

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA BIOLOGIJO

Darko PEROVŠEK

**ELEKTROFIZIOLOŠKI, ELEKTROKEMIJSKI IN
METABOLIČNI ODZIVI MODELNEGA
SUPERPOZICIJSKEGA IN APOZICIJSKEGA OČESA
ŽUŽELK NA SPREMEMBO PARCIALNEGA TLAKA
KISIKA**

MAGISTRSKO DELO

Ljubljana, 2008

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA BIOLOGIJO

Darko PEROVŠEK

**ELEKTROFIZIOLOŠKI, ELEKTROKEMIJSKI IN METABOLIČNI
ODZIVI MODELNEGA SUPERPOZICIJSKEGA IN APOZICIJSKEGA
OČESA ŽUŽELK NA SPREMEMBO PARCIALNEGA TLAKA KISIKA**

MAGISTRSKO DELO

**ELECTROPHYSIOLOGICAL, ELECTROCHEMICAL AND
METABOLICAL RESPONSE OF MODEL SUPERPOSITIONAL AND
APOSITIONAL INSECT EYE ON DIFFERENCE OF PARTIAL
OXYGEN PRESSURE**

M. SC. THESIS

Ljubljana, 2008

Magistrska naloga je zaključek magistrskega študija biologije. Opravljeno je bilo na Katedri za fiziologijo živali Oddelka za biologijo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani. Vsi poskusi so bili opravljeni v laboratoriju za fiziologijo vida Katedre za fiziologijo živali.

Studijska komisija Oddelka za biologijo je za mentorja magistrskega dela imenovala doc. dr. Petra Stuška ter somentorja doc. dr. Gregorja Zupančiča.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik:	prof. dr. Kazimir DRAŠLAR Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo
Mentor:	doc. dr. Peter STUŠEK Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo
Somentor:	doc. dr. Gregor ZUPANČIČ Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo
Član:	prof. dr. Marko HAWLINA Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta

Datum zagovora:

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Darko Perovšek

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

- ŠD Dn
DK 591.1:595.7(043.2)=163.6
KG /metabolni stres/dihalna veriga/fototransdukcija/žuželke/absorpcijka spektroskopija/ elektrokemijske meritve/elektrofiziološke meritve
KK
AV PEROVŠEK, Darko univ.dipl.biol.
SA STUŠEK, Peter (mentor)/ZUPANČIČ, Gregor (somentor)
KZ SI-1000 Ljubljana, Večna pot 111
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo
LI 2007
IN ELEKTROFIZIOLOŠKI, ELEKTROKEMIJSKI IN METABOLIČNI ODZIVI MODELNEGA SUPERPOZICIJSKEGA IN APOZICIJSKEGA OČESA ŽUŽELK NA SPREMEMBO PARCIALNEGA TLAKA KISIKA
TD Magistrsko delo
OP VIII, 74 str., 55 sl., X vir.
IJ sl
JI sl/en
AI Fotoreceptorske celice so visoko aktivne in potrebujejo veliko metabolne energije. Ob pomanjkanju le te, kot naprimer v metabolnem stresu kot je hipoksija, pride do odprtja TRP kanalov na fotoreceptorjih, kar povzroči depolarizacijo membrane pri dipterih (muhah in vinskih mušicah). Da bi ugotovili kakšna je vloga odprtja kanalov v metabolnem stresu pri normalnih fizioloških pogojih in ali je to splošen princip pri vseh žuželkah, smo združili nekaj elektrokemijskih in svetlobnih metod merjenja, ki smo jih opravili na vrstah *Ascalaphus Macaronius* – Metuljčnica in muhi *Calliphora vicina* (belooka mutanta). S hkratnim merjenjem stanja dihalne verige z metodo absorpcijske spektroskopije, elektroretinograma (ERG) in merjenja koncentracij posameznih ionov K^+ , Na^+ in Ca^{2+} z ionsko selektivnimi elektrodami, ob aplikaciji N_2 atmosfere – hipoksija, smo prišli do naslednjih zaključkov. Do odprtja TRP kanalov pride pri 30-50% reduciranosti dihalne verige, do česar pripelje le huda dolgotrajna hipoksija. Do takšnega stanja v normalnih fizioloških pogojih ne prihaja, zato metabolni stres ne pripomore k odprtju TRP kanalov v normalnih fizioloških pogojih. Kljub nekaterim razlikam v časovnih dogodkih med vrstama, lahko o fenomenu odprtja TRP kanalov kot posledici metabolnega stresa, skoraj zagotovo trdimo, da gre za splošen princip aktivacije TRP kanalov zaradi metabolnega stresa pri žuželkah.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dd
DC 591.1:595.7(043.2)=163.6
CX /metabolic stress/respiratory chain/fototransduction/insects/absorption spectroscopy/ electrochemical measurements/electrophysiological/measurements
CC
AU PEROVŠEK, Darko
AA STUŠEK, Peter (mentor)/ZUPANČIČ, Gregor (co mentor)
PP SI-1000 Ljubljana, Večna pot 111
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Biology
PY 2007
TI ELECTROPHYSIOLOGICAL, ELECTROCHEMICAL AND METABOLICAL RESPONSE OF MODEL SUPERPOSITIONAL AND APPOSITIONAL INSECT EYE ON DIFFERENCE OF PARTIAL OXYGEN PRESSURE
DT M.Sc. Thesis
NO VIII, 74 pag., 54 pict., X ref.
LA sl
AL sl/eng
AB Photoreceptor cells are highly active, therefore they need a lot of metabolic energy. When they are in energetic deficit like in metabolic stress-hypoxia, photoreceptor TRP channels opens, and the result is the depolarization of photoreceptor membrane with Diptera (Flies and Drosophilae). To reveal the role of TRP channel opening under metabolic stress in normal physiological conditions and to acknowledge if this is a widely spread principle with all the insects, we combined some electrochemical and spectrophotometrical measuring methods. The experiments were carried out on owl-fly *Ascalaphus Macaronius* and on fly *Calliphora vicina* (white eye mutant). With simultaneous absorption spectroscopy measuring of reductional state of respiratory pigments, electroretinogram measuring and electrochemical measuring of K^+ , Na^+ and Ca^{2+} concentrations with ion selective electrodes in normal and anoxic conditions, we came to some conclusions. The opening of TRP channels is accompanied with 30-50% of reduction in respiratory pigments chain. For this high reduction state a long term strong hypoxia is needed. That kind of hypoxia level is never reached under normal physiological conditions, therefore metabolic stress does not contribute to TRP channel opening under normal conditions. Despite some differences between both species in time courses of TRP channel opening under metabolic stress we can be almost certain, that this is a widely spread general mechanism of TRP channel activation in insects

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA.....	III
KEY WORDS DOCUMENTATION.....	IV
KAZALO VSEBINE.....	V
KAZALO SLIK.....	VII
KAZALO PRILOG.....	X
1. UVOD:	1
1.1. Fototransdukcija	1
1.2. Struktura apozicijskega in superpozicijskega očesa.....	5
1.3. Fototransdukcija in metabolični stres.....	11
2. MATERIAL IN METODE	15
2.1. Poskusne živali in njihova priprava	15
2.2. Omogočanje kontrole P_{O_2} in vzpostavitev anoksije	16
2.2.1. Vzpostavitev anoksije	16
2.2.2. Omogočanje kontrole P_{O_2}	18
2.3. Svetlobna stimulacija	19
2.4. Spektrofotometrija.....	21
Slika 14. Diferenčni spektri; vir: A method for dynamic spectrophotometric measurements in vivo using principal component analysis-based spectral deconvolution (Zupančič G. 2003; Pflugers Arch. Eur. J. Physiol.; vol. 447, št. 1, str. 113).....	23
2.5. Električne in elektrokemijske meritve.....	24
2.5.1. Izdelava elektrod	24
2.5.1.1. Indiferentna elektroda	24
2.5.1.2. Diferentne ERG elektrode	24
2.5.1.3. Ionsko selektivne elektrode	25
2.5.2. Ionsko selektivne elektrode in merjenje koncentracij posameznih ionov	25
2.5.3. Beleženje ionskih ter električnih sprememb	28
2.6. Postavitev poskusov in poteki protokolov	29
2.8. Obdelava rezultatov.....	31
3. NAMEN DELA.....	32
4. REZULTATI.....	33
4.1. Elektoretinografija	33
4.1.1. Vpliv prehoda me anoksičnimi in atmosferskimi pogoji na ERG pri vrstah <i>Ascalaphus macaronius</i> in <i>Calliphora vicina</i> (white eye mutant)	33
4.1.2. Vpliv deleža kisika na velikost odgovora ERG pri vrstah <i>Ascalaphus macaronius</i> in <i>Calliphora vicina</i> (white eye mutant)	37
4.2. Spremljanje koncentracij ionov s sočasnim spremljanjem oksidoredukcijskega stanja dihalnih pigmentov.....	39

4.2.1 Hkratno spremljanje stanja dihalne verige ter električnih in kemijskih dogajanj pri prehodu v anoksijo ter ponovnem prehodu v atmosfersko-normalno stanje pri muhi vrste <i>Calliphora vicina</i> (white eye mutant)	39
4.2.2. Zakasnitve sprememb koncentracij ionov ob vzpostavitvi anoksičnih pogojev in ponovnem prehodu v normalne - atmosferske pogoje.	43
4.2.3. Vrednotenje koncentracijskih sprememb pri posameznih ionih med različnimi protokoli pri prehodu v anoksične pogoje ter ponovni vzpostavitvi normalnih – atmosferskih pogojev.	46
4.2.4. Čas T-0,9 je čas pred in po anoksiji ob katerem se koncentracija iona spremeni za 0,9-krat maksimalne vrednosti konc.spremembe.	53
4.2.5. Stanje dihalnega pigmenta citC v časovni točki spremembe koncentracije iona ob prehodu v anoksično stanje in vrnitvi v normalne – atmosferske pogoje.	56
4.3. Spremljanje ionskih sprememb pri Metuljčnici <i>Ascalaphus macaronius</i>	58
4.4. Dvojna kinetika spremembe koncentracije K-ionov v temi ob prehodu v anoksijo pri muhi vrste <i>Calliphora vicina</i> (white eye mutant).	64
5. RAZPRAVA	65
5.1. Elektoretinografija	66
5.1.1. Spremljanje vplivov prehodov med anoksičnimi in atmosferskimi pogoji na odgovarjanje fotoreceptorskih celic z elektoretinografijo pri vrstah <i>Ascalaphus macaronius</i> in <i>Calliphora vicina</i> (white eye mutant)	66
5.1.2. Vpliv deleža kisika na velikost odgovora ERG pri vrstah <i>Ascalaphus macaronius</i> in <i>Calliphora vicina</i> (white eye mutant)	66
5.2. Spremljanje koncentracij ionov s sočasnim spremljanjem oksidoredukcijskega stanja dihalnih pigmentov pri muhi vrste <i>Calliphora vicina</i> (white eye mutant).....	67
Vrednotenje koncentracijskih sprememb pri prehajanju v in iz anoksičnega stanja.....	69
5.3. Spremljanje ionskih sprememb pri Metuljčnici <i>Ascalaphus macaronius</i>	70
5.4. Dvojna kinetika spremembe koncentracije K-ionov v temi ob prehodu v anoksijo pri muhi vrste <i>Calliphora vicina</i> (white eye mutant).	71
6. POVZETEK	73
7. VIRI.....	74
8. PRILOGE	77

KAZALO SLIK

Slika 1. Fotorekonverzija rodopsina pri žuželkah	2
Slika 2. Proces fototransdukcije pri žuželkah	4
Slika 3. Trije gradbeni tipi sestavljenih oči	6
Slika 4. Omatidij muhe	6
Slika 5. Shema odprtega rabdoma muhe A; ter zlitega rabdoma Metuljčice B	7
Slika 6. Razporeditev fotoreceptorskih celic pri muhi	7
Slika 7. Shema zgradbe superpozicijskega omatidija metuljčice	8
Slika 8. Shema nevralnega superpozicijskega očesa.	10
Slika 9. Spektralna občutljivost rodopsina (R) in metarodopsina (M)	10
Slika 10. Kamrica s pritrjeno poskusno živaljo	16
Slika 11. Shema sistema za vzpostavitev anoksije	18
Slika 12. Shema sistema kontrole P_{O_2}	19
Slika 13. Shema postavitve sistema za svetlobno draženje	20
Slika 14. Diferenčni spektri	23
Slika 15. Odštevanje referenčnega in diferenčnega časovnega poteka pri 540 nm valovne dolžine	24
Slika 16. Graf prikaza napetosti Na elektrode v koncentracijskih vrstah Na, K in Ca raztopin	26
Slika 17. Graf prikaza napetosti K elektrode v koncentracijskih vrstah Na, K in Ca raztopin	26
Slika 18. Graf prikaza napetosti Ca elektrode v koncentracijskih vrstah Na, K in Ca raztopin	27
Slika 19. Shema postavitve beleženja ionskih in električnih sprememb	29
Slika 20. Prikaz celotnega posnetka aplikacije anoksičnih pogojev pri muhi	33
Slika 21. Prikaz enega od odgovorov pri muhi v anoksiji z označeno merjeno amplitudo	34
Slika 22. Prikaz ugašanja amplitude ERG po vzpostavitvi anoksičnih pogojev pri muhi	34
Slika 23. Vrnitev odgovora in večanje njegove amplitude po prenehanju anoksije	35
Slika 24. Prikaz ugašanja in pojavljanja odgovorov pri omenjenih vrstah	36
Slika 25. Prikaz upadanja velikosti ERG v odvisnosti od deleža O_2	37
Slika 26. Prikaz velikosti normirane amplitude ERG v odvisnosti od deleža O_2 pri muhah in Metuljčnicah	38
Slika 27. Prikaz poteka poskusa pri muhi v svetlobi	40
Slika 28. Prikaz poteka poskusa pri muhi s svetlobnimi pulzi v intervalih po 4 sekunde	41
Slika 29. Prikaz poteka poskusa v temi	42

Slika 30. Prikaz zakasnitve spremembe koncentracije K^+ ionov v temi ob prehodu v anoksijo in ponovni vzpostavitvi normalnih atmosferskih pogojev.	43
Slika 31. Prikaz vrednosti zakasnitev spremembe posameznih ionov pri svetlobi, pulzih in temi ob prehodu v anoksijo.	44
Slika 32. Histogram prikazuje čase zakasnitev spremembe koncentracije ionov ob prehodu iz anoksije v normalne – atmosferske pogoje	45
Slika 33. Merjeni parametri spremembe koncentracije ionov	46
Slika 34: Merjena parametra-sprememba koncentracije Δ_1 in Δ_2	47
Slika 35. Statistično dokazljive razlike v spremembi koncentracije parametra Δ_1 med protokoli pri posameznih ionih.	48
Slika 36. Histogram statistično dokazljivih razlik v spremembi koncentracije (parameter Δ_2) med protokoli pri posameznih ionih.	48
Slika 37. Merjena parametra-sprememba koncentracije Δ_3 in Δ_4 .	49
Slika 38. Parameter Δ_3 predstavlja svetlobno obremenitev sistema pred anoksijo	50
Slika 39. Parameter Δ_4 predstavlja svetlobno obremenitev sistema po anoksiji	50
Slika 40. Prikaz merjenih parametrov Δ_5 in Δ_6	51
Slika 41. Parameter Δ_5 - koncentracijska razlika med "platojem" ter "overshoot"-om koncentracije iona pred anoksijo	52
Slika 42. Parameter Δ_6 koncentracijska razlika med "platojem" ter "overshoot"-om koncentracije iona po anoksiji	52
Slika 43. Združeni protokoli teme svetlobe in pulzov	53
Slika 44. Histograma prikaza časov ob katerih je bila dosežena 0,9-kratna vrednost maksimalne spremembe koncentracije	54
Slika 45. Histogram časov doseganja 0,9krat maksimalna sprememba po koncu anoksije.	55
Slika 46. Slika stanja dihalnega pigmenta cytC v času spremembe koncentracije posameznega iona	56
Slika 47. Histogram stanja (oziroma reduciranosti) dihalnega pigmenta cytC v trenutku ko pride do spremembe koncentracij posameznih ionov pri različnih protokolih, ob prehodu v anoksično stanje	56
Slika 48. Histogram stanja (oziroma reduciranosti) dihalnega pigmenta cytC v trenutku ko pride do spremembe koncentracij posameznih ionov pri različnih protokolih, ob ponovnem prehodu v normalno atmosfersko stanje	57
Slika 49: Časovni potek spremembe koncentracije K^+ ionov pri Metuljčnici pri treh protokolih (pulzi, svetloba in tema)	59
Slika 50. Časovni potek spremembe koncentracije Na^+ ionov pri Metuljčnici pri treh protokolih (pulzi, svetloba in tema)	60
Slika 51. Časovni potek spremembe koncentracije Ca^{2+} ionov pri Metuljčnici pri treh protokolih (pulzi, svetloba in tema)	61

Slika 52. Latenca spremembe K^+ iona pri Metuljčici (rumena barv), dodana v histogram latenc pri muhi ob prehodu v anoksično stanje.	62
Slika 53. Latenca spremembe K iona pri Metuljčici (rumena barva), ki smo jo dodali v histogram latenc pri muhi ob prehodu iz anoksičnega stanja	62
Slika 54. Vrednost maksimalne amplitude spremembe K iona pri Metuljčici (rumeno označeno), ki smo jo dodali v odgovarjajoč histogram pri muhi	63
Slika 55. Časovni potek spremembe koncentracije K^+ ionov v temi, kjer je lepo opazna dvojna kinetika spremembe koncentracije K^+ ionov po prehodu v anoksijo	64

KAZALO PRILOG

Latenca spremembe koncentracij ionov (Sliki 31 in 32).....	77
Δ_1 in Δ_2 (Sliki 35 in 36).....	77
Δ_3 in Δ_4 (Sliki 38 in 39).....	77
Δ_5 in Δ_6 (Sliki 41 in 42).....	78
T09 (Sliki 44 in 45).....	78
Vrednost CitokromaC ob spremembi koncentracije iona (Sliki 47 in 48).....	78
Ascalaphus latence spremembe koncentracije ionov (Sliki 52 in 53).....	79
Ascalaphus Δ_1 (Slika 54).....	79

1. UVOD:

Za večino vrst živali, razen za tiste, ki živijo v temnih okoljih, je najpomembnejša oblika informacije o okolju svetloba, ki je v primerjavi z ostalimi oblikami informacije potuje mnogo hitreje in omogoča visoko razmerje med signalom in šumom. Proces pretvorbe svetlobne informacije v obliko, razumljivo organizmu oziroma njegovemu živčnemu sistemu, imenujemo fototransdukcija. Svetloba ima relativno kratko valovno dolžino, kar omogoča, da so lahko senzorične strukture, ki svetlobo zaznavajo, majhne, vseeno pa omogočajo sprejem zelo natančne informacije iz okolja. Zaradi teh lastnosti je svetloba posebej pomemben vir informacij za živali, ki se hitro premikajo po tleh ali po zraku.

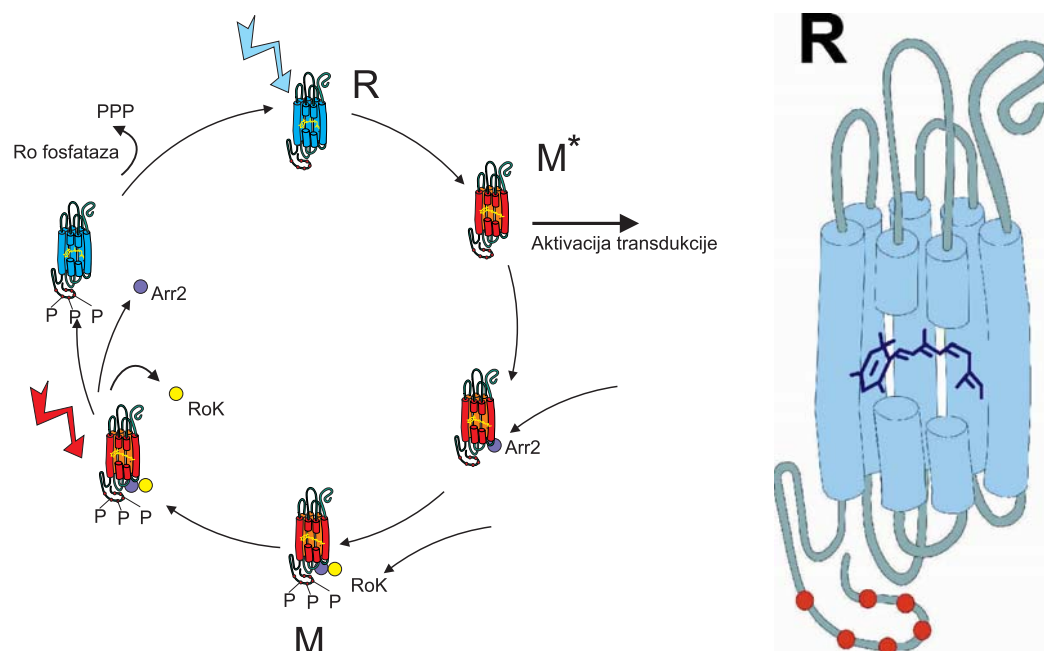
Oči žuželk sestavlja veliko število enakih enot – očesc, imenovanih omatidiji. Biokemijske procese sprememb na osvetljevanje se navadno študira na izoliranih celicah, samostojnih celicah ali delih celic. Zgradba žuželčjih oči nam omogoča študije procesov odzivov na svetlobo pri veliki populaciji enakih enot – očesc. Proces pretvorbe svetlobnih dražljajev iz okolja v električno vzburljenje fotoreceptorskih celic poteka pri žuželkah na način, ki je vsaj v prvi fazi podoben vretenčarskemu.

1.1. Fototransdukcija

Ključna molekula procesa fototransdukcije je tako pri žuželkah kot pri vretenčarjih rodopsin. To je molekula, ki je sorodna celi družini tako imenovanih GPCR receptorjev (G protein sklopljeni receptorji, angl.: G Protein Coupled Receptors) s sedmimi transmembranskimi regijami. Večina teh beljakovin je receptorjev za medcelične mediatorje (npr. hormone), pri katerih vezava liganda sproži aktivacijo G-beljakovine, ki zatem aktivira druge encime, kot so fosfolipaza C (PLC), adenilat ciklaza, fosfodiesteraza in druge. Edina razlika med rodopsinom in ostalimi GPCR receptorji je, da je pri rodopsinu ligand retinal, ki je že vezan na receptor. Ta po absorpciji fotona vidne svetlobe, ki izzove fotoizomerizacije retinala iz 11-cis v vse-trans obliko, pri žuželkah ostane vezan na receptor. To sproži konformacijsko spremembo v opsinu (beljakovinskem delu rodopsina). Aktiviran rodopsin imenujemo metarodopsin, ki povzroči aktivacijo G-beljakovine. Tako aktivirana G beljakovina vpliva na aktivnost vrste drugih encimov, ti pa na nastanek mediatorjev, ki vplivajo na ionsko prevodnost membrane.

Za razliko od fototransdukcijskega procesa pri žuželkah kjer retinal ostaja vezan na opsin, se pri vretenčarjih le ta po konformacijski spremembi odcepi od opsina in v nadaljnjem procesu spremeni v retinol. V tem sledi regeneracija in pa nastajanje novega rodopsina.

Pri žuželkah lahko pri rodopsinu (R) govorimo o tako imenovani fotorekonverziji (Slika 1.). Po absorpciji fotona nastaja metarodopsin (M^*), ki proži G-proteinsko kaskado. Njegova deaktivacija je tako pri vretenčarjih kot nevretenčarjih enaka in se prične z vezavo arestina (Arr), kateri sledi fosforilacija z rodopsinsko kinazo (RoK), ki povzroči inaktivacijo metarodopsina. Za končanje cikla fotorekonverzije pri žuželkah mora tako inaktiviran metarodopsin absorbirati nov foton. Absorpcijske lastnosti rodopsinov obeh oblik pri različnih nevretenčarjih se med seboj razlikujejo. Pri vrstah raziskovalnih objektov naloga je tako pri muhi absorpcijski vrh rodopsina (R) pri 490nm in metarodopsina (M) pri 580nm. Metuljčnica ima absorpcijske vrednosti drugačne: R – 350 nm in M – 470 nm. Po absorpciji le tega sledi odcepitev arestina in rodopsinske kinaze s čimer nastane rodopsin. Sledi še njegova defosforilacija, s čimer postane pripravljen na nov cikel aktivacije z absorpcijo naslednjega fotona.



Slika 1. Fotorekonverzija rodopsina pri žuželkah

Na nivoju metarodopsina, ki proži G proteisko kaskado, prihaja do močne ojačitve signala. Metarodopsin 2 pri vretenčarjih je sicer relativno nestabilna molekula, ki pa vseeno v svojem "kratkem" času aktivira tudi 1000 molekul G-beljakovine transducina ($G\tau$) v eni sekundi v kompleksu $G\tau$ /GDP, ki se tako spremeni v $G\tau$ /GTP, od katere se takoj odcepi molekula $G\tau\alpha$. Po dve taki molekuli se vežeta na inhibitorno podenoto encima cGMP-PDE (cGMP fosfodiesteraza), ki se odcepi, encim pa se na ta način aktivira. Aktivni encim je zadolžen za razgradnjo cGMP molekul, ki regulirajo aktivnost od cGMP odvisnih kanalčkov, ki prepuščajo Na^+ in Ca^{2+} v celico. Ravno tako kot molekula metarodopsina aktivira več molekul transducina, tudi molekula transducina pri vretenčarjih aktivira več molekul cGMP-PDE. Posledica je hidroliza več kot 100.000 molekul cGMP zaradi ene

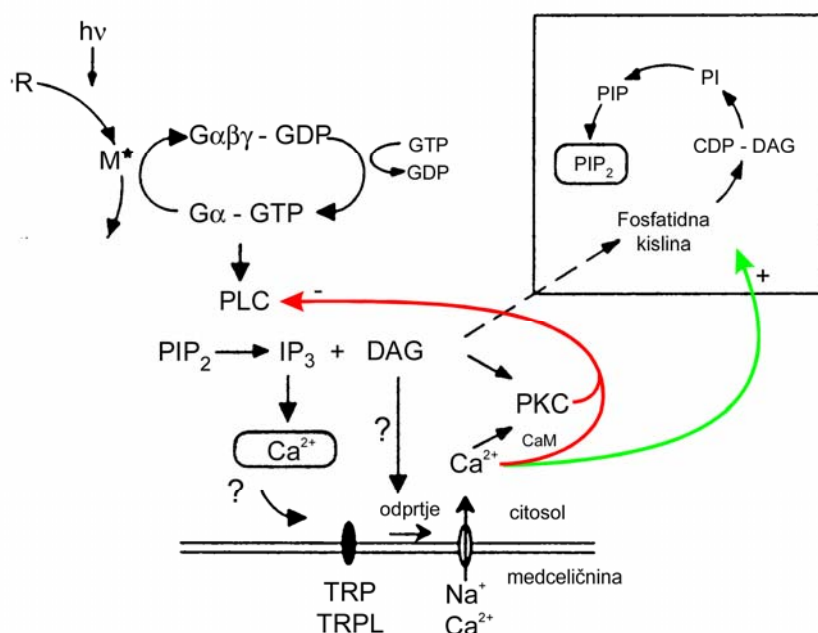
aktivirane molekule rodopsina 2. Na ta način je ojačanje prenosa informacije pri vretenčarjih večstopenjsko, s tem pa se hitrost sistema zmanjša. Tako pri vretenčarjih v temi 3 molekule cGMP vezane na cGMP kanal, vzdržujejo njegovo odprto stanje. V svetlobi se molekule cGMP razgradijo, kanali se zaprejo, celica pa se hiperpolarizira, kar je ravno obratno od depolarizacije membrane fotoreceptorja pri nevretenčarjih.

Pri žuželkah prisotnost metarodopsina povzroči zamenjavo na G-beljakovino vezanega gvanozin difosfata (GDP) z gvanozin trifosfatom (GTP), posledično se odcepita β in γ inhibitorni podenoti G-beljakovine, α podenota, ki ostane, pa je njegova aktivna oblika (slika 2.). Tako aktivirana G-beljakovina aktivira fosfolipazo C β (PLC β), ki cepi fosfoinozitol 4,5-bisfosfat (PIP $_2$), na znotrajcelični obveščevalni molekuli diacilglicerol (DAG) in inozitol trifosfat (IP $_3$). DAG je prekursor linolenske in arahidonske kisline (slednje samo pri vretenčarjih), ki nastaneta z delovanjem diacilglicerol lipaze. Kot kaže, večkrat nenasičen maščobne kisline (PUFA), kakršna je linolenska kislina, lahko neposredno povzroče odprtje TRP ("Transient Receptor Potential") in TRPL ("Transient Receptor Potential Like") kanalov, skozi katere vdreta Ca $^{2+}$ in Na $^+$, ki sta prisotna v izvencelični tekočini (slika 2.).

TRP kanali so široka skupina kanalov, najdenih v skoraj vseh živalskih vrstah. Skupino sestavlja sedem družin iz dveh strukturnih podskupin. Prva skupina zajema 5 družin TRPC, TRPV, TRPM, TRPN, TRPA z relativno visoko gensko sorodnostjo transmembranskih domen; ter drugo skupino z nižjo gensko sorodnostjo ter veliko zunajcelično zanko med 1 in 2 transmembransko domeno. Sestavljata jo družini TRPP and TRPML kanalov.

Ugotovljeno je bilo, da je prevodnost TRP kanalčkov za Ca $^{2+}$ 100x višja od prevodnosti za Na $^+$, prevodnost TRPL kanalčkov za Ca $^{2+}$ pa le 4x večja. Čeprav je prepustnost kanalčkov skoraj 100x večja za Ca $^{2+}$, pa je koncentracija Na $^+$ ionov v izvencelični tekočini približno 100x večja od koncentracije Ca $^{2+}$ ionov. S tem sta količini Na $^+$ in Ca $^{2+}$ ionov, ki preidejo membrano, približno izenačeni.

Ob hitrem naraščanju znotrajcelične koncentracije Ca $^{2+}$ in Na $^+$ ionov se membrana fotoreceptorskih celic depolarizira v nasprotju s hiperpolarizacijo pri vretenčarjih. Vloga inozitoltrifosfata (IP $_3$), ki pri procesu fototransdukcije sicer nastane, ni pojasnjena. Iz drugih celic je znano, da obstajajo na endoplazemskem retikulumu receptorji za IP $_3$, vendar z njihovo mutacijo niso dosegli opaznih razlik v amplitudi in časovnem poteku depolarizacije ali repolarizacije. (Reuss in sod. 1997, Raghu in sod. 2000 ter Hardie in sod. 2001).



Slika 2. Proces fototransdukcije pri žuželkah

Shema prikazuje potek aktivacije fototransdukcije. Nakazana je možnost aktivacije preko IP₃ molekule, katere vloga še ni pojasnjena. Prikazana je možna pot Ca²⁺ regulacije preko kalmodulina (CaM) in proteinske kinaze (PKC), ki zavirajo delovanje fosfolipaze. (Prirejeno po: Ranganathan in sod. 1995, Hardie in sod 2001.)

Ugotovili so, da je pomembna stopnja regulacije fototransdukcijske verige vezana na PLCβ. Delovanje tega encima namreč ob dovolj visoki koncentraciji zavirajo Ca²⁺ ioni. Na ta način je razgradnja PIP₂ in s tem nastanek diacilglicerola in inozitoltrifosfata upočasnjena. To preprečuje izpraznitev vseh zalog PIP₂ v plazemski membrani. Slednje se namreč zgodi pri *trp* mutantih, ki nimajo TRP kanalov. Vstop Ca²⁺ ionov je v tem primeru premajhen, da bi dovolj zavrl delovanje PLCβ, zato ta v najkrajšem času povsem izprazni zalogo PIP₂ v membrani. Posledica je le kratek napetostni tranzient (*trp*: »transient receptor potential«). Že obstoječe nenasičene maščobne kisline, ki odpirajo TRP in TRPL kanalčke, razgrajuje lipoksigenaza, aktivirana s Ca²⁺ ioni v visokih koncentracijah (Hardie in sod. 2001).

Vidni pigment, G-protein, PLCβ in kanalčki TRP ter TRPL so pri žuželkah lokalizirani v mikrovilih rabsomskega dela receptorskih celic. Protein INAD jih povezuje v signalne komplekse (signalplex), ti pa so preko proteina NINAC povezani z mikrovilarnim citoskeletom. Vse kaže, da posamezni mikrovili delujejo kot ekscitacijske enote, ki se na svetlobo odzivajo po principu vse ali nič. Svetloba s kvantnimi sunki (angl. quantum bumps) povzroči depolarizacijo, celotna depolarizacija receptorske celice pa je seštevek

vseh kvantnih sunkov. Od absorpcije fotona do odprtja prvega TRP kanala v mikrovilu lahko mine le 20 ms. Tako kratka latenca je posledica minimalnih difuzijskih razdalj (kot posledica združevanja v signalni kompleks), ki jih mora premagati aktivirana podenota G_{α} . Struktura kompleksa na ta način povečuje hitrost odziva, vendar pa hkrati za razliko od procesa pri vretenčarjih pomeni tudi izgubo ene stopnje ojačanja, ki je tako pri nevretenčarjih enostopenjsko.

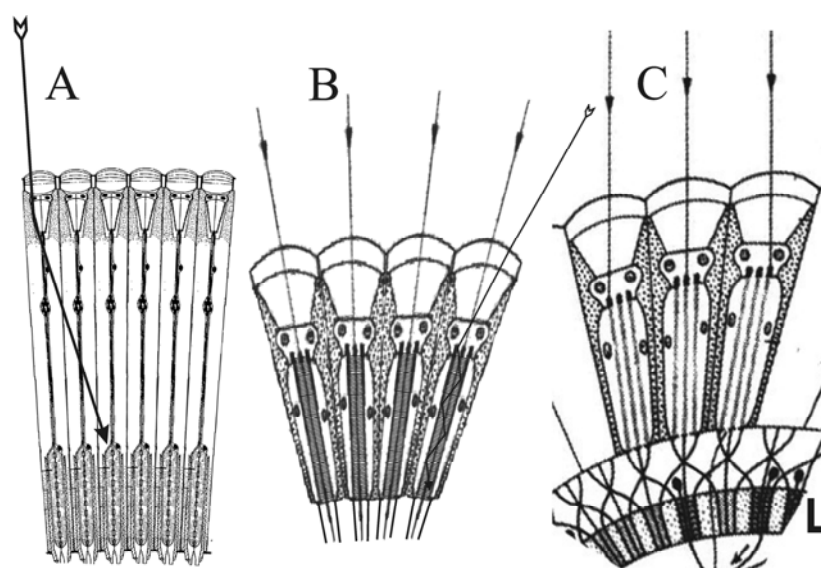
Vir energije za delovanje procesa fototransdukcije predstavlja univerzalni prenašalec energije ATP, ki nastaja večinoma v procesu oksidativne fosforilacije na notranji membrani mitohondrijev. Do dviga porabe ATP-ja v primeru žuželk prihaja ob osvetljevanju, na kar kaže do trikratni dvig porabe O_2 v očesu ob draženju s svetlobo (Pangršič in sod. 2005). Iz prej opisanega procesa fototransdukcije pri vretenčarjih pa opazimo, da se ob osvetljevanju torej aktivnem metarodopsinu 2, kompleks G_{τ} /GDP spreminja v G_{τ} /GTP, poraba O_2 pa zmanjša.

Za vse vrste vzdražnih celic, med katere seveda spadajo tudi fotoreceptorske celice, je značilen relativno visok metabolizem, ki ima posledično visoke zahteve po energiji. To se kaže tudi v "velikem številu mitohondrijev, prisotnih v fotoreceptorskih celicah.

Študije so pokazale, da se membrana fotoreceptorskih celic žuželk depolarizira v primeru svetlobnega draženja kot tudi v metabolnem stresu (anoksiji), ko mitohondriji ob odsotnosti O_2 , kot končnega prejemnika elektronov v dihalni verigi, prenehajo proizvajati ATP. Mehanizmi vpliva metabolnega stresa oziroma povezave mitohondrija in pa odprtja kanalov, torej depolarizacije membrane fotoreceptorske celice so delno razkriti, ni pa nam znano ali so ti mehanizmi vpleteni v normalen proces fototransdukcije. Dejstva vplivov metabolnega stresa in vprašanje povezave mitohondrijev s fototransdukcijsko kaskado so nas vzpodbudila k temeljitejši raziskavi poteka omenjenih procesov že v diplomski nalogi, ki pa je pustila kup neodgovorjenih vprašanj, ki so nas vodila k nadaljnjim natančnejšim raziskavam vplivov metabolnega stresa na časovni potek elektrokemijskih dogajanj pri fotoreceptorskih celicah nevretenčarjev.

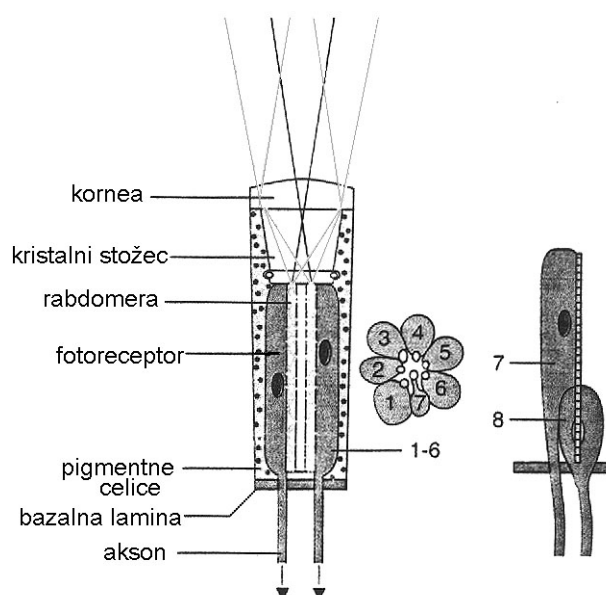
1.2. Struktura apozicijskega in superpozicijskega očesa

Pri žuželkah najdemo tri gradbene tipe sestavljenih oči: optično superpozicijskega, apozicijskega in nevravno superpozicijskega, ki po gradbenem tipu ustreza apozicijskemu očesu (Slika 3.). V našem primeru modelno apozicijsko oko predstavlja oko muhe vrste *Calliphora vicina* mutanta CHALKY (Slika 4.), modelno superpozicijsko oko pa oko vrste *Ascalaphus macaronius* s slovenskim imenom Metuljčnica (Slika 5.).



Slika 3. Trije gradbeni tipi sestavljenih oči.

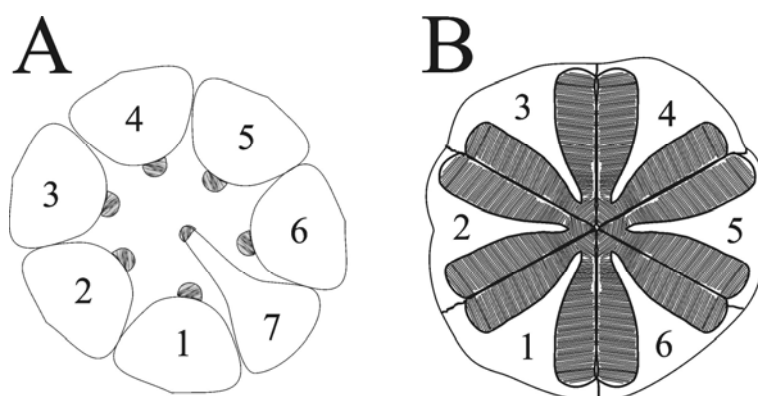
A superpozicijski gradbeni tip. Omatidiji med seboj optično niso ločeni, posledično rabsdomski del omatidija zadane svetloba, ki prihaja skozi sosednje omatidije. B Apozicijski gradbeni tip kjer so omatidiji optično ločeni, svetloba med njimi ne prehaja posledica je višja ločljivost ter slabša občutljivost. C nevralni superpozicijski tip kjer, so omatidiji optično ločeni, vendar pa v predelu lamine L prihaja do zbiranja informacije z večih očesc.



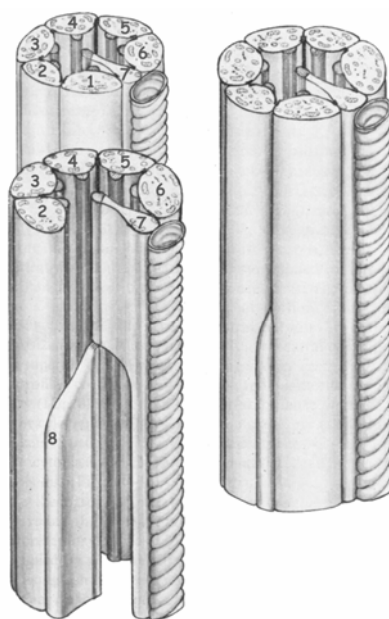
Slika 4. Omatidij muhe – apozicijski tip, kjer pigment optično ločuje očesca med seboj.

Očesca obeh tipov oči so podobno zgrajena, vendar pa kažeta očitne strukturne razlike. V obeh primerih dioptrični aparat sestavljata kornealna leča in kristalni stožec (Slika 4.). Vsako očesce – omatidij, sestavljaja osem fotoreceptorskih celic, obdanih s pigmentnimi

celicami. Na svetlobo občutljivi mikrovili fotoreceptorskih celic segajo v skupni zunajcelični prostor in tvorijo tako imenovani rabdom, ki je v našem primeru optičnega superpozicijskega očesa metuljčnice zlit, za razliko od očesca muhe, kjer so rabdomere (fotoobčutljivi deli membran fotoreceptorskih celic) jasno ločene in tako tvorijo odprti rabdom (Slika 5.). Posledično je v slednjem primeru tudi zunajcelični prostor relativno večji. Membrane svetlobno občutljivih mikrovilov rabdomer vsebujejo beljakovine, ki omogočajo fototransdukcijski mehanizem. Pri nevralem superpozicijskem očesu so rabdomere celic R1-6 ločene po vsej dolžini, pri celicah R7 in 8 pa le-ti stojita ena nad drugo in tvorita skupno rabdomero (Slika 6.). V primeru zlitega rabdoma se rabdomere v zunajceličnem prostoru stikajo zato ime zlitega rabdoma, clici R7 in 8 pa sta pomaknjena na rob rabdoma.

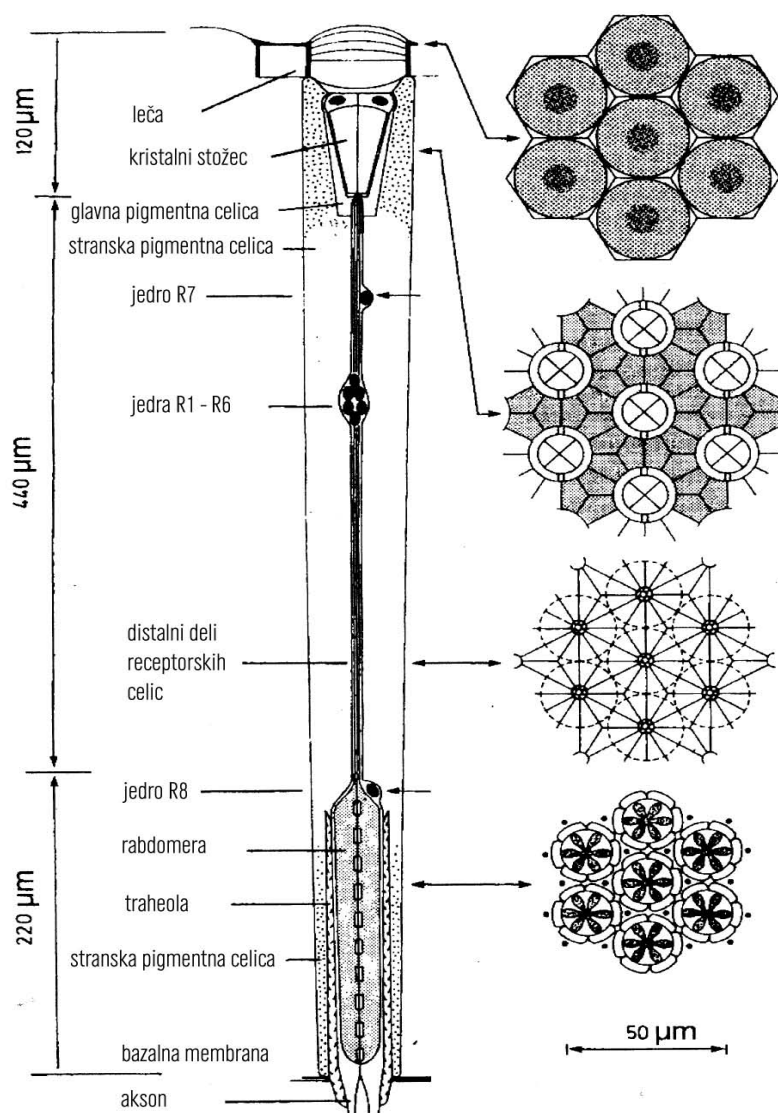


Slika 5. Shema odprtega rabdoma muhe A; ter zlitega rabdoma Metuljčnice B



Slika 6. Razporeditev fotoreceptorskih celic pri muhi

Ena glavnih strukturnih razlik obeh tipov je takoimenovani čisti pas ali "clear zone" med dioptričnim aparatom in svetlobno občutljivim delu rbdomom (Slika 7.) superpozicijskega očesa. Svetloba pri tem tipu zgradbe do posameznega rbdoma ne pride le skozi dioptrični aparat omatidija, ki mu pripada. Na posamezni rbdom usmerja svetlobo tudi skupina dioptričnih delov bližnjih in daljnih sosednjih omatidijev. Žarki nato potujejo skozi bistri pas in bolj ali manj natančno zadanejo rbdom centralnega omatidija. Slika, ki jo vidi en rbdom, je torej optična superpozicija slik, ki prihajajo skozi dioptrične aparate večih sosednjih omatidijev kar omogoča višjo občutljivost; zato je optična superpozicijska zgradba največkrat povezana s prilagoditvijo na razmere z nizkimi intenzitetami svetlobe in je značilna predvsem za žuželke, aktivne ob somraku in ponoči, najdemo pa jo tudi pri izključno dnevno aktivnih žuželkah, na primer pri vrsti iz naše študije, metuljčnici.



Slika 7. Shema zgradbe superpozicijskega omatidija Metuljčnice. V sredini je lepo viden 440µm širok čisti pas ali "clear zone", ki omogoča prehajanje svetlobe med omatidiji.

Posamezna očesca muhe so med seboj optično ločena, saj so receptorske celice obdane z zaščitnimi pigmentnimi celicami, ki ne prepuščajo svetlobe. Posledica optične ločenosti omatidijev je visoka ločljivost tega strukturnega tipa, ki pa posledično rezultira v nižji občutljivosti torej potrebi po večji količini svetlobe. Oko mutante chalky ne vsebuje zaščitnega pigmenta, kar pomeni, da omatidiji niso več optično ločeni, s čimer se ločljivost očesa močno zmanjša, ne pa tudi njegova občutljivost. V lamini, na nivoju nevronov, prihaja do zbiranja informacij iz večih fotoreceptorskih celic, kar kompenzira nižjo občutljivost zaradi optične ločenosti omatidijev. Od tod tudi ime: nevralno superpozicijsko oko (Slika 8.), (Kirschfeld 1973; Hardie 1985).

Fotoreceptorske celice muhe delimo v tri morfološko in funkcionalno različne razrede.

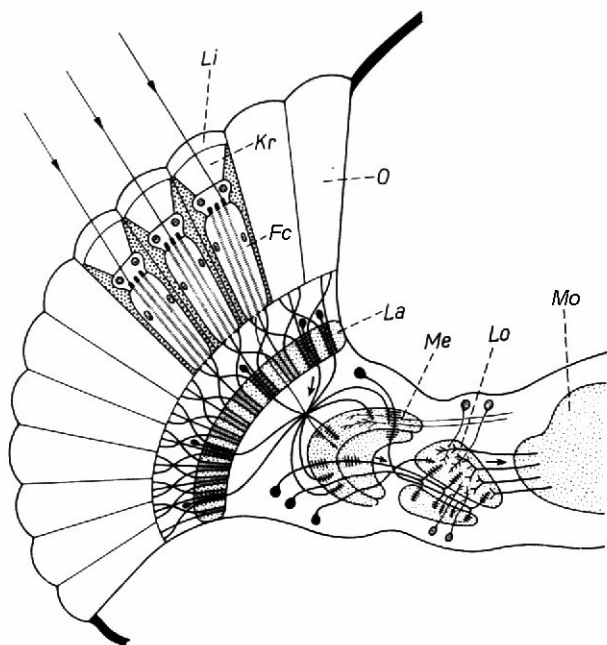
1. Največji so receptorji R1-6. Njihove rabdomere ležijo obrobno vzdolž celega osrednjega kanala, njihova maksimalna občutljivost pa je v območju valovnih dolžin svetlobe 480-500 nm in 350-360 nm. UV vrh občutljivosti naj bi bil posledica absorpcije fotostabilne kromofore ali antenskega pigmenta, ki posreduje energijo rodopsinskim molekulam in s tem povečuje absorpcijsko sposobnost retine.

2. Celice R7 so občutljive le na ultravijolično svetlobo. Njihove rabdomere ležijo središčno v centralnem kanalu in so pomaknjene v distalne dele omatidijev.

3. Fotoreceptorji R8 odgovarjajo na modrozeleno svetlobo. Njihovi rabdomi prav tako ležijo v središču centralnega kanala, vendar so pomaknjeni v proksimalni del očesca. (Hardie 1985).

Aksoni celic R1-6 izhajajo iz retine in se povezujejo z nevroni prvega optičnega ganglija, imenovanega lamina, ki ga sestavljajo LMC nevroni in velike monopolarne celice (Slika 8.).

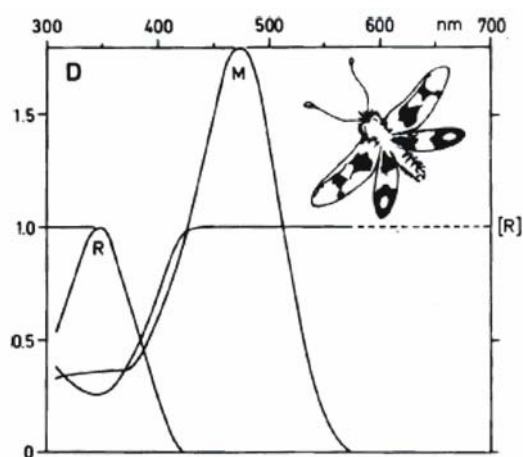
Aksoni celic R7 in R8 potekajo skozi lamino in sinapsirajo z nevroni drugega optičnega ganglija, imenovanega medula. (Kirschfeld 1973; Hardie 1985)



Legenda: Li - kornealna leča, Kr - kristalni stožec, Fc - fotoreceptorska celica, O - omatidij, La - lamina, Me - medula, Lo - lobuli, Mo - možgani

Slika 8. Shema nevralnega superpozicijskega očesa. Prirejeno po Kirschfeld 1973.

Ena od razlik gradbenih modelov oči omenjenih vrst je tudi v absorpcijskem maksimumu rodopsina celic R1-6, saj je v primeru metuljčnice absorpcija pomaknjena v UV del spektra 345 nm (Slika 9.).



Slika 9. Spektralna občutljivost rodopsina (R) in metarodopsina (M) po Hamdorfu, 1972.

[R] – Delež pigmenta v rodopsinski obliki po osvetljevanju z monokromatsko svetlobo izbrane valovne dolžine

Primerjava vplivov anoksije na oba gradbena tipa oces, je zanimiva s stališča različnih tipov rbdomov in posledično različnih razmerij med zunaj in znotraj celičnimi prostori ter

različne gostote mitohondrijev v fotoreceptorjih. Pri metuljčnici so mitohondriji gosto "posejani" po lumnu celice predvsem v področju fotoreceptivnih membran torej rabdoma s katerim so v relativno tesnem stiku. Pri muhi pa so mitohondriji ne tako gosto posejani in pomaknjeni na zunanji obod lumna celice. Ravno zaradi omenjenih razlik sta modela primerjalno zanimiva tako glede elektrokemijskih sprememb, kot vplivov metabolnega stresa na delovanje receptorskih celic.

1.3. Fototransdukcija in metabolni stres

Temeljni metabolni proces aerobnih organizmov je oksidativna fosforilacija. V njem nastaja ATP na notranji mitohondrijski membrani. Poleg te primarne naloge imajo mitohondriji tudi druge funkcije kot so vpliv na homeostazo znotrajcelične koncentracije Ca^{2+} . Med njegovimi mnogimi funkcijami so tudi regulacija aktivnosti encimov vpletenih v proces fototransdukcije: PLC, DAG kinaze in lipoksigenaze. V celicah z visoko metabolo aktivnostjo, med katere spada večina električno vzdražnih celic vključno s fotoreceptorskimi celicami, je število mitohondrijev razmeroma visoko. Naloga fotoreceptorskih celic je pretvorba svetlobe oziroma svetlobne informacije v električno spremembo razumljivo organizmu oziroma živčnemu sistemu. Posebno nevretenčarske oz. konkretno žuželčje fotoreceptorske celice, katerih metabolo breme se, za razliko od fotoreceptorskih celic vretenčarjev, zaradi depolarizacije membrane poveča ob osvetlitvi, predstavljajo izredno dober model za študij interakcije med samo vzdražno celico in njenimi mitohondriji. Zaradi podobnega načina delovanja in podobnosti transdukcijskega sistema (rodopsin kot arhetip metabotropnega receptorja, G-beljakovinska kaskada, fosfolipaza-C, TRP in TRPL kanali itd.; ref: Hardie in Raghu 2001) predstavljajo žuželčji fotoreceptorji relevanten model tudi za razumevanja procesov pri nevronih. S tega stališča je še posebno zanimiva interakcija med električno aktivnostjo celice ter delovanjem mitohondrijev.

Za produkcijo metabolne energije v obliki ATP, ki poteka v mitohondrijih zaradi razpoložljive energije protonskega gradienta preko njihovih membran, je potreben kisik. Medtem ko elektroni potujejo do kisika preko vrste različnih citokromov, se preko mitohondrijske membrane prečrpavajo protoni, s čimer nastaja protonski gradient (Tzagoloff 1982; Harold 1986; Trumpower in Gennis 1994). Kisik kot končni prejemnik elektronov v dihalni verigi omogoča normalno delovanje oksidativnega metabolizma, ki omogoča energijsko podporo membranskemu potencialu in fototransdukcijskemu sistemu. Večino energije za fototransdukcijo po predvidevanjih porablja Na^+/K^+ ATP-aza, ki črpa ione proti njihovemu koncentracijskemu gradientu, posredni porabnik je $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ izmenjevalnik (Hamdorf in sod. 1988; Jansonius 1990; Smits in sod. 1995; Pangršič in sod. 2005), nekaj energije pa se porabi za fosforilacijo transdukcijske verige. Tako je vidni

sistem insektov močno odvisen od oskrbe s kisikom, ki jo omogoča trahealni sistem (številne traheole povezane z velikimi zračnimi vrečami, ki verjetno služijo kot blažilnik hitrih sprememb parcialnega tlaka O_2). Znano je, da imajo fotoreceptorske celice visoko porabo kisika in so tako odvisne od neprestanega pritoka zraka (Hamdorf in sod. 1988, Gerster in sod. 1997, Pangršič in sod. 2005). Zanimivo je, da zmanjšanje tlaka kisika do relativno nizke stopnje (P_{O_2} 3kPa ali 3% zračnega tlaka), skoraj nima vpliva na velikost spremembe sumaričnega potenciala očesa ob osvetlitvi (elektroretinograma) pri muhi (Perovšek 2001). V primeru anoksije se odgovor fotoreceptorskih celic prične zmanjševati, dokler dokončno ne izgine (Dimitracos in Tsacopolus 1985; Jaremo, Jonson in Nilsson 1994). Ugotovili smo, da pri muhi odgovor fotoreceptorjev popolnoma ugasne šele pri parcialnih tlakih kisika (P_{O_2}) okrog 0,2 kPa; medtem ko je odgovor nevronov občutljivejši saj ostaja neprizadet do P_{O_2} 3.5kPa in izgine hitreje kot odgovor receptorjev (Perovšek 2001; diplomsko delo). Prav tako je za vinske mušice znano, da so sposobne preživeti brez težjih posledic precej dolga obdobja anoksije (>1h; Haddad 1997). Obenem druge raziskave kažejo, da anoksični metabolični stres povzroči aktivacijo (odprtje) TRP in TRPL kanalov pri muhi (*Musca*), vinski mušici (*Drosophila melanogaster*; Agam in sod. 2000) in verjetno tudi pri večini drugih žuželčjih vrstah. Vse kaže, da obstaja tesna povezava med fototransdukcijskim sistemom in delovanjem mitohondrijev oz. z oksidativno fosforilacijo. Tisto kar ni popolnoma znano sta narava in mehanizem te povezave.

Metabolični stres ne povzroči le prenehanje odgovarjanja fotoreceptorskih celic temveč povzroči depolarizacijo membrane kot posledico odprtja TRP in TRPL kanalov brez svetlobe. Metabolični stres lahko povzročimo ali z dolgotrajno anoksijo ali pa z depolarizacijo notranje mitohondrijske membrane s snovmi, ki so protonske ionofore (DNP, CCCP, FCCP). To kaže na neposredno povezavo med oksidativnim metabolizmom in aktivacijo TRP ter TRPL kanalov. Mehanizem aktivacije TRP in TRPL kanalov ter vloga mitohondrijev ob anoksičnem metaboličnem stresu ni popolnoma pojasnjena. Prva serija poskusov izvedenih v laboratoriju za fotorepcijo katedre za fiziologijo živali, ki je poskušala nekoliko bolj osvetliti ta proces je bila opravljena v okviru moje diplomske naloge (Perovšek 2001). Pri tem smo opazovali časovne poteke ugašanja različnih komponent ERG ob nastopu anoksičnih pogojev ter jih primerjali s ponovnim vklaplajanjem ob kasnejšem nastopu normoksičnih pogojev. Glavna težava takšnega pristopa je, da je ERG metoda, ki ne da veliko informacij o dejanskem elektrofiziološkem dogajanju na nivoju celic in tkiva, predvsem pa ne da informacije o stanju mitohondrijev.

Da bi bolje razumeli opisane pojave in lahko odgovorili na zastavljena vprašanja, je potrebno natančnejše poznavanje električnih dogajanj ob zmanjševanju P_{O_2} , oziroma

anoksičnih pogojih, tudi pri drugem poskusnem objektu in dobljene rezultate primerjati s predhodnimi rezultati.

V ta namen smo se odločili za dva modelna organizma. To sta muha *Calliphora vicina* – mutanta chalky in metuljčnica – *Libelloides (Ascalaphus) macaronius*. Elektretinografijo smo dopolnili z metodo ionsko selektivnih elektrod za boljše razumevanje časovnih potekov sprememb ionov v zunajceličnem prostoru ob nastopu anoksičnih pogojev, hkrati pa uporabili še metodo spremljanja oksidoredukcijskega stanja encimov dihalne verige in-vivo s pomočjo meritev in analize dinamičnih sprememb diferenčnih absorpcijskih spektrov (Zupančič 2003). S povezavo obeh metod smo želeli pridobiti neposredne podatke o tem pri katerih spremembah stanja mitohondrijev pride do aktivacije membranskih prevodnosti za K^+ , Na^+ in Ca^{2+} , ki so predvidoma posledica odprtja TRP kanalov.

Prvi modelni organizem je že dal preliminarne rezultate tako s področja časovnih potekov ERG v normalih in hipoksičnih pogojih (Perovšek 2001), kot tudi časovnih potekov redukcije dihalnih pigmentov (Lah 2002, Čehovin 2004). Posebnost, predvsem s stališča funkcionalne morfologije pa je metuljčnica. Ultrastrukturna morfologija fotoreceptorjev pokaže izredno gostoto mitohondrijev v neposredni bližini svetlobno občutljivih delov fotoreceptorskih celic (rhabdoma), ki je mnogo večjo kot pri muhi, kar kaže na izredno metabolno aktivnost oziroma potrebo po energiji. Gradbeni tip očesa se od muhe razlikuje (superpozicijsko v primerjavi z apozicijskim tipom ter zlit rhabdom v primerjavi z odprtim rhabdomom), obenem pa je tudi žival precej večja od muhe. Kljub vsemu pa so zahteve glede vida za obe živali podobni – obe sta dobra in hitra letalca, ki potrebujeta kvalitetno vidno informacijo. Zaradi omenjenih razlik in podobnosti zato predstavljata dobri oporni točki za interpretacijo povezav med električno aktivnostjo očesa ter stanjem mitohondrijev v pogojih metabolnega stresa povzročene s hipoksijo. V diplomski nalogi se je izkazalo, da ERG muhe *Calliphora erythrocephala* ostaja takorekoč nespremenjen do zelo nizkih stopenj parcialnega tlaka kisika, pri katerem je večina prenašalcev dihalne verige že reduciranih. Odziv ERG Calliphore na svetlobo je izginil pri presenetljivo nizki koncentraciji kisika (~0,2kPa) glede na njihovo relativno visoko metabolno aktivnost. Odpornost na nizke koncentracije kisika se kaže tudi pri vinski mušici *Drosophila melanogaster*, pri kateri so identificirali nekaj lokusov pomembnih za resistenco na anoksične pogoje (Haddad in sod. 1997). Po pričakovanju je metabolni stres (anoksija) pri muhi povzročil depolarizacijo membrane tudi v temi, torej odprtje TRP in TRPL kanalov, ki generirajo električno spremembo na membrani (Agam in sod. 2000). Ena možnih interpretacij teh rezultatov je, da gre v tem primeru za aktivacijo tako imenovanega SOC (store operated channels) sistema reguliranega preko sekundarnega prenašalca informacij-

Ca²⁺ iona (Reuss in sod. 1997; Venkatachalam in sod. 2002), v katerega so na neznan način vpleteni tudi mitohondriji. Dokazano je namreč bilo, da anoksija povzroči praznenje notranjih rezerv Ca²⁺ ionov in s tem povišanje znotrajcelične koncentracije Ca²⁺ (Chyuan Ng in sod 2005).

2. MATERIAL IN METODE

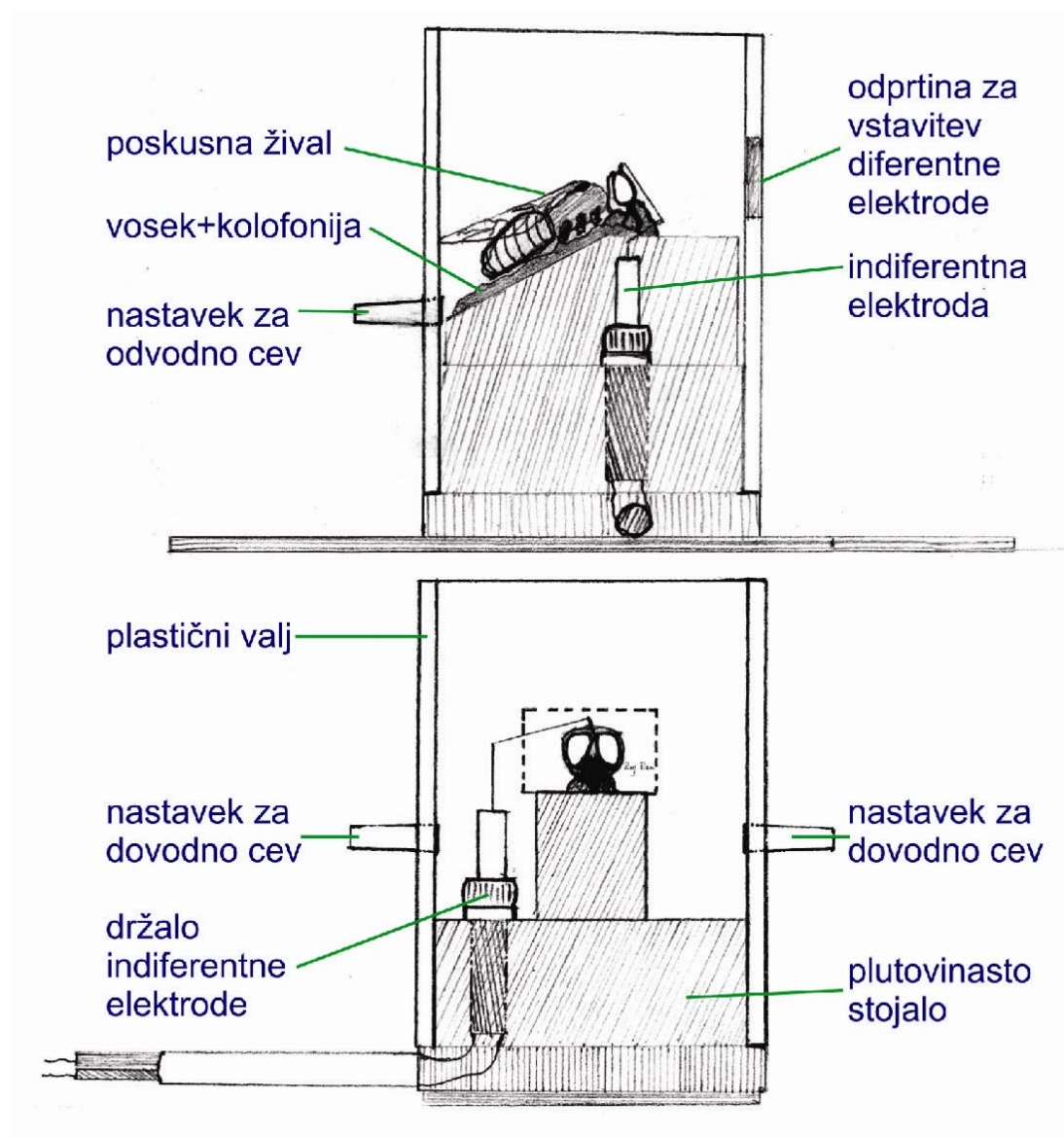
2.1. Poskusne živali in njihova priprava

Kot poskusne živali smo uporabljali vrsti *Ascalaphus macaronius* s slovenskim imenom metuljčnica in muhe vrste *Calliphora erythrocephala-chalky*. Chalky je oznaka za mutiran sev, ki fenotipsko ne izraža zaščitnega pigmenta v očesu in ima zato oči bele barve. Posledica mutacije je zmanjšana ločljivost očesa, do katere pride zaradi slabše optične ločenosti očesc (odsotnost zaščitnega pigmenta), obenem pa to omogoča večjo občutljivost saj z usmerjeno dražilno svetlobo izzovemo odgovor veliko večje površine očesa žuželke. Ličinke muh in odrasle osebkke smo hranili z jetri, ki so vsebovala primerno količino vitamina A, s čimer smo dosegli normalne vsebnosti rodopsina.

Metuljčnice so bile izlovljene iz naravnega okolja. Odvzete so bile na travnikih v okolici mesteca Komen na Krasu. Živali smo vzdrževali v inkubatorjih na okoli 20 C. Hranili smo jih z jetri v 2 do 3 dnevni intervalih ob vsakodnevnem vlaženju z vodo. Tako vzdrževane živali so ostajale vitalne do 15 dni po ulovu.

Poskusi so bili izvedeni na intaktnih očeh muhe ter metuljčnice *in situ*. Uporabljali smo samice muh starosti 8-16 dni. Pri metuljčnicah spola nismo izbirali, Seveda so bile na novo ulovljene živali primernejše, a vendar do starosti 12-14 dni opaznejših razlik ni bilo.

Preparacije živali so potekale najprej ob navadni sobni razsvetljavi s fluorescentnimi žarnicami, nato pa pod stereo mikroskopom z rdečo lučjo. Najprej smo živalim, zaradi lažje pritrditve na podstavek in boljše imobilizacije, s škarjami odstranili noge. Oprsje preparirane živali smo nato pritrdili na plutovinast podstavek z zmesjo dveh delov kolofonije in enega dela voska (Kronigova mešanica). Z isto zmesjo smo imobilizirali krila, glavo in ustni aparat. Na podstavek s pritrjeno živaljo smo nataknili plastični valj z nastavki za cevke in odprtino za vstavitvev diferentne elektrode (Slika 10.). Volumen kamrice je približno ustrežal volumnu 10 ml. Tako sestavljena kamrica majhnega volumna nam je omogočala hitro vzpostavitev željenih plinskih pogojev (Slika 10.).



Slika 10. Kamrica s pritrjeno poskusno živaljo

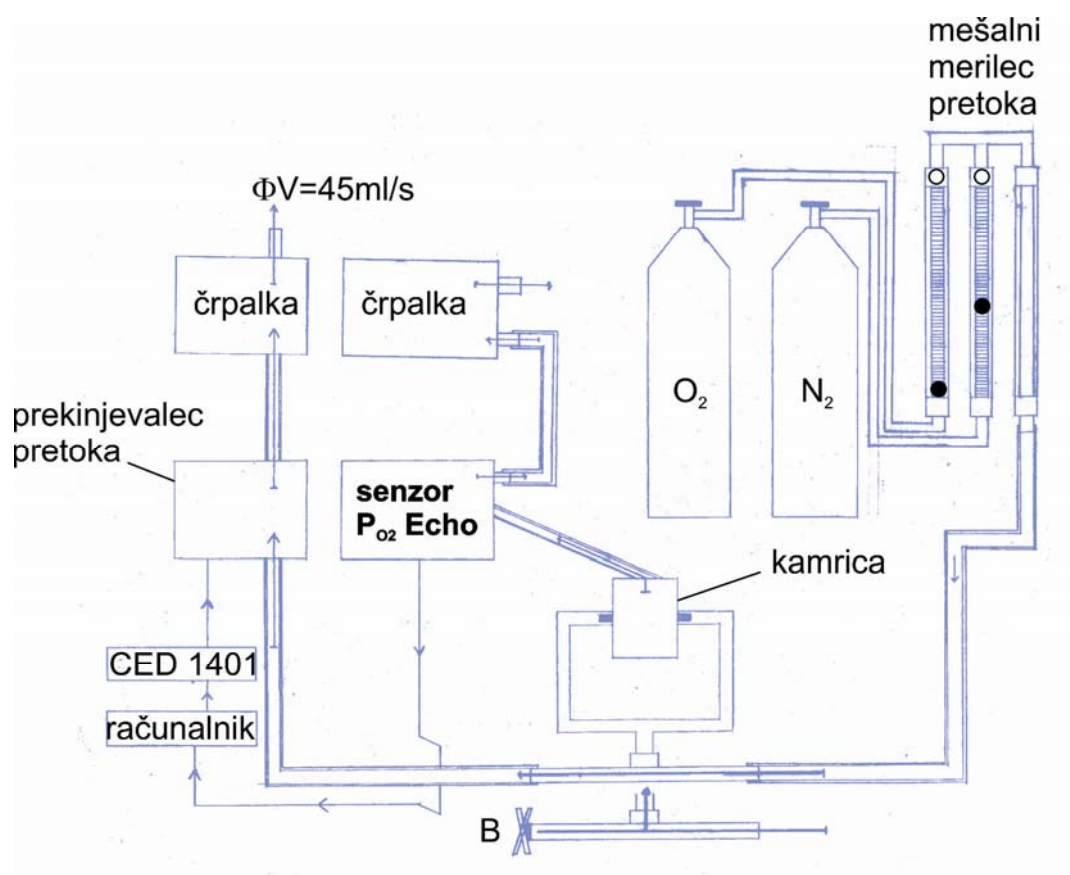
2.2. Omogočanje kontrole P_{O_2} in vzpostavitev anoksije

2.2.1. Vzpostavitev anoksije

Glavni problem, ki smo ga študirali, je bilo časovno sosledje električnih, kemičnih in biokemičnih dogodkov v žuželčjem očesu ob vzpostavitvi anoksije. V ta namen smo uporabili merilno kamrico, v kateri smo lahko v kratkem času spremenili parcialni tlak kisika P_{O_2} .

Mere prostora v kamrici so bile: premer \varnothing 26.5 mm, višina 26 mm. V prostor kamrice sta segala objektiv mikroskopa, ki je zavzel prostor volumna 1 ml ter del podstavka z volumnom 2.5 ml. Iz teh mer smo ocenili volumen kamrice na približno 10 ml.

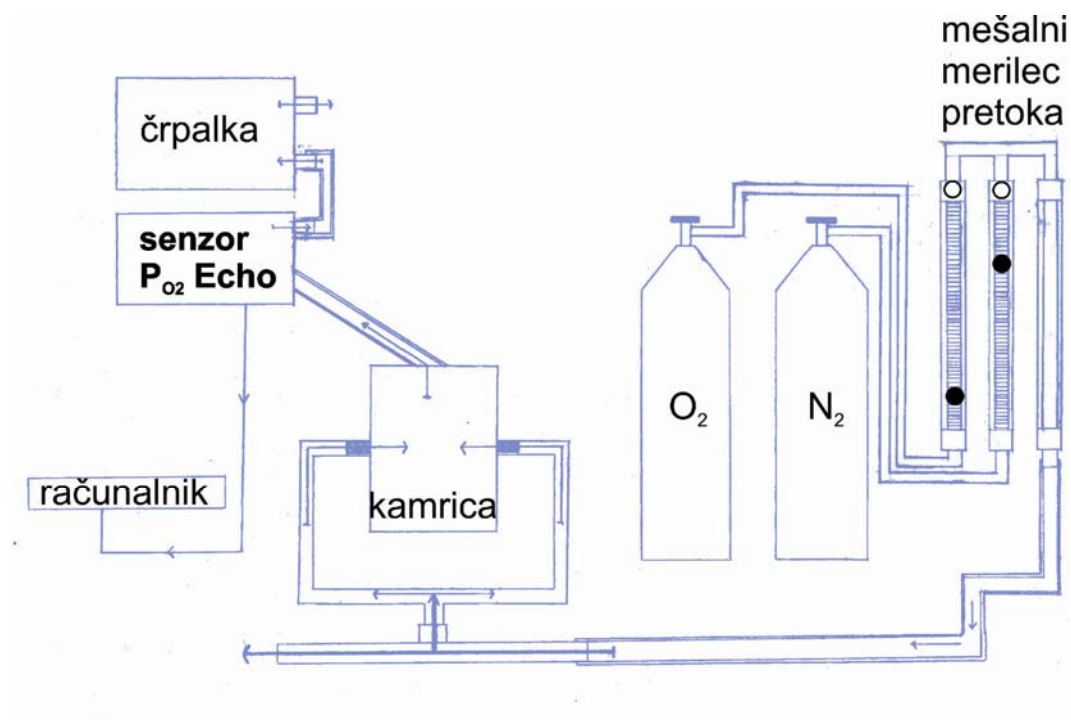
Kamrico s preparatom smo vstavili pod objektiv mikroskopa in nanjo pritrdili tri cevke. Ena cevka je bila namenjena odvajanju plinov iz kamrice v elektrokemijski senzor O₂ (ECHO, Slovenija). Natančnost senzorja je bila 0.010 ± 0.005 % O₂. Časovna resolucija senzorja ni bila zadovoljiva, saj senzor doseže ravnovesno stanje šele 10 s po skočni spremembi P_{O₂}. Zato ni bilo mogoče natančno izmeriti časa doseganja anoksičnih pogojev; senzor nam je tako služil le kot kontrola delovanja naprave za spreminjanje P_{O₂}. Drugi cevki sta dovajali mešanico N₂/O₂ ali pa čisti N₂ preko mešalnega merilca pretoka (Cole-Parmer, ZDA), povezanega z jeklenkama dušika in kisika. Hitrost pretoka, ki smo jo uporabljali pri poskusih, je bila 2660 ml/min, kar ustreza 45 ml/s. Glede na volumen kamrice ter na hitrost pretoka smo ocenili, da se P_{O₂} izenači najkasneje v 1s (ustreza približno 5 volumnom kamrice), zelo verjetno pa je ta čas še precej krajši. Vzpostavitev anoksije smo zagotovili s solenoidnim ventilom (Bürkert, Orange California U.S.A., izdelan v Z. Nemčiji), ki je imel funkcijo prekinjevalca pretoka. Sistem je deloval na principu Bernoullijeve cevi in je v normalnih pogojih sesal plin s hitrostjo pretoka enako dovodni hitrosti, mimo kamrice, v kateri se je nahajal atmosferski zrak. Ob prekinitvi pretoka je povečan tlak v cevi povzročil, da je mešanica plina, ki smo jo nastavili, v manj kot 2s napolnila kamrico (Zupančič;2003). Prekinjevalec smo krmilili s polprevodniškim tranzistorskim stikalom, ki smo ga preklapljali s pomočjo digitalnih signalov iz laboratorijskega A/D pretvornika CED 1401plus (Cambridge Electronic Design, Velika Britanija), ki je bil povezan z osebnim računalnikom tipa Pentium (Slika 11.).



Slika 11. Shema sistema za vzpostavitev anoksije

2.2.2. Omogočanje kontrole P_{O_2}

Kamrica je bila enako povezana kot v prejšnjem primeru, vendar smo vanjo dovajali mešanico kisika in dušika iz mešalnega merilca pretoka Cole-Parmer, ki nam je omogočal nastavitve parcialnega tlaka kisika. Pri tej vrsti poskusov nismo uporabljali solenoidnega ventila (prekinjevalca pretoka), saj je bil pretok toliko večji (4100-5400 ml/min oz. 68 - 90 ml/s), da je zaradi povečanega tlaka v dovodni cevi mešanica prepihovala tudi kamrico (Slika 12.). Parcialni tlak kisika smo merili z senzorjem O_2 ECHO, katerega občutljivost sem omenil že pred tem.

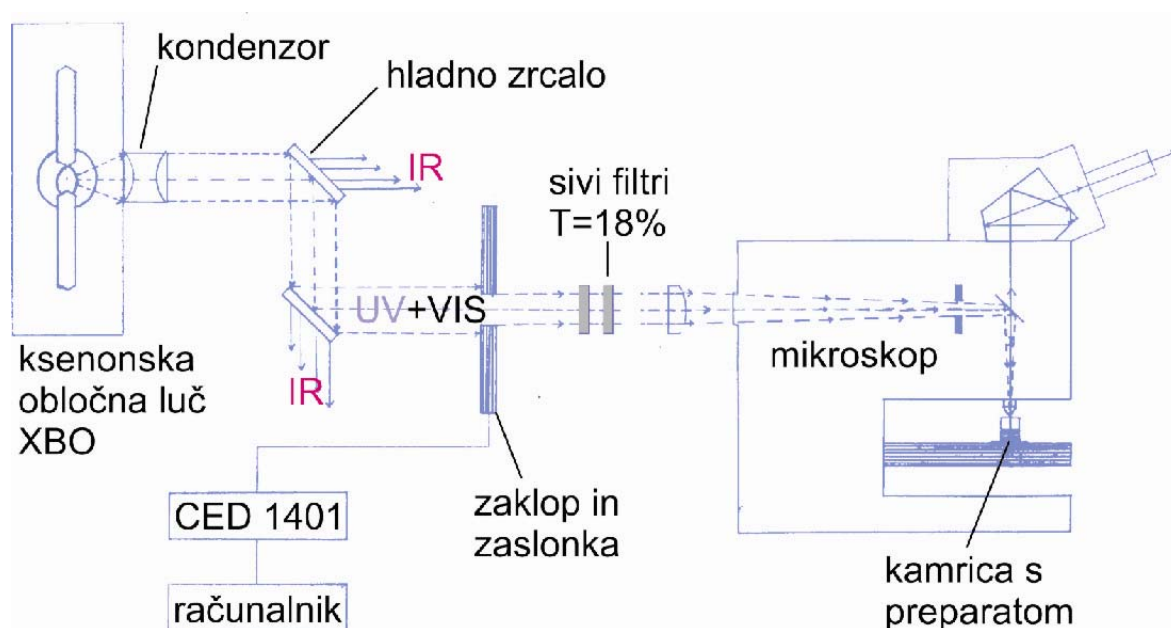


Slika 12. Shema sistema kontrole P_{O_2}

2.3. Svetlobna stimulacija

Vir svetlobe je bila ksenonova oblačna žarnica (Osram) z močjo 900W. Svetlobo smo najprej filtrirali skozi dvojni periskopski filter, ki prepušča infra rdečo svetlobo, odbija pa hladno svetlobo (Slika 13.). Svetloba, ki je ta filter zapustila, je vsebovala valovne dolžine med 300 in 700 nm, bila pa je skoraj povsem brez dolgovalovne in infrardeče svetlobe. Na ta način smo preprečili neposredno segrevanje preparata in spreminjanje temperaturnih pogojev med poskusi. Za periskopskim filtrom smo postavili zaslonko, ki nam je omogočal svetlobne dražljaje poljubnih časovnih trajanj. Sledila sta dva siva filtra s skupno prepustnostjo 0,034 ali 3,4%. Zadnji je bil širokopasovni 570 nm filter, ki je vzdrževal razmerje rodopsina in metarodopsina v membrani rahlo v prid rodopsina, ki pa ga nismo uporabljali v primeru spektrofotometričnih meritev. Filter s prepustnostjo 570 nm tako zmanjšuje možnost nastanka podepolarizacijskega popotenciala (PDA) ter pripomore k temu, da so bili zaključki odgovorov fotoreceptorjev čim krajši in čim manj odvisni od pretvorbe metarodopsina v rodopsin. Svetlobna jakost filtrirane svetlobe je prožila ERG odgovore približne velikosti polovice maksimalnega odgovora pri beli svetlobi. Za filtri je bila postavljena leča z goriščno razdaljo 1 m, ki v povezavi z objektivom zbira svetlobo v ravnini preparata. Svetlobo smo nato usmerili v mikroskop Leitz orthoplan, delujoč v refleksnem načinu, s standardnim objektivom povečave 4x, in jo

s pomočjo vertikalnega premikanja mikroskopske mizice zbrali na očesu živali. Protokoli svetlobnega draženja so bili izdelani s programom WinWCP ("Whole Cell Program" Strathclyde Electrophysiology Software; Velika Britanija) oziroma s programom Spike2 (Cambridge Electronic Design), povezanega z A/D pretvornikom CED 1401, ki je krmilil zaklop (Slika 13.).



Slika 13. Shema postavitve sistema za svetlobno draženje
IR infrardeča svetloba, VIS vidna svetloba, UV ultravijolična svetloba

2.4. Spektrofotometrija

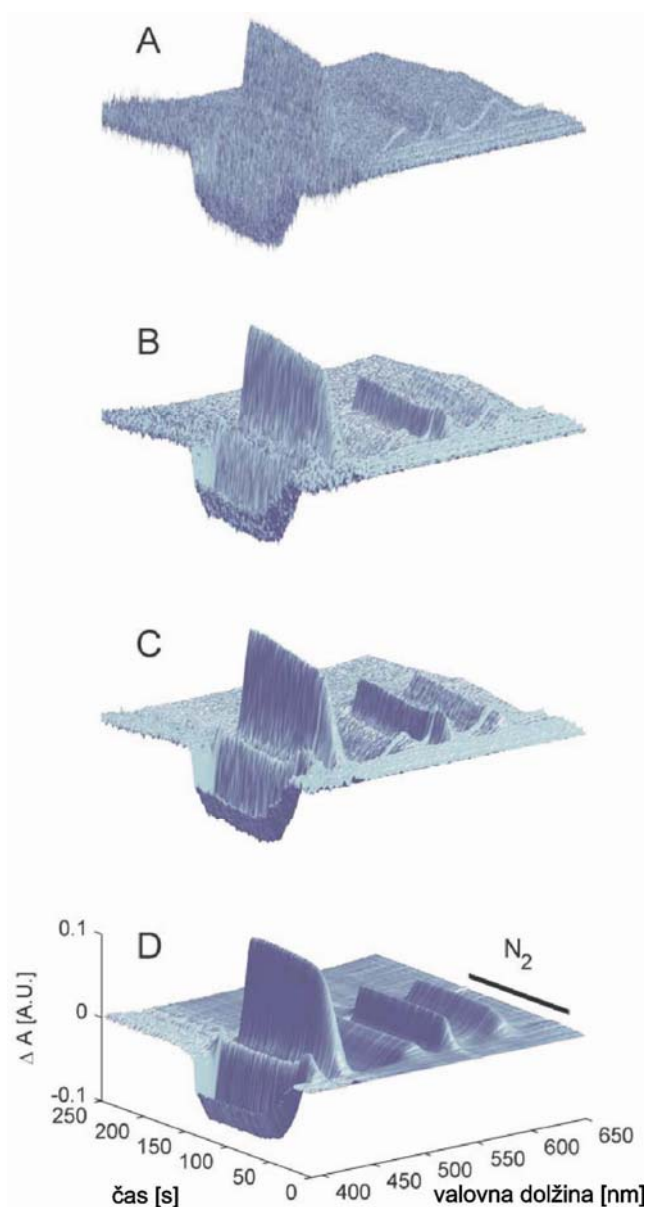
S spektrofotometrom povezanim s PC računalnikom smo spremljali spremembe spektralnih lastnosti encimov dihalne verige v mitohondrijih. Svetlobo odbito iz očesa muhe smo s pomočjo optičnega vlakna pripeljali do spektrofotometra (Ocean Optics USB2000; ZDA) povezanega s PC računalnikom. Tako smo ob spremembi P_{O_2} lahko spremljali, kako se zaradi oksidacije in redukcije spreminjajo spektralne lastnosti posameznih dihalnih encimov. Dobljeni signal smo s pomočjo programa Matlab ter izvršilnih podprogramov pretvorili v časovne poteke spektralnih sprememb (Zupančič; 2003).

Meritve smo zajemali s programom Matlab, ki nam je omogočal tudi nadaljno obdelavo dobljenih podatkov. Za zajemanje prebiranje in nadaljno obdelavo ter analizo podatkov je doc. Gregor Zupančič razvil vrsto podprogramskih orodij za različne korake obdelave podatkov. V prvem koraku smo surove spektralne in referenčne vrednosti digitalno filtrirali s FIR (finite impulse response) filtrom kar je zmanjšalo spektralno ločljivost iz 0.3 na 1nm. Dobljene spektre pa smo uporabili za izračun reflektance in diferenčnih spektrov. Sledila je izključitev vrednosti izven območja našega interesa, zato smo izključili vrednosti izmerjene pod 390 nm in nad 650 nm. Dobljene spektre smo zložili v časovno spektralno matriko. Kot osnova za izračun diferenčnih spektrov je služilo povprečje 10 spektrov v atmosferskih pogojih. Od referenčnega spektra smo nato odšteli zoženo časovno spektralno matriko dobljeno v anoksičnih pogojih in tako dobili časovno spektralno matriko surovih diferenčnih spektrov (Slika 14A.). Takšni diferenčni spektri predstavljajo izredno majhne spremembe v svetlobni jakosti in so tako izredno občutljivi na šum. V našem primeru je glavni vir šuma predstavljal elektronski šum detektorja in nihanje jakosti osvetljevalne svetlobe. Za ublažitev vpliva šuma smo dobljeno matriko pogladili v dveh stopnjah. Najprej smo matriko pogladili v smeri spektralne osi z ozkopasovnim digitalnim "Finite Impulse Response" – (FIR) filtrom programa Matlab. Filter je ločljivost zmanjšal na 3nm in tako izločil spremembe oziroma vrhove, ki so bili manj kot 3 nm narazen (Slika 14B). Sledilo je filtriranje s simetričnim dvodimenzionalnim Gausovim filtrom (Matlab image processing toolbox) za dvodimenzionalno glajenje. Navadno smo uporabili matriko dimenzije 5X5 z +/- 1SD pri +/- 1 element. To je dodatno zmanjšalo večino spektralnega in časovnega šuma (Slika 14C). Sledilo je še zmanjševanje frekvence vzorčenja v razredu 1:5 vzdolž spektralne osi kar je izločilo večino informacije izven spektralne ločljivosti 3 nmin močno zmanjšalo velikost časovno-spektralne matrike.

V drugem koraku smo uporabili metodo analize poglavitnih komponent na osnovi razčlenitve posamičnih vrednosti signala "Principal component analysis oz. Singular value decomposition", ki se navadno uporablja za identifikacijo števila komponent ki variirajo zaradi sprememb neodvisnih spremenljivk (pH, ionska jakost,...). Z uporabo te metode je mogoče zmanjšati veliko količino informacij na nekaj za nas pomembnih vektorjev osnovnih komponent. V prvem koraku je bil vsak izmerjeni spekter časovne spektralne matrike rekonstruiran s pomočjo linearne kombinacije iz literature dobljenih referenčnih spektrov za nas zanimivih komponent. Sledila je ponovna rekonstrukcija časovno spektralne matrike diferenčnih spektrov v kateri je bilo prisotnih le 7 osnovnih komponent, ki so obrazložile 99,8% sprememb (Slika 14D).

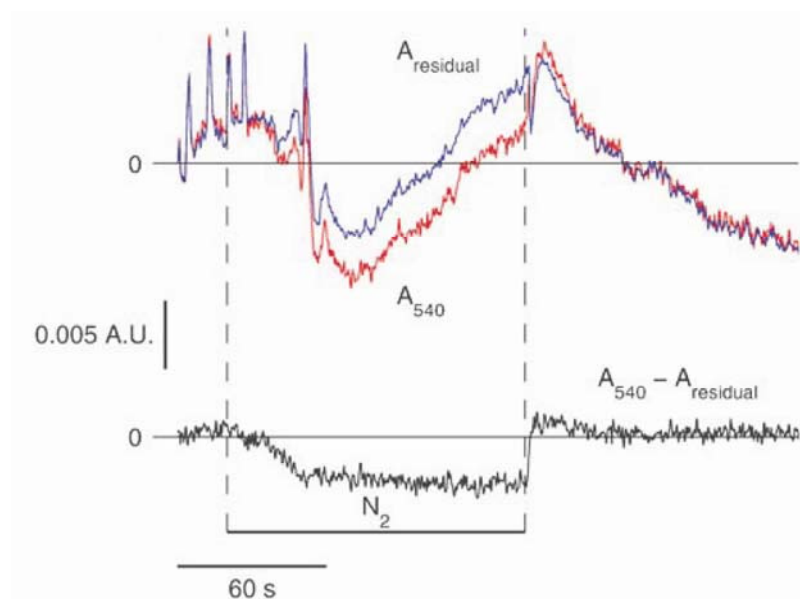
Sledil je izračun prispevkov posameznih komponent. V ta namen smo uporabili prej dobljeno rekonstruirano časovno spektralno matriko poglavitnih komponent ter iz literature znane spektre reduciranih in oksidiranih stanj elektronskih nosilcev - citokromov (a, a₃, b in c) ter flavoprotein (NADH dehidrogenazo). Spektre citokromov a in a₃ od (LIAO in Palmer, 1996), citokrom b (Weiss in Ziganke, 1974), citokrom c (University College, London, [medical physics web site](http://www.medphys.ucl.ac.uk/research/borg/research/NIR_topics/spectra/spectra.htm) – http://www.medphys.ucl.ac.uk/research/borg/research/NIR_topics/spectra/spectra.htm)

V tem procesu je bil vsak posamezen spekter časovno-spektralne matrike rekonstruiran s pomočjo linearne kombinacije znanega referenčnega spektra komponent. Uporabili smo od reduciranega odštet oksidiran - diferenčni spekter citokromov (a, a₃, b in c) ter flavoprotein (NADH dehidrogenazo). Nato smo pri določeni valovni dolžini od časovnega poteka diferenčnega spektra odšteli časovni potek referenčnega spektra. Razlika je predstavljala zmanjšanje absorbance v času anoksije in s tem spremembo koncentracijskega razmerja oksidiranega in reduciranega stanja posameznih komponent (Slika 15.)



Slika 14. Diferenčni spektri; vir: A method for dynamic spectrophotometric measurements in vivo using principal component analysis-based spectral deconvolution (Zupančič G. 2003; Pflugers Arch. Eur. J. Physiol.; vol. 447, št. 1, str. 113)

Slika prikazuje odvisnosti med časom poskusa (s) pri različnih plinskih pogojih (N₂ – anoksija), spremembo absorbance (ΔA) in valovno dolžino (nm). A Surovi diferenčni spektri; B spektri, filtrirani z dvodimenzionalnim simetričnim Gaussovimi filtrom; C spektri sestavljeni, iz poglavitnih komponent časovno spektralne matrike; D Diferenčni spektri z odštetimi vrednostmi polinoma 3.stopnje; Vidni so vrhovi diferenčnih spektrov citokroma aa3 (445 in 605nm), citokroma c (552nm) in citokroma b (564nm)



Slika 15. Odštevanje referenčnega in diferenčnega časovnega poteka pri 540 nm valovne dolžine. vir: A method for dynamic spectrophotometric measurements in vivo using principal component analysis-based spectral deconvolution (Zupančič G. 2003; Pflugers Arch. Eur. J. Physiol.; vol. 447, št. 1, str. 116) V spodnjem delu je prikazana razlika v absorbanci in s tem sprememba koncentracijskega razmerja reducirane in oksidirane oblike komponente.

2.5. Električne in elektrokemijske meritve

2.5.1. Izdelava elektrod

2.5.1.1. Indiferentna elektroda

Za indiferentno elektrodo smo uporabljali srebrno žico premera 0.25 mm, ki smo jo s spajkalnikom pritrdili v medeninasto držalo. Elektrodo smo najprej priostrili tako, da smo jo povezali z izvorom enosmerne napetosti (z njenim pozitivnim polom) in njeno konico potapljali v raztopino AgNO_3 , ki je bila prav tako povezana v tokokrog vendar z negativnim polom izvora. Tako nabrušeno elektrodo smo, približno 12 ur, v temi klorirali v raztopini HCl s pomočjo enosmerne napetosti, tako da je srebrna žica delovala kot anoda (skozi raztopino je tekel tok 10A/m^2)

2.5.1.2. Diferentne ERG elektrode

Diferentne elektrode za merjenje ERG so bile mikropipete zunanjsa premera 1 mm, notranjsa premera 0.7 mm in z debelino filameta $10\ \mu\text{m}$. Izvlekli smo jih na aparatu za vlečenje elektrod Narishige (Japonska). Zatem smo konico elektrode zbrusili pod kotom 45° na brusilnem kamnu, ki ga je enakomerno vrtel disketni gonilnik. Premer odprtine

konice je bil od 15-30 μm . Elektrode smo pred poskusom napolnili s fiziološko raztopino za insekte (NaCl: 130 mM; KCl: 2 mM; CaCl_2 : 2 mM; NaHCO_3 : 10 mM; MgCl_2 5 mM, pH=7). Napolnjeno mikropipeto smo vstavili v s fiziološko raztopino napolnjeno držalo tipa MEH3S proizvajalca WPI (World Precision Instruments, ZDA) opremljeno z Ag-AgCl stikom. Pri tem smo pazili, da v držalu ali elektrodi ni bilo mehurčkov, ki bi lahko motili prevajanje merilnih tokov ERG-ja. Držalo elektrode je bilo umaknjeno iz optične poti, saj je srebrov klorid občutljiv na svetlobo, kar moti odvajanje potencialov.

2.5.1.3. Ionsko selektivne elektrode

Izdelava elektrod je potekala v treh korakih: vlečenje kapilarnega stekla, silanizacije ter polnjenje elektrod.

Ionsko selektivne elektrode so bile izdelane iz borosilikatnega kapilarnega stekla zunanega premera 1,5mm z notranjo odprtino premera 1,0mm brez filamenta. Elektrode so bile povlečene na pullerju Sutter P97 (Sutter instruments) in zelo rahlo pobrušene na prej opisan način, s premerom odprtine okoli 5 μm .

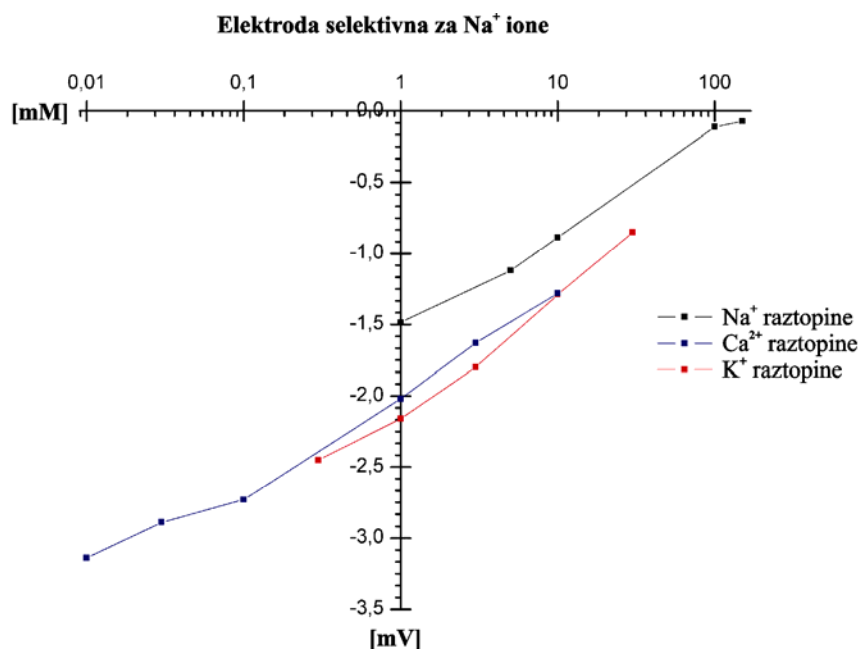
Takšne elektrode smo pazljivo položili v majhno pločevinasto škatlico, dimenzij 8x5cm višine 2cm ter jih nato grel približno 15-20 minut na temperaturo 230-250°C. V tako ogreto škatlico z elektrodami smo v majhni epruvetki dodali 35-40 μl silana, škatlico zaprli in jo grel nadaljnjih 20 minut, da so se stene elektrod silanizirale.

Sledilo je polnjenje elektrod s fiziološko raztopino, nato pa smo skozi konico potegnili v vrh elektrode ionoforo, selektivno za določeno vrsto ionov, v našem primeru so bile to Na, Ca^{2+} in K ionofora. Napolnili smo približno 50-100 μm konice elektrode. Ionofore so selektivno propustne za določene ione oziroma so za določeno vrsto iona bolj propustne kot ostale in nam na ta način omogočajo spremljanje sprememb koncentracij teh ionov.

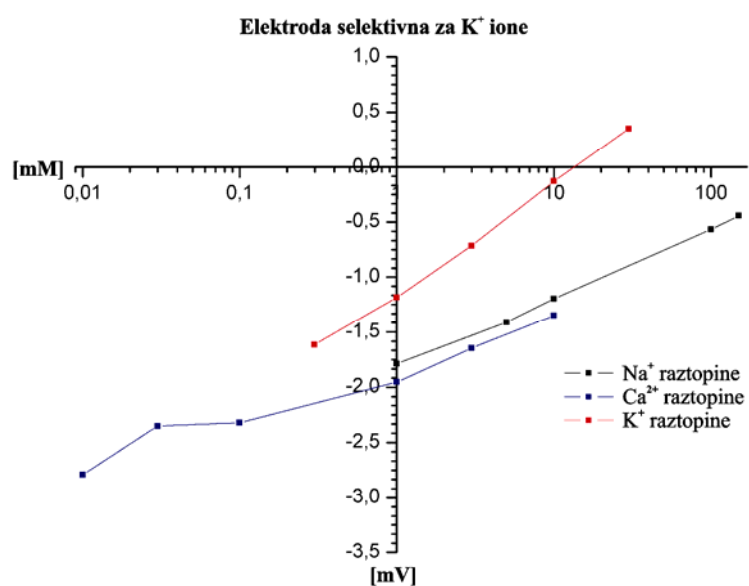
2.5.2. Ionsko selektivne elektrode in merjenje koncentracij posameznih ionov

Pri meritvah z ionsko selektivnimi elektrodami spremljamo časovni potek spremembe napetosti iona, ne da pa nam neposredne informacije o koncentraciji posameznega iona v prostoru meritve, ki jo je potrebno izračunati.

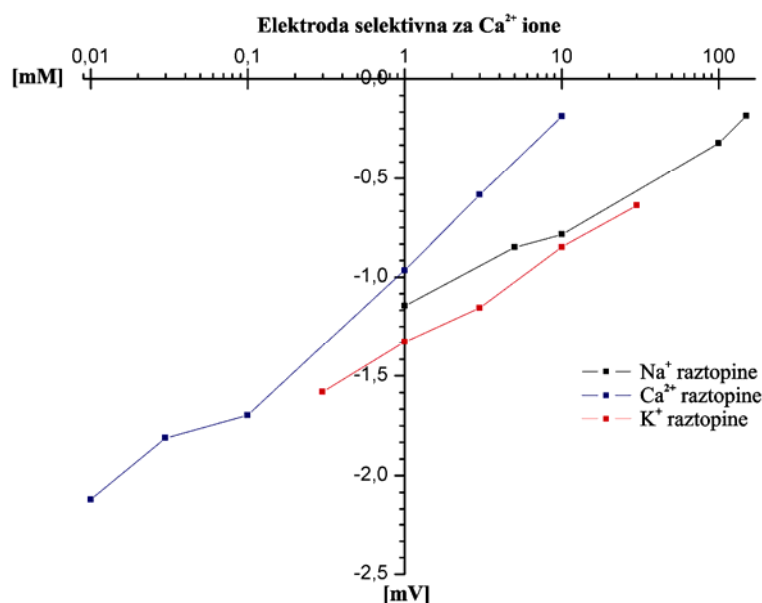
V prvem koraku smo ionsko selektivne elektrode kalibrirali v serijah raztopin različnih koncentracij Na, K in Ca^{2+} iona. Tko smo vsako vrsto elektrode (Na, K in Ca^{2+}) potopili v vse tri različne koncentracijske vrste K, Na in Ca^{2+} ter izmerili napetost na elektrodi (Slika 16, 17 in 18).



Slika 16. Graf prikaza napetosti Na elektrode v koncentracijskih vrstah Na, K in Ca^{2+} raztopin.



Slika 17. Graf prikaza napetosti K elektrode v koncentracijskih vrstah Na, K in Ca raztopin.



Slika 18. Graf prikaza napetosti Ca²⁺ elektrode v koncentracijskih vrstah Na, K in Ca raztopin.

Elektrode so bile po pričakovanju najboljčutljivejše v koncentracijski vrsti raztopine iona za katerega so bile selektivne. Vrednosti napetosti pa so se gibale v razredu pričakovanih koncentracij v naravnih pogojih.

Za pretvorbo posnetkov časovnih potekov napetostnih sprememb posameznih ionov v koncentracijske spremembe smo izhajali iz Nernstove enačbe izračuna potencialne razlike preko membrane.

$$E_X = \frac{R \times T}{z \times F} \times \ln \frac{[X]_o}{[X]_i}$$

(E-napetost, konstante R, T in F, ter valenca iona z, [x]_i-koncentracija iona v pipeti [x]_o-koncentracija iona v raztopini)

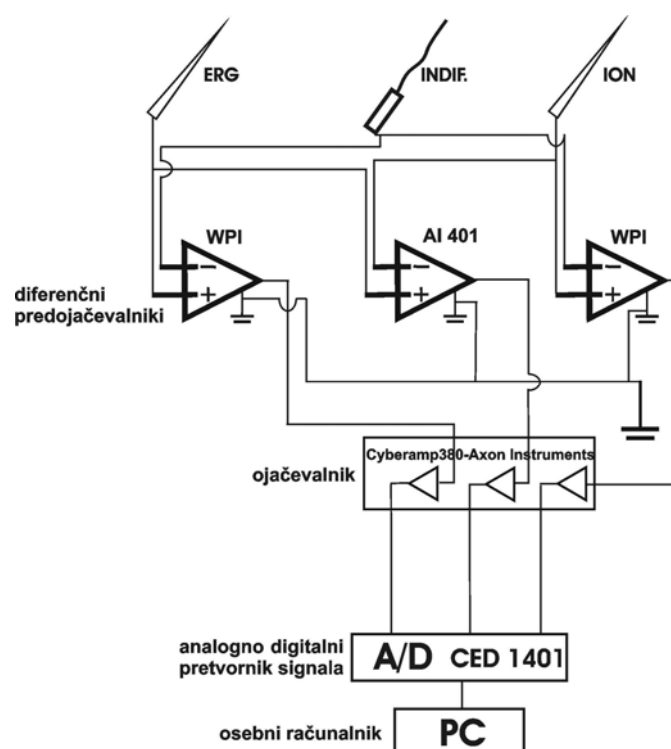
$$\text{Tako je koncentracija iona} = [X]_o = [X]_i \times e^{\frac{Ex \times z \times F}{R \times T}} \times 10^{-3}$$

osnova 10⁻³ zaradi mM velikostnega razreda.

2.5.3. Beleženje ionskih ter električnih sprememb

Pri beleženju smo uporabljali tri diferenčne predojačevalnike (Slika 19.), na katere smo pripeljali signale elektrod. Dva ojačevalnika proizvajalca World Precision Instruments - WPI (ZDA) ter diferenčno sondo AI401 proizvajalca Axon Instruments - AI (ZDA). Signal indiferentne elektrode je predstavljal referenčno točko, merjeni signal pa sta predstavljali ionska in ERG elektrodi. Indiferentni signal smo peljali na referenčna (-) vhoda ojačevalnikov WPI, nato pa smo na njuna (+) vhoda pripeljali še signala merilnih elektrod, katera smo ob tem peljali tudi na + ter - vhod diferenčne sonde Axon Instruments - AI 401 (Slika 19.). Na ta način smo prišli do treh merilnih kanalov. Na prvem smo merili ERG (izhod enega WPI predojačevalnika); na drugem kanalu signal ionske elektrode (izhod drugega WPI predojačevalnika) in na tretjem razliko ionskega ter ERG signala. Tretji kanal, nam je z odštevanjem signala ERG od ionskega signala omogočil spremljanje spremembe koncentracije posameznega iona.

Vsi trije signali so bili na prvi stopnji (trije predojačevalniki) ojačani 10x, sledil je ojačevalnik signala CyberAmp380 Axon Instruments (Slika 19.), kjer smo signal ojačali še (10x). Skupno 100X ojačan signal smo peljali na 12 bitni analogno digitalni pretvornik signala CED1401 plus (Cambridge Electronic Design, Velika Britanija), ki je signal digitaliziral (Slika 19.). Tako digitaliziran signal smo v končnem koraku pripeljali na PC računalnik in ga z ustrezno programsko opremo shranili na trdi disk. Za zapisovanje signala smo uporabljali programa WCP verzija V5.1 za Windows okolje (Strathclyde Electrophysiology Software, Velika Britanija) ter programom Spike2 verzija 5.11 (Cambridge Electronic Design) Programa imata možnost zapisovanja več kanalov. Tako smo, s pomočjo signala iz fotocelice, zapisovali tudi časovni potek svetlobnih dražljajev. Spike2 program ima možnost kontinuiranega snemanja medtem ko program WCP, omogoča skupno največ 29696 vzorčenj znotraj enega posnetka, tako da so bili časi med vzorčenji odvisni od dolžin posnetkov in števila snemanih kanalov. Tako je bil interval vzorčenja 6.4 ms, pri dolžini posnetka 95s, 33.68 ms pri 500s posnetku in 1.35 ms pri 24s posnetku. Posnetki so vsebovali zapisa dveh kanalov, vsakega velikosti 14848 vzorcev.



Slika 19. Shema postavitve beleženja ionskih in električnih sprememb

2.6. Postavitev poskusov in poteki protokolov

Indiferentna elektroda je bila del merilne kamrice. Živali smo jo med oči vbodli ročno s pomočjo pincete in stereomikroskopa, v okviru postopka preparacije. Na mikromanipulatorja pritrjeni diferentni elektrodi smo najprej postavili v žarišče optične poti mikroskopa in si zapomnili ustrezno pozicijo mikromanipulatorja, nato pa smo ju počasi umaknili. Zatem smo kamrico s preparatom pritrdili na mikroskopsko mizico, ki se premika v treh smereh (x, y, z). Na kamrico smo namestili cevke za odvod in dovod plinov. Oko živali v kamrici smo s pomočjo mizice premaknili v žarišče optične osi in počasi približali diferentno elektrodo do prejšnje pozicije na mikromanipulatorju. Nato smo pod mikroskopom pazljivo aplicirali elektrodi, ne pregloboko (300 – 600 μm), v oko. Poskuse smo opravljali po več različnih protokolih.

Pri snemanju s programom WCP smo uporabljali naslednje protokole

1. Protokol za meritev pojavljanja in izginjanja ERG v anoksiji:

- Prvi protokol je bil sestavljen iz petih posnetkov, dolgih 95 sekund. V vsakem od njih je bilo 24 svetlobnih dražljajev, dolgih 350 ms, ki so si sledili v štiri sekundnih intervalih.

Dušik smo aplicirali enajsto sekundo drugega posnetka in ga odvzeli 45 sekund po začetku četrtega posnetka. Skupni čas aplikacije dušika je bil 224 s.

2. Protokol za merjenje P_{O_2} pri katerem odgovori izginejo

- Drugi poskus je bil sestavljen iz poljubnega števila posnetkov, dolgih 24 sekund, s štirimi dražljaji dolžine 0.5 s, v intervalih po 5 s. Med tem poskusom smo postopno zmanjševali P_{O_2} , dokler odgovori ERG niso popolnoma izginili. Jakost svetlobnih dražljajev je bila ves čas poskusov enaka.

Pri uporabi programa Spike2 je posnetek kontinuiran, tako da je bilo možno celotne poskuse posneti v enem posnetku. Uporabljali smo tri vrste protokolov.

1-protokol je vseboval svetlobne pulze dolžine 350ms vsake 4 sekunde, N_2 pa smo vpihavali od 103,2 sekunde do 327,3 sekunde poskusa ali 224 sekund.

2-protokol je vseboval kontinuirani svetlobni pulz od 1-599 sekunde. Preparat je bil v anoksičnih pogojih 103,2 sekunde do 327,3 sekunde poskusa ali 224 sekund.

3-protokol ni vseboval draženja s svetlobo, anoksija pa je nastopila v času enakem prejšnjima protokoloma.

Med protokoloma s svetlobnimi dražljaji smo istočasno merili tudi spektrofotometrične lastnosti encimov dihalne verige. Na ta način smo prišli do več hkratnih meritev na isti živali v istem času. Pri enem posnetku smo tako dobili informacijo o sumaričnem električnem dogajanju, -ERG, spremembi koncentracije posameznega iona – ionski signal ter informacijo o stanju encimov dihalne verige – spektrofotometrična informacija. Po odštetju ERG signala od signala ionske elektrode smo dobili signal, ki je predstavljal časovni potek spremembe napetosti iona, ki jo je bilo potrebno preračunati v koncentracijo tega iona v zunajceličnem prostoru.

2.8. Obdelava rezultatov

Meritve, posnete s programom WCP oziroma Spike2, so prikazane v grafični obliki. Digitalizirane zapise meritev smo prenesli v program Matlab (Math Works, ZDA) s pomočjo Matlab skripta, ki ga je napisal dr. Gregor Zupančič. V Matlab so bile prenešene vse številske vrednosti vzorcev posnetka, skupaj s časi vzorčenja, številom posnetkov, številom posnetih kanalov, enotami kanalov in vrednostmi mirovnega potenciala na začetku vsakega posnetka. Iz uvoženih podatkov smo v Matlab-u izdelali grafe, identične posnetkom v programih. Program Matlab ima tudi možnost izbire vrednosti določenega vzorca, torej grafičnih vrednosti na točno določenih mestih posnetkov. Dobljene vrednosti je bilo mogoče urediti v vektorje in matrike, s katerimi smo lahko opravljali različne matematične operacije, kot so: seštevanje, odštevanje, povprečevanja, izračuni vrednosti deviacij in standardnih napak. Izmerjene numerične podatke smo prenašali v Microsoftov Excel in program Origin za izdelavo grafov.

3. NAMEN DELA

Metaboni stres povzroči odprtje TRP kanalov fotoreceptroskih celic pri muhah in vinskih mušicah. Mehanizem aktivacije TRP kanalov je povezan z oteženo (ponovno) sintezo molekul PIP₂ zaradi pomanjkanja ATP. Namen našega dela je bilo ugotoviti:

- Kolikšna stopnja metabolnega stresa je potrebna za odprtje TRP kanalov?
- Ali fotoreceptorske celice v fizioloških pogojih naletijo na metabolični stres take stopnje, ki je potreben za odprtje TRP kanalov in ali gre torej za fiziološki mehanizem ali le za patofiziološki pojav.
- Ali je ta mehanizem odpiranja TRP kanalov zaradi metabolnega stresa le posebnost muh oz. dvokrilcev (*Diptera*) ali pa ga srečamo tudi pri žuželkah s popolnoma drugačnim tipom rhabdoma (*Ascalaphus*; *Neuroptera*)

Na temelju predhodnih raziskav (Perovšek 2001, Lah 2002) in podatkov iz literature (Agam in sod. 2000, Hardie in sod. 2003) smo postavili naslednje delovne hipoteze:

- TRP kanali se odprejo le ob hudi, dolgotrajni hipoksiji.
- Odprtje TRP kanalov zaradi metabolnega stresa ne predstavlja fiziološko pomembnega načina za aktivacijo TRP kanalov.
- Pri aktivaciji TRP kanalov zaradi pomanjkanja ATP gre za splošen princip, ki se pojavlja pri vseh skupinah žuželk.

4. REZULTATI

Meritve izvedene v okviru naših poskusov spadajo v tri področja

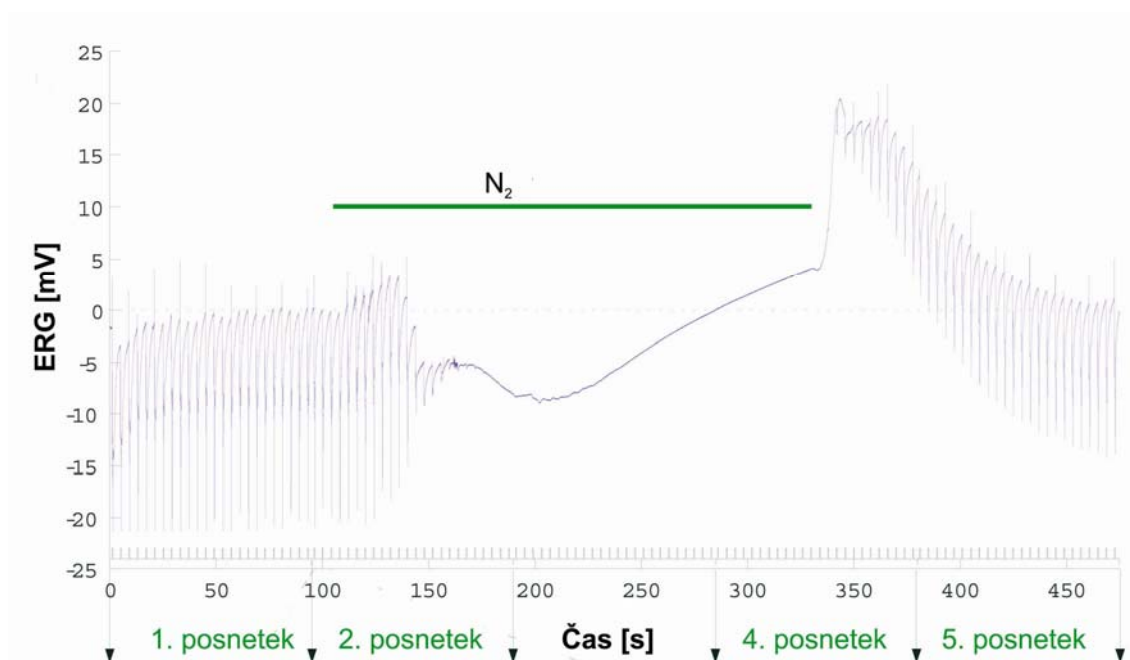
- meritve električnih sprememb (elektroretinogram)
- meritve sprememb ionskih koncentracij (merjenje z ionsko selektivnimi elektrodami)
- meritve oksidoredukcijskega stanja pigmentov dihalne verige (spektrofotometrija)

S pomočjo teh treh tehnik smo poskušali ovrednotiti vpliv anoksije na dogajanje pri fotoreceptorskih celicah

Meritve ERG ter koncentracij ionov smo opravljali na obeh poskusnih vrstah, medtem ko smo spektrofotometrične meritve lahko opravljali le na očeh muhe, saj imajo oči *Metuljčnice* premajhno stopnjo refleksije zaradi prisotnosti zaščitnega pigmenta, ki poleg tega, da zastira pot svetlobi, se tudi premika in tako dodatno spreminja količino in spektralno sestavo odbite svetlobe.

4.1. Elektroretinografija

4.1.1. Vpliv prehoda med anoksičnimi in atmosferskimi pogoji na ERG pri vrstah *Ascalaphus macaronius* in *Calliphora vicina* (white eye mutant)

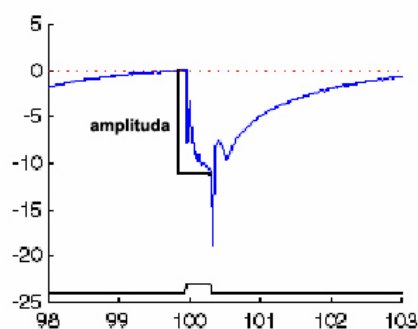


Slika 20. Prikaz celotnega posnetka aplikacije anoksičnih pogojev pri muhi. Posnetek je sestavljen iz petih posameznih posnetkov, katerih konci oziroma začetki so označeni s puščicami. Svetlobni

dražljaji so si sledili v intervalih po 4 sekunde kar je predstavljalo tudi našo časovno ločljivost pojavljanja in izginjanja odgovorov.

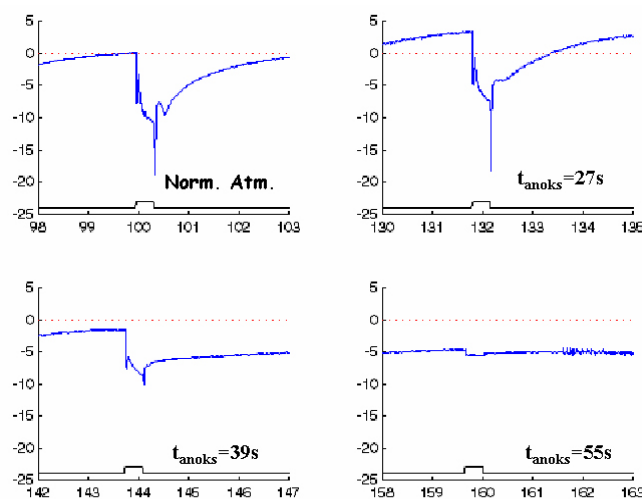
Pri vrsti *Ascalaphus* je bilo snemanje kontinuirano, tako da posnetka nismo sestavljali. Aplikacija anoksičnih pogojev je bila časovno enaka pri obeh vrstah in tako med njima primerljiva.

Za ovrednotenje vpliva anoksije oziroma parcialnega tlaka O_2 na ERG smo izbrali amplitudo ERG (Slika 21.)

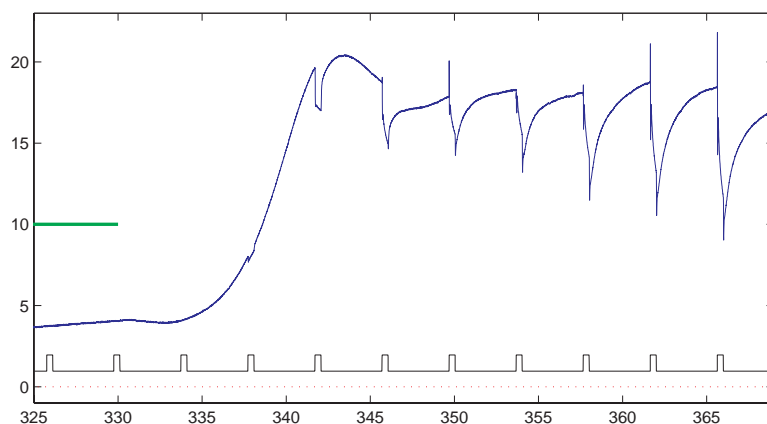


Slika 21. Prikaz enega od odgovorov pri muhi v anoksiji z označeno merjeno amplitudo.

Po vzpostavitvi anoksičnih pogojev se je amplituda ERG pri obeh vrstah zmanjševala dokler odgovor ni povsem izginil (Slika 22.). Opaziti je daljše vztrajanje odgovorov vrste *Ascalaphus* (slika 24). Ob vzpostavitvi normalnih atmosferskih pogojev se odgovor vrne hitreje kot izgine (Slika 23.), hkrati smo opazili hitrejše vračanje odgovorov pri muhi v primerjavi z metuljčnico (Slika 24.).



Slika 22. Prikaz ugašanja amplitude ERG po vzpostavitvi anoksičnih pogojev pri muhi



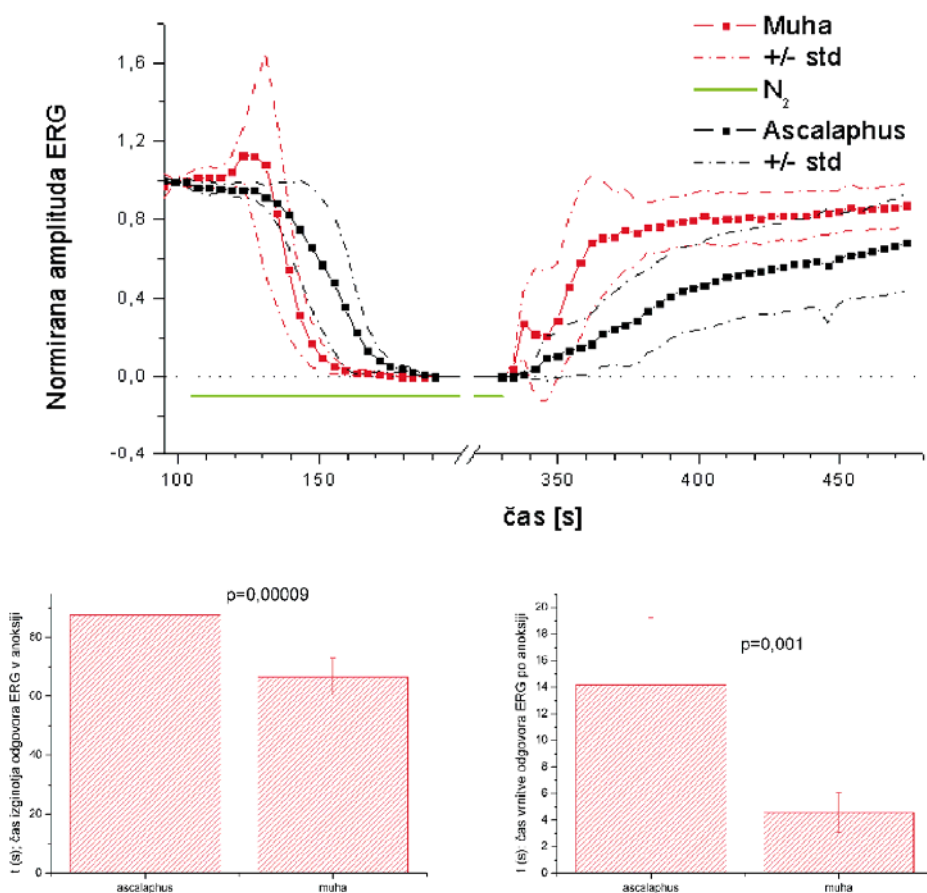
Slika 23. Vrnitev odgovora in večanje njegove amplitude po prenehanju anoksije.

Na sliki je del posnetka poskusa po vrnitvi normalnih (atmosferskih) pogojev pri muhi.

Prvi odgovor se v tem primeru pojavi po približno 8 sekundah, njegova amplituda pa je komaj vidna. Amplitude odgovorov so v nadaljnjem poteku vse večje. Prenehanje anoksičnih pogojev označuje konec zelene črte ob času 330 sekund.

Poskus je bil opravljen na sedmih muhah in devetih metuljčnicah. Velikost-amplitudo ERG smo normirali na tretji odgovor pred aplikacijo anoksije. Amplituda ERG je po anoksiji padala dokler odgovori niso povsem izginili (Slika 22). Pri muhi odgovor izgine po 64 sekundah medtem ko pri metuljčnici izgine po 88 sekundah (Slika 24).

Pojavljanje odgovorov po ponovni vzpostavitvi normalnih pogojev je pri muhah hitrejši. Tako se pri muhi odgovori v povprečju pojavijo po 4,6 sekundah pri Metuljčnici pa šele po 14 sekundah.



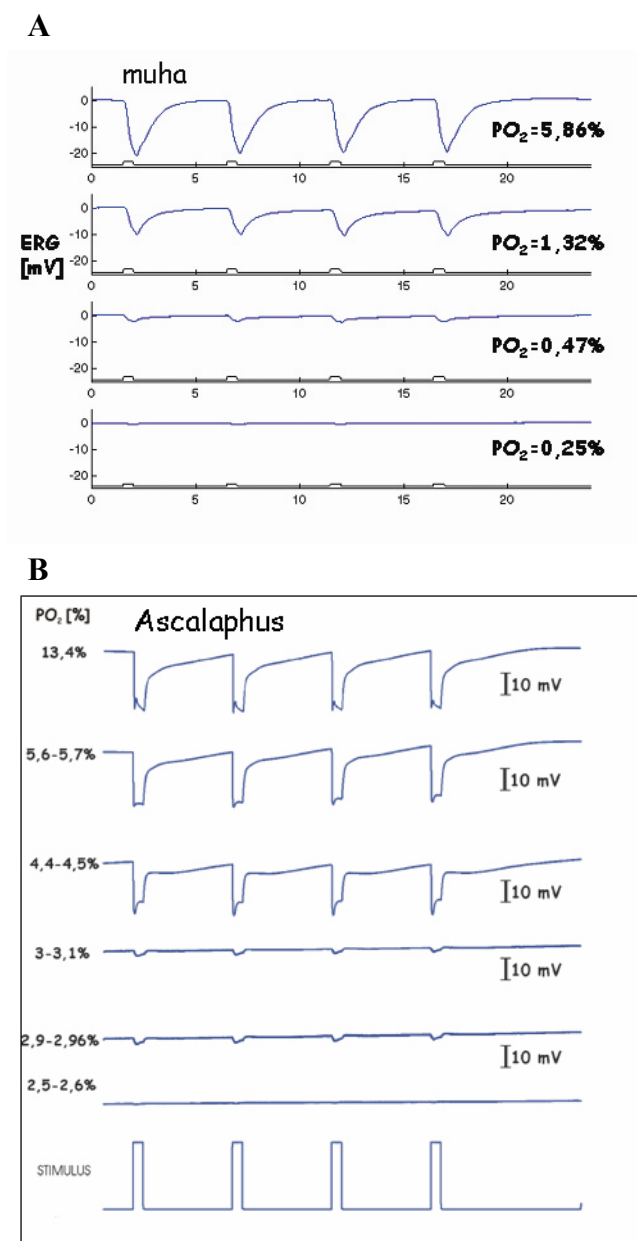
Slika 24. Prikaz ugašanja in pojavljanja odgovorov pri omenjenih vrstah.

Zelena črta označuje trajanje anoksije-torej pogojev 100% dušika. Zgornji del slike prikazuje časovni potek spreminjanja povprečne amplitude ERG v anoksiji in po vrnitvi v normalne pogoje pri obeh vrstah.

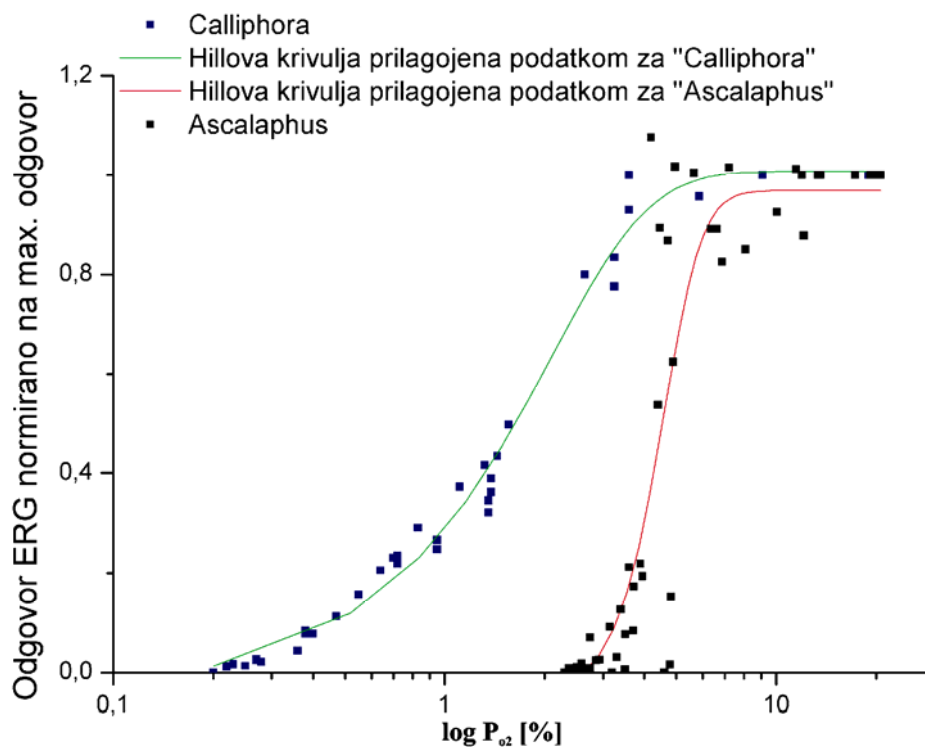
Histogram na sliki 24 spodaj levo prikazuje izginjanje ERG v anoksiji. Pri metuljčnici odgovori izginejo po 88 sekundah pri muhi pa po 64 sekundah. Časa se statistično razlikujeta z verjetnostjo 99,9%. Histogram desno prikazuje pojavljanje odgovorov pri obeh vrstah po ponovni vzpostavitvi normalnih atmosferskih pogojev. Pri muhi se prvi odgovor v povprečju pojavi že po 4,6 sekundah medtem ko pri Metuljčnici preteče v povprečju 14,2 sekunde do prvega odgovora. Časa se statistično razlikujeta z verjetnostjo 99,9%.

4.1.2. Vpliv deleža kisika na velikost odgovora ERG pri vrstah *Ascalaphus macaronius* in *Calliphora vicina* (white eye mutant)

Ob manjšanju deleža kisika smo opazili, da se velikost ERG zmanjšuje (slika 25A in B, Slika 26.). Poskus smo izvedli na petih muhah in devetih Metuljčicah.



Slika 25. Prikaz upadanja velikosti ERG v odvisnosti od deleža O_2 . A prikaz upadanja pri muhi in B prikaz upadanja pri Metuljčnici.



Slika 26. Prikaz velikosti normirane amplitude ERG v odvisnosti od deleža O_2 pri muhah in metuljčnicah. Delež kisika se nahaja na logaritemski x osi.

Opazimo lahko, da pri muhi odgovor ostaja le malo prizadet do P_{O_2} 4%, nato pa začne upadati (slika 26.). Odgovor ERG pri muhah izgine pri deležu kisika 0,19%.

Pri metuljčnici pa se kaže večja odvisnost oziroma občutljivost na delež kisika. Tako odgovor izgine že pri deležu kisika 2,6% relativno neprizadet pa ostaja do deleža 7%. Opazimo lahko tudi večji naklon torej hitrost padanja odgovora v odvisnosti od deleža kisika pri metuljčnici.

4.2. Spremljanje koncentracij ionov s sočasnim spremljanjem oksidoredukcijskega stanja dihalnih pigmentov

Pri omenjenih meritvah smo spremljali stanja dihalnih pigmentov – citokromov C, B, A, A₃. Največja sprememba v koncentraciji reducirane oblike citokroma pri prehodih v in iz anoksične atmosfere je bila izmerjena pri citokromu C. Največja sprememba pomeni tudi največjo ločljivost zato smo se pri obdelavi podatkov omejili na spremembo v koncentraciji reducirane oblike citokroma C ([citC_{red}]) kot predstavnika oksidoredukcijskega stanja dihalne verige.

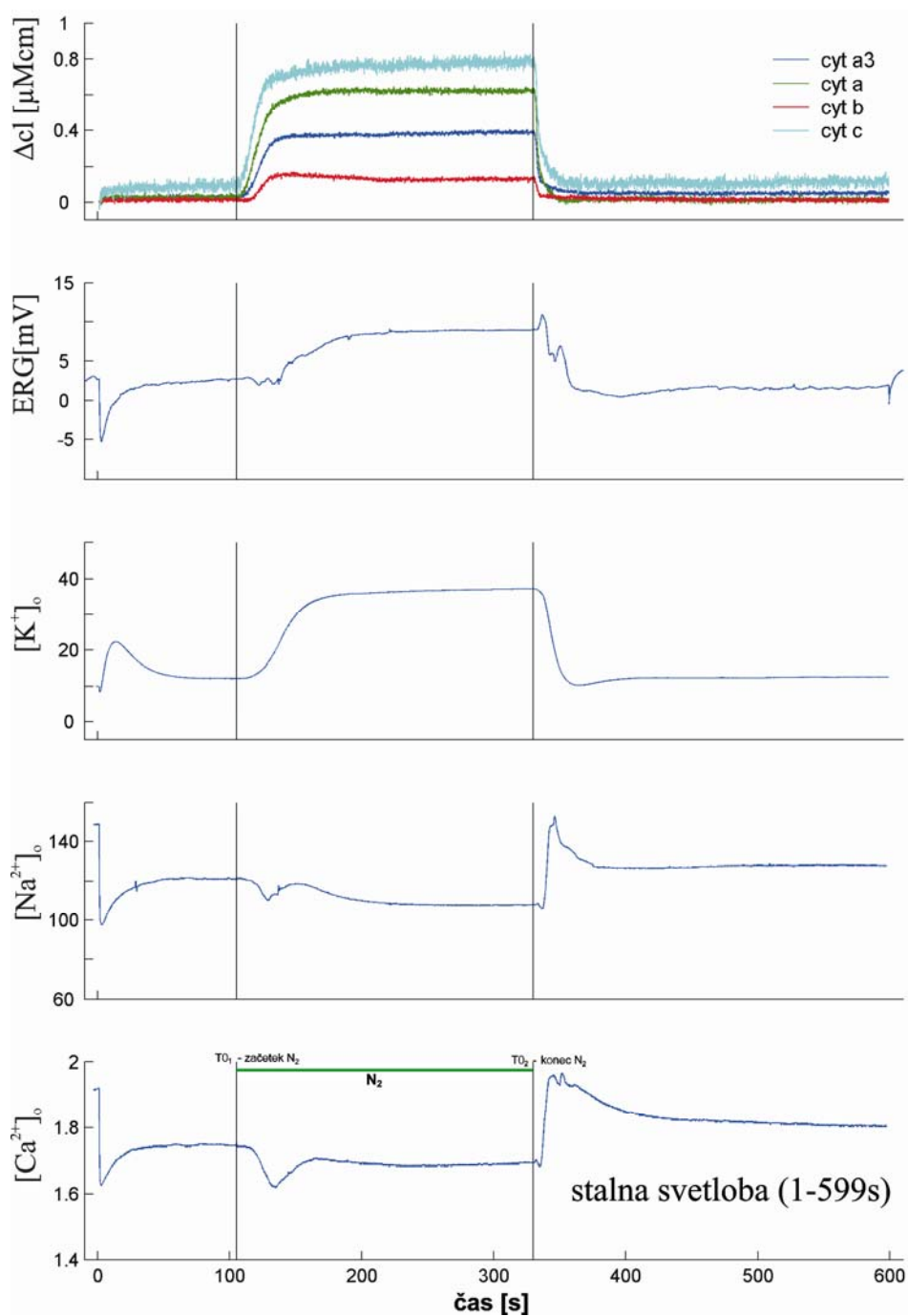
Ob izvedenih poskusih smo iz dobljenih posnetkov dobili več različnih informacij.

1. Hkratno spremljanje stanja pigmentov dihalne verige ter električnih in kemijskih (ionskih) dogajanj pri muhi.
2. Zakasnitve sprememb ionskih koncentracij ob prehodih v anoksično in zopet normalno atmosfersko stanje.
3. Stanje [citC_{red}] v trenutku ko ionska sprememba doseže 90% največje spremembe koncentracije iona
4. Spremljanje velikosti koncentracijskih sprememb ionov v določenih delih časovnih potekov stanja posameznih ionov pri svetlobnih pulzih, temi in pri stalnem draženju s svetlobo ter njihova primerjava.

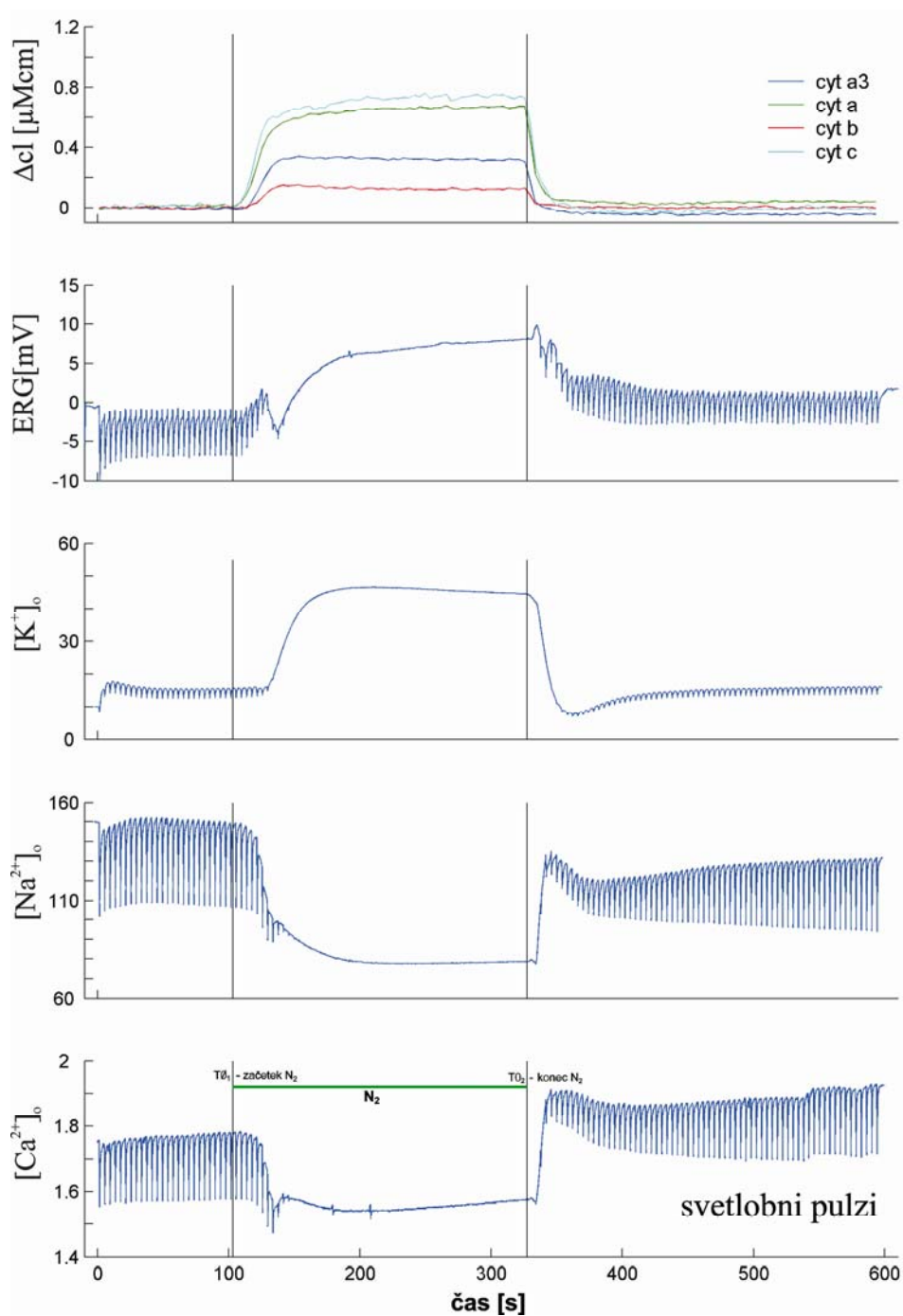
V nadaljevanju bodo srednje vrednosti posameznih stolpcev histogramov ter standardne napake prikazane kot tabele v prilogah

4.2.1 Hkratno spremljanje stanja dihalne verige ter električnih in kemijskih dogajanj pri prehodu v anoksijo ter ponovnem prehodu v atmosfersko-normalno stanje pri muhi vrste *Calliphora vicina* (white eye mutant)

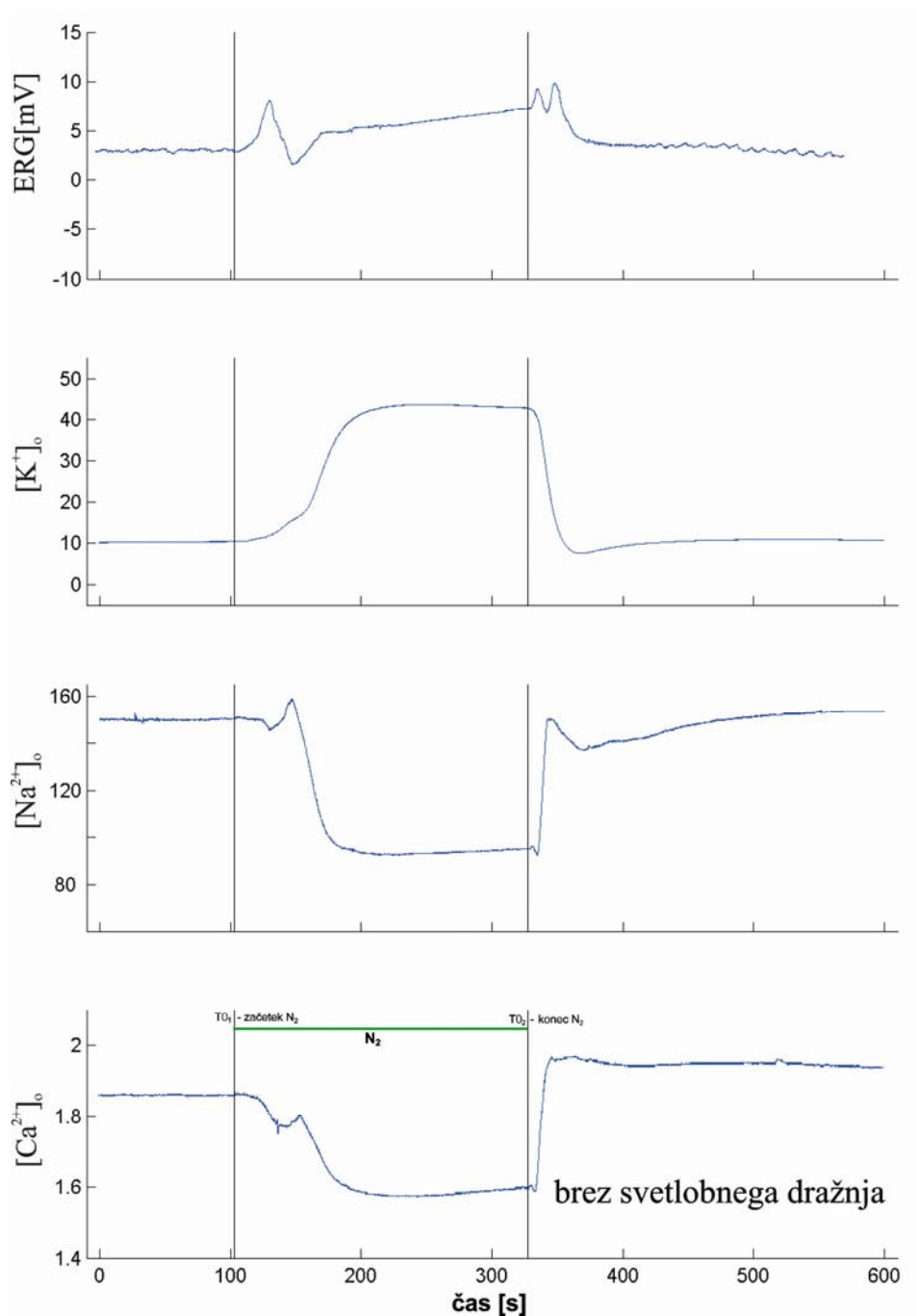
Pri meritvah smo istočasno merili stanje posameznega iona torej njegovo koncentracijo, ERG in stanje dihalnih pigmentov. Protokoli so potekali v stalnem svetlobnem draženju – **svetloba**, v svetlobnih pulzih ki so si sledili v intervalih po 4 sekunde – **pulzi** in v protokolu brez svetlobnega draženja – **temi**, kjer nismo spremljali stanja dihalnih pigmentov. Za spremljanje stanja dihalnih pigmentov smo potrebovali odbito svetlobo, za katero je bilo potrebno svetlobno draženje. Prav tako nismo spremljali dihalne verige pri metuljčnici, saj je metuljčnica divji genetski tip in tako v očesu vsebuje spremljevalne pigmentne celice, ki vsebujejo zaščitni pigment, ki zastira prehod odbite svetlobe, zato ta ni dovolj močna za merjenje stanja dihalnih pigmentov.



Slika 27. Prikaz poteka poskusa pri muhi v svetlobi. Svetloba traja v času od 1 do 599 sekund brez presledkov. Čas trajanja anoksije je označen z zeleno črto na spodnjem posnetku oziroma z navpičnimi črnimi črtami. Na zgornjem posnetku je prikazano stanje dihalnih pigmentov, sledi ERG, koncentracija K^+ , Na^+ in Ca^{2+} pri svetlobi.



Slika 28. Prikaz poteka poskusa pri muhi s svetlobnimi pulzi v intervalih po 4 sekunde. Čas trajanja anoksije je označen z zeleno črto na spodnjem posnetku oziroma z navpičnimi črnimi črtami. Na zgornjem posnetku je prikazano stanje dihalnih pigmentov, sledi ERG, koncentracija K, Na in Ca^{2+} pri svetlobnih pulzih.

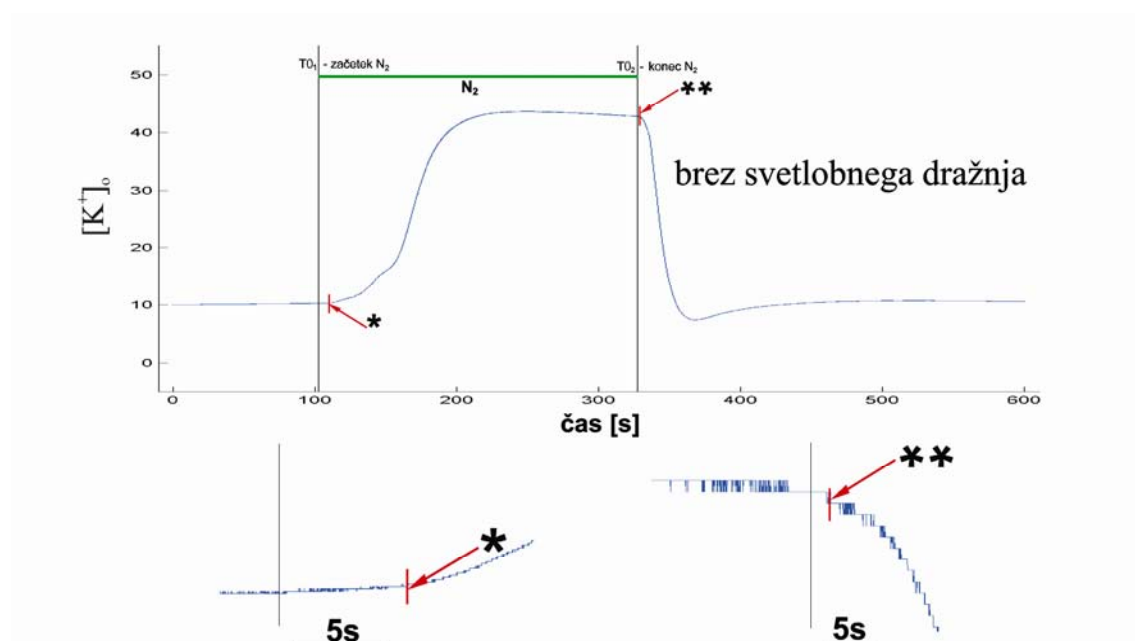


Slika 29. Prikaz poteka poskusa v temi. Čas trajanja anoksije je označen z zeleno črto na spodnjem posnetku oziroma z navpičnimi črnimi črtami. Na zgornjem posnetku je prikazan ERG sledi koncentracija K^+ , Na^+ in Ca^{2+} v temi

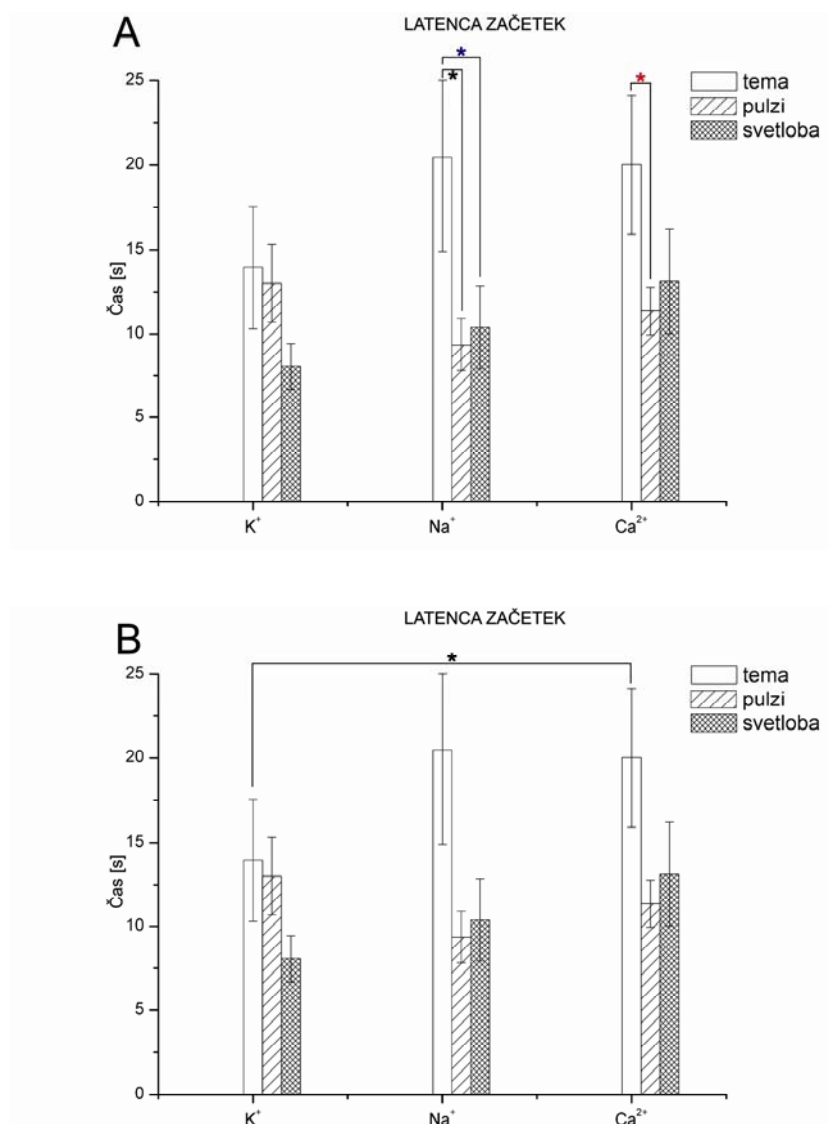
Na vseh slikah lahko opazimo spremembe koncentracij ionov po prehodu v anoksično stanje (odprtje kanalov). Pri poskusu s svetlobnimi pulzi smo opazili, da ERG odgovori izginejo, ko so dihalni pigmenti že skoraj popolnoma reducirani.

4.2.2. Zakasnitve sprememb koncentracij ionov ob vzpostavitvi anoksičnih pogojev in ponovnem prehodu v normalne - atmosferske pogoje.

Pigmenti dihalne verige se na anoksijo odzovejo takorekoč takoj, saj se vrenost citC začne spreminjati že po 1 sekundi od začetka vpihavanja dušika. Glede na pot, ki jo mora dušik opraviti, da zamenja atmosfero v okolici poskusne živali in glede na volumen zraka v kamrici poskusne živali, lahko trdimo, da zakasnitve spremembe stanja dihalnih pigmentov ni, kar pa ne velja za začetek spremembe koncentracije ionov.



Slika 30. Prikaz zakasnitve spremembe koncentracije K⁺ ionov v temi ob prehodu v anoksijo in ponovni vzpostavitvi normalnih atmosferskih pogojev. Na sliki spodaj sta prikazana povečana izseka iz zgornje slike. * označuje zakasnitev ob prehodu v anoksijo, ** pa označuje zakasnitev ob vzpostavitvi normalnih atmosferskih pogojev.



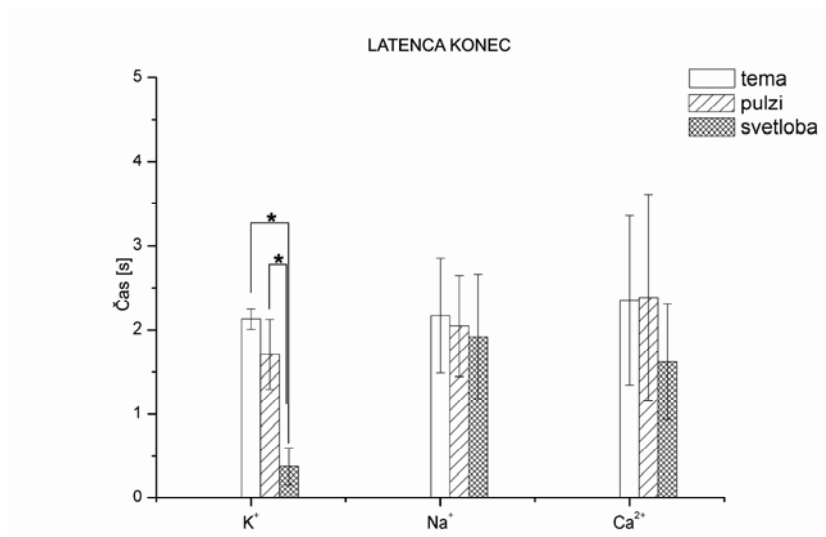
Slika 31. Prikaz vrednosti zakasnitev spremembe posameznih ionov pri svetlobi, pulzih in temi ob prehodu v anoksijo. Histogram A prikazuje statistične razlike pri posameznih ionih med svetlobo pulzi in temo. Histogram B prikazuje statistično različne zakasnitve med posameznimi ioni.

A histogram: Pri K⁺ ionu med posameznimi protokoli (svetloba, pulzi, tema) ni statistično dokazljivih razlik. Pri Na⁺ ionu sta svetloba in pa pulzi statistično različni od teme. Simbol * označuje verjetnost $\geq 95\%$. Pri Ca²⁺ sta si statistično različna le pulzi in svetloba. Verjetnost * $\geq 95\%$.

Na histogramu lahko pri Na⁺ in Ca²⁺ ionu opazimo tudi podaljševanje zakasnitve od svetlobe proti pulzom in nazadnje temi, kjer je zakasnitev najdaljša.

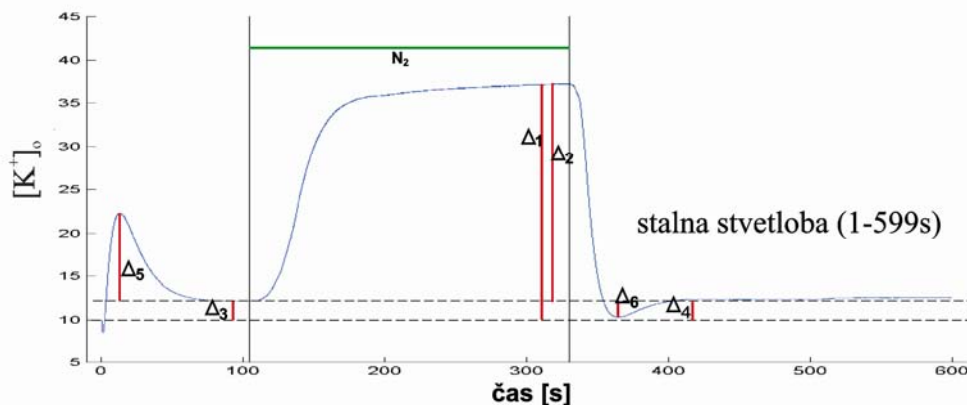
Histogram B: Statistično signifikantno razliko pri posameznih protokolih ob primerjanju ionov med seboj lahko zatrdimo z verjetnostjo $\geq 95\%$ le pri razliki med K in Ca temotnim protokolom.

Sicer pa so zakasnitve trajale od 8sekund pri K-svetloba do 20sekund pri Na-tema protokolu.



Slika 32. Histogram prikazuje zakasnitev spremembe koncentracije ionov ob prehodu iz anoksije v normalne – atmosferske pogoje. Zakasnitve med ioni ne kažejo statistično signifikantnih razlik, zakasnitve pa so relativno majhne (2s). Statistično signifikantne razlike so se pokazale le pri K⁺ ionu, kjer se zakasnitev pri protokolu K svetloba signifikantno razlikuje od ostalih dveh protokolov. Simbol * predstavlja verjetnost $\geq 95\%$.

4.2.3. Vrednotenje koncentracijskih sprememb pri posameznih ionih med različnimi protokoli pri prehodu v anoksične pogoje ter ponovni vzpostavitvi normalnih – atmosferskih pogojev.



Slika 33. Merjeni parametri spremembe koncentracije ionov. V tem primeru označeni na protokolu K – svetloba. Parametri so označeni z Δ_{1-6} .

Δ_1 – predstavlja največjo spremembo koncentracije med mirovnim nivojem ter največjo spremembo

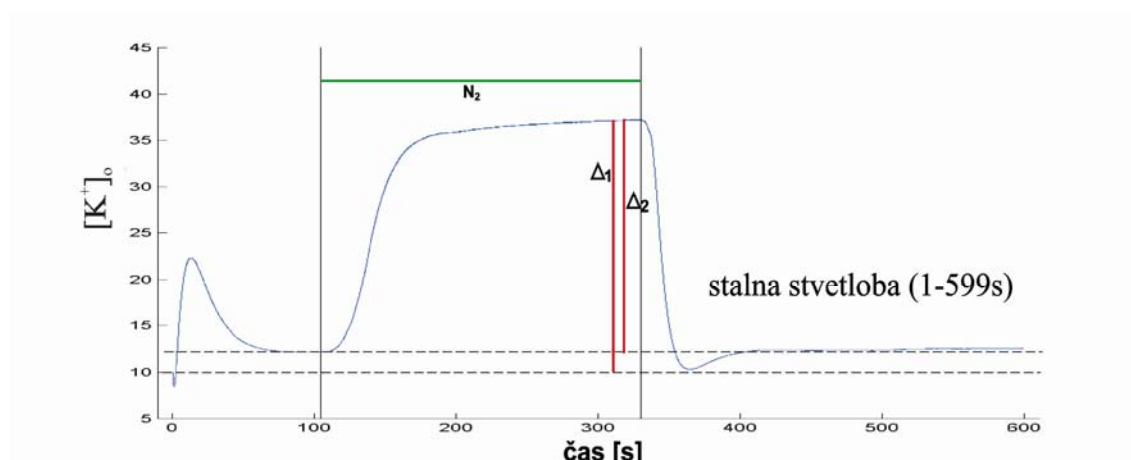
Δ_2 – predstavlja največjo spremembo koncentracije med "platojem", to je svetlobno obremenitvijo, ter največjo spremembo

Δ_3 – predstavlja koncentracijsko razliko med "platojem" ter mirovnim stanjem pred anoksijo – svetlobna obremenitev pred anoksijo

Δ_4 – predstavlja razliko po ponovni vzpostavitvi normalnih pogojev - svetlobna obremenitev po anoksiji

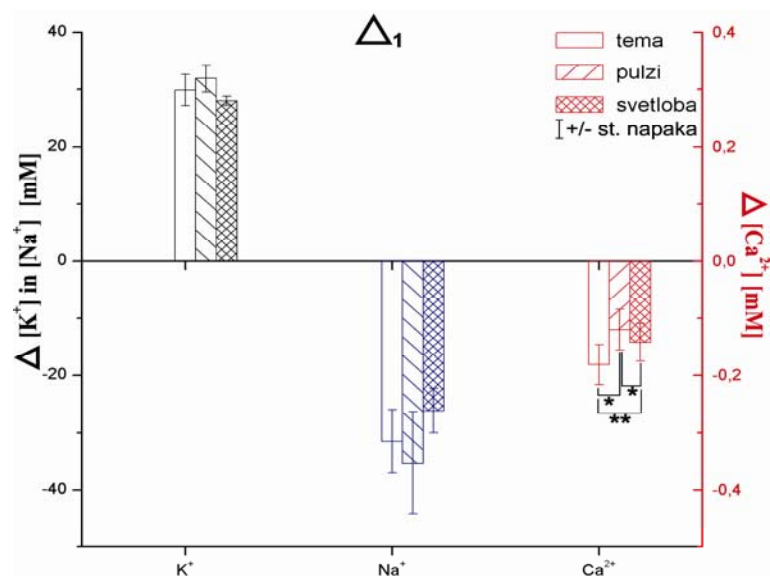
Δ_5 – predstavlja koncentracijsko razliko med "platojem" ter "overshoot"-om koncentracije iona pred anoksijo

Δ_6 – predstavlja koncentracijsko razliko med "platojem" ter "overshoot"-om koncentracije iona po vzpostavitvi normalnih pogojev



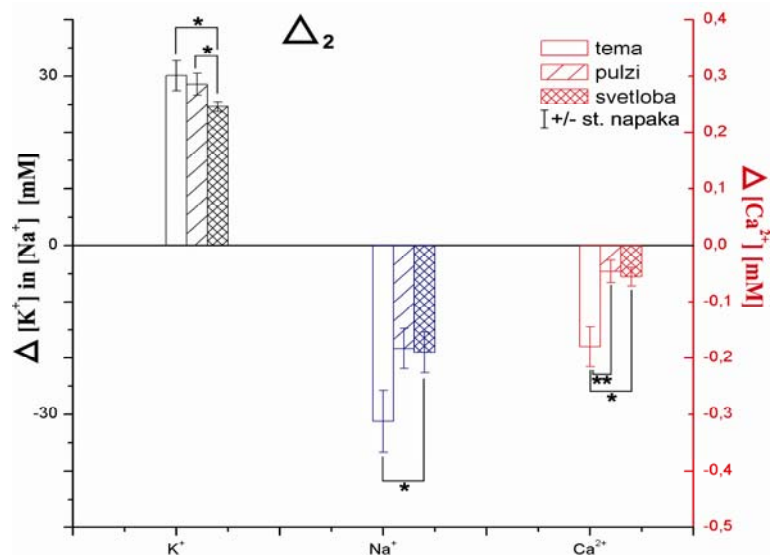
Slika 34. Merjena parametra-sprememba koncentracije Δ_1 in Δ_2 .

Δ_1 predstavlja spremembo med mirovnim nivojem koncentracije iona ter največjo spremembo koncentracije, hkrati predstavlja največjo možno koncentracijsko razliko. Δ_2 pa predstavlja največjo spremembo koncentracije med "platojem" ter največjo spremembo. Plato se pojavlja v protokolih s svetlobo in svetlobnimi pulzi, ko se nivo ERG po približno 80 sekundah ustali. Plato se v temnem protokolu seveda ne pojavlja. Plato tako predstavlja obremenitev sistema s svetlobo.



Slika 35. Statistično dokazljive razlike v spremembi koncentracije parametra Δ_1 med protokoli pri posameznih ionih. Δ_1 predstavlja spremembo med mirovnim nivojem ERG ter največjo spremembo koncentracije. Leva y-os označuje spremembo koncentracije v mM pri K^+ in Na^+ , desna y os pa pri Ca^{2+} kjer je sprememba koncentracije za en velikostni razred manjša.

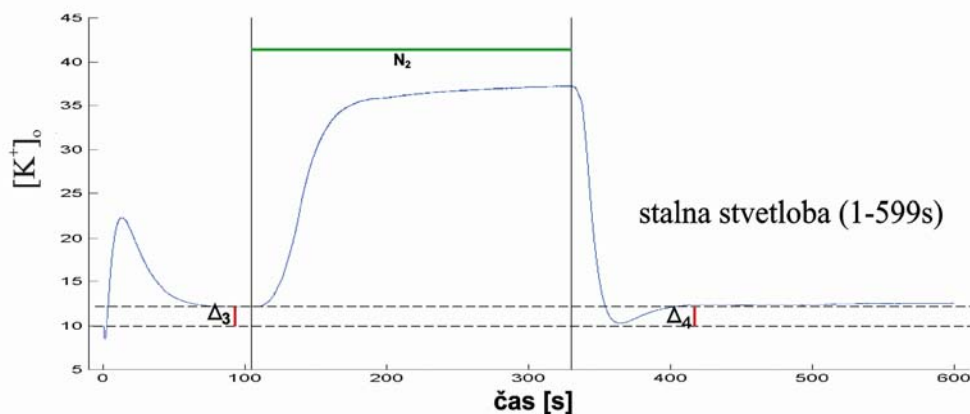
Med seboj se statistično razlikujejo le protokoli pri Ca^{2+} ; * - verjetnost razlike $\geq 95\%$, ** verjetnost razlike $\geq 99\%$. Velikost spremembe koncentracije je pri Na^+ in K^+ okoli 30 mM.



Slika 36. Histogram statistično dokazljivih razlik v spremembi koncentracije (parameter Δ_2) med protokoli pri posameznih ionih. Δ_2 predstavlja velikost spremembe koncentracije med "platojem" ter največjo spremembo. Leva y-os označuje spremembo koncentracije v mM pri K^+ in Na^+ , desna y-os pa pri Ca^{2+} .

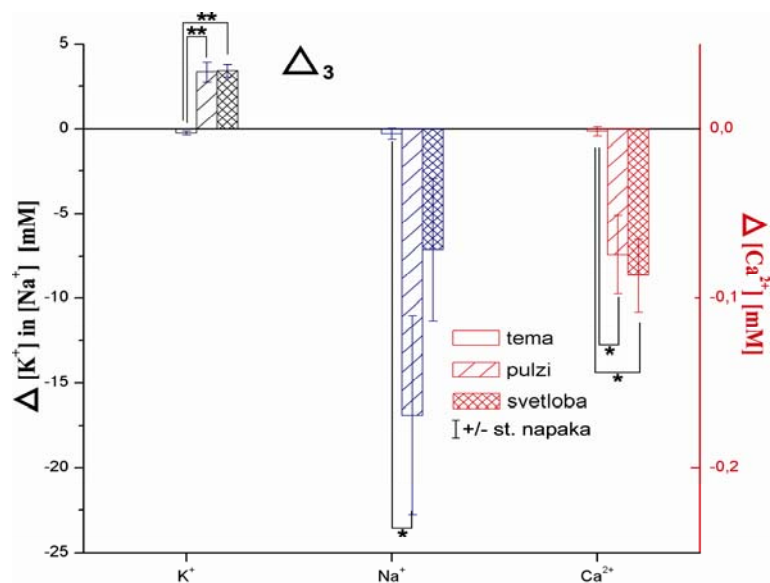
Med seboj se statistično razlikujejo protokoli pri vseh ionih. Pri K^+ ionu se sprememba konc. pri svetlobi statistično signifikantno razlikuje od protokola teme in pulzov. Pri Na^+

se tema razlikuje od svetlobe in pulzov. Pri Ca^{2+} pa med protokoloma teme in svetlobe ter med protokoloma teme in pulzov. * - verjetnost razlike $\geq 95\%$, ** verjetnost razlike $\geq 99\%$.



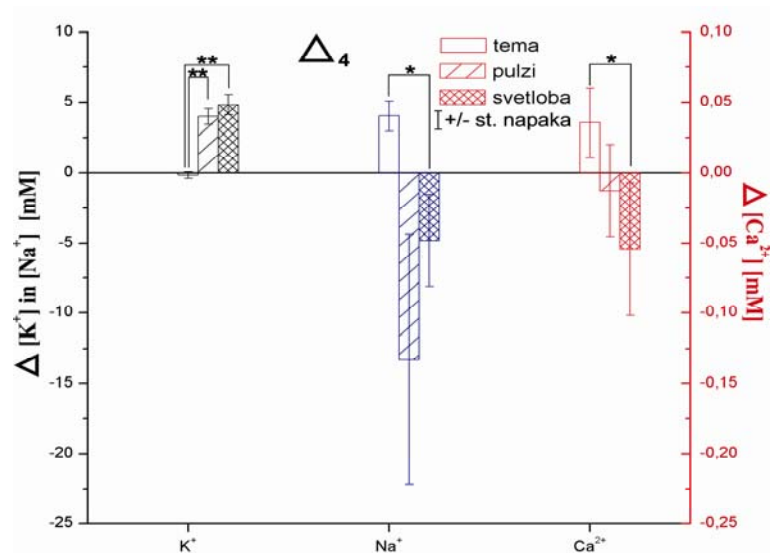
Slika 37. Merjena parametra-sprememba koncentracije Δ_3 in Δ_4 .

Δ_3 predstavlja koncentracijsko razliko med "platojem" ter mirovnim stanjem pred anoksijo, Δ_4 pa razliko po ponovni vzpostavitvi normalnih pogojev. Opisani razliki predstavljata svetlobno obremenitev sistema.



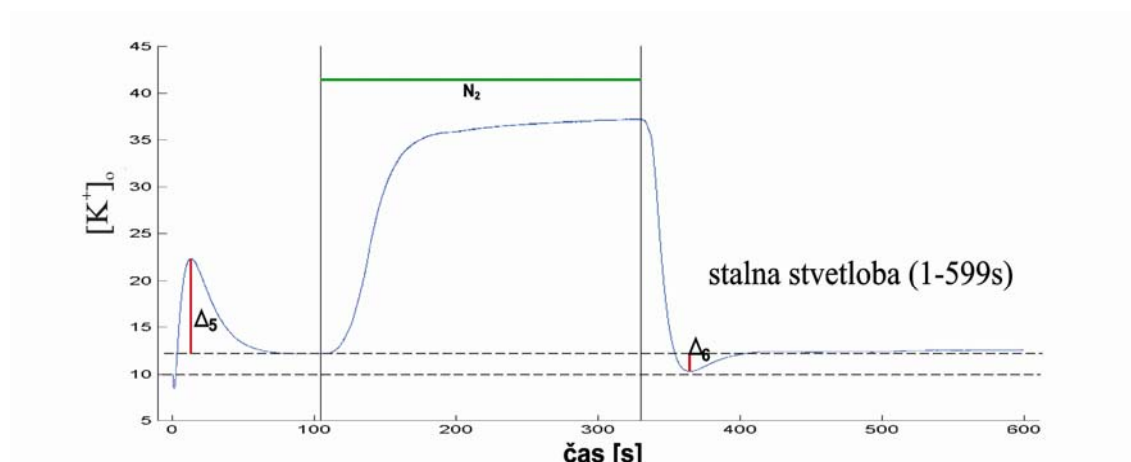
Slika 38. Parameter Δ_3 predstavlja svetlobno obremenitev sistema pred anoksijo.

Pri vseh ionih je vidno, da je obremenitev sistema v temi nična in po pričakovanju statistično signifikantno različna od protokolov svetlobe in pulzov, dokler obremenitev sistema med svetlobo in pulzi ni signifikantno različna. * - verjetnost razlike $\geq 95\%$, ** verjetnost razlike $\geq 99\%$



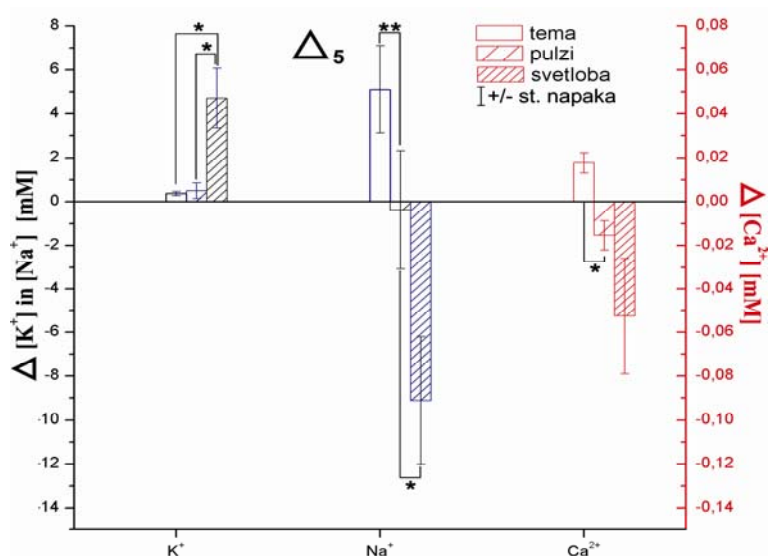
Slika 39. Parameter Δ_4 predstavlja svetlobno obremenitev sistema po anoksiji.

Pri vseh ionih je vidno, da je obremenitev sistema v temi nična oziroma zaradi lezenja signala sprememba v temi dobi obratni predznak (npr. pri Na⁺ ionu je sprememba koncentracije pozitivna torej se zunajcelično koncentracija tega iona "dvigne". Po pričakovanju je koncentracija v temi statistično signifikantno različna od protokolov svetlobe in pulzov, dokler obremenitev sistema med svetlobo in pulzi ni signifikantno različna. * - verjetnost razlike $\geq 95\%$, ** verjetnost razlike $\geq 99\%$



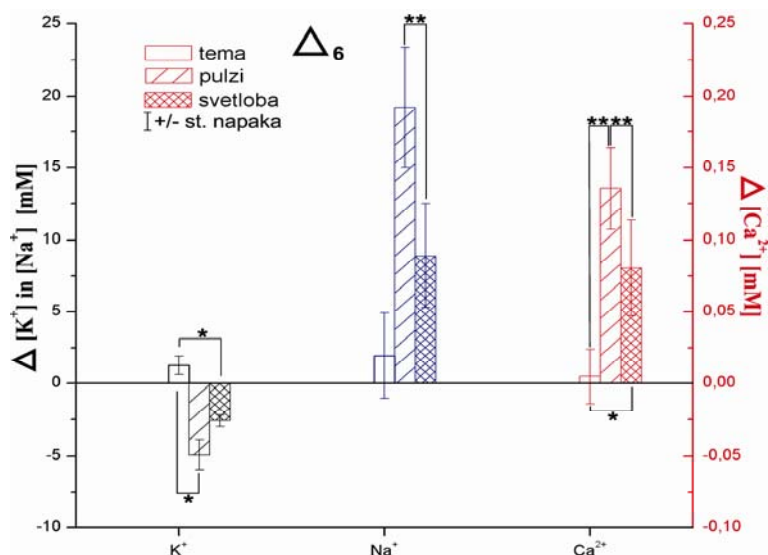
Slika 40. Prikaz merjenih parametrov Δ_5 in Δ_6 .

Δ_5 predstavlja koncentracijsko razliko med "platojem" ter "overshoot"-om koncentracije iona pred anoksijo, Δ_6 pa razliko po ponovni vzpostavitvi normalnih pogojev.



Slika 41. Parameter Δ_5 - koncentracijska razlika med "platojem" ter "overshoot"-om koncentracije iona pred anoksijo.

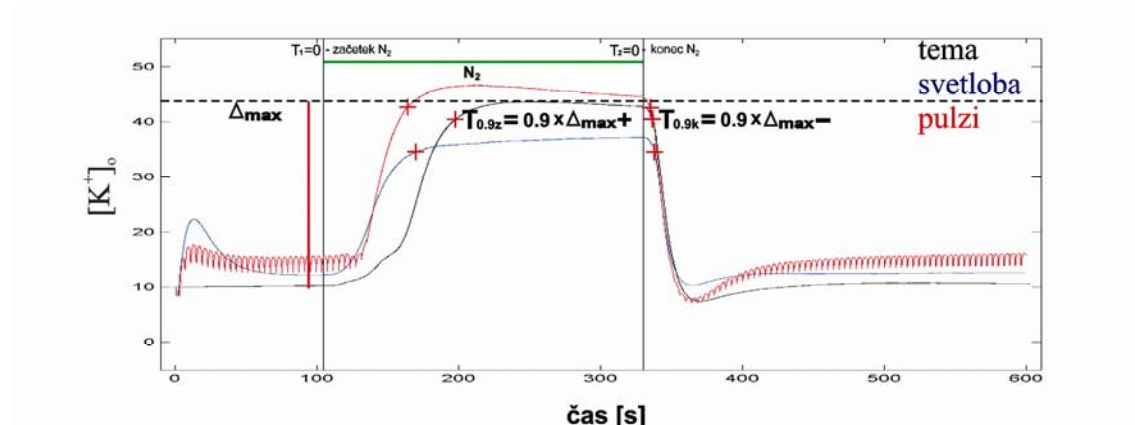
Pri vseh ionih je vidno, da je sprememba pri pulzih in temi skoraj nična in signifikantno različna od svetlobe kjer je ta razlika v vseh primerih največja. Pri Na^+ in Ca^{2+} opazimo obratno spremembo v temi. * - verjetnost razlike $\geq 95\%$, ** verjetnost razlike $\geq 99\%$



Slika 42. Parameter Δ_6 koncentracijska razlika med "platojem" ter "overshoot"-om koncentracije iona po anoksiji.

Pri vseh ionih je vidno, da je sprememba pri temi skoraj nična in signifikantno različna od svetlobe in teme. Povsod lahko opazimo največjo razliko pri pulzih nekaj manjšo pri svetlobi ter najmanjšo v temi. * - verjetnost razlike $\geq 95\%$, ** verjetnost razlike $\geq 99\%$

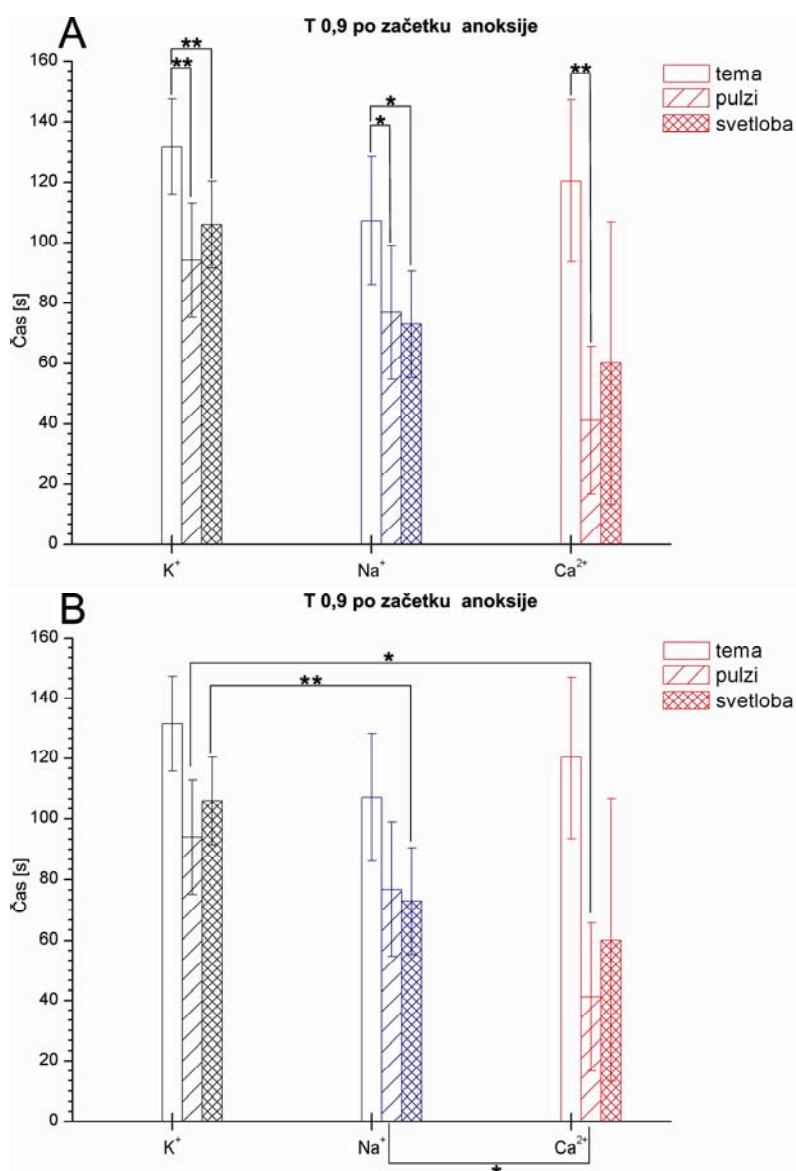
4.2.4. Čas $T_{0,9}$ je čas pred in po anoksiji ob katerem se koncentracija iona spremeni za 0,9-krat maksimalne vrednosti konc.spremembe.



Slika 43. Združeni protokoli teme svetlobe in pulzov.

Na časovnih potekih sprememb koncentracije K^+ iona so označena mesta kjer je dosežena vrednost 0,9krat maksimalna konc. sprememba.

Pri vseh ionih smo na označenih mestih (+) odčitali ob katerem času je bila ta vrednost dosežena in potem te čase primerjali med seboj. Opazimo lahko, da je čas doseganja te vrednosti pri K^+ po začetku anoksije najdaljši v temi, medtem ko so si časi po anoksiji relativno blizu skupaj



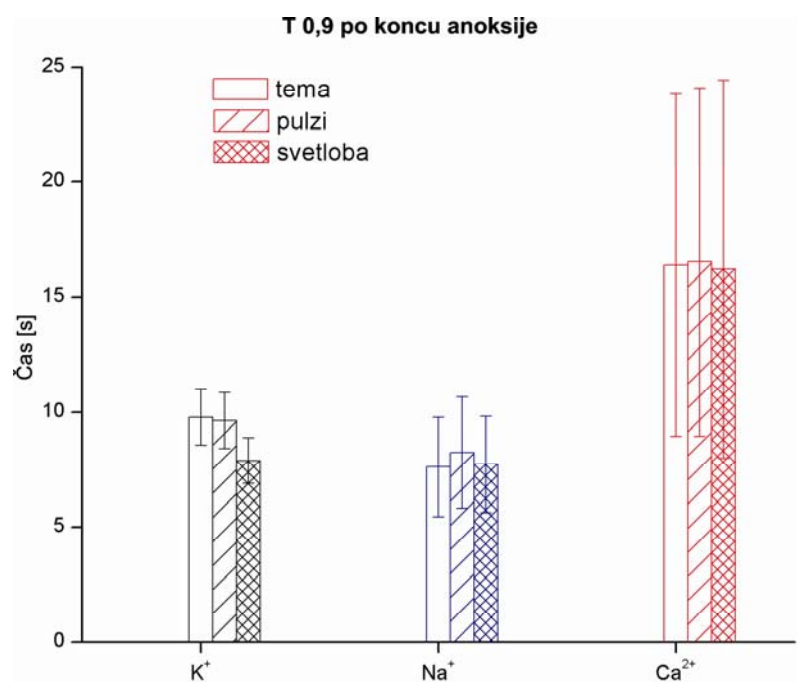
Slika 44. Histograma prikaza časov ob katerih je bila dosežena 0,9-kratna vrednost maksimalne spremembe koncentracije.

Histogram A prikazuje primerjavo časov med protokoli istega iona, histogram B pa primerjavo časov istih protokolov med posameznimi ioni.

Na Histogramu A opazimo da se v skoraj vseh primerih čas podaljšuje z manjšanjem svetlobne obremenitve in je tako v temi najdaljši. Pri K⁺ in Na⁺ se čas v temi statistično signifikantno razlikuje od časov pri pulzih in svetlobi pri Ca²⁺ pa le od časa pri protokolu svetlobnih pulzov. * - verjetnost razlike ≥95%, ** verjetnost razlike ≥99%

Na histogramu B so izmerjeni časi enaki tistim na histogramu A vendar gre za primerjavo enakih protokolov med ioni. Tako je čas T_{0,9} pri protokolu Ca-pulzi statistično različen od K in Na-pulzi. Signifikantno sta še različna protokola K in Na-svetloba.

* - verjetnost razlike ≥95%, ** verjetnost razlike ≥99%

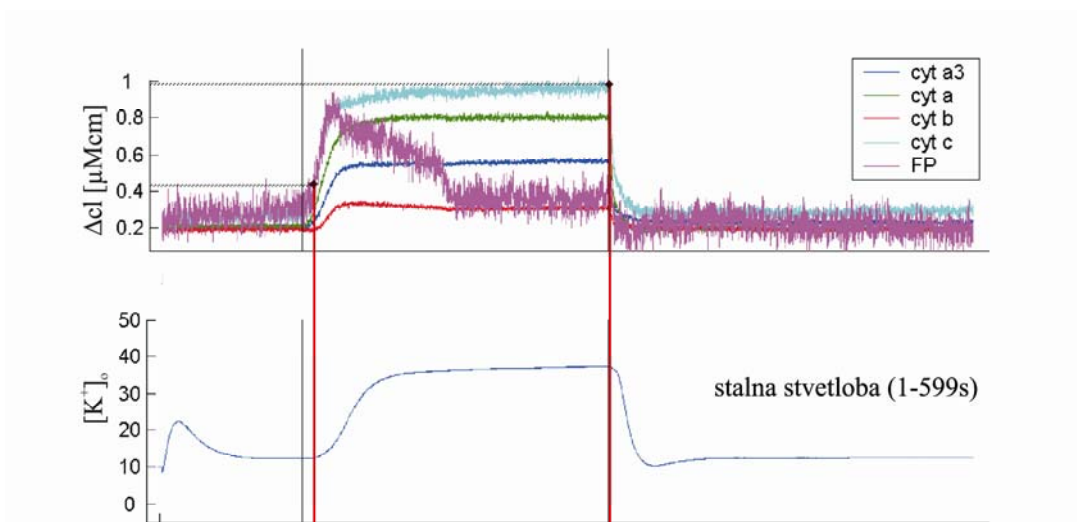


Slika 45. Histogram časov doseganja 0,9krat maksimalna sprememba po koncu anoksije

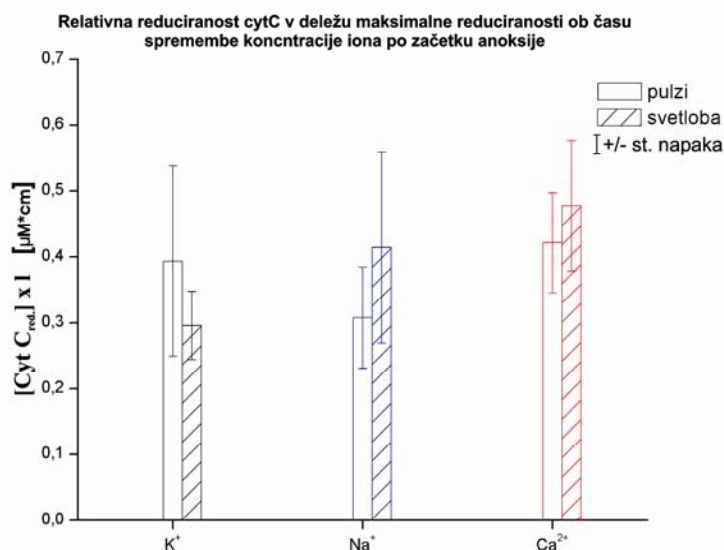
Kot smo omenili že prej so si časi po koncu anoksije veliko bližje kot časi po njenem začetku, tako v tem primeru ne prihaja do statistično dokazljivih sprememb. Opazimo lahko precej večjo povprečno vrednost časov v primeru Ca^{2+} iona.

4.2.5. Stanje dihalnega pigmenta cytC v časovni točki spremembe koncentracije iona ob prehodu v anoksično stanje in vrnitvi v normalne – atmosferske pogoje.

Opazovali smo dosežene vrednosti oziroma stanje reduciranosti cytC v trenutku, ko je anoksija povzročila začetek spreminjanja koncentracije posameznih ionov.

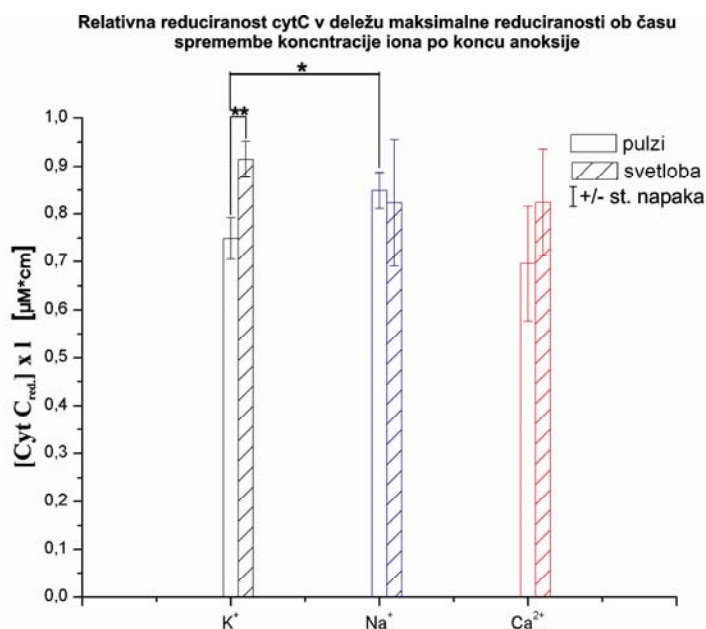


Slika 46. Slika stanja dihalnega pigmenta cytC v času spremembe koncentracije posameznega iona. Stanje je prikazano na primeru protokola K-svetloba, ob prehodu v anoksijo in ponovni vrnitvi v normalno atmosfersko stanje. Točki stanja cytC sta označeni z rdečo črto.



Slika 47. Histogram stanja (oziroma reduciranosti) dihalnega pigmenta cytC v trenutku, ko pride do spremembe koncentracij posameznih ionov pri različnih protokolih, ob prehodu v anoksično stanje.

Vrednosti se med seboj statistično ne razlikujejo, opazimo lahko le povečevanje reduciranosti citC ob spremembi konc. ionov v tem primeru je reduciranost ob spremembi najmanjša pri K^+ in največja pri Ca^{2+} .



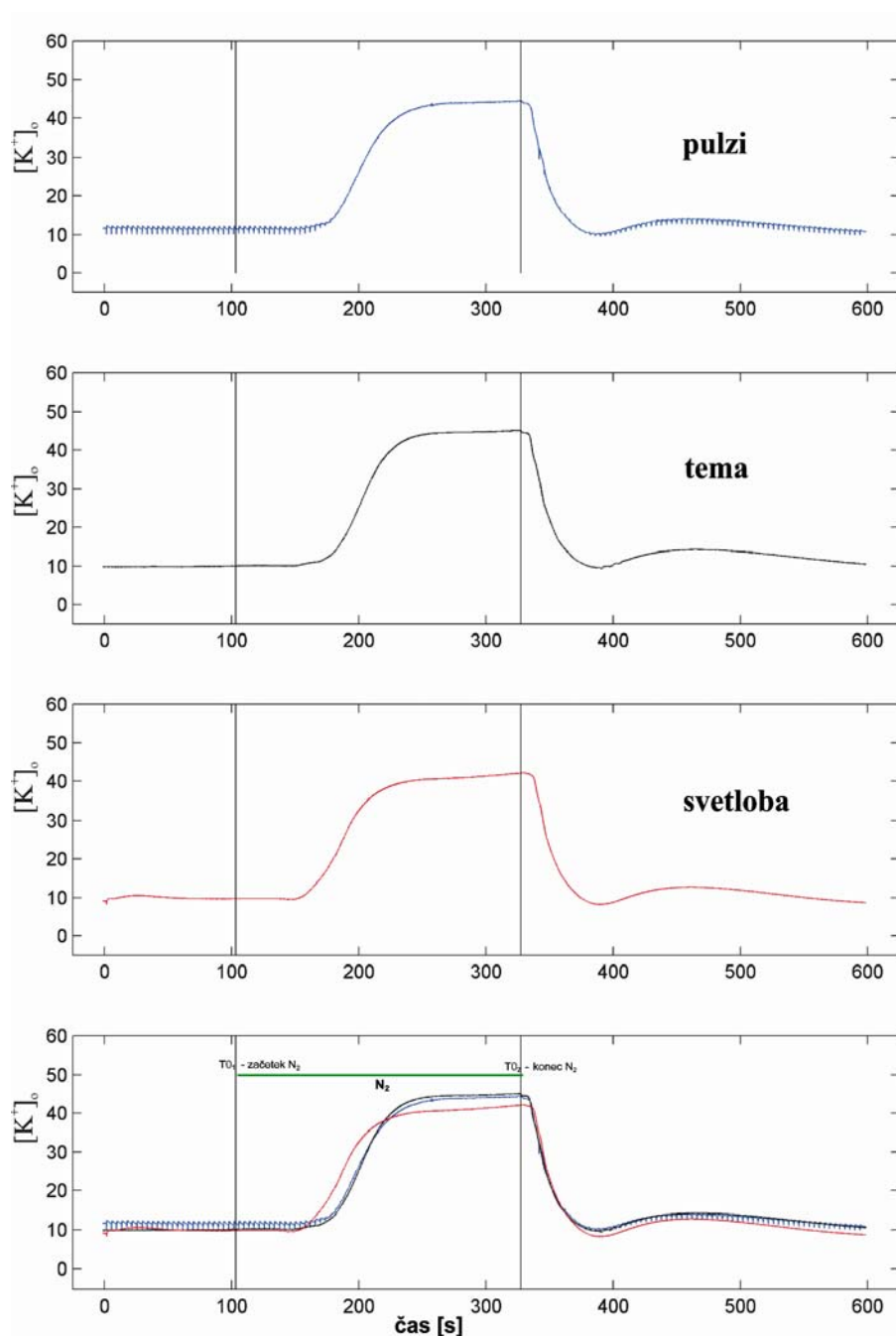
Slika 48. Histogram stanja (oziroma reduciranosti) dihalnega pigmenta citC v trenutku ko pride do spremembe koncentracij posameznih ionov pri različnih protokolih, ob ponovnem prehodu v normalno atmosfersko stanje.

Vrednosti se v večini med seboj statistično ne razlikujejo. Signifikantna razlika se pokaže le med K-pulzi in K-svetloba protokoloma ter K-pulzi in Na-pulzi. Povprečne vrednosti so si relativno blizu, stopnja reduciranosti pa je okoli 0,75 – 0,95, ob času sprememb koncentracij ionov. * - verjetnost razlike $\geq 95\%$, ** verjetnost razlike $\geq 99\%$

4.3. Spremljanje ionskih sprememb pri Metuljčnici *Ascalaphus macaronius*

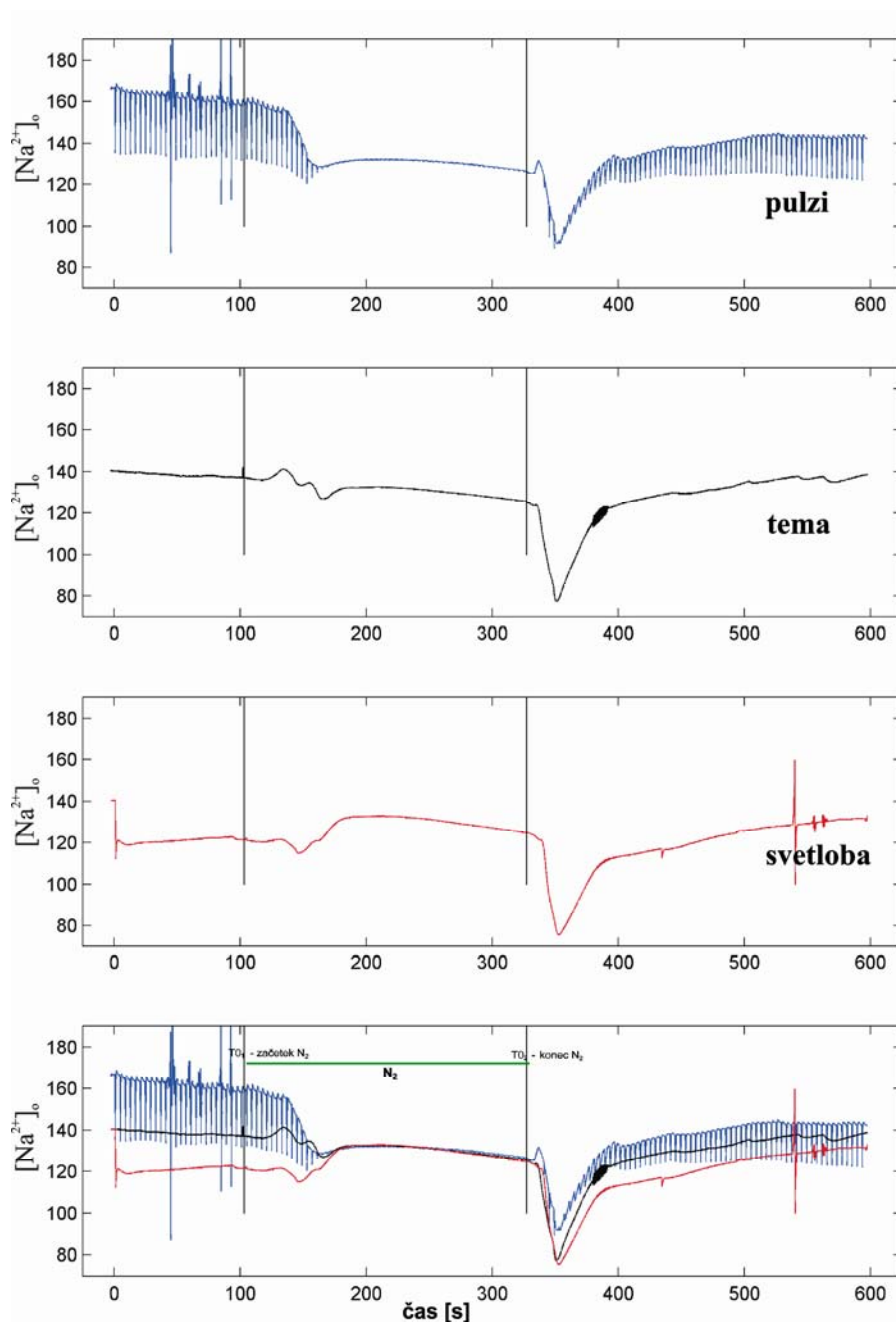
Podatkov oziroma meritev pri tej vrsti nismo obdelali na način, enak tistemu pri muhi, saj smo naleteli na kup težav, ki v veliki večini izvirajo iz morfoloških lastnosti omenjene vrste. Vseeno smo nekaj posnetkov uvrstili med rezultate saj omenjene meritve na tej vrsti niso bile še nikoli opravljene. O vzrokih časovnih potekov oziroma oblik le teh pa nekaj več v razpravi.

Omeniti je potrebno, da so se poskusi izvajali na približno 15 živalih, uspeli pa le na dveh. Opravili smo meritve sprememb koncentracij vseh treh ionov, žal časovni potek za Ca^{2+} le na eni od teh. Na spodnjih slikah so prikazani lepši posnetki od dveh, kjer je bilo to mogoče.



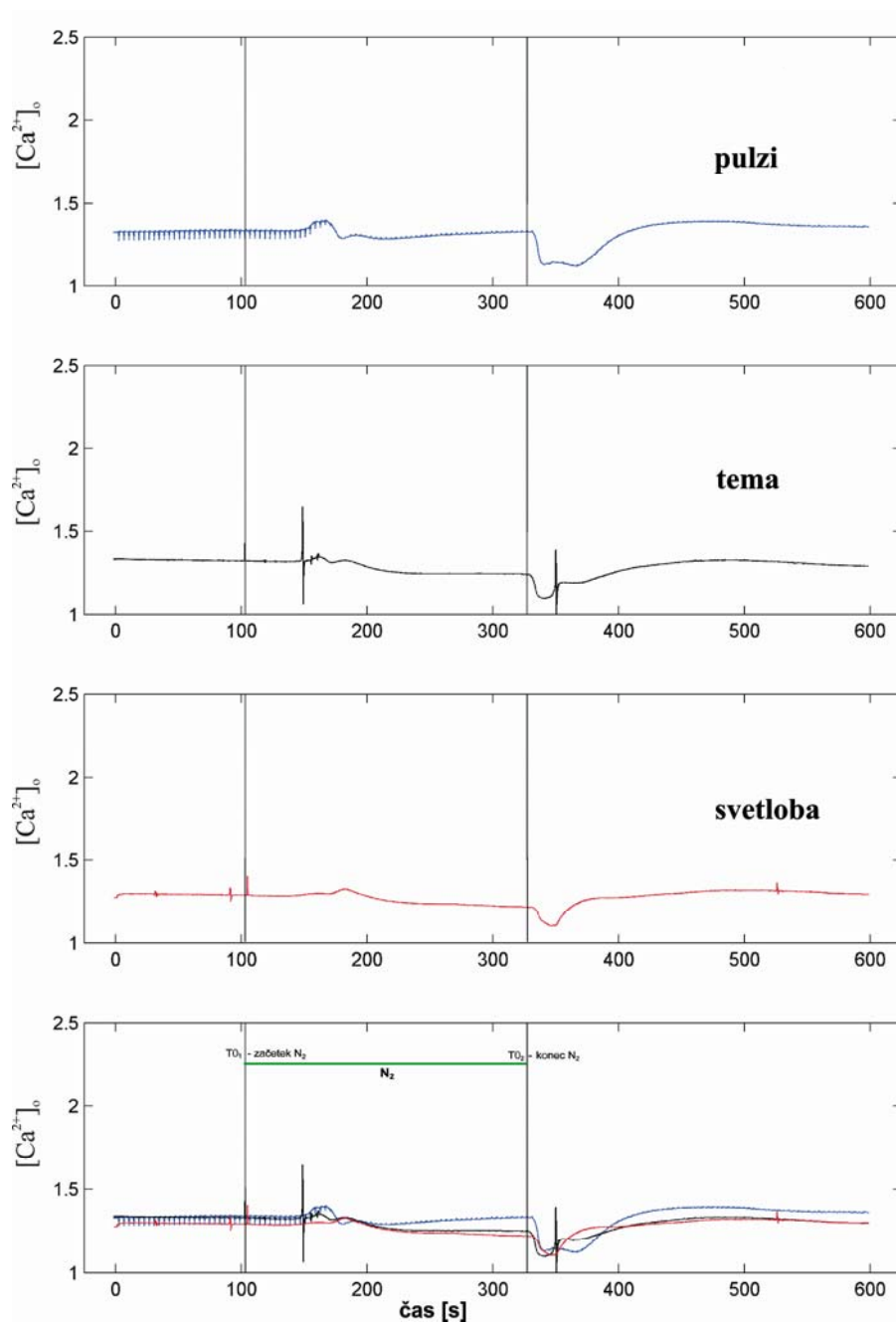
Slika 49. Časovni potek spremembe koncentracije K^+ ionov pri metuljčnici pri treh protokolih (pulzi, svetloba in tema).

Posneki so bili narejeni na isti živali, žal pa jih statistično nismo mogli obdelati, saj je poskus uspel le na dveh živalih prikazan pa je lepši posnetek. Na posnetku lahko opazimo, da so zakasnitve sprememb koncentracij ob prehodih v in iz anoksije nekoliko daljši kot pri muhi, kar smo opazili tudi pri pojavljanju in izginjanju odgovorov ERG.



Slika 50. Časovni potek spremembe koncentracije Na^+ ionov pri metuljčnici pri treh protokolih (pulzi, svetloba in tema).

Posnetki so bili narejeni na isti živali, žal pa jih statistično nismo mogli obdelati, saj je poskus uspel le na dveh živalih prikazan pa je lepši posnetek. Na posnetku lahko opazimo, da so zakasnitve sprememb koncentracij ob prehodih v in iz anoksije nekoliko daljši kot pri muhi. Opazimo lahko tudi razhajanje vrednosti mirovnega potenciala na začetku posnetka pri protokolu svetlobnih pulzov.

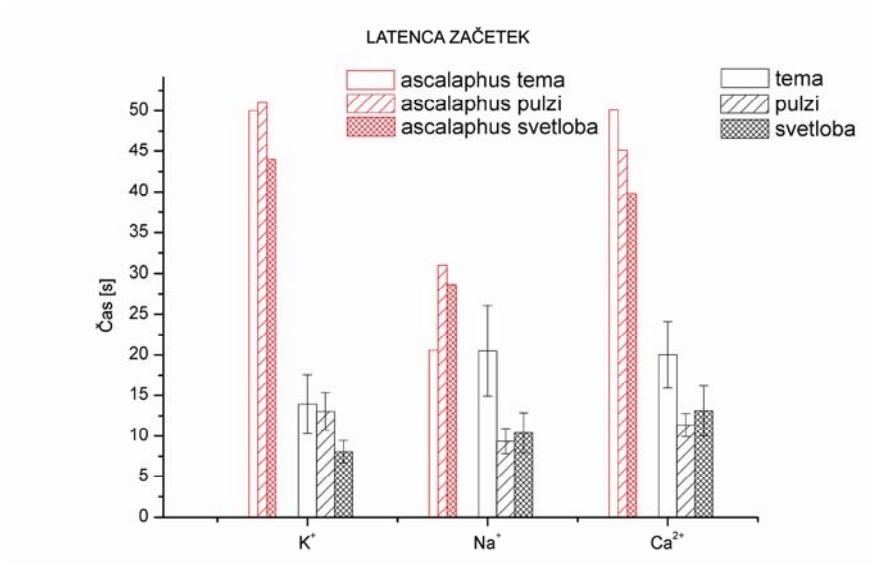


Slika 51. Časovni potek spremembe koncentracije Ca^{2+} ionov pri metuljčnici pri treh protokolih (pulzi, svetloba in tema).

Posnetki so bili narejeni na isti živali, žal pa jih statistično nismo mogli obdelati, saj je poskus uspel le na eni živali. Opazne so daljše zakasnitve spremembe koncentracije.

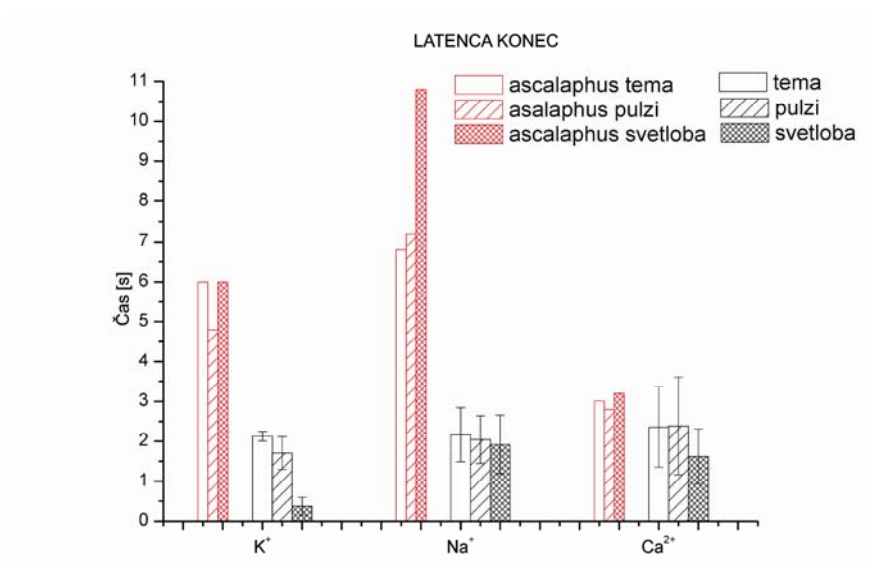
Po obliki so se posnetki K^{+} iona najbolj približali posnetkom K^{+} iona pri muhah. Čeprav je bil numerus poskusa le 1, smo v nadaljevanju ovrednotili začetno in končno latenco pri prehodu v in iz anoksičnega stanja (slika 52. in 53.). Ob tem smo izmerili še največjo

amplitudo spremembe koncentracije iona (slika 54.). Vrednosti smo nato za primerjavo dodali v odgovarjajoče histograme pri muhi.



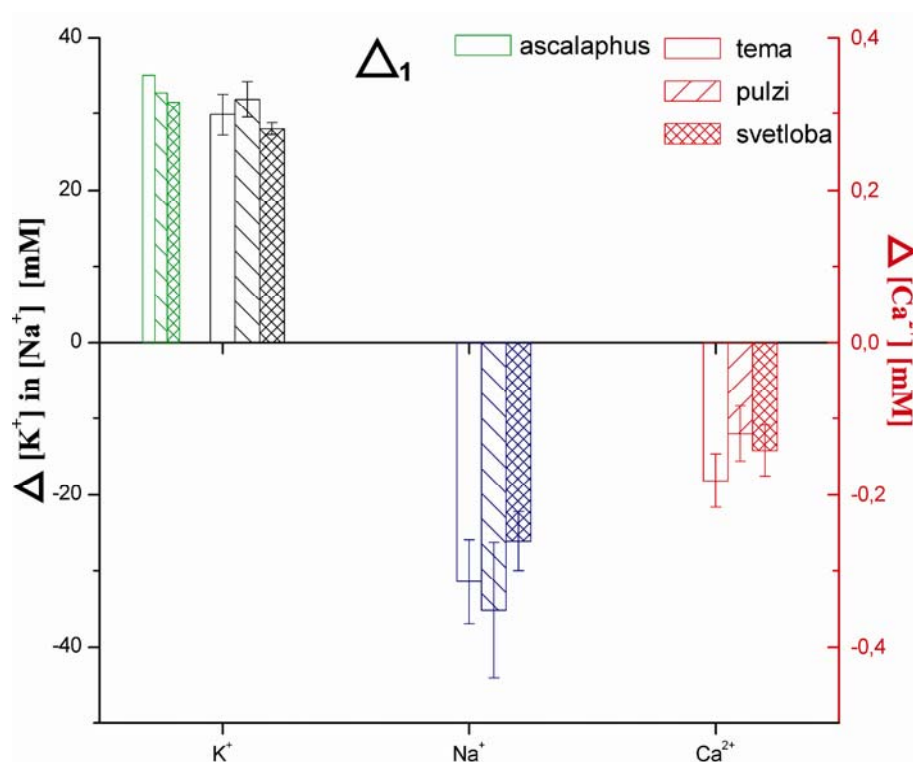
Slika 52. Latenca spremembe K⁺ Na⁺ in Ca²⁺ iona pri metuljčnici (rdeča barva), dodana v histogram latenc pri muhi ob prehodu v anoksično stanje.

Vrednosti latenc so več kot dvakrat daljše kot pri muhi z izjemo protokola teme pri Na⁺ ionu



Slika 53. Latenca spremembe K⁺ Na⁺ in Ca²⁺ iona pri metuljčnici (rdeča barva), ki smo jo dodali v histogram latenc pri muhi ob prehodu iz anoksičnega stanja.

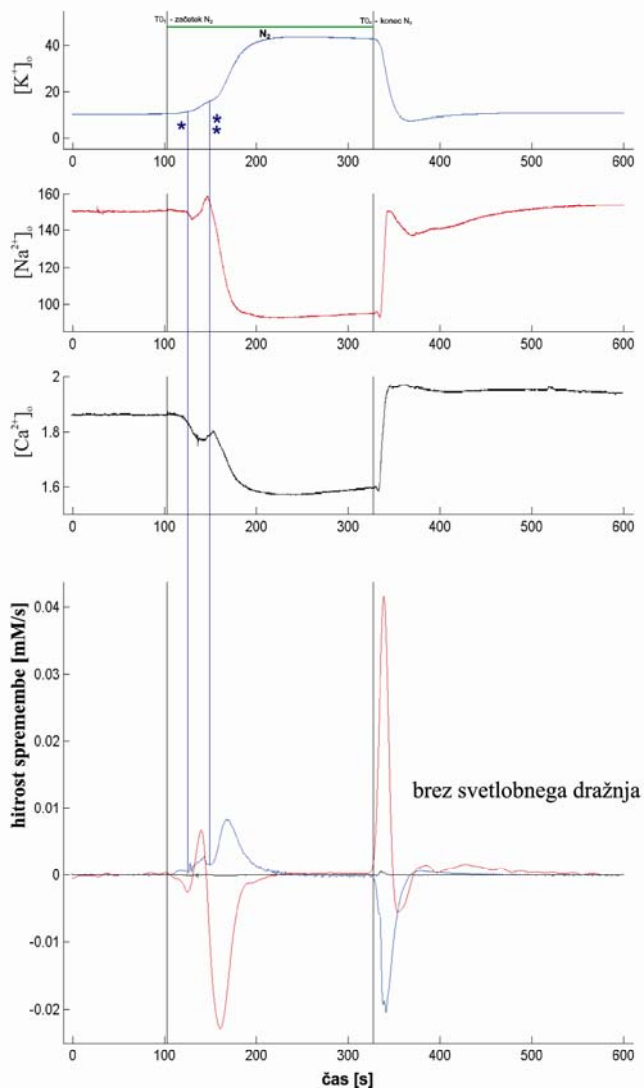
Latence so več kot dvakrat daljše kot pri muhi (pulzi 4,8 s, svetloba 6 s in tema 6 s)



Slika 54. Vrednost maksimalne amplitude spremembe K iona pri metuljčnici (zeleno označeno), ki smo jo dodali v odgovarjajoč histogram pri muhi.

Vrednosti amplitud se pri metuljčnici ne razlikujejo vidno od tistih pri *Calliphori*. Ostalih amplitud pri Na⁺ in Ca²⁺ nismo merili saj se za razliko od posnetkov K⁺, časovni poteki veliko bolj razlikujejo. Vendar o tem in možnih vzrokih nekaj več kasneje.

4.4. Dvojna kinetika spremembe koncentracije K⁺ ionov v temi ob prehodu v anoksijo pri muhi vrste *Calliphora vicina* (white eye mutant).



Slika 55. Časovni potek spremembe koncentracije K⁺ ionov v temi, kjer je lepo opazna dvojna kinetika spremembe koncentracije K⁺ ionov po prehodu v anoksijo. Sprememba je časovno omejena z modrima črtama ter *-začetek in **-konec počasnejših sprememb koncentracij.

Na sliki lahko opazimo prekrivanje območja z nepojasnjnim fenomenom "kašlja" pri Na⁺ in Ca²⁺. Na⁺ sliki spodaj so odvodi časovnih potekov sprememb koncentracij ionov, ki prikazujejo hitrost spremembe koncentracije. Pri Ca²⁺ te spremembe niso vidne, saj je velikostni razred sprememb pri Ca²⁺ 100-krat manjši.

5. RAZPRAVA

Fenomen odprtja TRP kanalov pri muhah in vinskih mušicah, kot posledice metabolnega stresa (Agam K. in sod. 2000), nas je vodilo v nadaljne razmišljanje. Kljub odkritju mehanizma aktivacije TRP kanalov, ki je povezan z oteženo ponovno sintezo PIP2 molekul ob pomankanju ATP (Hardie RC in sod. 2003), so se porajala nova vprašanja.

- Kolikšna stopnja metabolnega stresa je potrebna za odprtje TRP kanalov?
- Ali fotoreceptorske celice v fizioloških pogojih naletijo na metabolni stres take stopnje, ki je potreben za odprtje TRP kanalov in ali gre torej za fiziološki mehanizem ali le za patofiziološki pojav.
- Ali je ta mehanizem odpiranja TRP kanalov zaradi metabolnega stresa le posebnost muh oz. dvokrilcev (*Diptera*) ali pa ga srečamo tudi pri žuželkah s popolnoma drugačnim tipom rhabdoma (*Ascalaphus; Neuroptera*)

Rezultati so nas pripeljali do naslednjih ugotovitev:

(1) – Stopnja metabolnega stresa potrebna za odprtje kanalov je relativno visoka. Rezultati so pokazali da do odprtja kanalov pride pri približno 30 – 50% reduciranosti citokroma C.

(2) – Do tako visoke stopnje reduciranosti prihaja le v hudi dolgotrajni hipoksiji, do katere v normalnih fizioloških pogojih ne prihaja. Posledično lahko skoraj zagotovo trdimo, da do odprtja TRP kanalov zaradi metabolnega stresa v normalnih fizioloških pogojih ne prihaja.

(3) – V nalogi smo kot modelna organizma v raziskavah uporabili žuželki z različnima gradbenima tipoma oči; ob tem, da metuljčnica spada v podred Plannipenia, rod *Nothochrysa*, muha pa v rod *Diptera*. Rezultati raziskovanj pri obeh vrstah so nam potrdili hipotezo, da je mehanizem odpiranja TRP kanalov zaradi metabolnega stresa splošen princip, ki se verjetno pojavlja pri vseh skupinah žuželk.

5.1. Elektroretinografija

5.1.1. Spremljanje vplivov prehodov med anoksičnimi in atmosferskimi pogoji na odgovarjanje fotoreceptorskih celic z elektroretinografijo pri vrstah *Ascalaphus macaronius* in *Calliphora vicina* (white eye mutant)

Ugotovili smo, da po prehodu v anoksijo poteče približno 64 ± 4 sekund, preden odgovor izgine, pri muhi in 88 ± 4 s, da izgine pri metuljčnici, kar nakazuje na obstoječo zalogo kisika. Vzrok za zakasnitev izginotja odgovorov fotoreceptorjev so lahko zračne vreče, traheje in hemolimfa, ki lahko delujejo kot rezervoar kisika. Ob rezultatih počasnejšega ugašanja in pojavljanja odgovorov pri Metuljčnici lahko sklepamo da določena zaloga kisika obstaja v zračnih vrečah in trahejah podaljšani časi pa so odraz razmerja med hitrostjo porabe O_2 in velikostjo njegovih zalog.

Tako traheje z zračnimi vrečami kot hemolimfa lahko s kisikom v njih še nekaj časa zagotavljajo končni akceptor elektronov, potreben za oksidativno fosforilacijo. Plini v trahejah potujejo z difuzijo, katere hitrost je odvisna od koncentracijskih gradientov. V primeru anoksije pride do dviga koncentracije N_2 in padca koncentracije O_2 izven trahej in vreč. V tem primeru začne iz trahej in vreč izhajati O_2 in vanje vdirati N_2 , dokler vreče in traheje niso napolnjene z N_2 . Temu procesu sledi tudi hemolimfa, ki se po telesu sicer prečrpava, vendar pa je vsebnost O_2 v njej odvisna od tlaka O_2 v trahejah. Tako je posledica N_2 atmosfere izraba O_2 kot prejemnika elektronov, saj dotoka sveže oksidirane oblike O_2 ni, oksidativna fosforilacija in s tem produkcija metabolne energije ATP se prekine, fotoreceptorski odgovor pa ugasne.

Membrana se repolarizira zaradi iztoka K^+ ionov, delovanja Na^+/K^+ ATP-aze, ki je porabnik metabolne energije in Na^+/Ca^{2+} izmenjevalnika (Peretz in sod. 1998). Tako v primeru anoksije Na^+/K^+ ATP-aza ne deluje, zaradi česar naraste znotrajcelična koncentracija Na^+ in Ca^{2+} ionov, pade pa znotrajcelična koncentracija K^+ ionov. V tem primeru je membrana depolarizirana, celice pa nezmožne odgovora na dražljaj.

5.1.2. Vpliv deleža kisika na velikost odgovora ERG pri vrstah *Ascalaphus macaronius* in *Calliphora vicina* (white eye mutant)

Odvisnost amplitude ERG od pO_2 je pričakovana, saj je količina razpoložljive metabolične energije, ki je potrebna za vzpostavitev mirovnega membranskega potenciala, odvisna od preostalih zalog O_2 , oziroma od parcialnega tlaka O_2 . Posledično se membrana zaradi

pomanjkanja energije ne repolarizira popolnoma in odgovori so vse manjši dokler pri določenem deležu kisika povsem ne izginejo.

Že prejšnje meritve (Perovšek 2001) so pokazale, da je ERG pri muhi skoraj neprizadet do pO_2 5%. Potem se njegova amplituda hitro zmanjšuje, ko končno izgine pri pO_2 0.19%. Čeprav imajo fotoreceptorske celice muhe veliko porabo kisika, potrebujejo za vzdrževanje normalnega mirovnega membranskega potenciala le 5% O_2 . Pri vrednostih pO_2 med 5.0% in 0.19% je videti, da je amplituda odgovora v sorazmerju s koncentracijo kisika. Lahko bi torej rekli, da je kisika dovolj do pO_2 5%, kjer je ponudba kisika uravnotežena s povpraševanjem po njem, pod to vrednostjo pa se začne energetska kriza.

Do podobnih zaključkov smo prišli tudi pri metuljčnici, ki je pokazala večjo občutljivost na delež kisika saj odgovor izgine že pri 2,6%, medtem ko nespremenjen ostaja do 7% deleža kisika. Razlike lahko morda pripišemo drugačnemu razvoju ličinke metuljčnice, ki ni omejen na anoksične-hipoksične pogoje kot pri muhi. Opazen je ožji interval, v katerem odgovor povsem izgine. Morda lahko na tem mestu zaključimo, da je odpornost sistema na ekstremno nizke koncentracije deleža kisika bolj izjema kot pravilo, vsekakor pa bi bilo potrebno poskuse opraviti še na kateri od vrst žuželk, da bi to lahko zagotovo trdili.

5.2. Spremljanje koncentracij ionov s sočasnim spremljanjem oksidoredukcijskega stanja dihalnih pigmentov pri muhi vrste *Calliphora vicina* (white eye mutant)

Spremljanje stanja encimov dihalne verige ob istočasnem merjenju ERG ter koncentracij posameznih ionov ob prehodu v anoksijo in iz nje se je pokazalo kot ključna meritev, ki nam je odgovorila na pomembno vprašanje vloge metabolnega stresa kot aktivatorja TRP kanalov. Ob nekaterih razjasnitvah mehanizmov aktivacije TRP kanalov zaradi pomanjkanja metabolne energije, in s tem povezane otežkočene ponovne sinteze PIP_2 molekul (Hardie RC in sod. 2003), vloga fenomena v fizioloških pogojih še ni pojasnjena.

Sočasne meritve stanj dihalnih pigmentov ter koncentracij ionov v zunajceličnem prostoru so pokazale, da do odprtja kanalov pride šele pod pogojem hude dolgotrajne hipoksije, saj mora biti citokrom C kot izbrani pigment oz. parameter v dihalni verigi reduciran v 30-50% maksimalne reduciranosti, medtem ko v normalnih fizioloških pogojih – torej ob svetlobnem draženju prihaja le do približno 10% reduciranosti citokroma C (Zupančič in Perovšek 2007.). Meritve so nam ponudile odgovor, da v normalnih fizioloških pogojih metabolni stres oziroma pomanjkanje metabolne energije ATP ne igra vloge pri odprtju kanalov.

Hkratne meritve so dodatno potrdile vzroke počasnega izginjanja ERG. Opaziti je da odgovori vztrajajo dokler citokromska veriga ni skoraj popolnoma reducirana. To dejstvo govori v prid rezervoarju kisika kot je bilo omenjeno že prej. Ta rezervoar po našem prepričanju predstavlja trahealni sistem in zračne vreče.

Nesimetričnost zakasnitve spremembe koncentracij posameznih ionov ob prehodu v anoksijo in iz nje je bila pričakovana glede na nesimetričnost izginjanja in pojavljanja ERG.

Med seboj se zakasnitve sprememb koncentracij ionov na začetku ob prehodu v anoksijo statistično ne razlikujejo, kar velja tudi za konec anoksije. Opaziti je, da se spremembe v koncentracijah ionov pričnejo preden se dihalna veriga popolnoma reducira, čeprav ERG odgovor izgine kasneje ob popolni redukciji dihalne verige. Pojav lahko poskusimo razložiti z dveh stališč.

- Prva možnost je, da so ostale nereceptorske spremljevalne celice bolj občutljive na količino kisika, a vendar je to malo verjetno saj imajo vzdražne celice (v našem primeru fotoreceptorji) zelo visoko aktivnost torej je njihova potreba po energiji velika.

-Druga možnost se ponuja prav v visoki metabolni aktivnosti fotoreceptorjev. Ionsko neravnovesje oziroma polarizacija membrane zahteva veliko količino ATP-ja predvsem za njeno repolarizacijo kot tudi za vzdrževanje polarizacije v mirovnem stanju. Tako se že ob manjšem pomanjkanju metabolne energije oziroma reduciranosti dihalne verige ionsko neravnovesje poruši.

Ob prehodu v anoksijo lahko opazimo da so časi začetkov sprememb koncentracij posameznih ionov v temi nekoliko podaljšani. To lahko komentiramo kot izostanek obremenitve sistema s svetlobo. Ob osvetljevanju je poraba kisika večja kot v temi torej sistem lahko nekaj dlje časa energijo porablja za vzdrževanje ionskega ravnovesja. Ob prehodu iz anoksije v normalno atmosfersko okolje se sistem odzove veliko hitreje kot v obratni smeri. Zakasnitev spremembe koncentracije ionov je veliko krajša ob prehodu v normalno atmosfero. Morda je vzrok temu aktivno polnjenje zračnih mehov in trahealnega sistema predvsem pa smo že prej omenili da ostajajo pri muhi odgovori nespremenjeni do koncentracije 4-5% O₂, kar seveda rezultira v nesimetričnosti zakasnitev ob prehodu v anoksijo in iz nje.

Nesimetričnost se pokaže tudi pri času doseganja 90% (T-0.9) vrednosti maksimalne spremembe. Časi doseganja 0,9kratne vrednosti maksimuma se med protokoloma pulzov in kontinuirane osvetlitve niso razlikovali. Očitno pa se je podaljšal čas doseganja te vrednosti v temi, kar je dodaten dokaz svetlobne obremenitve sistema in da se sistem ob

osvetljevanju hitreje depolarizira kot v temi, oziroma je zaradi osvetljevanja že delno depolariziran. Po prehodu iz anoksije so si časi med posameznimi protokoli in posameznimi ioni veliko bližje, kar je glede na hitrejši odziv sistema ob prehodu v normalne pogoje pričakovano. Malenkost izstopajo le daljši časi pri Ca^{2+} ionu (sicer statistično nesignifikantne), pri čemer so srednje vrednosti za K^+ in Na^+ 8-10 s pri Ca^{2+} pa 16-17 s, kar morda nakazuje, da se Na/Ca^{2+} izmenjevalec priključi nekoliko kasneje ko ATP-aza že deloma povrne koncentracijske gradiente in je koncentracijski gradient Na dovolj velik za delovanje izmenjevalca.

Vrednotenje koncentracijskih sprememb pri prehajanju v in iz anoksičnega stanja

Spremljanje koncentracij posameznih ionov nam je dalo boljši vpogled v časovne razporeditve koncentracijskih sprememb posameznih ionov, rezultati pa so bili razen nekaterih pojavov, "fenomenov" kot npr. "kašel", pričakovani. Tako lahko trdimo da se ob prehodu v anoksijo kanali odprejo, posledično v zunajceličnem prostoru naraste koncentracija K^+ , pade pa koncentracija Na^+ in Ca^{2+} . Mehanizem delovanja anoksije na TRP in TRPL kanale je delno pojasnjen (Hardie RC in sod. 2003), vsekakor pa je vloga mitohondrijev in njihove dihalne verige v omenjenem procesu potrjena.

Δ_1 – maksimalna sprememba koncentracije posameznih ionov je velikost spremembe od mirovnega potenciala do platoja depolarizacije. Pri posameznih ionih se sprememba med protokoli teme svetlobe in pulzov po pričakovanjih ni razlikovala, saj sta mirovno stanje in pa popolna depolarizacija ob odprtih kanalih skrajni stanji sistema. Le pri Ca^{2+} smo opazili statistično signifikantne razlike med posameznimi protokoli, vendar pa so bile spremembe pri Ca^{2+} ionu veliko manjše, prav tako pa so bile meritve koncentracij tega iona najbolj težavne. Zato bi lahko te razlike opravičili s slabšo občutljivostjo elektrode.

Δ_2 - predstavlja velikost spremembe koncentracije med "platojem" ter največjo spremembo ob popolni depolarizaciji. Takoimenovani plato se pojavlja v protokolih svetlobe in svetlobnih pulzov, ko se potencial ostali na določeni vrednosti ob draženju s svetlobo pred prehodom v anoksijo. Za plato bi lahko rekli da odraža obremenitev sistema s svetlobo, vsekakor pa se izkaže da svetloba sistema ne depolarizira popolnoma oziroma toliko kot anoksija, ko kanali ostajajo odprti ves čas anoksije in pride do izenačitve koncentracij ionov v zunaj in znotrajceličnem prostoru. Po pričakovanju se izkaže da je tako sprememba v temi večja – torej enaka Δ_1 , medtem ko je sprememba ob stalni svetlobi oziroma svetlobnih pulzih manjša za vrednost platoja. Vrednost platoja je bila v nadaljnjem označena kot Δ_3 pred prehodom v anoksijo in Δ_4 po prehodu iz anoksije

Δ_5 - predstavlja koncentracijsko razliko med "platojem" ter "overshoot"-om koncentracije iona pred anoksijo. Tega pojava pri pulzih in seveda temi ni, je pa opazen pri kontinuiranem draženju s svetlobo. Morda lahko to nesorazmerno povečanje spremembe koncentracije razložimo z habituacijo torej prilagajanjem sistema na močno draženje, saj v primeru dražljajja močnejšega od predhodnega sistemu ne ostaja dovolj koncentracijskih razlik za nadaljni odgovor.

Δ_6 - predstavlja koncentracijsko razliko med "platojem" ter "overshoot"-om koncentracije iona po anoksiji. Predznak te spremembe je obraten spremembi Δ_5 . Praviloma overshoot po anoksiji seže ravno do mirovnega potenciala sistema nato pa se časovni potek počasi vrne na plato obremenitve s svetlobo. Opisane pojava ne znam razložiti, morda sitem potrebuje popolno regeneracijo koncentracijskih razlik ionov preden lahko ponovno "zleze" na nivo platoja obremenitve s svetlobo.

5.3. Spremljanje ionskih sprememb pri Metuljčnici *Ascalaphus macaronius*

Pri spremljanju koncentracijskih sprememb posameznih ionov ob prehajanju v anoksijo in iz nje smo naleteli na veliko različnih težav. Od pojava obratov potencialov torej npr. zunajceličnega porasta Na in Ca^{2+} do neizmerljivih sprememb. Ob dolgotrajnem iskanju rešitve merjenja sprememb pri omenjeni vrsti smo na dveh živalih uspeli dobiti nekaj časovnih potekov za posamezne ione, kateri približno pokažejo ionska razmerja ter spremembe koncentracij ionov ob prehajanju v N_2 in iz njega.

Kljub naštetim težavam smo uspeli potrditi hipotezo splošnega principa aktivacije TRP kanalov v metabolnem stresu pri žuželkah, saj je depolarizacija membrane lepo vidna v vseh treh protokolih za Na in K elektrodo, medtem ko je pri Ca elektrodi k slabim meritvam, poleg enakih težav kot pri muhi, doprinesla še struktura očesa metuljčnice.

Po pričakovanju so časi zakasnitev sprememb koncentracij ionov ob spreminjanju pogojev daljši (sliki 52. in 53.) in se ujemajo z meritvami izginjanja in pojavljanja odgovora ERG. Prav tako se koncentracije posameznih ionov (predvsem K^+ iona) spreminjajo po pričakovanju, tako da o velikih razlikah med omenjenima vrstama ob dosedanjih rezultatih ne moremo govoriti. Po pričakovanju se spremembe koncentracij pri K^+ skoraj ne razlikujejo, medtem ko pri ostalih dveh ionih lahko opazimo precejšnje razlike med oblikami posnetkov. Delo je tako pri muhi kot pri metuljčnici lažje potekalo pri K^+ elektrodi. Žal smo poskuse uspeli izpeljati le na dveh živalih.

Vzrokov za omenjene težave je več:

Kot prvega bi navedel dejstvo, da gensko spremenjene belooke muhe nimajo zaščitnega pigmenta zato očesca med seboj, za razliko od metuljčnice, optično niso ločena. To pomeni da lahko svetloba prosto prehaja med njimi in je na ta način oko v celoti osvetljeno.

Kot drug razlog so receptorske celice pri metuljčnici globlje v notranjosti očesa in je s konico elektrode do njih težje prodreti, saj se na poti do njih nahajajo traheje, ki za občutljivo elektrodo pomenijo pretrdo oviro in se ta nemalokrat poškoduje.

In kot tretji razlog lahko navedemo volumen zunajceličnega prostora ki je pri muhi veliko večji kot pri Metuljčnici.

Posledica je zelo lokalizirana depolarizacija v očesu Metuljčnice tako ob osvetljevanju kot v anoksiji, konica elektrode pa se mora nahajati v majhnem zunajceličnem prostoru in neposredni bližini receptorskih celic. Da stvar ne bi bila prelahka, je ob osvetljevanju osvetljenih le nekaj omatidijev, ki so med seboj optično ločeni, kar pomeni, da je potrebno za merjenje vpliva osvetljevanja z elektrodo prodreti v optično os točno določenih omatidijev, česar nam obstoječa oprema ni omogočala. Dodatna težava ob tako lokalizirani depolarizaciji predstavlja gneča elektrod, saj se morata konici elektrod za ERG ter meritve koncentracije posameznega iona takorekoč dotikati, da signala lahko upravičeno odštejemo.

Rešitev problemov morda predstavljajo "theta" ali večcevne elektrode, vendar pa se pri njih pojavijo druge težave, predvsem v pripravi le teh za merjenje ERG ter različnih ionskih koncentracij.

5.4. Dvojna kinetika spremembe koncentracije K-ionov v temi ob prehodu v anoksijo pri muhi vrste *Calliphora vicina* (white eye mutant).

Pri temotnem protokolu konc.sprememb K^+ iona ob prehajanju v anoksijo smo v začetni fazi spreminjanja koncentracije opazili dvojno kinetiko hitrosti sprememb. Prvi počasnejši del ki mu je sledila hitrejša faza popolne depolarizacije oziroma porušitve koncentracijskih gradientov. Počasnejša faza pri K^+ ionu je časovno sovpadala z nepojasnjenimi spremembami koncentracij pri Na^+ in Ca^{2+} – takoimenovanemu "kašlju"

Prepričljive razlage opisanega pojava nimamo, vendar pa smo opazili da začetek hitrejše faze časovno sovpada s skoraj popolno reducirano dihalno verigo, ko prav tako izginejo odgovori ERG.

Iz opisanega lahko sklepamo, da v tem primeru morda ne gre za spremembe koncentracij ionov pri receptorskih celicah, temveč za ionske spremembe pri spremljevalnih strukturah. Morda gre za primarne in sekundarne pigmentne celice, ki

metabolno niso tako visoko aktivne in zaradi tega manj odporne na spremembe koncentracije O_2 .

Po drugi strani pa lahko prva faza kaže na "upiranje" sistema, ki se odraža v njegovem delovanju do nizkih koncentracij O_2 . Tako sistem še vedno deluje skoraj nespremenjeno do popolne reduciranosti dihalne verige.

6. POVZETEK

Fotoreceptorske celice so visoko aktivne in potrebujejo veliko metabolne energije. Ob pomanjkanju le te, kot naprimer v metabolnem stresu - hipoksiji, pride do odprtja TRP kanalov na fotoreceptorjih, kar povzroči depolarizacijo membrane pri dipterih (muhah in vinskih mušicah). Mehanizem aktivacije TRP kanalov je povezan z oteženo (ponovno) sintezo molekul PIP₂ zaradi pomankanja ATP.

Da bi ugotovili kakšna je vloga odprtja TRP kanalov v metabolnem stresu pri normalnih fizioloških pogojih in ali je to splošen princip pri vseh žuželkah, smo združili nekaj elektrokemijskih in svetlobnih metod merjenja, ki smo jih opravili na vrstah *Ascalaphus Macaronius* – Metuljčnica in muhi *Calliphora vicina* (belooka mutanta). Z združitvijo metod torej hkratnim merjenjem stanja dihalne verige z metodo absorpcijske spektroskopije, elektroretinograma (ERG) in merjenja koncentracij posameznih ionov K⁺, Na⁺ in Ca²⁺ z ionsko selektivnimi elektrodami, ob aplikaciji N₂ atmosfere – hipoksija, smo iskali odgovore na nekaj postavljenih vprašanj.

- Kolikšna stopnja metabolnega stresa je potrebna za odprtje TRP kanalov?
- Ali fotoreceptorske celice v fizioloških pogojih naletijo na metabolni stres take stopnje, ki je potreben za odprtje TRP kanalov in ali gre torej za fiziološki mehanizem ali le za patofiziološki pojav.
- Ali je ta mehanizem odpiranja TRP kanalov zaradi metabolnega stresa le posebnost muh oz. dvokrilcev (*Diptera*) ali pa ga srečamo tudi pri žuželkah s popolnoma drugačnim tipom rhabdoma (*Ascalaphus*; *Neuroptera*)

Rezultati so nas pripeljali do naslednjih zaključkov:

Do odprtja TRP kanalov pride pri 30-50% reduciranosti dihalne verige, do česar pripelje le huda dolgotrajna hipoksija.

Do takšnega stanja v normalnih fizioloških pogojih ne prihaja, zato metabolni stres ne pripomore k odprtju TRP kanalov v normalnih fizioloških pogojih.

Kljub nekaterim razlikam v časovnih dogodkih med vrstama, lahko o fenomenu odprtja TRP kanalov kot posledici metabolnega stresa, skoraj zagotovo trdimo, da gre za splošen princip aktivacije TRP kanalov zaradi metabolnega stresa pri žuželkah.

7. VIRI

Agam K, v. Campenhausen M, Levy S, Ben-Ami HC, Cook B, Kirschfeld K, Minke B. 2000. Metabolic stress reversibly activates the *Drosophila* light-sensitive channels TRP in TRPL in vivo. *Journal of Neuroscience*. 20(15): 5748-5755

Chyb S, Hevers W, Forte M, Wolfgang WJ, Selinger Z, Hardie RC. 1999. Modulation of the light response by cAMP in *Drosophila* photoreceptors. *Journal of Neuroscience*. 19(20): 8799-8807

Chyb S, Raghu P, Hardie RC. 1999. Polyunsaturated fatty acids activate the *Drosophila* light-sensitive channels TRP and TRPL. *Nature*. 397: 255-259

Chyuan Ng, Wilson SM & Hume JR (2005). Mobilization of sarcoplasmic reticulum stores by hypoxia leads to consequent activation of capacitative Ca^{2+} entry in isolated canine pulmonary arterial smooth muscle cells. *J Physiol* **563**, 409–419.

Čehovin A. 2004. Dinamični odgovor elementov dihalne verige ob skočnih spremembah P_{O_2} pri muhah *Calliphora erythrocephala* in *Drosophila melanogaster*. Diplomsko delo, Ljubljana

Dimitracos SA, Tsacopoulos M. . 1985. The recovery from a transient inhibition of the oxidative metabolism of the photoreceptors of the drone (*Apis mellifera*). *J Exp Biol*. 119: 165-181

Gerster U, Stavenga DG, Backhaus W. 1997. Na^+/K^+ pump activity in photoreceptors of the blowfly *Calliphora*: a model analysis based on membrane potential measurements. *J Comp Physiol A*. 180: 113-122

Haddad Gabriel G., Yi-an Sun, Robert J. Wyman, and Tian Xu, 1997. Genetic basis of tolerance to O_2 deprivation in *Drosophila melanogaster*; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Vol. 94

Hamdorf K, Hochstrate P, Höglund G, Burbach B, Weigand U. 1988. Light activation of the sodium pump in blowfly photoreceptors. *J Comp Physiol A*. 162: 285-300

Hamdorf K., Paulsen R., Sshwemer J. (1972). Photoregeneration and sensitivity control of photoreceptors of invertebrates. V: *Biochemistry and Physiology of Visual Pigments*. Langer H. (ur.), Symposium Held at Institut für Tierphysiologie, Ruhr-Universität Bochum, 27.-30.8.1972. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg New York.

Harold FM. 1986. The vital force: a study in bioenergetics. Freeman, New York.

Hardie, R. C., Gu, Y., Martin, F., Sweeney, S. T., and Raghu, P. (2004) In Vivo Light-induced and Basal Phospholipase C Activity in *Drosophila* Photoreceptors Measured with Genetically Targeted Phosphatidylinositol 4,5-Bisphosphate-sensitive Ion Channels (*Kir2.1*) *J. Biol. Chem.* 279, 47773–47782

Hardie Roger C., Fernando Martin, Sylwester Chyb, and Padinjat Raghu 2003. Rescue of light responses in the *Drosophila* “null¹ phospholipase C mutant, norpAP24 by diacylglycerol kinase mutant, rdgA and by metabolic inhibition; *J. Biol. Chem.*, 10.1074

Hardie R. C., F. Martin, G. W. Cochrane, M. Juusola, P. Georgiev and P. Raghu 2002. Molecular Basis of Amplification in *Drosophila* Phototransduction: Roles for G Protein, Phospholipase C, and Diacylglycerol Kinase
Neuron, Volume 36, Issue 4, 14 November 2002, Pages 689-701

Hardie, Roger C. Padinjat Raghu, Suzanna Moore, Mikko Juusola, Richard A. Baines and Sean T. Sweeney 2001. Calcium Influx via TRP Channels Is Required to Maintain PIP₂ Levels in *Drosophila* Photoreceptors
Neuron, Volume 30, Issue 1, April 2001, Pages 149-159

Hardie RC . 1986. The photoreceptor array of dipteran retina. *Trends in Neuroscience.* 9: 419-423

Hardie R.C. 1985. Functional organization of the fly retina. In: Autrum, H., Ottoson, D., Perl, E.R., Schmidt, R.F., Shimazu, H. and Willis, W.D., Editors, 1985. *Progress in Sensory Physiology*, Springer, Berlin 1–79.pp .

Jansonius NM. 1990. Properties of the sodium pump in the blowfly photoreceptor cell. *J Comp Physiol A.* 167: 461-467

Järemo Jonson AC, Nilsson DE. 1994. Effects of energy deprivation on the fly pupil mechanisms: evidence for a rigor state. *J Comp Physiol A.* 174: 701-706

Kirschfeld K. 1973. Das neurale Superpositionsauge. V: Fortschritte der Zoologie Band 21, Heft 2/3. Gustav Fischer Verlag Stuttgart. 229-257

Lah L. 2002. Študij dinamike redoks stanj dihalnih pigmentov mušjega očesa in situ z dinamično diferenčno refleksno spektroskopijo. Diplomsko delo, Ljubljana

Pangršič, T., Stušek, P., Belušič, G., Zupančič, G. (2005) Light dependence of oxygen consumption by blowfly eyes recorded with a magnetic diver balance. *J. comp. physiol., A*, 191, 75-84.

Peretz A, Abitbol I, Sobko A, Wu CF Attali B. 1998. A Ca²⁺/Calmodulin-dependent protein kinase modulates *Drosophila* photoreceptor K⁺ currents: a role in shaping the photoreceptor potential. *Journal of Neuroscience.* 18(22): 9153-9162

Perovšek D. 2001. Vpliv parcialnega tlaka kisika na elektrortinogram pri muhi *Calliphora erythrocephala* chalky. Diplomsko delo, Ljubljana

Raghu Padinjat, Kate Usher, Sarah Jonas, Sylwester Chyb, Andrej Polyanovsky and Roger C. Hardie 2000. Constitutive Activity of the Light-Sensitive Channels TRP and TRPL in the Drosophila Diacylglycerol Kinase Mutant, *rdgA*
Neuron, Volume 26, Issue 1, April 2000, Pages 169-179

Reuss Helmut, Mart H. Mojet, Sylwester Chyb and Roger C. Hardie; 1997.
In Vivo Analysis of the Drosophila Light-Sensitive Channels, TRP and TRPL
Neuron, Volume 19, Issue 6, December 1997, Pages 1249-1259

Smits RP, Jansonius NM. , Stavenga DG. 1995. Dependence of receptor potential and redox state of mitochondrial cytochromes on oxygen fraction measured in the blowfly eye in vivo. *J Comp Physiol A*. 177: 105-110

Trumpower BL, Gennis RB. 1994. Energy transduction by cytochrome complexes in mitochondrial and bacterial respiration: the enzymology of coupling electron transfer reactions to transmembrane proton translocation. *Ann Rev Biochem*. 63: 675-716

Tzagaloff A. 1982. Mitochondria. Plenum, New York.

Venkatachalam, K., D.B. van Rossum, R.L. Patterson, H.T. Ma, and D.L. Gill. 2002. The cellular and molecular basis of store-operated calcium entry.
Nat. Cell Biol. 4:E263–E272.

Zupančič, G. (2003) A method for dynamic spectrophotometric measurements in vivo using principal component analysis-based spectral deconvolution. *Pflügers Arch* 447, 109-119.

Zupančič, G. in Perovšek, D.(2007) Metabolic stress is not likely to be a significant contributor to physiological TRP channel activation in blowfly photoreceptors; *Life Sciences 2007 (2007) Proc Life Sciences, PC292 Poster Communications*

8. PRILOGE

aver – srednja vrednost; Error – standardna napaka; Aver+err/-err – razlika oziroma seštevek srednje vrednosti in standardne napake

Latenca spremembe koncentracij ionov (Sliki 31 in 32)

	ZAČETEK					KONEC			N=7
	aver	error	aver+err	aver-err		aver	error	aver+err	
K	13,0113	2,3243	15,3356	10,6870	pulzi	1,7077	0,4116	2,1193	1,2961
	8,0580	1,3772	9,4352	6,6808	svetloba	0,3750	0,2219	0,5969	0,1531
	13,9288	3,6309	17,5597	10,2979	tema	2,1272	0,1167	2,2439	2,0105
Na	9,3586	1,5456	10,9042	7,8130	pulzi	2,0441	0,5965	2,6406	1,4476
	10,3795	2,4834	12,8629	7,8961	svetloba	1,9185	0,7348	2,6533	1,1837
	20,4923	5,6025	26,0948	14,8898	tema	2,1659	0,6793	2,8452	1,4866
Ca	11,3651	1,4129	12,7780	9,9522	pulzi	2,3838	1,2254	3,6092	1,1585
	13,1059	3,0884	16,1943	10,0175	svetloba	1,6217	0,6844	2,3061	0,9373
	20,0245	4,1164	24,1409	15,9081	tema	2,3512	1,0016	3,3528	1,3496

Δ_1 in Δ_2 (Sliki 35 in 36)

	Δ_1					Δ_2			N=7
	aver	error	aver+err	aver-err		aver	error	aver+err	
K	31,9358	2,3533	34,2891	29,5824	pulzi	28,6049	1,9327	30,5376	26,6723
	28,0387	0,7983	28,8370	27,2404	svetloba	24,6333	0,8966	25,5299	23,7367
	29,8998	2,7053	32,6051	27,1945	tema	30,1518	2,6514	32,8032	27,5003
Na	-35,2155	8,9093	-26,3062	-44,1247	pulzi	-18,3239	3,6118	-14,7122	-21,9357
	-26,1378	3,8669	-22,2710	-30,0047	svetloba	-19,0049	3,6147	-15,3901	-22,6196
	-31,4848	5,5419	-25,9429	-37,0268	tema	-31,1890	5,4583	-25,7308	-36,6473
Ca	-0,1198	0,0360	-0,0838	-0,1558	pulzi	-0,0457	0,0200	-0,0257	-0,0657
	-0,1420	0,0334	-0,1087	-0,1754	svetloba	-0,0554	0,0163	-0,0392	-0,0717
	-0,1814	0,0350	-0,1464	-0,2164	tema	-0,1798	0,0357	-0,1441	-0,2155

Δ_3 in Δ_4 (Sliki 38 in 39)

	Δ_3					Δ_4			N=7
	aver	error	aver+err	aver-err		aver	error	aver+err	
K	3,3308	0,5878	3,9187	2,7430	pulzi	3,9717	0,5456	4,5173	3,4261
	3,4054	0,3703	3,7757	3,0351	svetloba	4,8198	0,7249	5,5448	4,0949
	-0,2519	0,1078	-0,1441	-0,3597	tema	-0,1577	0,2345	0,0768	-0,3921
Na	-16,8915	5,8702	-11,0213	-22,7617	pulzi	-13,2901	8,9052	-4,3849	-22,1952
	-7,1330	4,1925	-2,9405	-11,3255	svetloba	-4,8263	3,2870	-1,5394	-8,1133
	-0,2958	0,3378	0,0420	-0,6337	tema	4,0220	1,0627	5,0846	2,9593
Ca	-0,0741	0,0233	-0,0508	-0,0974	pulzi	-0,0127	0,0327	0,0200	-0,0454
	-0,0866	0,0215	-0,0651	-0,1081	svetloba	-0,0544	0,0473	-0,0071	-0,1017
	-0,0015	0,0028	0,0013	-0,0044	tema	0,0356	0,0247	0,0603	0,0109

Δ_5 in Δ_6 (Sliki 41 in 42)

	Δ_5					Δ_6			
	aver	error	aver+err	aver-err		aver	error	aver+err	aver-err
K	0,4959	0,3591	0,8550	0,1369	pulzi	-4,9291	1,0501	-3,8790	-5,9792
	4,7147	1,3629	6,0776	3,3519	svetloba	-2,5942	0,4019	-2,1923	-2,9961
	0,3701	0,0946	0,4647	0,2756	tema	1,2594	0,6485	1,9079	0,6110
Na	-0,3808	2,6936	2,3128	-3,0744	pulzi	19,2046	4,2008	23,4055	15,0038
	-9,1096	2,9128	-6,1969	-12,0224	svetloba	8,9001	3,6054	12,5055	5,2947
	5,1096	1,9893	7,0989	3,1203	tema	1,9343	2,9869	4,9213	-1,0526
Ca	-0,0154	0,0067	-0,0087	-0,0220	pulzi	0,1357	0,0284	0,1641	0,1073
	-0,0525	0,0265	-0,0260	-0,0790	svetloba	0,0804	0,0331	0,1136	0,0473
	0,0176	0,0045	0,0221	0,0131	tema	0,0049	0,0191	0,0240	-0,0142

T09 (Sliki 44 in 45)

	ZAČETEK					KONEC			
	aver	error	aver+err	aver-err		aver	error	aver+err	aver-err
K	94,0354	18,8505	112,8859	75,1849	pulzi	9,6308	1,2327	10,8635	8,3981
	105,9581	14,4398	120,3979	91,5183	svetloba	7,8783	0,9995	8,8778	6,8788
	131,4756	15,8204	147,2960	115,6552	tema	9,7858	1,2216	11,0074	8,5642
Na	76,8140	22,1151	98,9291	54,6989	pulzi	8,2386	2,4313	10,6699	5,8073
	72,9113	17,5741	90,4854	55,3372	svetloba	7,7255	2,0927	9,8182	5,6328
	107,2378	21,0976	128,3354	86,1402	tema	7,6178	2,1652	9,7830	5,4526
Ca	41,1718	24,5565	65,7283	16,6153	pulzi	16,5110	7,5685	24,0795	8,9425
	60,0738	46,8038	106,8776	13,2700	svetloba	16,1982	8,2256	24,4238	7,9726
	120,3290	26,7748	147,1038	93,5542	tema	16,3746	7,4416	23,8162	8,9330

Vrednost CitokromaC ob spremembi koncentracije iona (Sliki 47 in 48)

	ZAČETEK					KONEC			
	aver	error	aver+err	aver-err		aver	error	aver+err	aver-err
K	0,3935	0,1441	0,5376	0,2494	pulzi	0,7488	0,0435	0,7923	0,7053
	0,2958	0,0519	0,3477	0,2439	svetloba	0,9145	0,0370	0,9515	0,8775
			0,0000	0,0000	tema			0,0000	0,0000
Na	0,3077	0,0769	0,3846	0,2308	pulzi	0,8489	0,0376	0,8865	0,8114
	0,4142	0,1449	0,5591	0,2693	svetloba	0,8232	0,1324	0,9556	0,6908
			0,0000	0,0000	tema			0,0000	0,0000
Ca	0,4212	0,0761	0,4973	0,3451	pulzi	0,6960	0,1193	0,8153	0,5767
	0,4776	0,0992	0,5768	0,3784	svetloba	0,8240	0,1119	0,9359	0,7121
			0,0000	0,0000	tema			0,0000	0,0000

Ascalaphus latence spremembe koncentracije ionov (Sliki 52 in 53)

	ZAČETEK					KONEC				N=1
	aver	error	aver+err	aver-err		aver	error	aver+err	aver-err	
K	51,0000				pulzi	4,8000				
	44,0000				svetloba	6,0000				
	50,0000				tema	6,0000				
Na	31,0000				pulzi	7,2000				
	28,7000				svetloba	10,8000				
	20,6000				tema	6,8000				
Ca	45,1000				pulzi	2,8000				
	39,8000				svetloba	3,2000				
	50,1000				tema	3,0100				

Ascalaphus Δ_1 (Slika 54)

Vrednosti maksimalne spremembe koncentracije K^+ iona so pri temi-35,1; pulzih-32,8; in svetlobi-31,5 mM; N=1