

elektrod) oraz zwiększa ryzyko popełnienia błędu. Rozwiązanie tego problemu podsuwa sama natura – czy to w przypadku ewolucji, czy też w rozwoju osobniczym (na przykład układu nerwowego) mamy do czynienia ze znacznym nadmiarem – odpowiednio osobników bądź neuronów. Te z nich, które nie spełniają wymogów (nie są dostatecznie przystosowane lub nie osiągają struktur docelowych), podlegają eliminacji. Podobnie w neuromodulacji istnieje techniczna możliwość zastosowania wielokontaktowych elektrod (64 i więcej kontaktów), które mogłyby zostać wszczepione, nawet w liczbie kilku, wyłącznie na podstawie neuroobrazowania, bez stosowania czasochłonnych badań neurofizjologicznych. Wykluczyłoby to konieczność repozycjonowania i czasochłonego poszukiwania optymalnego położenia elektrody

podczas zabiegu u czuwającego pacjenta. To w przeprowadzonym już po zakończeniu operacji procesie programowania stymulacji następowałaby selekcja odpowiednich kontaktów i ustawień, dających optymalne efekty kliniczne. Warunkiem jest oczywiście takie zaprojektowanie elektrod, aby możliwe było niemal dowolne kształtowanie generowanego przez nie szybkozmiennego pola elektrycznego.

Możliwości rozwoju neuromodulacji są – jak zatem widać – bardzo duże. Jako przeprowadzający tego typu zabiegi spodziewam się i oczekuję na dalszy postęp w zakresie tej metody. W dłuższej perspektywie duże nadzieje należy również wiązać z wprowadzeniem metod leczenia przyczynowego, związanych z zastosowaniem inżynierii genetycznej i wykorzystaniem komórek macierzystych.

Dr Witold Libionka, Collegium Medicum, Uniwersytet Jagielloński.



BIOLOGIA MOLEKULARNA UCZENIA SIĘ I PAMIĘCI: SPOJRZENIE BARDZO SUBIEKTYWNE

Leszek Kaczmarek (Warszawa)

Zrozumienie istoty procesów tworzenia i magazynowania pamięci stanowi od lat jedno z głównych wyzwań badań nad mózgiem. Jest to zagadnienie fascynujące. Pamięć przecież definiuje naszą osobowość, a zatem w gruncie rzeczy decyduje o naszym człowieczeństwie. Jednocześnie uważa się, że poznanie tego zjawiska to wkroczenie na drogę wyjaśnienia również i innych wyższych czynności intelektualnych, a wśród nich świadomości. Pamięć bowiem, w przeciwieństwie do innych wymienionych zjawisk, można stosunkowo łatwo badać doświadczalnie. Istnieją liczne testy pozwalające zmierzyć pamięć u zwierząt, a także i u człowieka. Ostatnie lata to wielki rozwój badań mózgu, w tym i badań nad procesami uczenia się i pamięci (w języku angielskim traktuje się te zjawisko zwykle łącznie, stosując zbitkę słowną - *learning and memory*). Przyczyna tego rozwoju kryje się niewątpliwie w postępie metod badawczych, z jednej strony pozwalających na obrazowanie aktywnego mózgu żywego człowieka, a z drugiej, wykorzystując zwierzęta doświadczalne, na głębokie wnikiwanie w struktury komórkowe i molekularne.

Nie mamy dzisiaj wątpliwości, że pamięć jest ulokowana w mózgu. Mózg stanowi sieć komórek nerwowych (neuronów), kontaktujących się za pomocą swoistych złącz, czyli synaps. Impuls elektryczny przebiegający przez neuron dociera do końca

dłuższej wypustki zwanej aksonem i tam powoduje uwalnianie przekaźnika nerwowego. Ten zaś dociera (poprzez przestrzeń międzykomórkową) do białek ulokowanych na krótkich wypustkach (dendrytach) innych neuronów. Białka te - receptory przekaźnika - przenoszą do wnętrza komórki nerwowej informację, umożliwiającą jej pobudzenie. Każdy neuron połączony jest w ten sposób z olbrzymią liczbą (sięgającą 10 000!) innych komórek nerwowych. Siła tego połączenia jest swoista dla każdej pary neuronów i jest zapewne wyrazem zarówno ilości uwolnionego przekaźnika, jak też reaktywności białek receptorowych, a zwłaszcza ich zdolności do przeniesienia sygnału do wnętrza komórki. Siła ta może ulegać zmianom w toku uczenia się, stanowiąc materialny podkład śladu pamięciowego. W pewnym uproszczeniu można powiedzieć, że ślad pamięciowy jest drogą, po której informacja przekazywana jest w sieci komórek nerwowych. W konsekwencji, pytanie o naturę pamięci sprowadza się do potrzeby zrozumienia mechanizmu molekularnego odpowiedzialnego za modyfikację siły połączeń synaptycznych. Oczywiście można oczekiwać, że zmiana ta zachodzi w obrębie synapsy. Nie można jednakowoż wykluczyć, że podłożem tej zmiany są procesy zachodzące również w innych częściach komórki, w tym również w jądrze komórkowym.

Stwierdzenie, że zespół wszystkich genów komórki, czyli genom, odgrywa istotną rolę w procesach uczenia się jest oczywiście truizmem. Tak jak truizmem jest podobne stwierdzenie w odniesieniu do funkcjonowania jakiejkolwiek komórki jądrzastej. Można się bowiem spodziewać, że jeśli geny byłyby zbędne dla czynności pewnych komórek, to podobnie jak dojrzałe krwinki czerwone ssaków, komórki takie byłyby pozbawione jądra i zawartych w nim genów. Można jednak sądzić, że genom odgrywa w tworzeniu śladów pamięciowych rolę jedynie bierną, służąc jako nośnik informacji o strukturze różnych rodzajów RNA i białek niezbędnych dla prawidłowego działania komórki nerwowej. Wiele zresztą badań wykazało taką właśnie funkcję genów. Na przykład odkryto mutanty muszki owocowej cechujące się zaburzeniami uczenia się. Podobne mutanty myszy otrzymano również w laboratorium. Interesujące, że zarówno w przypadku muszki, jak i myszy, zmutowane geny kodowały bardzo ważne białka, których rolą jest regulacja podstawowych procesów życiowych każdej w zasadzie komórki (były to głównie białka zaangażowane w wewnątrzkomórkowe przekazywanie informacji). Można się spodziewać, że brak takich białek dezorganizuje wiele różnych procesów komórkowych, w tym i tych stanowiących biochemiczne podłoże pamięci.

Od początku lat 60. sądzono jednak, że w toku uczenia się dochodzi do pobudzenia aktywności pewnych, zupełnie wówczas nieznanych, genów. Przemawiały za tym wyniki doświadczeń z inhibitorami syntezy białka i RNA. Okazało się bowiem, że podanie zwierzęciu takich substancji uniemożliwiało tworzenie długotrwałych (czyli trwających co najmniej przez kilka dni) śladów pamięciowych. Co więcej, tylko inhibitory podane w okresie treningu behawioralnego (czyli sesji uczenia się) miały taki wpływ. Wskazywało to na to, że w czasie uczenia się dochodzi do pobudzonej aktywności (ekspresji) pewnych genów, a w konsekwencji zwiększonej syntezy nieznanych wówczas białek. Białka te są następnie niezbędne dla utworzenia długotrwałych śladów pamięci. Fakt, że traktowanie zwierząt tymi substancjami nie hamowało zdolności do zapamiętywania na kilka godzin świadczył, że omawiane inhibitory nie wywierały swego wpływu poprzez blokowanie zdolności zwierzęcia do percepcji bodźców, motywacji do wykonania zadania, czy też nie wykazywały innego nieswoistego działania.

W drugiej połowie lat 80. podjęto pierwsze próby zbadania, czy ekspresja (mierzona poziomem swoistego mRNA) określonych genów może się zmieniać w toku uczenia się. Wybrano modele uczenia się, wykorzystujące testy oparte o tzw. obronne

odruchy warunkowe. W naszych pracach rozpoczętych wspólnie z zespołem H. Matthiesa z Magdeburga, a kontynuowanych we współpracy z zespołem K. Zielińskiego w Instytucie Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN w Warszawie, analizowaliśmy wpływ nabywania tzw. dwukierunkowej reakcji unikania na ekspresję genów. Eksperyment przeprowadzany był w aparacie zwanym klatką wahadłową. Składa się ona z dwóch identycznych części. W każdej z nich podłoga zbudowana jest z metalowych prętów, przez które można dostarczyć łagodny bodziec bólowy (prąd elektryczny o natężeniu ok. 1 mA), w każdej jest także źródło światła i dźwięku. Zwierzę jest umieszczone np. w lewej części. W pewnym momencie gaśnie w niej światło, co stanowi sygnał, że w ciągu pięciu sekund w tej części klatki zostanie podany prąd. Szczur ma zatem pięć sekund na przebiegnięcie do części prawej. Jeśli tego nie robi, jest karany bodźcem bólowym, jeśli zaś reakcję wykona poprawnie to bodźca bólowego nie otrzymuje. Może zatem uniknąć bólu i dlatego taka procedura nazywa się nabywaniem reakcji unikania.

Stwierdziliśmy, że pojedyncza sesja treningowa składająca się z 50 prób i trwająca około 25 minut powoduje wzmożoną aktywność genu *c-fos* oraz genu *zif268* w mózgu szczura. W kolejnych doświadczeniach stwierdziliśmy, iż samo wykonanie już wyuczonej reakcji unikania przez zwierzęta już nauczone, nie wywołuje podwyższonej aktywności genu. Sądzimy zatem, że to właśnie proces uczenia się jest odpowiedzialny za obserwowane zjawisko. Warto tu dodać, że produkt genu *c-fos*, czyli białko c-Fos stanowi składnik czynnika transkrypcyjnego (zwanego AP-1), czyli kompleksu białkowego zdolnego do regulacji ekspresji wielu genów. Podobną rolę odgrywa i białko Zif268. Zarówno my, jak i inni badacze potwierdzili te obserwacje w następnych eksperymentach, wykazując wzmożoną w konsekwencji treningu ekspresję również i innych czynników transkrypcyjnych.

Bardzo ciekawe wyniki uzyskaliśmy w ramach wspólnej pracy międzynarodowego zespołu badawczego koordynowanego przez A.J. Silvę z Uniwersytetu Kalifornijskiego w Los Angeles. Jego zespół pokazał w 2001 roku, że myszy heterozygotyczne względem genu kodującego podjednostkę alfa kinazy II zależnej od wapnia i kalmoduliny (α CamKII), czyli mające jedną kopię genu prawidłową, a drugą zmutowaną, są niezdolne do tworzenia śladów pamięci dłuższych niż kilka dni. W doświadczeniach tych zastosowano trening nabywania reakcji warunkowania strachu. Podobnie, jak to opisano powyżej, mysz jest umieszczona w specjalnej klatce, tym razem pojedynczej, z podłogą zbudowaną z metalowych prętów, przez któ-

re można podać łagodny bodziec prądowy. Ponowne umieszczenie zwierzęcia w tej samej klatce wyzwała u niego reakcję strachu, wyrażającą się zamieraniem, nawet gdy mysz nie otrzymuje bodźca prądowego. Pamięć badana w ciągu kilku dni po treningu była zaś w pełni prawidłowa. Podjęliśmy więc próbę wykrycia, gdzie lokują się krótkotrwałe, a gdzie długotrwałe ślady pamięci. Aby poznać odpowiedź na te pytania, określiliśmy poziom białek c-Fos i Zif268 w różnych regionach mózgu myszy. Okazało się, u myszy kontrolnych, genetycznie prawidłowych, ponowna ekspozycja na środowisko, w którym zwierzę było trenowane, powodowała nagromadzenie się obu białek w hipokampie, jeśli doświadczenie było wykonane w kilka dni po treningu, a wybranych częściach kory mózgowej, jeśli po kilku tygodniach. Tego drugiego efektu (ekspresji białek c-Fos i Zif268 w korze mózgowej) nie obserwowaliśmy u myszy zmutowanych. Wyciągnęliśmy stąd wniosek, że owe obszary kory mózgowej są niezbędne dla zapamiętywania na dłuższy czas.

Kolejne nasze badania miały na celu wyjaśnienie, jak działa opisane powyżej „białko pamięci” c-Fos. Jak wspomniano, jest to składnik czynnika transkrypcyjnego AP-1, czyli regulatora aktywności genów. Z faktu, że jego nagromadzenie w komórkach nerwowych towarzyszy uczeniu się można sądzić, co zresztą znajduje już stopniowe potwierdzenie, że muszą istnieć inne geny regulowane przez ten czynnik transkrypcyjny. Wydaje się, że geny te mogą kodować białka kontrolujące siłę połączeń między komórkami nerwowymi. Warto tu podkreślić, że w takim rozumieniu nie ma miejsca na pojedyncze białko, czy cząsteczki kwasów nukleinowych, które zawierałyby w sobie ślady pamięciowe. Zwiększenie ilości białka to tylko pierwszy etap w tworzeniu śladu pamięci. Bardzo ważne jest również właściwe umiejscowienie tego białka w komórce nerwowej, np. w określonych synapsach. Rodzi się zatem pytanie o zdolność neuronów do zapewnienia tak specyficznej lokalizacji wybranych mRNA lub białek. Ostatnie badania to przełom w tej dziedzinie. Okazuje się, że istnieją mechanizmy bardzo swoistego transportu i umiejscowienia wręcz w wybranych synapsach (po stronie postsynaptycznej, czyli w określonych końcówkach dendrytów) – zarówno określonych białek, jak i mRNA, które ulega tutaj lokalnej translacji. Zatem dopiero umiejscowienie jakichkolwiek biochemicznych nośników informacji w ściśle określonym miejscu sieci nerwowej ma sens dla tworzenia śladów pamięciowych.

W poszukiwaniu genów regulowanych przez c-Fos skupiliśmy się na badaniach nad układem enzymatycznym białek zdolnych do modyfikacji macierzy zewnątrzkomórkowej (ang. *extracellular matrix*, ECM). Coraz liczniejsze są bowiem dowody na kon-

trołę siły połączeń synaptycznych przez otaczającą macierz białek pozakomórkowych. W tym kontekście pojawia się pytanie, jakie czynniki mogą kontrolować z kolei skład i strukturę tej macierzy. Oczywista wydaje się tu hipoteza o udziale specyficznych proteaz, zdolnych do rozkładu określonych składników ECM. Wykazaliśmy, że tkankowy inhibitor metaloproteaz (TIMP-1) jest regulowany w komórkach nerwowych hipokampa na poziomie ekspresji genu przez c-Fos/AP-1. Ta obserwacja skłoniła nas do badań regulowanych przez TIMP-1 metaloproteaz macierzy zewnątrzkomórkowej (*matrix metalloproteinases*, MMP). Odkryliśmy, że jedna z nich, MMP-9, jest obecna w komórkach nerwowych hipokampa i jej zawartość jest regulowana przez aktywność komórek nerwowych. Co więcej, dokonaliśmy bardzo zaskakującego odkrycia, że pobudzenie czynnościowe (bioelektryczne) neuronów hipokampa prowadzi do translokacji mRNA MMP-9 do synaps, w okolice postsynaptyczne. Nic zatem dziwnego, że na synapsach oraz w ich okolicach wykryliśmy również białko MMP-9 i jego aktywność enzymatyczną. Zważywszy na kluczową rolę modyfikacji synaps w uczeniu się, nie są także zaskoczeniem wyniki naszych badań nad uczeniem się i plastycznością synaptyczną u zwierząt, u których MMP-9 została zablokowana, czy też jej gen zmutowany. W takich warunkach procesy uczenia się i pamięć zostały upośledzone.

Opisane powyżej wyniki badań wydawały się mieć charakter wyłącznie podstawowy, pomagając zrozumieć istotę fascynującej cechy naszego umysłu – pamięci. Okazuje się jednak, że mają one także swoją drugą, medyczną i potencjalnie aplikacyjną stronę. Nasze ostatnie prace wskazują, że badając ekspresję c-Fos oraz MMP-9/TIMP-1, dotykamy biologicznego podłoża poważnych patologii: padaczki, chorób psychicznych, uzależnienia od alkoholu etylowego czy kokainy. Pokazaliśmy na przykład, że u myszy z uszkodzonym genem MMP-9 dużo trudniej jest wywołać padaczkę, a z kolei u szczurów z dodatkową kopią tego genu – łatwiej. We wszystkich powyższych schorzeniach mamy bowiem do czynienia z zaburzeniami plastyczności neuronalnej, w tym i synaptycznej.

Szczególnie fascynujące są wyniki naszych wspólnych prac z prof. Januszem Rybakowskim z Poznania, w których wykazaliśmy, że różna ekspresja genu MMP-9 może mieć znaczenie w chorobach psychicznych człowieka. Badania te wynikały z poprzednio nagromadzonej wiedzy o roli MMP-9 w schorzeniach innych narządów niż mózgu oraz odkrycia różnych wariantów genu kodującego MMP-9 u człowieka. Warianty te, tzw. polimorfizmy, cechują

się np. różnym poziomem aktywności genu. Wykazaliśmy, że polimorfizm skutkujący mniejszą ekspresją MMP-9 jest częstszy u chorych na schizofrenię, a rzadszy u cierpiących na chorobę maniako-depresyjną, niż u osób zdrowych. Wyniki tych badań są w zgodzie z innymi ostatnimi odkryciami, wskazującymi, że zmiany plastyczności synaptycznej leżą

u podłoża chorób psychicznych. Taki postęp naszej wiedzy – wskazujący na rolę podobnych mechanizmów leżących u podłoża uczenia się i pamięci, jako wybranych wyższych czynności intelektualnych z jednej strony, a ich zaburzeń w postaci chorób psychicznych z drugiej, jest niewątpliwie fascynujący, acz nie całkiem nieoczekiwany...

Prof. dr hab. Leszek Kaczmarek, Kierownik Pracowni Neurobiologii Molekularnej Instytutu Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN, 02-093 Warszawa, Pasteura 3, tel. (22) 659-30-01, fax: (22) 822-53-42; E-mail: l.kaczmarek@nencki.gov.pl



Wsparcie udzielone przez Islandię, Liechtenstein i Norwegię poprzez dofinansowanie ze środków Mechanizmu Finansowego Europejskiego Obszaru Gospodarczego oraz Norweskiego Mechanizmu Finansowego, a także ze środków budżetu Rzeczypospolitej Polskiej w ramach Funduszu dla Organizacji Pozarządowych.

PESTYCYDY: ZA CZY PRZECIWIW?

Ryszard Laskowski (Kraków)



Pestycydy to termin bardzo ogólny, obejmujący ogromną grupę substancji chemicznych, których jedyną wspólną cechą jest to, że służą do niszczenia organizmów uznanych przez człowieka za szkodniki (łac. *pestis* – zaraza, plaga; *caedere* – zabijać). Znajdziemy wśród nich zarówno substancje nieorganiczne (np. zieleń paryska – $\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2$, kryolit – Na_3AlF_6), jak i całą gamę substancji organicznych (np. DDT, aldryna, dimetoat, chlorpiryfos i wiele innych). Obecnie znanych jest około 1500 takich substancji, należących do ponad 50 klas związków chemicznych. Pod względem powszechności stosowania pierwsze miejsce zajmują herbicydy – substancje do zwalczania chwastów, stanowiące około 60% światowego zużycia pestycydów. Na miejscu drugim znajdują się fungicydy, służące do walki z grzybami (do 20% światowego zużycia), zaś miejsce trzecie to dość zróżnicowana grupa związków chemicznych używanych do walki ze szkodnikami zwierzęcymi – zoocydy (około 10-20% zużycia). Pozostałe kilka procent przypada na wszelkie inne substancje stosowane do walki ze szkodnikami i chorobami, np. baktericydy. Jak widać z tego zestawienia, pestycydy służą bardzo różnym celom. Ochrona roślin uprawnych przed szkodnikami, mikroorganizmami chorobotwórczymi oraz konkurencją ze strony innych roślin (chwastów), umożliwia zwiększenie plonów. Pestycydy stosowane przeciwko bakteriom oraz pasożytom zwierzęcym zapewniają dobry stan zdrowotny zwierząt

hodowlanych, a w konsekwencji większą produkcję mięsa, tłuszczu czy mleka. Chronią także nas samych przed owadami i pajęczakami roznoszącymi choroby oraz przed samymi organizmami chorobotwórczymi. Lista korzyści płynących ze stosowania pestycydów jest więc długa. Jest jednak druga strona medalu: pestycydy są skutecznym orężem w walce ze szkodnikami dzięki temu, że są dla nich toksyczne, nie jest zaś możliwe stworzenie takich substancji, których toksyczność ograniczałaby się do tych wyjątkowo gatunków, przeciwko którym są kierowane. Zatem stosowanie pestycydów z definicji pociąga za sobą jakieś niekorzystne skutki, co czyni postawione w tytule artykułu pytanie jak najbardziej zasadnym. Zanim jednak będziemy mogli wytoczyć konkretne argumenty przemawiające za i przeciw powszechnemu stosowaniu pestycydów, musimy, choć pobieżnie, poznać te substancje.

Czym są pestycydy?

Nie miejsce tu na szczegółową prezentację wszystkich grup pestycydów pod kątem ich budowy chemicznej i mechanizmów oddziaływania na organizmy. Skupimy się zatem na tych, które wydają się nieść największe ryzyko dla człowieka i jego środowiska. Należą tu przede wszystkim środki stosowane do zwalczania szkodników owadzych – insektycydy, mimo że ich udział w ogólnym zużyciu pestycydów