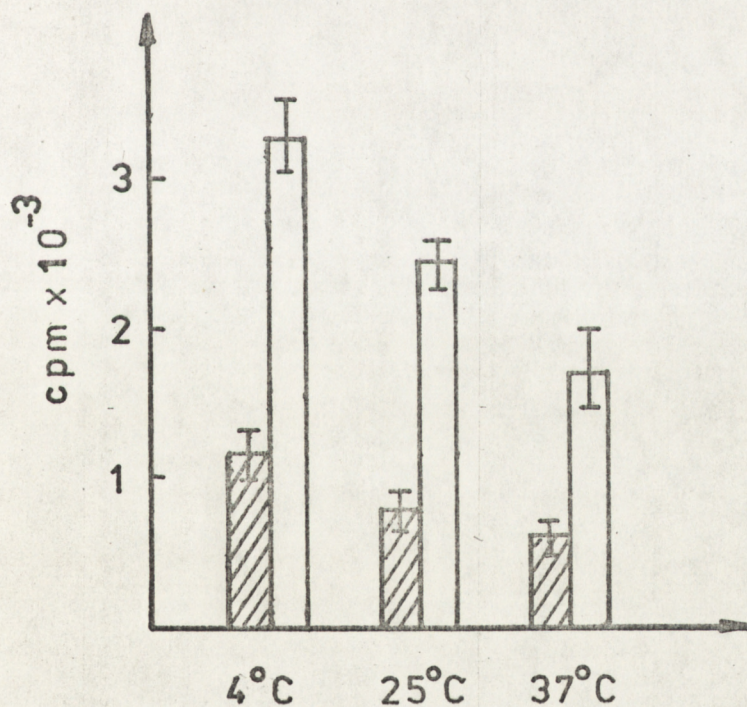






V.12. WPŁYW TEMPERATURY NA POZIOM PRZYŁĄCZANIA  $^3\text{H-QNB}$   
DO LIMFOCYTÓW

Obniżanie temperatury powoduje wzrost poziomu specyficznego przyłączenia  $^3\text{H-QNB}$  do limfocytów /Rys.9 a, b/

Rys.9a

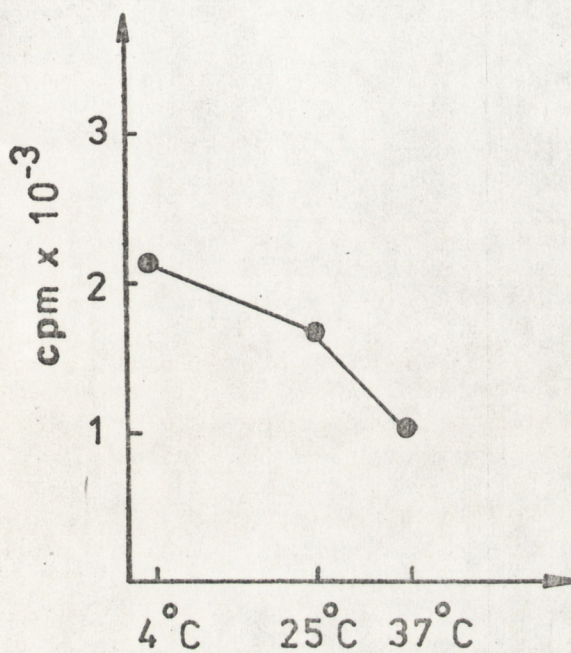


 Wiązanie w obecności atropiny  
 Wiązanie w nieobecności atropiny



Rys. 9b.

Zmiana poziomu wiązania specyficznego  $^3\text{H}$ -QNB do limfocytów jako funkcja temperatury.





## VI. OMÓWIENIE WYNIKÓW I DYSKUSJA

Stosowanie specyficznych radioaktywnych ligandów do badania powierzchniowych receptorów komórkowych jest obecnie metodą ogólnie przyjętą /6,13,14,86/. Niewielkie różnice występujące w opisach sposobu postępowania wynikają z wyboru metody mającej na celu oddzielenie komórek z przyłączonym ligandem od wolnego ligandu znajdującego się w nadmiarze w roztworze. Spośród kilku metod najczęściej bywa stosowane sączenie przez odpowiednie filtry bądź wirowanie. Poważną wadą sączenia jest to, iż ligand może się wiązać z samym filtrem i w ten sposób zaburzać kinetykę reakcji specyficznej /89/. Niedogodnością zaś wirowania jest ograniczona liczba próbek, które mogą być równocześnie poddane wirowaniu, oraz dłuższy niż w przypadku sączenia czas izolacji /89/. Wybór odpowiedniej metody wirowania, oraz jej przystosowanie do warunków naszego laboratorium stworzyło, jak się wydaje, optymalny układ dla badań, bowiem czas izolacji komórek z przyłączonym ligandem nie był dłuższy od 2 min, rozrzuty wyników pomiędzy poszczególnymi próbkami tej samej grupy nie przekraczały 5% wartości podstawowej, a sam sposób postępowania był prosty i umożliwiał uzyskiwanie powtarzalnych wyników.

W pierwszym etapie badań radioaktywnym ligandem była  $^3\text{H}$ -Acetylocholina /  $^3\text{H}$ -ACh/. Powodowało to pewne komplikacje. Jak wiadomo, acetylocholina jest związkiem nietrwałym; ulega hydrolizie i może być rozkładana przez esterazę acetylocholinową / E.C. 3.1.1.7 /. Przy  $\text{pH} = 7,4$ , w temp.  $37^\circ\text{C}$  - a więc w warunkach moich doświadczeń- hydroliza



acetylocholinę jest procesem tak powolnym /czas półtrwania  $T_{1/2}$  wynosi około 20 dni /54//, że wobec czasu trwania poszczególnych doświadczeń, który nie przekraczał 3 godzin, można ją pominąć w analizie i ACh traktować jako związek trwały. Nie można jednak wykluczyć działania esterazy acetylocholinowej. Jej wpływ sprawdziłem na drodze farmakologicznej przy użyciu fizostygminy, jej specyficznego inhibitora. Obecność powodowała niewielki /mniej niż 5% / wzrost ilości przyłączonej acetylocholinę /Rys.1/, co nie wpływało w sposób istotny na kształt krzywych. Trwałość acetylocholinę w warunkach niniejszych doświadczeń upoważniła do przyjęcia, że efekty uzyskiwane po stosowaniu radioaktywnej acetylocholinę nie były artefaktami, lecz zostały spowodowane działaniem samego związku.

W wyniku inkubacji limfocytów z  $^3\text{H-ACh}$  obserwowano liniowy w czasie przyrost radioaktywności przyłączonej do limfocytów /Rys.1/, co przy wysokich stężeniach ligandu / $10^{-3}\text{M}$  /, i długich czasach inkubacji, trwających do 3 godzin, wskazuje na wnikanie hormonu do wnętrza komórek.

Przemawia za tym również analiza krzywej przedstawiającej zależność pomiędzy ilością radioaktywności przyłączonej do limfocytów a stężeniem acetylocholinę w środowisku. Jest pewne, że poszczególne próbki przedstawione w kolejnych punktach wykresu zawierają stałą ilość radioaktywnej  $^3\text{H-ACh}$  / $10^{-9}\text{M}$ ,  $0,1\mu\text{Ci}$ / przy wzrastających stężeniach "zimnej", nieradioaktywnej acetylocholinę. Obserwowane równoległy do osi odciętych odcinek krzywej w zakresie stężeń  $10^{-9}\text{M}$  -  $10^{-6}\text{M}$  "zimnej" ACh, można interpretować



jako wzrost ilości acetylocholiny przyłączonej do limfocytów wprost proporcjonalny do wzrostu jej stężenia w środowisku. Interpretacja ta wynika stąd, że w kolejnych próbach reprezentujących wzrastające stężenia ACh, stosunek  $\frac{[{}^3\text{H-ACh}]}{[\text{ACh}]}$  ulega regularnemu obniżeniu o jeden rząd.

Równoległy odcinek krzywej odpowiada więc angażowaniu na powierzchni limfocytów kolejnych miejsc, które mogą służyć do przenoszenia ACh do wnętrza komórek. Po przekroczeniu stężenia  $10^{-5}$  M, obserwowany spadek przyłączonej radioaktywności może oznaczać wysycenie na powierzchni limfocytów wszystkich miejsc mogących brać udział w tym procesie. Według Giraudat i Changeux /24/ acetylocholina o stężeniu  $10^{-5}$  M otwiera wszystkie kanały jonowe sprzężone z receptorami nikotynowymi. Prawdopodobne więc jest uczestnictwo nikotynowych receptorów cholinergicznym w opisywanym procesie. Dalsze podwyższanie stężenia ACh, zgodnie z oczekiwaniem, wyraża się na krzywej spadkiem ilości przyłączonej radioaktywności. A to oznacza, iż od tego momentu, czyli od wysycenia wszystkich miejsc, które mogą selektywnie przenosić ACh poprzez błonę komórkową, szybkość transportu ACh jest stała i nie zależy od dalszego wzrostu jej stężenia w otaczającym środowisku.

Wyniki badań z odpłukiwaniem  ${}^3\text{H-ACh}$  przyłączonej do limfocytów /Rys.3/ również poważnie przemawiają za wchodzeniem ACh do wnętrza komórek. Ponad 70% radioaktywności wiąże się trwale z limfocytami. Nie jest to jednak wiązanie na powierzchni błony komórkowej, bowiem po rozbiciu komórek wywołanym przez zamrażanie i rozmrażanie limfocytów,



około 60% uprzednio związanej radioaktywności uwalnia się /Rys.3/.

Na wchodzenie ACh do wnętrza limfocytów pewien wpływ może mieć pinocytoza, zjawisko polegające na wychwytywaniu przez komórki kropelek środowiska, które je otacza /15/. Ponieważ jednak pinocytoza jest procesem niespecyficznym, który nie może zależeć od stężenia ACh, jej wpływ dotyczyć może jedynie poziomu tła wiązania, a nie kształtu krzywej.

Jak wynika z omówionych dotychczas doświadczeń, limfocyty posiadają pewien mechanizm, który realizuje transport acetylocholinę poprzez błonę komórkową. Czy w mechanizmie tym zaangażowane są w jakiś sposób znane typy receptorów dla acetylocholinę, Czy też, jest to mechanizm działający całkowicie od nich niezależnie? Odpowiedzi na te pytania udzielają - w takiej mierze w jakiej jest to możliwe przy zastosowaniu metod farmakologicznych - wyniki doświadczeń z antagonistami receptorów cholinergicznych nikotynowych i muskarynowych /tabela 5/. Otrzymane dane pokazują, że zablokowanie receptorów nikotynowych przez przyłączenie do nich D-tubokuraryny, powoduje częściowe zahamowanie transportu ACh do wnętrza limfocytów. Jest to pierwsze, bezpośrednie potwierdzenie laboratoryjne na limfocytach szczura sugestii Richman'a i wsp./62/ o obecności na powierzchni limfocytów receptorów nikotynowych. Na podstawie tego doświadczenia stwierdziłem ponadto, że obecne na szczurzych limfocytach receptory nikotynowe są w pewnym stopniu zaangażowane w przenoszenie ACh poprzez błonę komórkową. Została więc tym receptorom przypisana określona funkcja.

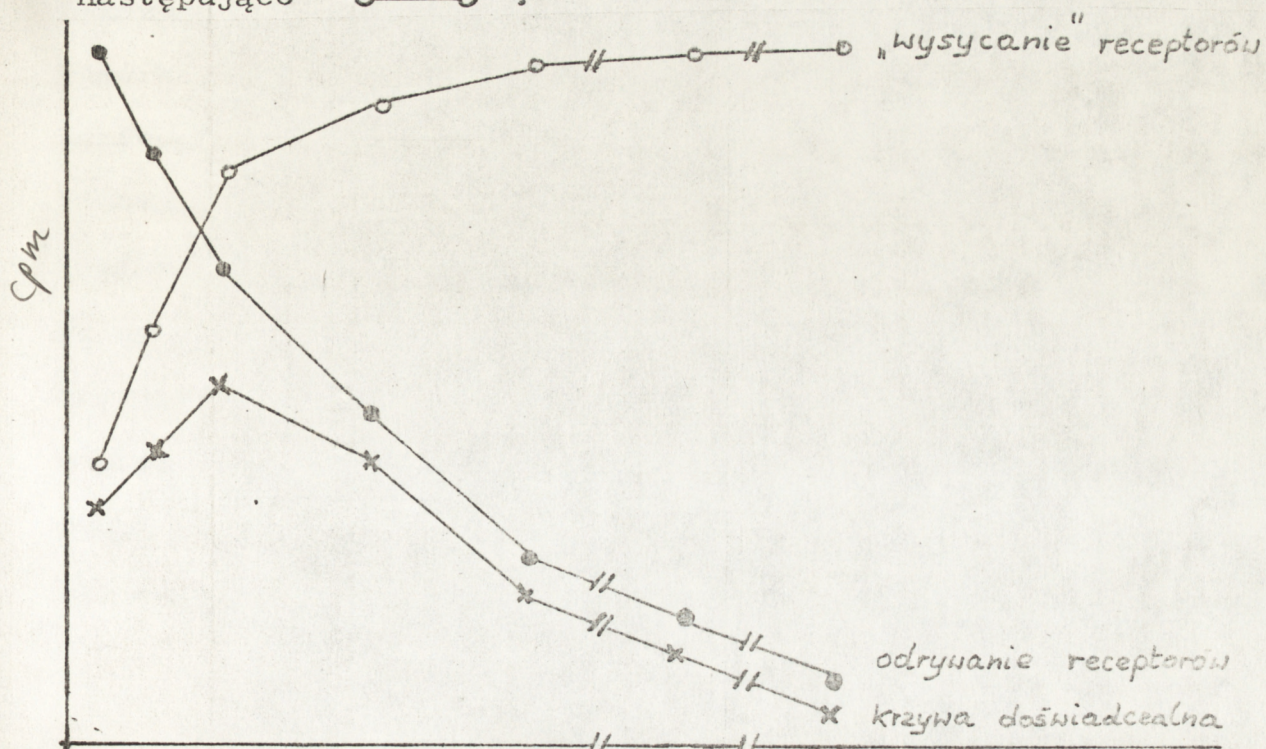


Z analogicznie przeprowadzonych badań z zastosowaniem blokera receptorów muskarynowych, atropiny /tabela 5/, wynika, że nie ma ona wpływu na przyłączanie ACh do limfocytów. Wynik ten, który skłania do przypuszczenia, że na limfocytach nie ma receptorów muskarynowych, jest sprzeczny z doniesieniami z piśmiennictwa. Schreiner i Unanue /66/ objaśniali obecnością receptorów muskarynowych wzrost ruchliwości ludzkich limfocytów B pod wpływem ACh i znikanie tego efektu pod wpływem atropiny. Zaś Gordon i wsp./26/ przy użyciu radioaktywnego ligandu wykazali obecność receptorów muskarynowych na ludzkich limfocytach. Jak wynika z moich dalszych badań, na limfocytach szczura oprócz receptorów nikotynowych, znajdują się również receptory muskarynowe. Brak wpływu atropiny na przyłączanie ACh można wyjaśnić niezwykle krótkim czasem kontaktu acetylocholinyl z receptorem. Czas ten wynosi dla poznanych receptorów nikotynowych 1-3 msek /24/, a dla receptorów muskarynowych 300- 500 msek /73/ i jest tak krótki, że w trakcie oczyszczania komórek napiętnowanych radioaktywnym ligandem od wolnego izotopu pozostającego w roztworze, może dochodzić do oddysocjowywania ACh połączonej specyficznje z jej receptorami. Obserwacja ta służy do wniosku praktycznego : do badania receptorów cholinergicznycch przy pomocy radioaktywnycch ligandów, można jako ligand stosować ACh tylko wtedy, gdy dysponuje się taką metodą izolacji, która umożliwia oddzielenie kompleksu ACh- receptor w czasie nie przekraczającym kilkadziesiąt milisekund. Ponieważ było to w naszych warunkach nieosią-



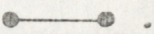
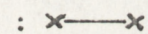
galne ze względów technicznych, do dalszych badań receptora muskarynowego wykorzystałem wysoce specyficznego antagonistę tych receptorów -  $^3\text{H}$ -Quinuclidinyl benzilate / $^3\text{H}$ -QNB/, związek uznawany obecnie powszechnie za najlepszy ligand do tego typu badań /7, 21, 34, 35, 44, 57, 82, 87/.

Już w pierwszych doświadczeniach przeprowadzonych z tym antagonistą, stwierdziłem, że po zablokowaniu atropiną receptorów muskarynowych obniża się znacznie przyłączanie  $^3\text{H}$ -QNB do limfocytów /Rys.4/. Oznacza to, że na limfocytach szczura znajdują się cholinergiczne receptory muskarynowe. Analiza kinetyki wiązania  $^3\text{H}$ -QNB skłania do przypuszczenia, że nie jest to proces jednolity. Charakter krzywej wskazuje, moim zdaniem, na występowanie dwóch przeciwstawnych procesów. Pierwszy proces to wzrost  $^3\text{H}$ -QNB przyłączonego do receptorów, asymptotycznie dążący do wartości reprezentującej wysycenie wszystkich miejsc receptorowych na powierzchni limfocytów. Dla ułatwienia śledzenia toku myślenia, hipotetyczny kształt takiej krzywej jest przedstawiony na rys.10 następująco  $\circ - \circ$ .



Rys. 10.



Przebieg tej krzywej jest zgodny z powszechnie otrzymywanymi krzywymi kinetyki wysycania receptorów przy użyciu radioaktywnego ligandu /6/. Na proces wysycania receptorów nakłada się drugi proces, proces odrywania się powierzchniowych receptorów muskarynowych. Hipotetyczny kształt tej krzywej jest oznaczony na Rys.10 następująco  . Te dwa równoległe przebiegające procesy uzewnętrzniają się w postaci wypadkowej, która wyraża się krzywą doświadczalnie uzyskiwaną. Krzywa ta jest zaznaczona na Rys.10 krzyżykami :  . Z podobnym problemem zetknął się Gavin z wsp./22/ przy badaniu receptorów insulinowych na limfocytach ludzkich. W ich badaniach układ był jeszcze bardziej skomplikowany ze względu na naturalny katabolizm radioaktywnej insuliny. Mimo tych trudności autorzy stwierdzili, że receptory insulinowe odrywają się od powierzchni komórek, i że w medium inkubacyjnym można odnaleźć całe receptory /22/. Czy w przypadku receptorów muskarynowych może następować oddysocjowywanie receptorów ? Przedstawione dane wskazują, że receptory muskarynowe odrywają się z błony komórkowej do roztworu. W supernatancie pochodzącym z nad limfocytów inkubowanych z  $^3\text{H-QNB}$  /Rys.8/ oprócz nadmiaru wolnego ligandu /szczyt B/, znajduje się również kompleks białko-  $^3\text{H-QNB}$ . Natychmiast nasuwa się pytanie, czy bloker receptora muskarynowego,  $^3\text{H-QNB}$ , jest bezpośrednio odpowiedzialny za odrywanie receptora, czy też pod wpływem obecności tego antagonisty dochodzi do pogłębienia, a tym samym i ujawnienia stale występującego zjawiska przechodzenia receptorów do roztworu ? Dla rozwiązania tego problemu



pobrano supernatant z nad limfocytów inkubowanych bez  $^3\text{H-QNB}$ , a następnie po dodaniu tego ligandu, przeprowadzono rozdział otrzymanej mieszaniny na kolumnie wypełnionej podłożem Sephadex G-15. Okazało się, że w eluacie nadal, choć w mniejszej ilości, znajdują się kompleksy  $^3\text{H-QNB}$  - białko. Dlatego też można przypuszczać, że degradacja receptorów muskarynowych z powierzchni limfocytów do otaczającego je środowiska, jest procesem ciągłym, który ulega przyspieszeniu pod wpływem  $^3\text{H-QNB}$  - gdyż jest prawdopodobne, że receptory zablokowane, a więc unieczynnione przez antagonistę, łatwiej i szybciej odłączają się od błony komórkowej.

Wobec tych wyników, jest bardzo prawdopodobne, że określona, konkretna liczba receptorów muskarynowych na powierzchni limfocytów ustala się w wyniku dynamicznej równowagi pomiędzy receptorami odłączającymi się od błony komórkowej a receptorami syntezowanymi de novo. Na korzyść takiego mechanizmu przemawiają wyniki doświadczeń ujawniających zależność pomiędzy liczbą receptorów obecnych w danej chwili na powierzchni limfocytów, a rodzajem środowiska inkubacyjnego /Rys.6/. W "bogatych" mediach hodowlanych, takich jak Płyn Parker'a 199 z dodatkiem lub bez surowicy cielej i glutaminy, liczba receptorów muskarynowych na powierzchni limfocytów nie ulega zasadniczej zmianie nawet w przypadku inkubacji prowadzonych przez kilka dni. W przeciwieństwie do tego, limfocyty inkubowane w płynach "ubogich", np. MEM, MEM z surowicą cielej i glutaminą czy PBS, w miarę pogarszania się warunków hodowli



coraz szybciej tracą swoje powierzchniowe receptory muskarynowe. Prowadzone równocześnie badania żywotności komórek w zależności od rodzaju płynu hodowlanego, wykazały, że w PBS - medium pozbawionym jakichkolwiek surowców odżywczych - utrata receptorów muskarynowych znacznie wyprzedza w czasie śmierć limfocytów /Rys.5,6/.

Doświadczenie to sygnalizuje, że przyczyną obniżenia liczby receptorów nie jest gwałtowna śmierć komórek, lecz najprawdopodobniej ograniczony dopływ materiałów odżywczych do limfocytów. Wydaje się zresztą oczywiste, że końcowym efektem braku odnowy zużywających się elementów komórkowych /nie tylko zresztą receptorów/, musi być śmierć komórki. W przypadku hodowli limfocytów w PBS, śmierć występowała po 10 godzinach /Rys.6 a, b/.

Tak więc w sytuacji, gdy z powodu braku budulców i materiałów energetycznych komórka nie może wytwarzać nowych receptorów, stare zaś ulegają, po pewnym czasie, degradacji, zostaje zachwiana równowaga dynamiczna zapewniająca obecność pewnej, stałej liczby powierzchniowych receptorów muskarynowych, i obserwuje się /Rys.6/ stopniowe, zależne od składu płynu hodowlanego, zmniejszanie się liczby, a w końcu zanikanie tych receptorów.

Zgodnie z przedstawioną interpretacją, proces degradacji receptorów wywołany brakiem materiałów odżywczych, jeżeli nie posunął się zbyt daleko, powinien się zatrzymać, lub nawet odwrócić w przypadku ich ponownego dopływu. W celu sprawdzenia tego rozumowania, limfocyty całkowicie pozbawione receptorów muskarynowych na skutek 3 godzinnej inku-



bacji w PBS, umieszczono w "bogatym" medium hodowlanym - Parker 199 z dodatkiem surowicy cielęcej i glutaminy. Zgodnie z oczekiwaniem, na tak przygotowanych limfocytach ponownie pojawiły się receptory muskarynowe. Długi czas - 14-16 godzin potrzebny do ponownego pojawienia się receptorów muskarynowych na limfocytach, zdaje się wskazywać na to, że receptory musiały zostać zsyntezowane *de novo*.

Jeszcze jednym potwierdzeniem proponowanego modelu dynamicznej równowagi między receptorami, wydaje się być zależność liczby eksponowanych na powierzchni limfocytów receptorów muskarynowych od temperatury inkubacji /Rys.9 a,b/. Wraz z obniżaniem temperatury od 37°C do 4°C można było obserwować zwiększanie się liczby receptorów na tych komórkach. Prawdopodobnie, jest to związane z występującym równoległe do spadku temperatury, obniżeniem się szybkości degradacji receptorów, co ujawnia się jako chwilowy wzrost liczby receptorów na powierzchni.

Proponowany model regulacji liczby receptorów muskarynowych eksponowanych w danej chwili na powierzchni limfocytów w zależności od różnych czynników zewnętrznych, wydaje się być jednym z mechanizmów umożliwiających limfocytom kontrolę wrażliwości na pojawiający się neurohormon.

Wyniki badań przedstawione w niniejszej pracy *wykazują* ~~uwidacznia~~ obecność dwóch typów receptorów cholinergicznyc~~h~~ na limfocytach szczura i wskazują równocześnie kierunki dalszych poszukiwań.



## VII. W N I O S K I

1. Na błonie komórkowej limfocyta szczura znajdują się receptory cholinergiczne typu nikotynowego zaangażowane w przenoszenie acetylocholino do wnętrza komórek.
2. Na błonie komórkowej limfocyta szczura znajdują się receptory cholinergiczne typu muskarynowego.
3. Liczba receptorów muskarynowych eksponowanych w danej chwili na powierzchni limfocyta jest wynikiem ustalenia się dynamicznej równowagi pomiędzy receptorami odrywającymi się od błony a receptorami syntezowanymi de novo. Na stan równowagi dynamicznej wpływają zmiany składu i temperatury środowiska inkubacyjnego.



## VIII. S T R E S Z C Z E N I E

Ekspozycją ostatnio kierunkiem poszukiwań jest określenie zakresu i warunków w jakich zachodzi wzajemne oddziaływanie układu nerwowego i układu immunologicznego. Pewne perspektywy tworzy możliwość regulowania aktywności komórek układu immunologicznego przez neurohormony. Z niezbyt bogatego piśmiennictwa wynika, że wśród innych neurohormonów, również acetylocholina może zmieniać reaktywność limfocytów. Nie został jednak poznany mechanizm w jaki cząsteczki acetylocholiny przenoszą informację do wnętrza limfocytów. Przypuszcza się, że istotną rolę w przebiegu tego procesu odgrywać mogą specyficzne dla acetylocholiny receptory powierzchniowe.

Celem niniejszej pracy było zbadanie obecności i bliższa charakterystyka receptorów cholinergicznym na limfocytach szczura.

Dla jego realizacji wybrano i zaadaptowano metodę oznaczania powierzchniowych receptorów przy zastosowaniu radioaktywnych ligandów specyficznie przyłączających się do tych właśnie receptorów. Oddzielanie komórek zawierających radioligand związany z ich receptorami od nadmiaru wolnego radioligandu było prowadzone przy pomocy odpowiedniego wirowania.

Stwierdzono, że w wyniku inkubacji limfocytów z  $^3\text{H-ACh}$  następuje liniowy w czasie przyrost ilości radioaktywności związanej z komórkami. Przyrost radioaktywności będący uzewnętrznieniem wiązania ligandu z receptorem



zależy od temperatury i przy jej obniżeniu zmniejsza się poziom wiązania. Te dwa wyniki sugerowały, że acetylocholina wnika do wnętrza limfocytów. Przypuszczenie to znalazło potwierdzenie w badaniach kinetyki oddysocjowania  $^3\text{H-ACh}$  związanej z limfocytami. Stwierdzono, że tylko około 30% przyłączonej do komórek radioaktywnej acetylocholinie może zostać odpłukane, podczas gdy po rozbiciu komórek uwalnia się z nich około 60% związanej i nimi radioaktywności.

Wnikanie acetylocholinie do wnętrza komórek zależy od jej stężenia. W zakresie stężeń  $10^{-11}\text{M} - 10^{-6}\text{M}$  obserwuje się liniowy przyrost ilości przyłączonej  $^3\text{H-ACh}$  zgodny ze wzrastającym stężeniem acetylocholinie w środowisku. Po przekroczeniu stężenia  $10^{-5}\text{M}$ , w zakresie stężeń  $10^{-5}\text{M} - 10^{-1}\text{M}$  przyrost radioaktywności zmniejsza się.

Za wnikanie acetylocholinie do wnętrza limfocyta odpowiada receptor nikotynowy; zablokowanie tego receptora przy pomocy D-tubokuraryny, powoduje bowiem znaczne obniżenie przyłączania  $^3\text{H-ACh}$  do limfocytów.

Zbadano obecność receptorów muskarynowych na limfocytach szczura stosując swoisty związek antagonistyczny wobec receptorów muskarynowych -  $^3\text{H-QNB}$  - w obecności i przy braku atropiny. Kinetyka wiązania specyficznego wyrażająca wartość odpowiadającą aktualnie eksponowanej liczbie receptorów muskarynowych na powierzchni limfocyta wykazuje osiągnięcie maksimum wiązania po 5 minutach inkubacji. Dalsze przedłużanie inkubacji w obecności  $^3\text{H-QNB}$  wywołuje stopniowy spadek radioaktywności związanej z limfocytami.



Poziom specyficznego wiązania  $^3\text{H-QNB}$  do limfocytów zależy od składu środowiska inkubacyjnego. Preinkubacja prowadzona w środowiskach bogatych w materiały odżywcze i energetyczne : Parker 199, Parker 199 + surowica cielęca + glutamina, nie wpływa w istotny sposób na przyłączanie  $^3\text{H-QNB}$  do limfocytów, podczas gdy przy stopniowym pogarszaniu warunków preinkubacji w środowiskach ubogich /MEM +surowica cielęca + glutamina, MEM, czy PBS / , dochodzi do coraz to szybszego spadku specyficznego wiązania radioligandu.

Limfocyty, które utraciły zdolność specyficznego wiązania  $^3\text{H-QNB}$  na skutek 3 godzinnej inkubacji w środowisku ubogim /PBS/ odzyskują tę właściwość po 14-16 godzinach inkubacji w bogatym płynie hodowlanym /Parker 199 + surowica cielęca + glutamina/.

Otrzymane wyniki upoważniają do stwierdzenia, że na limfocytach szczura znajdują się dwa typy receptorów cholinergicznych : receptory nikotynowe i muskarynowe. Receptory nikotynowe są w pewnym stopniu zaangażowane w przenoszenie acetylocholino do wnętrza limfocytów. Obecne na powierzchni limfocytów receptory muskarynowe są labilne, a aktualna ich liczba zależy od warunków inkubacji limfocytów. Dla wyjaśnienia zasad funkcjonowania receptorów muskarynowych zaproponowano model dynamicznej równowagi pomiędzy receptorami nowo syntezowanymi a receptorami ulegającymi degradacji. Nasuwa się przypuszczenie, że obserwowane zmiany w liczbie receptorów muskarynowych eksponowanych na powierzchni limfocyta mogą wyrażać jego aktualną wrażliwość na pojawiający się neurohormon.



IX. P I Ś M I E N N I C T W O

1. Ader R. /1981/, Behavioral influences on immune responses. W Perspectives on Behavioral Medicine ,ed.Weiss S.M. Herd J.A., Fox B.H., pp. 163- 182 .
2. Aguilar J.S., Criado M., De Robertis E. /1979/, Pre- and postsynaptic localization of central muscarinic receptors. Eur. J. Pharm. 57, 227-230 .
3. Anholt R., Lindstrom J. and Montal M. /1981/, Solubilization of acetylcholine receptor channels by lipids in cholate solution and during reconstitution in vesicles. J. Biol. Chem. 256, 4377-4387 .
4. Anholt R. /1981/, Reconstitution of acetylcholine receptors in model membranes. Trends in Bioch. Sci. 6/11/, 288-291 .
5. Barlow R.B., Burston K.N. and Vis A., /1978/, Three types of muscarinic receptors ? Proc.of the Brit. Pharm. Soc. 1978, 142 P .
6. Baxter J.D., and Funder J.W. /1979/, Hormone receptors. New Engl. J. Med. 301/21/, 1149-1161 .
7. Ben-Barak J., Dudai Y. /1979/, Cholinergic binding sites in rat hippocampal formation : properties and ontogenesis. Brain Res. 166, 245-257 ,
8. Besedovsky K.O., Da Prada M., Rey A., Sorkin E. /1981/, Immunoregulation by sympathetic nervous system. Trends in Pharm. Sci. 2/9/, 236-238 .
9. Bourne H.R., Lichtenstein L.M., Melmon K.L., Henney C.S., Weinstein Y. and Shearer G.M. /1974/, Modulation of inflammation and immunity by cyclic AMP. Science 184, 19-28



10. Burgoyne R.D. /1980/, A possible role of synaptic membrane protein phosphorylation in the regulation of muscarinic acetylcholine receptors. *Febs Letters*, 122/2/, 288-292 .
11. Burgoyne R.D. /1981/, The loss of muscarinic acetylcholine receptors in synaptic membranes under phosphorylating conditions is dependent on calmodulin. *Febs Letters*, 127/1/, 144-148 .
12. Cash D.J., Hess G.P. /1980/, Molecular mechanism of acetylcholine receptor - controlled ion translocation across cell membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* , 77/2/, 842-846 .
13. Cuatrecasas P. /1975/, Hormone receptors - their function in cell membranes and some problems related to methodology. W *Advances in Cyclic Nucleotide Research* , ed. Drummond G.I., Greengard P. and Robinson G.A., Raven Press, New York, vol.5, pp 79-104 .
14. Cuatrecasas P. and Hollenberg M.P. /1976/, Membrane receptors and hormone action. *Adv. Protein Chem.* 30, 251-451 .
15. Danysz A. /1977/, *Farmakologia ogólna*. W *Farmakologia PZWL* , Warszawa, P.26 .
16. Devine-Strander C.B., Revel J.P. and Raftery M.A. /1979/, Demonstration of the transmembrane nature of the acetylcholine receptor by labeling with anti-receptor antibodies. *J. Cell. Biology*, 83, 499-510 .
17. Dunn S.M.J., Blanchard S.G., Raftery M.A., /1980/, Kinetics of carbamylcholine binding to membrane bound acetylcholine receptor monitored by fluorescence changes of a covalently bound probe. *Biochemistry*, 19/24/,



18. Estensen R.D. /1973/, Cyclic GMP and cell movement. Nature, 245, 458-460 .
19. Fuchs S., Schmidt-Hopfeld I., Tridente G. and Tarrab - hazdai R. /1980/, Tymic lymphocytes bear a surface antigen which cross-reacts with acetylcholine receptor. Nature, 278 /5778/, 162-164 .
20. Galant S.P., Lundak R.L., Eaton L. /1976/, Enhancement of early human rosette formation by cholinergic stimuli. J. Immunol., 117, 48-51 .
21. Gaginella T.S., Rimele T.J., O'Dorisio T.M. and Dorff R.J., /1981/, Pharmacological identification of muscarinic receptors in the pylorus of the cat by binding of <sup>3</sup>H-Quinuclidinyl benzilate. Life Sci. 26/19/, 1599-1608.
22. Gavin III J.R., Gorden P., Roth J., Archer J.A. and Buell J.B.C., /1973/, Characteristics of the human lymphocyte insulin receptor. J. Biol. Chem. 248, 2202-2207.
23. George W.J., Polson J.G., O'Tode A.G., Goldberg N.D. /1970/, Elevation of guanosine 3'-5' cyclic phosphate in rat heart after perfusion with acetylcholine. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 66, 398- 403.
24. Giraudat J. and Changeux J.P. /1980/, The acetylcholine receptor. Trends in Pharm. Sci. 1/4/, 198-202.
25. Goldberg N.D. Haddox M.K., Hartle D.K. and Hadden J.W. /1973/, The biological role of cyclic 3'-5' guanosine monophosphate. W Proceedings of the Fifth International Congress of Pharmacology, ed. Karger S., Basel, Vol.5, pp146-169.



26. Gordon M.A., Cohen J.J. and Wilson I.B. /1978/,  
Muscarinic cholinergic receptors in murine lymphocytes.  
Demonstration by direct binding. Proc. Natl. Acad. Sci.  
USA. 75/6/, 2902-2904 .
27. Grąbczewska E., Krzystyniak K., Ryżewski J./1979/,  
Cholinergic stimulation of lymphocytes in vitro.  
Bull. Acad. Pol. Sci. CL II, 27/10/, 83-87.
28. Gurvitz D. and Sokolovsky M. /1980/, Induced intercon-  
version of agonist affinity states in muscarinic  
receptor from mice brain ; effects of temperature and  
sugars. Biochem. Biophys. Res. Commun. 94, 493-500 .
29. Gurvitz D., Sokolovsky M., Galvon R. /1980/, Muscarinic  
receptor binding in mouse brain; regulation by guanine  
nucleotides. Biochem. Bophys. Res. Commun. 94, 487-492.
30. Hadden J.W., Hadden E.M. and Goldberg N.D. /1974/,  
Cyclic AMP, cell growth and the immune response.  
ed. Braun W., Lichtenstein L.M., Parker C.W., Springer  
Verlag. New York. pp.237-246.
31. Hadden J.W., Hadden E.M., Haddox M.K., Goldberg N.D.  
/1972/, Guanosine 3'-5' cyclic monophosphate : a possible  
intracellular mediator of mitogenic influences in  
lymphocytes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 69, 3024 -3029.
32. Hadden J.W., Johnson E.M., Hadden E.M., Coffey R.G. and  
Johnson L.D. /1975/, Cyclic GMP and lymphocyte activa-  
tion. W Immune Recognition. ed. Rosenthaler A.S.  
pp. 359-390,
33. Hadden J.W., Hadden E.M., Johnson L.D., Johnson E.M.,  
/1975/, Cyclic nucleotides in lymphocytes function  
and metabolism. W Lymphocytes and their interactions.



- ed. Williams R.C. Raven Press. New York. pp. 27-55.
34. Haga T. /1980/, Molecular size of muscarinic acetylcholine receptors of rat brain. *Febs Letters* 113/1/, 68 - 72,
35. Haga T. /1980/, Solubilization of muscarinic acetylcholine receptors by L -  $\alpha$ -Lysophosphatidylcholine. *Biomedical Res.* 1, 265-268.
36. Hall N.R., Goldstein A.L. /1981/, Neurotransmitters and the immune system. W Psychoneuroimmunology. ed. Ader R. Academic Press. pp. 521-543 .
37. Heilbronn E. and Bartfai T. /1978/, Muscarinic acetylcholine receptor. *Progress in Neurobiology* 11, 171-188.
38. Hollenberg M.D. /1979/, Hormone receptor interactions at the cell membrane. *Pharmacological Reviews* Vol.30/4/, 393- 409.
39. Hucho F. /1981/, The nicotinic acetylcholine receptor. *Trends in Bioch.Sci.* 6/9/, 242-244.
40. Hucho F., Schiebler W. /1980/, Reconstitution of active acetylcholine receptor by hybridisation of binding site - blocked with ion channel-blocked acetylcholine receptor protein. *Bioch. Biophys. Acta* 597, 626-630.
41. Kahn C.R. /1976/, Membrane receptors for hormones and neurotransmitters. *J. Cell Biol.* 70, 261-286.
42. Kato G., Agid Y. /1979/, Les récepteurs de l'acetylcholine. *La Nouvelle Presse Médicale.* 8/29/, 2407-2411.
43. Klimenko V.M. /1972/, Study of multiple neuronal mechanisms of hypothalamic regulation of immune reactions in rabbits. *Avtoref, Kand. Diss. B.*
44. Kloog Y., Sachs D.I., Korczyn A.D., Heron D.S. and Sokolovsky M. /1979/, Muscarinic acetylcholine receptors



- in cat iris. *Biochem. Pharmacol.* 28, 1505-1511.
45. Korneva E.A. /1976/, Neurohormonal regulation of immunological homeostasis. *Fizjologia Cheloveka* 2/3/, 469-481.
46. Korneva E.A. and Khai L.M. /1963/, Effect of destruction of areas within the hypothalamic region on the process of immunogenesis. *Fiziologicheskii Zh. SSSR*, 49 /1/, 42-48 .
47. Korneva E.A. and Khai L.M. /1967/, Effect of the stimulation of different structures of mesencephalon on the course of immunological reactions. *Fiziol. Zh. SSSR, IM. Sechnova* 53/1/, 42-47.
48. Korneva E.A. and Klimenko V.M. /1976/, Neuronale Hypothalamus aktivität und Homöostatische Reaktionen. *Ergebn. Exp. Med.* 23, 373-382.
49. Kuo J.F., Greengard P. /1970/, Cyclic nucleotide protein kinases. Isolation and purification of a protein kinase activated by guanosine 3'-5' - monophosphate. *J. Biol. Chem.* 245, 2493 -2499.
50. Lindstrom J., Merlie J. and Yogeewaran /1979/, Biochemical properties of acetylcholine receptor from Torpedo Californica. *Biochemistry.* 18, 4465-4470.
51. Lowry O.H., Rosebrough N.J. Farr A.L., Randall R.J., /1951/, Protein measurement with folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265-270.
52. Ländström I., Nylander C., /1981/, A possible model for receptors in excitable membranes. *J. Teor. Biol.* 88, 671-683.
53. Malbon C.C. /1979/, Avenues of adrenergic research. *J. Lab. Clin. Med.* 94 /3/, 381-386.



54. Marchbanks R.M. /1975/, Biochemistry of cholinergic neurons. W Handbook of Psychopharmacology. Vol.3 .  
- Biochemistry of Biogenic Amines. ed.Iversen L.L., Iversen S.D., Snyder S.H., Plenum Press. New York. pp.247-326.
55. Maśliński C., Karczewski W. /1957/, The protective influences of brain stimulation by electric currents on histamine shock in guinea pigs. Bull. Acad. Pol. Sci. 5, 57-62.
56. Melmon K.L., Bourned H.R., Weinstein Y. Shearer G.M., Bauminger S. and Kram J. /1974/, Hemolytic plaque formation by leucocytes in vitro : control by vasoactive hormones. J. Clin. Invest. 53, 13-21.
57. Moreno-Yanes J.A., Mahler H.R./1979/, Muscarinic cholinergic receptors in goldfish retina. Life Sci. 24 /19/, 1787-1792.
58. Parascandola J. /1989/, Origins of the receptor theory. Trends in Pharmacol.Sci. 1 /3/, 189-192.
59. Plaut M., Lichtenstein L.M., Henney C.S. /1975/, Properties of a subpopulation of T cells bearing histamine receptors. J. Clin. Invest. 55, 856-862.
60. Raftery M.A., Hunkapiller M.W., Strader C.D., and Hood L.E. /1980/, Acetylcholine receptor - complex of homologous subunits. Science 208, 1454-1457.
61. Reynolds J.A. and Karlin A. /1978/,Molecular weight in detergent solution of acetylcholine receptor from *Torpedo Californica*. Biochemistry, 17, 2035-2038.
62. Richman D.P. and Arnason B.G.W./1979/,Nicotinic acetylcholine receptor : Evidence for a functionally distinct



- receptor on human lymphocytes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76/9/, 4632-4635.
63. Rossini L. /1981/, Reclassifying cholinergic receptors. Trends in Pharmacol. Sci. 2/9/, I-V.
64. Ryzewski J. /1968/, Influence of the vegetative nervous system on the course of the Homologous disease in F<sub>1</sub> Hybrid Rats. Bull. Acad. Pol. Sci. 16/3/, 153-156.
65. Scatchard G. /1949/, The attractions of proteins for small molecules and ions. Ann. N.Y. Acad. Sci. 51, 660-672.
66. Schreiner G.F., Unanue E.R. /1975/, The modulation of spontaneous and anti Ig- stimulated motility of lymphocytes by cyclic nucleotides and adrenergic and cholinergic agents. J. Immunol. 114, /2/, 802-808.
67. Shearer G.M., Melmon K.L., Weinstein Y, and Sela /1972/, Regulation of antibody response by cells expressing histamine receptors. J. Exp. Med. 136, 1302-1307.
68. Siman R.G., Klein W.L. /1979/, Cholinergic activity regulates muscarinic receptors in central nervous system cultures. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 76/8/, 4141-4145.
69. Singer S.J., Nicolson G.L. /1972/, The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. Science, 175, 720-731.
70. Singh U. /1979/, Effect of catecholamines on lymphopoesis in fetal mouse thymic explants. J. Anat. 129, 279-292
71. Singh U. and Owen J.J.T. /1976/, Studies on the maturation of thymus stem cells. The effects of catecholamines, histamine and peptide hormones on the expression of T-cell alloantigens. Eur. J. Immunol. 6, 59-62.



72. Smythies J.R. /1980/, An hypothesis concerning the molecular structure of the nicotinic acetylcholine receptor. *Medical Hypotheses* 6, 943-950.
73. Sokolovsky M., Bartfai T. /1981/, Biochemical studies on muscarinic receptors. *Trends in Biochem.Sci.* 6/11/, 303-305 .
74. Sokolovsky M., Gurwitz D. /1980/, Agonist-specific reverse regulation of muscarinic receptors by transition metal ions and guanine nucleotides. *Bioch. Biophys. Res. Commun.* 96, 1296- 1305 .
75. Spector N.H. /1980/, The central state of the hypothalamus in health and disease. W *Handbook of the Hypothalamus.* ed.Morgane P., Panksy J., Dekker. New York. Vol.2 452-517.
76. Stein M., Schleifer S., Keller S.E., /1980/, Hypothalamic influences on immune responses. W *Psychoneuroimmunology.* ed. Ader R. Academic Press. New York. pp.429-447.
77. Strom T.B., Carpenter C.B., Garovoy M.R., Austen F.K., Merrill J.P. and Kaliner M /1973/, The modulating influence of cyclic nucleotides upon lymphocyte-mediated cytotoxicity. *J. Exp. Med.* 138, 381-395.
78. Strom T.B., Disseroth A., Morganroth J., Carpenter C.B. and Merrill J.P. /1972/, Alteration of the cytotoxic action of sensitized lymphocytes by cholinergic agents and activators of adenylate cyclase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 69, 2995-2999.
79. Strom T.B., Sytkowski A.J., Carpenter C.B. and Merrill J.P. /1974/, Cholinergic augmentation of lymphocyte mediated cytotoxicity. A study of the cholinergic receptor of cytotoxic T lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*



- 71, 1330 - 1333.
80. Szentivanyi A. and Szekely J. /1958/ Anaphylaxis and the nervous system. Part IV. Ann. Allergy, 16, 389-392.
81. Szentivanyi A. and Fillipp G. /1958/, Anaphalaxis and the nervous system. Part II. Ann. Allergy 16, 143-151.
82. Taylor R.L., Albuquerque M.L.C. , Burt D.R./ 1980/, Muscarinic receptors in Pineal. Life Sci. 26/25/, 2195-2200.
83. Tell G.P., Haour F. and Saez J.M. /1978/, Hormonal regulation of membrane receptors and cell responsivness. A review. Metabolism 27/10/, 1566-1592.
84. Tyrey and Nalbandov V. /1972/, Influence of anterior hypothalamic lesions on circulating antibody titers in the rat. Am.J. Physiol. 222/2/, 179-185.
85. Vekshina N.L. and Magaera S.V. /1974/, Changes in the serotonin concentration in the limbic structure of the brain during immunisation. Bull. Exp. Biol. Med. 77, 625-627.
86. Watson J., Epstein R., Cohn M. /1973/, Cyclic nucleotides as intracellular mediators of the expression of antigen sensitive cells. Nature 246, 405-409.
87. Weistein Y., Chambers D.A., Bourne H.R., Melmon K.L., /1974/, Cyclic GMP stimulates lymphocyte nucleic acid synthesis. Nature 251, 352-353.
88. Wu C.S.W., Raftery M.A., /1981/, Reconstitution of acetylcholine receptor function using purified receptor protein. Biochemistry, 20/4/, 694-701.



89. Yamamura H.J. /ed./ /1978/, Neurotransmitter receptor binding . Raven Press. New York.
90. Yamamura H.I. and Snyder S.H /1974/, Muscarinic cholinergic binding in rat brain. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 71/5/, 1725-1729.