

**POLSKIE
TOWARZYSTWO
ANATOMICZNE**

TOM 2 - NR 1
1975 (1-108)

Postępy Biologii Komórki

PWN-WARSZAWA

<http://rcin.org.pl>

Kwartalnik
Polskiego Towarzystwa Anatomicznego
wydawany z pomocą finansową
Polskiej Akademii Nauk

Redaguje Kolegium

Jerzy KAWIAK, Wincenty KILARSKI, Jan MICHEJDA, Maria OLSZEWSKA

Komitet Redakcyjny

Jadwiga ACKERMANN, Leszek CIECIURA, Jerzy KAWIAK, Wincenty KILARSKI,
Jan MICHEJDA, Maria OLSZEWSKA, Stanisław ZAWISTOWSKI

Adres Redakcji

Centrum Medyczne Kształcenia Podyplomowego, ul. Marymoncka 99,
01-813 Warszawa

Państwowe Wydawnictwo Naukowe — Oddział Wrocław 1975

Wydanie I. Nakład 368 + 122 egz. Ark. wyd. 8,25. Ark. druk. 6,75 + 1 wklejka. Papier druk. sat.
III kl. 80 g, 70 × 100 cm. Oddano do składania 17 I 1975 r. Podpisano do druku w kwietniu 1975 r.
Druk ukończono w kwietniu 1975 r. Zam. 2037/75. — A-15. Cena zł 20,—

Wrocławska Drukarnia Naukowa, Wrocław, ul. Lelewela 4

ZASTOSOWANIE STEREOLOGII W BADANIACH MORFOMETRYCZNYCH

Marian KONWIŃSKI, Wiesław SZYMKOWIAK

Samodzielna Pracownia Mikroskopii Elektronowej Instytutu Biostruktury
Akademii Medycznej w Warszawie

Streszczenie. Rozwój ilościowych metod badania czynności organizmów żywych stwarza stale rosnące zapotrzebowanie na ilościowe dane morfologiczne. Ilościowe podejście do opisu biostruktury — morfometria umożliwia ustalenie ilościowych korelacji strukturalno-funkcjonalnych. Nieocenioną rolę w badaniach morfometrycznych odgrywają metody stereologiczne. Pozwalają one na przekształcanie wyników pomiarów dokonanych na losowych przekrojach badanego obiektu na dane dotyczące budowy przestrzennej tego obiektu. W niniejszym opracowaniu przedstawiono podstawowe metody stereologiczne oraz praktyczne aspekty ich zastosowania w badaniach biostruktury.

WSTĘP

Morfometrią nazywa się dział morfologii zajmujący się ilościowym opisem struktur biologicznych. Czasami tym mianem określa się też działanie praktyczne polegające na wykonywaniu różnorodnych pomiarów struktury danego obiektu. Dane morfometryczne są niezbędne do ustalania ilościowych korelacji strukturalno-funkcjonalnych [65, 74].

Organizmy żywe i ich składniki mają w większości budowę złożoną. Bezpośrednie prześledzenie ich budowy i wykonanie ich pomiarów jest zazwyczaj niemożliwe. Najlepszą i powszechnie stosowaną metodą badania materiałów kompleksowych jest skrawanie. Jeśli skrawki są odpowiednio cienkie w stosunku do wielkości składników strukturalnych materiału, to można je uważać za dwuwymiarowe obrazy — przekroje tych składników. Każdy przekrój może być bezpośrednio zmierzony na skrawku. Dane morfometryczne odnośnie do trójwymiarowej struktury, z której przekroje pochodzą, można uzyskać przez zastosowanie metod stereologicznych do opracowania wyników pomiarów na płaszczyźnie [69].

Stereologia jest to ogół metod, które umożliwiają trójwymiarową interpretację dwuwymiarowych obrazów będących przekrojami lub rzutami badanych obiektów. Stereologię można też określić jako ogół metod ekstrapolacji z przestrzeni dwuwymiarowej do trójwymiarowej [15].

Pojęcia morfometrii i stereologii pozostają więc w ścisłym związku, ale absolutnie nie są synonimami [68, 70]. Stereologię należy też odróżnić od innych metod analizy przestrzennej obiektów, jak: stereometria, stereoskopia i fotogrametria [62].

Stereometria jest to dział geometrii zajmujący się przestrzennymi własnościami ciał o znanych kształtach. Stanowi więc jedną z dyscyplin podstawowych dla stereologii.

Stereoskopia polega na składaniu dwóch obrazów tej samej struktury widzianej pod dwoma różnymi kątami, podczas gdy stereologia dotyczy interpretacji wielu losowych obrazów struktury.

Fotogrametria, w przeciwieństwie do stereologii, zajmuje się odwzorowaniem trójwymiarowych obiektów na płaszczyźnie, np. przy opracowaniu map terenu.

Zasadniczą rolę w stereologii odgrywają metody statystyczno-geometryczne. Stosowanie ich jest możliwe we wszystkich przypadkach, gdy próba materiału zawiera wiele badanych struktur tego samego kształtu. Badane struktury powinny być jednorodnie ułożone w przestrzeni, a w przypadku ich niejednorodnego rozkładu pobrana próba powinna zawierać wszystkie rodzaje anizotropii badanego materiału. Jeśli dostępny jest tylko pojedynczy egzemplarz struktury lub kształt struktury jest bardzo skomplikowany, to metodą z wyboru jest rekonstrukcja ze skrawków seryjnych [39, 76] lub kinematografia seryjnych skrawków. Stereologia jako wiedza formalna jest nową dyscypliną, chociaż była praktycznie wykorzystywana od dawna. Za pierwszych stereologów uważani są starożytni astronomowie. Traktowali oni obrazy ciał niebieskich jako rzuty tych ciał na sklepienie niebieskie — wyimaginowaną wklęsłą powierzchnię kuli opisaną wokół Ziemi. Największym osiągnięciem stereologicznym w starożytności [17] było określenie odległości Słońca i Księżyca od Ziemi przez Aristarchosa z Samos (320–250 p. n. e.). Za genialne osiągnięcia stereologii w czasach nowożytnych [17], należy uznać teorię heliocentryczną Mikołaja Kopernika (1478–1543) oraz prawa Keplera (Johannes Kepler 1571–1630).

W zakresie innych dziedzin, pojedyncze badania stereologiczne były wykonywane, począwszy od ubiegłego stulecia, przez geologów i metalurgów, a wreszcie przez biologów. W ciągu ostatnich kilkunastu lat podjęto próbę systematyzacji i popularyzacji stereologii. Wynikiem tych dążeń był zjazd zainteresowanych specjalistów z różnych dziedzin nauki, zorganizowany w roku 1961. Nadali oni słowu stereologia jego dzisiejsze zna-

czenie i utworzyli Międzynarodowe Towarzystwo Stereologii. Od tego momentu nastąpił też wyraźny wzrost zainteresowania stereologią i praktycznego jej zastosowania [64] w badaniach organizmów żywych.

W literaturze istnieje kilka monografii stereologicznych. Do najważniejszych z nich należą następujące pozycje: „Quantitative methods in morphology” pod red. Weibela i Eliasa [71], „Sterieometriczeskaja mietałłografija” Sałtykowa [50], „Stereology” pod red. Eliasa [16], „Morphometry of the human lung” Weibela [66], „Quantitative microscopy” pod red. De Hoffa i Rhinesa [12], „Quantitative stereology” Underwooda [62], „Stereology 3” pod red. Weibela [67], a w języku polskim „Wstęp do metalografii ilościowej” Rysia [47]. Wśród wielu artykułów monograficznych na szczególną uwagę zasługują: „Stereology: applications to biomedical research” Eliasa i wsp. [17], „Stereological principles for morphometry in electron microscopic cytology” Weibela [68] oraz nieliczne artykuły w języku polskim traktujące o możliwości zastosowania stereologii: „Mikrostereologia” Kozłowskiego [38] i „Metody ilościowe w badaniach ultrastruktury komórek” Godulów [25].

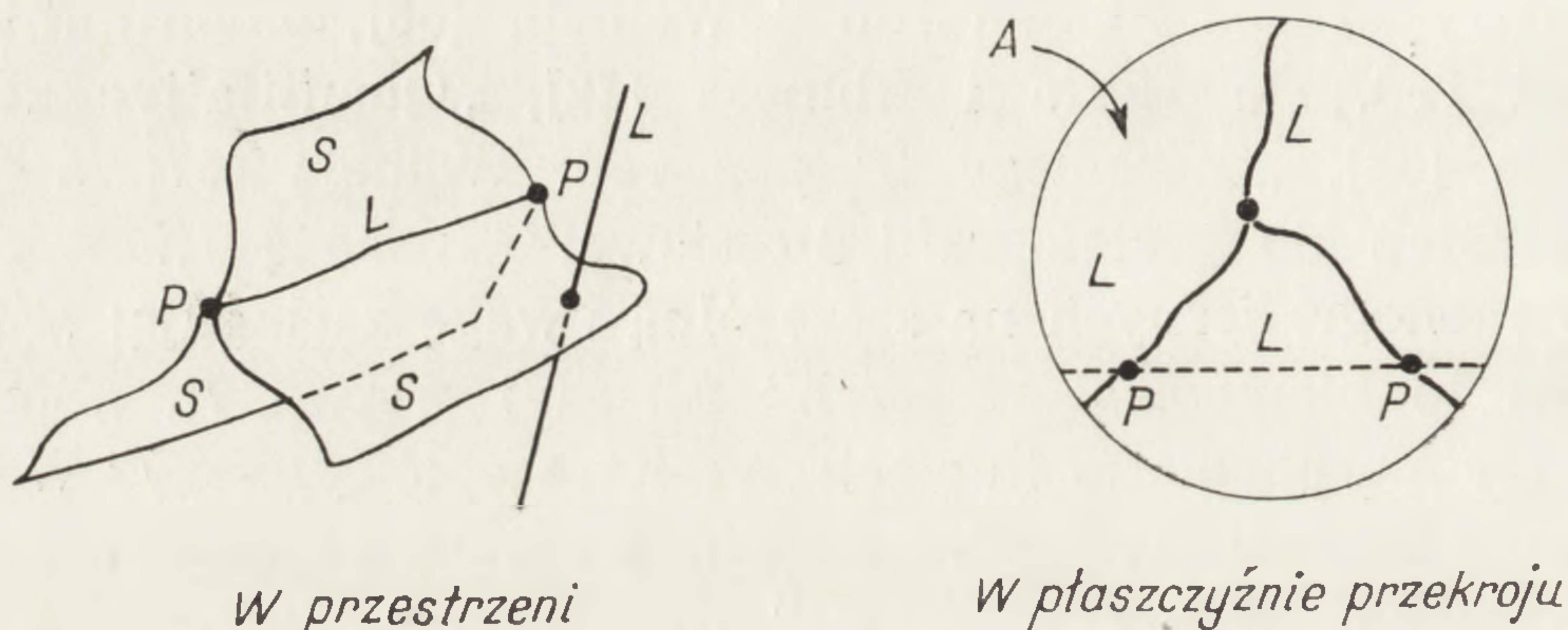
Matematyczne zazwyczaj przedstawienie stereologii zniechęca wielu badaczy biologicznych i medycznych do zastosowania w swych badaniach metod stereologicznych. W artykule tym starano się pominąć wyprowadzenia wzorów, podając korzyści i możliwości płynące z zastosowania stereologii. Szczególną uwagę zwrócono na sposób przygotowania i opracowania materiału biologicznego do badań stereologicznych.

MIANOWNICTWO STEREOLOGICZNE

Celem systematyzacji i jasności dalszego opisu zostanie przedstawione mianownictwo oraz oznaczenia stereologiczne. Definicje niektórych terminów zmodyfikowane według Eliasa i wsp. [17] przedstawiają się następująco:

przekrój	— płaska powierzchnia, która powstaje gdy płaszczyzna przecina trójwymiarową strukturę;
skrawek	— cienka warstwa materiału przezroczystego;
profil	— przekrój pojedynczego składnika materiału. Dla struktury trój-, dwu- i jednowymiarowej profil jest odpowiednio polem, linią i punktem;
sieczna	— pojedynczy fragment linii pomiarowej, który nakłada się na pole powierzchni profilu;
przecięcie	— punkt skrzyżowania linii pomiarowej z zarysem profilu;
współczynnik osiowy	— stosunek długości do szerokości profilu lub stosunek długiej do krótkiej osi cząsteczki.

Przy interpretacji powyższych terminów trzeba brać pod uwagę możliwość różnego pochodzenia punktów, linii i powierzchni. Na przykład, punkty mogą być same strukturą lub mogą być tworzone przez przecięcie linii z linią, linii z płaszczyzną czy linii z powierzchnią. Na rysunku 1 przedstawiono pewne związki między powierzchniami, liniami i punktami w trójwymiarowej przestrzeni i dwuwymiarowym przekroju.



Rys. 1. Powierzchnie S , linie L , punkty P w trójwymiarowym i dwuwymiarowym przekroju [62].

Underwood [61, 62] opracował system oznaczeń stereologicznych wprowadzając złożone symbole literowe do zapisywania ułamków — główna litera jest licznikiem, a litera indeksu mianownikiem, np. $N_V = N/V$. Dodatkowe małe litery indeksu są używane do oznaczania badanego obiektu. Według tego systemu i uzupełnień [17, 38] opracowano wykaz symboli stereologicznych.

Podstawowe symbole stereologiczne

Symbol	Wymiar *	Określenie
P	—	Liczba punktów pomiarowych.
P_p	—	Względna liczba punktów. Stosunek liczby punktów pomiarowych trafiających daną strukturą do ogólnej liczby punktów pomiarowych.
P_L	mm^{-1}	Liczba przecięć na jednostkę długości linii pomiarowej.
P_A	mm^{-2}	Liczba profilów punktowych na jednostkę pola pomiarowego.
l	mm	Długość struktury liniowej do linii pomiarowej.
L_L	mm/mm	Względna długość siecznej. Długość siecznych na jednostkę linii pomiarowej.
L_A	mm/mm^2	Długość struktur liniowych na jednostkę pola pomiarowego.
L_V	mm/mm^3	Długość struktur liniowych na jednostkę objętości pomiarowej.
A	mm^2	Pole przekroju (pole profilu lub pole pomiarowe).

A_A	mm^2/mm^2	Względne pole przekroju. Pole profilów na jednostkę pola pomiarowego.
S	mm^2	Pole powierzchni struktury.
S_V	mm^2/mm^3	Pole powierzchni struktury na jednostkę objętości pomiarowej.
V	mm^3	Objętość struktury lub objętość pomiarowa.
V_V	mm^3/mm^3	Względna objętość. Objętość struktury na jednostkę objętości pomiarowej.
N	—	Liczba struktur.
N_L	mm^{-1}	Liczba struktur na jednostkę długości linii pomiarowej.
N_A	mm^{-2}	Liczba struktur na jednostkę pola pomiarowego.
N_V	mm^{-3}	Liczba struktur na jednostkę objętości pomiarowej.
q	mm/mm	Współczynnik osiowy profilu. Stosunek długości do szerokości profilu.
Q	mm/mm	Współczynnik osiowy cząstek. Stosunek długości do szerokości cząstki.
d	mm	Średnica lub wysokość profilu — średnia odległość między równoległymi liniami stycznymi do profilu.
D	mm	Średnica lub wysokość struktury — średnia odległość między równoległymi płaszczyznami stycznymi do struktury.
t	mm	Grubość skrawka lub odległość między przekrojami.

* Wymiar arbitralnie wyrażony w mm.

METODY OSZACOWANIA WZGLĘDNEJ OBJĘTOŚCI

Wszystkie metody oszacowania względnej objętości składnika struktury opierają się na równości względnej objętości V_V , względnego pola przekroju A_A , względnej długości siecznej L_L oraz względnej liczby punktów P_P , przypadających na ten składnik

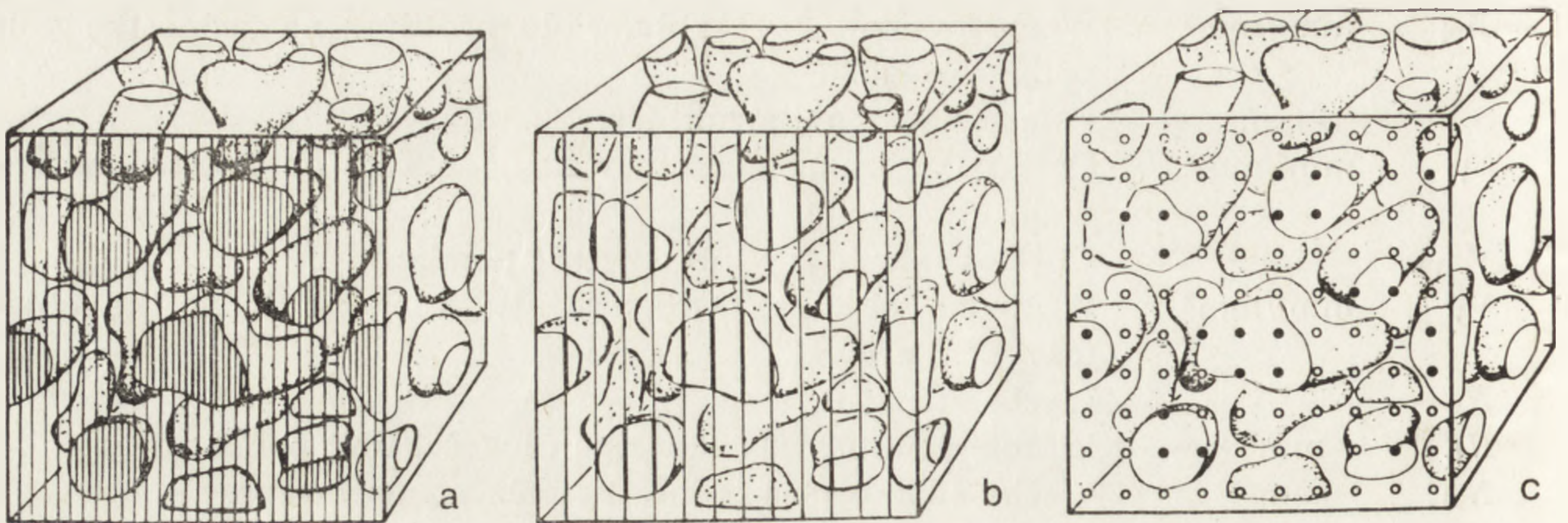
$$V_V = A_A = L_L = P_P. \quad (1)$$

Wyprowadzenie kolejnych fragmentów równania (1) jest podane w wielu pracach [25, 29, 49, 50, 62, 66]. Na rysunku 2 przedstawiono metody pomiaru A_A , L_L oraz P_P używane dla oszacowania względnej objętości.

W przeciwieństwie do ogólnego mniemania badane przekroje nie muszą być przypadkowo zorientowane. Mogą one być równoległe. Zwykle trzeba analizować wiele odległych przekrojów ze względu na anizotropię strukturalną, lub niewystarczającą liczbę profilów danego składnika na przekroju [29, 62].

Również linie i punkty pomiarowe nie muszą być przypadkowo zorientowane. Kolejne linie pomiarowe mogą być równoległe, a punkty pomiarowe mogą tworzyć regularny układ.

Picnierskie prace w tym zakresie zostały wykonane przez geologów. W roku 1847 francuski geolog Delesse [13] wprowadził analizę powierzchniową dla określenia V_V , udowadniając empirycznie równość



Rys. 2. Analiza objętościowa składu tkanki na przekroju (a) za pomocą planimetrii, (b) przez zsumowanie długości siecznych, (c) przez liczenie punktów, które trafiły na profil [72]

względnej objętości i względnego pola przekroju (rys. 2a). Delesse zmierzył pole profilów przez nanoszenie ich na ciężki papier, wycinanie i ważenie. Modyfikacje tej metody są stosowane do dziś. Od roku 1908 [33] do mierzenia profilów używany jest również planimetr. W przypadku jednorodnego i powtarzalnego wykontrastowania profilów możliwe jest zastosowanie fotometru do pomiarów pól [52].

W roku 1898 inny geolog Rosiwał [48] zastosował analizę liniową zamiast planimetrii do określenia A_A (rys. 2b). Wykorzystanie tej metody znacznie wzrosło, gdy opracowano urządzenie ułatwiające mierzenie długości siecznych przez liniowe skanowanie obrazu. Początkowo były to stoliki mikroskopowe o mierzonym przesuwie [55], a potem stoliki o napędzie elektrycznym połączone z licznikiem obrotów urządzenia napędzającego [34] lub licznikiem impulsów elektrycznych, których liczba jest proporcjonalna do wielkości przesuwu [28].

Analiza punktowa została po raz pierwszy zastosowana w roku 1930 przez Thomsona [59], który nakładał obraz dwuwymiarowej siatki punktowej na obraz przekroju dla oszacowania A_A (rys. 2c).

Głagolew [24] w roku 1934 użył liniowego układu punktów wyznaczających bezpośrednio L_L . Używając mikroskopu nakładał on obraz punktu skrzyżowania linii na obraz preparatu przesuwanego skokowo wzdłuż prostej. Niezależnie od niego, Chayes [6] przystosował stół mikroskopowy do analizy punktowej, przez wbudowanie mechanizmu zapadkowego ułatwiającego kontrolę przesuwu.

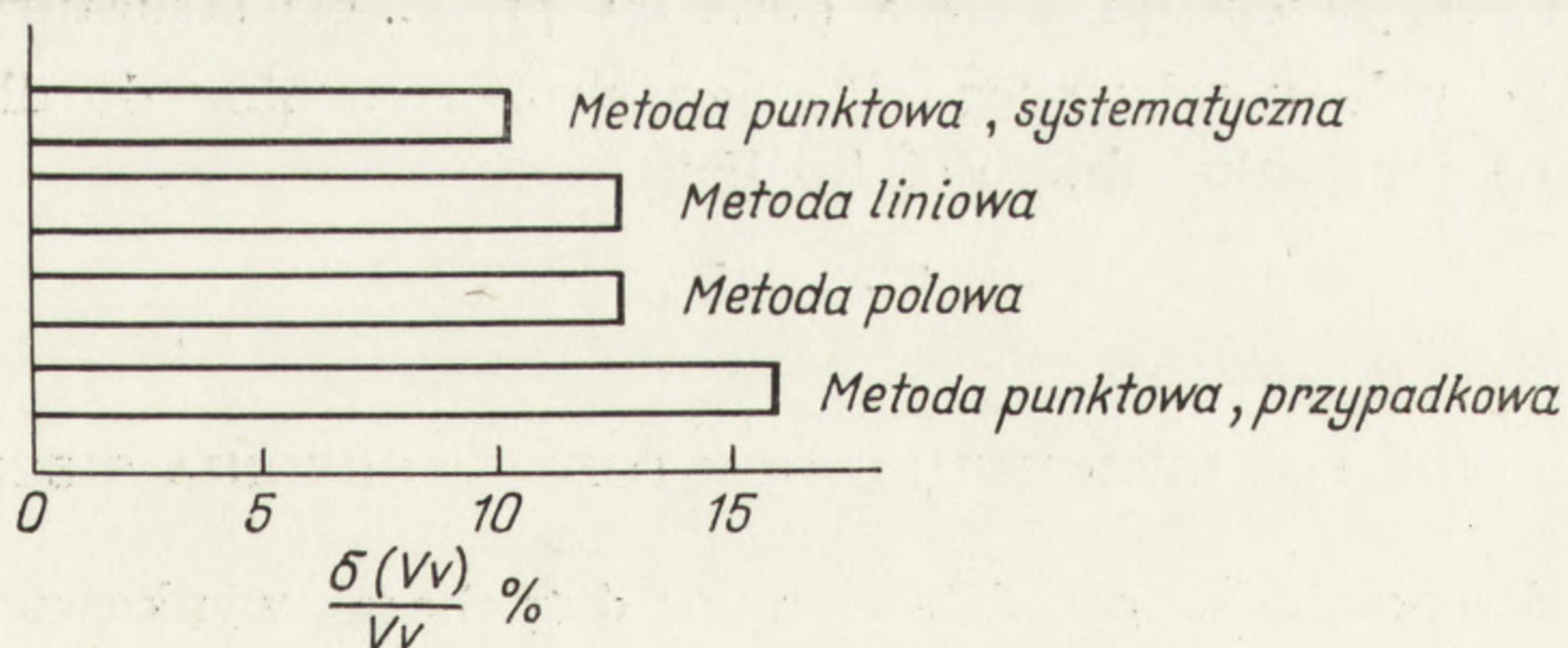
W nowszych mikroskopach przeznaczonych do analizy punktowej preparat przesuwany jest automatycznie po naciśnięciu guzika rejestratora punktów pomiarowych, np. Swift Automatic Counter (Swift, England). W mikroskopie Wild (Wild Heerbrugg itd.) możliwe jest przechodzenie od analizy punktowej do liniowej [22].

Obecnie są już produkowane i w dalszym ciągu udoskonalane urządzenia automatyczne [18, 19] oparte na zasadzie liniowego lub punkto-
wego skanowania w płaszczyźnie przedmiotu [40] — Automatic Particle
Counter and Sizer (Casella Electronics Ltd.), w płaszczyźnie obrazu
[20] — Quantimet 720 (Metals Research Ltd.), Classimat (Leitz),
Microvideomat (Opton) lub w płaszczyźnie źródła światła [77] — Flying
Spot Microscope (Rank Citel Corp.).

PORÓWNANIE METOD ANALIZY WZGLĘDNEJ OBJĘTOŚCI

Praktycznie stosuje się cztery metody umożliwiające analizę na prze-
krojach: metoda polowa, liniowa z dwuwymiarowym układem linii po-
miarowych i dwie metody punktowe — z systematycznym i przypad-
kowym dwuwymiarowym układem punktów. Wszystkie cztery metody
pozwalają bezpośrednio ocenić A_A .

Hilliard i Cahn [29, 31] oszacowali teoretyczne wartości błędu sta-
tystycznego wymienionych czterech metod analizy względnej objętości
hipotetycznej struktury, która zawierała przypadkowo ułożone, równe
kuliste cząsteczki. Za miarę względnego błędu przyjęli oni współczynnik
wariancji $\delta(V_V)/V_V$. Okazało się, że współczynnik wariancji systematycz-
nej analizy punktowej dla danej liczby obserwacji był najmniejszy
(rys. 3). Empirycznie wykazano [23, 29], że błąd systematycznej metody
punktowej może być nawet mniejszy.



Rys. 3. Teoretyczne wartości $\delta(V_V)/V_V$ dla 100 obserwacji struktury zawierającej
przypadkowo ułożone cząstki kuliste o równej wielkości [29]

Jeśli gęstość obserwacji na przekroju nie jest duża, to wielkość
standardowego odchylenia zależy głównie od liczby obserwacji, podczas
gdy jakość obserwacji odgrywa rolę drugorzędą. W związku z tym,
rzeczywistym kryterium porównania metod analizy względnej objętości
powinna być wydajność metody. Najbardziej wydajna metoda jest naj-
ekonomiczniejsza dla osiągnięcia założonej dokładności. Innymi słowy,

nie tylko liczba koniecznych pomiarów, ale i prędkość wykonania jednego pomiaru decydują o wydajności metody. Dlatego metoda liniowa i polowa mogą w niektórych przypadkach konkurować z systematyczną metodą punktową.

POLE POWIERZCHNI I DŁUGOŚĆ NA JEDNOSTKĘ OBJĘTOŚCI

Ocena powierzchni ograniczającej struktury ma ważne implikacje funkcjonalne odnośnie do kontaktu struktury z otoczeniem. Podstawowe równanie

$$S_V = 2P_L \quad (2)$$

podaje relację między liczbą przecięć linii pomiarowych z systemem powierzchni w trójwymiarowej przestrzeni i polem tych powierzchni. Wyprowadzenie równania (2) podał po raz pierwszy Sałtykow w roku 1945 [50], potem Smith i Guttman [57] i niezależnie jeszcze kilku autorów [49, 62, 63].

Sałtykow [50], Smith i Guttman [57] wyprowadzili też równanie, które podaje relację między długością linii na płaszczyźnie L_A (liniami są profile płaszczyzn) i liczbą przecięć z linią pomiarową P_L .

$$L_A = \frac{\pi}{2} P_L \quad (3)$$

Struktury liniowe (włókniste) zawarte w przestrzeni ukazują się jako punkty na przekroju. Liczba punktów przecięcia struktury liniowej na jednostkę pola pomiarowego P_A , jest proporcjonalna do długości tej struktury na jednostkę objętości L_V [50]

$$L_V = 2P_A \quad (4)$$

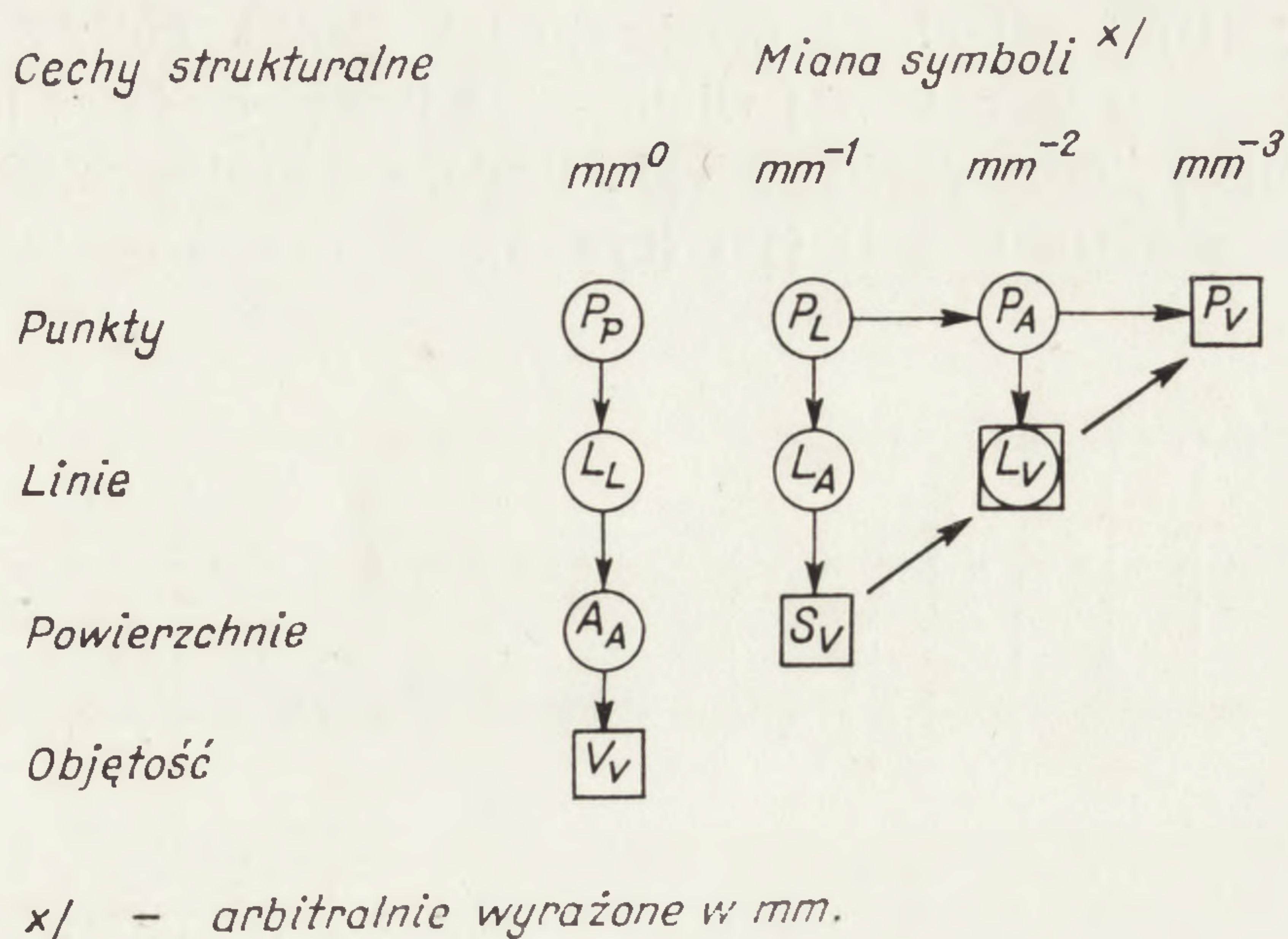
STOSUNEK POWIERZCHNI DO OBJĘTOŚCI — ŚREDNIA SIECZNA

Zależności pomiędzy przedstawionymi dotychczas wielkościami można ująć w system przedstawiony na rysunku 4 [61, 62], z którego wynika, że nie ma bezpośredniej zależności między pierwszą kolumną symboli a pozostałymi. Powiązanie V_V i S_V jest możliwe za pośrednictwem liniowego wymiaru struktury, zwanego średnią sieczną $\bar{L} = L_L/N_L$, czyli

$$\bar{L} = V_V/N_L \quad (5)$$

Ponieważ dla oddzielnych cząstek strukturalnych $2N_L = P_L$, to

$$\bar{L} = 4V_V/S_V \quad (6)$$



Rys. 4. Zależności wielkości mierzonych (○) od obliczanych (□). Strzałki wskazują możliwości obliczenia danej wielkości z innej wielkości [61, 62]

WIELKOŚĆ I ROZKŁAD WIELKOŚCI CZĄSTEK

Określenie wielkości, a zwłaszcza rozkładu wielkości cząstek jest jednym z najtrudniejszych problemów stereologii. Dotychczas rozwiązanie tego problemu jest możliwe tylko dla cząstek o wybranych kształtach. Badane cząstki muszą przy tym spełniać kilka warunków [7]: 1) wszystkie cząstki muszą mieć ten sam kształt i mogą się różnić tylko wielkością, 2) ich kształt musi być znany, 3) ich kształt wyklucza możliwość wielokrotnego przekroju tą samą płaszczyzną pomiarową.

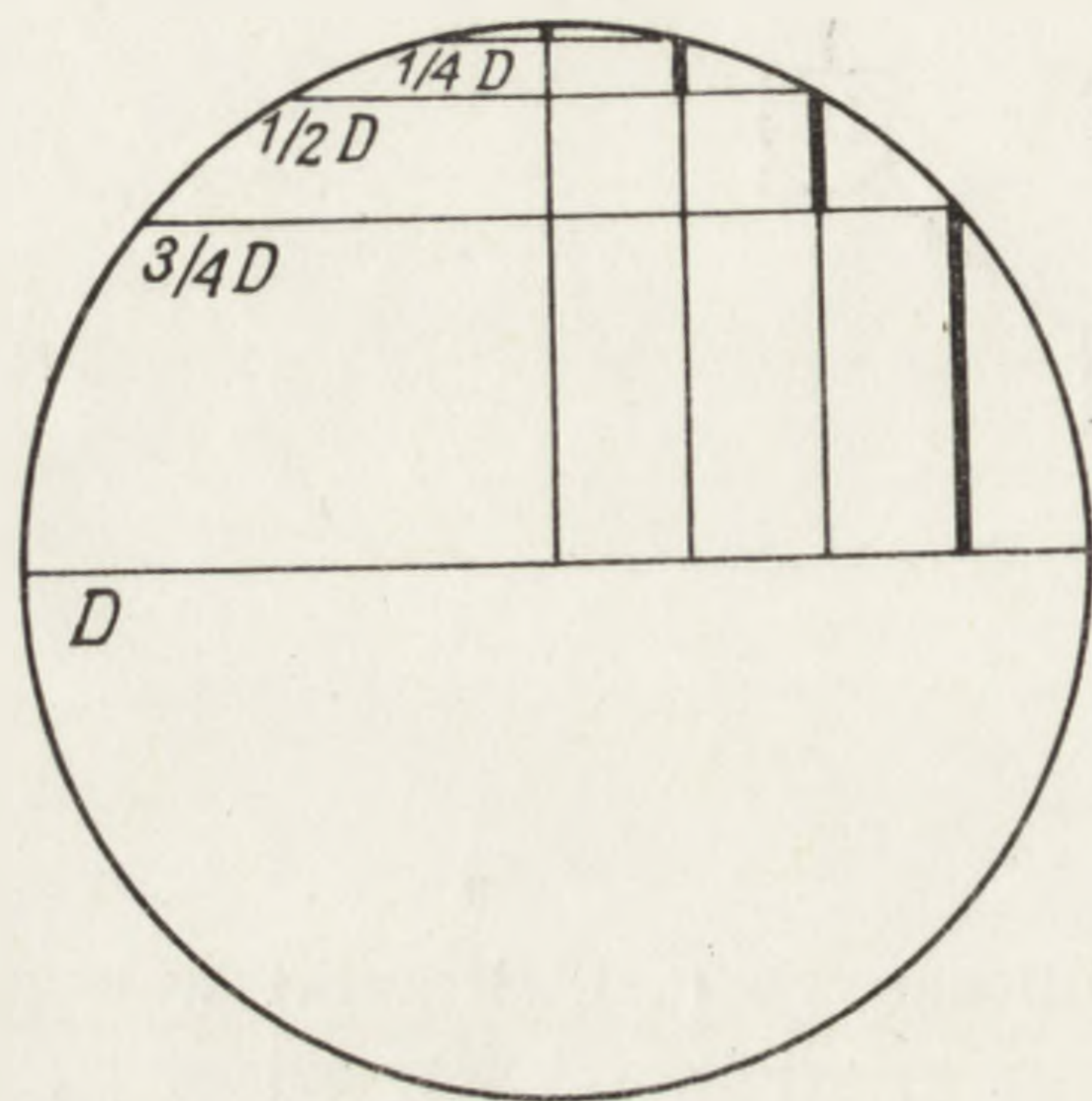
Miarą wielkości cząstek w przestrzeni trójwymiarowej może być wymiar liniowy, powierzchniowy lub objętościowy. Najczęściej używanym wymiarem jest średnica lub średnia wysokość oraz objętość. Wielkość cząstek kulistych określa się średnicą, a wielkość cząstek o innych kształtach średnią wysokością — średnią odległością między dwiema płaszczyznami równoległymi stycznymi do cząstek we wszystkich możliwych ułożeniach.

Hilliard [30] podał wzory na obliczenie D , V , S dla cząstek o różnych kształtach, w zależności od ich charakterystycznych wymiarów liniowych, to znaczy w zależności od: promienia (kula, półkula, płytko kołowa), promienia i wysokości (walec), wysokości (cienki pręt), osi (elipsoidy) oraz krawędzi (wielościany).

Dla zobrazowania trudności związanych z określeniem wielkości cząstek na podstawie obserwacji ich przekrojów, rozpatrzemy najprostszy przypadek, kiedy cząstki mają kształt kulisty.

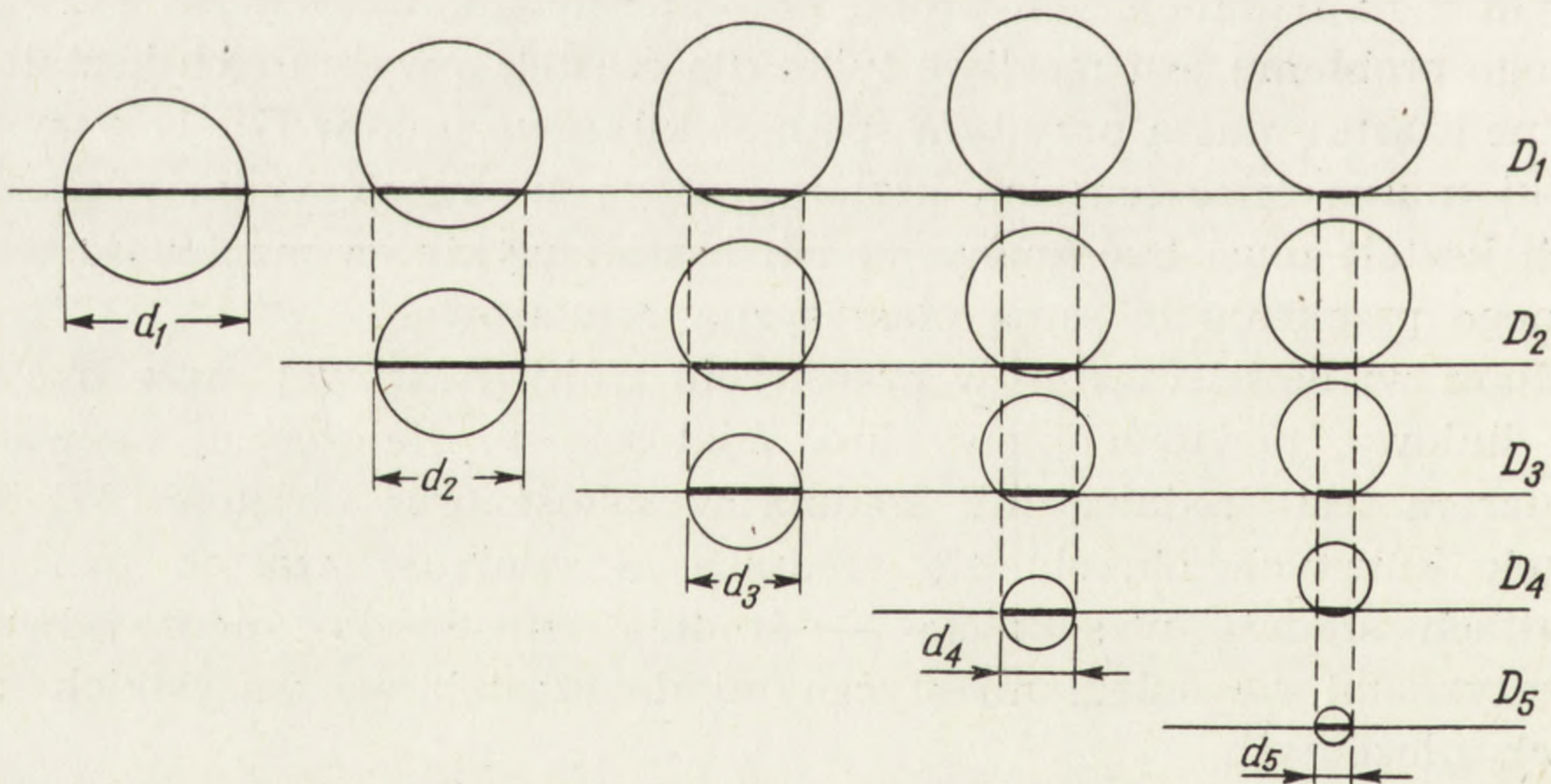
Przekroje kuli są kołami. Średnica kołowego profilu jest funkcją

średnicy kuli (D) i odległości przekroju od środka kuli. Jeśli badamy przekroje wielu kul jednakowej wielkości, mierząc średnice ich profilów, to 13,4% ogólnej liczby profilów będzie miało średnice między 0 a $0,5D$ oraz 86,6% między $0,5D$ a D [17] (rys. 5).



Rys. 5. Względna częstość występowania profilów kul jednakowej wielkości w czterech klasach wielkości średnicy profilu (grube linie) [17]

W przypadku badania przekrojów kul o różnej wielkości, profile o danej wielkości są otrzymywane z kul różnej wielkości (rys. 6).



Rys. 6. Nakładanie się przekrojów kul o średnicach $D_1 - D_5$ na całkowitą liczbę profilów o średnicach $d_1 - d_5$ [7]

OKREŚLENIE ŚREDNIEJ WIELKOŚCI CZĄSTEK KULISTYCH BEZ WYZNACZANIA ROZKŁADU ICH WIELKOŚCI

Określenie średniej wielkości cząstek z pomiarów ich profilów na przekroju, bez wyznaczania rozkładu ich wielkości jest możliwe tylko dla cząstek o kształcie: kuli, płytek kołowych [21], walców [21, 11],

elipsoid obrotowych [11]. Przykładowo podane są równania (7–10), pozwalające określić średnie wymiary: średni promień \bar{R} , średnią objętość \bar{V} i średnią powierzchnię \bar{S} cząstek kulistych oraz liczbę tych cząstek na jednostkę objętości N_V , na podstawie pomiarów N_A , N_L , A_A , L_L lub P_P oraz $m = 1/d$ na przekroju [21, 62]

$$\bar{R} = \frac{\pi}{4m}, \quad (7)$$

$$\bar{V} = 2\bar{A}\bar{R} = \frac{\pi V_V}{2mN_A}, \quad (8)$$

$$\bar{S} = \frac{8\bar{A}\bar{R}}{L} = \frac{2\pi N_L}{mN_A}, \quad (9)$$

$$N_V = \frac{V_V}{2\bar{A}\bar{R}} = \frac{2mN_A}{\pi}. \quad (10)$$

OKREŚLENIE ROZKŁADU WIELKOŚCI CZĄSTEK

Otrzymanie rozkładu wielkości cząstek jest trudniejszym zadaniem niż oszacowanie średniej wielkości, daje jednak więcej informacji. Metody wyznaczania rozkładu wielkości cząstek, na podstawie rozkładu wielkości profilów tych cząstek na przekroju, można podzielić zależnie od wielkości mierzonej. Sałtykow [50] zaproponował podział tych metod na takie, które opierają się na pomiarze średnicy, pola lub siecznej profilu. Większość metod określania rozkładu wielkości odnosi się do cząstek kulistych. Empiryczny rozkład wielkości profilów jest podzielony na klasy wielkości i rzeczywista liczebność kul w danej klasie wielkości jest obliczana za pomocą pewnych operacji matematycznych w wykorzystaniem charakterystycznych współczynników, zwykle zebranych w tabele (tab. 1).

Metody oparte na mierzeniu siecznych profilów są uważane za najbardziej użyteczne [1, 62], ponieważ pomiar odcinków linii pomiarowej siecznych jest łatwy — możliwa jest automatyzacja, a matematyczne opracowanie stosunkowo uproszczone. Niezależne oszacowanie każdej wielkości klasy zapobiega kumulacji błędów.

Opracowano także metody otrzymania rozkładu wielkości struktur płytkowych [5], elipsoid obrotowych [9] i trójosiowych [10] na podstawie pomiaru odcinków linii pomiarowej nakładającej się na ich profil. Ostatnio Hennig i Elias [23] podali uproszczoną metodę szybkiego określenia rozkładu wielkości kul przez porównanie krzywych rozkładu średnicy profilów: empirycznej z wzorcową.

TABELA 1. Charakterystyka metod określania rozkładu wielkości kuli na podstawie pomiarów ich profilów [60, 62]

Cechy mierzone	Autorzy metod (piśmiennictwo)	Użycie tabeli współczynników	Niezależne oszacowanie każdej klasy wielkości	Skala i liczba przedziałów klasowych*
Średnice	Wicksel [75]	tak	tak	$D_{\max}/15$
	Scheil [53]	tak	nie	$D_{\max}/15$
	Schwartz [54]	tak	tak	$D_{\max}/10$
	Schwartz-Sałykow [50]	tak	tak	D_{\max}/k ($k \leq 15$)
	Johnson [35]	tak	nie	wielkość ziarn wg ASTM
Pola	Johnson-Sałykow [50]	tak	nie	skala absolutna niezależna od D_{\max}
	Sałykow [51]	nie	tak	skala absolutna oparta na A/A_{\max} ($k \leq 12$)
Sieczne	Spektor [58]	nie	tak	ciągła lub D_{\max}/k
	Lord i Willis [41]	nie	tak	D_{\max}/k
	Cahn i Fullman [5]	nie	tak	ciągła lub D_{\max}/k
	Bockstiegel [3]	nie	tak	D_{\max}/k

* D_{\max} — średnica największego profilu, k — dowolna liczba przedziałów klasowych, ASTM — amerykańskie tablice norm.

LICZBA CZĄSTEK NA JEDNOSTKĘ OBJĘTOŚCI

De Hoff i Rhines [11] wykazali, że liczba profilów na jednostkę pola pomiarowego (N_A) zależy od liczby cząstek na jednostkę objętości badanej (N_V) oraz od ich przeciętnej wysokości (średnicy) \bar{D} : $N_A = N_V \bar{D}$. Dla wyznaczenia N_V trzeba znać N_A i \bar{D}

$$N_V = N_A / \bar{D}. \quad (11)$$

Równanie [11] jest prawdziwe niezależnie od kształtu i wielkości cząstek. Założenie kształtu jest jednak konieczne dla wyznaczenia \bar{D} . Wszystkie cząstki muszą mieć ten sam, znany kształt. Ponadto określenie \bar{D} jest możliwe tylko dla niektórych kształtów (patrz poprzedni rozdział). Możliwość określenia przeciętnej wysokości ogranicza więc zastosowanie omawianej metody [7, 62].

KSZTAŁT CZĄSTEK STRUKTURALNYCH

Często kształt struktury jest mylnie uważany za cechę jakościową o drugorzędnym znaczeniu. W rzeczywistości kształt można określić ilościowo. Z czynnościowego punktu widzenia, kształt struktury jest rów-

nie ważny jak wielkość i liczba cząstek strukturalnych. Ponadto oszacowanie wielkości, rozkładu wielkości i liczby cząstek wymaga znajomości kształtu tych cząstek.

Określenie kształtu cząstek jest możliwe, jeśli wszystkie cząstki mają ten sam kształt. W naturze warunek ten jest zwykle spełniony. Kształt ocenia się na podstawie wielu profilów cząstek o różnych orientacjach przestrzennych. Większość cząstek wchodzących w skład organizmów żywych może być sklasyfikowana jako kuliste lub elipsoidalne ziarna, jako włókna oraz błony.

Miarą kształtu profilu jest współczynnik osiowy q – stosunek długości do szerokości (wysokości) profilu. Hennig i Elias [14, 27] opracowali krzywe skumulowanej częstości zmiennej q dla elipsoid obrotowych i trójosiowych oraz dla okrągłych i eliptycznych walców. Kilka krzywych skumulowanej częstości współczynnika osiowego q odnosi się do każdego z wymienionych kształtów, każda krzywa dla innego współczynnika osiowego (Q) cząstek danego kształtu. W praktyce sporządza się wykres skumulowanej częstości empirycznych wartości q i porównuje się go z wykresami wzorcowymi.

POBIERANIE MATERIAŁU DO BADAŃ STEREOLOGICZNYCH

Wszystkie badania stereologiczne są eksperymentami statystycznymi. Do obserwacji wybiera się próbki materiału, które są analizowane dla zebrania danych ilościowych. Poprzez prawdopodobieństwa geometryczne dane te są odnoszone do przestrzennych właściwości struktury wchodzącej w skład badanej populacji.

Wyprowadzenie każdego z podstawowych równań stereologicznych opiera się na założeniu jednorodnego rozkładu cech strukturalnych, czyli na izotropii strukturalnej. Większość badanych systemów strukturalnych nie spełnia tego warunku – jest anizotropowa.

Istnieją dwa zasadnicze rodzaje strukturalnej anizotropii polegające na występowaniu uprzywilejowanej orientacji lub gradientach gęstości składników.

Próba jest reprezentatywna dla danego układu strukturalnego, jeśli zawiera wszystkie rodzaje anizotropii występujące w tym układzie [8]. W przypadku układu izotropowego pojedynczy przekrój może stanowić reprezentatywną próbę [29]. Jeśli składniki materiału mają uprzywilejowaną orientację, należy wykonać szereg przekrojów równomiernie rozłożonych w przestrzeni, aby otrzymać próbę reprezentatywną. W przypadku istnienia gradientu gęstości przekrój powinien przebiegać równoległe do kierunku gradientu [8].

W stereologii stosuje się anizotropowe systemy pomiarowe, np. ukła-

dy równoległych linii pomiarowych. Anizotropia układu pomiarowego nie powinna w żadnym wypadku nakładać się z anizotropią struktury [68]. Wielu autorów zaleca stosowanie izotropowych kolistych linii pomiarowych [47] lub trójkątnego układu linii [56] o stosunkowo małej anizotropii.

Hilliard [28] opisał metody oceny anizotropii wynikającej z uprzywilejowanego ułożenia linii i powierzchni w trójwymiarowej przestrzeni przez określenie funkcji ich rozkładu. Metody te są jednak trudne i bardzo pracochłonne. Przybliżone oszacowanie stopnia ukierunkowania struktury można otrzymać licząc przecięcia liniowe profilów z linią pomiarową w kierunku równoległym i prostopadłym do osi anizotropii [68].

LICZBA POMIARÓW A BŁĄD STATYSTYCZNY

Liczba pomiarów w eksperymencie stereologicznym zasadniczo zależy od pożądanej dokładności oszacowania parametrów oraz od homogenności populacji. Pojedynczy pomiar polega na zliczaniu cząstek, punktów pomiarowych, punktów przecięcia, zmierzeniu długości odcinka lub pola przekroju jednej cząstki. Układ pomiarowy musi być tak nałożony na strukturę badaną, aby zapewnić jednakowe prawdopodobieństwo trafienia punktem, linią lub powierzchnią pomiarową w każdy element struktury. Próba przeprowadzona w ten sposób jest próbą reprezentatywną. Wyniki poszczególnych pomiarów są wtedy rozłożone wokół wartości średniej arytmetycznej (\bar{x}) badanej próby

$$\bar{x} = \frac{\sum_{i=1}^n x_i}{n}, \quad (12)$$

gdzie x_i jest wynikiem pojedynczego pomiaru oraz n – liczbą pomiarów. Rozrzut wyników wokół wartości średniej, będący funkcją homogenności badanej struktury jest określony przez odchylenie standardowe

$$\sigma = \frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n-1} = \frac{\sum_{i=1}^n x_i^2 - n \cdot \bar{x}^2}{n-1}, \quad (13)$$

oznaczenia jak przy wzorze (12).

Natomiast odchylenie standardowe rozkładu średniej arytmetycznej (błąd standardowy średniej arytmetycznej) równa się

$$\sigma_m = \frac{\sigma}{\sqrt{n}}, \quad (14)$$

oznaczenia jak przy wzorze (12).

Dokładność oszacowania średniej w próbie jest zwykle oceniana przy założeniu 95% przedziału ufności [44]. De Hoff [8] podał, że przy założeniu względnego błędu średniej, równego $\pm y$ procent wartości średniej arytmetycznej w próbie trzeba wykonać tyle pomiarów, aby

$$2\sigma_m = \frac{2\sigma}{\sqrt{n}} = \frac{y}{100} \cdot \bar{x}, \quad n = \left(\frac{200}{y} \cdot \frac{\sigma}{\bar{x}} \right)^2, \quad (15)$$

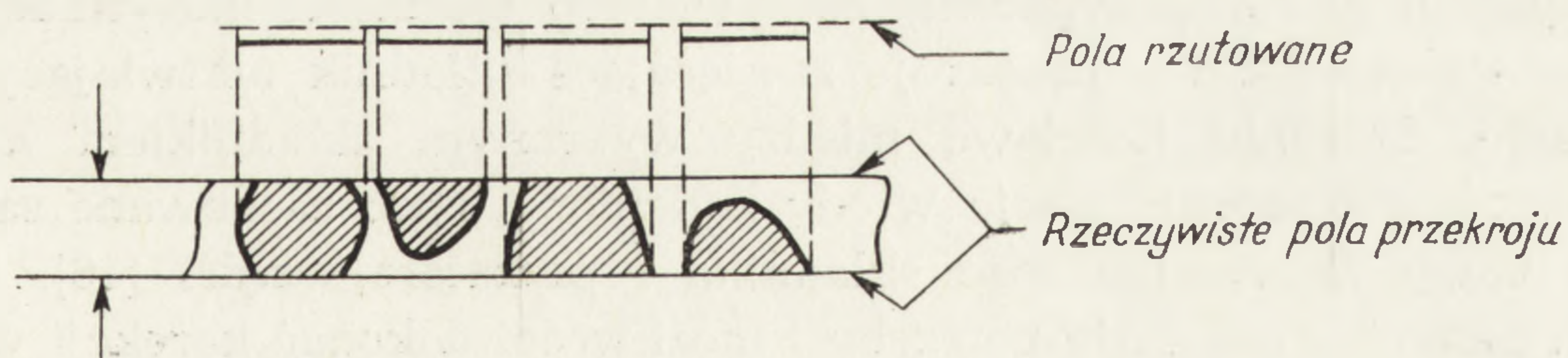
gdzie n – liczba pojedynczych pomiarów, σ – odchylenie standardowe, \bar{x} – średnia arytmetyczna. Wartości \bar{x} i σ należy wstępnie oszacować na podstawie niewielkiej próby.

Bardziej dokładne metody oszacowania liczby pomiarów podaje Ryś [49] i Sałtykow [50].

BŁĄD SYSTEMATYCZNY W BADANIACH STEREOLOGICZNYCH

Błąd systematyczny analizy stereologicznej, w przeciwieństwie do błędu statystycznego, nie zmniejsza się ze wzrostem liczby pomiarów. Najczęstszymi przyczynami tego rodzaju błędów jest użycie skrawków zamiast rzeczywistych przekrojów struktury, brak dostatecznej rozdzielności obrazu, niedokładność oraz mylne rozpoznanie profili struktury. Należy też pamiętać, że nawet w przypadku bezbłędnego badania stereologicznego, otrzymany wynik może być fałszywy z powodu zmian strukturalnych spowodowanych niewłaściwym przygotowaniem materiału biologicznego do badania (patrz następny rozdział).

Podstawowe równania stereologiczne odnoszą się do zmiennych mierzonych na rzeczywistych (dwuwymiarowych) przekrojach struktury. Jednak do badania w mikroskopie świetlnym i elektronowym używa się zwykle skrawków, które mają skończoną grubość. Wobec tego obserwowane pola rzutu gęstych struktur są większe od ich rzeczywistego pola przekroju (rys. 7).



Rys. 7. Wpływ grubości skrawka na rzutowany obraz cząstek [29]

Różnica między rzutowanym a rzeczywistym polem przekroju została w petrografii nazwana efektem Holmesa, od nazwiska badacza [32]. Systemy biologiczne zawierają niewiele cząstek o dużej gęstości, do

których w pełni stosuje się efekt Holmesa [17]. W praktyce pomija się zwykle wpływ grubości skrawka, jeśli grubość skrawka jest mniejsza od 0,2 średnicy struktury.

Brak dostatecznej rozdzielczości obrazu może być spowodowany ograniczoną zdolnością rozdzielczą mikroskopu lub brakiem dostatecznego kontrastu między składnikami obrazu. Zjawiska te powodują rozmycie granic profilów, co ma szczególne znaczenie przy badaniu błon ograniczających składniki komórkowe.

Loud [42] wykazał empirycznie, że około jedna trzecia profilów błon znajdujących się w cienkich skrawkach jest niewidoczna, ponieważ przy nachyleniu pod kątem mniejszym niż 30° w stosunku do płaszczyzny skrawka błony biologiczne niedostatecznie rozpraszają elektrony. Może być to przyczyną niedoszacowania powierzchni, objętości i liczby cząstek strukturalnych, zwłaszcza w przypadku gdy struktury nie są rozpoznawalne na podstawie ich budowy wewnętrznej.

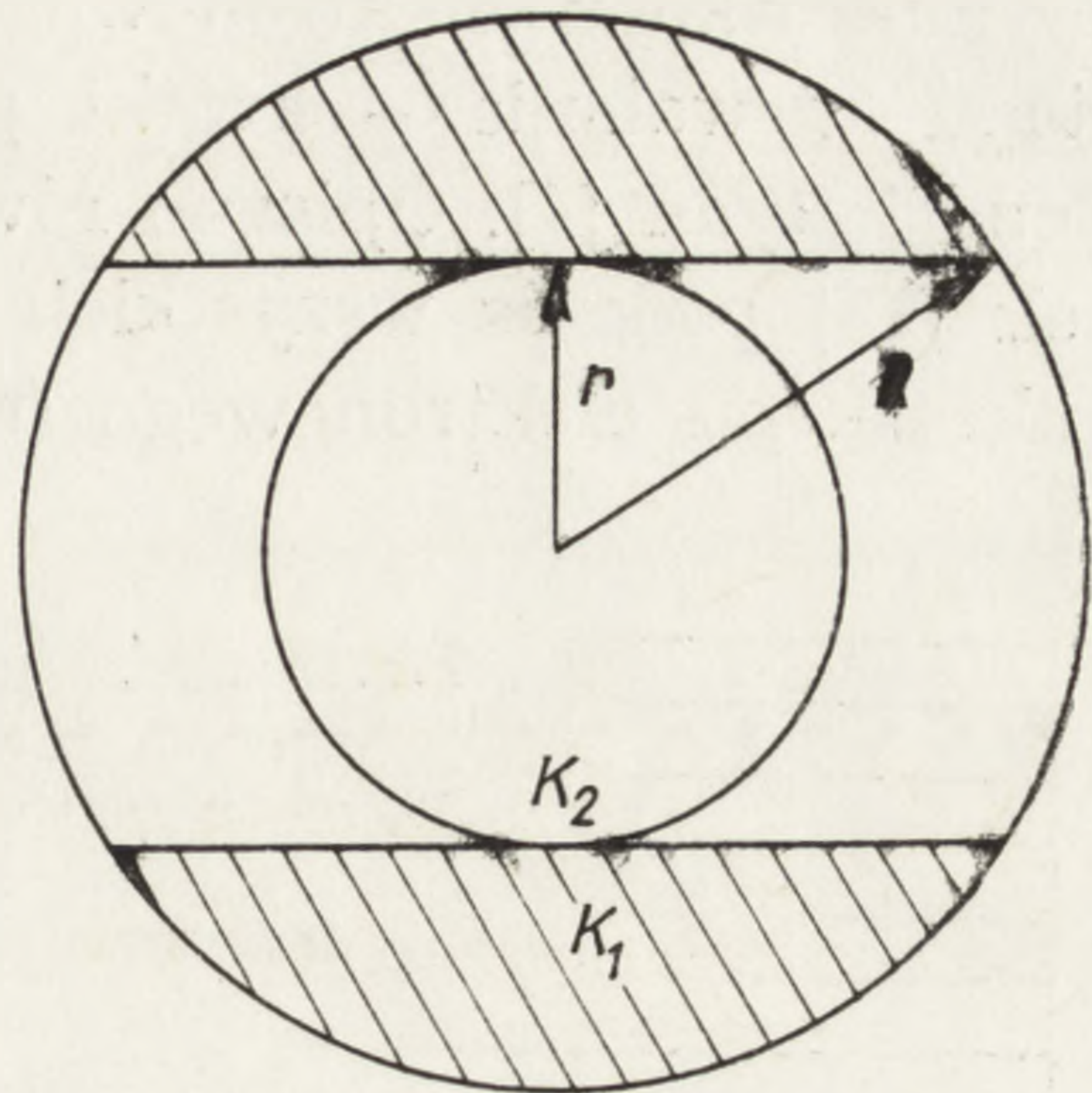
Błąd systematyczny wynikający z niedoskonałości technicznych używanej aparatury oraz z preparatyki materiału biologicznego, musi być wzięty pod uwagę w warunkach konkretnego badania stereologicznego. Obraz przekroju struktury może być znacznie zniekształcony wskutek aberracji układów soczewek mikroskopowych oraz z powodu kompresji skrawka przy skrawaniu. Loud i wsp. [43] stwierdzili, że zniekształcenia obrazu spowodowane dystorsją soczewek elektromagnetycznych i kompresją skrawków są sobie przeciwstawne i przeważnie można je pominąć w rozważaniach systematycznego błędu analizy stereologicznej.

BADANIE WYBRANYCH PROFILÓW KOMÓREK

Rozpoznanie typu komórki lub organelli komórkowych na przekroju może być bardzo trudne, jeśli badany przekrój nie zawiera dostatecznej ilości szczegółów. Zazwyczaj o wiele łatwiej jest zidentyfikować typ komórki na profilach zawierających jądro komórkowe, niż na nie zawierających go. W przypadku rzeczywistych trudności klasyfikacyjnych można wybierać tylko przekroje zawierające składnik ułatwiający identyfikację. Stosunki ilościowe między wybranym składnikiem a pozostałą częścią komórki zostają wtedy zmienione, choć zachowane są właściwe relacje w obrębie tego składnika i pozostałej części [46]. Należy o tym pamiętać i w razie potrzeby i możliwości dokonać korekcji względnych wielkości.

Opracowano metodę korekcji względnych objętości komórki, otrzymanych z wyłącznego badania cienkich skrawków zawierających jądro komórkowe dla kulistego kształtu komórki i kulistego jądra położonego koncentrycznie [37] rys. 8 lub ekscentrycznie [45].

Rys. 8. Model geometryczny komórki o kształcie kulistym K_1 z koncentrycznie położonym kulistym jądrem K_2 . Zakreśkowane części modelu oznaczają fragmenty komórki odrzucane przy badaniu przekrojów przechodzących przez jądro [37]



W wyniku badania centralnych, przechodzących przez jądro przekrojów komórek (rys. 8), empiryczna wartość względnej objętości jądra i jego składników jest zawyżona w stosunku do wartości rzeczywistej V_V . Relacja wartości empirycznej $V_{V\text{emp}}$ i rzeczywistej V_V przedstawia się następująco [36]:

$$V_{V\text{emp}} = \frac{2V_V}{3V_V^{1/3} - V_V}, \quad (16a)$$

albo

$$V_V = \left(\frac{3V_{V\text{emp}}}{V_{V\text{emp}} + 2} \right)^{3/2}. \quad (16b)$$

Oczywiście rzeczywista V_V cytoplazmy równa się: $1 - V_V$ jądra.

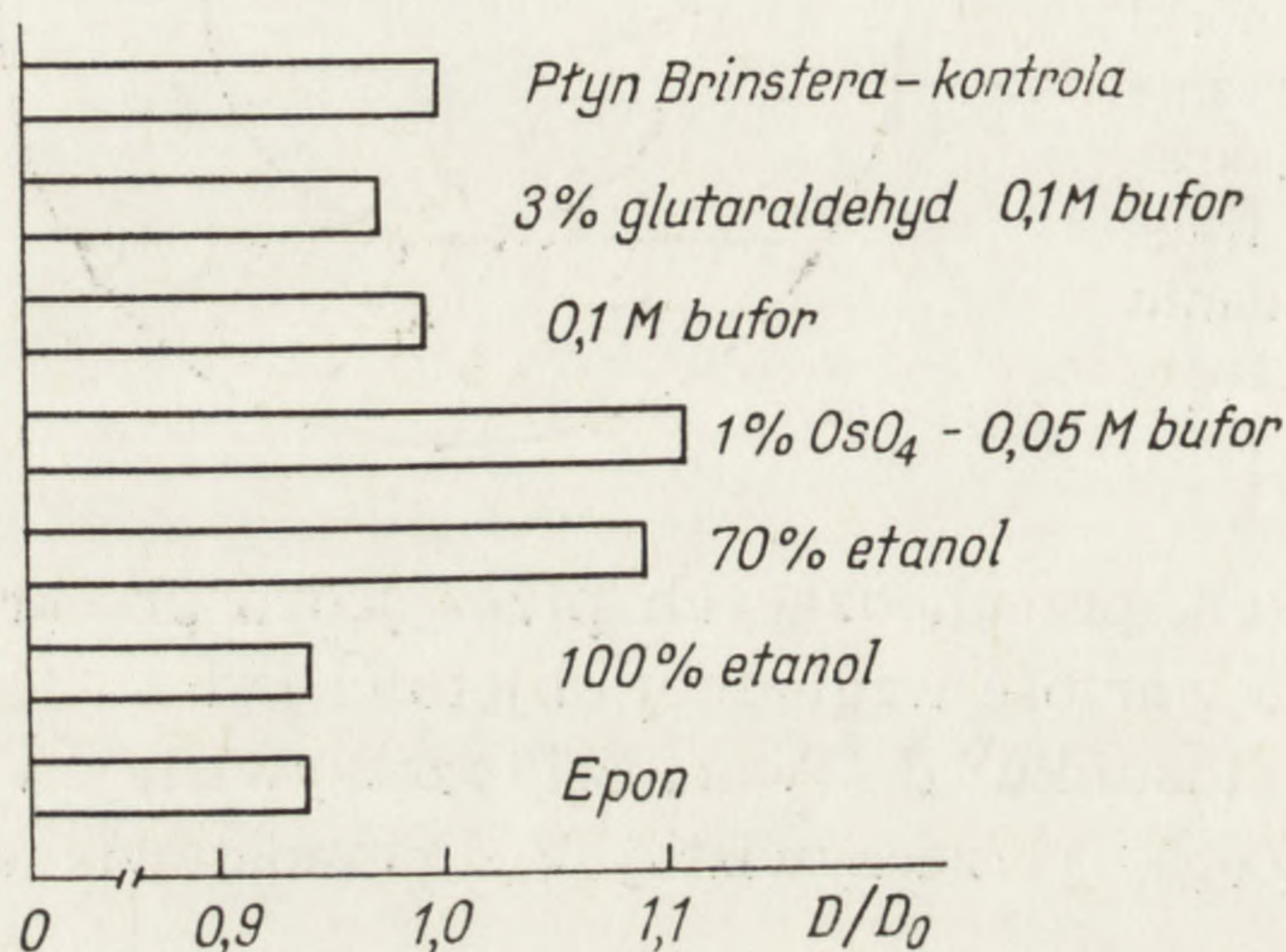
PREPARATYKA MATERIAŁU BIOLOGICZNEGO DO BADAŃ MORFOMETRYCZNYCH

Dokładne zachowanie struktury badanych narządów, tkanek, komórek i jej składników jest oczywistym dążeniem morfologów. Na podstawie badania utrwalonego i preparowanego w rozmaity sposób materiału biologicznego, wyciąga się bowiem wnioski odnośnie do budowy organizmów żywych. Problem ten nabiera szczególnej wagi w badaniach morfometrycznych. Należy znać zakres zmian powstających w trakcie preparatyki, aby właściwie interpretować wyniki morfometryczne.

Wpływ techniki histologicznej na wymiary komórek i tkanek był od dawna badany przez morfologów – dla przeglądu poleca się monografię Bakera [2].

Ostatnio zainteresowanie wielu badaczy skupia się na ocenie zmian komórkowych i subkomórkowych powstających w trakcie preparatyki

do mikroskopu elektronowego. Większość prac z tej dziedziny dotyczy etapu utrwalania – krótki przegląd osiągnięć w tym zakresie podaje Bone i Ryan [4]. Opisano również zmiany wielkości komórek [36] i tkanek [73] podczas wszystkich etapów obecnie stosowanej preparatyki do mikroskopu elektronowego (rys. 9).



Rys. 9. Średnice rzutu ocytów wtórnych podczas kolejnych etapów preparatyki do mikroskopu elektronowego, powodujące najmniejsze zmiany średnicy [36]

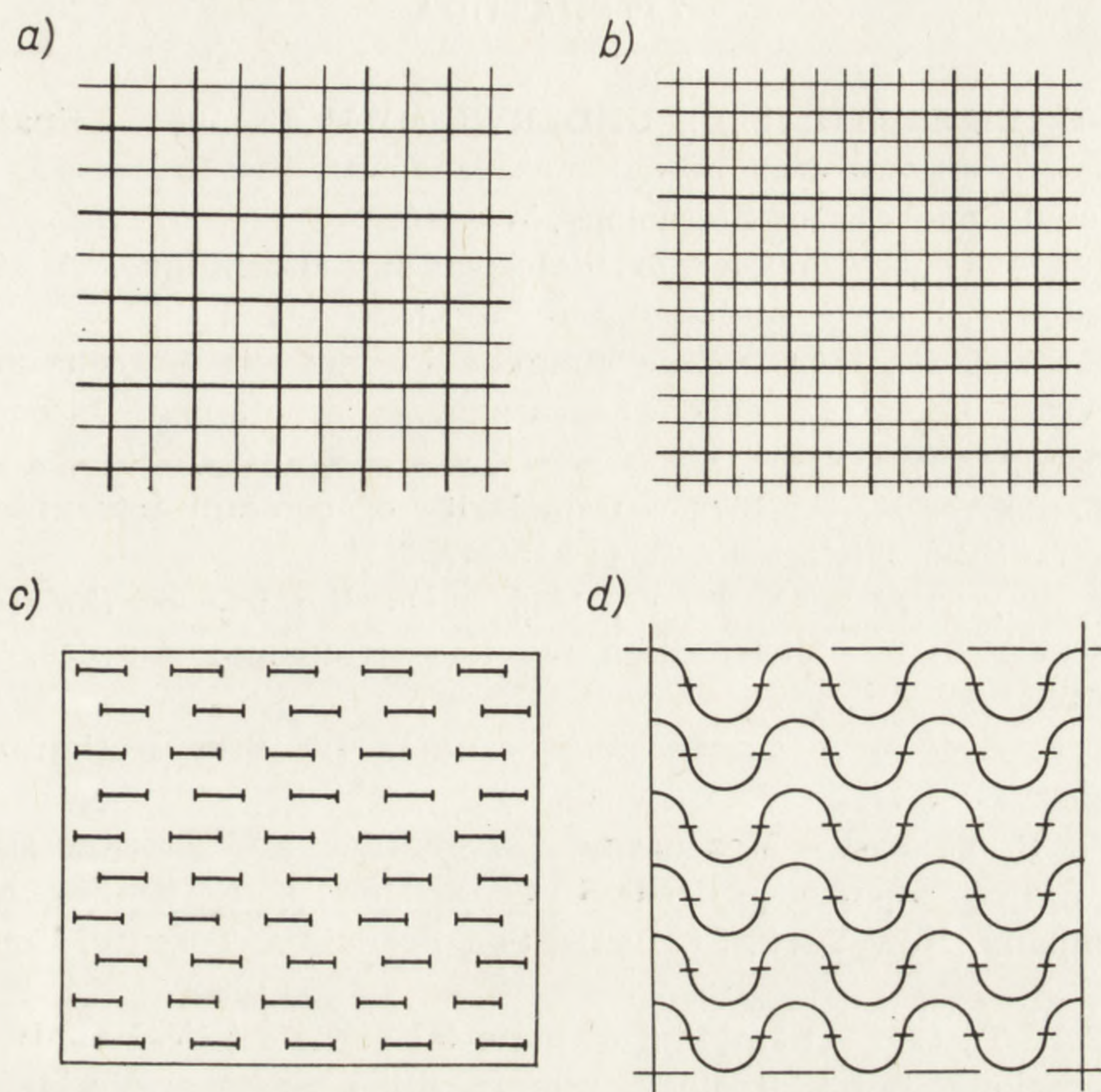
Komórki zatopione w żywicach epoksydowych ulegają podczas skrawania bardzo małej kompresji w porównaniu do kompresji materiału zatopionego w stosowanych dawniej metakrylanach [43].

PRAKTYCZNE WYKONYWANIE BADAŃ STEREOLOGICZNYCH

Na podstawie niewielkiej próby, należy określić liczbę przekrojów, które trzeba przeanalizować, aby osiągnąć założoną dokładność (np. na podstawie wzoru 15). Po wykonaniu połowy tak określonej liczby pomiarów ponownie określamy liczbę przekrojów i dokonujemy brakujących pomiarów [62]. Opisana procedura jest bardzo użyteczna, gdyż pozwala na przerwanie pomiarów w momencie osiągnięcia założonej dokładności.

Do analizy stereologicznej używa się siatek pomiarowych wielu rodzajów. Jeżeli badana struktura jest ograniczona (izolowane komórki), to do badania używamy siatek nieograniczonych. W przypadku struktur nieograniczonych (tkanka) stosujemy siatki ograniczone. Do najczęściej stosowanych, należą siatki z podwójnym systemem linii i punktów (rys. 10a, b) [68, 72], siatka Weibela (rys. 10c) [68] oraz siatka Merza (rys. 10d) [47].

W mikroskopie świetlnym analizę stereologiczną przeprowadza się najczęściej przy użyciu okularów pomiarowych z wkładkami, z naniesioną odpowiednią siatką lub za pomocą nasadki projekcyjnej z siatką



Rys. 10. Typy siatek stosowanych najczęściej w stereologii. *a* i *b* — siatki podwójne [68], *c* — siatka Weibela [68], *d* — siatka liniowa anizotropowa Merza [47]

naniesioną na ekran. Elektronogramy są najczęściej analizowane po obróbce fotograficznej. Zwykle na zdjęcie przykładamy przezroczystą folię z naniesioną siatką, można również projektować na ekran jednocześnie elektronogram i siatkę pomiarową, lub wykonać odbitkę fotograficzną, na której będzie zarówno pozytywny elektronogramu, jak i odpowiednia siatka (rys. 11).

W czasie wykonywania pomiarów stereologicznych należy dobrać odpowiednią gęstość siatki. Ogólną zasadą jest, aby nie więcej niż jeden punkt pomiarowy trafiał w badaną strukturę, a pole pomiarowe było zawsze większe od profilu [29, 49, 62, 68]. Wbrew ogólnemu mniemaniu, gęstość siatki, czyli dokładność pojedynczego pomiaru nie jest parametrem najważniejszym. Na jakość, czyli reprezentatywność próby w analizie stereologicznej wpływa przede wszystkim liczba badanych osobników, potem liczba badanych narządów, wycinków, skrawków, pól widzenia i w końcu dokładność pojedynczego pomiaru. Trzeba pamiętać, że lepiej przeanalizować 100 przekrojów z mniejszą dokładnością, niż jeden ze stukrotnie większą dokładnością [38].

LITERATURA

- [1] AARON H. B., SMITH R. D., UNDERWOOD E. E., 1963 – Spatial grain-size distribution from two-dimensional measurements, [w] Proceedings of the First International Congress for Stereology, Wiedeń.
- [2] BAKER J., 1960 – Principles of biological microtechnique. A study of fixation and drying, II wyd., Methuen and Co. Ltd., London.
- [3] BOCKSTIEGEL G., 1966 – Eine einfache Formel zur Berechnung räumlicher Grössenverteilungen aus durch Linearanalyse erhaltenen Daten, Z. Metallk., 57: 647–652.
- [4] BONE Q., RYAN K. P., 1972 – Osmolarity of osmium tetroxide and glutaraldehyde fixatives, Histochem. J., 4: 331–347.
- [5] CAHN J. W., FULLMAN R. L., 1956 – On the use of lineal analysis for obtaining particle size distribution function in opaque samples, Trans. AIME, 206: 610–614.
- [6] CHAYES F., 1949 – A simple point counter for thin section analysis, Am. Mineralogist, 34: 1–11.
- [7] De HOFF R. T., 1968 – Measurement of number and average size in volume, [w] Quantitative microscopy, red. R. T. De Hoff, F. N. Rhines, Mc Graw-Hill Book Company, New York, St. Louis, San Francisco, Toronto, London, Sydney, 128–148.
- [8] De HOFF R. T., 1967 – Sampling of material and statistical analysis in quantitative stereology, [w] Stereology, red. H. Elias, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 119–130.
- [9] De HOFF R. T., 1962 – The determination of the size distribution of ellipsoidal particles from measurement made on random plane sections, Trans. AIME, 224: 474–477.
- [10] De HOFF R. T., BOUSQUET P., 1970 – Estimation of the size distribution of triaxial ellipsoidal particles from distribution of linear intercepts, J. Microsc. 92: 119–135.
- [11] De HOFF R. T., RHINES F. N., 1961 – Determination of number of particles per unit volume from measurements made on random plane sections: the general cylinder and the ellipsoid, Trans. AIME, 221: 975–982.
- [12] De HOFF R. T., RHINES F. N. – red., 1968 – Quantitative microscopy, Mc Graw-Hill Book Company, New York St. Louis, San Francisco, Toronto, London, Sydney.
- [13] DELESSE A., 1848 – Procédé mécanique pour déterminer la composition des roches, Ann. Mines, 13: 379–388.
- [14] ELIAS H., 1972 – Identification of structure by the common-sense approach, J. Microsc. 95: 59–68.
- [15] ELIAS H., 1967 – Introduction problems of stereology, [w] Stereology, red. H. Elias, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1–11.
- [16] ELIAS H. — red., 1967 – Stereology, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
- [17] ELIAS H., HENNIG A., SCHWARTZ D., 1971 – Stereology: applications to biomedical research, Physiol. Rev., 51: 158–200.
- [18] FISHMEISTER H. F., 1967 – Automatic measuring and scanning devices in stereology, [w] Stereology, red. H. Elias, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 263–274.
- [19] FISHMEISTER H. F., 1968 – Scanning methods in quantitative metallography,

- [w] Quantitative microscopy, red. R. T. De Hoff, F. N. Rhines, McGraw-Hill Book Company, New York, St. Louis, San Francisco, Toronto, London, Sydney, 336-379.
- [20] FLORY L. E., PYKE W. S., 1953 - Particle counting by television techniques, *RCA Rev.*, **14**: 546-556.
- [21] FULLMAN R. L., 1953 - Measurement of particle sizes in opaque bodies, *Trans. AIME*, **197**: 447-452.
- [22] GANDER R. H., 1967 - Morphometric microscope with automatic stage sampling, [w] *Stereology*, red. H. Elias, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 289-290.
- [23] GLADMAN T., WOODHEAD J. H., 1960 - The accuracy of point counting in metallographic investigations, *J. Iron Steel Inst.*, **194**: 189-193.
- [24] GŁAGOLEW A. A., 1934 - Quantitative analysis with the microscope by the point method, *Eng. Mining J.*, **135**: 399-400.
- [25] GODULA J., GODULA J., 1971 - Metody ilościowe w badaniach ultrastruktury komórek, *Kosmos, ser. A — Biol.*, **20**: 307-325.
- [26] HEGRE E. S., 1967 - Serial section cinematography, [w] *Stereology*, red. H. Elias, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 316-322.
- [27] HENNIG A., ELIAS H., 1970 - A rapid method for the visual determination of the size distribution of their sections, *J. Microsc.*, **93**: 101-107.
- [28] HILLIARD J. E., 1967 - Determination of structural anisotropy, [w] *Stereology*, red. H. Elias, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 219-227.
- [29] HILLIARD J. E., 1968 - Measurement of volume in volume, [w] *Quantitative microscopy*, red. R. T. De Hoff, F. N. Rhines, Mc Graw-Hill Book Company, New York, St. Louis, San Francisco, Toronto, London, Sydney, 45-76.
- [30] HILLIARD J. E., 1967 - The calculation of the mean caliper diameter of a body for use in the analysis of the number of particles per unit volume, [w] *Stereology*, red. H. Elias, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 211-215.
- [31] HILLIARD J. E., CAHN J. W., 1961 - An evaluation of procedures in quantitative metallography for volume-fraction analysis, *Trans. Metals Soc. AIME*, **221**: 344-352.
- [32] HOLMES A. H., 1927 - Petrographic methods and calculations, Murby and Company, London.
- [33] HUNTINGTON A. K., DESH C. H., 1908 - The planimetric analysis of alloys and the structure of phosphor-cooper, *Trans. Faraday Soc.*, **4**: 51-59.
- [34] HURLBUT C., 1939 - An electric counter for thin section analysis, *Am. J. Sci.*, **237**: 253-261.
- [35] JOHNSON W. A., 1946 - Estimation of spatial grain size, *Metal. Progr.*, **49**: 87-92.
- [36] KONWIŃSKI M., ABRAMCZUK J., BARAŃSKA W., SZYMKOWIAK W., 1974 - Size changes of mouse ova prepared for morphometric studies in the electron microscope, *Histochemistry* (w druku).
- [37] KONWIŃSKI M., KOZŁOWSKI T., 1972 - Morphometric study of normal and phytohemagglutinin-stimulated lymphocytes, *Z. Zellforsch.*, **129**: 500-507.
- [38] KOZŁOWSKI T., 1971 - Mikrostereologia, *Optyka — biuletyn informacyjny PZO*, No. 1: 18-28.
- [39] KRIEG W. J. S., 1967 - Reconstruction from serial sections, [w] *Stereology*, red. H. Elias, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 293-301.

- [40] LANGERCRANTZ C., 1948 – Photoelectric counting of individual microscopic plant and animal cells, *Nature*, **161**: 25–26.
- [41] LORD G. W., WILLIS T. F., 1951 – Calculation of air bubble size distribution from results of a Rosiwal traverse of aerated concrete, *ASTM Bull.*, No **177**: 56–61.
- [42] LOUD A. V., 1967 – Quantitative estimation of the loss of membrane images resulting from oblique sectioning of biological membranes, [w] *Proceedings 25th Anniversary Meeting of Electron Microscopy Society of America*, red. C. J. Arceneaux, Claitor's Book Store, Banton Rouge, 144–145.
- [43] LOUD A. V., BARANY W. C., PACK B. A., 1965 – Quantitative evaluation of cytoplasmic structures in electron micrographs, *Lab. Invest.*, **14**: 996–1008.
- [44] MARTIN J., 1972 – Podstawy matematyki i statystyki dla biologów, lekarzy i farmaceutów, PZWL, Warszawa.
- [45] MAYHEW T. M., CRUZ L. M., 1973 – Stereological correction procedures for estimating true volume proportions from biased samples, *J. Microsc.*, **99**: 287–299.
- [46] MAYHEW T. M., WILLIAMS F. A., 1971 – A comparison of two sampling procedures for stereological analysis of cell pellets, *J. Microsc.*, **94**: 195–204.
- [47] MERZ W. A., 1967 – Die Streckenmessung an gerichteten strukturen in Mikroskopie Anwendung zur Bestimmung von Oberflächen-Volumen-Relationen in Knochengewebe, *Mikroskopie*, **22**: 132–142.
- [48] ROSIWAL A., 1898 – Ueber geometrische Gesteinsanalysen, *Verhandl. K. K. Geol. Reichsanst.*, **5–6**: 143–175.
- [49] RYŚ J., 1970 — Wstęp do metalografii ilościowej, Wydawnictwo Śląsk, Katowice.
- [50] SAŁTYKOW S. A., 1970 – Stierieometriczeskaja mietallografija, III wyd., Mietalurgija, Moskwa.
- [51] SAŁTYKOW S. A., 1967 – The determination of the size distribution of particles in opaque material from a measurement of the size distribution of their sections, [w] *Stereology*, red. H. Elias, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 163–173.
- [52] SAUNDERS E. R., KAHLES J. R., 1942 – A study of martensite formation by a photoelectric method, *Trans. Am. Soc. Metals*, **30**: 1139–1158.
- [53] SCHEIL E., 1935 – Statistische Gefuguntersuchungen, *I. Z. Metallk.*, **27**: 199–208.
- [54] SCHWARTZ H. A., 1934 – The metallographic determination of the size distribution of temper carbon modules, *Metals Alloys*, **5**: 139–140.
- [55] SHAND S. J., 1916 – A recording micrometer for geometrical rock analysis, *J. Geol.*, **24**: 394–404.
- [56] SITTE H., 1967 – Morphometrische Untersuchungen an Zellen, [w] *Quantitative Methods in Morphology*, red. E. R. Weibel, H. Elias, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 167–198.
- [57] SMITH C. S., GUTTMAN L., 1953 – Measurement of internal boundaries in three-dimensional structures by random sectioning, *Trans. AIME*, **197**: 81–87.
- [58] SPEKTOR A. G., 1950 – Dispersionnyj analiz sfiericzeskich czastic w nieproзраcznych strukturach, *Zawod. Lab.*, **16**: 173–177.
- [59] THOMSON E.: 1930 – Quantitative microscopic analysis, *J. Geol.*, **38**: 193–222.
- [60] UNDERWOOD E. E., 1968 – Particle-size distribution, [w] *Quantitative Microscopy*, red. R. T. De Hoff, F. N. Rhines, Mc Graw-Hill Book Company, New York, St. Louis, San Francisco, Toronto, Sydney, 149–200.

- [61] UNDERWOOD E. E., 1967 – Quantitative evaluation of sectioned material [w] Stereology, red. H. Elias, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 49–60.
- [62] UNDERWOOD E. E., 1970 – Quantitative stereology, Addison-Wesley Publishing Company, Reading, Menlo Park, London, Don Mills.
- [63] UNDERWOOD E. E., 1968 – Surface area and length in volume, [w] Quantitative Microscopy, red. R. T. De Hoff, F. N. Rhines, McGraw-Hill Book Company, New York, St. Louis, San Francisco, Toronto, London, Sydney, 77–127.
- [64] WANIEWSKI E., 1965 – Morphometric methods in pathomorphology (quantitative pathomorphology), [w] Proceedings of the Conference on Modern Methods of Investigation in Pathomorphology, Warszawa, 101.
- [65] WEIBEL E. R., 1970 – Morphometric estimation of pulmonary diffusion capacity. I. Model and method, *Respir. Physiol.*, **11**: 54
- [66] WEIBEL E. R., 1963 – Morphometry of the human lung, Springer-Verlag, Berlin, Göttingen, Heidelberg.
- [67] WEIBEL E. R., – red., 1973 — Proceedings of the Third International Congress for Stereology “Stereology 3”, Blackwell Scientific Publications, Oxford, London, Edinburgh, Melbourne.
- [68] WEIBEL E. R., 1969 – Stereological principles for morphometry in electron microscopic cytology, *Int. Rev. Cytol.*, **26**: 235–302.
- [69] WEIBEL E. R., 1972 – The value of stereology in analysing structure and function of cells and organs, *J. Microsc.* **95**: 3–13.
- [70] WEIBEL E. R., ELIAS H., 1967 – Introduction to stereology and morphometry [w] Quantitative Methods in Morphology, red. E. R. Weibel, H. Elias, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 3–19.
- [71] WEIBEL E. R., ELIAS H., – red., 1967 — Quantitative methods in morphology, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
- [72] WEIBEL E. R., KISTLER G. S., SCHERLE W., 1966 – Practical stereological methods for morphometric cytology, *J. Cell Biol.*, **30**: 23–38.
- [73] WEIBEL E. R., KNIGHT B. W., 1964 – A morphometric study on the thickness of the pulmonary air-blood barrier, *J. Cell Biol.*, **21**: 367–384.
- [74] WEIBEL E. R., STAUBLI W., GNAGI E. R., HESS F. A., 1969 – Correlated morphometric and biochemical studies on liver cell. I. Morphometric Model, stereologic methods and normal morphometric data for rat liver, *J. Cell Biol.*, **42**: 68–91.
- [75] WICKSELL S. D., 1925 – The corpuscle problem. I. A mathematical study of biometric problem, *Biometrika*, **17**: 84.
- [76] YAMADA M., YOSHIDA S., 1972 – Graphic stereo-reconstruction of serial sections, *J. Microsc.* **95**: 249–256.
- [77] YOUNG J. Z., ROBERTS F., 1951 – A flying-spot microscope, *Nature*, **167**: 231.

Otrzymano: maj 1974.

Przyjęto: październik 1974.

Adresy autorów: ul. Chałubińskiego 5, 00-613 Warszawa.

The first part of the paper deals with the ...

The second part of the paper deals with the ...

The third part of the paper deals with the ...

The fourth part of the paper deals with the ...

The fifth part of the paper deals with the ...

The sixth part of the paper deals with the ...

The seventh part of the paper deals with the ...

The eighth part of the paper deals with the ...

The ninth part of the paper deals with the ...

The tenth part of the paper deals with the ...

The eleventh part of the paper deals with the ...

The twelfth part of the paper deals with the ...

The thirteenth part of the paper deals with the ...

The fourteenth part of the paper deals with the ...

The fifteenth part of the paper deals with the ...

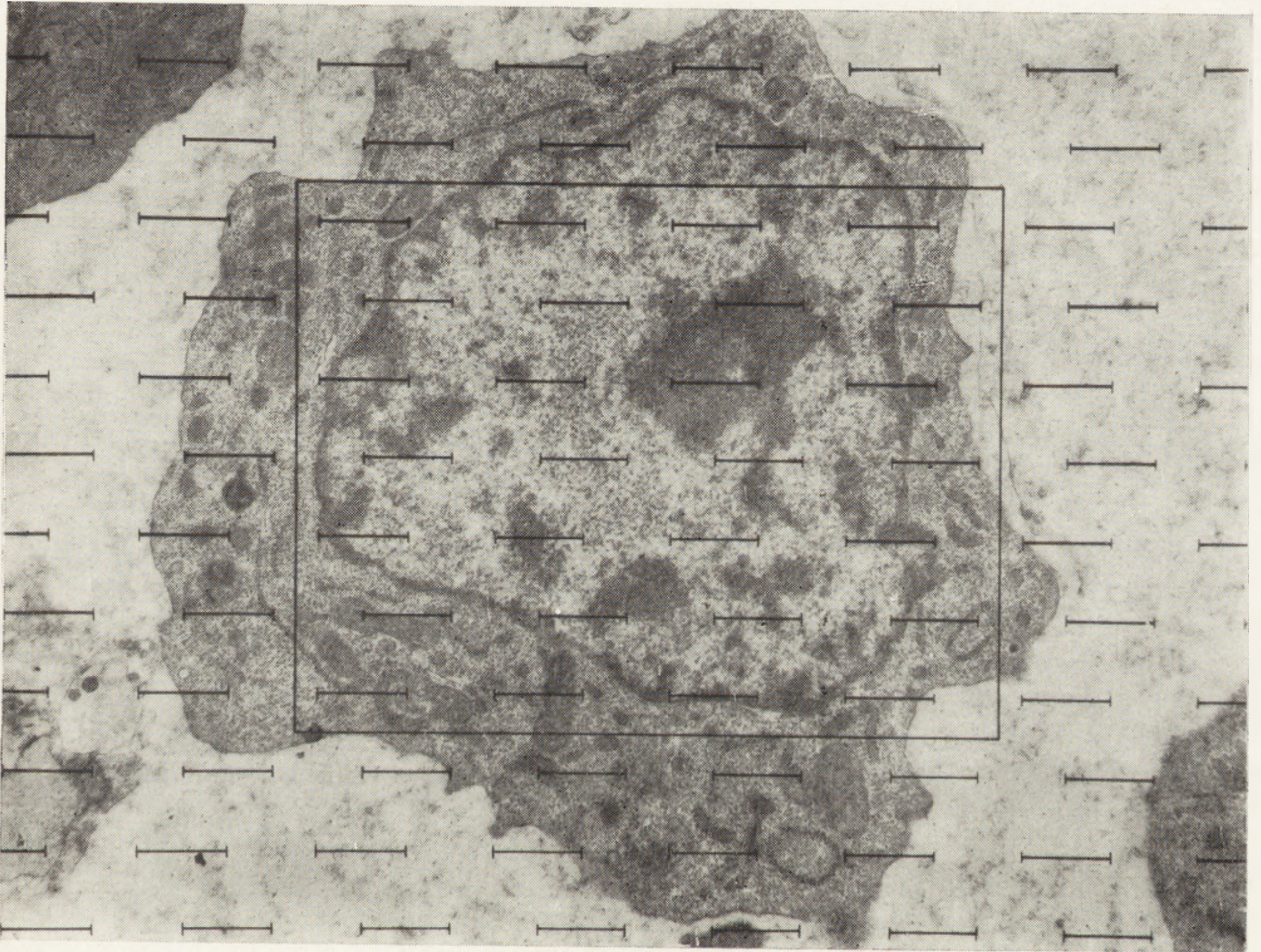
The sixteenth part of the paper deals with the ...

The seventeenth part of the paper deals with the ...

The eighteenth part of the paper deals with the ...

The nineteenth part of the paper deals with the ...

The twentieth part of the paper deals with the ...



Rys. 11. Komórka z nałożoną siatką Weibela

APARAT JĄDROWY ORZĘSKÓW

Janina KACZANOWSKA, Andrzej KACZANOWSKI i Stefan RADZIKOWSKI

Zakład Cytologii Instytutu Zoologicznego
Uniwersytet Warszawski, Warszawa

Streszczenie. Artykuł zawiera charakterystykę dualizmu jądrowego orzęsków, ze szczególnym uwzględnieniem różnicowania makronukleusa i mikronukleusa oraz aktywności syntetycznej obydwu typów jąder. Omówiono również różnicowanie się jąder w procesie koniugacji i autogamii, niektóre elementy genetyki, zagadnienie typów płciowych (mating type) i dziedziczenia tej cechy, jak również pewne aspekty stosunków plazmo-jądrowych w komórkach orzęsków.

Komórki orzęsków zawierają, z pewnymi wyjątkami [20], dwa rodzaje jąder: tzw. mikronukleusy i makronukleusy. Jądra te różnią się zasadniczo, a łącznie tworzą aparat jądrowy.

Mikronukleusy są jądrami o małych wymiarach. Są to jądra dzielące się mitotycznie, a okresowo przechodzą również mejozę, wytwarzając jądra gametyczne. Jedynie mikronukleus bierze udział w procesie płciowym i w przekazywaniu genów w trakcie wytwarzania jądra zygotycznego. Z drugiej strony mikronukleusy prawie nie uczestniczą w produkcji RNA, a więc nie uczestniczą w kierowaniu metabolizmem komórki.

Makronukleusy wraz z mikronukleusami powstają ze zróżnicowania jąder powstałych z zygoty. Po zróżnicowaniu jąder, makronukleusy nie są zdolne do mejozy. U większości gatunków orzęsków, makronukleusy dzielą się w trakcie podziału komórki. Podziały makronukleusów nie są mitozą. Funkcje vegetatywne komórki i ujawnianie się jej cech fenotypowych zależą od makronukleusa. Makronukleusy są jądrami dużych rozmiarów, o dużej zawartości czynnej chromatyny. Rozwój makronukleusa związany jest z przyrostem cytoplazmy i ze zwiększeniem jego aktywności metabolicznej (stosunek plazmo-jądrowy).

Skoro makronukleusy (jak i mikronukleusy) pochodzą od wspólnego jądra zygoty, to zawierają powielony genom tej zygoty lub przynajmniej powieloną pewną część genomu, niezbędną do wegetatywnego funkcjonowania komórki.

Doświadczalnie wykazano, że komórki wegetatywne danego genotypu mogą nigdy nie ujawniać pewnych genów zawartych w mikronukleusie. Ich obecność można dopiero wykazać w kolejnych krzyżówkach.

Różnicowanie się jąder orzęsków jest związane:

1) albo z eliminacją pewnych części genomu w trakcie powstawania makronukleusa,

2) albo ze stałą represją pewnych genów w makronukleusie, oraz zablokowaniem wegetatywnych funkcji mikronukleusa.

Celem rozstrzygnięcia tych możliwości, należy połączyć badania genetyczne, cytologiczne i molekularne.

W artykule omówiono dwie odrębne fazy różnicowania się. Pierwsza faza to różnicowanie się mikronukleusów i makronukleusów z jądra zygoty po procesie płciowym; druga to zjawiska różnicowania się osobników w klonach w trakcie somatycznych podziałów u niektórych orzęsków.

Różnicowanie się zawiązków makronuklearnych można zaobserwować w determinacji tzw. typu płciowego (cechy mt). Różnicowanie się osobników w klonach po szeregu podziałów wegetatywnych obserwowane u *Tetrahymena*, związane jest ze zjawiskiem tzw. sortowania podjąder makronukleusa „somatical assortment”.

Podano zarówno hipotezę próbującą wyjaśnić zjawiska różnicowania się klonów w trakcie podziałów wegetatywnych, jak i pewne dane z tą hipotezą niezgodne.

Z obserwacji cytologicznych wynika, że podział makronukleusa nie jest mitozą, a przypadkowym rozdziałem chromatyny. Z drugiej strony, omówione są niektóre wyniki badań genetycznych, wykazujących istnienie mechanizmu regulacji rozdziału chromatyny przynajmniej u *Tetrahymena* i *Paramecium*. Wobec tego przytoczone są niektóre hipotezy, próbujące wyjaśnić sprzeczność między wynikami badań genetycznych a obserwacjami cytologicznymi. Podano także analizę wzajemnych wpływów, jakie wywierają na siebie jądra, np. w trakcie doświadczalnych transplantacji, bądź też wpływu starego makronukleusa na różnicujący się po procesie płciowym nowy aparat jądrowy.

Uzupełnieniem tego zagadnienia są dane na temat wpływu zakłóceń w cytoplazmie na funkcjonowanie i cykl rozwojowy makronukleusa. W artykule uwaga jest skupiona na nowszych pracach dotyczących aparatu jądrowego orzęsków. Szersze omówienie wcześniejszych badań czytelnik może znaleźć w artykułach: [75, 59, 76, 80, 41, 8, 19, 31, 70, 15].

I. PODOBIENSTWA MIĘDZY MIKRONUKLEUSAMI I MAKRONUKLEUSAMI ORZEŚKÓW

U wszystkich badanych dotychczas orzešków stwierdzono zarówno w makronukleusie, jak i mikronukleusie występowanie DNA, związanego z histonami [43, 31, 30]. W obu jądrach stwierdzono także występowanie białek niehistonowych, w tym także szeregu enzymów, białek zdolnych do polimeryzacji w struktury włókniste [83], nukleoproteidów, białek kwaśnych, a także cukrów pojedynczych, dwucukrów, zasad purynowych i pirymidynowych [70, 31]. W podziałach zarówno mikronukleusów, jak i makronukleusów zachowana jest i zostaje błona jądrowa. Mitozie mikronukleusów, jak też i podziałowi makronukleusa nie towarzyszy wrzeciono pozajądrowe. Brak jest również zróżnicowania jakichkolwiek struktur wyznaczających bieguny podziałowe czy też centrioli.

Mikronukleusy i makronukleusy powstają przez różnicowanie się jednej zygoty. A więc zawierają ten sam genom o ile nie następuje eliminacja części chromatyny np. u *Stylonychia* [4]. Nawet wtedy jednak, przynajmniej część tego samego genomu reprezentowana jest w obu rodzajach jąder. Notuje się więc wiele cech wspólnych dla tych dwóch rodzajów jąder. Cechy te wskazują jednocześnie, że są to typowe jądra organizmów eukariotycznych.

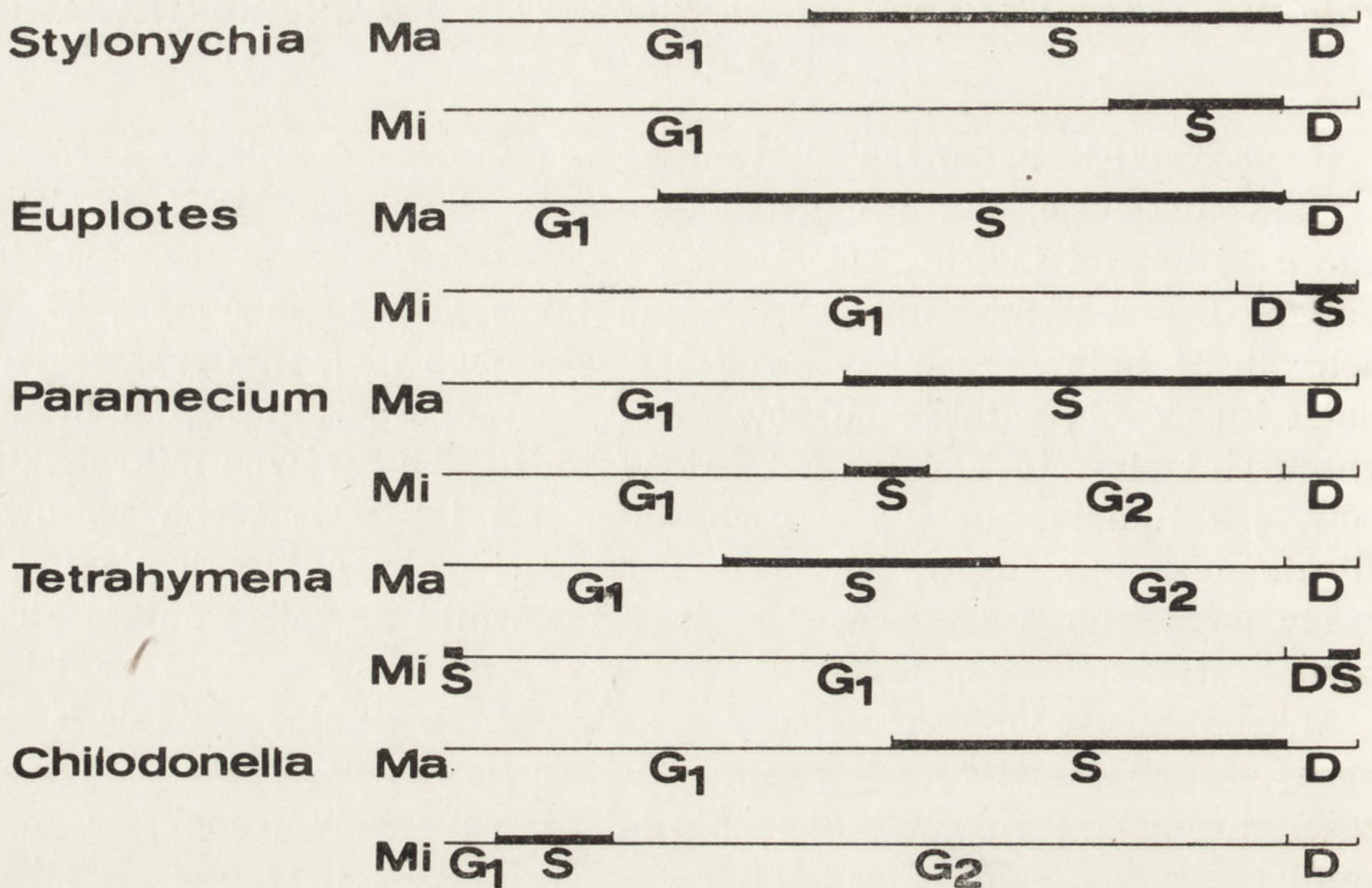
O wiele jednak więcej można powiedzieć o różnicach występujących między tymi jądrami.

II. RÓŻNICE MIĘDZY MIKRONUKLEUSAMI I MAKRONUKLEUSAMI ORZEŚKÓW

1. RÓŻNICE W CYKLU ŻYCIOWYM I ZDOLNOŚCIACH DO SYNTEZY DNA I RNA

Orzeški rozmnażają się przez podział. Czas od jednego do następnego podziału, tzn. długość cyklu komórkowego jest różna u różnych gatunków i zależy również od warunków zewnętrznych (temperatury, pokarmu etc.), a także od czynników wewnętrznych (np. od wieku klonu liczonego od ostatniego procesu koniugacji [73], genetycznych uwarunkowań [42], etc.). W trakcie cyklu komórkowego następuje synteza DNA w mikronukleusie i jego podział na potomne mikronukleusy, jak też (u większości orzešków) synteza DNA w makronukleusie i jego podział na potomne makronukleusy. Jednakże mimo współwystępowania obu typów jąder na terenie wspólnej cytoplazmy dla wielu orzešków (rys. 1) wykazano, że okresy presyntezy (G_1), syntezy (S) i postsyntezy (G_2) DNA w mikronukleusie i makronukleusie zupełnie nie pokrywają się w czasie.

Co więcej, jak to przedstawiono na rysunku 1, u różnych gatunków



Rys. 1. Fazy cyklu syntezy DNA w mikronukleusie i makronukleusie różnych orzęsków między dwoma kolejnymi podziałami (wg Raikova [70] zmodyfikowana)

stosunki poszczególnych faz cyklu w mikronukleusie (Mi) i makronukleusie (Ma) układają się zupełnie inaczej.

W makronukleusie pospolitych orzęsków *Stylonychia* i *Paramecium*, nie stwierdzono w ogóle fazy postsyntezy (G₂) i wydaje się, że podział stanowi zakończenie fazy replikacji DNA. Doświadczalnie można w pewnych przypadkach zmienić układ faz w cyklu Mi i Ma [37].

Synteza DNA w mikronukleusie trwa na ogół krócej, niż w makronukleusie i prowadzi do podwojenia materiału DNA (badania [21, 67] cytofotometryczne). Ilość chromatyny w makronukleusie na ogół jest znacznie wyższa niż w mikronukleusie i jej rozdział w trakcie podziału może nie być idealnie równy tak, iż zdarza się, że potomne makronukleusy rozpoczynają ponowną fazę syntezy (S) z różną ilością DNA. Z reguły w trakcie cyklu komórkowego następuje podwojenie ilości tej chromatyny, ale w niektórych doświadczeniach obserwowano również czterokrotne zwiększenie się zawartości DNA w makronukleusie bez podziału makronukleusa orzęska [36], np. u *Tetrahymena* pod wpływem podgrzewania.

Miejsca syntezy DNA w makronukleusie, albo mogą być rozsiane (np. u *Tetrahymena*) bądź uporządkowane. Tak np. u *Stylonychia*, *Euplotes* i innych, obserwuje się syntezę DNA początkowo na końcach wydłużonego makronukleusa, a następnie miejsce syntezy, tzw. pasmo replika-

cyjne, przesuwa się ku centrum jądra. Przesuwaniu się tych pasm syntezy DNA towarzyszy również synteza histonów, a następnie RNA [27]. Powstało pytanie, czy w makronukleusie *Stylonychia* bądź też form pokrewnych z przesuującym się pasmem replikacyjnym istnieje takie uporządkowanie chromatyny, że wcześniej replikujące się odcinki chromatyny byłyby zgrupowane na końcach makronukleusa, a późniejsze w środku. Badania Ammermanna [6] wykluczyły jednak tę możliwość u *Stylonychia*.

Natomiast u innych orzęsków, np. *Chilodonella cucullulus* występuje zróżnicowanie w makronukleusie na dwie strefy: zewnętrzną i wewnętrzną. Radzikowski [68] wykazał, że replikacja DNA w obu tych częściach zachodzi nie jednocześnie, a mianowicie wcześniej w strefie wewnętrznej, a następnie w zewnętrznej. U większości orzęsków nie występuje ani zróżnicowanie makronukleusa na strefy, ani nie obserwuje się pasm replikacyjnych. Wydaje się więc, że synteza zachodzi w całym jądrze jednocześnie. Przy tworzeniu się makronukleusa, jak też i przy podziale wegetatywnym niektórych orzęsków (np. *Tetrahymena pyriformis* [19] bądź też sporadycznie u *Chilodonella* [68]), część chromatyny może zostać wyeliminowana z makronukleusa.

Makronukleusy są głównymi producentami RNA. W mikronukleusie RNA nie jest w ogóle syntetyzowane bądź też syntetyzowane są jego znikome ilości i to tylko w okresie przed i pokoniugacyjnym [5, 50, 63]. To RNA nie jest niezbędne do wegetatywnego funkcjonowania komórki, skoro przynajmniej u pewnych gatunków orzęsków uzyskano trwałe szczepy amikronuklearne (np. u *Tetrahymena* LG-C, *Euplotes minuta*), na drodze przypadkowych nieprawidłowych podziałów. Fazy syntezy RNA w cyklu życiowym orzęska najlepiej poznano u *Tetrahymena*. Christensson [18] stwierdził, że ilość rybosomalnego RNA ogromnie wzrasta tuż po podziale komórki. Następnie jego synteza przebiega wolniej, a dopiero przed następnym podziałem obserwowany jest jej powtórny wzrost. Christensson wykazał także istnienie związanego z chromatyną makronukleusa nieinformacyjnego RNA o stałej sedymentacji 3–5S; Poziom syntezy w RNA utrzymywał się przez cały okres interfazy, a gwałtownie spadał w trakcie podziału. Istnieją dane, że przynajmniej tuż przed podziałem występuje pewna synteza RNA niezbędnego do podtrzymywania rozwoju komórek potomnych [25]. Prawdopodobnie jest to rRNA [18], [47].

Zbadano RNA oraz jego powstawanie w makronukleusie *Tetrahymena*. Nilsson i Leick [60] opisali liczne peryferyczne jąderka w makronukleusie, które mogą się zlewać w większe skupienia, jeżeli komórka jest głodzona. Ponowne odżywienie komórki powoduje znowu rozpad na małe jąderka. Jak podkreślają autorzy, taka organizacja jąderek jest inna

niż w komórkach *Metazoa*, w których istnieje stała ich liczba. W jąderkach *Tetrahymena* wyróżniono nici i pętle DNA oraz ziarnisto-włóknistą strukturę części peryferycznych. Zachodzi tam bardzo szybka produkcja materiału prerybosomalnego. W okresie intensywnego wzrostu kultury *Tetrahymena*, wydajność syntezy rRNA w pojedynczym jąderku jest około $10\times$ większa niż w jąderku komórek szczepu Hela [46]. Być może, że ta wydajność wiąże się z lokalizacją jąderek tuż pod błoną jądrową, co ułatwia zarówno transport do jądra substancji potrzebnych do syntez, jak i możliwość wyrzucania zsyntetyzowanego materiału przez błonę jądrową do cytoplazmy. W błonie jądrowej makronukleusa *Tetrahymena*, Franke [24] opisał aż 95–135 porów jądrowych na jeden mikron kwadratowy, w odróżnieniu od zaledwie 40–80 porów w błonie jądrowej takich nawet aktywnych komórek jak oocyty, czy też komórki ślinianek *Diptera*. W błonie mikronukleusa jest ich zdecydowanie mniej lub nie ma ich wcale, np. u *Paramecium* [38]. Transport materiału prerybosomalnego przez błonę jądrową makronukleusa opisano na podstawie elektronogramów u *Tetrahymena* [60] i *Chilodonella* [68].

Kumar [45] przeprowadził badania nad prerybosomalnym RNA *Tetrahymena* i stwierdził jego niebakteryjny charakter. Powstająca cząsteczka miała stałą sedymentacji 35 S, a degradowane produkty odpowiadały 17 S i 26 S. Podobne badania wykonali Prescott i inni [64] nad makronukleusem *Stylonychia* i wykazali istnienie podjednostek rRNA o 25 i 17 S, a także tRNA 4 S i mRNA. Kumar [45] wykazał, że podjednostki rybosomalne *Tetrahymena* mają stałe sedymentacji 60 S i 45 S, a Byfield i inni [16] stwierdzili również, że polimeraza RNA u *Tetrahymena* działa w obecności rifampicyny, która hamuje wybiórczo bakteryjną polimerazę RNA.

Wszystkie te dane wskazują, że istotnie głównie makronukleus, a nie mikronukleus jest odpowiedzialny za produkcję RNA, oraz, że cechy organizacji jąder orzęsków odpowiadają jądom innych komórek eukariotycznych.

2. RÓZNICE MIĘDZY MIKRO- I MAKRONUKLEUSAMI W TRAKCIE PROCESÓW PŁCIOWYCH

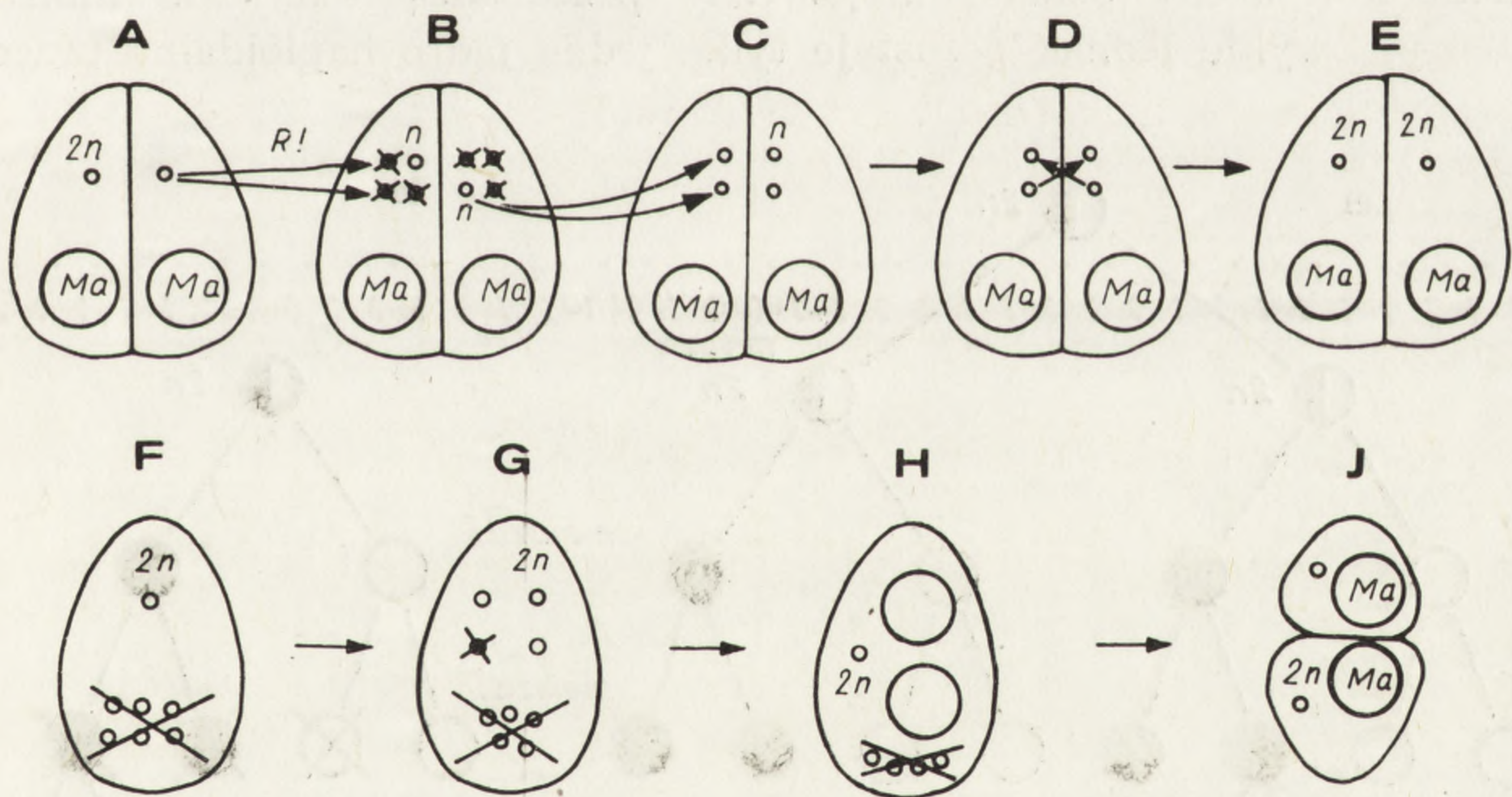
Zwykle przyjęło się uważać mikronukleusy za jądra diploidalne. Jednak Chen [17] i Dupy-Blanc [21] wykazali, że niektóre szczepy *Paramecium bursaria* mają mikronukleusy z niejednakową liczbą chromosomów, np. tri- lub pentaploidia powstała wskutek zaburzeń w trakcie koniugacji.

Podobne zjawisko wykazała również Dysart [22] u *Tetrahymena limacis*.

Po upływie pewnej liczby mitoz mikronukleusa od ostatniego procesu

płciowego, mikronukleus staje się zdolny do wchodzenia w mejozę. Badania genetyczne wykazały, że przynajmniej u *Paramecium*, *Tetrahymena* i *Euplotes* istnieje genetyczna kontrola zdolności do rozpoczynania procesu płciowego [76, 56, 48].

U wielu gatunków opisano cytologiczne etapy mejozy podczas koniugacji (przeгляд danych [70]). Szczególnie długotrwała profaza pierwszego podziału redukcyjnego charakteryzuje się występowaniem stadium „parasola” – „parachute”, podczas której tworzą się bivalenty, ale mogą również występować uniwalenty [71] lub chromatyna pozachromosomowa, która jest eliminowana z jądra, np. u *Chilodonella* [69] i może zamazywać obraz typowej płytki metafazowej w mejozie. Po kolejnym, drugim podziale mejotycznym powstają cztery haploidalne jądra, z których zachowuje się tylko jedno w okolicy przyzębowej pierwotniaka, a trzy ulegają zwykle rozpuszczeniu. Ta strefa jest szczególnie bogata w endoplazmatyczne retikulum, i w niej odbywa się wytworzenie mostu cytoplazmatycznego między dwoma partnerami w koniugacji.



Rys. 2. Przemiany aparatu jądrowego w trakcie koniugacji i w okresie pokoniugacyjnym.

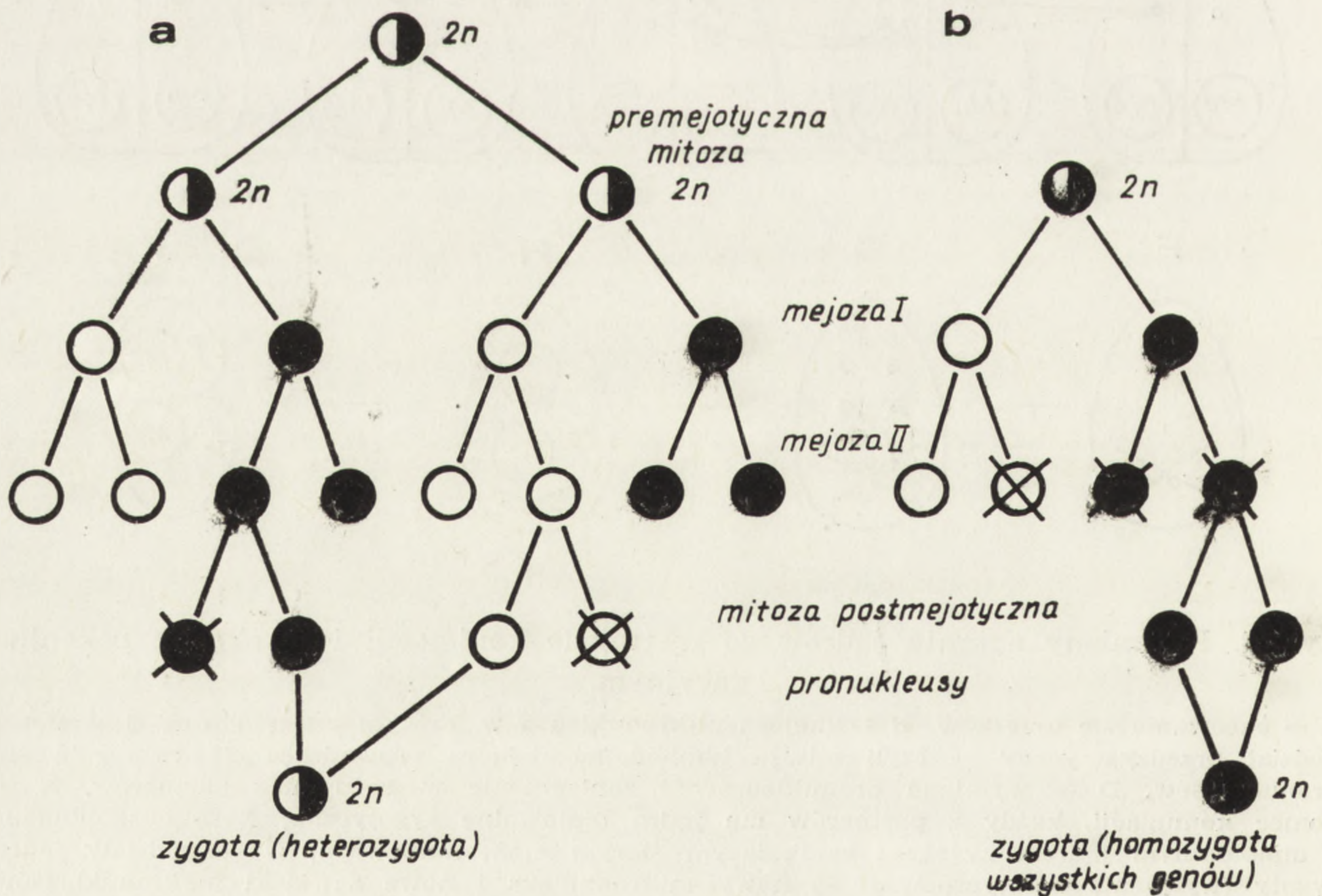
A — parowanie się orzęsków, B — mejoza mikronukleusa w każdym z partnerów, C — trzeci podział przedzygotyczny — czyli mitoza haploidalnego jądra prowadząca do tworzenia się pronukleusów, D — wymiana pronukleusów i zapłodnienie w każdym z partnerów, E — koniec koniugacji, każdy z partnerów ma jądro diploidalne zygotyczne, F — ekskoniugant z diploidalnym jądrem zygoty i zanikającym starym makronukleusem, G — podziały jądra zygoty (wyłącznie mitotyczne), H — nowy mikronukleus i nowe zawiązki makronukleusów występują resztki starego makronukleusa, I — w trakcie pierwszego podziału ekskoniuganta następuje rozdział zawiązków makronukleusa do osobników potomnych. Powstają dwa osobniki wegetatywne

Po połączeniu się dwóch osobników zwanych odtąd koniugantami, w obu osobnikach zachodzą wspomniane procesy mejozy. W okolicy mostu cytoplazmatycznego każdego z dwu osobników, zostaje zachowane po jednym jądrze haploidalnym (rys. 2B). U większości gatunków zachodzi jeszcze trzeci mitotyczny podział tego jądra, w wyniku którego z koniugantów powstają dwa jądra gametyczne, zwane pronukleusami (rys. 2c).

Jeden z tych pronukleusów, zwany stacjonarnym, pozostaje w tym samym miejscu, a drugi, zwany migracyjnym, przesuwa się do cytoplazmy partnera przez most cytoplazmatyczny. Most ten funkcjonuje dwukierunkowo i jednocześnie odbywa się wymiana pronukleusów migracyjnych między partnerami. Pronukleus stacjonarny danego osobnika ulega kariogamii (złaniu się) z pronukleusem migracyjnym partnera.

W wyniku koniugacji, obydwaj partnerzy mają więc jądro zygotyczne powstałe ze złania się własnego jądra gametycznego z cudzym (rys. 2).

Od tego normalnego typu koniugacji występują u *Ciliata* różnego typu odstępstwa, które mają miejsce zarówno przed kariogamią, jak i po kariogamii. Wiele orzęsków na przykład, ma więcej niż jeden mikronukleus i wtedy podział mejotyczny przechodzą wszystkie mikronukleusy. Zwykle jednak pozostaje tylko jedno jądro haploidalne przecho-



Rys. 3. Autogamia dwóch jąder gametycznych zlewających się w jednym osobniku.
a) autogamia u *Euplotes*, b) autogamia u *Paramecium*

dzące mitozę postmejotyczną, w wyniku której powstają dwa pronukleusy. Po kariogamii powstaje jądro zygotyczne, które podlega dwukrotnemu podziałowi mitotycznemu i odtwarza się stan sprzed koniugacji. W rodzajach *Tracheloraphis* i *Trachelocerca* nawet wiele mikronukleusów dzielących się mejotycznie może także przejść przez mitozę postmejotyczną. W efekcie powstaje pewna liczba jąder, które różnicują się w pronukleusy stacjonarne lub migracyjne. Wobec tego w każdym koniugancie powstaje kilka synkarionów.

W innych przypadkach spotyka się, że mikronukleus przechodzi mitozę premejotyczną i w rezultacie podział mejotyczny przechodzą dwa jądra. W tych przypadkach mitoza postmejotyczna obejmuje tylko dwa jądra haploidalne z ośmiu. W efekcie powstają cztery jądra, z których tylko dwa rozwijają się w pronukleusy. Jest to zjawisko nie bez znaczenia, ponieważ pronukleusy te mogą się wtedy różnić genetycznie, jeżeli pochodzą z niesiostrzanych jąder (rys. 3a).

Oprócz koniugacji, u wielu orześków opisano jeszcze inny proces płciowy, zwany autogamią. W trakcie autogamii tylko jeden osobnik bez partnera podlega mejozie, a następnie jeden z produktów dwóch podziałów redukcyjnych dzieli się jeszcze raz wytwarzając pronukleusy. Dotąd więc proces jest identyczny z koniugacją (rys. 2 i 3b.) Jednakże u autogamontów następuje samozapłodnienie przez zlanie się powstałych dwóch pronukleusów. Powstałe jądro zygotyczne jest homozygotą pod względem wszystkich genów, jeżeli tylko jedno z jąder haploidalnych przechodzi przez tzw. mitozę postmejotyczną prowadzącą do tworzenia pronukleusów (rys. 3b), jak to ma miejsce u *Paramecium aurelia*. Fakt ten jest szeroko wykorzystywany w celu otrzymywania czystych genetycznie linii.

Pewne pierwotniaki, jak *Paramecium aurelia* i *Euplotes minuta* [75, 74], zdolne są zarówno do autogamii jak i koniugacji, inne jak *Paramecium bursaria* lub *Tetrahymena pyriformis* normalnie podlegają wyłącznie koniugacji. Wykazano również, że zdolność do przechodzenia cyklicznej autogamii jest pod kontrolą genetyczną [33], a do ujawnienia tego genu może dochodzić w pewnym okresie życia klonu, różnie u różnych gatunków: bądź to po dojrzałości do koniugacji, np. u *Paramecium aurelia* syngen 4 [76] bądź też wcześniej, jak u niektórych gatunków *Euplotes* [48].

3. RÓZNICOWANIE SIĘ APARATU JĄDROWEGO PO PROCESIE PŁCIOWYM. SORTOWANIE SIĘ MAKRONUKLEUSÓW

Losy synkarionu, tzn. jądra zygotycznego powstałego w wyniku zlania się jąder gametycznych, są bardzo różne w zależności od rozpatrywanego gatunku.

Ogólnie możemy powiedzieć, że w osobniku, który ma jeszcze funkcjonujący sprzed koniugacji makronukleus o starym genotypie, znajduje się po procesie płciowym jądro zygoty o nowym genotypie. W trakcie dalszych przemian odbywa się różnicowanie nowego aparatu jądrowego (a więc nowych mikronukleusów i makronukleusów).

Synteza RNA we fragmentach starego makronukleusa odbywa się jeszcze przez kilka generacji po procesie płciowym *Paramecium aurelia* syngen 4 [9, 10], i *Chilodonella cucullulus* [69]. Doświadczalnie można powstrzymać degenerację starego makronukleusa [76, 70] u *Paramecium aurelia* (rys. 7). Wszystkie te procesy odbywają się na terenie wspólnej cytoplazmy i stary makronukleus, przez swoją aktywność metaboliczną, może oddziaływać na różnicowanie się i późniejsze funkcje powstającego aparatu jądrowego. Oprócz tego mogą zachodzić wzajemne oddziaływania różnicujących się jąder. W sumie zaobserwowano pewne zjawiska epigenetyczne determinujące ujawnianie się niektórych cech reprezentowanych przez dany genotyp, związane z alternatywną represją pewnych genów (rozdział pt. Determinacje cechy mt typu płciowego).

Różnicowaniu się nowego makronukleusa towarzyszy nieodwracalna strata zdolności do wchodzenia w mejozę. U większości gatunków orzęsków w trakcie tworzenia się makronukleusa odbywa się bardzo intensywna synteza DNA i ilość chromatyny bardzo wzrasta. Jeżeli w danym gatunku istnieje zdolność do podziału makronukleusa, to nie jest to mitozą. Nie występuje bowiem wrzeciono mitotyczne i materiał chromatynowy jest, jak się wydaje, rozdzielany przypadkowo do potomnych jąder.

Hipoteza 1. Najprostszym modelem podziału makronukleusa orzęska, byłoby przyjęcie swobodnego i przypadkowego rozdziału chromosomów lub ich części. Hipoteza ta wydaje się zgodna, albo przynajmniej niesprzeczna z obecnymi danymi cytologicznymi. Przyjęcie swobodnego, przypadkowego rozdziału chromosomów do dwóch jąder potomnych, będzie miało bardzo określone konsekwencje genetyczne, jeżeli makronukleus jest początkowo heterozygotą typu Aa względem danego genu A. Otóż przypadkowy rozdział oznacza najczęściej niezupełnie równy ilościowo rozdział jednostek chromatyny niosących allel A i jednostek niosących allel a. Te drobne odchylenia od stanu wyjściowego, który można określić jako $N \times A + N \times a$ początkowo nie będą miały istotnego wpływu na ekspresję genu A, ponieważ każdy z alleli jest reprezentowany w makronukleusie przez dużą liczbę kopii. Z czasem jednak, drobne odchylenia od pierwotnego równego stosunku liczby dwóch alleli będą się kumulować i przynajmniej, w niektórych liniach, doprowadzą one do powstania jąder, które zawierają wyłącznie kopie allelu A i wyłącznie kopie allelu a, a więc powstanie linia wyrażająca cechę recesywną!

Swobodny rozdział chromatyny w podziale makronukleusa prowadziłyby jednak nie tylko do rozdziału kopii danego allelu. Przyjmując ten model należy oczekiwać również powstania jąder, w których będzie ubytek w genomie (może się zdarzyć), że nie będzie kopii ani allelu dominującego, ani recesywnego. Inaczej mówiąc, oczekiwana jest aneuploidia makronukleusa. Jeżeli liczba kopii jest bardzo duża np. u *Stylonychia*, to pojawienia się aneuploidii należy oczekiwać po wielu generacjach. Jednakże u *Paramecium* i u *Tetrahymena* liczba kopii jest bardzo ograniczona, a mimo to nie obserwuje się aneuploidii. A więc istnieje jakiś mechanizm zabezpieczający przed aneuploidią!

Z przedstawionego punktu widzenia, większość danych z genetyki makronuklesów można traktować jako potwierdzenie lub zaprzeczenie modelu losowego sortowania się chromosomów, lub ich fragmentów. Jeżeli genetyczne sortowanie się alleli w makronukleusie nie zachodzi, albo jeśli zachodzi niecałkowicie swobodnie i na przykład dla pewnych genów rozpoczyna się z wyraźnym opóźnieniem względem poprzedniej koniugacji, to wówczas należałoby odrzucić hipotezę 1 o całkowicie losowym rozdziale chromosomów w trakcie podziału makronukleusa. Tymczasem nie u wszystkich badanych gatunków i nie we wszystkich przypadkach stwierdzono sortowanie się, czego przyczyną są prawdopodobnie różnice w charakterze makronukleusów różnych gatunków. Nie pozostaje więc nic innego, jak przytoczyć współczesne wiadomości i poglądy dotyczące natury i mechanizmów różnicowania makronukleusów trzech typów: *Tetrahymena pyriformis*, *Paramecium aurelia* i *Stylonychia mytilus* wraz z porównywalnymi wynikami dla *Euplotes crassus* i *Chilodonna cucullulus*.

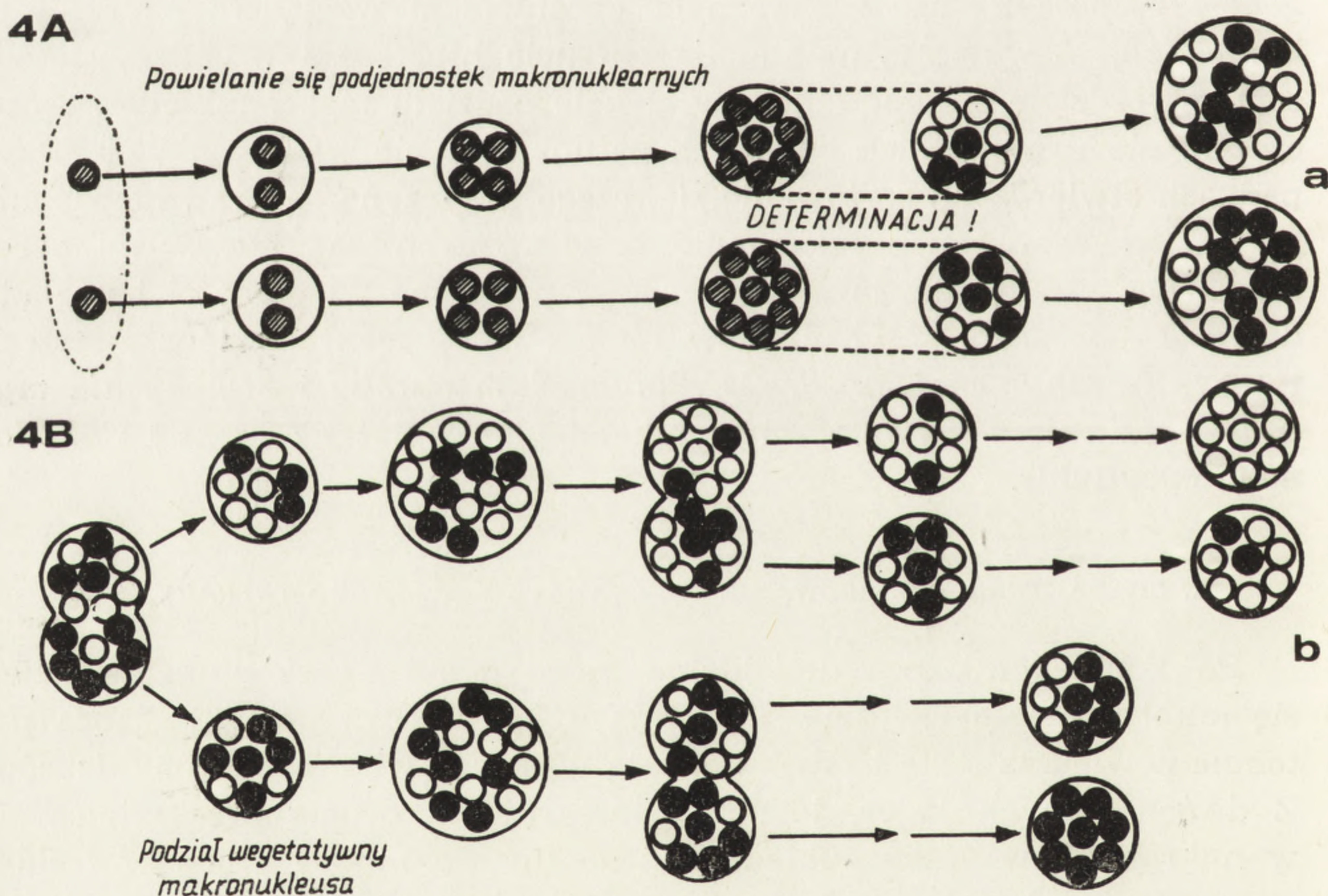
A. CHARAKTER I RÓZNICOWANIE SIĘ APARATU JĄDROWEGO TETRAHYMENA

Po koniugacji nowe diploidalne jądro zygoty ekskoniuganta dzieli się mitotycznie dwukrotnie. Powstają 4 jądra. Dwa przednie jądra potomne powiększają się i przekształcają w dwa zawiązki makronukleusów. Z dwóch tylnych jąder, jedno dezintegruje, a drugie przekształca się w mikronukleus. Mikronukleus jest zdolny do mitozy i już w trakcie pierwszego podziału wegetatywnego ekskoniuganta do każdego osobnika potomnego dostaje się jeden mikronukleus i jeden zawiązek makronuklearny. Tak więc w trakcie pierwszego podziału ekskoniuganta makronukleusy nie dzielą się, ale ich zawiązki zostają rozdzielone między siostrzane komórki potomne. Klony powstałe w wyniku podziałów wegetatywnych jednej komórki, z jednym zawiązkiem makronuklearnym, noszą nazwę karionid (rys. 2I). U *Tetrahymena* w heterozygotycznych klonach zaobserwowano, że w trakcie wegetatywnych podziałów tworzą się osob-

niki ujawniające cechy recesywne. Pojawienie się w klonie osobników wykazujących wyłącznie cechę recesywną można tłumaczyć

1) albo sortowaniem alleli danego genu i wtedy osobnik wykazujący cechę recesywną byłby całkowicie homozygotyczny względem danego allelu makronukleus (hipoteza 1),

2) hipoteza 2; albo nie istnieje swobodne sortowanie się alleli, a pierwotny diploidalny genom tworzy jedną jednostkę strukturalną (podjądro) [75, 61]. Podjądro niosące obydwa allele danego genu ulegałoby poliploidyzacji. W pewnym okresie rozwoju (określonym przez Nanneya jako determinacja), w każdym podjądrze niezależnie i przypadkowo zachodziłoby trwałe i nieodwracalne zablokowanie (rys. 4A) jednego z alleli. Byłaby to represja interalleliczna niezależna w każdym podjądrze. Odtąd drogą przypadkowej segregacji podjader w kolejnych podziałach, dochodziłoby do powstania osobników o makronukleusach niosących wyłącznie jeden



Rys. 4. Różnicowanie się podjader w makronukleusie i ich segregacja w trakcie podziałów somatycznych (wg Nanneya [55] zmodyfikowana)

A — tworzenie się zawiązków nowych makronukleusów po procesie płciowym; wzrost zawiązka związany jest z powielaniem się całych genomów podjader, następnie zachodzi determinacja podjader związana z losową represją jednego z dwóch alleli heterozygoty względem danego genu. Losowa represja symbolizowana jest czarnym lub białym kolorem. B — przypadkowe sortowanie się podjader, jakie zachodzi od momentu ich determinacji (należy zauważyć, że schemat 4B byłby identyczny w przypadku swobodnego sortowania zarówno podjader, jak i pojedynczych chromosomów, a nawet ich fragmentów, które zawierałyby dwa różne allele tego samego genu)

rodzaj aktywnego allelu (rys. 4B.), a więc wg pierwszej z omawianych hipotez — hipotezy swobodnego sortowania chromatyny, makronukleus stawałby się homozygotą danego genu (przy czym mikronukleus oczywiście nadal pozostawałby zawsze heterozygotą), a wg hipotezy drugiej „podjader”-„subnuklei”-makronukleus fizycznie zachowuje heterozygotyczny charakter.

Nanney, Dubert [58] obliczyli, że częstotliwość pojawienia się fenotypowo czystych linii w klonie *Tetrahymena* wynosi około 0,013 w każdym podziale.

Schensted [72] opracowała matematyczny model genetycznego sortowania czynnych alleli u *Tetrahymena* i wykazała, że stosunek 0,013 linii czystych na jeden podział odpowiadałby sortowaniu się 45 kopii danego genu.

Wbrew jednak temu modelowi swobodnego sortowania się podjednostek, przedstawionemu już (i słusznemu w przypadku determinacji cechy mt u *Tetrahymena*, o czym będzie dalej mowa), allele niektórych innych genów nie rozpoczynają sortowania się tuż po koniugacji. Sortowanie alleli czynnych rozpoczyna z opóźnieniem, mimo że tempo tego procesu się nie zmienia. A więc tempo sortowania alleli czynnych u *Tetrahymena* jest zgodne z modelem Schensted z tym, że samo sortowanie może zacząć się z opóźnieniem 30, 50 a nawet 80 podziałów po koniugacji. Na przykład dla izozymu esterazy E-1 pojawienie się czystych fenotypowo osobników występuje po 80 podziałach od chwili koniugacji [1]. Istnieje także jeden wrażliwy termicznie mutant, który w ogóle nie podlega sortowaniu McCoy [49]. Tak więc prosty model niezależnego sortowania się poszczególnych chromosomów, ich fragmentów czy nawet haploidalnych zespołów chromosomów nie tłumaczy wszystkich zjawisk (tak jak przedstawiono w hipotezie nr 1). Hipoteza nr 2 determinacji i losowej segregacji podjader jest do przyjęcia z punktu widzenia genetycznego (rys. 4A i 4B). Jeżeli zablokowanie (determinacja! rys. 4A) jednego allelu następowałoby tuż po koniugacji i losowo w każdym podjadrze, to sortowanie się przebiegałoby zgodnie z modelem Schensted. Opóźniona determinacja jednego z alleli w poszczególnych podjadrach powodowałaby opóźnienie w sortowaniu czystych fenotypowo osobników. Brak represji jednego z alleli powodowałaby brak sortowania się. Jest to hipoteza bardzo sugestywna i atrakcyjna. Jednakże nie jest zgodna z badaniami cytofotometrycznymi [2, 84]. Otóż wykazano, że w makronukleusie *Tetrahymena* istnieje ploidalność tylko 45 n, podczas gdy model sortowania Nanney i Dubert [58] i Schensted [72] wymaga ploidalności 45 diploidalnych genomów. Czyli genomu dwukrotnie większego = 90 n. Rozważano (Nanney wg [2]), że może podjadra w makronukleusie są diploidalne, ale ilość DNA w po-

szczególnym podjądrze jest dwukrotnie mniejsza niż w genomie występującym w mikronukleusie. Na przykład, że podjądra Ma nie zawierają pewnych powtarzalnych sekwencji DNA, zawartych w mikronukleusie. Allen i Gibson [2] w badaniach nad DNA mikronukleusów i makronukleusów *Tetrahymena* odrzucają tę możliwość. Badanie DNA *Tetrahymena* wykazało, że długość poszczególnych izolowanych molekuł jest zbliżony do długości molekuly DNA ssaków (Murti, nie opublikowane). Mimo to nie udało się w makronukleusie *Tetrahymena* zidentyfikować poszczególnych chromosomów. Na elektronogramach obserwuje się jedynie drobne ziarenka, które można wytrawić DNA-azą. Te ziarenka podlegają rozdziałowi w trakcie podziałów wegetatywnych makronukleusa, a ich natura ciągle pozostaje nie znana.

B. RÓŻNICOWANIE SIĘ APARATU JĄDROWEGO *PARAMECIUM AURELIA* PO PROCESIE PŁCIOWYM

Jądro zygoty osobnika po procesie płciowym podlega dwu- lub trzykrotnym podziałom. Podobnie jak u *Tetrahymena* już po 30–40 min. od chwili rozdzielenia się koniugantów można wyróżnić zwykle spęczniałe dwa zawiązki nowych makronukleusów. Pierwszy podział orzęska wiąże się z mitozą jednego lub dwóch mikronukleusów i z rozdziałem zawiązków makronuklearnych do osobników potomnych. Występują więc karionidy.

W makronukleusach osobników potomnych nie obserwuje się struktur o charakterze chromosomów. Chromatyna jest rozproszona i barwi się jednolicie w trakcie reakcji Feulgena. Podczas dwóch kolejnych generacji ilość DNA zwiększa się około 10-krotnie [9]. Jednocześnie nie stwierdza się ani eliminacji chromatyny, ani jej degradacji. Synteza DNA występuje zresztą i w starym makronukleusie, który rozpada się na liczne (około 30) fragmenty, w których synteza DNA od początku jest słaba i szybko ustaje wraz z rozwojem nowych zawiązków makronuklearnych. Fragmenty makronuklearne będą jednak jeszcze przez kilka podziałów głównymi producentami RNA, chociaż pierwsza synteza RNA w nowych zawiązkach makronuklearnych obserwowana jest już po pół godzinie od początku różnicowania się jąder. Przed pierwszym podziałem makronukleusa w jego wnętrzu, tworzy się jedno duże skupienie RNA. Dopiero po pierwszym podziale nowego makronukleusa masa ta ulega rozdrobnieniu na liczne jąderka, w których wg Juranda i innych [38] DNA występuje w partii wewnętrznej, a RNA — w zewnętrznej. Chromatyna występuje natomiast w postaci dość drobnych ziaren. Te dwa składniki strukturalne są, jak się wydaje, przypadkowo rozdzielane w trakcie podziału makronukleusa.

Genetyczne badania Sonneborna [75, 76] nie wykazały zjawiska so-

matycznego sortowania się czystych fenotypowo homozygotycznych makronukleusów z heterozygotycznych ekskonjugantów. Liczba kopii danego allelu w makronukleusie jest niewielka, a jednak w podziałach wegetatywnych nie obserwuje się aneuploidii. A więc hipoteza 1 — swobodnego i przypadkowego rozdziału chromatyny jest nie do przyjęcia. Sonneborn zaproponował hipotezę diploidalnych podjąder (hipoteza 2) rozdzielanych w trakcie podziału Ma, z których każde byłoby pewną całością funkcjonalną. Hipoteza ta została następnie rozwinięta i dostosowana do przypadku *Tetrahymena* przez Nanneya. Różnica między charakterem podjąder *Paramecium* i *Tetrahymena* polegałaby na tym, że w podjądrach *Paramecium* nie byłoby represji interallelicznej (p. wyżej).

Współcześnie Nyberg [62] potwierdził jeszcze raz brak genetycznego sortowania się makronukleusów u *Paramecium*. Przeprowadził on na jednym szczepie *Paramecium aurelia* trzymiesięczne studia nie dopuszczając przez cały ten czas do autogamii drogą intensywnego karmienia. W doświadczeniu tym prześledził fenotypowe cechy klonów, które były heterozygotami trzech genetycznie nie sprzężonych genów. Stwierdzenie, że nie ma sortowania makronukleusów względem tych trzech genów przemawia dobitnie za istnieniem podjąder w makronukleusie *Paramecium*.

Jednakże Jurand i inni [38] obliczyli liczbę ziarenek chromatynowych w tym samym szczepie *Paramecium aurelia* i stwierdzili, że ich liczba w makronukleusie jest większa w porównaniu do wyliczonego stopnia ploidyzacji makronukleusa mierzonego stosunkiem ilości chromatyny w makronukleusie do mikronukleusa. Tak więc na pewno pojedyncze ziarno chromatynowe w makronukleusie nie jest odpowiednikiem mikronukleusa. Czym jest więc strukturalnie podjądro?

C. RÓŻNICOWANIE SIĘ APARATU JĄDROWEGO STYLONNYCHIA

(i innych pierwotniaków tworzących chromosomy politeniczne po procesie płciowym (rys. 5))

Początkowo wszystkie jądra powstałe w wyniku podziału synkarionu są takie same. Ale po kilku godzinach jedno z jąder zaczyna pęcznieć i rozwijać się w zawiązek makronukleusa. W trakcie różnicowania się nowego makronukleusa *Stylonychia*, odbywa się wyodrębnianie około 300 chromosomów [7]. Po 15 godzinach rozpoczyna się despiralizacja tych chromosomów, a następnie ich politenizacja. W ten sposób powstają w zawiązku makronukleusa chromosomy olbrzymie, które zawierają około 30 razy więcej DNA niż ma to miejsce w mikronukleusie. Podobne zjawisko politenizacji opisano również dla innych orzęsków (*Euplotes*, *Nyctotherus*, *Chilodonella*), Jaremo i Alonso [34, 66] wykazali, że w chromosomach politenicznych *Stylonychia mytilus* występują również charak-

terystyczne prążki i regiony syntezy RNA odpowiadające puffom chromosomów politenicznych owadów. Chromosomy homologiczne nie koniugują, natomiast chromosomy politeniczne mogą się łączyć końcami, dając w krańcowym przypadku jeden olbrzymi politeniczny agregat u *Nyctotherus* [29]. W czasie następnych paru godzin chromosomy olbrzymie rozpadają się poprzecznie. Kloetzel [44], Gil i Alonso [28] wykazali w elektronogramach, że olbrzymie chromosomy rozpadają się na pojedyncze chromosomy przyjmując postać granul o średnicy około $1-2\mu$, otoczonych białkową otoczką bądź materiałem włóknistym. W tym czasie w makronukleusie obserwuje się eliminację około 90% [12] DNA.

Ammermann [4] stwierdził w makronukleusie występowanie stadium ubogiego w DNA. Poziom DNA może wtedy opaść nawet do poziomu diploidalnego obserwowanego w mikronukleusie (Mi) (rys. 5).

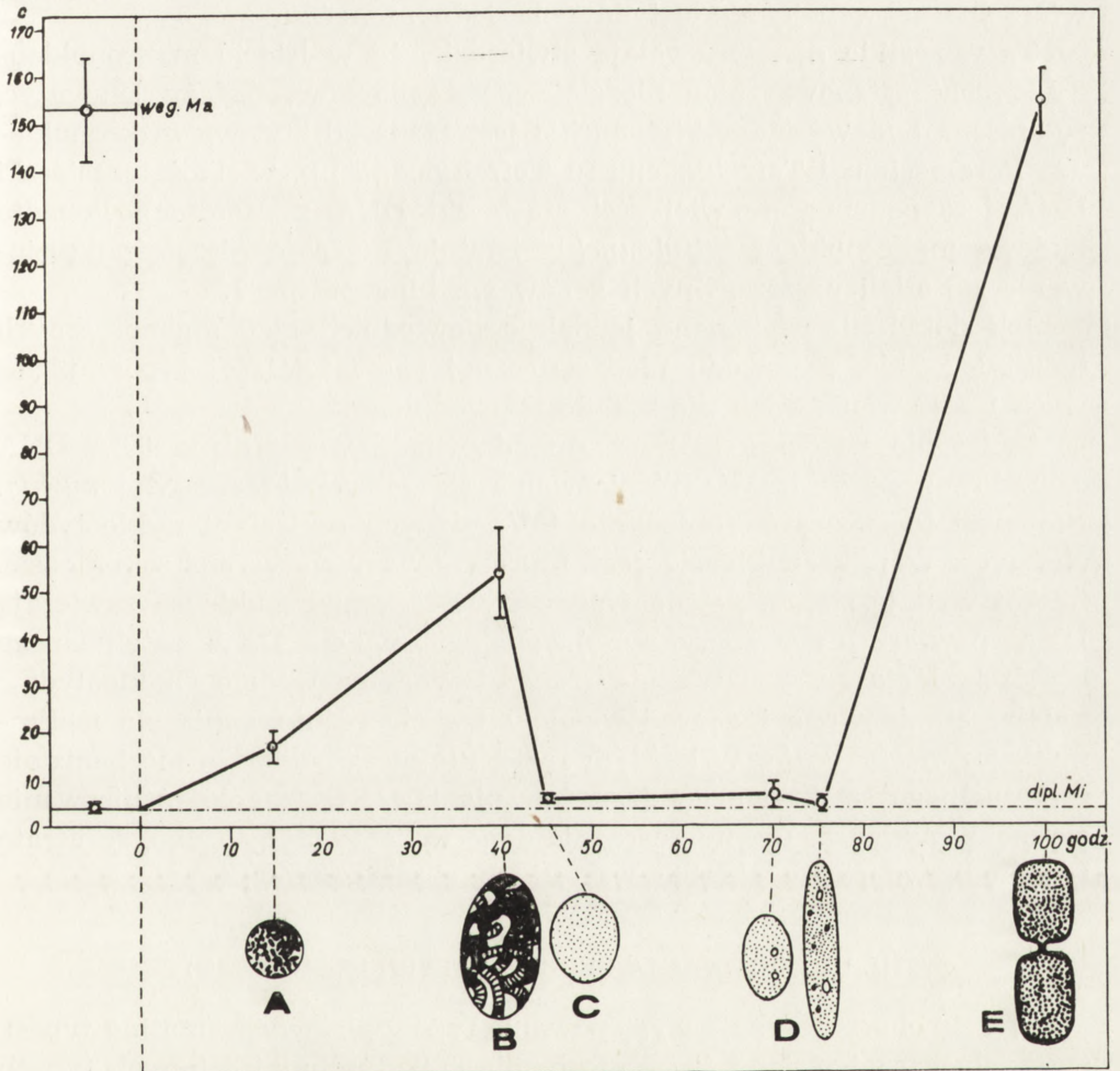
Podobną fragmentację chromosomów politenicznych, a także zgromadzenie około 50% DNA w wielką, wyrzucaną na zewnątrz jądra przy pierwszym podziale makronukleusa stwierdził Radzikowski [69] u *Chilodonella*, gdzie jednak poziom DNA w tym okresie nie spadał tak dalece, jak u *Stylonychia*.

Wracając do losów makronukleusa *Stylonychia*, po rozpadzie chromosomów na chromomery i eliminacji około 90% DNA, następuje wielokrotne przesuwanie się przez makronukleus pasm replikacyjnych, w których ma miejsce synteza DNA. Mniej więcej w 90 godzin po koniugacji zawartość DNA osiąga prawie 58 razy wyższy poziom niż w mikronukleusie. W około 100 godzinie odbywa się podział wegetatywny makronukleusa (rys. 5). Jeżeli chodzi o naturę makronukleusa wydaje się więc, że stanowi on skupienie wielu chromomerów przypadkowo rozdzielanych w trakcie podziału.

Ammermann [5] sugeruje, że byłoby ich około 150 000, a więc przy kolejnych podziałach nie dochodziłoby do statystycznej szansy pojawienia się makronukleusów aneuploidalnych wcześniej niż po upływie około kilkuset podziałów. Istotnie, badania nad starzeniem się klonów (*Euplotes* [26]) potwierdziły te przypuszczenia. Tak więc starzenie się klonów związane byłoby z ich narastającą aneuploidią w Ma, a odmłodzenie linii wiązałoby się z procesem płciowym i periodycznym odtworzeniem aparatu jądrowego [23].

Prescott i inni [64, 65] wyekstrahowali DNA z izolowanych mikronukleusów i makronukleusów *Stylonychia* w warunkach uniemożliwiających degradację i fragmentację molekuł DNA. Wykazali oni, że molekuly DNA z mikronukleusa są bardzo długie tak, że najkrótsze odcinki wynosiły co najmniej 15μ , tymczasem odcinki DNA wykryte w materiale pochodzącym z makronukleusa mierzyły zaledwie $0,4-2\mu$ długości. Stała sedimentacji tego materiału była bardzo niska i wahała się około 9-11S.

poziom DNA



Rys. 5. Różnicowanie się nowego zawiązka makronukleusa *Stylonychia* (Ammerman [5] 1971). Na osi odciętych oznaczono poziom zawartości DNA w jednostkach umownych. Na osi rzędnych czas w godzinach. Rysunki przedstawiają kolejne fazy rozwoju makronukleusa:

A — faza endomitotycznego powielenia chromosomów w zawiązku nowego makronukleusa, B — okres występowania chromosomów politenicznych, C — faza eliminacji około 90% DNA z zawiązka nowego makronukleusa, D — pojawienie się pierwszych jąder i początek drugiej fazy replikacji, E — pierwszy podział nowo powstałego makronukleusa

Taka długość nici DNA z taką stałą sedymentacji odpowiada mniej więcej odcinkom jednogennym wraz z regionem kontrolnym. Odcinki o długości około 2μ , mogłyby reprezentować więcej niż jeden gen, np. odcinek dla łącznej syntezy cząstki preribosomalnej. Te informacje zostały ostatnio uzupełnione [51] danymi wskazującymi, że każdy odcinek

DNA makronuklearnego ma jeden koniec wiążący RNA-polimerazę i powtarzalną sekwencję nukleotydów na jednym końcu.

Te wszystkie dane pozwalają stwierdzić, że w istocie makronukleus *Stylonychia* stanowi zbiór niezależnych replikonów. Należy zauważyć, że opisana budowa jądra *Stylonychia* jest różna od budowy makronukleusa *Paramecium* i *Tetrahymena* (u *Tetrahymeny* np. wielkość cząsteczki DNA jest podobna do wielkości cząsteczki DNA u *Metazoa*). Ponadto budowa makronukleusa *Stylonychia* istotnie sugeruje niezależne sortowanie się alleli poszczególnych genów wg hipotezy nr 1.

Jak dotąd nie wykonano jednak odpowiednich badań genetycznych na *Stylonychia*, z powodu niedostatecznej znajomości jej typów płciowych i sortowanie alleli nie zostało udowodnione.

Nadal nie wiadomo [65], czemu odpowiada wspomniane 90% DNA degradowanego w trakcie różnicowania się mikronukleusa *Stylonychia*. Nie musi to oznaczać, że jedynie 10% różnych sekwencji nukleotydów obecnych w mikronukleusie jest reprezentowanych w makronukleusie. Raczej wydaje się, że pewne fragmenty DNA mikronukleusa zawierają DNA powtarzalny (repetytywny), analogiczny do DNA satelitarnego komórek *Metazoa*. Te właśnie repetytywne sekwencje nukleotydów byłyby eliminowane i degradowane w trakcie różnicowania się makronukleusa, *Stylonychia*. W każdym razie, nic nie wiadomo o mechanizmie ewentualnego selektywnego degradowania DNA w trakcie różnicowania się makronukleusa. Pewne pośrednie dane wskazywałyby tylko, że utrata DNA odbywa się w obrębie wszystkich chromosomów.

III. DETERMINACJA CECHY mt (TYPU PŁCIOWEGO)

Orzęski charakteryzuje występowanie typów płciowych (mating types), zwanych inaczej płciami fizjologicznymi. Tylko osobniki o innych typach płciowych zdolne są do wzajemnej koniugacji. Wiadomo również, że aczkolwiek w klonie typ płciowy może być ujawniony dopiero po kilkunastu, albo nawet kilkudziesięciu generacjach po poprzednim procesie płciowym, jego determinacja odbywa się na ogół bardzo wcześnie. Badania nad typami płciowymi były prowadzone na paru gatunkach orzęsków, a uzyskane wyniki pozwoliły na prześledzenie pewnych zjawisk epigenetycznych odbywających się podczas różnicowania się makronukleusów.

Badania te rozpoczął przed blisko trzydziestu pięcioma laty Sonneborn [77, 75, 76] i kontynuowane były przez Beale'a [8], Nanneya i innych. Sonneborn [75] stwierdził u *Paramecium aurelia* występowanie szeregu syngenów, czyli podgatunków biologicznych, które nie mogą się między sobą krzyżować, mimo że morfologicznie wszystkie należą do jednego

gatunku *Paramecium aurelia*. Następnie istnienie syngenów (podgatunków biologicznych) zostało potwierdzone także i u innych orzęsków (*Paramecium bursaria*, *Tetrahymena*, *Euplotes*, *Stylonychia* etc.).

W obrębie poszczególnego syngenu danego gatunku występują dwa lub też więcej odrębnych typów płciowych. Jeżeli typów płciowych jest więcej niż dwa, to osobnik danego typu płciowego zdolny jest do szybkiej i efektywnej koniugacji, o ile jest tylko dojrzały płciowo, ze wszystkimi innymi typami płciowymi danego syngenu.

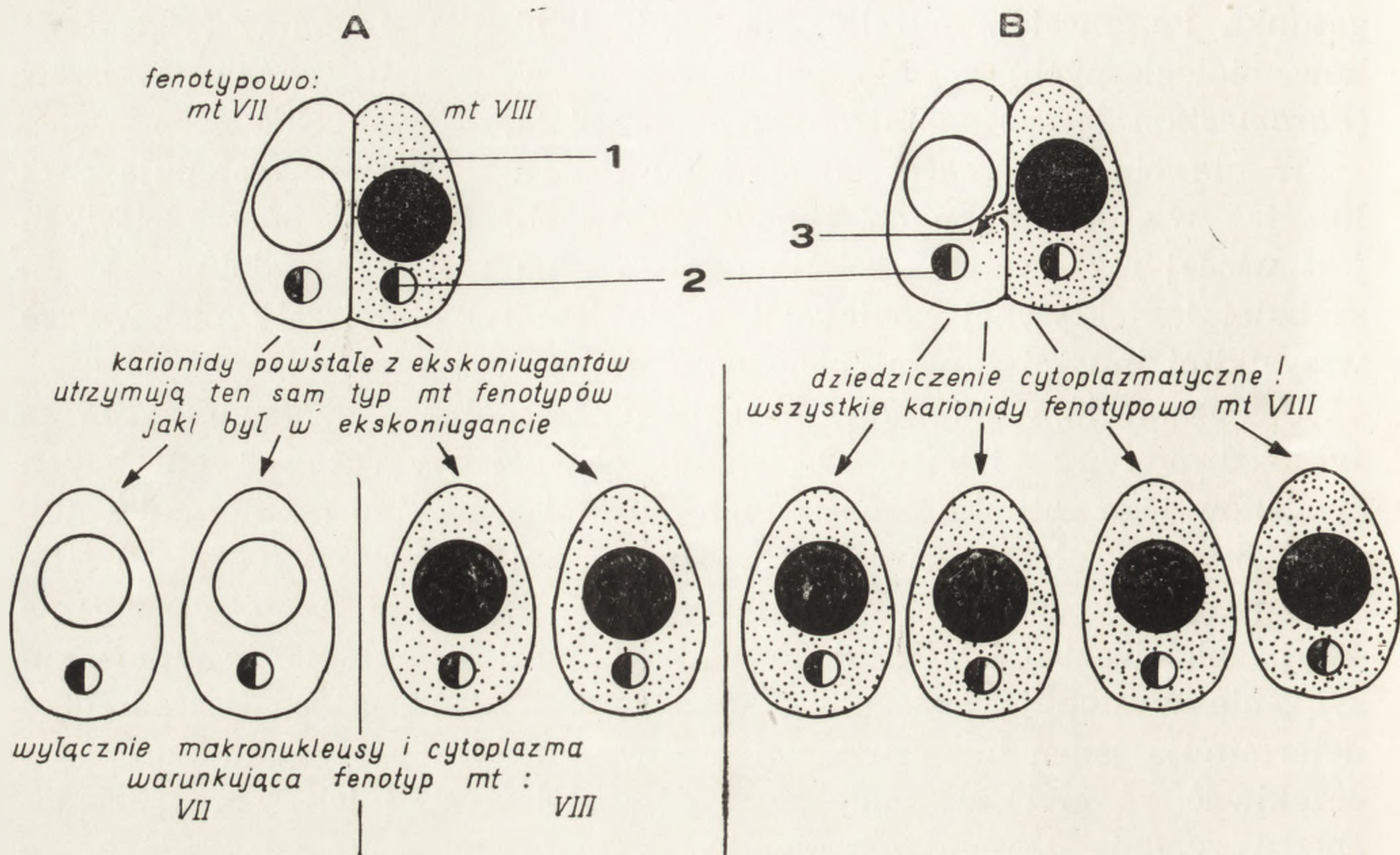
U *Paramecium aurelia* w obrębie poszczególnego syngenu znane są tylko dwa typy płciowe. Do chwili obecnej wykryto 13 odrębnych syngenów tego gatunku oznaczonych cyframi arabskimi (numerami 1–13), oraz 26 typów płciowych oznaczonych cyframi rzymskimi (I–XXVI) [15]. Tak więc w syngenie 1 występują typy płciowe I i II, a np. w syngenie 4 typy płciowe VII i VIII itd. Początkowo spodziewano się, że w każdym syngenie występują dwa allele tego samego genu, które bezpośrednio determinują jeden lub drugi typ płciowy. W tym przypadku można by oczekiwać, że przekazywanie się typów płciowych i ich segregacja zachodzi zgodnie z regułami Mendla. Tymczasem wykazano jednak, że tylko w jednym ze znanych syngenów *Paramecium aurelia*, a mianowicie w syngenie 13 [78], cecha mt jest warunkowana w ten sposób. W innych syngeniach natomiast co najmniej dwa niezależne geny w tym procesie uczestniczą. Używając nomenklatury Sonneborna wyróżniane są trzy typy dziedziczenia cechy mt.

A. DZIEDZICZENIE CYTOPLAZMATYCZNE TYPU PŁCIOWEGO (mt)

W syngeniach 2, 4, 6, 7, 8, 10, 12, a więc o numerach parzystych (z wyjątkiem nietypowego syngenu 7, o którym jeszcze będzie mowa), stwierdzano tzw. cytoplazmatyczne dziedziczenie typu płciowego (rys. 6A).

Dwa różne pod względem typu płciowego osobniki przechodzą koniugację. W wyniku koniugacji dwaj ekskoniuganci mają identyczne genetycznie jądra zygotyczne. Jednakże każdy z ekskoniugantów da klon, w którym zostanie utrzymany ten sam typ płciowy, jaki był w koniugancie. Co więcej, okazało się, że osobniki homozygotyczne, które przeszły autogamię będą dawały potomstwo wyłącznie tego samego typu, jakie miały przed autogamię.

Jak się więc wydaje, w mikronukleusie homozygotycznym po autogamii istnieją co najmniej dwa niezależne geny determinujące zarówno mt VII, jak i mt VIII. O ujawnieniu się jednego z tych genów, a wyłączeniu drugiego genu decyduje cytoplazma. Ścisłej mówiąc, decyduje o tym czynnik cytoplazmatyczny produkowany pod kontrolą starego makronukleusa.



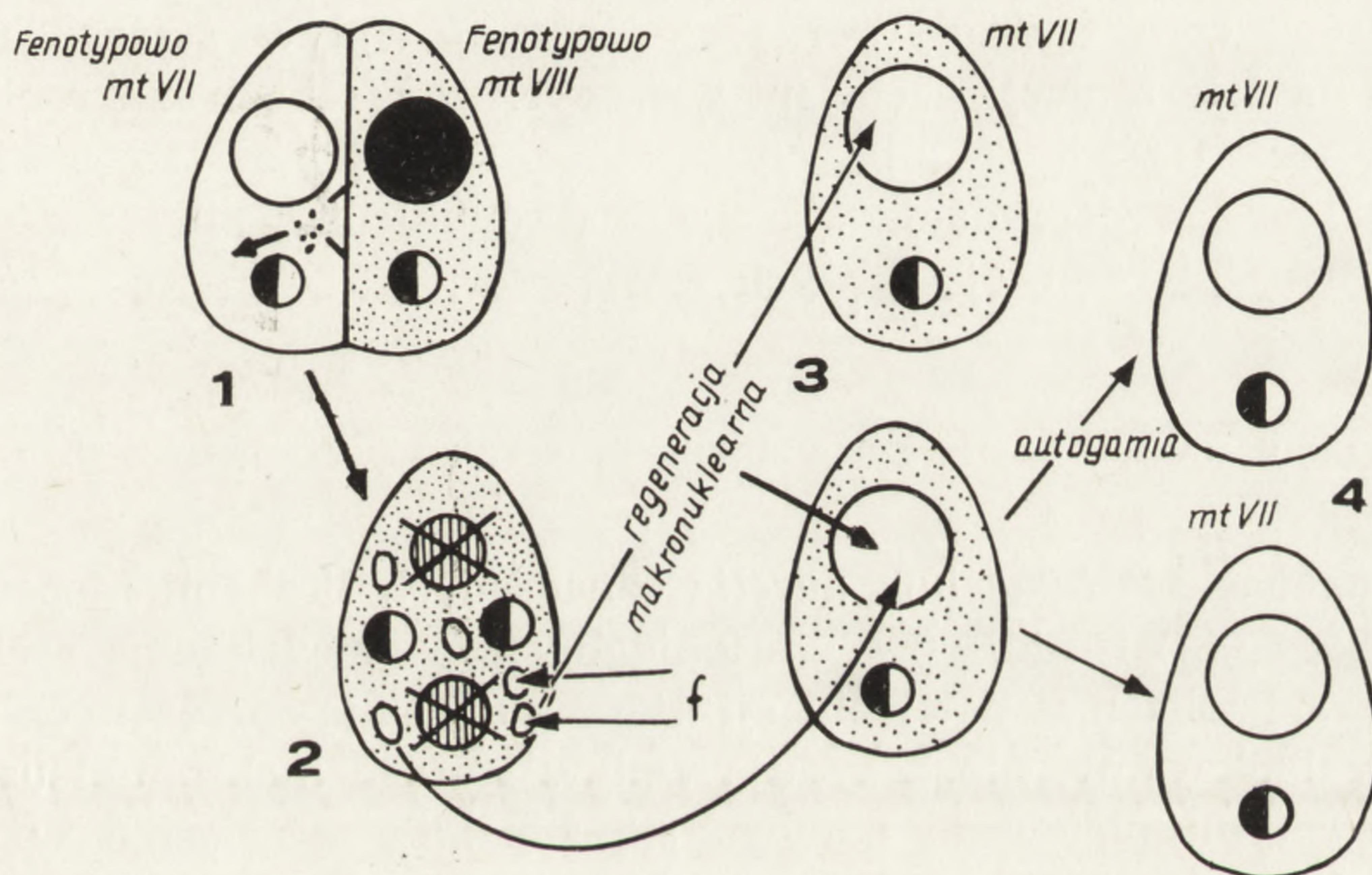
Rys. 6. Cytoplazmatyczne dziedziczenie typu płciowego *Paramecium aurelia* w syngenie 4 (dotyczy syngenów 2, 6, 8, 10, 12) (wg Sonneborna [77] zmodyfikowana). Biały kolor makronukleusa symbolizuje ekspresję VII typu płciowego determinowanego przez odpowiedni gen (lub grupę genów), który znajduje się w stanie aktywnym na terenie makronukleusa. Analogicznie kolor czarny symbolizuje przeciwny typ płciowy — to jest typ VIII, co jest również związane z aktywizacją odpowiedniego genu (lub grupy genów). Zachodzą przy tym dwie możliwości: a) wzajemne wykluczanie się obu dróg metabolicznych prowadzących do wytworzenia dwu substancji warunkujących albo jeden, albo drugi typ płciowy lub b) włączenie jednej drogi metabolicznej powoduje wyrażenie jednego z dwóch typów płciowych, a aktywizacja obu dróg metabolicznych powoduje wytworzenie substancji charakteryzującej typ przeciwny (efekt kumulacyjny). W każdym przypadku jednak na terenie mikronukleusa znajdują się oba niezależne geny (lub ich grupy), których aktywacja na terenie makronukleusa determinuje jeden z dwóch możliwych typów płciowych. Obecność tych genów symbolizują odpowiednio białe i czarne połówki mikronukleusa na rysunku.

A — normalna koniugacja mt VII \times mt VIII. 1 — cytoplazma osobnika mt VIII. 2 — w mikronukleusie występują co najmniej dwa niezależne geny (lub ich grupy) w stanie nieaktywnym. Potomstwo każdego z ekskoniugantów wyraża wyłącznie rodzicielski typ płciowy. Typ płciowy nie ulega też zmianie po autogamii. B — przedłużona koniugacja mt VII \times mt VIII, podczas której zachodzi mieszanie się cytoplazmy partnerów. 3 — przepływ cytoplazmy osobnika mt VIII do partnera. Czynniki cytoplazmatyczne (symbolizowany przez zakropkowanie cytoplazmy mt VIII) przechodząc do osobnika mt VII powoduje zmianę typu płciowego w całym potomstwie tego osobnika. Zmiana ta utrzymuje się także po autogamii.

Jeżeli koniugacja osobników np. reprezentujących mt VII i mt VIII zostaje przedłużona pod wpływem podwyższenia temperatury środowiska, to następuje wtedy dokładnie przemieszanie się cytoplazmy obu partnerów. Wówczas obydwa koniuganty po koniugacji tworzą klony wyłącz-

nie o typie mt VIII. A więc wpływ czynnika cytoplazmatycznego z koniuganta mt VIII dominuje nad wpływem czynnika cytoplazmatycznego partnera. Jest to jednocześnie doświadczenie potwierdzające cytoplazmatyczny charakter kontroli typu płciowego (rys. 6B).

W trakcie podgrzewania koniugantów występuje niekiedy również i inne zjawisko poza mieszaniem się cytoplazmy partnerów. Istnieje bowiem możliwość, że w koniugancie pod wpływem podwyższenia temperatury nie dojdzie do rozwoju i różnicowania się nowych makronukleusów, które się rozpadną, natomiast stary makronukleus nie ulegnie rozpadnięciu i degradacji, a zostanie zregenerowany (rys. 7). Jeżeli



Rys. 7. Wpływ regeneracji starego makronukleusa na determinację typu płciowego w syngenie 4 *Paramecium aurelia* (zmodyfikowany wg Beale'a [8]).

1 — przedłużona koniugacja mt VII \times mt VIII połączona z częściowym wymieszaniem się cytoplazmy obu partnerów (rys. 6B), a więc czynnik cytoplazmatyczny powodujący determinację typu płciowego mt VIII dostaje się do osobnika mt VII. 2 — zawiązki nowych makronukleusów degenerują w ekskoniugancie mt VII, podczas gdy fragmenty starego makronukleusa (f) (zwykle jeden fragment) regenerują. 3 — w potomstwie ekskoniuganta mt VII nie następuje zmiana typu płciowego, mimo obecności cytoplazmy mt VIII. Wynika więc, że fragmenty starego makronukleusa są niewrażliwe na czynnik cytoplazmatyczny mt VIII. 4 — po autogamii również nie następuje zmiana typu płciowego. Osobniki nadal będą typu mt VII. A więc czynnik cytoplazmatyczny z komórki mt VIII nie powiela się autonomicznie w cytoplazmie, uległ on rozproszению lub zanikł w trakcie podziałów wegetatywnych i już nie oddziałuje na nowe zawiązki makronuklearne powstające w trakcie autogamii

osobnik mt VII dostał w trakcie przedłużonej koniugacji dużą nawet porcję cytoplazmy z partnera mt VIII, ale przeszedł później regenerację starego makronukleusa, to cały klon będzie typu mt VII tzn. takiego, jak stary makronukleus. A więc jedynie nowe zawiązki makronukleusów są wrażliwe na działanie czynnika cytoplazmatycznego determinującego typ płciowy, a regenerujący stary makronukleus jest na ten czynnik

niewrażliwy. Wydaje się również, że czynnik cytoplazmatyczny nie jest trwały lub też ulega zbyt dużemu rozcieńczeniu w trakcie następnych podziałów wegetatywnych, bo porcja cytoplazmy mt VIII otrzymana w trakcie koniugacji u osobnika ze zregenerowanym makronukleusem mt VII nigdy już nie wpłynie na zmianę typu płciowego w trakcie autogamii (rys. 7). Innymi słowy, czynnik ten nie ma charakteru autonomicznie powielającego się plazmagenu, a więc jest czynnikiem wytwarzanym przez stary makronukleus podczas początków jego stopniowej degradacji.

Dziedziczenie cytoplazmatyczne i makronuklearna regeneracja są przykładem wzajemnego oddziaływania na siebie różnych jąder (starego i nowo tworzących się makronukleusów).

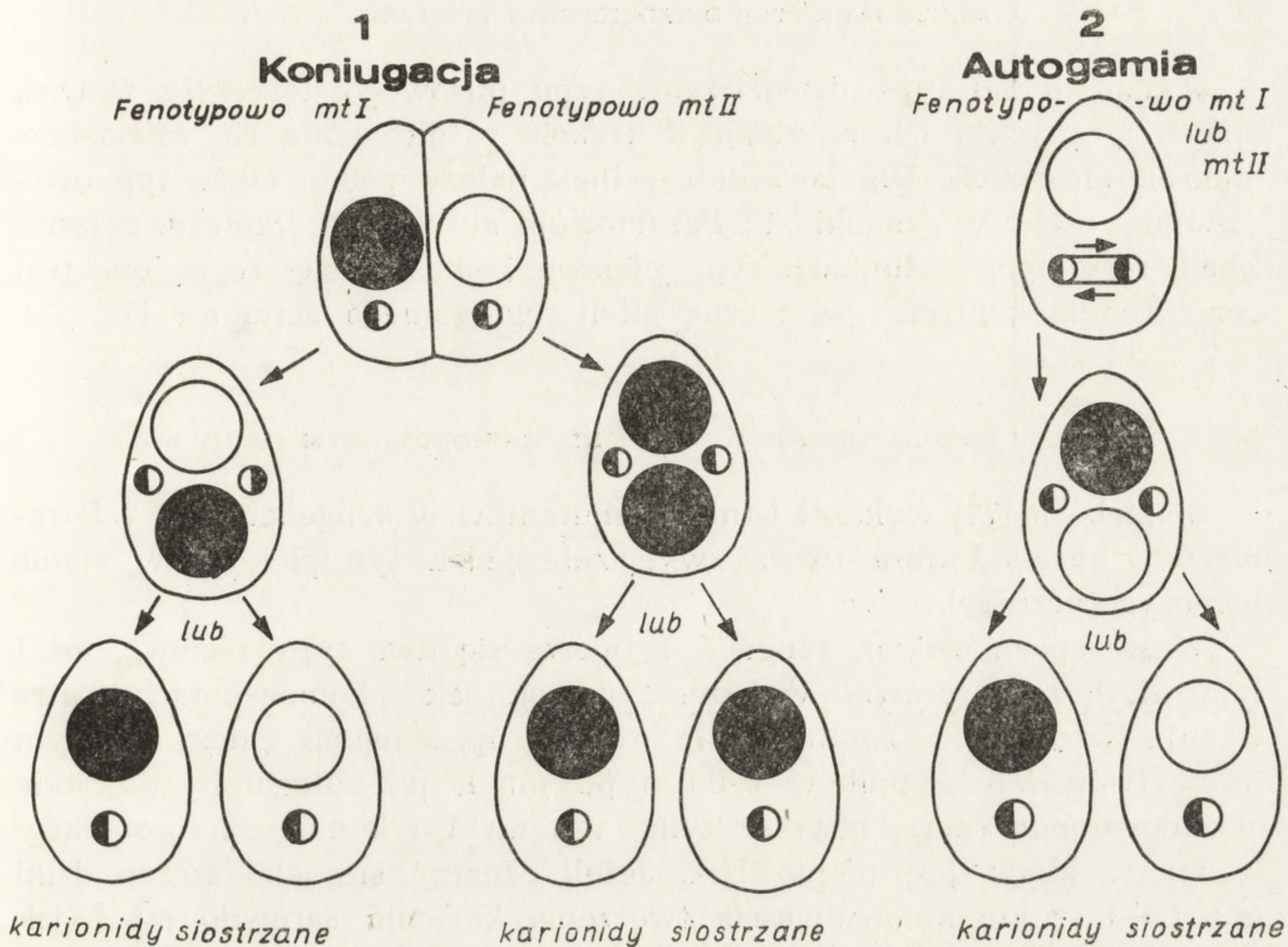
Wyrazem tych oddziaływań jest zarówno wpływ starego makronukleusa na determinację cechy mt w nowych zawiązkach makronuklearnych jak też i fakt, że albo odbywa się rozwój nowych zawiązków makronukleusa a degradacją starego makronukleusa, albo regeneracja makronukleusa i resorpcja nowych zawiązków.

B. KARIONIDALNY TYP DZIEDZICZNOŚCI TYPU PŁCIOWEGO

W syngenach *Paramecium aurelia* oznaczonych liczbami nieparzystymi (1, 3, 5, 9, 11) istnieje tzw. karionidalny typ dziedziczenia cechy mt. W tych przypadkach, o determinacji który z dwu nie sprzężonych genów zostanie zablokowany, nie decyduje wpływ starego makronukleusa. Determinacja typu płciowego odbywa się zupełnie niezależnie w dwóch zawiązkach makronuklearnych tworzących się w osobniku, który przeszedł koniugację lub autogamię. Te zawiązki makronuklearne o zupełnie losowo zdeterminowanych typach płciowych zostają rozdzielone do dwóch potomnych komórek w trakcie pierwszego wegetatywnego podziału (rys. 8).

Badanie klonów powstałych z komórek po pierwszym podziale wegetatywnym karionid wykazało, że determinacja i segregacja cechy mt jest wówczas absolutnie losowa, np. dla mt I lub mt II w syngenie 1. Tak więc w dwóch współwystępujących na terenie jednego osobnika zawiązkach makronuklearnych następuje niezależne i nieodwracalne, losowe zdeterminowanie cechy mt (rys. 8. 1).

W przypadku dziedziczenia karionidalnego również i klony po autogamii — a więc homozygotyczne względem wszystkich genów — zdolne są do losowego determinowania typów płciowych. Jest to równocześnie potwierdzenie hipotezy uczestnictwa co najmniej dwu genów niezależnych w procesie determinacji cechy mt (rys. 8. 2). Reasumując, zarówno karionidalne (rys. 8), jak i tzw. cytoplazmatyczne dziedziczenie cechy mt u *Paramecium aurelia* (rys. 6) zawierają jeden element wspólny. Zakłada



Rys. 8. Karionidalne różnicowanie się typu płciowego po koniugacji i autogamii u *Paramecium aurelia* w syngenach 1, 3, 5, 9, 11 (zmodyfikowane wg różnych autorów). Kolorem czarnym zaznaczono ekspresję typu mt I w makronukleusie a białym mt II. Mikronukleusy zawierają determinanty obu typów płciowych zaznaczonych odpowiednią czarną i białą połówką, jak w poprzednich rys.

1. Koniugacja mt I \times mt II. 1 — powstawanie karionid w trakcie pierwszego podziału eks-koniugantów. Zachodzi losowa determinacja typu płciowego w każdym zawiązku makronuklearnym. Dwie siostrzane karionidy mogą być różnego typu płciowego, obie typu I, lub obie typu II. Dwie spośród tych trzech możliwości są przedstawione na rys. 8-1. Autogamia klonu mt II. 2 — losowa determinacja typu płciowego w karionidach może prowadzić do losowego determinowania typu rodzicielskiego bądź typu przeciwnego, bądź też obu typów. W autogamii uzyskuje się osobniki homozygotyczne względem wszystkich genów. A więc karionidalne dziedziczenie typu płciowego dotyczy istotnie determinacji niezależnych genów (lub ich grup)

się, że w każdym przypadku w osobnikach homozygotycznych (po autogamii) synkarion zawiera dwa geny determinujące cechę mt. W trakcie tworzenia się zawiązków makronuklearnych z synkarionu następuje trwałe i nieodwracalne zablokowanie jednego z nich, i wobec tego zeterminowanie możliwości ujawnienia tylko drugiego z genów. Epigenetyczne różnicowanie się zawiązków makronuklearnych względem cechy mt polegałoby na wzajemnym wykluczaniu się represji jednego, a derepresji drugiego genu. Zjawisko to nosi nazwę wzajemnego wykluczania się, „mutual exclusion” [55].

C. MENDELowski TYp DZIEDZICZENIA TYPU PŁCIOWEGO

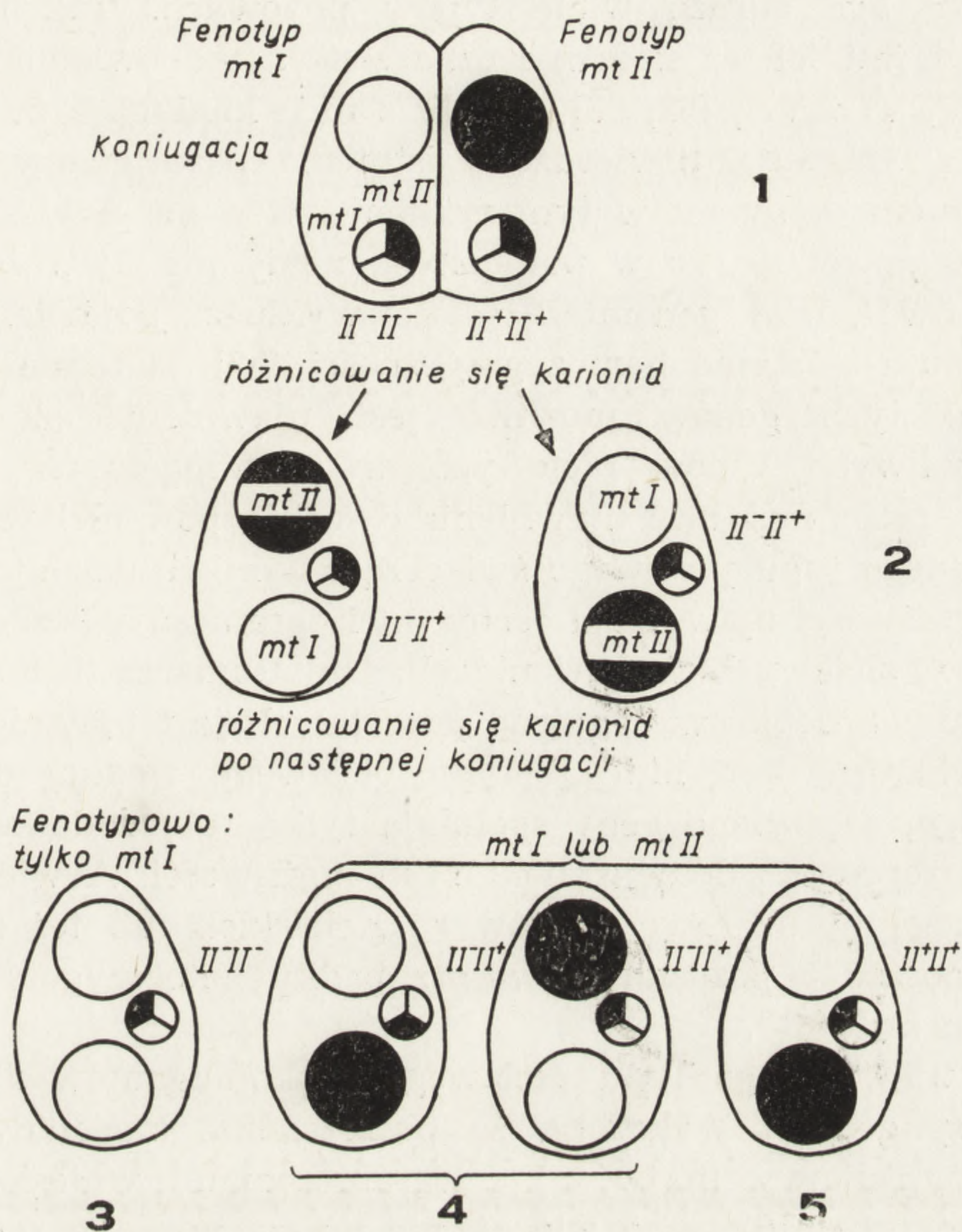
Podane dotąd typy dziedziczenia typu płciowego dotyczyły zjawisk epigenetycznych i ich regulacji w trakcie różnicowania się zawiązków makronuklearnych. Dla porządku jednak należy podać także typ dziedziczenia cechy w syngenie 13 *Paramecium aurelia* i u *Euplotes crassus*. Zbadano w tych gatunkach typy płciowe i okazało się, że są one pod bezpośrednią kontrolą genetyczną alleli tego samego genu mt [78, 33].

D. GENY REGULATOROWE W DZIEDZINIE KARIONIDALNYM CECHY mt

Sonneborn [77] wykazał istnienie mutantów w syngenach 1 i 7 *Paramecium aurelia*, które tworzą wyłącznie jeden typ płciowy w stanie homozygotyczności.

W szczepach dzikich syngenu 1 tworzą się dwa typy płciowe, mt I i mt II, losowo zarówno w heterozygotach, jak i homozygotach (patrz wyżej). Natomiast w zmutowanym szczepie np. syngenu 1 pozwalającym na wytworzenie osobników tylko typu mt I, po autogamii wszystkie eksautogamonty mają również tylko typ mt I i koniugacja osobników wewnątrz klonu jest niemożliwa. Jeżeli oznaczy się jako szczep dziki (mt II+) szczep z możliwością tworzenia karionid zarówno mt I jak i mt II, a przez (mt II-) mutantą niezdolnego do tworzenia typu płciowego mt II w karionidzie, to przy krzyżówce szczepów homozygotycznych o genotypach (II+II+) (II-II-) wszystkie ekskoniuganty w pokoleniu F₁ są heterozygotami. Wykazują one w karionidach determinację losową zarówno mt I i mt II, a więc cecha II+ jest cechą dominującą względem cechy mt II- (rys. 9. 1 i 2). Natomiast przy krzyżowaniu osobników z pokolenia F₁ tzn. (II+) (II-) (II+II-) stosunek osobników zdolnych do tworzenia w karionidach losowo mt I i mt II, do osobników zdolnych do tworzenia karionid tylko mt I (homozygoty recesywne) wynosi 3:1 (rys. 9:3 4 i 5). Wynik ten wskazuje na dominację allelu dzikiego, tzn. zdolności do tworzenia karionid obu typów. Przy krzyżówce wstecznej (II+II-) (II-II-), otrzymujemy wynik, w którym jest 1:1 osobników z mt I i mt II w stosunku do osobników tylko z mt I (rys. 9).

Na rysunku 9 przedstawiono, jak się wydaje, najprostszą interpretację genetyczną determinacji typów płciowych w syngenie 1 w obecności genu regulującego mt II-/II+I+. Zakłada się, że w każdym przypadku istnieją dwa niezależne geny obecne w synkarionie determinujące cechę mt I lub mt II. W obecności allelu dzikiego mt II+ wzajemne wykluczanie się (mutual exclusion) funkcjonowania jednego z tych genów jest zupełnie losowe.



Rys. 9. Mendlowskie dziedziczenie recesywnego kontrolującego allelu $mt-II^-$ w syngenie 1 *Paramecium aurelia* (zmodyfikowane wg Sonneborna [75]). Sektory białe i czarne mikronukleusa symbolizują obecność genów (lub grup genów) determinujących dwa typy płciowe mt I i mt II, trzeci sektor symbolizuje obecność alleli $mt-II^-$ i $mt-II^+$ zgodnie z oznaczeniami na schemacie.

1 — Koniugacja $mt II^- mt II^- \times mt II^+ mt II^+$. 2 — Losowe różnicowanie się karionid w pokoleniu F-1 wskazuje na dominujący charakter dzikiego allelu $mt II^+$ w heterozygotach $mt II^+ mt II^-$. Różnicowanie się karionid po następnej koniugacji $mt II^+ mt II^- \times mt II^+ mt II^-$ daje: 3 — ekskoniuganty typu $mt II^- mt II^-$, które stanowią jedną czwartą wszystkich linii wyłącznie reprezentujące typ mt I. 4 — Heterozygoty $mt II^+ mt II^-$, oraz 5 — homozygoty $mt II^+ mt II^+$. Szczepy te stanowią linie zdolne nadal do losowego różnicowania karionid obu typów płciowych. Heterozygoty (4) po autogamii segregują jednak połowę linii homozygot recesywnych tworzących jedynie mt I, podczas heterozygoty lub homozygoty $mt II^+ mt II^+$ nadal zdolne są do losowego karionidalnego determinowania obu typów

W homozygotach szczepu zmutowanego allel $mt II^-$ nie dozwala na losową determinację dwu genów zablokowując możliwość zdeterminowania typu mt II, a pozwalając jedynie na determinację mt I.

Podobny mechanizm dziedziczenia wykazano w syngenie 1 *Tetrahymena pyriformis*. U *Tetrahymena pyriformis* w poszczególnych syn-

genach może być bardzo wiele typów płciowych. Tak na przykład w syngenie 1 jest ich aż siedem i oznaczone są odpowiednio jako mt I, II, III, IV, V, VI i VII, [52, 56]. Każdy z nich koniuguje ze wszystkimi, z wyjątkiem własnego. Stwierdzono istnienie paru genów związanych z dziedziczeniem cechy mt w tym syngenie. Gen mt A w stanie homozygotycznym powoduje, że w potomstwie nigdy nie ujawniają się typy płciowe IV i VII. Inny gen mt B z kolei wyklucza pojawienie się mt I, o ile występuje w stanie homozygotyczności [57]. Natomiast w heterozygocie obu tych genów możliwe jest ujawnienie się wszystkich siedmiu możliwych typów płciowych w poszczególnych karionidach. Wykluczenie przez $mt^A mt^A$ ujawnienia dwóch typów płciowych, a przez $mt^B mt^B$ jednego typu płciowego świadczą o tym, że działają one represyjnie na możliwości ujawnienia cechy mt i ograniczają liczbę możliwych losowo typów płciowych w karionidach. Nie tłumaczą jednak, dlaczego ten, a nie inny typ płciowy spośród pozostałych jest ujawniony. A więc istnieje mechanizm determinacji typu płciowego według dziedziczenia karionidalnego, a poznane geny spełniają tylko rolę dodatkowego regulatora przez represję zaledwie niektórych możliwości. A więc siostrzane karionidy mogą być zarówno typów rodzicielskich lub też innego typu płciowego spośród 5 pozostałych w przypadku heterozygoty mt^A lub 6 w przypadku $mt^B mt^B$.

Badania ujawnionego typu płciowego ekskoniugantów *Tetrahymena pyriformis* syngenu 1 wykazały, że poszczególne karionidy mają typ zupełnie przypadkowy (najwyżej z ograniczeniami wniesionymi przez obecność mt^A lub mt^B), a co więcej, nie muszą w ogóle reprezentować rodzicielskich typów płciowych, a zupełnie dowolne spośród 7 możliwych [56, 57, 53, 54].

E. ZJAWISKA KONIUGACJI WEWNĄTRZKLONALNEJ (SELFING)

Jak już pisaliśmy, klony charakteryzują się stałym typem płciowym, który nie ulega już zmianie aż do następnego procesu płciowego, kiedy ta cecha mt ponownie różnicuje się. Znane są jednak przypadki odstępstwa od tej reguły i wtedy obserwuje się koniugację wewnątrzklonalną w jednej karionidzie. Dokładna analiza tych klonów karionidalnych wykazała, że partnerzy koniugacji należą do przeciwnych typów płciowych. A więc zachodzi różnicowanie komplementarnych typów w obrębie jednego klonu w trakcie podziałów wegetatywnych bez procesu płciowego.

Na przykład w syngenie 7 *Paramecium aurelia* osobniki należące do mt XIII mogą przechodzić w mt XIV: i ta zmiana jest wyłącznie jednokierunkowa. Taub [82] tłumaczy tę zmianę istnieniem substancji odpo-

wiadającej za mt XIII. Ta substancja z kolei byłaby prekursorem substancji determinującej powstanie mt XIV. W trakcie starzenia się klonu następowałoby wtedy przechodzenie osobników z mt XIII do mt XIV. Skoro makronukleusy *Paramecium* nie sortują się w trakcie podziału, takie różnicowanie się klonu byłoby wynikiem pewnej kolejności funkcjonowania dwóch genów determinujących cechę mt.

Zjawisko koniugacji intraklonalnej „selfing” obserwowano również w syngenie 1 *Tetrahymena pyriformis* w tych liniach, które szybciej niż inne wchodziły w okres dojrzałości płciowej [3, 11].

Okazało się jednak, że linie te z czasem sortują się tworząc podlinie o ustalonym nieodwracalnie typie płciowym. Typ płciowy *Tetrahymena* jest więc jeszcze jedną cechą, która podlega sortowaniu. Wydaje się więc, że sortowanie się cechy typu płciowego *Tetrahymena* można najłatwiej (ale nie wiadomo czy najszuszniej [2], wytłumaczyć zakładając schemat determinacji niezależnej w podjądrach i sortowanie zróżnicowanych i zdeterminowanych podjader (rys. 4A i 4B). Ujawnienie się koniugacji wewnątrz klonu byłoby wynikiem uzyskania zdolności do koniugacji wcześniej (rys. 4A:a) niż odbyło się sortowanie czystych fenotypowo makronukleusów (rys. 4B:b). Po sortowaniu oczywiście podlinie uzyskiwałyby nieodwracalnie zdeterminowany typ płciowy.

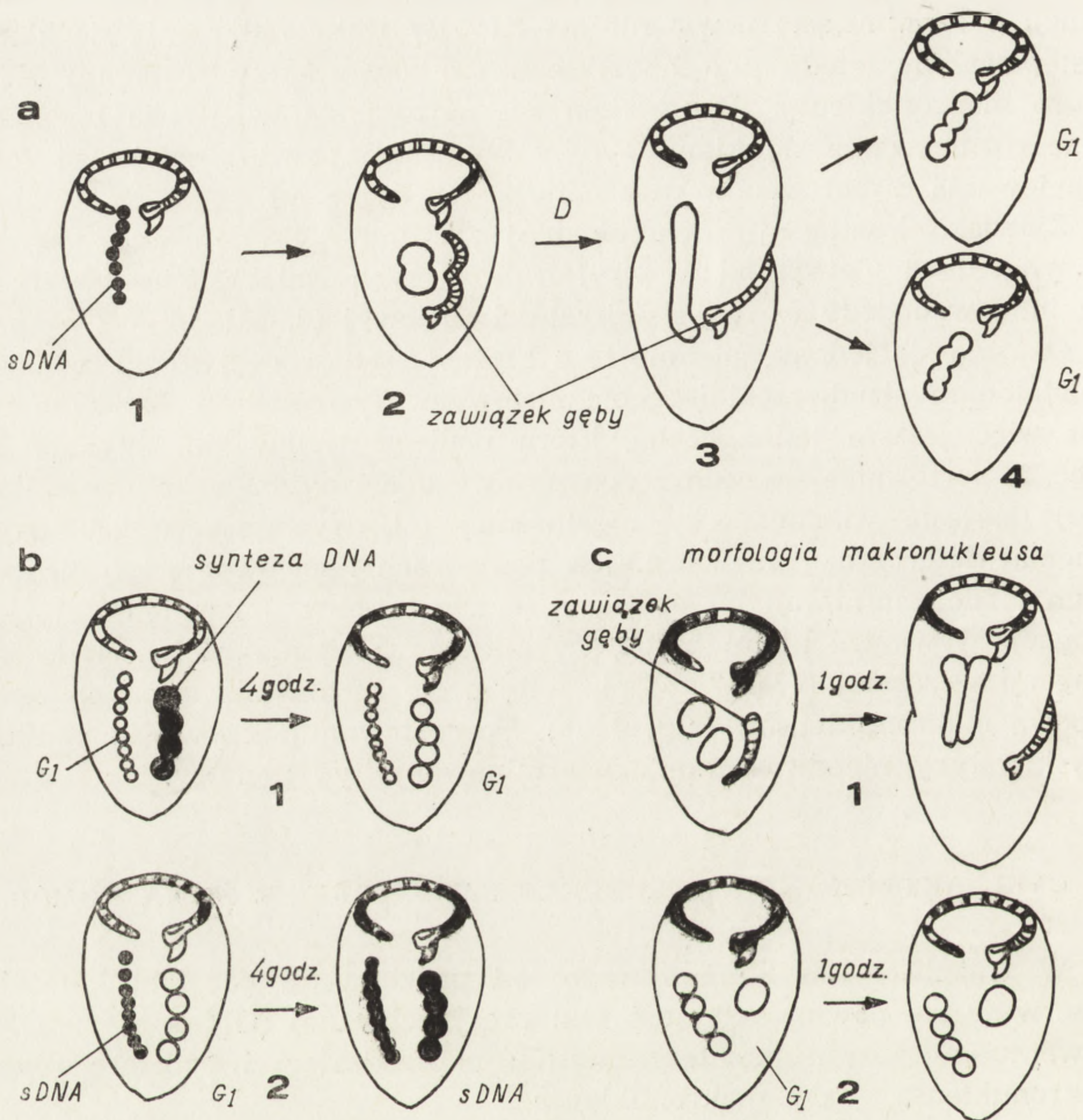
IV. CYKL AKTYWNOŚCI MAKRONUKLEUSA W TRAKCIE ŻYCIA KOMÓRKI

W trakcie cyklu komórkowego (od podziału do podziału komórki) obserwuje się pewną kolejność faz: presyntetycznej (G_1), syntezy DNA i ewentualnie fazy postsyntetycznej (G_2) poprzedzających podział zarówno mikronukleusa, jak i makronukleusa.

Powstaje pytanie, czy doświadczalnie można zmienić cykl makronukleusa? W tym celu można obserwować reakcję makronukleusa na duże uszkodzenia struktury cytoplazmy orzęska, lub też zbadać wzajemne oddziaływanie na siebie dwóch makronukleusów, z których jeden jest implantowany do komórki.

Do badań nad regeneracją orzęsków oraz do badań nad skutkami transplantacji jąder szczególnie dobrze nadaje się duży orzęsek *Stentor*. Wybór tego obiektu do badań związany jest z tym, że *Stentor* odznacza się zarówno widocznymi zmianami w kształcie makronukleusa w ciągu cyklu komórkowego, jak też dobrymi zdolnościami regeneracyjnymi.

Cykl przemian morfologicznych w makronukleusie *Stentora* w cyklu komórkowym został przedstawiony na rys. 10. U orzęska tego pod koniec okresu syntezy DNA (rys. 10a:1) w makronukleusie odbywają się charakterystyczne zmiany zarówno w makronukleusie, jak i na po-



Rys. 10. Doświadczenia nad wzajemnym wpływem cytoplazmy i jądra (makronukleusa) u *Stentor* sp. (wg Tartara [80] i de Terra [81] zmodyfikowane).

a — cykl zmian morfologicznych w makronukleusie i towarzyszące zmiany w stadiach rozwoju zawiązka gęby osobnika tylnego. 1 — stadium syntezy DNA makronukleusa. Makronukleus składa się z przewężonych paciorkowatych części. Okres środkowej i późnej interfazy, 2 — koniec syntezy DNA. Makronukleus przybiera postać owalnej pałeczki. Wyraźny zawiązek gęby, 3 — stadium podziału komórki. Makronukleus wydłuża się i dzieli. Rozwinięty aparat gębowy dla tylnej komórki potomnej, 4 — wczesna interfaza. Okres przed syntezą G₁. Makronukleus ulega rozdrobnieniu na poszczególne paciorkowate części. b — doświadczenia nad transplantacją makronukleusów u *Stentora*. 1 — komórka biorcy w okresie G₁, wszczepiony makronukleus syntetyzujący DNA po 4 godz. przestaje syntetyzować DNA, 2 — komórka biorcy w fazie syntezy DNA wszczepiony makronukleus w fazie G₁ rozpoczyna syntezę. c — doświadczenia nad transplantacją różnych morfologicznie stadiów makronukleusa *Stentora*. 1 — synchroniczne wchodzenie w podział obu jąder i odpowiednie zmiany w aparacie gębowym towarzyszące podziałowi. 2 — komórka biorcy we wczesnej interfazie, a zbity owalny makronukleus dawcy. Komórka kontynuuje swój cykl, a wszczepiony makronukleus albo ulega rozdrobnieniu, albo „czeka” na wejście komórki w podział.

wierzchni ciała. Początkowo rozciągnięty makronukleus ulega zlaniu się w jedną zbitą kulę, a na powierzchni ciała ujawnia się zawiązek nowej gęby dla przyszłego osobnika tylnego. W tym okresie ustaje synteza DNA w makronukleusie. Dalszy rozwój polega na rozdzieleniu się makronukleusa na dwa potomne i pełnemu ukształtowaniu się gęby dla osobnika tylnego (rys. 10a:2, 3). Wreszcie w trakcie cytokinezy rozdzielają się dwa osobniki potomne, a ich makronukleusy ulegają rozdrobnieniu na paciorkowate wstęgi. Te makronukleusy znajdują się jeszcze przez parę godzin w fazie presyntetycznej (G_1) (rys. 10a:4).

Tartar [80] wykazał, że przez usunięcie gęby *Stentora* wywołujemy ciąg zmian rozwojowych zmierzających do odtworzenia utraconego aparatu gębowego. Niezależnie od tego, czy amputacja gęby została dokonana w fazie G_1 makronukleusa, czy też w fazie S, w trakcie regeneracji nie obserwuje się syntezy DNA. Natomiast po paru godzinach od uszkodzenia komórki obserwuje się powstanie zawiązka nowej gęby morfologicznie identycznego do tego, który tworzył się w okresie podziału dla osobnika tylnego. W tym okresie, podobnie jak w podziale, poszczególne paciorkowate części makronukleusa ulegają zlaniu się w jedną zbitą kulę, mimo braku nowej syntezy DNA. Ostateczne wykształcenie nowej gęby w trakcie regeneracji zbiega się z ponownym rozczłonkowaniem makronukleusa na paciorkowate części. Tartar zwraca więc uwagę na fakt, że opisane zmiany morfologiczne makronukleusa są identyczne w okresie podziału i regeneracji (a więc porównywalne do rys. 10a). Inaczej mówiąc, badania te sugerują istnienie wyraźnej korelacji między zjawiskami rozwoju struktur powierzchniowych i zjawiskami morfologicznymi w makronukleusie. W trakcie podziału orzęska obserwuje się więc sekwencję zjawisk rozwojowych w makronukleusie, którą można wywołać również sztucznie przez interwencję z zewnątrz (chirurgiczną), w trakcie regeneracji komórki. Należy więc sądzić, że uszkodzenie w cytoplazmie jest sygnałem do zmian w makronukleusie i wywołuje pewien cykl rozwojowy.

Uprzednio rozważany był wpływ cytoplazmatycznych produktów syntetyzowanych pod kontrolą starego makronukleusa na różnicowanie się nowych zawiązków makronuklearnych (dziedziczenie cytoplazmatyczne cechy w niektórych syngenach *Paramecium aurelia*).

To samo zagadnienie można również analizować w doświadczeniach nad cyklem komórkowym *Stentora* obserwując różnicowanie się i losy wszczepionego makronukleusa do komórki biorcy.

De Terra [81] podsumowuje różne własne warianty doświadczeń nad transplantowaniem jąder u *Stentor*. Jedna seria doświadczeń dotyczyła zależności cytoplazmatyczno-jądrowych w inicjacji lub hamowaniu syntezy DNA (rys. 10b.) Otóż w cyklu życiowym *Stentora* wyróżniamy stosunko-

wo krótki okres G_1 (makronukleus w tym okresie oraz w okresie S jest złożony z wielu paciorkowatych części). Jeżeli do takiej komórki we wczesnej interfazie wszczepi się jądro, które było w stadium syntezy DNA, to po 4 godzinach zaobserwuje się wstrzymanie replikacji mimo dostępności prekursorów DNA w środowisku (rys. 10b:1).

O wiele jednak bardziej istotne były inne doświadczenia, w których do komórki syntetyzującej DNA wszczepiono makronukleus pochodzący z komórki w stanie G_1 , jeszcze nie syntetyzującej DNA. Otóż po 4 godzinach zaobserwowano inkorporację znakowanej trytem tymidyny w obu jądrach, a więc we własnym makronukleusie, a także i we wszczepionym (rys. 10b:2). De Terra stwierdziła więc, że w pewnym okresie cyklu jest syntetyzowany cytoplazmatyczny „inicjatorowy” czynnik, którego obecność warunkuje zdolność do syntezy DNA wszystkich jąder obecnych na terenie cytoplazmy. Nieobecność tego inicjatora z kolei powoduje niezdolność do zainicjowania syntezy DNA, nawet jeżeli dane jądro było w fazie S przed przeszczepem.

Innym typem doświadczeń są badania nad fazami morfologicznymi w cyklu *Stentora*. Chyba najbardziej wyraźnym dowodem na wpływ stanu cytoplazmy i powierzchni ciała orzęska na przemiany w makronukleusie są znowu doświadczenia nad transplantacją jąder (schematycznie przedstawione na rys. 10c). Otóż normalnie przed podziałem makronukleus ulega kondensacji i w okresie gdy zawiązał się rozwój gęby przyszłego tylnego osobnika, makronukleus tworzy zbitą kulę. Normalnie w trakcie następnej godziny rozwoju taki makronukleus ulega wydłużeniu, a następnie przewęża się na dwa potomne (rys. 10a), zmianom tym towarzyszy dalszy rozwój zawiązka gęby dla przyszłej komórki potomnej. Jeżeli takie makronukleusy „zbite” w postaci kuli zostaną wszczepione do innych *Stentorów* znajdujących się w różnych fazach cyklu, ich losy będą zasadniczo różne. Jeżeli „zbity” makronukleus zostanie wszczepiony do komórki także z własnym jądrem „zbitym”, to po godzinie oba jądra wydłużą się i podzielą (rys. 10c:1). Jeżeli natomiast takie jądro zostanie wszczepione do komórki we wczesnej interfazie o własnym makronukleusie paciorkowatym, to wszczepiony „zbity” makronukleus nie ulegnie podziałowi; będzie on albo w stadium „zbitym” czekając na wejście komórki w podział i wtedy podzieli się równocześnie z makronukleusem gospodarza, albo też już nieco wcześniej upodobni się do makronukleusa gospodarza i ulegnie fragmentacji na przynajmniej kilka paciorkowatych części (rys. 10c:2). Podane tutaj doświadczenia sugerują, że w określonym okresie cyklu komórkowego odbywa się produkcja pewnych czynników cytoplazmatycznych kontrolowana przez makronukleusa, a także że zakłócenia w cytoplazmie oddziałują na cykl przemian w makronukleusie.

Czy oznacza to jednak, że w makronukleusie istnieje kolejność funkcjonowania przynajmniej pewnych genów bądź czy odpowiednia reakcja makronukleusa, objawiająca się cyklem jego przemian, jest tylko związana z obecnością lub nieobecnością odpowiednich substancji na terenie cytoplazmy produkowanych bez koniecznego ich kolejnego pojawiania się? Na te pytania nie ma dotąd ostatecznej odpowiedzi.

Hanson i Kaneda [32] na podstawie badań nad długością cyklu życia komórkowego *Paramecium aurelia* w warunkach optymalnych i po okresowym wstrzymaniu syntezy RNA wysunęli koncepcję sekwencyjnej (kolejnej) akcji genów w cyklu życiowym pierwotniaków. Z badań Rasmussena [71a] na tym samym obiekcie wynikałoby, że istnienie tylko pewnych nie zakłóconych syntez w makronukleusie jest niezbędne dla zakończenia cyklu komórkowego.

Informacje o istnieniu u *Tetrahymena* cyklu intensywności produkcji różnych rodzajów RNA w cyklu życiowym [18, 47], sugerują pewną kolejność, a nie jednoczesność ujawniania się poszczególnych genów.

A jednak zachodzą wątpliwości, czy istnieje niezmienny cykl kolejnej aktywizacji genów. Badania dotyczące długości nie zakłóconego cyklu komórkowego *Tetrahymena* [35] wskazują, że istnieją zasadnicze różnice w czasie trwania fazy G_1 (presyntetycznej) makronukleusa, jak się wydaje uzależnione od istnienia zapasowej puli pewnych substancji potrzebnych do przebiegu morfogenezy podziałowej. Skrócenie fazy G_1 w cyklu komórkowym mogłoby oznaczać, że pewne geny istotne w rozwoju mogłyby nawet nie być aktywne w poszczególnym cyklu, o ile istnieją na terenie komórki odpowiednie produkty zsyntetyzowane uprzednio w nadmiarze.

Aktywizacja lub wyłączenie pewnych genów mogłoby być stymulowane przez czynniki środowiskowe, a nie tylko regulowane wewnętrznym cyklem rozwojowym. Wskazują na to pewne badania nad *Tetrahymena* [13, 14].

Inną możliwość rozważa teoretycznie Kauffmann [40] wysuwając hipotezę stałej kontroli kolejności przebiegu aktywizowania genów. W przypadku zakłóceń w funkcjonowaniu któregoś genu, lub też powstania niedostatecznej ilości produktu tego genu, następowałoby powtórzenie pewnego odcinka rozwoju. Istnienie takiej kontroli pozwalałoby na ewentualne powtórzenia pewnego fragmentu sekwencji ujawniania się genów. Hipotezę tę trudno sprawdzić, ale pewne badania nad cyklem życiowym *Paramecium aurelia* [39] wydają się być z nią zgodne.

V. PODSUMOWANIE

W artykule przedstawiono niektóre zagadnienia dotyczące struktury i funkcji jąder u orzęsków. Jednolita teoria budowy i funkcji makronukleusa wymagałaby pełnej zgodności danych cytologicznych i genetycznych, tak jak w przypadku chromosomowej teorii wszystkich innych jąder *Eukariota*. Zwrócono szczególną uwagę na zjawiska różnicowania się jąder i regulacji ich funkcji. Orzęski stanowią bowiem bardzo ciekawy materiał do badań nad wzajemnymi oddziaływaniami jądra i cytoplazmy oraz różnych jąder znajdujących się na terenie tej samej cytoplazmy.

Zagadnienie to dotyczy

1) różnicowania się dwóch różnych produktów tego samego syngamionu na makronukleus i mikronukleus związane nie tylko z powieleniem chromatyny w makronukleusie lub ewentualną jej częściową eliminacją, ale również z represją syntezy RNA w mikronukleusie.

2) wpływu produktów syntezy starego makronukleusa na nowo powstający zawiązek nowego Ma (patrz dziedziczenie cechy mt typu płciowego *Paramecium*).

3) wpływu, jaki wywiera jądro komórki biorcy na jądro wszczepione, a który wyraża się w represji lub indukcji syntezy DNA (doświadczenia de Terra nad transplantacją jąder u *Stentora*).

Rozważania zjawisk wzajemnego wpływu jądra i cytoplazmy oraz różnych jąder zawartych w tej samej cytoplazmie oparte są na założeniu, że wymiana jądro—cytoplazma nie jest jednokierunkowa. Produkty syntezy rozpoczętej transkrypcją DNA jądrowego gromadząc się w cytoplazmie mogą z kolei oddziaływać na jądro regulując jego funkcje.

Zjawiska dotyczące wzajemnych oddziaływań jądro—cytoplazma i różnych jąder w tej samej cytoplazmie, stanowią więc część szerszego zagadnienia, jakim jest regulacja funkcjonowania genów.

LITERATURA

- [1] ALLEN S. L., 1967 – Chemical genetics of Protozoa, in: Chemical Zoology I ed. M. Florkin, B. T. Scheer.
- [2] ALLEN S. L., GIBSON I 1972 – Genome amplification and gene expression in the ciliate macronucleus, *Bioch. Genetics*, 6: 293–313.
- [3] ALLEN S. L., NANNEY D. L. 1958 – An analysis of nuclear differentiation in selfer of *Tetrahymena pyriformis*, *American Naturalist*, 92: 139–160.
- [4] AMMERMANN D., 1965 – Cytologische und genetische Untersuchungen an dem Ciliaten *Stylonychia mytilus* (Ehrenberg), *Arch. Protistenk.*, 108: 109–152.
- [5] AMMERMANN D., 1970 – The micronucleus of the ciliate *Stylonychia mytilus*, its nucleic acid synthesis and its function, *Exp. Cell Res.*, 61: 6–12.
- [6] AMMERMANN D., 1971 – Morphology and development of the macronuclei

- of the ciliates *Stylonychia mytilus* and *Euplotes aediculatus*, *Chromosoma*, **33**: 209–238.
- [7] AMMERMANN D., 1973 – Development and differentiation in the ciliate *Stylonychia mytilus*, in: *The cell cycle in development and differentiation*, ed. M. Balls., F. S. Billet, 51–60.
- [8] BEALE G. H., 1954 – *The genetics of Paramecium aurelia*, ed. Cambridge University Press. London and New York.
- [9] BERGER J. D., 1973 – Nuclear differentiation and nucleic acid synthesis in well-fed exconjugants of *Paramecium aurelia*, *Chromosoma*, **42**: 247–268.
- [10] BERGER J. D., 1973 – Selective inhibition of DNA synthesis in macronuclear fragments in *Paramecium aurelia*. Exconjugants and its reversal during macronuclear regeneration, *Chromosoma*, **44**: 33–48.
- [11] BLEYMAN L., 1973 – Intraclonal conjugation in early-maturing clones of *Tetrahymena pyriformis*, *Progress in protozoology*, ed. Univ. Clermont-Ferrand, 46.
- [12] BOSTOCK C. J., PRESCOTT D. M., 1972 – Evidence of gene diminution during the formation of the macronucleus in the protozoan *Stylonychia* P.N.A.S., **69**: 139–142.
- [13] BUHSE H. E., 1967 – Microstome-macrostome transformation in *Tetrahymena vorax*, *J. Protozool.*, **14**: 608–613.
- [14] BUHSE H. R., CAMERON I. R., 1968 – Temporal pattern of macromolecular events during the microstome-macrostome cell transformation, *J. Exp. Zool.*, **169**: 229–236.
- [15] BUTZEL H. M., 1974 – Mating type determination and development in *Paramecium aurelia*, in: *Paramecium, a current survey*, ed. W. J. Von Wagtendonk, Elsevier Scientific Publ. Com. P: 91–130.
- [16] BYLFIELD I. E., LEE Y. C., BONNET L. R., 1970 – Similarity of *Tetrahymena* and mammalian RNA polymerases based on rifampicin resistance, *Biochim. Biophys. Acta.*, **204**: 610–613.
- [17] CHEN T. T., 1940 – Polyploidy and its origin in *Paramecium*, *J. Hered.*, **31**: 175–184.
- [18] CHRISTENSSON E. G., 1970 – Studies of messenger RNA during the cell-cycle in synchronized mass cultures of *Tetrahymena pyriformis* GL by hybridization, *J. Protozool.*, **17**: 495–501.
- [19] CLEFFMANN G., 1968 – Regulierung der DNS-Menge im Makronukleus von *Tetrahymena*, *Exp. Cell Res.*, **50**: 193–207.
- [20] DRAGESQO J., 1963 – Compléments a la connaissance des Cilies mesopsammigues de Roscoff, *Cahiers Biol. Marine.*, **4**: 91–119.
- [21] DUPY-BLANC J., 1969 – Etude par cytophotometric des teneurs en ADN nucléaire chez trois especes de paramecie, chez differentes varietes d'une meme espece et chez differentes types sexuels d'une meme variete, *Protistol.*, **5**: 239–248.
- [22] DYSART M. D., 1959 – Cytochemical and quantitative DNA analyses of the macronucleus and its extrusion body in species of *Tetrahymena*, *J. Protozool.*, **6** (suppl.): 8.
- [23] FAURE-FREMIET E., 1954 – Les problemes de la differenciation chez les Protistes, *Bull. Soc. Zool.*, **29**: 311–316.
- [24] FRANKE W. W., 1967 – Zur Feinstruktur isolierter Kernmembranen aus tierischen Zellen., *Z. Zellforsch. Mikroskop. Anat.*, **80**: 585.
- [25] FRANKEL J., 1965 – The effect of nucleic acid antagonists on cell division

- and organelle development in *Tetrahymena pyriformis*, J. Exp. Zool., 159: 113-148.
- [26] FRANKEL J., 1973 - Dimension of cortical patterns in *Euplotes*: The role of pre-existing structure the clonal life cycle and the genotype, J. Exp. Zool., 183: 71-94.
- [27] GALL J. G., 1959 - Macronuclear duplication in the ciliated protozoan *Euplotes*, J. Biophys. Biochem. Cytol., 5: 295-308.
- [28] GIL R., ALONSO P., PEREZ-SILVA J., 1972 - Ultrastructure of the macronuclear anlage in *Stylonychia mytilus*, J. Exp. Cell Res., 5: 509-518.
- [29] GOLIKOVA M. N., 1964 - Polytene chromosomes in the developing macronucleus of a Ciliate, Citologija., 6: 250-253.
- [30] GOROVSKY M. A., HATTMAN S., PLEGER G. L., 1973 - Studies on histone fraction macronucleus and micronucleus of *Tetrahymena pyriformis*, J. Cell Biol. 57: 773-782.
- [31] GRELL K., 1973 - Protozoologie, ed. Springer Verlag. Berlin, Heidelberg, New-York.
- [32] HANSON E. D., KANEDA M., 1968 - Evidence for sequential gene action with the cell cycle of *Paramecium*, Genetics, 60: 793-805.
- [33] HECKMANN K., 1964 - Paarungssystem und genabhängige Paarungstypdifferenzierung bei dem hypotrichen Ciliaten *Euplotes vannus* O. F. M. Z. Vererbungsl., 95: 114-124.
- [34] JARENO M. A., ALONSO P., PEREZ-SILVA J., 1972 - Identification of some puffed regions in the polytene chromosomes of *Stylonychia mytilus*, Protistol., 8: 237-243.
- [35] Jauker P., Cleffmann G., 1970 - Oscillation of individual generation times in cell lines of *Tetrahymena pyriformis*, Exp. Cell Res., 62: 447-480.
- [36] JEFFERY W. R., STUART K. D., FRANKEL J., 1970 - The relationship between Deoxyribonucleic acid replication and cell division in heat-synchronized *Tetrahymena*, J. Cell Biol., 46: 533-543.
- [37] JERKA-DZIADOSZ M., FRANKEL J., 1970 - The control of DNA synthesis in macronuclei and micronuclei regenerating cells, J. Exp. Zool. 173: 1-22.
- [38] JURAND A., BEALE G. H., YOUNG M. R., 1964 - Studies on the macronucleus of *Paramecium aurelia*, II, Development of macronuclear anlage, J. Protozool., 11: 491-497.
- [39] KACZANOWSKA J., HYVERT N., de HALLER G., 1974 - Actinomycin D experiment on *Paramecium aurelia*. I effects on generation time and morphogenesis during the cell division cycle, J. Protozool., 22 (in press).
- [40] KAUFFMANN S., 1971 - Gene regulation networks: a theory for their global structure and behaviours, in: Curr. Topics Dev. Biol., ed. Monroy, A. Mascona 6: 145-182.
- [41] KIMBALL R. F., 1964 - Physiological genetics of the ciliates in: Biochemistry and Physiology of Protozoa, ed. S. H. Hutner vol. III Academic Press New York: 243-275.
- [42] KIMBALL R. F. 1967 - Persistent intraclonal variations in cell dry mass and DNA content in *Paramecium aurelia*., Exp. Cell Res., 48: 378-395.
- [43] KIMBALL R. F., PRESCOTT D. M., 1962 - Deoxyribonucleic acid synthesis and distribution during growth and amitosis of the macronucleus of *Euplotes*, J. Protozool., 9: 88-92.
- [44] KLOETZEL J., 1970 - Compartmentalization of the developing macronucleus following conjugation in *Stylonychia* and *Euplotes*, J. Cell Biol., 47: 395.

- [45] KUMAR A., 1970 – Ribosome synthesis in *Tetrahymena pyriformis*, *J. Cell Biol.*, **45**: 623–634.
- [46] LEICK V., 1969 – Formation of subribosomal particles in the macronuclei of *Tetrahymena pyriformis*, *Europ. J. Biochem.*, **8**: 221.
- [47] LETTS P. J., ZIMMERMAN A. M., 1970 – Polipeptide synthesis with microsomes from pressure-treated *Tetrahymena*, *J. Protozool.*, **17**: 593–596.
- [48] LUPORINI P., 1970 – Life cycle of autogamous strains of *Euplotes minuta*, *J. Protozool.*, **17**: 96.
- [49] McCOY W., 1974 – Doniesienie osobiste.
- [50] MURTI K. G., PRESCOTT D. M., 1970 – Micronuclear ribonucleic acid in *Tetrahymena pyriformis*, *J. Cell Biol.*, **47**: 460–467.
- [51] MURTI K. G., PRESCOTT D. M., PENE J. J., 1972 – DNA of ciliated protozoa. III. Binding of RNA polymerase and denaturation at the ends of the low-molecular weight DNA in *Stylonychia*, *J. Mol. Biol.*, **68**: 413–416.
- [52] NANNEY D. L., 1953 – Mating type determination in *Tetrahymena pyriformis* *Proc. of natl Ac. Sci.*, **39**: (10) 1057–1063.
- [53] NANNEY D. L., 1959 – Genetic factors affecting mating type frequencies in variety I of *Tetrahymena pyriformis*, *Genetics*, **44**: 1173–1184.
- [54] NANNEY D. L., ALLEN S., 1959 – Intranuclear co-ordination in *Tetrahymena* *Physiol. Zool.*, **32**: 221–228.
- [55] NANNEY D. L., 1963 – Aspects of mutual exclusion in *Tetrahymena* in: *Biological organization of the cellular and supercellular level*, ed. R. J. C. Harris Academic Press New-York and London.
- [56] NANNEY D. L., CAUGHEY P. A., 1955 – The genetic control of mating type potentialites in *Tetrahymena*, *Genetics*, **40**: 388–398.
- [57] NANNEY D. L., CAUGHEY B. A., TEFANKIJAN D., 1955 – The genetic control of mating type potentialites in *Tetrahymena pyriformis*, *Genetics*, **40**: 668–680.
- [58] NANNEY D. L., DUBERT J. M., 1960 – The genetics of the H serotype system in variety I of *Tetrahymena pyriformis*, *Genetics*, **45**: 1335–1349.
- [59] NANNEY D. L., RUDZIŃSKA M. A., 1960 – Protoza in: *The cell*. ed. J. Brachet., A. E. Mirsky vol IV Academic Press 109–150.
- [60] NILSSON J. R., LEICK V., 1970 – Nuclear organization and ribosomes formation in *Tetrahymena pyriformis* GL, *Exp. Cell Res.*, **60**: 316–372.
- [61] NILSSON J. R., 1970 – Suggestive structural evidence for macronuclear „sub-nuclei” in *Tetrahymena pyriformis* GL, *J. Protozool.*, **17**: 539–548.
- [62] NYBERG D., – *Genetics*, (in press).
- [63] PASTERNAK J., 1967 – Differential genic activity in *Paramecium aurelia*, *J. Exp. Zool.*, **165**: 395–417.
- [64] PRESCOTT D. M., BOSTOCK C. J., MURTI K. G., LAUTH, GAMOW B., 1971 – Electron microscopic and sedimentation analyses DNA of *Stylonychia mytilus*, *Chromosoma*, **34**: 355–366.
- [65] PRESCOTT D. M., MURTI K., Bostock C. J., 1973 – The genetic apparatus of *Stylonychia* sp., *Nature* (in press).
- [66] RADZIKOWSKI S., Nuclear behaviour during conjugation of *Chilodonella cucullulus* O. F. M. and polytene chromosomes in the exconjugants, *Bull. Acad. Polon. Sci.*, **15**: 749–751.
- [67] RADZIKOWSKI S., 1969 – Interdivisional nuclear changes microphotometric studies on DNA synthesis in *Chilodonella cucullulus*. O. F. M., *Bull. Acad. Polon. Sci.*, **17**: 399–402.

- [68] RADZIKOWSKI S., 1973 – Die Synthese der Nukleinsäure im Macronukleus von *Chilodonella cucullulus* O. F. M., Progress in Protozoology.
- [69] RADZIKOWSKI S., 1973 – Die Entwicklung des Kernapparates und die Nukleinsäuresynthese während der Konjugation von *Chilodonella cucullulus* O. F. M., Arch. Protistenk., **115**: 419–428.
- [70] RAIKOV I. B. 1967 – Kariologija prostiejszich, ed. Nauka, Leningrad.
- [71] RAO M. W. N., 1966 – Macronuclear development in *Euplotes woodruffi* following conjugation, J. Cell Biol., **31**: 90 A.
- [71a] RASMUSSEN L., 1967 – Effects of metabolic inhibitors on *Paramecium aurelia* during the cell generation cycle, Exp. Cell Res., **48**: 132–139.
- [72] SCHENSTED I. V., 1958 – Model of subnuclear segregation in the macronucleus of ciliates, Amm. Naturalist., **92**: 161–170.
- [73] SIEGEL R. W., 1967 – Genetics of aging and life cycle of ciliates, Symp. Soc. Exp. Biol., **21**: 127–148.
- [74] SIEGEL R. W., HECKMANN K., 1966 – Inheritance of autogamy and the killer trait in *Euplotes minuta*, J. Protozool., **13**: 34–38.
- [75] SONNEBORN T. M., 1947 – Recent advances, in the genetics of *Paramecium* and *Euplotes*, Adv. Genet., **1**: 263–268.
- [76] SONNEBORN T. M., 1950 – Methods in the general biology and genetics of *Paramecium aurelia*, J. Exp. Zool., **113**: 87–147.
- [77] SONNEBORN T. M., 1939 – *Paramecium aurelia*: Mating types, Amer. Naturalist **73**: 390–413.
- [78] SONNEBORN T. M., 1966 – A non-conformist genetic system in *Paramecium aurelia*, Amer. Zoologist, **6**: 589.
- [79] STEVENS B. J., ANDRE J., 1969 – The nuclear envelope., in: Handbook of molecular cytology, ed. Lima de Faria, North-Holland Publ. Comp., 838–871.
- [80] TARTAR V., 1961 – Biology of *Stentor*, ed. Pergamon Press.
- [81] De TERRA N., 1970 – Cytoplasmic control of macronuclear events in the cell cycle of *Stentor*, Symp. Soc. Exp. Biol., **24**: 345–368.
- [82] TAUB S. R., 1959 – The genetics of mating type determination in syngen 7 of *Paramecium aurelia*, Genetics, **44**: 541–542.
- [83] TUCKER J. B., 1967 – Changes in nuclear structure during binary fission in the ciliate *Nassula*, J. Cell Sci., **2**: 481–498.
- [84] WOODARD J., GOROVSKY M., KANESHIRO E., 1968 – Macronuclear subnuclei in *Tetrahymena*, J. Cell Biol., **39**: 182a.

Otrzymano: kwiecień, 1974.

Przyjęto: listopad, 1974.

Adres autorów: Krakowskie Przedmieście 26/28, 00-325 Warszawa.

ROLA BŁON W PROCESACH FOTORECEPCJI

Jan ZURZYCKI

Zakład Fizjologii Roślin, Instytut Biologii Molekularnej
Uniwersytet Jagielloński

Streszczenie. Fotorecepcja jest jednym z rodzajów oddziaływania światła na żywy organizm, związanym z reakcją fizjologiczną organizmu na kierunek lub natężenie światła. Termin „fotoreceptor” stosowany bywa w dwu znaczeniach — dla określenia związku chemicznego (barwnika) czynnego w fotorecepcji lub w celu określenia struktury komórkowej, lub subkomórkowej, w której odbywa się proces fotorecepcji. Przegląd szeregu zjawisk fotorecepcji, takich jak fototaksja bakterii i glonów, fototropizm spletków mchów i paprotników, translokacje wewnątrzkomórkowe chloroplastów, proces widzenia — wykazuje, że omówione zjawiska fotorecepcji są integralnie związane z istnieniem systemów błoniastych. Omówiono niektóre konsekwencje wynikające z lokalizacji barwników fotoreceptorowych w błonach, takie jak ułatwienie przenoszenia energii i wzajemne oddziaływanie cząsteczek fotoreceptorów zmieniające własności absorpcyjne systemu, jak również przytoczono kilka przykładów badania pierwotnych procesów fotorecepcji na sztucznych układach modelowych.

WSTĘP

Fotorecepcja jest jednym z rodzajów oddziaływania światła na żywy organizm. Światło — a więc promieniowanie elektromagnetyczne, zawarte w granicach długości fal 380–720 nm — jest absorbowane przez wiele związków barwnych, wchodzących w skład żywych komórek lub ich wytworów. Jednakże nie każda absorpcja energii świetlnej ma związek z fotorecepcją. O klasyfikacji danego zjawiska decydują dalsze losy pochłoniętej energii świetlnej. Energia ta może być przekształcana na ruchy cieplne cząstek, przy czym wzbudzona cząsteczka barwnika przechodzi na drodze bezpromienistej do swego stanu podstawowego bądź może być wpromieniowana w postaci kwantów fluorescencji. Energia wzbudzenia może również wywołać szereg chemicznych zmian, samego barwnika lub cząstek usytuowanych w bez-

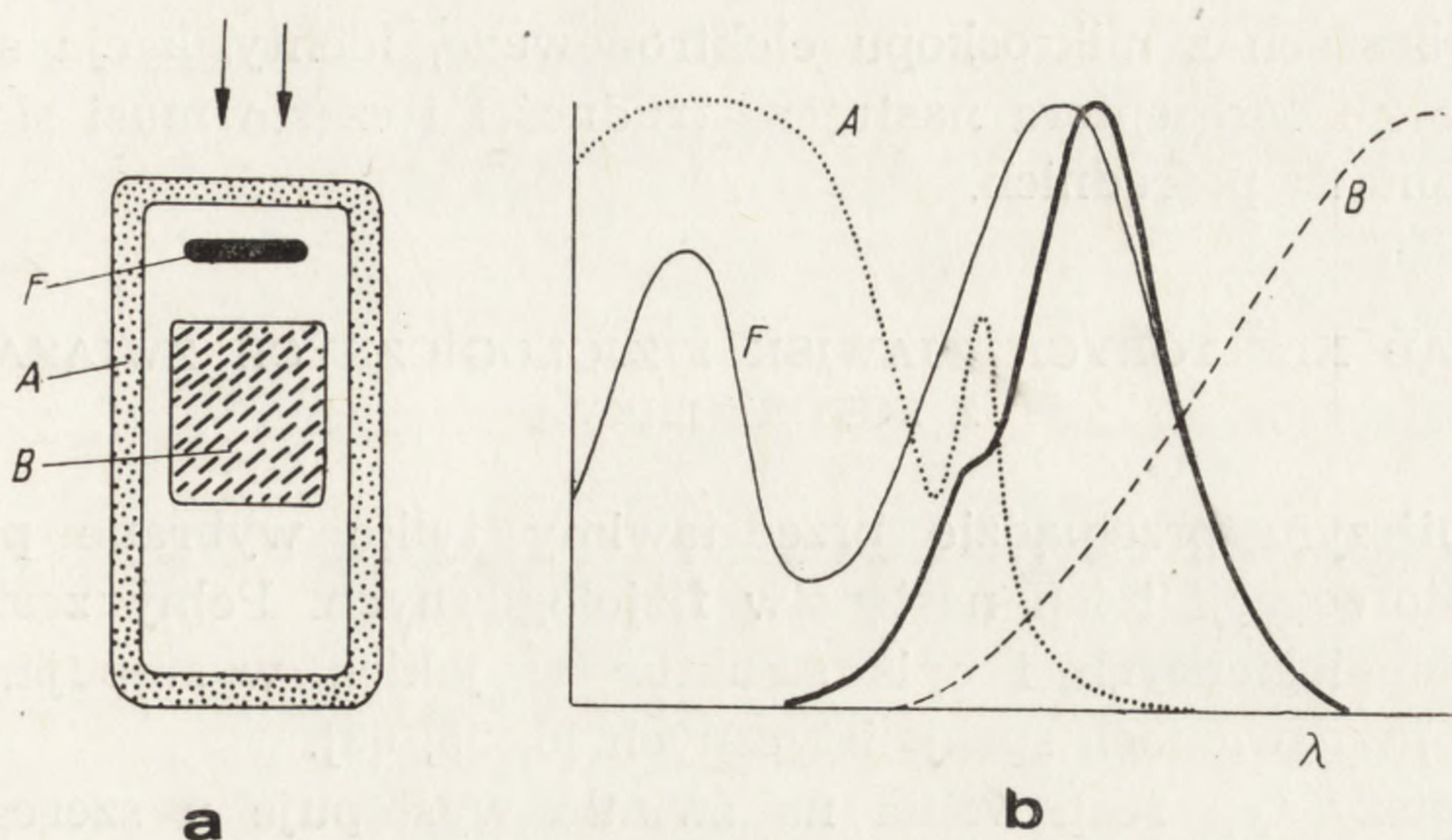
pośredniej bliskości, np. izomeryzację, dysocjację, fotoutlenianie itp. Jeżeli jednak zmiany te nie mają konsekwencji fizjologicznych, nie są elementem naturalnych procesów życiowych, również nie zaliczymy ich do fotorecepcji. W innych (fizjologicznych) fotoreakcjach przejście barwnika w stan wzbudzony uruchamia ciąg reakcji fizyko-chemicznych, prowadzących do określonego efektu fizjologicznego. Z dużym przybliżeniem możemy ostatnią kategorię procesów podzielić na dwie grupy [55].

A. Procesy, w których dominuje charakter energetyczny. Absorpcja kwantu świetlnego inicjuje w tym przypadku ciąg reakcji doprowadzających do wytworzenia produktu końcowego o wysokim zapasie energii. Ilość wytworzonego produktu końcowego jest bezpośrednio uzależniona od liczby pochłoniętych kwantów. Produkt końcowy jako taki ma znaczenie dla organizmu. Przykładem tego typu procesów może być fotosynteza.

B. Procesy, w których dominuje charakter cybernetyczny. Działanie światła można w tym przypadku określić jako oligodynamiczne. Absorpcja promieniowania rozpoczyna ciąg reakcji, w których efekt energetyczny pochłoniętego promieniowania ulega wielokrotnemu wzmocnieniu. Jest to możliwe dzięki wykorzystaniu energii produkowanej w procesach metabolicznych. Ostatecznym skutkiem jest określona reakcja organizmu na czynniki otoczenia. Przykładem tego typu zjawisk może być proces widzenia. Fotorecepcją w ścisłym słowa znaczeniu nazywać będziemy pochłanianie światła inicjujące procesy scharakteryzowane w ostatnim punkcie.

O ile termin fotorecepcji można jednoznacznie zdefiniować, o tyle pojęcie fotoreceptora stosowane jest powszechnie w dwu różnych znaczeniach. Fotoreceptorem nazywamy substancję (związek chemiczny), w którym odbywa się absorpcja światła uruchamiająca dalsze procesy. Termin fotoreceptor używany bywa również dla określenia struktury komórkowej lub subkomórkowej, w której zlokalizowane są barwniki-fotoreceptory, a której budowa ma istotne znaczenie przynajmniej dla początkowych etapów ciągu fotoreakcji.

Informacje dotyczące fotoreceptora jako barwnika czerpiemy głównie z określenia widma działania światła w danej fotoreakcji i porównania go z widmem absorpcyjnym barwników występujących w komórce. Zgodność obu krzywych jest poważnym argumentem wskazującym na rolę danej substancji w procesie fotorecepcji. W praktyce postępowanie takie nastęrcza często poważne trudności. Pomijając niełatwe problemy techniczne związane z określeniem widma działania, spotykamy się często z różnicami kształtu i położenia widma działania w stosunku do widma absorpcji roztworu fotoreceptora. Zjawisko to może mieć kilka przyczyn, z których dwie przedstawiono na rys. 1. Wyobraźmy



Rys. 1. a — schemat hipotetycznej komórki zawierającej trzy barwniki, w tym jeden pełniący funkcję fotoreceptora (F), b — widma absorpcji trzech barwników oraz widmo działania fotoreakcji zaznaczone grubszą linią

sobie, że w komórce występują trzy barwniki, z których jeden (A) zlokalizowany jest peryferycznie, dwa pozostałe (F i B) znajdują się w strukturach centralnych komórki leżących jednak jedna nad drugą. Widma absorpcyjne rozdzielonych ekstraktów trzech barwników przedstawia rys. 1 b, na którym grubszą linią zaznaczono widmo działania. Widmo to wykazuje podobieństwo, ale nie dokładną zgodność z widmem absorpcji fotoreceptora F. W zakresie krótkofalowym brak zgodności spowodowany jest ekranującym działaniem barwnika A, który modyfikuje intensywność i skład spektralny światła docierającego do fotoreceptora. Maksimum widma działania jest przykładowo przesunięte ku stronie długofalowej w stosunku do maksimum widma absorpcji fotoreceptora. Może to być wynikiem innego stanu barwnika w strukturach komórkowych w porównaniu ze stanem w roztworze. Substancja B nie wpływa modyfikująco na widmo działania, ponieważ położona jest w drodze światła za fotoreceptorem. Oświetlenie komórki z przeciwnej strony (od dołu) spowodowałoby zmianę widma działania, wywołaną przez absorpcję w barwniku B. Powyższy, teoretyczny przykład może stanowić ilustrację trudności jakie napotyka eksperymentator, i konieczności krytycznej interpretacji widm działania jako podstawy do identyfikacji fotoreceptorów.

Informacje o strukturze komórkowej grającej rolę fotoreceptora opieramy na badaniach anatomicznych. O ile struktury te są duże (w skali mikroskopowej), a stężenie barwnika znaczne, problem identyfikacji nie stanowi trudności. Jeżeli jednak stężenie fotoreceptora jest znikome (często dodatkowo związek ten jest maskowany przez inne nieaktywne barwniki), lub jeżeli mamy do czynienia ze strukturami widocznymi

tylko w obrazach z mikroskopu elektronowego, identyfikacja struktury grającej rolę fotoreceptora nastęcza trudności i często musi się opierać na argumentach pośrednich.

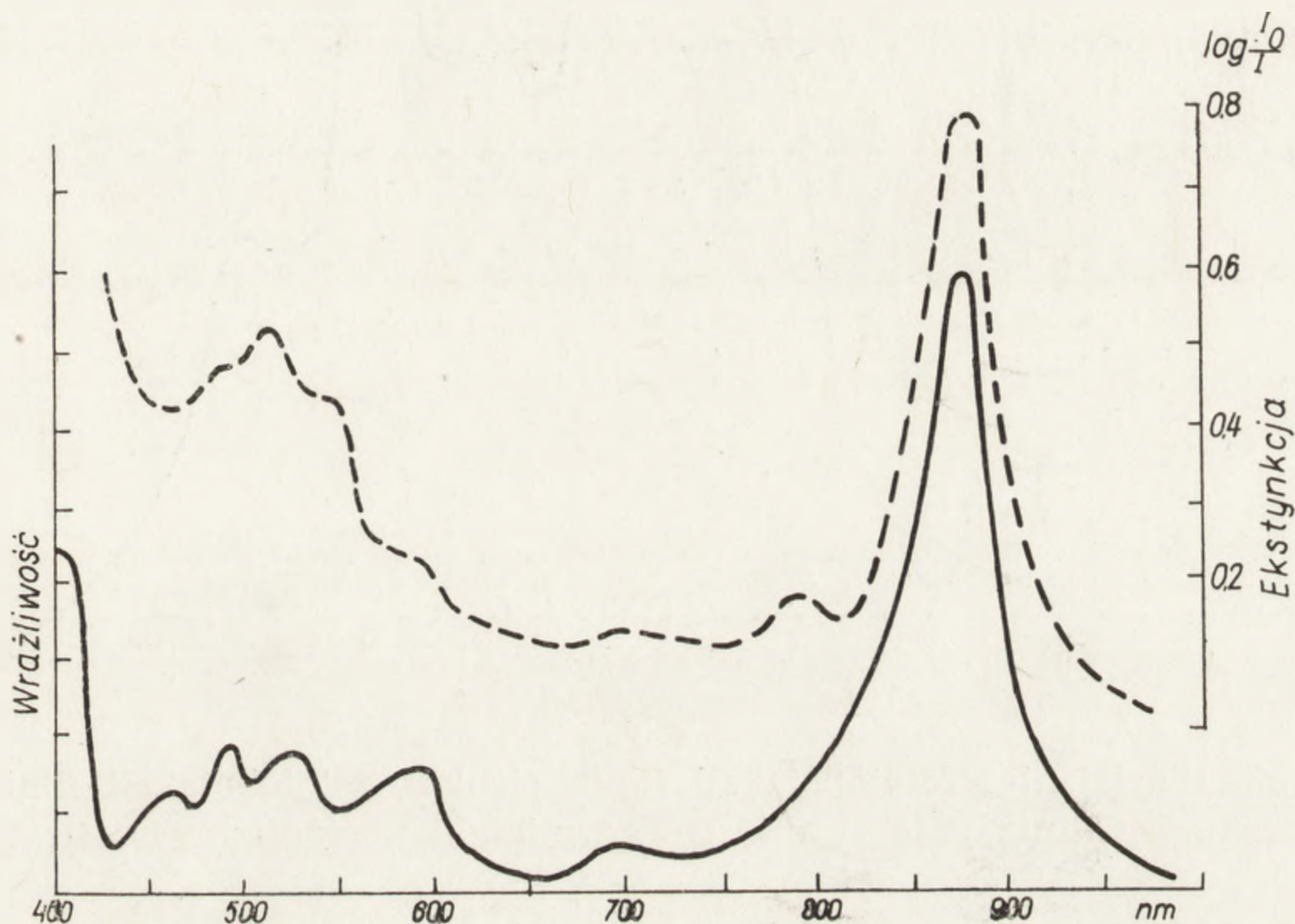
PRZEGLĄD NIEKTÓRYCH ZJAWISK FIZJOLOGICZNYCH ZWIĄZANYCH Z FOTORECEPCJĄ

W poniższym przeglądzie przedstawimy tylko wybrane przykłady zjawisk fotorecepcji i ich następstw fizjologicznych. Pełny zestaw procesów fotobiologicznych i opis struktur w jakich występują, znaleźć można w opracowaniach specjalistycznych [6, 55, 63].

Najprostszy typ reagowania na światło występuje u szeregu organizmów jednokomórkowych mających zdolność przemieszczania się w środowisku. Ich reakcja na kierunek i natężenie światła jest łatwo uchwytana, dzięki zmianom kierunku lub szybkości ruchu. Zachowanie takie prowadzi w rezultacie do grupowania się organizmów w obszarach o optymalnym oświetleniu, a unikania innych. Reakcje ruchowe na oświetlenie, zwane ogólnie fototaksją, składają się w istocie z szeregu typów reagowania, których dokładne określenie jest konieczne dla poprawnego przeprowadzenia badań. Jako podstawę klasyfikacji typów ruchów przyjmujemy podział zastosowany przez Bünninga [3], jakkolwiek istnieją tendencje do wprowadzenia nowego nazewnictwa [8]. Ruch organizmu, którego kierunek zależny jest od kierunku padania światła nazwiemy fototopotaksją. Może ona być dodatnia, gdy organizm kieruje się w stronę światła, lub ujemna, gdy płynie w przeciwnym kierunku. Jeżeli organizm płynący w środowisku napotyka na nagłą zmianę oświetlenia, może u niego nastąpić reakcja szokowa związana ze zmianą kierunku ruchu – jest to fotofobotaksja (dodatnia lub ujemna). Wreszcie jeżeli zmiana natężenia oświetlenia wpłynęła na szybkość ruchu, mamy do czynienia z fotokinezą, dodatnią gdy w świetle następuje przyspieszenie ruchu, ujemną gdy zwolnienie.

Zjawiska fototaksji (różnych typów) spotykamy już u prokariontów: bakterii fotosyntetycznych i sinic. Charakterystyczne jest przy tym, że rolę fotoreceptora w tych organizmach spełniają barwniki fotosyntetyczne, zlokalizowane w systemie tylakoidów, a więc struktur błoniastych. Rysunek 2 przedstawia przykład widma działania ujemnej fobotaksji u bakterii *Rhodospirillum rubrum* [38]. Widmo działania wykazuje całkowitą zgodność z widmem działania fotosyntezy, natomiast pewne różnice w porównaniu z widmem absorbcyjnym ekstraktu etanolowego barwników fotosyntetycznych. Różnice te (w części krótkofalowej) wynikają z absorpcji światła w pewnych barwnikach (spiryloksantynie), której udział w fotosyntezie jest znikomy. Potwierdzenie

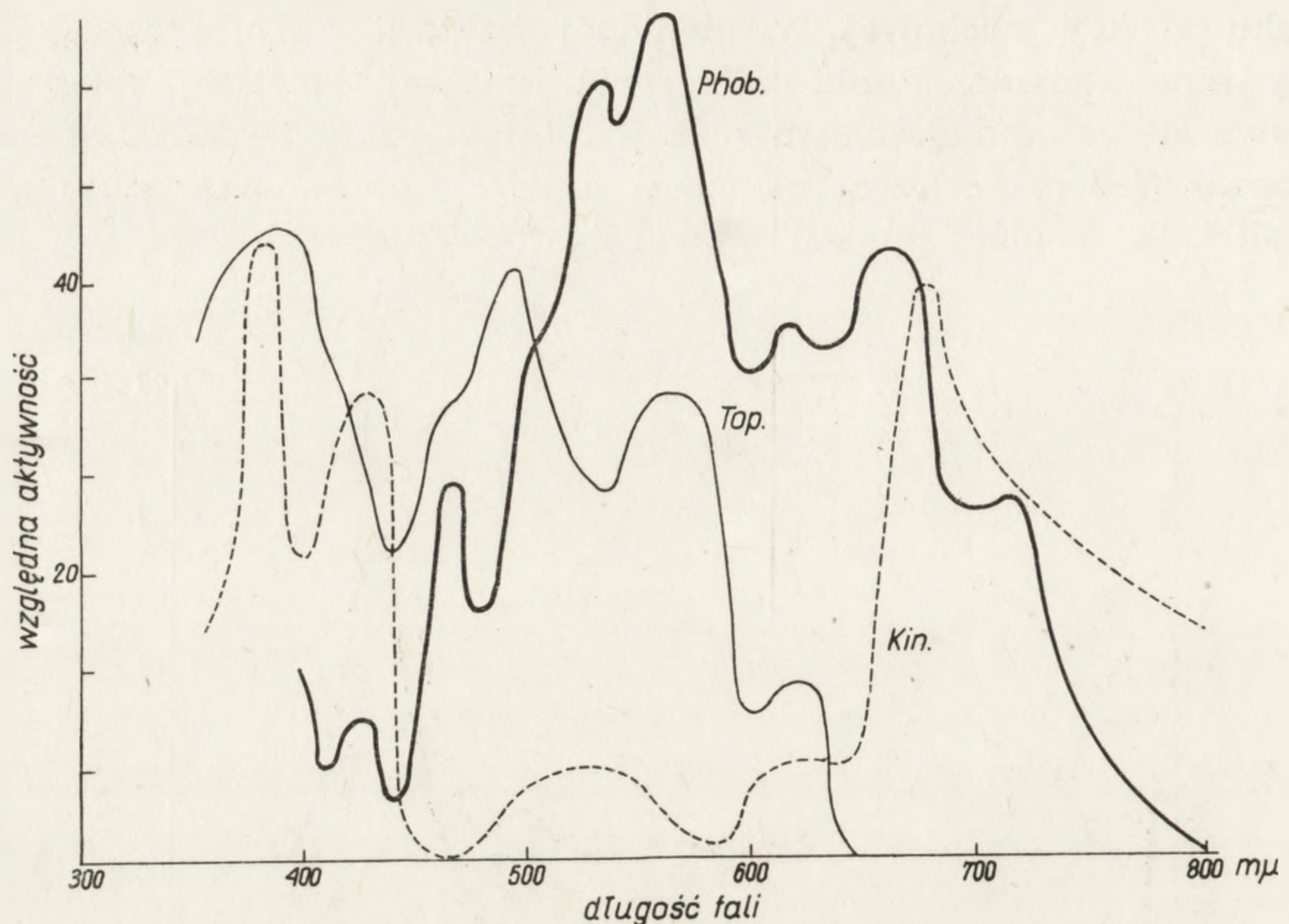
związku reakcji ruchowej wymienionej bakterii z fotosyntezą przyniosły inne badania. Punkt wysycenia krzywej świetlnej fotosyntezy pokrywa się ze zmniejszeniem reakcji fototaktycznej na kontrast światła. Prawo Webera-Fechnera mówiące, że $\Delta I/I = \text{const.}$ obowiązuje w fototaksji tylko poniżej punktu wysycenia fotosyntezy [5, 56].



Rys. 2. Widmo działania fotofobotaksji u *Rhodospirillum rubrum* (linia ciągła) oraz widmo absorpcyjne ekstraktu etanolowego barwników [38]

Badania Nultscha [40–45] nad różnymi typami reagowania na światło sinicy *Phormidium*, przyniosły również potwierdzenie roli barwników fotosyntetycznych w fotorecepcji światła. W badaniach tych wykazano jednak bardziej złożone stosunki, a mianowicie istnienie trzech systemów barwników fotosyntetycznych, związanych z poszczególnymi typami reakcji. System sterujący fototopotaksją związany jest z absorpcją światła w karotenach i fikobilinach [40], fotofobotaksja kontrolowana jest przez absorpcję w chlorofilu a i fikobilinach [40, 41, 43], natomiast fotokineza uzależniona jest wyłącznie od absorpcji w chlorofilu a [41–43] (rys. 3).

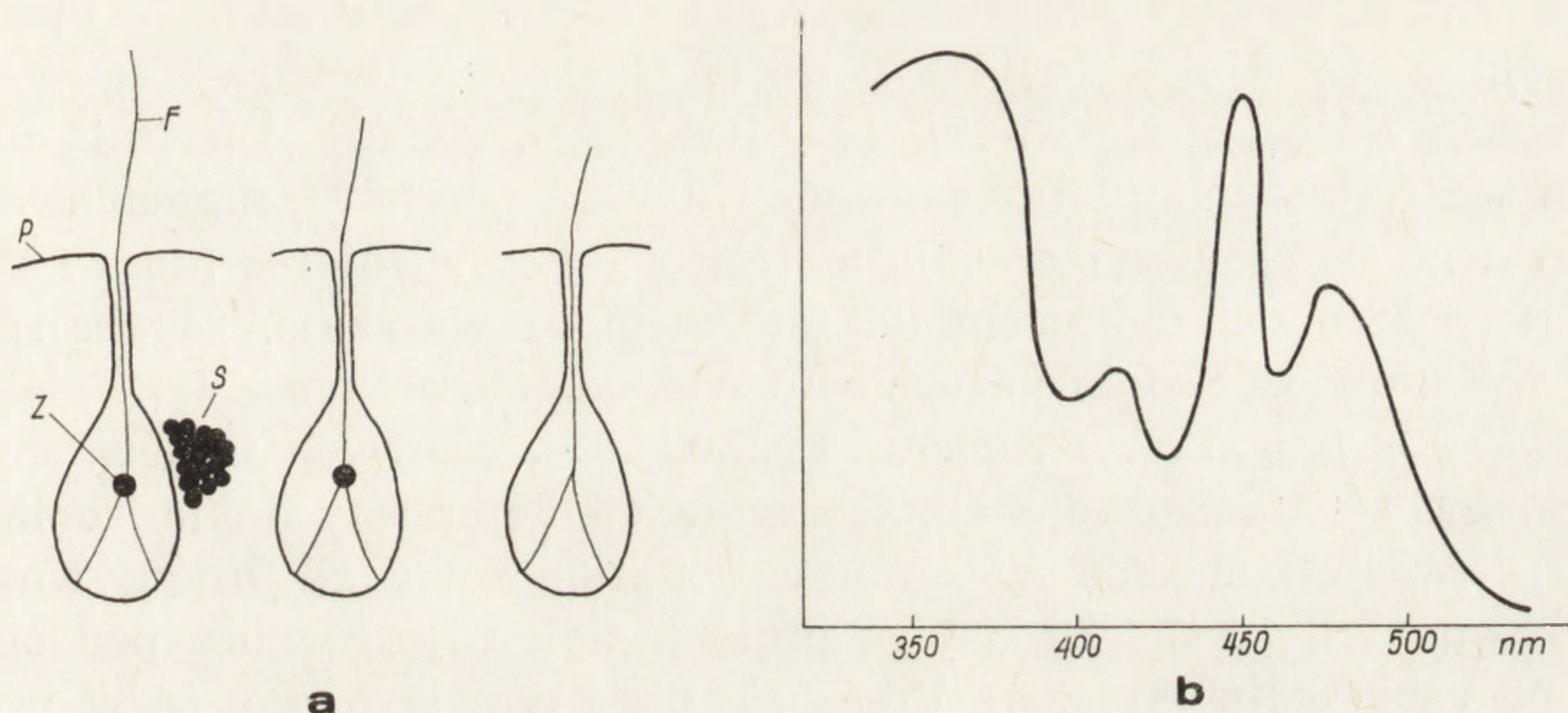
Wydaje się że proces topotaksji związany jest z natężeniem fotosyntezy, natomiast fobotaksja z nagłą zmianą w transporcie elektronów wywołującą reakcję szokową [45]. W fotokinezie nie można wykluczyć działania ATP produkowanego w fotosyntezie. Nie znamy bliżej mechanizmów sprzęgających poszczególne fotosystemy z reakcjami ruchowymi. Natomiast faktem stwierdzonym i występującym w zasadzie tylko u prokariotów, jest bezpośredni udział systemu fotosyntetycznego w kontrolowaniu reakcji ruchowych organizmu, związanych ze światłem.



Rys. 3. Widma działania: fototopotaksji (linia cienka), fotofobotaksji (linia gruba) i fotokinezy (linia przerywana) u *Phormidium uncinatum* [40, 41, 43]

Jednokomórkowe eukarionty, jak np. wiciowce, okrzemki, wykazują reakcje fototaktyczne najczęściej jedynie w zakresie krótkofalowym światła. W tym przypadku fotoreceptorem nie są już barwniki fotosyntetyczne, ale substancje absorbujące w bliskim ultrafiolecie i zakresie widzialnym do około 500 nm. Widma działania topotaksji i fobotaksji są często podobne, co nie wyklucza, że obie reakcje związane są z innymi szlakami metabolicznymi [19, 20, 44]. Ograniczmy się tu do opisanie reakcji obiektu dość dobrze poznanego, jakim jest *Euglena gracilis*. Ten piękny wiciowiec posiada zielone chloroplasty oraz zlokalizowaną w przedniej części ciała tzw. plamkę oczną (stigmę) o wymiarach ok. $2 \times 3 \mu\text{m}$, wykazującą intensywne czerwono-pomarańczowe zabarwienie. Zabarcwienie to pochodzi od obecności karotenoidów, głównie β karotenu i luteiny, co wykazano pomiarami mikrospektrofotometrycznymi in vivo [54]. Badania przy użyciu mikroskopu elektronowego wykazały, że stigma złożona jest z ok. 50 gęsto mozaikowato upakowanych globul o średnicy ok. $0,1 \mu\text{m}$ każda, przypominających krople tłuszczów. Mimo wysuwanych analogii plamki ocznej do fotoreceptorów oka zwierząt wyższych okazało się, że stigma nie jest fotoreceptorem. Już badania Engelmanna [10] polegające na lokalnym oświetlaniu komórki wykazały, że uczulenie na światło związane jest nie z oświetleniem stigmaty, ale z oświetleniem części podstawowej witki. Wić *Euglena* rozgałęzia się

u podstawy, a nad miejscem rozgałęzienia znajduje się małe zgrubienie o powierzchni ok. $0,3\mu\text{m}^2$ nie wykazujące pod mikroskopem widzialnego zabarwienia [9]. Zgrubienie to jest właściwą strukturą fotoreceptora. Potwierdziły ten wniosek badania Gössel [14], która wykazała, że mutant *Euglena* nie mający stigmaty, ale mający owo zgrubienie podstawowe zdolny jest do fototaksji, natomiast organizm pozbawiony zgrubienia wici nie reaguje na światło (rys. 4 a). Nie znamy ultrastruktury zgru-



Rys. 4. a — fragment przedniej części komórki *Euglena* normalnej, tj. zawierającej stigmę (S), i zgrubienie podstawowe wici (Z) oraz dwu mutantów: pozbawionego stigmaty, lecz posiadającego zgrubienie podstawowe i pozbawionego zarówno stigmaty i zgrubienia podstawowego (14, 56 zmienione), b — widmo działania fototopotaksji [7].

bienia podstawowego, natomiast godny podkreślenia jest fakt jego bezpośredniego kontaktu z wicią wykazującą w swej ultrastrukturze dominację elementów membranowych. Widmo działania ujemnej fototopotaksji wykazuje pewne rozbieżności w pomiarach wykonywanych przez różnych badaczy [8, 9, 14]. Opierając się na bardzo precyzyjnych pomiarach Diehna [9] można stwierdzić podobieństwo widma działania do własności optycznych ryboflawiny (rys. 4 b). Rola plamki ocznej polega na działaniu ekranującym. *Euglena* płynie ruchem obrotowym i jeżeli kierunek ruchu nie pokrywa się z kierunkiem promieni świetlnych, fotoreceptor (zgrubienie wici) otrzymuje impulsy światła przerywane okresami, w których stigma zaciemnia ciało podstawowe. Wysiwna się przypuszczenie, że stan wzbudzenia flawin i jego oddziaływanie na najbliższe otoczenie może wpływać na działalność pompy jonowej, utrzymującej normalny potencjał membranowy. Wytwarza się przy tym stan depolaryzacji, który wędruje wzdłuż membran fotoreceptora w wici [9]. Na marginesie tej hipotezy warto zaznaczyć, że badania fototaksji in-

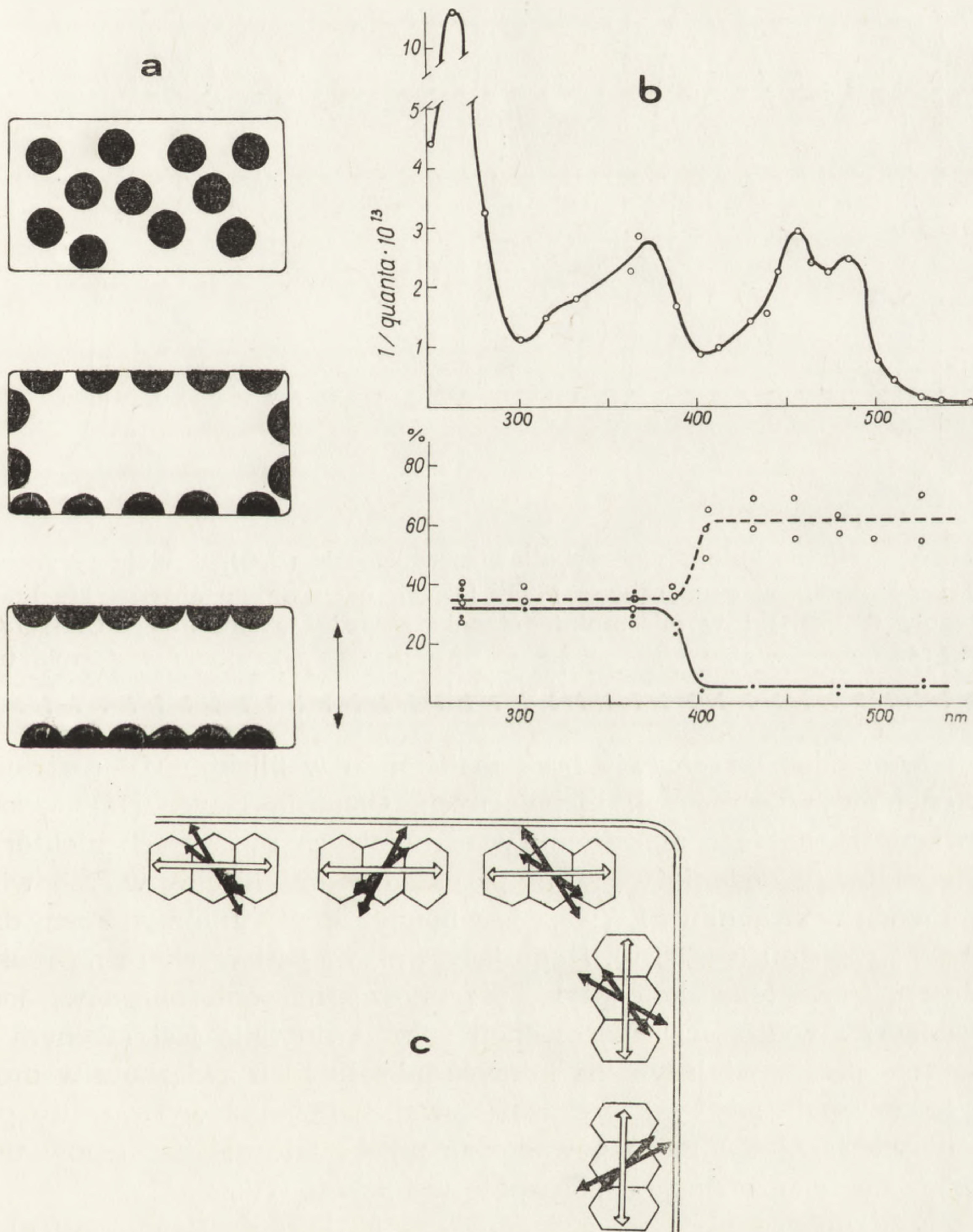
nego gatunku wiciowca *Platymonas* wykazały, iż reakcja tego organizmu na światło zależy od stosunków jonowych panujących w środowisku. Brak jonów Ca^{++} lub Mg^{++} wstrzymuje zupełnie ruch. Do normalnego, aktywnego ruchu konieczna jest również obecność jonów K^+ . Kierunek topotaksji zmienia się w zależności od stężenia jonów: przy stosunku $\text{Mg}/\text{Ca} > 6$ topotaksja jest dodatnia, przy mniejszym od 6 zmienia się na ujemną. Wobec jonów Mg i K topotaksja jest zawsze dodatnia, natomiast kombinacja jonów Ca i K daje wartość graniczną $\text{Ca}/\text{K} = 0,015$. Gdy jonów K jest więcej, fototaksja jest dodatnia, gdy mniej – ujemna [17, 19].

Euglena odznacza się wielką wrażliwością na światło. Dodatnią fototopotaksję wywołują już intensywności $3,3 \text{ erg cm}^{-2}\text{s}^{-1}$ promieniowania niebieskiego, co po uwzględnieniu małych wymiarów fotoreceptora i strat na absorpcję przed dotarciem do fotoreceptora wskazuje, że absorpcja już 4 kwantów jest zdolna uruchomić reakcję fototaktyczną [9].

Jednym z przykładów ruchów organelli komórkowych uzależnionych od światła są translokacje chloroplastów. Chloroplasty mają zdolność zmiany swego położenia w komórce w zależności od intensywności oświetlenia. Widmo działania tego procesu wykazuje również podobieństwo do ryboflawiny (rys. 5). Udało się przy tym wykazać, że w przypadku zastosowania światła spolaryzowanego, komórka wyczuwa kierunek polaryzacji i chloroplasty unikają w świetle silnym ścian bocznych, równoległych do wektora elektrycznego polaryzacji [37, 66, 69]. Jedyną strukturą, która zapewnia tak ściśle ukierunkowanie fotoreceptora, konieczne do wytłumaczenia opisanej reakcji na światło spolaryzowane, jest zewnętrzna błona protoplastu (plazmalemma) [66]. Wysłunięta ostatnio hipoteza dotycząca mechanizmu recepcji bodźca świetlnego [68] zakłada, że absorpcja światła aktywuje enzym zlokalizowany w zewnętrznej membranie protoplazmatycznej, enzym związany z FMN, a prowadzący dezaminującą oksydację glicyny [50, 51]. Z reakcji chloroplastu na światło spolaryzowane różnej długości fali wynika, iż układ pierścienia izoalloksazynowego ryboflawiny jest ściśle określony w stosunku do powierzchni membrany. Jeden z produktów reakcji, prawdopodobnie aldehyd glikolowy zmienia własności wewnętrznego środowiska komórki, powodując że miejsca o optymalnym stężeniu tego związku stają się punktem atrakcji dla chloroplastów. Wykazano [13] dodatni, chemotaktyczny wpływ aldehydu glikolowego. Warto zaznaczyć, że układ regulujący pozycję chloroplastów jest również bardzo czuły na oświetlenie i pewne przesunięcia można stwierdzić już w intensywnościach rzędu $0,1 \text{ erg cm}^{-2} \text{ s}^{-1}$.

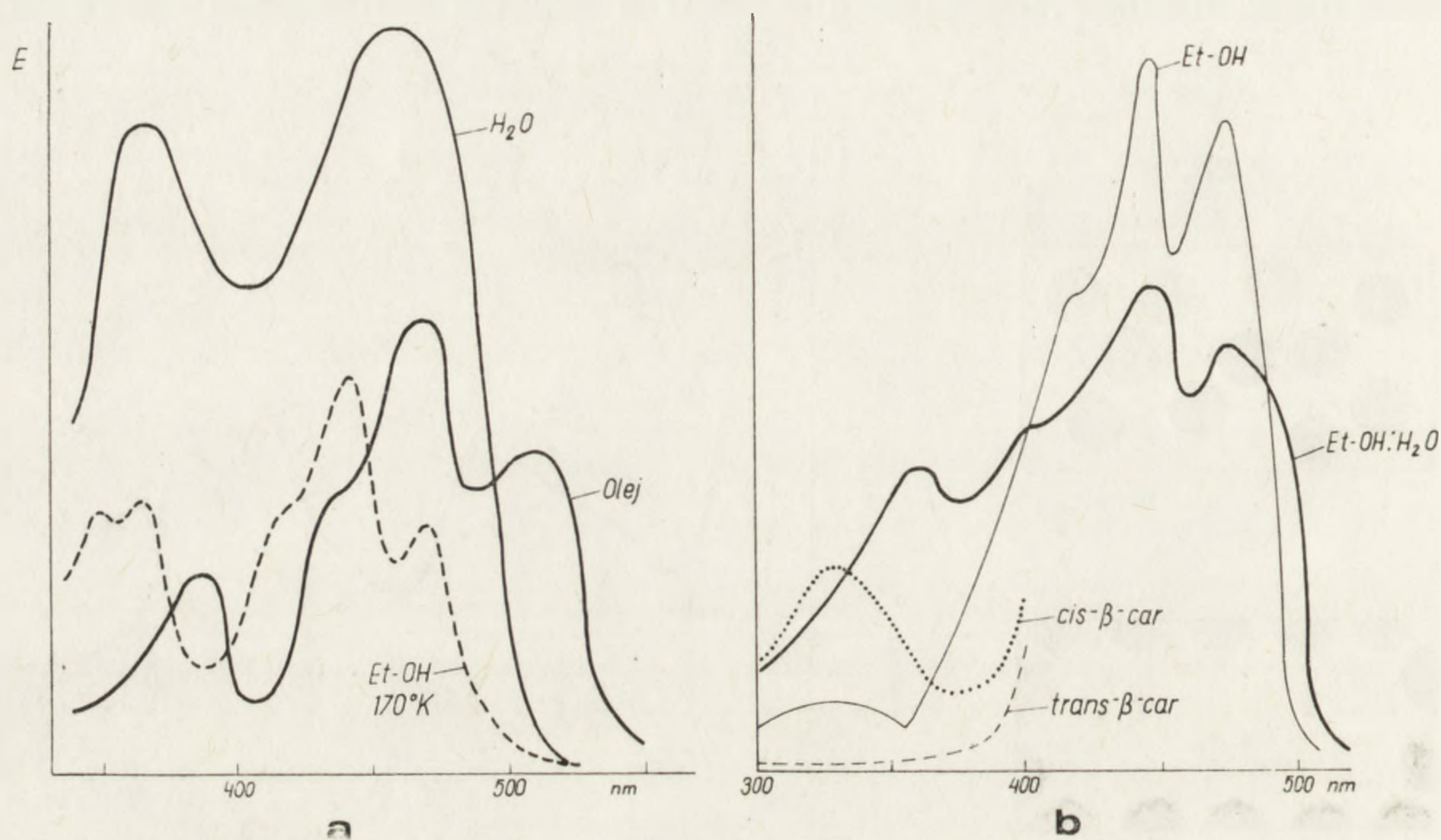
W opisanych powyżej przypadkach fototaksji *Euglena*, ruchów chloroplastów i wielu innych fotoreakcjach – widma działania są wzajemnie

podobne. Przypominają one widma absorpcyjne roztworów flawin, a także karotenoidów, choć nie są identyczne z żadnym z nich. W związku z tym ciągle dyskutowana jest kwestia, czy flawiny czy też karotenoidy grają rolę fotoreceptorów w tych procesach. Przeciw flawinom przemawia obok małego ich stężenia brak maksimum absorpcji przy długo-



Rys. 5. a — schemat układu chloroplastów w komórce *Funaria* w świetle słabym, w świetle silnym i w świetle silnym spolaryzowanym liniowo. Strzałka wskazuje płaszczyznę wektora elektrycznego polaryzacji, b — widmo działania światła w translokacji chloroplastów (u góry) i widmo wrażliwości na kierunek polaryzacji (u dołu) [66], c — hipotetyczny układ cząsteczek ryboflawiny [68]

falowym krańcu absorpcji, tj. ok. 480–500 nm. Maksimum takie pojawia się jednak w flawinach, gdy rozpuszczone są w roztworach apolarnych [55], lub gdy badamy ich widma niskotemperaturowe [9] (rys. 6 a). Prze-



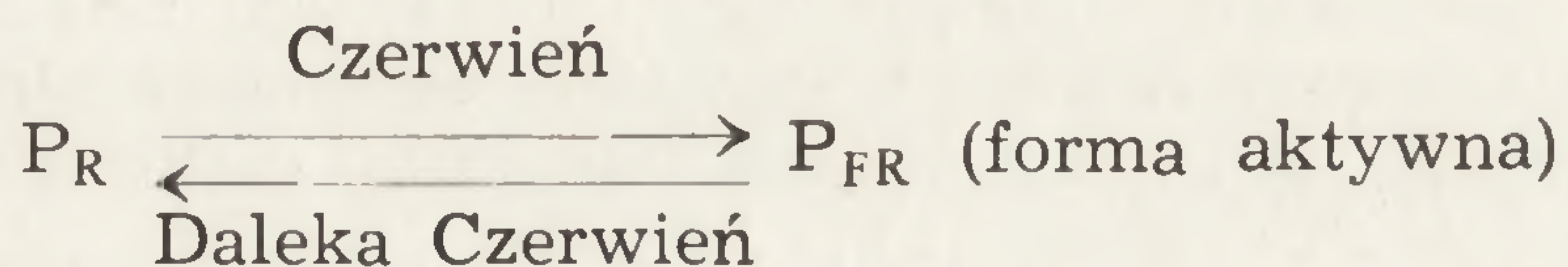
Rys. 6. a — widmo absorpcyjne ryboflawiny w wodzie (H₂O), w oleju rycynowym (olej) i w etanolu w temperaturze 170°K [55, 8]. b — widmo absorpcyjne luteiny w etanolu (Et—OH) i w mieszaninie etanolu z wodą w stosunku EtOH: H₂O = = 54,7:45,3 oraz widmo absorpcyjne w bliskim UV β-karotenu w formie trans i cis [2, 15]

ciw karotenoidom przemawia brak maksimum w bliskim UV roztworów karotenoidów w ośrodkach niepolarnych. Ostatnio Hager [15] wykazał pojawianie się takiego maksimum w etanolowych roztworach niektórych karotenoidów po dodaniu wody; na przykład widmo luteiny w środowisku etanol:woda w stosunku 54,7:45,3 jest niemal identyczne z widmem działania fototropizmu (rys. 6 b). Hamujący wpływ, jaki wywiera na reakcje fotorecepcji (*Euglena*, koleoptyle, przemieszczenia chloroplastów) jodek potasu znany wygaszacz fluorescencji ryboflawiny nie jest mocnym argumentem przemawiającym na korzyść udziału tych związków w procesach fotorecepcji, gdyż jak wykazał Kowallik [32] jod wytwarzany podczas naświetlania KJ może powodować przekształcenie karotenów trans w formy cis, a te wykazują absorpcję w bliskim UV.

Poważnymi argumentami świadczącymi na korzyść flawin jest a) ich rola jako koenzymów [53]. Wiele enzymów zawierających pochodne flawin (FMN lub FAD) zmienia swą aktywność pod wpływem światła [50, 51, 33, 34]. Natomiast karotenoidy nie wchodzą w skład enzymów; b) wykazanie ścisłej korelacji między reakcją chloroplastów na światło

spolaryzowane różnej długości fal [66], a usytuowaniem wektorów przejścia w cząsteczce ryboflawiny [35]. Jakkolwiek potoczą się dalej losy omawianej dyskusji, godny podkreślenia jest fakt, że zarówno hipoteza flawinowa, jak i karotenoidowa zakłada zmianę własności optycznych barwników w związku z ich występowaniem w specyficznych warunkach. Warunki takie stwarza lokalizacja barwników w błonach*.

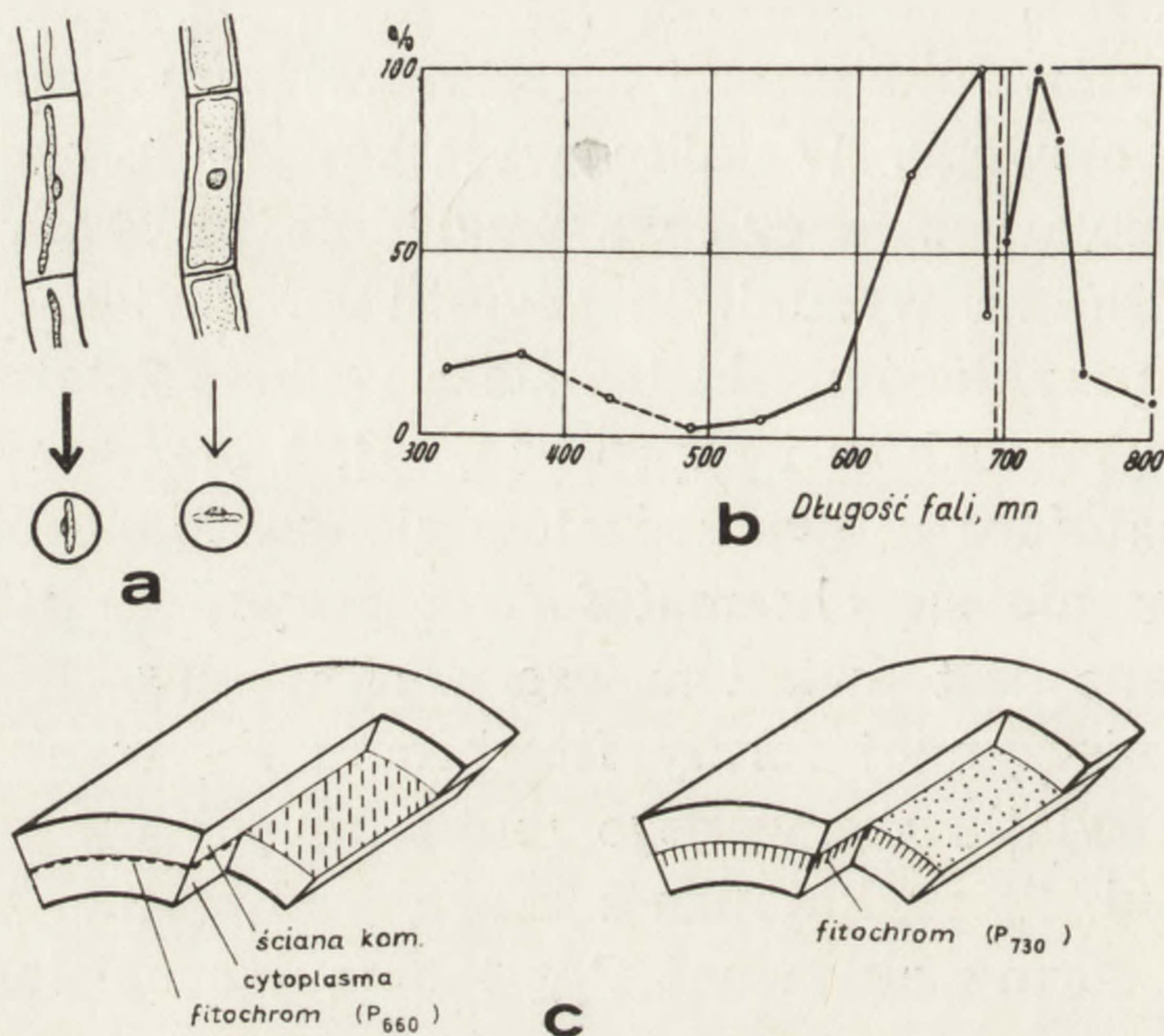
Wiele przykładów fotorecepcji u roślin związanych jest z aktywnością systemu fitochromowego. W kilku wyjątkowych przypadkach, zastosowanie światła spolaryzowanego we względnie prostych układach biologicznych pozwoliło na wysunięcie sugestii co do lokalizacji fitochromu w komórce. Do przykładów takich należą reakcja fototropiczna komórek spletków niektórych mchów i paproci [4, 11], a przede wszystkim zmiany położenia chromatoforu u dwu rodzajów glonów *Mougeotia* i *Mesotenium* [22–27]. Przekręcenie się chromatoforu z pozycji profilowej do pozycji płaskiej sterowane jest światłem czerwonym (rys. 7 b) powodującym przekształcenie nieczynnej formy fitochromu P_R w aktywną P_{FR} . Stymulujący efekt światła czerwonego można znieść następczym impulsem dalekiej czerwieni, który katalizuje reakcję odwrotną, zmniejszając tym samym stężenie formy aktywnej P_{FR} i hamując działanie światła czerwonego



Zastosowanie światła spolaryzowanego oraz punktowych naświetlań komórki wykazały, że cząsteczki fitochromu zlokalizowane są w zewnętrznej warstwie cytoplazmy (prawdopodobnie w kompleksie membrany) oraz że wykazują one wybitne ukierunkowanie. Forma P_R ustawiona jest swym wektorem absorpcji równolegle do ściany komórkowej, natomiast forma P_{FR} wykazuje położenie wektora absorpcji prostopadle do poprzedniego [11, 23, 24, 25, 26] (rys. 7 c). Za zmianę taką odpowiedzialne jest przypuszczalnie przejście rozprostowanego łańcucha tetrapyrrolowego, który jest podstawowym składnikiem P_R w formę „zagiętą” cis-trans lub cis-cis występującą prawdopodobnie w formie fitochromu P_{FR} . Z tą zmianą stereoizometrii może wiązać się inne położenie wektora absorpcji cząsteczki. Jednakże, jak podkreśla Haupt [23], utrzymanie uporządkowania cząsteczek barwnika przy przejściach stereoizometrycznych, możliwe jest tylko wówczas, gdy jedna strona łańcucha bilansowego związana jest z białkiem, którego pozycja jest ustalona

* Istnieją również poglądy negujące rolę zarówno flawin, jak i karotenoidów w wymienionych zjawiskach fotorecepcji [21].

w przestrzeni. Za lokalizacją cząsteczek fitochromu w plazmalemmie przemawiają związki między absorpcją światła w tym barwniku a zmianą takich właściwości jak potencjał membranowy lub stopień przepuszczalności, a więc parametrami regulowanymi przez właściwości zewnętrznej błony cytoplazmatycznej [30, 60].

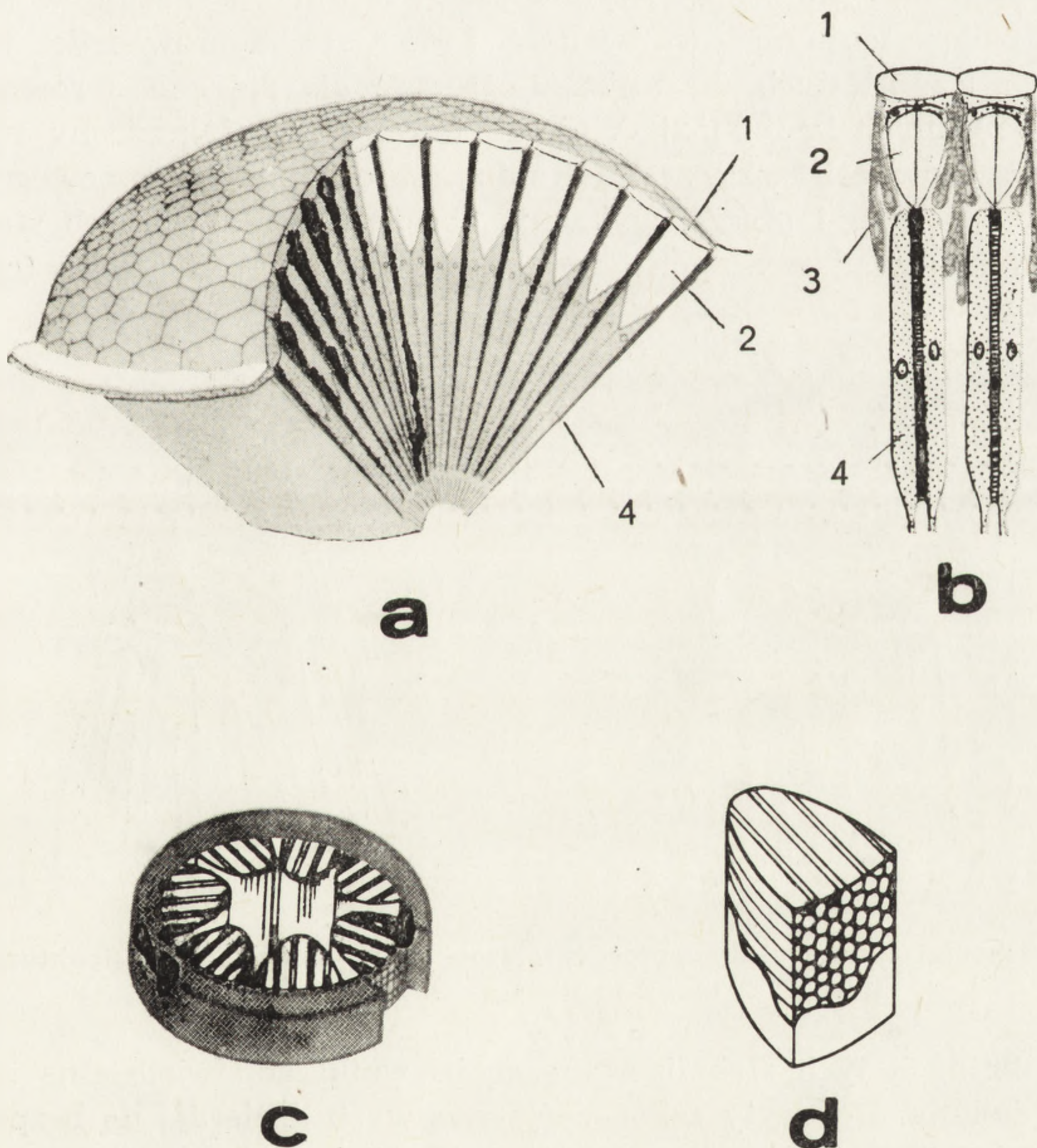


Rys. 7. a - Zmiana położenia płytkowatego chromatoforu w komórce *Mougeotia* w zależności od natężenia światła, b — widmo działania światła stymulującego i hamującego reakcję [22], c - hipotetyczny układ cząsteczek fitochromu PR i PFR [25].

Wśród zwierząt najważniejszym zjawiskiem fotorecepcji jest bez wątpienia proces widzenia. Organem fotorecepcji jest w tym przypadku oko. Nie będziemy wchodzić bliżej w ewolucję struktury oka, które ulega stopniowej komplikacji i udoskonaleniu od pojedynczej komórki epitelialnej wrażliwej na światło, że do złożonych struktur oka kręgowców czy stawonogów [36, 55, 61, 63]. Rozpatrzmy tylko zagadnienie związku fotorecepcji ze strukturami membranowymi na dwu przykładach wysoko wyspecjalizowanych organów wzrokowych reprezentujących dwa różne kierunki ewolucyjne.

Oczy stawonogów są przykładem oka złożonego, przy czym wysoki stopień organizacji występuje dopiero u owadów. Oko takie składa się z wielu (np. u *Drosophila* z ok. 700) stożkowatych, radialnie ustawionych oczek elementarnych (ommatidiów), których strukturę przedstawiono na rys. 8. Każde ommatidium ma skupiające światło ciało kryształiczne i komórki barwnikowe, które dzięki zdolności zmieniania kształtu mogą modyfikować intensywność światła docierającego do głębiej położonej komórki wzrokowej. W budowie komórki wzrokowej wyróżnić można 7 ustawionych radialnie właściwych elementów foto-

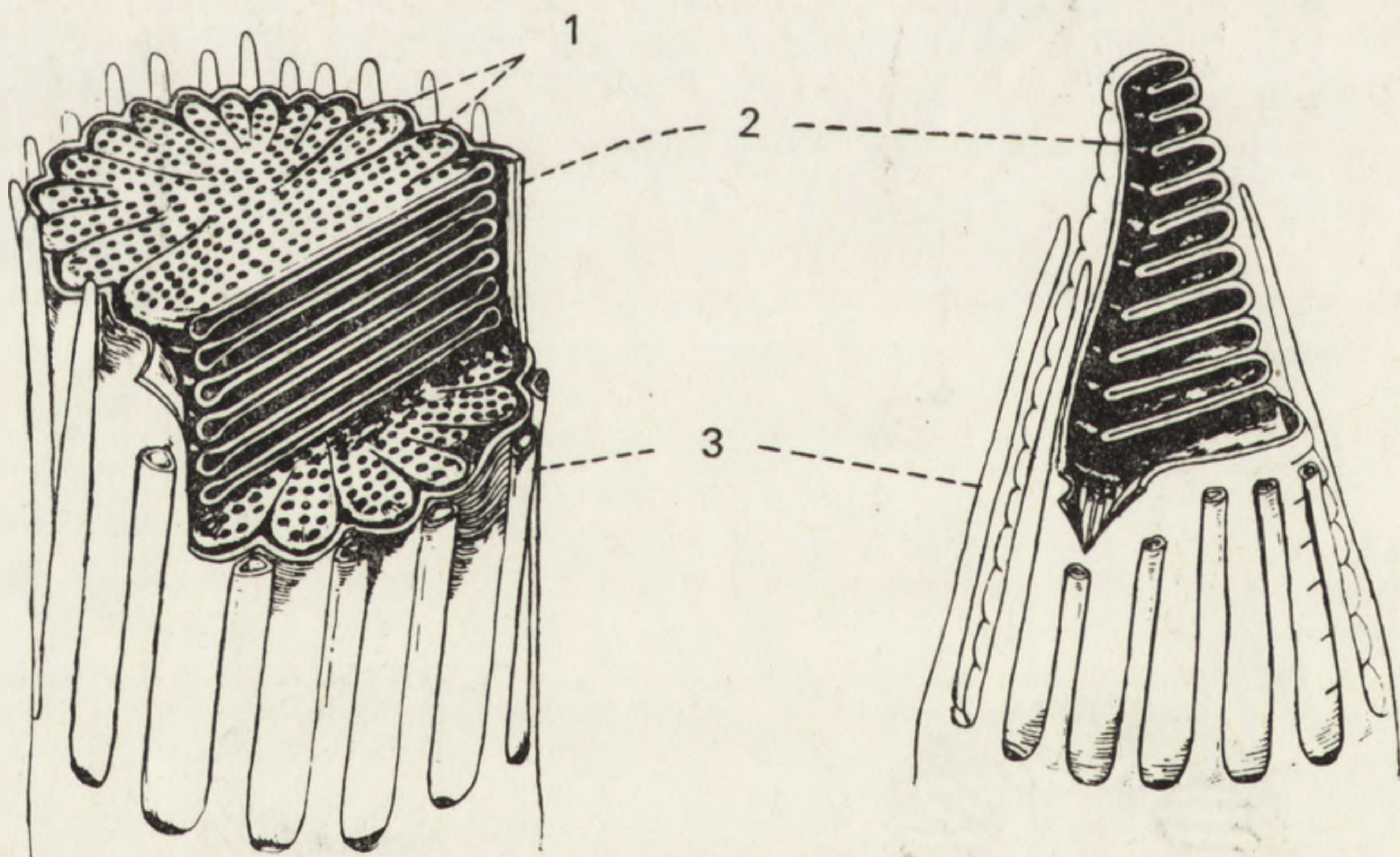
repcji — rhabdomerów. Każdy rhabdomer ma średnicę ok. $1\ \mu\text{m}$ i długość do $60\ \mu\text{m}$, a jak wykazały badania jego ultrastruktury, złożony jest z gęsto upakowanych i zawsze radialnie ustawionych rurkowatych struktur błoniastych. Rurki (tubule) mają średnicę zewnętrzną $200\text{--}400\ \text{Å}$, a grubość ścianki ok. $100\ \text{Å}$. Z rhabdomerów wyizolowano barwnik — rodopsynę, a więc analogiczny do występujących u zwierząt kręgowych. Absorpcja światła w rhabdomerach prowadzi do powstania we włóknie nerwowym dochodzącym do komórki wzrokowej specyficznych zmian dających sygnał nerwowy, którego obraz w odprowadzeniu nazywamy elektroretinogramem (e.r.g.). W szczególnych przypadkach można odprowadzenia dokonać z pojedynczej komórki wzrokowej [31]. Zdolność



Rys. 8. *a* — schemat budowy oka złożonego u owadów, *b* — przekrój dwóch ommatidiów: 1 — soczewka, 2 — ciało krystaliczne, 3 — komórki barwnikowe, 4 — rhabdomery (wg Kuhna z 61), *c* i *d* — schemat ultrastruktury rhabdomerów [63]

owadów do odczuwania kierunku polaryzacji światła [1] wskazuje, że cząsteczki barwnika ułożone są w rurkach rhabdomeru w sposób regularny i uporządkowany.

Oko kręgowców ma bardziej złożoną budowę. Ma ono w części przedniej ciało soczewkowane, rzutujące geometrycznie obraz na dno oka i mogące zmieniać swe położenie dzięki mięśniom soczewkowym, co umożliwia akomodację oka dla ostrego odwzorowania obrazów leżących w różnej odległości. Przed soczewką znajduje się tęczówka, której stopień rozwarcia zmienia natężenie światła wchodzącego do oka. Istotnym elementem jest wyścielająca dno oka siatkówka, w której jednostkami czułymi na światło są mozaikowato rozmieszczone pręciki i czopki połączone z zakończeniami włókien nerwowych. Największe pręciki (z siatkówki oka żaby) mają wymiary $6 \times 55 \mu\text{m}$ i wykazują w mikroskopie polaryzacyjnym dwójłomność formy, co doprowadziło jeszcze w latach trzydziestych do wniosku, że składają się one z równoległe uporządkowanych lamel [52]. Wniosek ten został potwierdzony w późniejszych badaniach przy zastosowaniu mikroskopu elektronowego. Zarówno czopki, jak i pręciki wykazują obecność pofałdowanych struktur błoniastych lub spłaszczonych i gęsto nad sobą leżących cystern (rys. 9).



Rys. 9. Schemat ultrastruktury pręcika i czopka: 1 – wewnętrzne struktury błoniaste, 2 – błona zewnętrzna, 3 – dendryty [59]

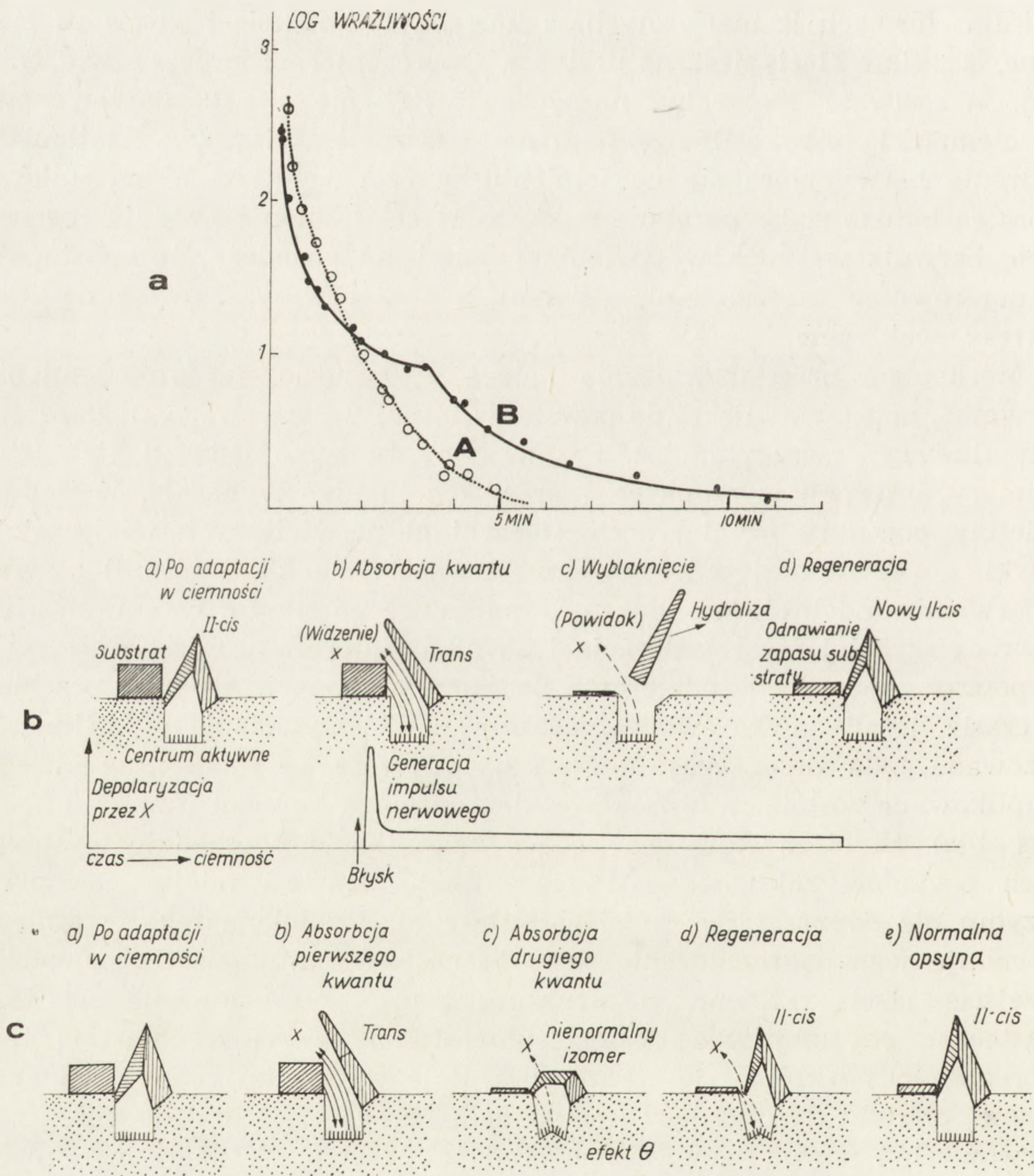
W membranach tych zlokalizowane są barwniki odpowiedzialne za absorpcję światła. Dendryty zakończeń nerwowych docierają do bezpośredniego sąsiedztwa struktur membranowych. Aktywność pręcików związana jest z wrażliwością na intensywność światła (szczególnie niskich intensywności — widzenie skototropowe), natomiast czopki związane są z systemem widzenia barw (widzenie fototropowe).

W elementach błoniastych pręcików i czopków zlokalizowane są barwniki fotoreceptorowe. Posiadają one w zakresie widzialnym jednowierzchołkowe widmo absorpcji, dość szerokie (szerokość połówkowa ponad 100 nm). Najłatwiej ekstrahowalna jest rodopsyna — chromoproteid złożony z komponenty białkowej opsyiny i komponenty barwnej — retinenu. Retinen jest pochodną aldehydową witaminy A, jego sposób związania z białkiem został wyjaśniony [6, 39]. Retinen może występować w kilku formach izomerycznych, z których tylko 9-cis i 11-cis są stabilne, a tylko 11-cis jest naturalnym fotoreceptorem procesu widzenia [29]. Wrażliwość spektralna na słabe oświetlenie oka zaadaptowanego do ciemności jest zgodna z widmem absorpcji rodopsyny. Natomiast widzenie barw opiera się na istnieniu w czopkach trzech barwników, które są bardzo słabo poznane. Fakt, że 11-cis retinen powoduje regenerację barwników czopków po ich wyblaknięciu świadczy, że substancja ta ma również znaczenie dla działania receptorów wrażliwych na trzy zakresy spektralne.

Mechanizm procesu widzenia polega w zasadzie na fotoprzemianie barwnika, doprowadzającej do powstania impulsu nerwowego. Jego szczegóły tłumaczy szereg hipotez. Przytoczmy tu tylko jedną z nich [49]. Pomiar absorpcji w czopkach i pręcikach *in vivo* wykazały, iż impuls świetlny powoduje wyblaknięcie (bleaching) naświetlonych miejsc siatkówki, po czym następuje powolny (trwający do kilku minut) powrót zabarwienia. Zdolność do widzenia, zanikająca po silnym błysku światła, powraca szybciej niż regeneracja barwnika. Interesujące jest przy tym, że powrót zdolności do odbierania bodźców świetlnych ma inny przebieg w czasie, jeżeli dawka światła zastosowana do wywołania wyblaknięcia dozowana była przez czas dłuższy, a inny gdy ta sama ilość energii zaaplikowana została w formie krótkiego, silnego impulsu (tzw. θ effect) (rys. 10a). Hipoteza Rushtona będąca modyfikacją poprzednio wysuwanych poglądów zakłada, że 11-cis retinen zakrywa miejsce aktywne enzymu nie dopuszczając do niego substratu. Produkcja tego ostatniego powoduje jego nagromadzenie się. Absorpcja kwantu światła powoduje przejście 11-cis retinenu w strukturę trans, wyprostowanie się jego cząsteczki, co umożliwia dostęp substratu do enzymu. Substrat ten, którego zapas wkrótce się wyczerpuje, daje w wyniku reakcji enzymatycznej produkt dyfundujący (maksymalna droga ok. 1 μm) do zakończeń nerwowych i powodujący w nich stan pobudzenia. Trans retinen ulega dysocjacji (bleaching), wędruje poza czopki czy pręciki i wraca w formie 11-cis wchodząc ponownie w połączenie z białkiem (rys. 10b). Jeżeli w okresie silnego oświetlenia nastąpi w tej samej cząsteczce retinenu absorpcja dwóch kwantów światła, powstaje nowa „nienormalna” forma izomeryczna retinenu, zawierająca dwa wiązania cis, która szybko blokuje

dostęp substratu do enzymu, a następnie dopiero wolno przekształca się w formę 11-cis (rys. 10c).

Nie wnikając głębiej w fizjologię procesów widzenia możemy stwierdzić, że zjawisko to związane jest z absorpcją światła w elementach membranowych (rurkowatych u stawonogów, płaskich u kręgowców). Podobny związek procesów fotorecepcji z strukturami błoniastymi wy-



Rys. 10. a – szybkość regeneracji zdolności do percepcji bodźca świetlnego (oś y – logarytm progu wrażliwości) po jednakowej dozie światła zastosowanego w czasie 10 sek. (linia przerywana) lub w formie błysku 100 μ s (linia ciągła), b – hipotetyczny przebieg procesów następujących po absorpcji jednego kwantu światła, c – podobny obraz dotyczący absorpcji dwu kwantów w bardzo krótkim okresie [49]

nikał z podanych poprzednio przykładów. Nie wiemy czy fotorecepcja jest zawsze związana z lokalizacją barwników w strukturach błoniastych, gdyż zjawiska te nie są dostatecznie poznane. Nie ulega jednak wątpliwości, że błony odgrywają, jeśli nie we wszystkich to na pewno w większości najważniejszych zjawisk fotorecepcji, istotną rolę.

KONSEKWENCJE FIZYCZNE ZWIĄZANE Z LOKALIZACJĄ BARWNIKÓW W BŁONACH

Powszechnie spotykane umiejscowienie barwników fotoreceptorowych w membranach nasuwa przypuszczenie, że układy takie są szczególnie korzystne dla przebiegu procesów związanych z fotorecepcją. Ewentualnego wyjaśnienia tego faktu należy szukać w zjawiskach odbywających się na poziomie molekularnym.

a) Struktura i własności błon biologicznych wskazują, że w skład tych elementów wchodzi zarówno lipidy, jak i białka i że niektóre cechy błon upodobniają je do właściwości ciała stałego. Fakty te mają poważne konsekwencje dla omawianego przez nas problemu. Z jednej strony możliwa jest teoretycznie lokalizacja cząstek barwnika albo w fazie lipidowej, albo białkowej lub wreszcie na granicy tych faz, co ma wpływ modyfikujący na własności optyczne barwników. Z drugiej strony własności ciała stałego mogą również modyfikować cechy barwników. Zagadnienia te omówiono na przykładzie zilustrowanym na rys. 6.

b) Lokalizacja barwników w błonach sprzyja ich koncentracji i uporządkowaniu. Barwniki fotoreceptorowe występują często w komórce w małym stężeniu. W takim przypadku, ich rozproszenie w komórce uniemożliwiłoby wzajemne oddziaływanie cząsteczek barwników. Lokalizacja w błonach i to błonach specjalnego typu (organelli fotoreceptora) powoduje, że drobiny barwników zostają skoncentrowane na małej przestrzeni i zlokalizowane blisko siebie. Fakt ten umożliwia

1) rezonansowe przenoszenie energii wzbudzenia między cząsteczkami [64],

2) wzajemne oddziaływanie mogące prowadzić do zmian własności absorpcyjnych systemu w porównaniu z własnościami absorpcyjnymi swobodnych drobin. Jako przykład tego ostatniego typu oddziaływania przytoczymy rozważania teoretyczne, oparte na zastosowaniu modelu ekscytonowego dla monomolekularnych systemów lamelarnych [28]. Zakładając luźny (oparty na oddziaływaniach Van der Waalsa), ale uporządkowany układ drobin, obliczono dla szeregu sposobów uporządkowania, wpływ ukierunkowania dipoli cząsteczek i ich wzajemnych odległości na widmo absorpcyjne. Absorpcja systemu lamelarnego może być istot-

nie różna od absorpcji wolnych cząsteczek. Można to ująć ogólnym wzorem

$$\Delta E_{\text{lam}}(k) = \Delta E_{\text{vap}} + \Delta D + \varepsilon(k),$$

gdzie ΔE_{lam} i ΔE_{vap} oznaczają energię przejścia dla danego poziomu k dla cząsteczek w układzie uporządkowanym i w zupełnej izolacji, ΔD — różnicę w energii oddziaływania drobin w stanie podstawowym i wzbudzonym (ΔD ma liczbowo małe znaczenie przy dużych ΔE), a współczynnik ε zależy od geometrii rozmieszczenia dipoli. Rysunek 11 podaje kilka przykładów

a) dla regularnego układu dipoli w płaszczyźnie wartość $\varepsilon = -4,2 \frac{e^2/d^2}{a^3}$, gdzie e — ładunek elektronu, d — długość dipola przejścia elektronowego, a — odległość między centrami drobin. W konsekwencji daje to przesunięcie widma absorpcji ku długofalowej części widma;

b) przykład, w którym dipole ustawione są prostopadle do rozpatrywanej płaszczyzny. Wartość ε wynosi w tym przypadku $+8,4 \frac{e^2/d^2}{a^3}$, co daje silne przesunięcie ku krótkofalowej części widma;

c) układ staje się bardziej skomplikowany, jeżeli dipole ustawione są skośnie, jednakże w różną stronę w poszczególnych rzędach. Wzór określający ΔE_{lam} ma postać dość złożoną i zależną od kątów Θ_z . Rezultaty dla $\Theta_z = 90^\circ$ i 0° przedstawiono na rysunku. Stwarzają one możliwość zarówno przesunięcia widma absorpcyjnego, jak i jego poszerzenia i rozmycia.

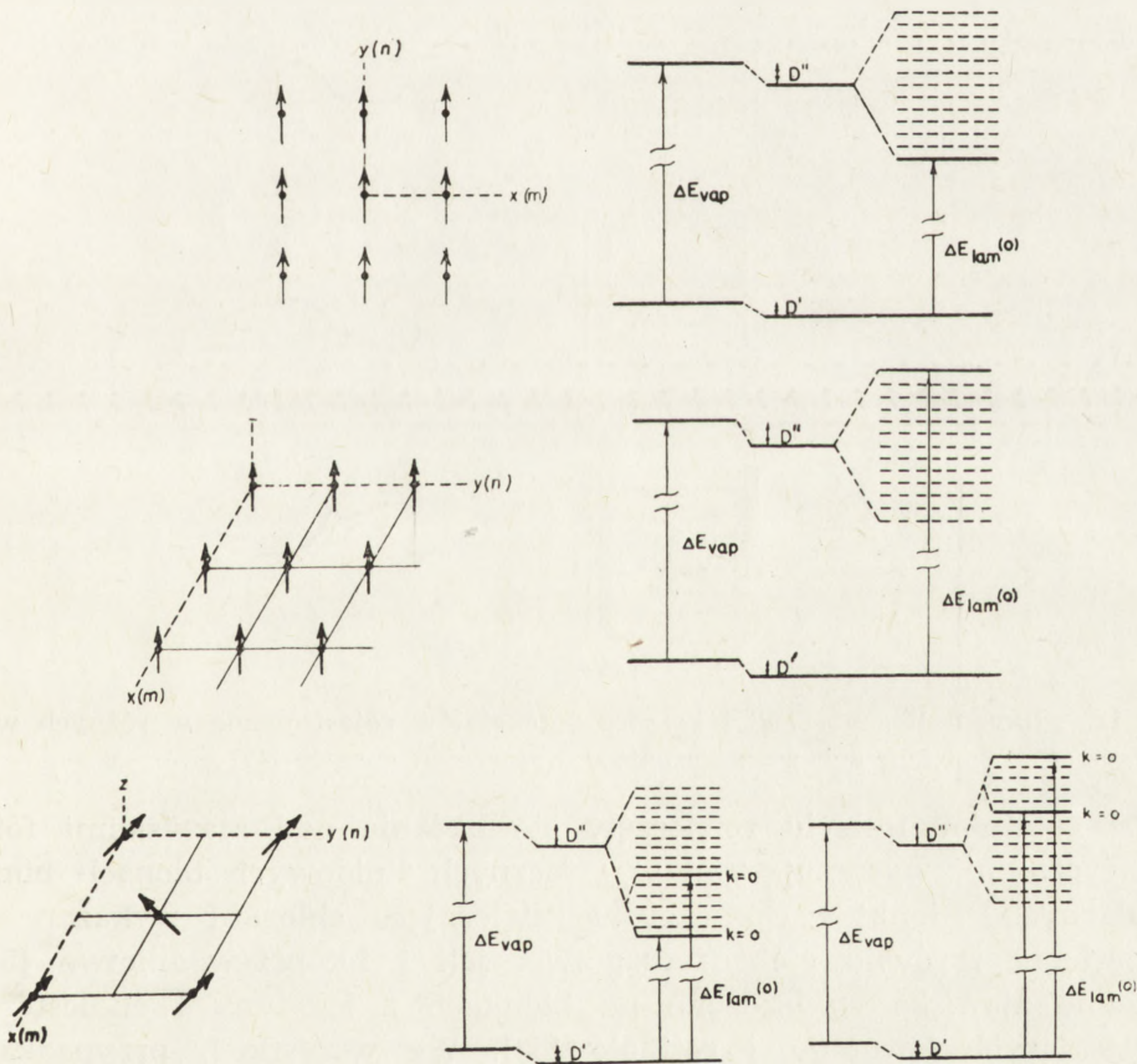
Jednym z następstw regularnego układu drobin absorbujących promieniowanie w układach membranowych, jest często spotykana zależność reakcji fotorecepcji od kierunku polaryzacji światła. Zjawisko to nie ma przypuszczalnie fundamentalnego znaczenia dla istoty fotorecepcji — jest raczej konsekwencją uporządkowanego układu drobin barwników, wynikającego z ich zlokalizowania w błonach. Wtórnie zostało ono wykorzystane w percepcji bodźca świetlnego u owadów. Znane doświadczenia Frischa nad zachowaniem się pszczół [12], wykazały ogromną rolę odczuwania kierunku i stopnia polaryzacji naturalnego promieniowania dla ich orientacji w przestrzeni. Podobne zjawisko stwierdzono dla innych owadów [62].

Absorpcja światła w barwnikach zlokalizowanych w membranach stwarza możliwość powstania lub zmiany istniejącego już potencjału membranowego. Wykazano to m. in. badając skrawki siatkówki kałamarnicy (*Limulus*) [16]. Wprowadzenie mikroelektrody do wnętrza czopka wykazuje potencjał membranowy rzędu 10–50 mV, który zmienia się po oświetleniu. Zmiana ta zależna jest od położenia elektrody i jest naj-

większa w końcowej części czopka, a najmniejsza w jego części stykającej się z komórką podstawową. Fakt ten wskazuje na to, że nie mamy tu do czynienia jedynie ze zmianą potencjału membranowego całej komórki, ale z gradientem potencjału generowanym w warstwie cystern fotoreceptora.

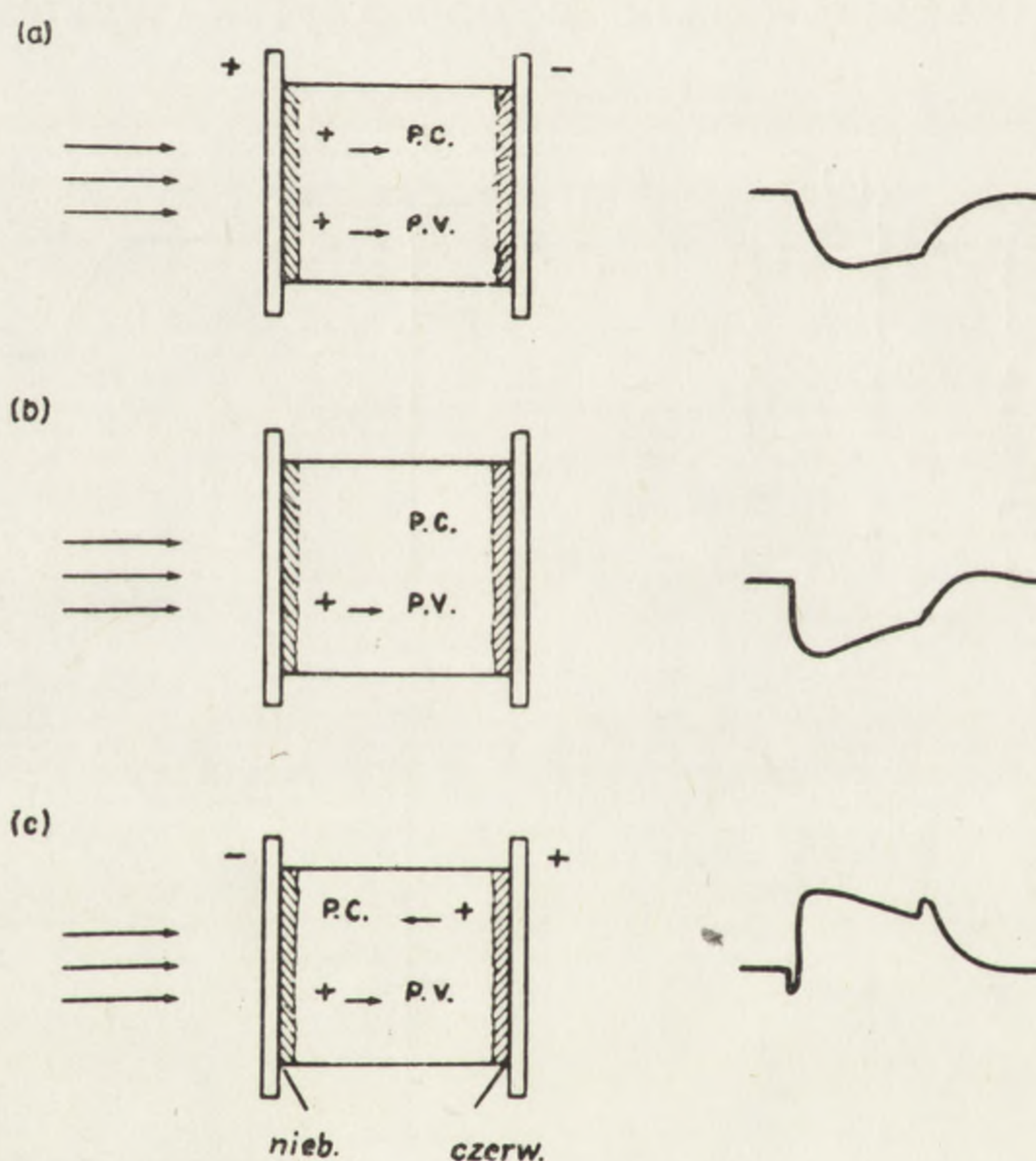
Na marginesie badań *in vivo* — stwarzających znaczne trudności zarówno w technice wykonania, jak i interpretacji wyników, warto wspomnieć o studiowaniu procesów fotoelektrycznych w sztucznych układach modelowych. Z wielu prac o tej tematyce wymienimy tylko kilka.

Rosenberg [47] opracował układ zwany „photoconductive sandwich cell” złożony z dwóch płytek szklanych pokrytych homogeniczną warstwą β karotenu, a przedzielonych bezbarwnym ośrodkiem przewodzącym prąd. Odprowadzenie elektryczne z obu płytek wykazuje charaktery-



Rys. 11. Wpływ usytuowania dipoli cząsteczek barwnika (strona lewa) na zmianę ΔE układu lamelarnego w porównaniu do ΔE swobodnych cząstek barwnika. Bliższe objaśnienie w tekście [28]

styczne zmiany potencjału następujące po jednostronnym oświetleniu „komórki” (rys. 12). Przy braku przyłożonego potencjału zewnętrznego (część środkowa rysunku) odprowadzenie daje obraz potencjału generowanego przez sam układ (zjawisko fotoogniwa). Przy istniejącym potencjale zewnętrznym mamy do czynienia z nakładaniem się dwóch efektów: fotoprzewodnictwa (proces szybszy) i generacji wewnętrznej siły elektromotorycznej (proces wolniejszy). W rezultacie daje to krzywe przypominające e.r.g. oka [47]. Opisany model jest bardzo prosty i trudno go stosować bezpośrednio dla wytłumaczenia procesów widzenia. Niemniej uderzająca jest zgodność przebiegu otrzymanych krzywych przy różnych intensywnościach światła i długościach fali z naturalnymi elektroretinogramami.

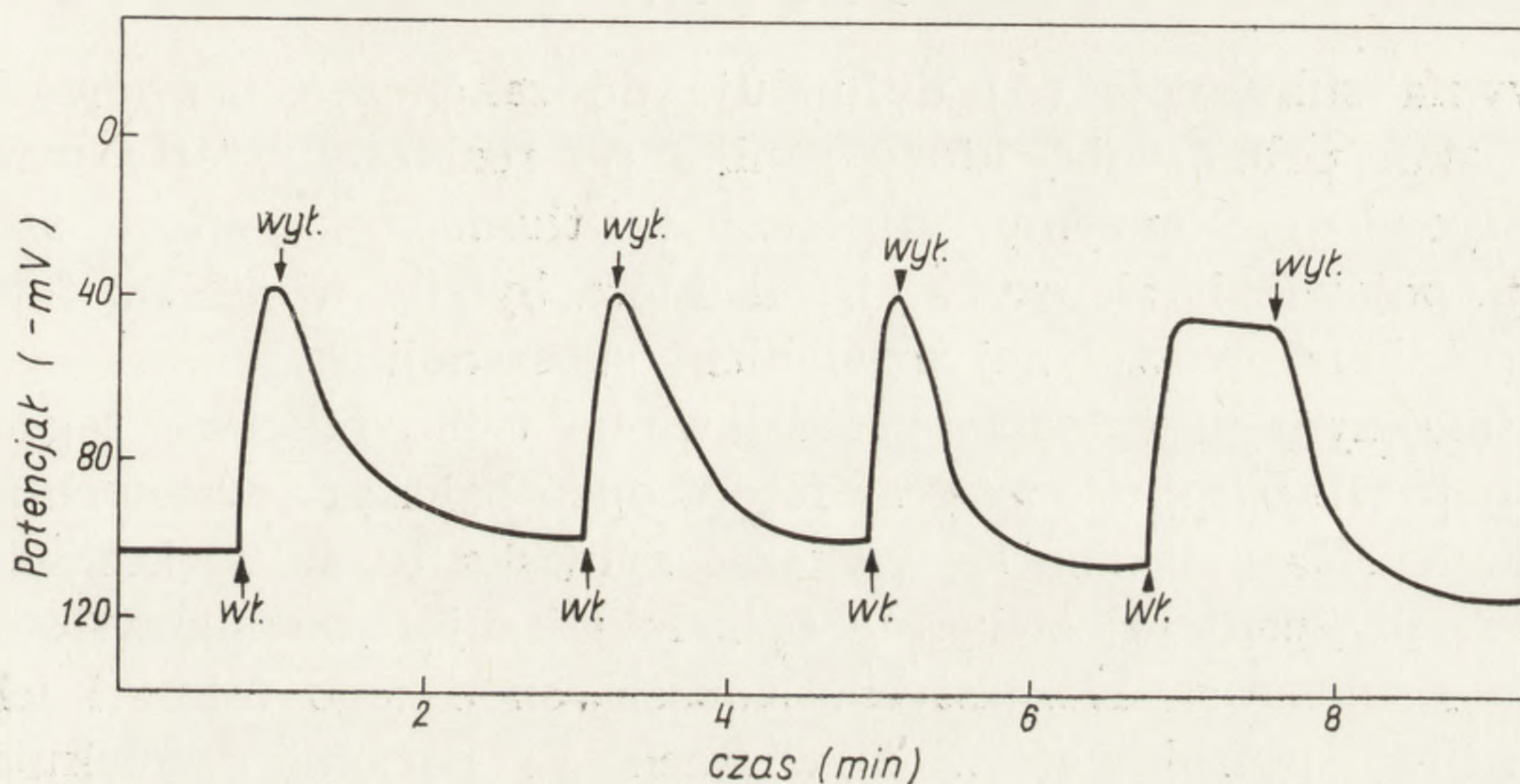


Rys. 12. „Ogniwo Rosenberga” i krzywe potencjałów rejestrowane w różnych warunkach po włączeniu i wyłączeniu światła [47]

W ostatnim 10-leciu rozpoczęły się badania nad zjawiskami fotoelektrycznymi, występującymi w sztucznych lipidowych błonach bimolekularnych. Błonki z cholesterolu zawierające chlorofil wykazały po oświetleniu zarówno efekt fotoogniwa, jak i fotoprzewodnictwo [57]. Podobne zjawiska stwierdzono na błonkach z lecytyny i cholesterolu zawierających karoteny i retinole [58]. We wszystkich przypadkach rejestrowane potencjały były małe, rzędu kilku μV .

Znaczny postęp w problemie zjawisk fotoelektrycznych w sztucznych membranach przynosi praca Panta i Rosenberga [46], w której zastoso-

wano błonkę cholesterolową lecz barwniki organiczne zastąpiono nieorganicznymi jonami zdolnymi do pochłaniania światła (głównie jony Fe^{3+}) aplikowanymi po jednej stronie membrany. Układ taki ze względu na swą asymetrię wykazywał samorzutny potencjał membranowy rzędu -100 mV, który zmniejszał się po oświetleniu (widmo działania było zgodne z widmem absorpcji FeCl_3) do -40 mV. Efekty były wielokrotnie powtarzalne (rys. 13). Stwierdzono również wystąpienie zjawisk



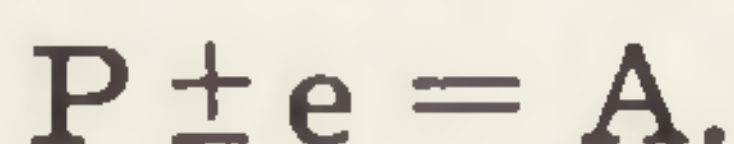
Rys. 13. Zmiany potencjału następujące w trakcie wielokrotnego włączania i wyłączenia oświetlenia w błonie cholesterolowej będącej w kontakcie z chlorkiem żelaza [46]

fotoprzewodnictwa. Mechanizm opisanych zjawisk tłumaczony jest następująco. Przejście w stan wzbudzenia jonu Fe^{3+} może prowadzić do jego redukcji kosztem elektronu z jednej z cząsteczek wody otoczki hydratacyjnej. Ponieważ jednak utleniona H_2O^+ znajduje się w bezpośredniej bliskości jonu Fe^{2+} , bardzo szybko jest reakcja odwrotna. Sytuacja taka ma miejsce w roztworach.



Jeżeli jednak jon Fe^{3+} wraz z otoczką hydratacyjną dyfunduje przez błonę, sama błona może stać się dawcą elektronów. Wytworzona w ten sposób „dziura” dyfunduje w membranie (generując siłę elektromotoryczną) lub przemieszcza się kierunkowo pod wpływem istniejącego pola (fotoprzewodnictwo), aż dotrze do powierzchni membrany gdzie utlenia wodę do H_2O^+ . Ponieważ jednak produkt utleniania i redukcji omawianej reakcji są w tym przypadku lokalnie rozdzielone membraną, reakcja przeciwna jest utrudniona i równowaga przytoczonego powyżej wzoru przesuwa się na stronę prawą.

Autorzy [46] wysuwają przypuszczenie, że analogiczne procesy mogą występować w cysternach czopków i pręcików. Absorpcja światła w rodopsynie (przy założeniu różnicy potencjałów między wnętrzem cysterny a otoczeniem) wywołuje wędrówkę elektronu (lub dziury) do wnętrza cysterny. Tam znajdują się prekursorzy (P) substancji elektrogeicznych (np. acetylcholino, kwasu gammaaminomasłowego itp.), których uczynienie wymaga utlenienia lub redukcji



Aktywna substancja (A) dyfunduje do zakończeń nerwowych wywołując stan pobudzenia, który zanika po rozłożeniu tejże substancji przez odpowiednie enzymy. Hipoteza ta tłumaczy niektóre szczegóły e.r.g., np. pojawienie się szybkiej fali, która byłaby wynikiem fotoprądu i fali opóźnionej wywołanej działaniem substancji A.

W niniejszym przeglądzie przedstawiono tylko niektóre zagadnienia fotorecepcji. Niewątpliwie procesy fotorecepcji należą do ważnych zjawisk biologicznych. Jak starano się wykazać zjawiska te, w większości lepiej poznanych przypadków, związane są z lokalizacją barwników-fotoreceptorów w strukturach błoniastych. Konsekwencji tego faktu i ich znaczenia należy poszukiwać w zjawiskach na poziomie molekularnym. Przypuszczalnie duża rola w ostatecznym wyjaśnieniu tych zjawisk przypadnie w przyszłości badaniom na układach modelowych, które będąc dziś jeszcze w stadium początkowym otwierają jednak szerokie perspektywy.

LITERATURA

- [1] AUTRUM H., STRUMPF H., 1950 – Das Bienenaug als Analysator für polarisiertes Licht. Z. Naturforsch. 5 b. 116–122.
- [2] BARA M., GALSTON A. W., 1968 – Experimental modification of pigment content and phototropic sensitivity in excised avena coleoptiles. Physiol. Plant. 21: 109–118.
- [3] BÜNNING E., 1939 – Die Physiologie des Wachstums und der Bewegungen, Springer, Berlin.
- [4] BÜNNING E., ETZOLD H., 1958 – Über die Wirkung von polarisiertem Licht auf keimende Sporen von Pilzen, Moosen und Farnen. Ber. dtsh. Bot. Ges. 71: 304–306.
- [5] CLAYTON R. K., 1953 – Studies in the phototaxis of *Rhodospirillum rubrum* III. Quantitative relations between stimulus and response. Arch. Mikrobiol. 19: 141–165.
- [6] DARTNALL H. J. A. (red.), 1972 – Photochemistry of vision. Springer, Berlin.
- [7] DIEHN B., 1969 – Action spectra of the phototactic responses in *Euglena*. Biochem. Biophys. Acta 177: 136–140.

- [8] DIEHN B., 1970 – Phototaxis in *Euglena*: Physiological basis of photoreception and tactic orientation. Proc. X. Int. Congr. Microbiol. Mexico. 721–729.
- [9] DIEHN B., KINT B., 1971 – The flavin nature of the photoreceptor molecule for phototaxis in *Euglena*. Physiol. Chem. Physics 2: 483–488.
- [10] ENGELMANN Th. W., 1882 – Über Licht- und Farbenperception niederster Organismen. Arch. ges. Physiol. 29: 387–400.
- [11] ETZOLD H., 1965 – Der Polarotropismus und Phototropismus der Chloronemen von *Dryopteris filix mas* (L) Schott. Planta 64: 254–280.
- [12] FRISCH K. v., 1949 – Die Polarisation des Himmellichtes als orientierende Faktor bei den Tänzchen der Bienen. Experientia, 5: 142–148.
- [13] GODZIEMBA-CZYŻ J., 1973 – Certain aspects of the chemotactic reaction of chloroplasts in *Funaria hygrometrica*. Acta Soc. Bot. Polon. 42: 453–459.
- [14] GÖSSEL I., 1957 – Über das Aktionsspektrum der Phototaxis chlorophyllfreier Euglenen und über die Absorption des Augenflecks. Arch. Mikrobiol., 27: 288–305.
- [15] HAGER A., 1970 – Ausbildung von Maxima im Absorptionsspektrum von Carotinoiden im Bereich um 370 nm; Folgen für die Interpretation bestimmter Wirkungsspektren. Planta 91: 38–53.
- [16] HAGINS W. A., ZONANA H. N., ADAMS R. G., 1962 – Local membrane current in the outer segments of squid photoreceptors. Nature 194: 844–847.
- [17] HALLDAL P., 1957 – Importance of calcium and magnesium ions in the phototaxis of motile green algae. Nature 179: 215–216.
- [18] HALLDAL P., 1958 – Action spectra of phototaxis and related problems in *Volvocales*, *Ulva*-gametes and *Dinophyceae*. Physiol. Plant. 11: 118–153.
- [19] HALLDAL P., 1960 – Action spectra of induced phototactic response changes in *Platymonas*. Physiol. Plant. 13: 726–735.
- [20] HALLDAL P., 1963 – Zur Frage des Photoreceptors bei der Topophobotaxis der *Flagellaten*. Ber. dtsh. Bot. Ges. 76: 323–327.
- [21] HARTMANN K. M., UNSER I. C., 1972 – Carotenoids and flavins versus phytochrome as controlling pigments for blue-UV-mediated photoresponses. Z. Pflanzenphysiol. 69: 109–124.
- [22] HAUPT W., 1959 – Die Chloroplastendrehung bei *Mougeotia*. I. Über den quantitativen und qualitativen Lichtbedarf der Schwachlichtbewegung. Planta 53: 484–501.
- [23] HAUPT W., 1968 – Die Orientierung der Phytochrom-Moleküle in der Mougeotiazelle: Ein neues Modell zur Darstellung der experimentellen Befunde. Z. Pflanzenphysiol. 58: 331–346.
- [24] HAUPT W., 1972a – Localization of phytochrome within the cell, w: Phytochrome (red. K. Mitrakos and W. Shropshire) Academic Press, 553–569.
- [25] HAUPT W., 1972b – Perception of light direction in oriented displacements of cell organelles. Acta Protozool. 11: 179–188.
- [26] HAUPT W., MORTEL G., WINKELNKEMPER I., 1969 – Demonstration of different dichroic orientation of phytochrome P_R and P_{FR}. Planta, 88: 183–186.
- [27] HAUPT W., THIELE R., 1961 – Chloroplastenbewegung bei *Mesotaenium*. Planta 56: 388–401.
- [28] HOCHSTRASSER R. M., KASHA M., 1964 – Application of the exciton model to monomolecular lamellar system. Photochem. Photobiol. 3: 317–331.
- [29] HUBBARD R., WALD G., 1953 – Cis – trans isomers of vitamin A and retinene in the rhodopsin system. J. gen. Physiol 36: 269–315.

- [30] JAFFE M. J., 1968 – Phytochrome-mediated bioelectrical potentials in the mung bean seedlings. *Science* **162**: 1016–1017.
- [31] KENNEDY D., 1964 – The photoreceptor process in lower animals, w: Giese A. C. (red) *Photophysiology*, Acad. Press, New York vol. II. 79–121.
- [32] KOWALIK W., 1968 – Über die Wirkung von Kaliumjodid auf die licht-stimulierte endogene Atmung von Algen. *Planta* **79**: 122–127.
- [33] KOWALIK W., 1969 – Der Einfluss von Licht auf die Atmung von *Chlorella* bei gehemmter Photosynthese. *Planta* **86**: 50–62.
- [34] KOWALIK U., KOWALIK W., 1969 – Eine wellenlängeabhängige Atmungssteigerung während der Photosynthese von *Chlorella*. *Planta* **84**: 141–157.
- [35] KURTIN W. E., SONG P. S., 1968 – Photochemistry of the model phototropic system involving flavins and indoles. I. Fluorescence polarization and MO calculation of the direction of the electronic transition moments in flavins. *Photochem. Photobiol.* **7**: 263–273.
- [36] LANGER H., (red.), 1973 – *Biochemistry and Physiology of visual pigments*. Springer, Berlin.
- [37] MAYER F., 1964 – Lichtorientierte Chloroplasten-Verlagerungen bei *Selaginella martensii*. *Z. Bot.* **52**: 346–381.
- [38] MILATZ J. M. W., MANTEN A., 1953 – The quantitative determination of the spectral distribution of phototactic sensitivity in the purple bacterium *Rhodospirillum rubrum*. *Biochem. Biophys. Acta*, **11**: 17–27.
- [39] MORTON R. A., PITT G. A. J., 1955 – Studies on rhodopsin. 9. pH and the hydrolysis of indicator yellow. *Biochem. J.* **36**: 128–134.
- [40] NULTSCH W., 1961 – Der Einfluss des Lichtes auf die Bewegung der Cyanophyceen. I. Phototaxis von *Phormidium autumnale*. *Planta* **56**: 632–647.
- [41] NULTSCH W., 1962a – Der Einfluss des Lichtes auf die Bewegung der Cyanophyceen. II. Photokinesis bei *Phormidium autumnale*. *Planta* **57**: 613–623.
- [42] NULTSCH W., 1962b – Der Einfluss des Lichtes auf die Bewegung der Cyanophyceen. III. Photophobotaxis von *Phormidium uncinatum*. *Planta* **58**: 647–663.
- [43] NULTSCH W., 1962c – Phototactische Aktionsspektren von Cyanophyceen. *Ber. dtsh. bot. Ges.* **75**: 433–543.
- [44] NULTSCH W., 1971 – Phototactic and photokinetic action spectra of the diatom *Nitzschia communis*. *Photochem. Photobiol.* **14**: 705–712.
- [45] NULTSCH W., 1974 – Der Einfluss des Lichtes auf die Bewegung phototropher Mikroorganismen. I. Photokinesis, W. Fink, München.
- [46] PANT H. C., ROSENBERG B., 1971 – Photoelectric effects in bimolecular lipid membrane in the presence of light sensitive inorganic ions. *Photochem. Photobiol.* **14**: 1–14.
- [47] ROSENBERG B., 1962 – Electronic charge transport in carotenoid pigments and a primitive theory of the electroretinogram. *Photochem. Photobiol.* **1**: 117–129.
- [48] RUSHTON W. A. H., 1964a – Vision as a photic process. w Giese A. C. (red) *Photophysiology* Acad. Press New York, vol. II 123–162.
- [49] RUSHTON W. A. H., 1964b – Flash photolysis in human cones, *Photochem. Photobiol.* **3**: 561–577.
- [50] SCHMID G. H., 1970 – The effect of blue light on some flavin enzymes. *Z. Physiol. Chem.* **351**: 575–578.
- [51] SCHMID G. H., SCHWARZE P., 1969 – Blue light enhanced respiration in colourless *Chlorella* mutant. *Z. Physiol. Chem.* **350**: 1513–1520.

- [52] SCHMIDT W. J., 1938 – Polarizationsoptische Analyse eines Einweiss-Lipoid Systems erleutert am Aussenglied der Sehzellen. *Kolloid. Z.* 83, 137–148.
- [53] SLATER E. C., 1956 – Flavines and flavoproteins. Elsevier, Amsterdam.
- [54] STROTHER K. G., WOLKEN J. J., 1960 – Microspectrophotometry of *Euglena* chloroplasts and eyespot. *Nature* 188, 601–602.
- [55] THOMAS J. B., 1965 – Primary photoprocesses in biology. North Holland Publ. Co., Amsterdam.
- [56] THOMAS J. B., NIJENHUIS L. E., 1950 – On the relation between phototaxis and photosynthesis in *Rhodospirillum rubrum*. *Biochem. Biophys. Acta* 6: 317–324.
- [57] TIEN H. T., 1968 – Light induced phenomena in black lipid membranes constituted from photosynthetic pigments. *Nature* 219, 272–274.
- [58] TIEN H. T., KOBAMOTO N., 1969 – Carotenoid bilayer lipid membrane model for the visual receptor. *Nature* 224, 1107–1108.
- [59] WALD G., BROWN P. K., GIBBONS I. R., 1963 – The problem of visual excitation. *J. Opt. Soc. Amer.* 53, 20–35.
- [60] WEISENSEEL M. H., SMEIBIDL E., 1973 – Phytochrome controls the water permeability in *Mougeotia*. *Z. Pflanzenphysiol.* 70, 420–431.
- [61] WOJTUSIAK R. J., 1960 – Ewolucja psychiki u zwierząt, w: Stulecie dzieła Karola Darwina, PWN, Kraków 73.
- [62] WOJTUSIAK R. J., 1972 – Dotychczasowy stan obserwacji nad migracjami owadów w Polsce. *Przeł. Zool.* 16, 396–407.
- [63] WOLKEN J. J., 1961 – The photoreceptor structures. *Int. Rev. Cytol.* 11, 195–218.
- [64] WOLKEN J. J., 1962 – Photoreceptor structures: Their molecular organization for energy transfer. *J. Theoret. Biol.* 3, 192–208.
- [65] ZURZYCKI J., 1967 – Properties and localization of the photoreceptor active in displacements of chloroplasts in *Funaria hygrometrica* I. Action spectrum. *Acta Soc. Bot. Polon.* 36, 133–142.
- [66] ZURZYCKI J., 1967b – Properties and localization of the photoreceptor active in displacements of chloroplasts in *Funaria hygrometrica* II. Studies with polarized light. *Acta Soc. Bot. Polon.* 36, 143–152.
- [67] ZURZYCKI J., 1968 – Properties and localization of the photoreceptor active in displacements of chloroplasts in *Funaria hygrometrica* V. Studies on plasmolized cells *Acta Soc. Bot. Polon.* 37, 11–17.
- [68] ZURZYCKI J., 1972 – Primary reactions in the chloroplast rearrangements. *Acta Protozool.* 11, 189–199.
- [69] ZURZYCKI J., LELĄTKO Z., 1969 – Action dichroism in the chloroplasts rearrangements in various plant species. *Acta Soc. Bot. Polon.* 38, 493–506.

Otrzymano: listopad, 1974.

Przyjęto: listopad, 1974.

Adres autora: ul. Grodzka 53, 31-001 Kraków.

ZASTOSOWANIA TEORII DLVO DO ANALIZY ODDZIAŁYWAŃ MIĘDZYKOMÓRKOWYCH

Jadwiga JAKUBAS

Zakład Biofizyki i Biomatematyki
Centrum Medyczne Kształcenia Podyplomowego, Warszawa

Streszczenie. Analiza sił fizycznych działających między biologicznymi cząstkami i makrocząsteczkami* ma bardzo istotne znaczenie z punktu widzenia takich problemów jak adhezja komórkowa, agregacja, kohezja i segregacja komórek i organizacja układów biologicznych.

W latach sześćdziesiątych Bangham i Petica [1] oraz Curtis [2] zwrócili uwagę na pewne zbieżności obserwowanych faktów w dziedzinie biologii komórki z teorią

*Niniejsza praca dotyczy bezpośrednio jedynie zastosowań teorii DLVO; pominięte jest wiele innych aspektów oddziaływań międzykomórkowych, jak np. zjawiska kontaktowe, aspekty immunologiczne, zjawiska „coupling” między błonami sąsiadujących komórek, problemy związane z przekazywaniem informacji pozycyjnej między sąsiadującymi komórkami.

liofobowych koloidów, opracowaną kilka lat wcześniej przez Derżagina i Landaua [5] i niezależnie przez Verweya i Overbeeka [3]. Teoria ta przystosowana do układów biologicznych nosi nazwę teorii DLVO (skrót pochodzi od nazwisk autorów). W ostatnich latach opracowano nowe ujęcia teoretyczne oparte na założeniach tej teorii, której pierwotną postać traktuje się dziś jako sformułowanie klasyczne, stanowiące pierwsze przybliżenie.

Mimo pewnych ograniczających założeń i trudności eksperymentalnego wyznaczenia szeregu parametrów, wzory wyprowadzone z klasycznej teorii DLVO są ciągle jeszcze podstawą fizycznej analizy zagadnień oddziaływań międzykomórkowych. Klasyczna teoria DLVO daje możliwość uzyskania jasnych interpretacyjnie wzorów; nowe ujęcia, znacznie bardziej ścisłe, dają jedynie rozwiązania numeryczne.

Celem tego przeglądu jest krótkie przedstawienie klasycznej teorii DLVO, ze zwróceniem uwagi na niektóre aktualne zagadnienia teoretyczne i związane z nimi perspektywy badań eksperymentalnych.

Teoria DLVO zakłada występowanie dwóch rodzajów sił pomiędzy oddziałującymi cząstkami. Są to

— siły elektrostatyczne, działające między cząstkami niosącymi na swych powierzchniach ładunki elektryczne.

— siły Van der Waalsa, które mogą działać między cząstkami obojętymi elektrycznie.

Rozważania teorii dotyczą sił dalekiego zasięgu, tzn. takich, które działają w odległościach większych niż międzyatomowe czy międzycząsteczkowe przestrzenie (dla ciał stałych i cieczy dużo większych od 5 Å).

Komórki kręgowców można traktować jako cząstki naładowane elektrycznie. Niosą one na swych powierzchniach ładunek ujemny, którego źródłem mogą być grupy reszt aminokwasów lub grupy karboksylowe kwasu N-acetyloneuraminidowego (NANA). Można więc podjąć próbę zastosowania założeń teorii DLVO do oddziaływań komórkowych. Siły elektrostatyczne działające między komórkami mają charakter odpychający. Siły Van der Waalsa dalekiego zasięgu są siłami przyciągającymi. Całkowitą energią oddziaływania V_T dwu komórek oblicza się jako sumę energii oddziaływań elektrostatycznych V_R i energii oddziaływań Van der Waalsa V_A .

$$V_T = V_R + V_A.$$

Poniżej zostaną omówione oddziaływania elektrostatyczne wraz z wyprowadzeniem wzorów na energię potencjalną V_R tych oddziaływań (część I), oddziaływania Van der Waalsa i wzory na energię potencjalną V tych oddziaływań (część II), całkowita energia oddziaływań V_T , oraz eksperymentalna weryfikacja teorii DLVO (część III) i nowsze ujęcia teoretyczne (część IV).

I. ODDZIAŁYWANIA ELEKTROSTATYCZNE

Centralnym pojęciem w rozważaniu tych oddziaływań jest elektryczna warstwa podwójna. Wokół komórki niosącej na swej powierzchni ładunek elektryczny w roztworze elektrolitu gromadzą się jony znaku przeciwnego; formowana jest tzw. warstwa podwójna. Układ jako całość jest elektrycznie obojętny. W teorii DLVO przyjmuje się model dyfuzyjnej warstwy podwójnej według Guya-Chapmana [4], zgodnie z którym rozważa się obszar w pobliżu granicy faz jako składający się z dwóch części: ściśle związanej z powierzchnią warstwy jonowej oraz rozmytej warstwy dyfuzyjnej złożonej z jonów otaczających komórkę, w której gra rolę termiczny ruch jonów; płaszczyzny te rozdziela tzw. płaszczyzna poślizgu.

Oddziaływanie elektrostatyczne dwóch obdarzonych ładunkiem komórek odbywa się poprzez oddziaływanie ich warstw podwójnych. Potencjał elektryczny pola wokół komórki można określić za pomocą równania Poissona

$$\Delta\Psi = -\frac{4\pi\rho}{\varepsilon}, \quad (1)$$

w którym ρ jest gęstością objętościową ładunków, ε — stałą dielektryczną obszaru wokół komórki. Zakłada się stałość wartości ε (założenie to jest kwestionowane dla dużego gradientu potencjału i dużego stężenia jonów).

Stężenie n_i jonów i -tego rodzaju w warstwie podwójnej, zgodnie z rozkładem Maxwella-Boltzmana, jest funkcją stosunku energii potencjalnej oddziaływań elektrostatycznych $v_i e\Psi$, do energii ruchów cieplnych kT

$$n_i = n_{i0} \exp\left(-\frac{v_i e\Psi}{kT}\right), \quad (2)$$

gdzie n_{i0} oznacza stężenie jonów w dużej odległości od komórki, v_i — wartościowość i -tego jonu, e — ładunek elektronu, Ψ — potencjał pola elektrostatycznego w danym punkcie, T — temperaturę bezwzględną, k — stałą Boltzmana.

Gęstość ładunku w warstwie podwójnej otrzymuje się sumując po wszystkich rodzajach jonów

$$\rho = \sum n_i e v_i = \sum e n_{i0} v_i \exp\left(-\frac{v_i e\Psi}{kT}\right). \quad (3)$$

Jeśli założy się, że roztwór zawiera te same ilości anionów i kationów i o tej samej wartościowości, wówczas gęstość ładunku można zapisać następująco:

$$\rho = ve(n^+ - n^-) \quad (4)$$

i korzystając z wyrażenia na gęstość jonów (2), otrzymuje się wzór

$$\rho = -2ven_0 \sinh \frac{ve\Psi}{kT}. \quad (5)$$

Wstawiając do równania Poissona [1], otrzymane wyrażenie na gęstość ładunku, otrzymuje się następującą postać równania opisującego rozkład potencjału elektrycznego wokół komórki

$$\Delta\Psi = \frac{8\pi n_0 ve}{\varepsilon} \sinh(ve\Psi/kT). \quad (6)$$

Przy założeniu $\frac{ve\Psi}{kT} \ll 1$ (co jest spełnione dla komórek o potencjale powierzchniowym $\Psi_0 \leq -25$ mV w fizjologicznych warunkach) równanie (6) upraszcza się do postaci

$$\Delta\Psi = \frac{8\pi n_0 v^2 e^2}{\varepsilon kT} \cdot \Psi, \quad (7)$$

oznaczając $\frac{8\pi n_0 v^2 e^2}{\varepsilon kT} = \kappa^2$, otrzymuje się

$$\Delta\Psi = \kappa^2 \Psi. \quad (8)$$

Równanie (7) jest znanym równaniem wyjściowym w teorii silnych elektrolitów Debaya-Hückela. Istnieje jego analityczne rozwiązanie dla przypadków zarówno w geometrii płaskiej, sferycznej, jak i cylindrycznej. Natomiast nieliniowe równanie różniczkowe (6) daje się scałkować w analitycznej formie tylko dla geometrii płaskiej.

Równanie (6) zostało wyprowadzone przy następujących założeniach: jednakowa stała dielektryczna dla całego obszaru okołokomórkowego, jony tej samej wartościowości, ładunki punktowe, gęstość ładunku w warstwie jonowej podlega rozkładowi Maxwella-Boltzmana.

Pierwszym krokiem w dalszych rozważaniach jest rozwiązanie równania (6), w celu uzyskania wyrażenia na zmianę potencjału pola elektrostatycznego wokół komórki w funkcji odległości od jej powierzchni. Następnie zostanie obliczony potencjał pola elektrostatycznego pochodzący od dwóch komórek, w środku między nimi. Wyrażenia te będą potrzebne do oszacowania siły działającej na powierzchnię komórki. Jej znajomość pozwoli na znalezienie odpychającej energii oddziaływań elektrostatycznych.

Dotychczas nie jest rozstrzygnięta kwestia, czy część powierzchni komórki wchodząca w adhezję należy traktować jako płaszczyzną czy

też jako powierzchnię kulistą. Przedstawione zostaną rozwiązania dla dwóch przypadków

1) gdy powierzchnie oddziałujących części komórek traktuje się jako płaszczyzny,

2) gdy powierzchnie oddziałujących części komórek traktuje się jako powierzchnie kuliste.

Rozważmy najpierw przypadek pierwszy.

1. W przypadku powierzchni płaskiej potencjał zmienia się tylko w kierunku normalnej do powierzchni; oznaczmy ten kierunek x . Równanie (6) upraszcza się więc do postaci

$$\frac{\partial^2 \Psi}{\partial x^2} = \frac{8\pi n_0 v^2 e^2}{\epsilon k T} \cdot \Psi. \quad (9)$$

Po wprowadzeniu następujących oznaczeń

$$\frac{ve\Psi}{kT} = y, \quad \frac{ve\Psi_0}{kT} = y_0, \quad \frac{8\pi n_0 v^2 e^2}{\epsilon k T} = \kappa^2, \quad \kappa x = \zeta,$$

równanie (6) przechodzi w

$$\frac{\partial^2 y}{\partial \zeta^2} = \sinh y. \quad (10)$$

$\Psi_0 = (0)$ jest to tzw. potencjał powierzchniowy, zakładany w tym modelu za wielkość stałą w czasie. Przy naturalnych warunkach brzegowych

$$\zeta = \infty, \quad y = 0 \quad \text{i} \quad \partial y / \partial \zeta = 0, \quad \zeta = 0, \quad y = y_0 \equiv \Psi = \Psi_0.$$

dla przypadku $\frac{ve\Psi_0}{kT} \ll 1$, otrzymuje się rozwiązanie

$$\Psi = \Psi_0 e^{-\kappa x}. \quad (11)$$

Parametr $1/\kappa$ określa „grubość” podwójnej warstwy, przy której potencjał maleje e razy.

Dla przypadku: dowolnych y_0 i dużych ξ (czyli wtedy, gdy odległość od powierzchni do komórki jest znacznie większa niż grubość $1/\kappa$ podwójnej warstwy) rozwiązanie równania (9) ma następującą postać:

$$\Psi = 4 \frac{kT}{ve} \frac{e^{\frac{ve\Psi_0}{2kT}} - 1}{e^{\frac{ve\Psi_0}{2kT}} + 1} \cdot e^{-\kappa x}. \quad (12)$$

Z przytoczonego wzoru wynika, że potencjał pola elektrostatycznego wokół komórki (której powierzchnię rozważa się jako płaską) maleje eks-

ponencjalnie wraz z odległością od jej powierzchni. Przy obliczaniu potencjału pola elektrostatycznego między dwoma komórkami (między ich warstwami podwójnymi) zakłada się, że komórki są w takiej odległości, że ich struktury ładunkowe nie zaburzą się nawzajem w sposób istotny. Niech H_o oznacza odległość między powierzchniami komórek. Wartość potencjału w środku między komórkami $\Psi_{H_o/2}$ jest sumą potencjałów pochodzących od każdej z nich

$$\Psi_{H_o/2} = \frac{8kT}{ve} \frac{e^{\frac{ve\Psi_o}{2kT}} - 1}{e^{\frac{ve\Psi_o}{2kT}} + 1} \cdot e^{-\frac{\kappa H_o}{2}}. \quad (13)$$

Potencjał pola elektrostatycznego w środku między komórkami spada więc eksponencjalnie w miarę oddalania się komórek od siebie.

Wzajemna siła oddziaływania komórek na jednostkę ich powierzchni, może być obliczona jako różnica dwu ciśnień: ciśnienia działającego na warstwę podwójną w polu drugiej warstwy podwójnej (gdy komórki są blisko siebie) i ciśnienia na warstwę podwójną izolowaną (można uważać, że komórki są w odległości nieskończonej). Według Derzagina [9] wielkość ciśnienia wypadkowego p dana jest wzorem

$$p = 2n_o kT \left(\cosh \frac{ve\Psi_{H_o/2}}{kT} - 1 \right). \quad (14)$$

Przy założeniu $\frac{ve\Psi_{H_o/2}}{kT} \ll 1$ wyrażenie powyższe przyjmuje postać

$$p = n_o kT \left(\frac{ve\Psi_{H_o/2}}{kT} \right)^2. \quad (15)$$

Po scałkowaniu równania (15), otrzymuje się

$$V_R = \frac{64n_o kT}{\kappa} \left(\frac{e^{\frac{ve\Psi_o}{2kT}} - 1}{e^{\frac{ve\Psi_o}{2kT}} + 1} \right)^2 e^{-\kappa H_o}. \quad (16)$$

Wzór powyższy przedstawia energię potencjalną odpychania na jednostkę powierzchni komórkowej, w funkcji wzajemnej odległości komórek H_o , w przypadku gdy komórki mają ten sam potencjał powierzchniowy Ψ_o , a ich powierzchnie rozważane są jako płaskie.

Dla komórek o różnych potencjałach powierzchniowych Ψ_{o1} , Ψ_{o2} wyrażenie na energię potencjalną odpychania ma postać

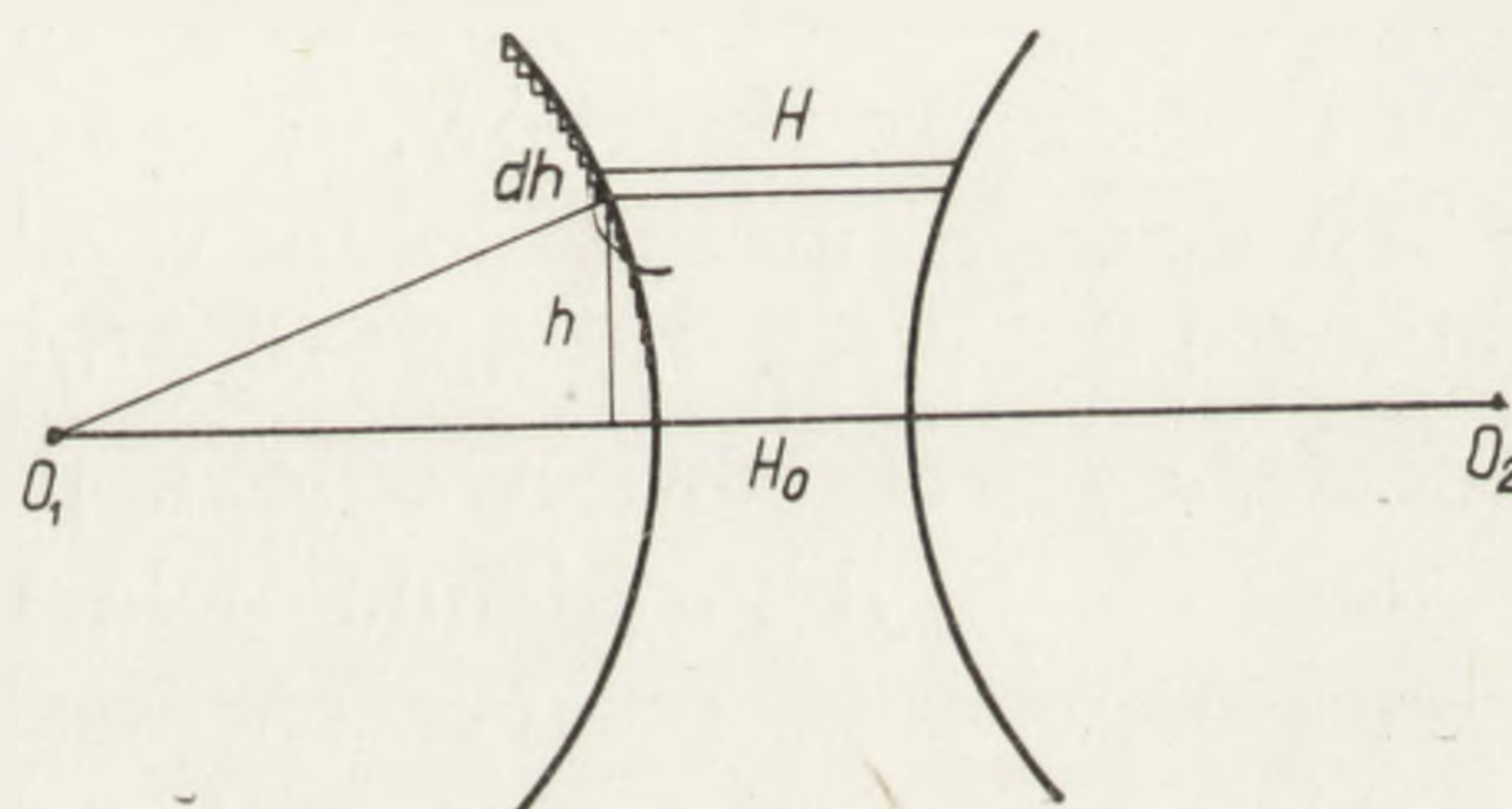
$$V_R = \frac{\varepsilon\kappa}{8\pi} [(\Psi_{o1}^2 + \Psi_{o2}^2) \cdot (1 - \coth \kappa H_o) + 2\Psi_{o1}\Psi_{o2} \operatorname{cosech} \kappa H_o]. \quad (17)$$

Wzór został wyprowadzony przez Hogga [6], przy założeniu $ve\Psi_o/kT \ll 1$.

2. W drugim przypadku traktuje się komórkę jako kulę, z kulistą warstwą podwójną wokół niej.

Hogg [6] opierając się na metodzie Derżagina [5] w następujący sposób wyprowadził wyrażenia na energię oddziaływania dwóch kulistych komórek V_{Rsf} (dwóch kulistych warstw podwójnych).

Jeśli założy się, że grubość podwójnych warstw jest mała w porównaniu z wymiarami kulistej komórki, można postąpić tak: dzieli się kulę na nieskończenie małe, równoległe krążki i sumuje ich oddziaływanie (rys. 1). Interakcje te pochodzą już od płaskich powierzchni. Energia potencjalna oddziaływań elektrostatycznych dwu płaskich powierzchni (o różnych potencjałach powierzchniowych) jest określona wzorem (17).



Rys. 1. Ilustracja graficzna wyprowadzenia wzoru na energię odpychania między dwoma kulami drogą sumowania oddziaływań pochodzących od płaskich równoległych warstw

Energia oddziaływania między sferycznymi podwójnymi warstwami dana jest więc przez całkę $V_{Rsf} = \int_0^{\infty} 2h\pi \cdot V_R dh$, gdzie h promień krążka, V_R określono przez (17). Po przekształceniach geometrycznych i po scałkowaniu, otrzymuje się

$$V_{Rsf} = \frac{\epsilon a_1 a_2 (\Psi_{o1}^2 + \Psi_{o2}^2)}{4(a_1 + a_2)} \left[\frac{2\Psi_{o1}\Psi_{o2}}{\Psi_{o1}^2 + \Psi_{o2}^2} \ln \frac{1 + \exp(-\kappa H_0)}{1 - \exp(-\kappa H_0)} + \ln (1 - \exp(-\kappa H_0)) \right], \quad (18)$$

gdzie a_1 , a_2 są promieniami komórek, H_0 – wzajemną odległością powierzchni komórkowych.

Wzór powyższy przedstawia energię odpychania oddziaływań elektrostatycznych dwóch kulistych komórek o różnych potencjałach powierzchniowych Ψ_{o1} , Ψ_{o2} i różnych promieniach krzywizn a_1 , a_2 , w funkcji wzajemnej odległości komórek H_0 .

W przypadku, gdy oddziałujące komórki mają taki sam promień krzywizny $a_1 = a_2 = a$ i takie same potencjały powierzchniowe $\Psi_{o1} = \Psi_{o2} = \Psi_o$, wzór powyższy upraszcza się do postaci

$$V_{Rsf} = \frac{\epsilon a \Psi_o^2}{2} \ln \left[1 + \exp(-\kappa H_0) \right]. \quad (19)$$

Z przedstawionych w tym rozdziale wzorów (16), (17) i (18), (19) określających energię potencjalną odpychania dla płaskich i sferycznych powierzchni, oraz dla takich samych i różnych potencjałów powierzchniowych, można wnioskować o tym, jakie parametry i w jaki sposób wpływają na wielkość potencjału odpychania.

II. ODDZIAŁYWANIE O CHARAKTERZE PRZYCIĄGAJĄCYM

Źródłem międzykomórkowych sił przyciągających są głównie siły dyspersyjne Van der Waalsa. Na gruncie mechaniki kwantowej oddziaływania dyspersyjne pojawiają się w sposób naturalny w rachunku zaburzeń Reyleya Schrödingera. Są one niezależne od wypadkowych ładunków oddziałujących układów. Interpretuje się je jako wynik korelacji ruchu elektronów.

Klasycznie można sobie wyobrazić, że siły dyspersyjne pochodzą od przemieszczeń ładunków (fluktuacji ładunkowych) w obrębie cząsteczki, co jest równoważne z powstawaniem chwilowych dipoli elektronowych. Szybkozmiennie pola pochodzące od zmian dipolowego momentu powodują polaryzację sąsiednich cząsteczek, a to prowadzi do wzajemnych oddziaływań o charakterze przyciągającym.

London [26] i Casimir, Polder [27] wyprowadzili wyrażenia na energię przyciągania dwu niepolarnych cząstek. Zgodnie z tą teorią, energia przyciągania dwu cząstek jest odwrotnie proporcjonalna do szóstej potęgi odległości tych cząstek

$$V = -\frac{\lambda}{r^6}.$$

Stała λ występująca w tym wzorze zależy od właściwości cząstek, ich potencjałów polaryzacyjnych i polaryzowalności.

Hamaker, rozwiązując problem oddziaływań przyciągających dla ciał stałych i cieczy, założył że całkowita energia przyciągania dwu ciał jest prostą sumą oddziaływań między parami ich atomów.

Według Hamakera [7] energia przyciągania dwu cząstek o płaskiej powierzchni, przy założeniu, że odległość cząstek H_0 jest znacznie mniejsza od ich rozmiaru charakterystycznego δ , wyraża się wzorem

$$V_A = -\frac{A}{48\pi \cdot H_0^2}, \quad (20)$$

przy czym A , tzw. „stała Hamakera” jest iloczynem: $4\pi q^2 \lambda$, gdzie q oznacza liczbę atomów w cm^3 .

Energię przyciągania dwu komórek o powierzchni kulistej, przy powyższym założeniu ($\delta \gg H_0$) określa wzór następujący:

$$V_A = - \frac{A a_1 \cdot a_2}{6(a_1 + a_2)} \cdot \frac{1}{H_o}, \quad (21)$$

w którym a_1 , a_2 są promieniami komórek, H_o – odległością między komórkami, A – stałą Hamakera.

Fakt, że powyższe wzory zostały wyprowadzone przy założeniu addytywności sił, przy pominięciu oddziaływań więcej niż dwuciałowych, stanowi poważną trudność teoretyczną.

Podejście to nie daje eksperymentalnych możliwości dokładnego wyznaczenia stałej Hamakera (trudności z oszacowaniem parametrów od tak dużej ilości atomów jaką zawiera komórka).

III. CHARAKTERYSTYKA ODDZIAŁYWAŃ

Zgodnie z wyjściowym założeniem całkowita energia potencjalna V_T oddziaływania dwóch komórek jest sumą energii odpychania oddziaływań elektrostatycznych V_R i energii przyciągania oddziaływań Van der Waalsa V_A .

Wzór na całkowitą energię oddziaływania dwóch płaskich jednostkowych powierzchni komórkowych, mających takie same potencjały powierzchniowe, otrzymuje się sumując wyrażenia (16) i (20)

$$V_T = \frac{64nkT}{\kappa} \left(\frac{e^{\frac{ve\Psi_0}{2kT}} - 1}{e^{\frac{ve\Psi_0}{2kT}} + 1} \right) e^{-\kappa H_o} - \frac{A}{48\pi H_o^2}. \quad (22)$$

Dla dwu kulistych jednostkowych powierzchni komórkowych, o różnych potencjałach powierzchniowych i różnych promieniach krzywizn, energia wyraża się wzorem

$$V_T = \frac{\varepsilon}{4} \frac{a_1 a_2}{a_1 + a_2} \{ (\Psi_{01} + \Psi_{02})^2 \ln [1 + \exp(-\kappa H_o)] + (\Psi_{01} - \Psi_{02})^2 \ln [1 - \exp(-\kappa H_o)] \} - \frac{A}{6H_o} \frac{a_1 \cdot a_2}{a_1 + a_2} \quad (23)$$

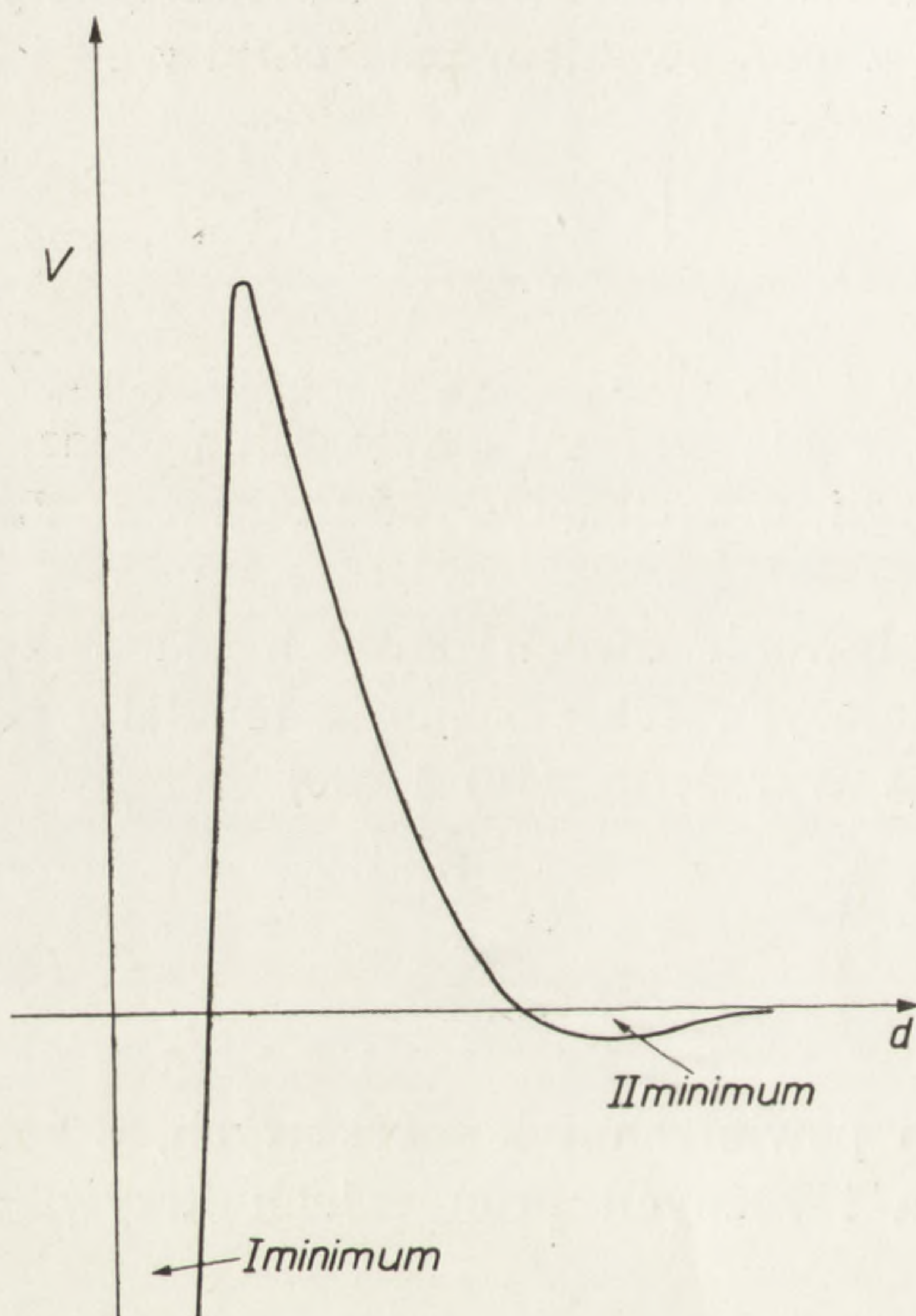
(jest to suma wyrażen (18) i (21)).

Dla powierzchni kulistych o tym samym potencjale powierzchniowym i o takim samym promieniu wzór powyższy upraszcza się do postaci

$$V_T = \frac{\varepsilon a}{2} \Psi_0^2 \ln [1 + \exp(-\kappa H_o)] - \frac{Aa}{12H_o^2}. \quad (24)$$

Człony odpowiadające za energię elektrostatycznego oddziaływania maleją eksponencjalnie z odległością, człony odpowiadające za energię przyciągania maleją odwrotnie z kwadratem odległości.

Przy wzajemnej odległości cząstek mniejszej od 15 Å przeważa człon odpowiadający za energię przyciągania. Energia V_A maleje stosunkowo wolno z odległością, a V_R znacznie szybciej, skutkiem czego, w odległości 100–200 Å dominuje również potencjał przyciągania. W tych dwu obszarach (15 Å oraz 100–200 Å), które określa się jako I i II minimum potencjału, może zachodzić adhezja cząstek. Obszar pośredni jest obszarem silnego odpychania cząstek (maksimum potencjału).

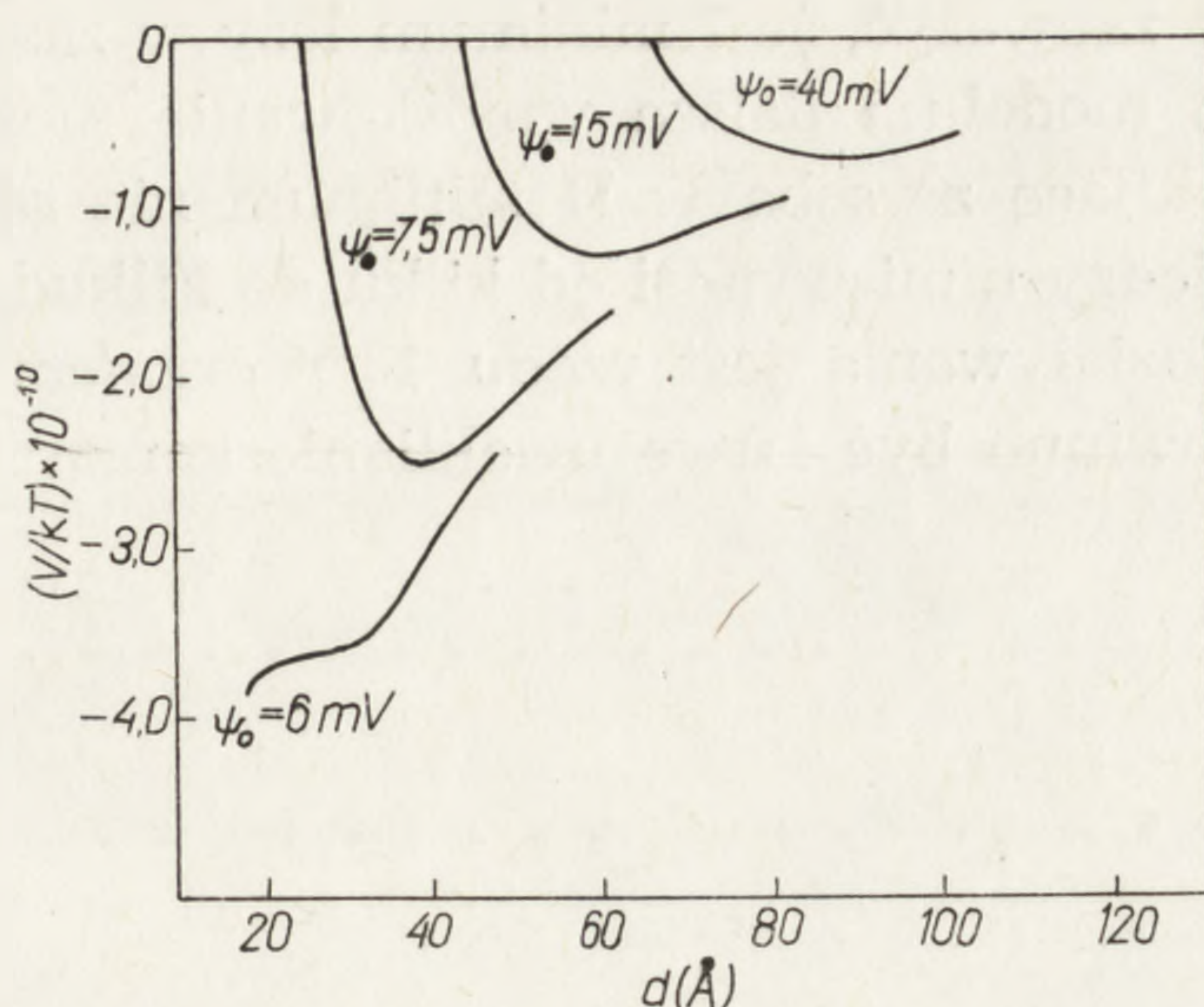


Rys. 2. Schematyczny przebieg energii potencjalnej oddziaływania w funkcji odległości

Schematyczny przebieg energii potencjalnej w funkcji odległości przedstawia rys. 2 (zaznaczono I i II minimum).

Całkowita energia potencjalna V_T zależy od następujących parametrów: potencjału powierzchniowego komórki, właściwości środowiska: stężenia jonów, wartościowości jonów, stałej dielektrycznej, od wielkości i kształtu komórki i od stałej Hamakera.

Zmniejszenie potencjału powierzchniowego Ψ_0 przy nie zmienionych pozostałych parametrach redukuje energię odpychania. Energia ta może też być skutecznie zmniejszana przez wzrost stężenia jonów, wartościowości (siły jonowej) i zmniejszenie stałej dielektrycznej. Wielkość stałej Hamakera determinuje energię przyciągania. Rysunek 3 przedstawia wpływ Ψ_0 na głębokość II minimum. Na rysunku 4 pokazany jest wpływ stałej Hamakera i stężenie jonów, na energię II minimum. Zależność



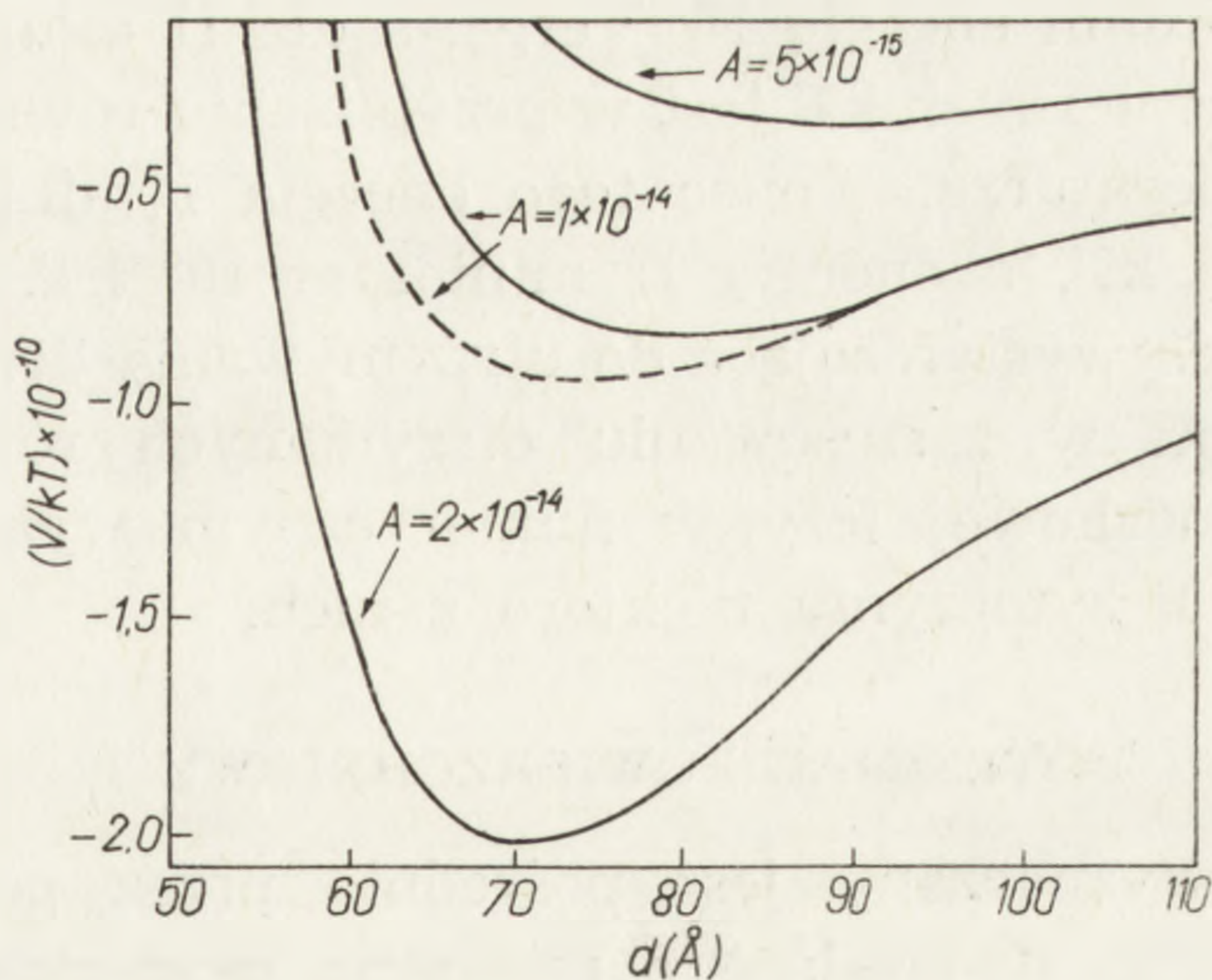
Rys. 3. Wpływ powierzchniowego potencjału ψ_0 na całkowitą energię potencjalną oddziaływania (obl. wg wzoru (22)).

$A = 1 \cdot 10^{-14}$ erga, $c = 0,145M$, elektrolit jednowartościowy

całkowitej energii oddziaływania od promienia komórki przedstawiono na rys. 5.

Wartości wymienionych już parametrów określają położenia i głębokość obydwu minimów oraz wysokość elektrostatycznej bariery odpychającej.

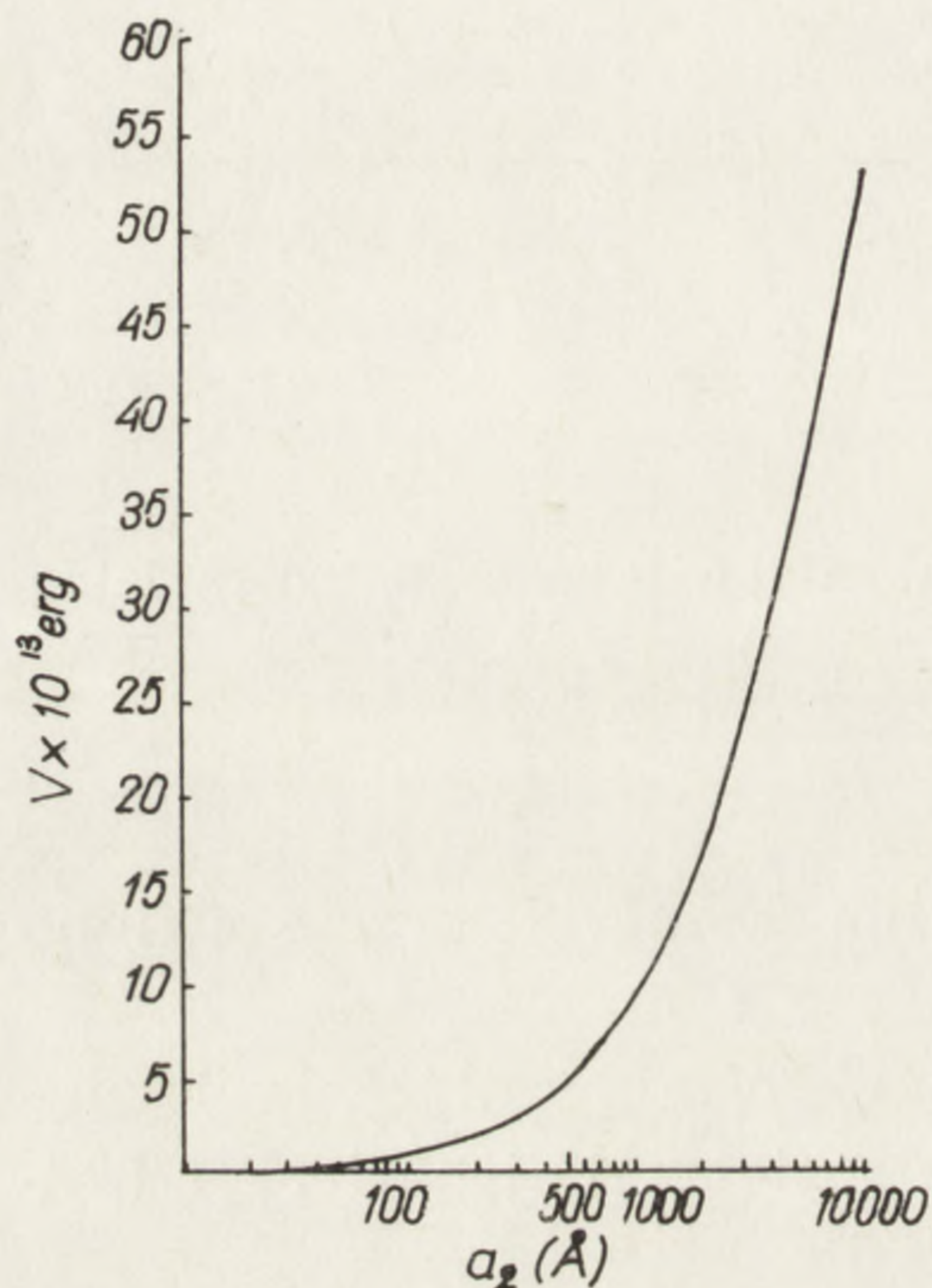
Z teorii wynika, że komórki oddziałujące w I minimum znajdują się bardzo blisko siebie (odległość mniejsza od 15 Å), a ich energia oddziaływania jest rzędu 10^{-1} erga/cm². Mogą tu mieć miejsce wiązania chemiczne, a w ich obecności energia wiązania będzie znacznie większa.



Rys. 4. Energia potencjalna oddziaływania w funkcji odległości (obl. wg wzoru (22)) dla różnych wartości stałej Hamakera: $0,5 \cdot 10^{-14}$, $1 \cdot 10^{-14}$, $2 \cdot 10^{-14}$ erga

Należy jednakże zauważyć, że I minimum leży w zasadzie poza zakresem rozważań tego modelu i dalsze wnioskowanie może być wątpliwe.

Komórki oddziałujące ze sobą w II minimum nie są w ścisłym kontakcie, odległość między nimi wynosi od kilku do kilkudziesięciu angstromów, a energia oddziaływania jest rzędu 10^{-4} erga/cm². Wobec niskich wartości energii, powinno być łatwe uwalnianie komórek.



Rys. 5. Energia potencjalna oddziaływania (obl. wg wzoru (23)) w funkcji zmieniającego się promienia jednej z komórek. Promień drugiej komórki wynosi $1\mu\text{m}$, wzajemna odległość komórek $H = 15\text{Å}$, $A = 0,5 \cdot 10^{-14}$ erga, $\psi_{01} = \psi_{02} = -25\text{mV}$.

W celu zorientowania się, czy wartości energii otrzymane z rozważań teoretycznych są duże czy małe z punktu widzenia adhezji, można porównać je z energiami ruchów termicznych; termiczne ruchy komórek mogą przeciwdziałać połączeniom komórek i wpływać na stabilność adhezji. Zakładając, że powierzchnia kontaktujących komórek jest rzędu μ^2 , uzyskuje się dla I minimum energię 10^{-9} erga, a dla II minimum 10^{-12} erga. Energia ruchów termicznych kT jest w przybliżeniu równa 4×10^{-14} erga w pokojowej temperaturze. Wobec tego energia I minimum odpowiada w przybliżeniu $10^5 kT$, a energia II minimum $10^2 kT$. Można więc sądzić, że energie będą wystarczające do utrzymywania komórek w adhezji.

Główny problem w zastosowaniu otrzymanych równań do zagadnienia adhezji komórkowej leży w numerycznym wyznaczeniu niektórych parametrów. Przytoczymy niektóre z nich.

POTENCJAŁ POWIERZCHNIOWY

Parametr ten wyznaczany jest pośrednio przez pomiar potencjału elektroforetycznego ξ . Związek ξ z mierzoną eksperymentalnie ruchliwością ν naładowanej komórki w polu elektrycznym określa wzór Helmholtza-Smoluchowskiego

$$v = \frac{\varepsilon \xi}{4\pi\eta},$$

gdzie η i ε są parametrami w obrębie płaszczyzny poślizgu. ψ_0 można wyznaczyć z zależności (15)

$$\psi_0 = \frac{\xi}{(1 + d/a)e^{\kappa d}},$$

d jest odległością płaszczyzny poślizgu od powierzchni komórki. Oszacowanie parametru d nastęrcza poważne trudności. W taki sposób wyznaczony parametr ψ_0 obarczony jest niewątpliwie dużym błędem. Niektórzy autorzy są zdania, że należy używać wartości ξ jako potencjału powierzchniowego. Good [9] sugeruje wg Overbeeka, że $|\psi_0|$ jest większe o 1 do 5 mV od ξ , gdy ξ w zakresie od -10 mV do -40 mV, a $1/\kappa = 8 \text{ \AA}$ (warunki te spełnione są dla wielu komórek w fizjologicznym roztworze, np. limfocyty - 18 mV, erytrocyty - 11 mV).

Poza niepewnością danych eksperymentalnych dotyczących ψ_0 są jeszcze wątpliwości innego rodzaju. Po pierwsze - nie ma pewności, że potencjał wyznaczony w warunkach swobodnego przepływu komórek jest odpowiedni dla komórek wchodzących w adhezję. Po drugie - pomiar potencjału nie daje informacji o rozkładzie zjonizowanych grup na powierzchni komórki; zakłada się milcząco równomierny rozkład ładunku, co może budzić wątpliwości.

STAŁA DIELEKTRYCZNA

Do wyliczeń teoretycznych przyjmuje się zazwyczaj stałą dielektryczną środowiska, w którym znajduje się komórka. Jednakże w obszarze „kontaktowym”, gdzie stężenie jonów jest bardzo duże, wartość ε jest prawdopodobnie znacznie mniejsza niż w dalekiej odległości od komórki. Trudno też mówić o jednorodności środowiska w tym obszarze. Wyróżnić w nim można przynajmniej trzy strefy: dwie o szerokości kilkudziesięciu angstromów odpowiadające obszarom przybliżonym i trzecia środowiskowa pomiędzy nimi. Różnica między stałą dielektryczną obszaru kontaktowego a stałą dielektryczną środowiska będzie tym wyraźniejsza, im komórki będą bardziej zbliżone do siebie.

STAŁA HAMAKERA

Zakres wartości stałej A dla żywych komórek nie jest jeszcze znany, szacuje się go w granicach 10^{-14} - 10^{-16} erga. Wilkins i wsp. [11] na podstawie eksperymentów flokulacyjnych wyznaczyli dla leukocytów wartość

rzędu 10^{-14} erga. Weiss [12] dla komórek oddziałujących ze szkłem podaje wartość 5×10^{-15} erga, Gregory [27] $0,9 \times 10^{-14}$ erga. Wobec eksperymentalnych trudności nie ma możliwości dokładnego wyznaczenia tego parametru.

Również i odległość może nie być jednoznacznie wyznaczanym parametrem wobec nieznajomości szczegółów peryferii komórkowej oraz wobec artefaktów związanych z przygotowaniem.

IV. DLVO A DANE EKSPERYMENTALNE

Oddziaływania komórkowe wykazują wiele cech charakterystycznych dla oddziaływań typu DLVO. Wśród typów biologicznych kontaktów można wyróżnić dwa, które mogą odpowiadać I i II minimum potencjału. Pierwszy z nich odpowiada bardzo ścisłemu połączeniu komórek, bardzo trwałemu, o silnym wiązaniu energetycznym. Próby uwolnienia komórek kończą się zwykle ich uszkodzeniem. Przykładem tego rodzaju połączenia może być połączenie typu „tight junction”.

Drugim typem jest kontakt z wyraźną szczeliną między komórkami, obserwowaną zarówno dla komórek będących w równowadze w różnych tkankach, jak i dla komórek swobodnych. Szerokość tych szczelin mierzona w preparatach oglądanych mikroskopem elektronowym jest w granicach 100 do 400 Å (28). Jak wynika z rozważań teoretycznych, żadne substancje cementujące nie są potrzebne do utworzenia takiej szczeliny, może ona być wynikiem oddziaływań fizycznych. Toteż obecność substancji cementujących, których rola i sam fakt istnienia były przedmiotem wielu dyskusji, na gruncie DLVO znajduje nowe uzasadnienie; np. Good [9] sugeruje, że zapobiega ona kontaktowi komórek w I minimum. Komórki przylegające do siebie z obecnością szczeliny mogą być łatwo uwolnione. Przykładem tego typu oddziaływań mogą być połączenia erytrocytów w rulony.

Wykonano wiele prac eksperymentalnych, mających na celu sprawdzenie zgodności teoretycznych obliczeń z danymi eksperymentalnymi. Szeroki przegląd danych eksperymentalnych podają Curtis [13], [10], Weiss [14], Good [9]. Bada się wielkość energii wiązania komórek czy też wielkość sił potrzebnych do ich uwolnienia, wpływ zmiany parametrów na szerokość szczeliny międzykomórkowej oraz wpływ zmiany parametrów na wielkość energii. Badania dotyczą zarówno oddziaływań międzykomórkowych, jak i oddziaływań komórka-substrat. Część tych eksperymentów zgadza się z rozważaniami teoretycznymi, jednakże niemożność dokładnego wyznaczenia parametrów jest dużym utrudnieniem w weryfikacji tej teorii.

V. NOWE OPRACOWANIA TEORETYCZNE

Rozważania teoretyczne DLVO ukazują bez wątpienia, że oddziaływanie międzykomórkowe można modelować w oparciu o znane podstawowe zjawiska fizyczne. Jednakże teoria ta dostarcza jedynie jakościowych informacji o zjawisku i cechach sił działających, a to zarówno z powodu wyjściowych założeń (np. stałość potencjału powierzchniowego komórki w czasie, ograniczenie do jonów jednej wartościowości, etc. p. rozdział II, czy addytywność sił przyciągających), jak i niemożności dokładnego wyznaczenia wszystkich parametrów. Przede wszystkim dotyczy to sił przyciągających. Podejście Hamakera, w którym przedmiotem rozważań są poszczególne cząsteczki, nie daje podstaw teoretycznych dla eksperymentalnego wyznaczenia stałej Hamakera dla materiału komórkowego.

Próbowano więc nowego podejścia w rozważaniu sił przyciągających. Lifszic i Działoszyński [16] zastosowali metody elektrodynamiki kwantowej do obliczenia sił działających między dużymi (tzn. wieloatomowymi) ciałami w odległościach większych od międzyatomowych; Opracowanie Lifszica i Działoszyńskiego rozwinęli Ninham i Parsegian [22, 24, 25, 29]. Wzory otrzymane z tych opracowań są bardzo skomplikowane (w przeciwieństwie do wzorów uzyskiwanych z DLVO), ale parametry w nich występujące są eksperymentalnie mierzonymi wielkościami. Wszystkie eksperymentalne informacje potrzebne do oszacowania wielkości energii przyciągania są osiągalne z widm absorpcji i współczynników załamania materiału [17].

Ninham i wsp. [8] przeprowadzili bardzo interesujące eksperymenty na sztucznych błonach (oddziaływanie sztucznych błon między sobą jak i z materiałami takimi jak metal, kwarc, tworzywa sztuczne). Stwierdzono wyraźną zależność oddziaływania między błonami od ich fizycznych własności, składu fizykochemicznego i struktury. Zmiany składu błony, jej gęstości ładunku oraz gęstości wagowej mogą dawać możliwość identyfikacji parametrów, które rządzą interakcjami. Pozwoliłoby to więc na uzyskanie nowych informacji o siłach (czego nie można osiągnąć na gruncie DLVO).

Rozważając oddziaływanie dwu płaskich równoległych warstw lipidowych Ninham i wsp. [19] stwierdzili, że charakter sił działających między błonami lipidowymi jest różny od charakteru sił rozważonych na gruncie DLVO. Kwestionują zatem słuszność założenia Hamakera o addytywności sił Van der Waalsa. Wykazali oni ponadto zależność przyciągających od temperatury sił. Dotychczasowe eksperymenty nie obejmują materiału komórkowego, a dopóki nie dysponuje się charakterystyką widm absorpcyjnych materiału komórkowego, nie jest możliwe

zastosowanie nowych opracowań. Powyższe rozważania dotyczą oddziaływań dalekiego zasięgu. Oddziaływania bliskiego zasięgu ciągle jeszcze czekają na opracowanie.

W odniesieniu do oddziaływań elektrostatycznych przeprowadzono obliczenie, bez wprowadzania takich założeń ograniczających jak stałość potencjału powierzchniowego czy stałość powierzchniowego ładunku, liniowa aproksymacja, ograniczenie do jonów jednowartościowych [20, 21]. Z opracowań tych otrzymuje się rozwiązania w postaci numerycznej.

Nie ulega wątpliwości, że siły elektrostatyczne i siły Van der Waalsowskie mają swój udział w zjawisku adhezji. Teoria wykazuje, że siły te są wystarczające do utrzymania komórek w adhezji w obecności samego elektrolitu (bez udziału substancji cementujących). Jak wynika z rozważań termodynamicznych [8], również i specyficzna adhezja (wybiórcze łączenie komórek tego samego typu) może być wyjaśniona na gruncie fizycznych oddziaływań. Mogłyby za tym przemawiać doświadczenia nad specyficzną agregacją komórkowego materiału [26].

Jednakże cechy i własności sił, o których mowa, w szczególności sił przyciągających dalekiego zasięgu, w odniesieniu do komórkowego materiału nie są jeszcze znane. Możliwość uzyskania informacji o ich własnościach, a co za tym idzie, o ich roli i udziale w adhezji wydaje się być możliwa na gruncie opracowanych teorii.

LITERATURA

- [1] PETHICA B. A., 1961 — *Exp. Cell Res. Suppl.* 8, 123–140.
- [2] CURTIS A. S., 1960 — *Am. Naturalist* 94: 37.
- [3] VERWEY E. J. W., OVERBEEK J. Th. G., 1948 — *Theory of the stability of Lyophobic Colloids*, Elsevier Publishing Co., Amsterdam.
- [4] KORTUM G., 1966 — *Elektrochemia*, PWN Warszawa.
- [5] DERŻAGIN B., LANDAU L., 1941 — *Acta Physicochim.* 14: 633.
- [6] HOGG R., HEALY T. W., FURSTENAU D. W., 1966 — *Trans. Faraday Soc.* 62: 1638.
- [7] HAMAKER H. C., 1937 — *Physica* 4: 1058.
- [8] PARSEGHIAN V. A., GINGEL D., 1972 — *J. Adhesion* 4: 283.
- [9] GOOD J., 1972 — *J. Theor. Biol.* 37: 413.
- [10] CURTIS A. S., 1967 — *The Cell Surface, its Molecular Role in Morphogenesis*, Logos Press, London.
- [11] WILKINS D. J., OTTEWIL R. H., BANGHAM A. D., 1962 — *J. Theoret. Biol.* 2: 176.
- [12] WEISS L., — *Exp. Cell Res.* 1968, 51: 609.
- [13] CURTIS A. S., 1973 — *Cell adhesion in Progress in Biophysics and Molecular Biology* (ed. J. A. V. Buttler, D. Noble) 27: 317.
- [14] WEISS L., 1967 — *The Cell Periphery, Metastasis and Other Contact Phenomena*, North-Holland Press, Amsterdam.

- [15] WEISS L., 1972 – Progress in Surface Science (ed. Sydney G. Davison) **1**: 355.
- [16] DZYALOSHINSKII I. E., LIFSHITZ E. M., PITAEVSKII L. P., 1961 – Ad. Phys. **10**: 165–209.
- [17] GINGEL D., PARSEGIAN V. A., 1972 – J. Theor. Biol. **36**: 41–52.
- [18] PARSEGIAN V. A., NINHAM B. W., 1971 – J. Coll. Int. Sci. **37**: 332–341.
- [19] PARSEGIAN V. A., NINHAM B. W., 1970 – Biophys. J. **10**: 664–674.
- [20] NINHAM B. W., PARSEGIAN V. A., 1971 – J. Theor. Biol. **31**: 405–428.
- [21] PARSEGIAN A. V., GINGEL D., 1972 – Biophys. J. **12**: 1192–1204.
- [22] PARSEGIAN V. A., NINHAM B. W., 1969 – Nature **224**: 1197–1198.
- [23] DERŻAGIN B., 1939 – Acta Physicochim. **10**: 333.
- [24] NINHAM B. W., PARSEGIAN V. A., 1970 – J. Chem. Phys. **52**: 4578–4587.
- [25] GINGEL D., 1971 – J. Theoret. Biol. **30**: 121–149.
- [26] ROTH S., 1968 – Develop. Biol. **18**: 602–631.
- [27] GREGORY J., 1969 – J. Advan. Colloid Interface Sci. **2**: 369.
- [28] CURTIS A. S., 1964 – J. Cell Biology **19**: 199–215.
- [29] VISSER J., 1972 – Adv. Coll. Int. Sci. **3**: 331–363.

Otrzymano: październik 1974.

Przyjęto: listopad 1974.

Adres autorki: ul. Marymoncka 99, 01-813 Warszawa.

KOMUNIKAT

Wobec wielu wątpliwości w sprawie polskiej terminologii z zakresu biologii komórki, Redakcja postanowiła utworzyć w „Postęпах Biologii Komórki” dział poświęcony propozycjom i dyskusjom dotyczącym tematów kontrowersyjnych. Redakcja spodziewa się, że w wyniku dyskusji będzie można w przyszłości ustalić terminy obowiązujące w języku polskim. Zapraszamy Czytelników do nadsyłania propozycji: brzmienie terminu w języku polskim z zestawieniem tego terminu w języku angielskim.

I KONFERENCJA PRACOWNI MIKROSKOPII ELEKTRONOWEJ INSTYTUTU BIOLOGII DOŚWIADCZALNEJ im. M. NENCKIEGO PAN

W dniu 21 października 1974 odbyła się w Instytucie Biologii Doświadczalnej PAN im. M. Nenckiego w Warszawie I Konferencja Mikroskopii Elektronowej zorganizowana przez Pracownię ME tego Instytutu. Tematyka doniesień, przedstawionych podczas Konferencji, dotyczyła szeregu zagadnień, co wynika z różnorodnych zainteresowań naukowych osób prowadzących badania w Pracowni, spełniającej rolę laboratorium środowiskowego. Mimo różnorodności tematów, postaramy się poniżej dokonać pewnej syntezy prezentowanego w czasie trwania Konferencji materiału.

Wyniki badań prowadzonych na pierwotniakach były przedmiotem wielu doniesień. Pierwotniaki dwóch grup *brucei* i *lewisi* z rodziny *Trypanosomidae*, były obiektem badań prowadzonych przez A. Wartonia i M. Modlińską (Zakład Parazytologii PAN). Przedstawiciele tych dwóch grup pierwotniaków różnią się zasadniczo swoją budową ultrastrukturalną, przy czym różnice te są szczególnie wyraźne w budowie kinetoplastu. Wyniki badań ultrastruktury, jak i badań z zastosowaniem metod cytochemicznych pozwoliły na stwierdzenie różnej roli kinetoplastu w metabolizmie pierwotniaków należących do poszczególnych grup *Trypanosomidae*.

Zespół K. Golińska, M. Jerka-Dziadosz i J. Kink z Zakładu Biologii Komórki IBD przedstawił dane dotyczące lokalizacji strefy wzrostu odpowiedzialnej za regulację kształtu komórki *Dileptus* pierwotniaka z typu orzęsków. Ten sam Zespół przedstawił ponadto rezultaty badań regeneracji przedniej części ciała (proboscis) oraz tworzenia się urzęsienia u ekscystujących się komórek *Ciliata*.

Substrukturę kompleksu pellikularnego *Euglena ehrenbergii* omówiła E. Mikołajczyk (Zakład Biologii Komórki IBD). Osobniki tego gatunku mają zdolność wykonywania ruchu euglenoidalnego i charakteryzują się silnie rozwiniętym kompleksem pellikularnym. Zgodnie z opinią autorki zdolność do wykonywania tego typu ruchów nie zależy od stopnia rozwinięcia pellikuli. B. Hrebenda (Zakład Biologii Komórki IBD) przedstawiła wyniki badań dotyczących elementów kurczliwych pierwotniaka *Amoeba proteus*. Elementy te zachowane zostają w tzw. glicerynowych modelach ameb, w których to wykazują zdolność kurczenia się pod wpływem ATP i jonów wapnia.

Bliższemu poznaniu mechanizmu cyklu skurczowo-rozkurczowego mięśnia służyć mogą przedstawione przez R. Dąbrowską i E. Nowak (Zakład Biochemii Układu Nerwowego i Mięśni) oraz Z. Podlubną (Instytut Biofizyki AN ZSRR w Puszczyño) wyniki badań wskazujących na tworzenie wspólnych parakryształów przez cienkie filamenty troponiny z tropomiozyną i F-aktyną mięśnia poprzecznie prążkowa-

nego. Polimeryzacja aktyny zachodząca pod wpływem różnych kationów dwuwartościowych o znanym powinowactwie do tego białka była przedmiotem doniesienia H. Strzeleckiej-Gołaszewskiej (Zakład Biochemii Układu Nerwowego i Mięśni). W obecności dwudodatnich jonów cynku i niklu obserwowano granularne agregaty występujące obok regularnie zbudowanych filamentowych polimerów. Te ostatnie są charakterystyczne dla polimeryzacji aktyny pod wpływem jonów K^+ , Ca^{++} i Mg^{++} .

Podobnie jak dwa powyżej omówione doniesienia z Zakładu Biochemii Układu Nerwowego i Mięśni IBD, w ścisłym związku z prowadzonymi w tym Zakładzie badaniami biochemicznymi były przedstawione przez M. Michalaka i G. Sarzałę dane dotyczące biogenezy i różnicowania błon sarkoplazmatycznego retikulum. Autorzy wykazali, że błony i pęcherzyki retikulum wyizolowane z mięśnia szkieletowego płodów lub nowo narodzonych królików różnią się ultrastrukturą od tych błon wyizolowanych z mięśni zwierząt dorosłych. Najciekawszą obserwacją było stwierdzenie na powierzchni błon sarkoplazmatycznego retikulum zwierząt dorosłych występowania cząsteczek o średnicy 40 Å, które nie występują u embriónów i zwierząt nowo narodzonych.

Zmiany chorobowe we włóknach mięśniowych były przedmiotem doniesienia A. Fidziańskiej (Klinika Neurologiczna AM w Warszawie). Autorka stwierdziła różnice w ultrastrukturze zanikającego włókna mięśniowego chorych w wieku dojrzałym i włókna mięśniowego u dzieci z rdzeniowym zanikiem mięśni. Istotne znaczenie w diagnostyce niektórych schorzeń centralnego układu nerwowego (np. lipidazy) mogą mieć obserwacje przeprowadzone przez M. Jędrzejowską (Klinika Neurologiczna AM w Warszawie). Stwierdziła ona mianowicie swoiste zmiany w ultrastrukturze nerwów obwodowych, spowodowane tymi schorzeniami.

Zupełnie oddzielnym zagadnieniem były badania dotyczące struktury i chemizmu glikokaliksu. Badania te dotyczyły zarówno powierzchni komórki pierwotniacznej (E. Wyroba, Zakład Biologii Komórki IBD), jak i warstw otaczających niektóre narządy owadów, jak np. owaria (A. Przełęcka i A. Dutkowski, Zakład Biologii Komórki IBD) czy ciało tłuszczowe (A. Dutkowski). Ciekawe są wyniki wskazujące, iż pewne właściwości warstwy okrywającej owaria, jak zdolność wiązania konkanawaliny A, wydają się być warunkowane hormonalnie, jak również i to, że warstwa okrywająca ciało tłuszczowe ulega zmianie podczas rozwoju owada. Inną interesującą obserwacją dotyczącą tzw. surface coat pierwotniaka *Paramecium aurelia* było stwierdzenie, że zdolność wiązania czerwieni rutenowej przez powierzchnię błony komórkowej tego pierwotniaka związana jest z występującymi w niej białkami antygenowymi.

Zreferowane powyżej doniesienia dotyczyły badań przeprowadzonych za pomocą mikroskopu transmisyjnego. Kilku autorów referowało wyniki badań przeprowadzonych za pomocą mikroskopu odbiciowego (skaningowego). Były to między innymi doniesienia J. Szczachury i G. P. Mierzejewskich z Zakładu Paleozoologii PAN dotyczące badań form kopalnych. Interesujące obserwacje uzyskane z zastosowaniem tego typu mikroskopu przedstawiła H. Piękoś (Instytut Botaniki PAN w Krakowie). Wykazała ona istotne różnice struktury powierzchni zarodników różnych gatunków paproci.

W przedstawionym powyżej krótkim omówieniu materiału prezentowanego podczas konferencji pominęliśmy niektóre doniesienia. Nie oznacza to jednak niedoceniań przez autorów niniejszego omówienia badań prowadzonych przez autorów nie wymienionych doniesień. Celem naszym było zapoznanie Czytelników z niektórymi zagadnieniami opracowywanymi z wykorzystaniem zgromadzonej

w pracowni aparatury. W tym miejscu należy wyrazić uznanie dla pracy personelu technicznego pracowni, którego wysiłku nie można pominąć przy ocenie dorobku naukowego zaprezentowanego podczas konferencji. Dorobek ten zaś upoważnia do pozytywnej oceny idei organizowania laboratoriów środowiskowych. Konieczne jest jednak pełne ich wyposażenie, tak by można w nich prowadzić prace z zastosowaniem najnowszych technik badawczych, jak chociażby dla przykładu, kriorytowania.

A. B. Dutkowski, A. Warton

INFORMACJE DLA AUTORÓW

POSTĘPY BIOLOGII KOMÓRKI drukują artykuły przeglądowe, omawiające najnowsze osiągnięcia w dziedzinie biologii komórki, nie publikowane dotąd w innych wydawnictwach. Autorzy odpowiadają za ścisłość podawanych informacji. Artykuły drukowane w POSTĘPACH BIOLOGII KOMÓRKI nie mogą być bez zgody Redakcji publikowane w innych periodykach.

Prace należy przysyłać w dwu egzemplarzach zarówno tekst, jak i załączniki. Objętość tekstu (bez rysunków wraz z objaśnieniami) nie powinna przekraczać 20 stron. Maszynopis powinien być jednostronny, z podwójną interlinią, marginesem około 4 cm po lewej stronie oraz numeracją stron. W tekście nie należy robić żadnych podkreśleń na maszynie ani atramentem.

Na pierwszej stronie należy podać, przed tekstem, tytuł pracy, pod nim imiona (w pełnym brzmieniu) i nazwiska autorów oraz nazwę zakładu naukowego, w którym autorzy pracują, następnie krótkie streszczenie (ok. 1/2 strony). Za streszczeniem, z pozostawieniem około 5 cm odstępu, następuje tekst główny. W tekście nie należy zamieszczać żadnych tabel, rysunków, fotografii ani schematów. Dla ustalenia ich lokalizacji należy pozostawić wolny wiersz w żądanym miejscu i odpowiednio zaznaczyć ołówkiem na marginesie: tab. 1, rys. 1 itp.

Tekst podzielony na rozdziały jest bardziej przejrzysty. Po tytułach wydzielonych nie należy stawiać kropek. Za tekstem należy dołączyć spis literatury. Powinna być ona ułożona w porządku alfabetycznym. Powoływanie się na cytowaną literaturę następuje przez wymienienie liczby porządkowej w nawiasach prostokątnych, np. [5].

Przykłady cytowania literatury:

- [1] Sachsenmayer W., Remy U., Plattner R., 1972 — Initiation of synchronous mitosis in *Physarum polycephalum*, *Exptl. Cell Res.*, 73: 41-48.
- [2] Hnilica L. S., McClure M. E., Speltzberg T. C., 1971 — Histone biosynthesis and the cell cycle, [w] *Histone and Nucleohistones*, red. D. M. P. Philips, Plenum Press. London, New York 60-64.

Tabele należy dołączyć na oddzielnych kartkach — każda powinna być podpisana. Rysunki, schematy, fotografie należy dołączyć w postaci nadającej się do reprodukcji lub przerysowania. Fotografie powinny być na błyszczącym papierze, kontrastowe. Podpisy pod rysunki powinny być dołączone na oddzielnej kartce. Po tytule należy podać objaśnienia lub uwagę „objaśnienia w tekście”. Przy załącznikach powinno być podane ich pochodzenie.

Redakcja zastrzega sobie możliwość dokonania skrótów nie wpływających na treść pracy.

Autor na życzenie Redakcji obowiązany jest dokonać korekty autorskiej, którą powinien zwrócić w ciągu 3 dni. Koszty spowodowane zmianami tekstu w korekcie, poza poprawkami błędów drukarskich, ponosi Autor.

Artykuły honorowane są wg ustalonych stawek, autorzy otrzymują 25 odbitek artykułu bezpłatnie.

Zamówienie na egzemplarze POSTĘPÓW BIOLOGII KOMÓRKI przyjmuje ORWN PAN, Warszawa, Pałac Kultury i Nauki.

Warunki prenumeraty

Cena prenumeraty krajowej:

rocznie zł 80.— półrocznie zł 40.—

Instytucje państwowe, społeczne, zakłady pracy, szkoły itp., mogą zamawiać prenumeratę wyłącznie w miejscowych Oddziałach i Delegaturach RSW „Prasa-Książka-Ruch”.

Prenumeratory indywidualni mogą opłacać w urzędach pocztowych i u listonoszy lub dokonywać wpłat na konto NBP I OM Nr 1641-6-1025, RSW „Prasa-Książka-Ruch”, Przedsiębiorstwo Upowszechniania Prasy i Książki, ul. Hubaska 8/14, 50-502 Wrocław (w terminie do 10 dnia miesiąca poprzedzającego okres prenumeraty).

Prenumeratę za zleceniem wysyłki za granicę, która jest o 40% droższa od prenumeraty krajowej, przyjmuje RSW „Prasa-Książka-Ruch”, Biuro Kolportażu Wydawnictw Zagranicznych, ul. Wronia 23, 00-840 Warszawa, konto PKO Nr 1-6-100024.

Bieżące i archiwalne numery można nabyć lub zamówić we Wzorcowni Wydawnictw Naukowych PAN-Ossolincum-PWN, Pałac Kultury i Nauki, 00-901 Warszawa oraz w księgarniach naukowych „Domu Książki”.

Egzemplarze zdezaktualizowane można również nabyć w RSW „Prasa-Książka-Ruch”, Przedsiębiorstwo Upowszechniania Prasy i Książki, ul. Hubaska 8/14, 50-502 Wrocław, konto NBP I OM Nr 1641-6-1025.

A subscription order stating the period of time, along with the subscriber's name address can be sent to your subscription agent or directly to Foreign Trade Enterprise Ars Polona-Ruch, 7 Krakowskie Przedmieście, 00-068 Warszawa, P. O. Box 1001, POLAND.

Please send payments to the account of Ars Polona-Ruch in Bank Handlowy S.A., 7 Traugutt Street, 00-067 Warszawa. POLAND.

Indeks 38703/36970

