

2435  
POLSKIE  
TOWARZYSTWO  
ANATOMICZNE

**TOM 2 · NR 3**

1975 (181–256)

# 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 ACKERMAN, 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 1. Nakład 381 + 119 egz. Ark. wyd. 6,25. Ark. druk. 4 $\frac{1}{4}$  + wkł. Papier druk. sat.  
IV, kl. 70 g. 70 × 100 cm. Oddano do składania 6 V 1975 r. podpisano do druku w lipcu 1975 r.  
Druk ukończono w sierpniu 1975 r. Zam. 2215/75 — A-14. Cena zł 20,—

Wrocławska Drukarnia Naukowa, Wrocław, ul. Lelewela 4



## WSPÓLZALEŻNOŚĆ MIĘDZY CIAŁEM TŁUSZCZOWYM A OWARIAMI OWADÓW

Andrzej B. DUTKOWSKI

Zakład Biologii Komórki, Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN

*Streszczenie.* Żółtko jaj owadów może być syntetyzowane zarówno w obrębie poszczególnych struktur pęcherzyka jajowego, jak również poza rurką jajnikową, głównie w ciele tłuszczowym. W artykule omówiono pozajajnikową syntezę białkowego i lipidowego składnika żółtka. Substancje zsyntetyzowane w ciele tłuszczowym uwalniane zostają do hemolimfy, z której pobierane są przez komórki jajowe podczas witellogenezy drogą pionocytozy. Synteza, gromadzenie lub uwalnianie substancji z ciała tłuszczowego, jak również ich pobieranie przez komórki jajowe są kontrolowane przez układ neuroendokryalny przy czym w przypadku większości gatunków owadów w kontrolę tą zaangażowany jest hormon juwenilny produkowany przez corpora allata. Jajniki mogą bezpośrednio bądź pośrednio oddziaływać na intensywność procesów zachodzących w tkance tłuszczowej, prawdopodobnie przez wytwarzanie hormonu, który oddziaływać może bądź na poszczególne ośrodki centralnego układu neuroendokrynego, bądź bezpośrednio na ciała tłuszczowe.

Przedmiotem niniejszego opracowania są niektóre aspekty współzależności między dwoma narządami owadów, ciałem tłuszczowym a owariami. Współzależność ta polega na możliwości wykorzystania materiałów zmagazynowanych w komórkach ciała tłuszczowego przez komórki jajowe w czasie witellogenezy.

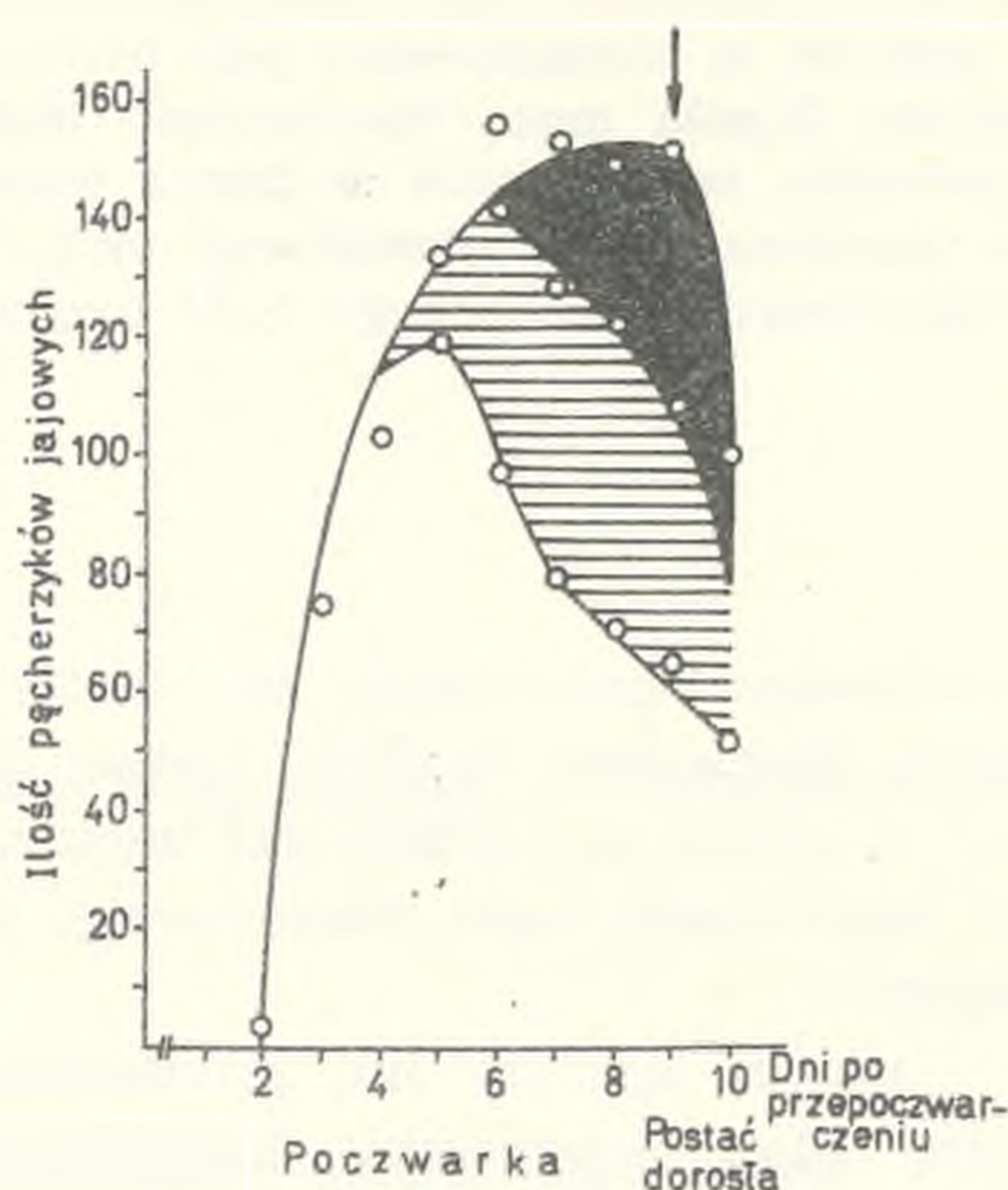
Witellogeneza — proces syntezy lub gromadzenia żółtka w oocyocie — stanowi istotny etap dojrzewania komórek jajowych owadów, podobnie jak i innych zwierząt. Białka i lipidy stanowią główne składniki żółtka, które odkładane jest w postaci kul lub płytek w ooplazmie komórek. Substancje te tworzą materiał budulcowy i energetyczny dla przyszłego zarodka.



Procesy zaangażowane w produkcję żółtka zachodzą bardzo intensywnie, na co wskazuje ogromny, wzrost objętości oocytu, podczas wegetatywnej fazy jego rozwoju, spowodowany głównie gromadzeniem się w nim materiałów odżywczych. I tak dla przykładu objętość oocytu *Drosophila melanogaster* zwiększa się w tym czasie około stu tysięcy razy [100], a *Periplaneta americana* nawet ponad dwa miliony razy [29]. Tak wielki wzrost objętości oocytu ograniczony jest do stosunkowo krótkiego okresu czasu, ponieważ witellogeneza trwa na ogół kilka dni. Dla przykładu czas ten w przypadku *Drosophila* wynosi 3 dni [100], *Galleria* około 4 dni [50], a *Gryllus* 6 dni [22], (rys. 1).

Witellogeneza zachodzi jednocześnie w wielu komórkach jajowych. W przypadku gatunków, których samice przechodzą kilka cykli płciowych procesy witellogenezy powtarzają się kilkakrotnie przeciwnie do tych gatunków owadów, których samice przechodzą tylko jeden cykl płciowy. Dojrzewanie jaj zachodzić może zarówno przed jak i po linie imaginalnej, przy czym w obrębie poszczególnych gatunków owadów, należących do tego samego rzędu, proces ten może odbywać się w różnych stadiach rozwojowych.

Strukturalne różnice w budowie jajników owadzi powodują, że w proces tworzenia żółtka zaangażowane mogą być różne części pęcherzyka jajowego. W przypadku owariol typu panoistycznego prócz oocytu w procesie tym uczestniczyć mogą komórki nabłonka folikularnego,



Rys. 1. Przyrost ilości pęcherzyków jajowych *Galleria mellonella* w pojedynczej rureczce jajnikowej podczas jej rozwoju. Ilość pęcherzyków witellogenetycznych zaznaczona płaszczyzną zakreskowaną, ilość pęcherzyków postwitellogenetycznych zaznaczona płaszczyzną zaczerńioną



w przypadku zaś jajników typu meroistycznego — również komórki trofocytów. Ponadto składniki żółtka mogą być syntetyzowane poza komórkami jajowymi, przy czym ilość zsyntetyzowanych poza jajnikami składników żółtka w stosunku do całkowitej ich zawartości w komórce jajowej wydaje się zupełnie nie zależeć od typu budowy jajnika właściwego dla owadów danego gatunku. Pomimo zasadniczego podobieństwa w budowie jajników *Hyalophora cecropia* i *Drosophila melanogaster* białko pochodzące spoza owarioli jest podstawowym składnikiem żółtka pierwszego owada [163, 164, 169, 170], natomiast stanowi niewielką część żółtka *Drosophila* [45, 99].

Rozważania dotyczące pozajajnikowego pochodzenia składników żółtka pozostają w ścisłym związku ze wspomnianym na wstępie założeniem artykułu. Dlatego też dalej ograniczymy się do omówienia tego tylko aspektu witellogenezy.

#### BIAŁKOWY SKŁADNIK ŻÓŁTKA

Znakomita większość badań, prowadzonych w ostatnich latach nad witellogenezą, koncentruje się wokół problemu miejsca syntezy składnika białkowego żółtka (tzw. żółtka białkowego) i sposobu jego transportu do komórki jajowej.

Pierwsze doniesienie, wskazujące na obecność w komórce jajowej białka, które nie zostało w niej zsyntetyzowane, przedstawił w 1943 r. Wigglesworth [181]. Wykazał on, że jaja pluskwiaka — *Rhodnius prolixus*, odżywiającego się krwią, zawierają hemoglobinę. Obserwowany w hemolimfie wielu owadów wzrost stężenia białek bądź w okresie dojrzewania jaj, bądź bezpośrednio przed tym okresem, a następnie spadek ich zawartości — kiedy procesy witellogenezy są zaawansowane — sugeruje, że białka te mogą być źródłem żółtka białkowego [109, 158].

Zastosowanie techniki immunochemicznej pozwoliło Telferowi wykazać zarówno w hemolimfie samic, jak i żółtku jaj *Hyalophora cecropia* obecność tego samego rodzaju białka [163, 170]. Białko to występuje również w hemolimfie samców tego gatunku owada, ale w stężeniu około tysiąc razy mniejszym niż w hemolimfie samic [164]. Koncentracja w hemolimfie tego charakterystycznego dla samic białka (określanego w literaturze: sex-limited protein, female protein, vitellogenin) spada wraz z zakończeniem procesów witellogenezy [169], jednocześnie obecne jest ono w dojrzałych jajach w stężeniu 20–30-krotnie wyższym niż w hemolimfie samic [163]. Po operacyjnym usunięciu owariol zawartość „female protein” w hemolimfie nie obniża się [164], co interpretuje się



jako konsekwencję usunięcia organu akumulującego to białko. Doświadczenia przeprowadzone przez Stay [159] wykazały znaczenie omawianego rodzaju białka dla prawidłowego rozwoju jaj. Autorka implantowała samcom tego gatunku owadów jajniki zawierające niedojrzałe jaja. W tych warunkach komórki jajowe znajdujące się w transplantowanych owariolach nie dojrzewały. Jeżeli jednak jednocześnie z przeszczepieniem jajników wstrzykiwała samcom charakterystyczne dla samic białko, komórki jajowe dojrzewały. Również tylko obecność tego charakterystycznego białka w środowisku warunkowała tworzenie się żółtka w hodowanych *in vitro* jajnikach *Hyalophora* [87].

Prócz charakterystycznego dla samic białka, ulegają wbudowaniu w komórki jajowe w czasie dojrzewania inne białka hemolimfy. Białka te wbudowane są jednak w wyraznie mniejszym stopniu [87], (rys. 2).

W ciągu 20 lat, które minęły od ukazania się pierwszej pracy Telfera, wykazano obecność charakterystycznego dla samic białka, które selektywnie włączane jest w żółtko komórek jajowych i które nie występuje w hemolimfie samców bądź znajduje się w niej w śladowych ilościach u wszystkich badanych gatunków owadów [4, 5, 15, 24, 27, 30, 42, 64, 68, 102, 123, 132, 187].

Można zatem przypuszczać, że występowanie tego białka charakterystycznego dla samic, niezbędnego do produkcji żółtka, jest cechą właściwą owadom wszystkich gatunków. Wydaje się ponadto, że w hemolimfie przynajmniej kilku gatunków owadów występuje kilka (najczęściej dwa) różnych białek, które są właściwe samicom tych gatunków [24, 144, 156]. Zbyt jeszcze mało jest danych aby można w pełni określić ich cechy fizykochemiczne. Są one rozpuszczalne w 0,8–1,4 M roztworze chlorku sodu [15, 31, 109], posiadają ujemny ładunek elektryczny, przy czym białka samicze różnych gatunków *Drosophila* różnić się mogą wielkością tego ładunku [73]. Zgodnie z badaniami de Loof i de Wilde [109] białko charakterystyczne dla samic, wyizolowane z hemolimfy *Leptinotarsa decemlineata*, jest glikoproteidem o ciężarze cząsteczkowym wynoszącym około 250 tysięcy.

Również glikoproteidem jest „sex protein” *Locusta migratoria* [17] i *Periplaneta americana* [5]. W hemolimfie samic tych dwóch ostatnich gatunków wykryto ponadto drugą frakcję białek, będącą również „sex protein”, a mającą charakter lipoproteidu. Białko o takich samych właściwościach immunologicznych jak „sex protein” wyodrębnione z hemolimfy samic, wyizolowano również z ciała tłuszczowego i dojrzałych jaj owadów. Białko wyizolowane z żółtka jaj *Leucophaea* charakteryzuje się stałą sedymentacji 27 S, natomiast stała sedymentacji białka wyekstrahowanego z ciała tłuszczowego wynosi 14 S [31]. W przypadku tego gatunku owadów charakterystyczne dla samic białko jest lipopro-



teidem zawierającym niewielką ilość fosforu (0,14<sup>0</sup>/o) w komponencie białkowej. Część lipidową stanowi głównie fosfatydylocholina [101]. Natomiast białko to u *Aedes aegypti* prócz komponenty lipidowej i białkowej zawiera węglowodany w ilości około 10<sup>0</sup>/o. Składnik lipidowy tworzą głównie fosfolipidy i sterydy [84]. Analiza aminokwasów białka charakterystycznego dla samic, wyizolowanego z *Leptinotarsa decemlineata* [109] i *Leucophasa maderae* [101], wykazuje duże podobieństwo tego białka u obu gatunków. Białko to jest bogate w serynę, kwas glutaminowy i leucynę (tabela 1). Powszechnie uważa się, że „sex protein” stanowiący dominujący składnik białkowy żółtka (50–90<sup>0</sup>/o) większości owadów, jest głównym białkowym materiałem odżywczym zarodka [15, 73, 109]. Istnieją poza tym sugestie, co będzie omówione dokładnie później, że bierze ono udział w transporcie lipidów do oocytów [5].

#### MIEJSCE SYNTEZY BIAŁKA CHARAKTERYSTYCZNEGO DLA SAMIC

Zdolność ciała tłuszczowego do syntezy białek hemolimfy wykazał po raz pierwszy Shigematsu [157]. Stwierdził on, że wzrost zawartości białek w hemolimfie gąsienic *Bombyx mori* zachodzi równolegle ze wzmożoną syntezą białek w ciele tłuszczowym. W eksperymentach przeprowadzonych in vitro stwierdził zarówno syntezę białek w ciele tłuszczowym, jak i ich uwalnianie do środowiska hodowlanego. Ponieważ ruchliwość elektroforetyczna uwolnionych białek była taka sama jak rodzimych białek hemolimfy wnioskował, że ich synteza in vivo odbywa się w ciele tłuszczowym. Powyższe wyniki, jak i podobne uzyskane w badaniach przeprowadzonych na *Calliphora erythrocephala* [147, 149] sugerowały, że również i „sex protein”, jako jedno z białek hemolimfy, może pochodzić z tej tkanki. Przypuszczenie to znalazło w krótkim czasie potwierdzenie eksperymentalne.

Pan i współautorzy [133] wykazali, że w warunkach in vitro, piętnowane aminokwasy włączają się w znacznym stopniu w te frakcje białek ciała tłuszczowego zarówno *Hyalophora cecropia*, jak i *Periplaneta americana*, które po wyekstrahowaniu reagują z przeciwciałami surowicy krwi królika immunizowanego „sex protein” otrzymanymi z żółtka jaj tych gatunków owadów. Piętnowane aminokwasy wbudowują się w „sex protein” o stałej sedymentacji 14 S ciała tłuszczowego [31]. Charakterystyczne dla samic białko pojawia się w hemolimfie w większości badanych gatunków owadów w okresie inicjowania procesów witellogenezy i zanika po ich zakończeniu, co wskazuje, że powstaje ono w tym właśnie czasie. Odstępstwo od tej prawidłowości zostało zaobserwowane u *Hyalophora cecropia*. W ciele tłuszczowym samic tego



gatunku stwierdza się w czasie dojrzewania jaj dwa okresy syntezy „sex protein”: pierwszy w stadium przedpoczwarki, drugi (w kilka miesięcy później) w stadium poczwarki (rys. 3). Zatem, w tym przypadku pojawienie się omawianego białka w hemolimfie wyprzedza znacznie okres, w którym może ono zostać wykorzystane przez oocyty. Jednak ilość zsyntetyzowanego białka w pierwszym okresie nie pokrywa zapotrzebowania na nie przez komórki jajowe i dopiero ponowna synteza białka zapewnia wyprodukowanie takiej jego ilości, która umożliwia pełny rozwój jaj [132].

Prócz omówionych powyżej prac Pan i współautorów, jak i analogicznych badań przeprowadzonych na *Leucophaea* [64, 67], istnieje szereg danych pośrednich, na podstawie których można wnioskować, że ciało tłuszczowe wielu gatunków owadów jest jednym bądź głównym miejscem syntezy „sex protein” oraz że jego synteza związana jest z cyklem reprodukcyjnym. Do nich należą przede wszystkim obserwacje wskazujące na obecność w ciele tłuszczowym frakcji białka (białek) o ruchliwości elektroferotycznej, jak i właściwościach immunologicznych podobnych do analogicznych właściwości frakcji białka (białek) obecnego w hemolimfie samic oraz w dojrzałych jajach [139, 158, 192]. Wzrost intensywności syntezy RNA a następnie białek w ciele tłuszczowym poprzedza okres dojrzewania jaj *Schistocerca gregaria* [91, 143], *Periplaneta americana* [122] i *Tenebrio molitor* [137, 138], przy czym dla ostatnich dwóch gatunków wykazano, że wzrostowi intensywności syntez tych substancji towarzyszy wzrost zawartości białek w hemolimfie [129, 139].

Cytologiczne i ultrastrukturalne badania ciała tłuszczowego, przeprowadzone w różnych fazach cyklu reprodukcyjnego szeregu owadów, wskazują również na udział omawianej tkanki w syntezie białek. Procesom dojrzewania jaj *Trogoderma granarium* [126] i *Diptera punctata* [160] towarzyszy zanikanie w komórkach ciała tłuszczowego bogatych w białka kul.

Kule te pojawiają się ponownie w tych komórkach po zakończeniu dojrzewania jaj [160]. Thomsen i Thomsen [175] obserwowali cykliczne przeorganizowanie struktury komórek ciała tłuszczowego *Calliphora erythrocephala*, które ściśle związane jest z cyklem dojrzewania jaj. U samic tego gatunku owadów cykl reprodukcyjny trwa sześć dni, przy czym witellogeneza rozpoczyna się w trzecim dniu cyklu i kończy się piątego dnia. Tylko w tym okresie komórki ciała tłuszczowego posiadają silnie rozwinięte szorstkie endoplazmatyczne reticulum, a obrazy aparatu Golgiego przemawiają za ich aktywnością sekrecyjną. W analogicznym okresie rozwoju jaj silnie rozwinięte, szorstkie, endoplazmatyczne retikulum, charakterystyczne dla komórek aktywnie syntetyzujących



białko, obserwowano również w komórkach ciała tłuszczowego *Leptinotarsa decemlineata* [107]. Podobne zmiany w organizacji komórek ciała tłuszczowego obserwowano podczas dojrzewania pęcherzyków jajowych *Galleria mellonella* [53] (Porównaj rys. 4 z rys. 5).

Z drugiej strony badania szeregu tkanek *Periplaneta americana* przeprowadzone przez Roth i Porter [139] za pomocą mikroskopu elektronowego wykazały, że komórki ciała tłuszczowego nie posiadają strukturalnej organizacji warunkującej syntezę białka, posiadają ją zaś komórki nabłonka przewodu pokarmowego. Na tej podstawie autorzy sugerują, że w komórkach nabłonka odbywa się synteza białek niezbędnych dla rozwoju jaj. Poglądy te są sprzeczne z wynikami cytowanej powyżej pracy Pan i współautorów [133], według których ciało tłuszczowe karalucha syntetyzuje charakterystyczne dla samic białko niezbędne dla rozwoju jaj. Badania szeregu autorów [39, 40, 158] wykazują jednak, że przynajmniej u pewnych gatunków owadów niektóre białka hemolimfy i żółtka jaj, w tym „sex protein” [158], mogą być syntetyzowane w komórkach przewodu pokarmowego.

Możliwość syntezy białek hemolimfy, poza ciałem tłuszczowym, pozostaje w zgodzie z przypisywaną przez wielu autorów inną rolą tego narządu w gospodarce z substancjami białkowymi niektórych owadów. Ograniczałaby się ona jedynie do magazynowania białek pobranych przez ciało tłuszczowe z hemolimfy oraz ponownego ich do niej uwolnienia, przy czym pierwszy proces zachodzi pod koniec stadium larwalnego, drugi zaś po przepoczwarczeniu. Powyższa sugestia opiera się na następujących obserwacjach: niektóre, charakteryzujące się określonym współczynnikiem ruchliwości elektroforetycznej frakcje białek pojawiają się podczas rozwoju pewnych owadów, np. *Pieris brassicae* [40], *Malacosoma americanus* [114] czy *Protoparce quinquemaculata* [95] — początkowo w hemolimfie, a następnie dopiero w ciele tłuszczowym. Komórki ciała tłuszczowego pobierają białka hemolimfy prawdopodobnie drogą pinocytozy. Obserwowano bowiem tworzenie się licznych pęcherzyków pinocytotycznych w komórkach tego narządu, które poprzedza okres formowania się kul białkowych, przy czym temu ostatniemu procesowi towarzyszy spadek zawartości białek hemolimfy. Białka ezogenne zaś, np. peroksydaza, wstrzyknięte owadowi przed okresem formowania się kul białkowych w komórkach ciała tłuszczowego, pojawiają się początkowo w pęcherzykach pinocytotycznych, a następnie dopiero w kulach białkowych [111, 112, 113].

Jeszcze inną funkcję ciała tłuszczowemu przypisuje Lamy [101]. Uważa on, że białka pobrane przez narząd w okresie larwalnym zostają w nim przekształcone, w wyniku czego powstają białka hemolimfy,



w tym „sex protein”, charakterystyczne dla późniejszych stadiów rozwoju owadów.

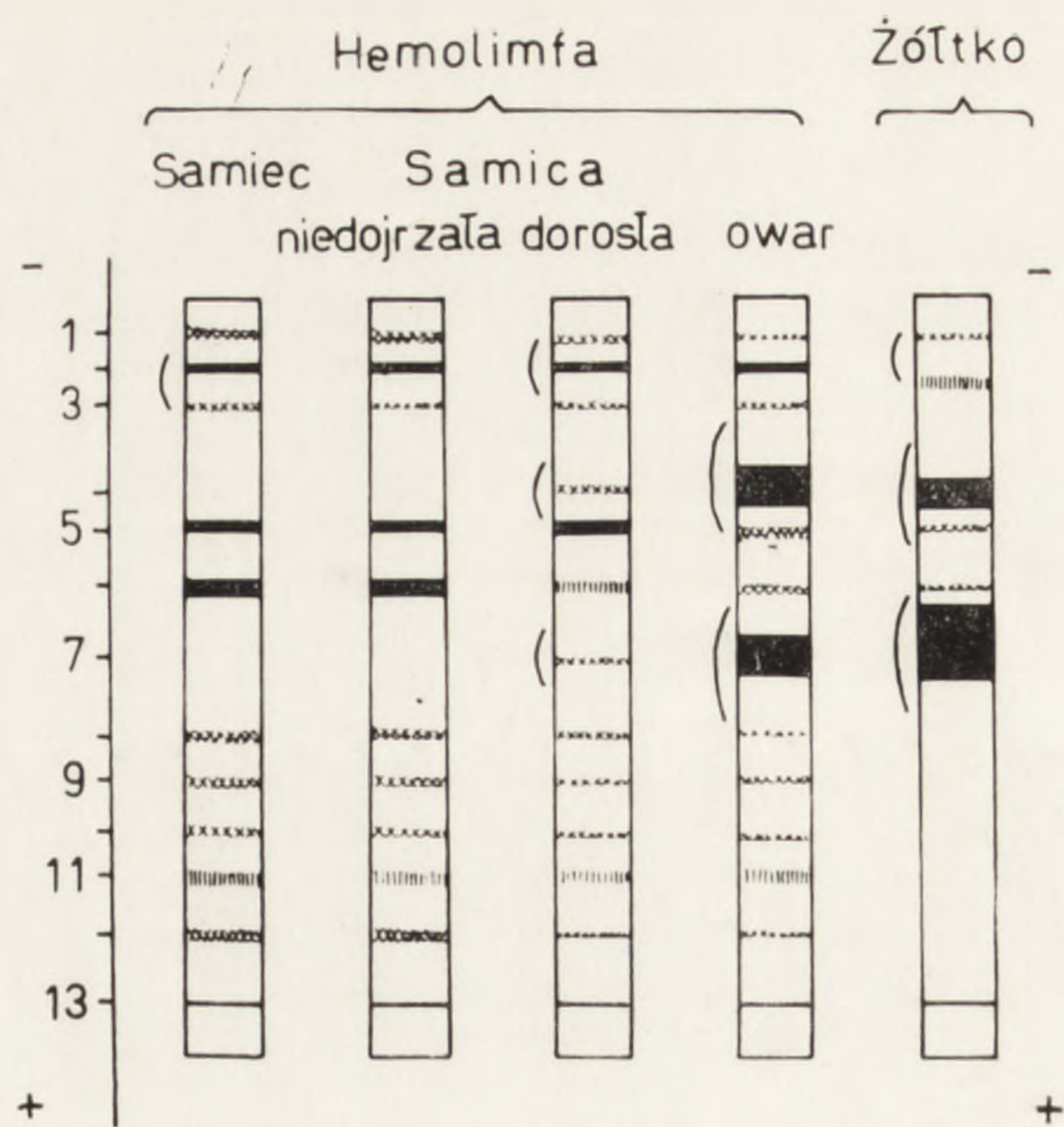
Trudno jest obecnie uogólnić dane dotyczące miejsca syntezy białek hemolimfy, w tym „sex protein”. W dużej mierze wynika to z jednostronności prowadzonych przez poszczególnych autorów badań, co powoduje, że zarejestrowany zostaje jeden proces podczas gdy inny jednocześnie zachodzący pozostaje niezauważony. Wynika to także w wielu przypadkach z różnorodności metodyki prowadzonych badań. Pomimo to można przypuszczać, że nawet w obrębie tego samego rzędu owadów istnieć mogą gatunkowo uwarunkowane, zróżnicowane mechanizmy, zaangażowane w omawiany proces.

#### MECHANIZMY INKORPORACJI BIAŁKA W ŻÓŁTKO

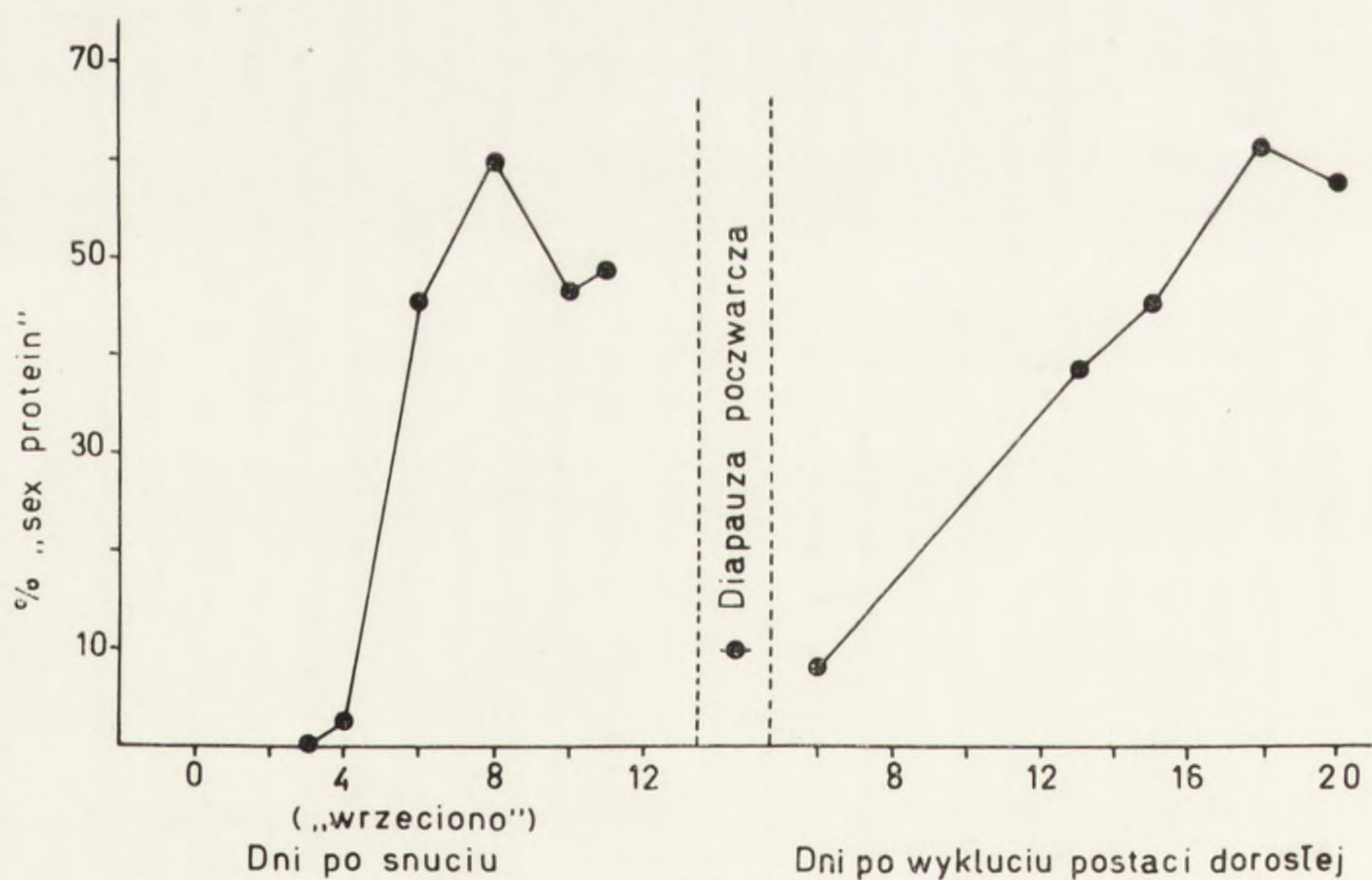
Uwolnione z miejsca syntezy do hemolimfy białko, zanim zostanie wbudowane w żółtko komórek jajowych musi, podobnie jak cząsteczki innych substancji, przedostać się kolejno przez ścianę owarioli, warstwę komórek nabłonka folikularnego, wreszcie błonę plazmatyczną samego oocytu. Błona podstawna, pokrywająca z zewnątrz owariole, jest bogata w białka [44]. Jak wykazały prowadzone przez nas badania, błona ta, rurczek jajnikowych w *Galleria mellonella*, zbudowana jest z glikoproteidów oraz zawiera kwas sialowy [153]. Anderson i Spielman [11] używając różnych białek o znanej masie cząsteczkowej jak cytochrom c, peroksydaza, hemoglobina, katalaza i ferrytyna wykazali, że ściana owarioli *Aedes aegypti* nie stanowi przeszkody dla cząsteczek o masie cząsteczkowej w zakresie od 12 do 500 tysięcy. Jak już wspomniano, masy cząsteczkowe „sex protein” nie przekraczają tych wielkości, można zatem przypuszczać, że ściana rurczki jajnikowej nie stanowi bariery dla tych białek hemolimfy. Czy jest ona jednak jedynie sitem molekularnym, czy też jest barierą, na której odbywa się selekcja cząsteczek substancji transportowanych do wnętrza jajnika, trudno jest w tej chwili odpowiedzieć.

Prześlędzono proces przenikania barwników przeżyciowych i substancji piętnowanych pierwiastkami promieniotwórczymi do oocytów szeregu owadów. Wykazano, że docierają one do powierzchni oocytów przestrzeniami między komórkami nabłonka folikularnego [120, 154, 167]. Zastosowanie sprzężonego z fluoresceiną przeciwciała dla „sex protein” pozwoliło wykryć obecność tego białka w przestrzeniach między komórkami nabłonka, co wskazuje, że właśnie tymi przestrzeniami białka niezbędne dla tworzenia żółtka docierają do oocytu [165, 168] (rys. 6). Przestrzenie między komórkami nabłonka folikularnego powiększają się znacz-



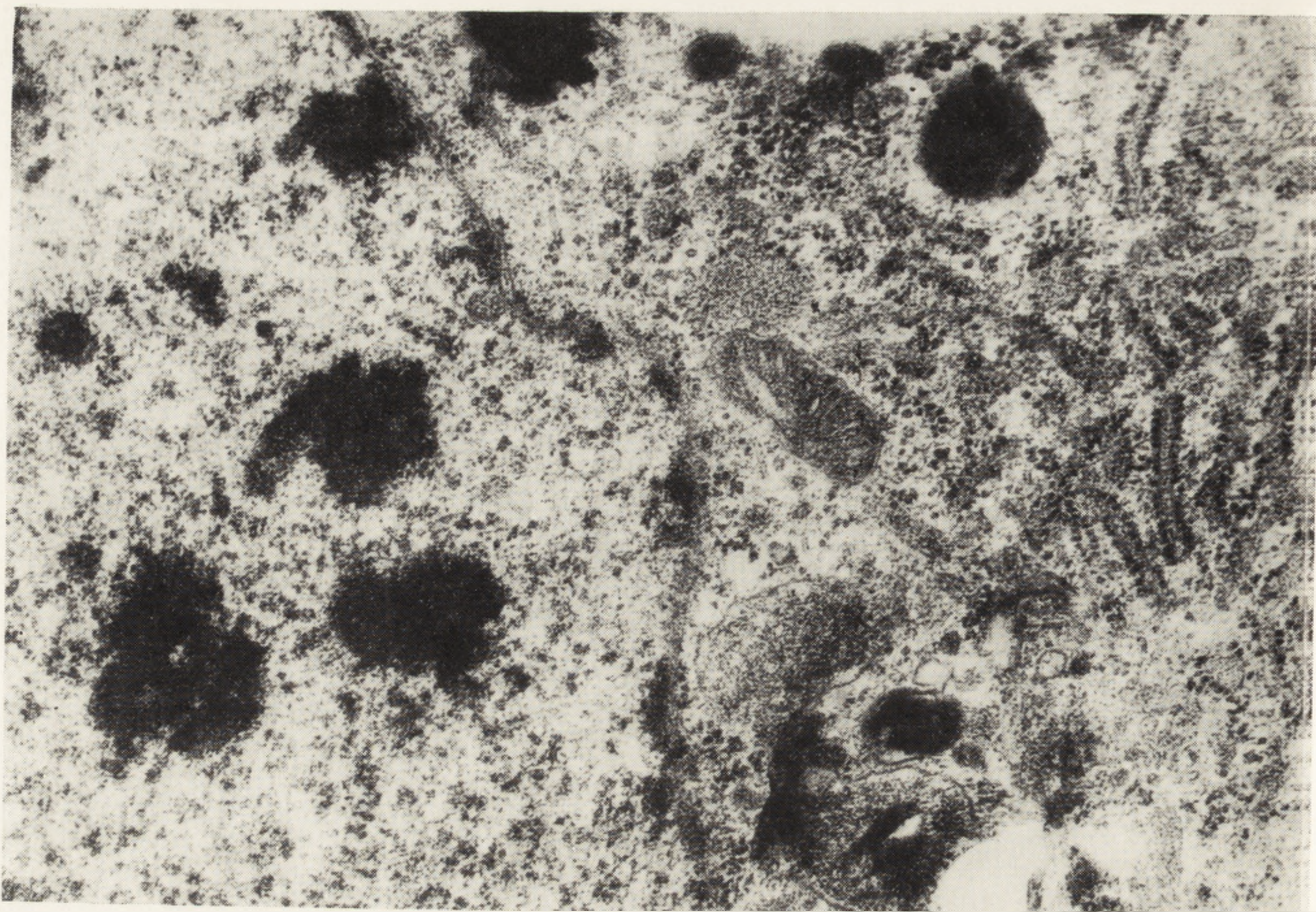


Rys. 2. Elektroforegramy rozkładu na żelu polyakrylamidowym białek hemolimfy i żółtka *Periplaneta americana*. Łukami zaznaczono frakcje reagujące z przeciwciałem surowicy krwi królika immunizowanego „sex protein” z żółtka jaj tego gatunku, owar — samica owariotektomizowana. Według [15]

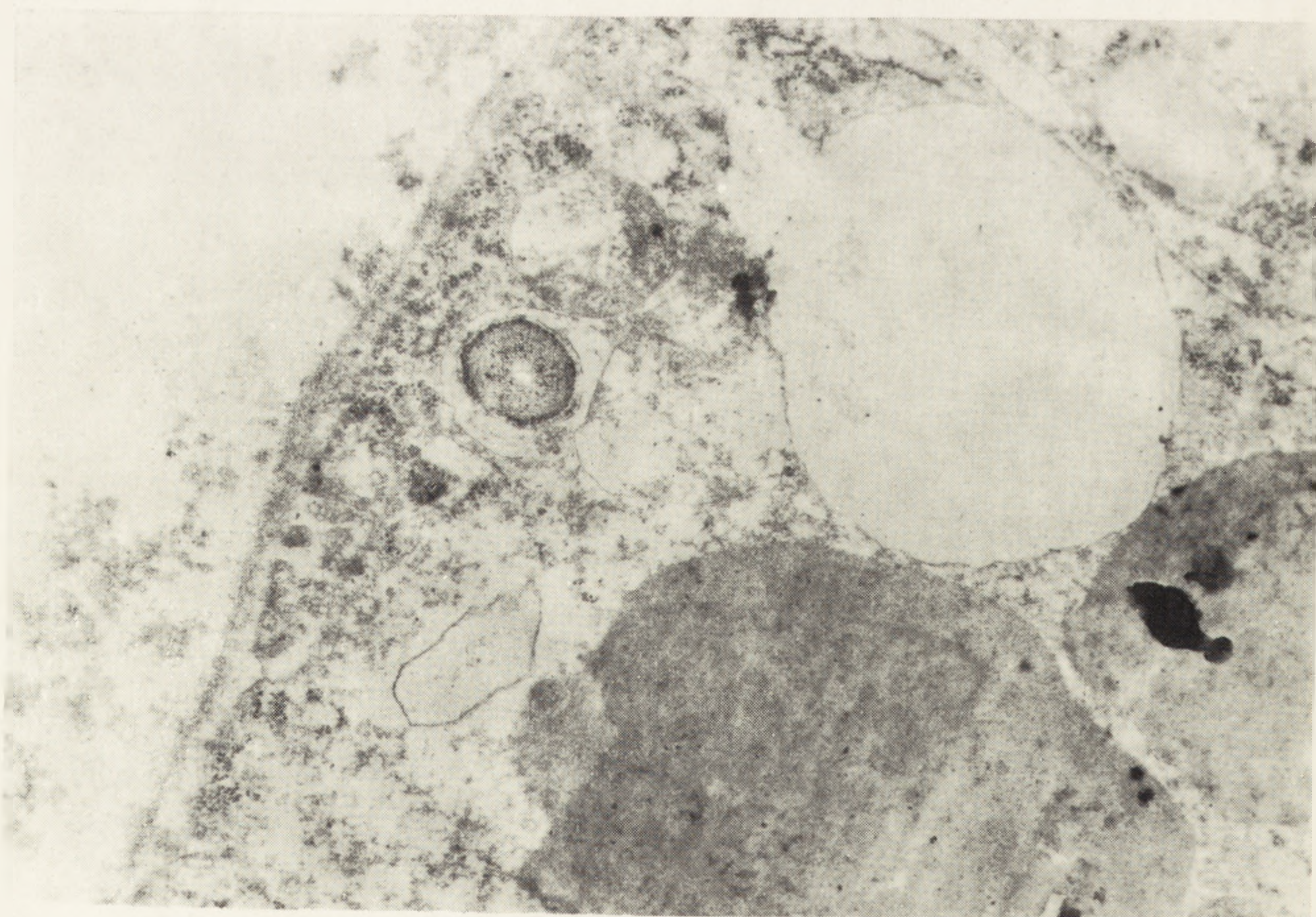


Rys. 3. Synteza „sex protein” przez ciało tłuszczowe *Hyalophora cecropia*. Intensywność syntezy wskazanego typu białka wyrażona jako procent radioaktywności znajdującej we frakcji „sex protein” w stosunku do całkowitej radioaktywności białek. Owadom wstrzykiwano  $H^3$ -leucynę na 24 godz. przed dokonaniem oznaczeń. Według [132]



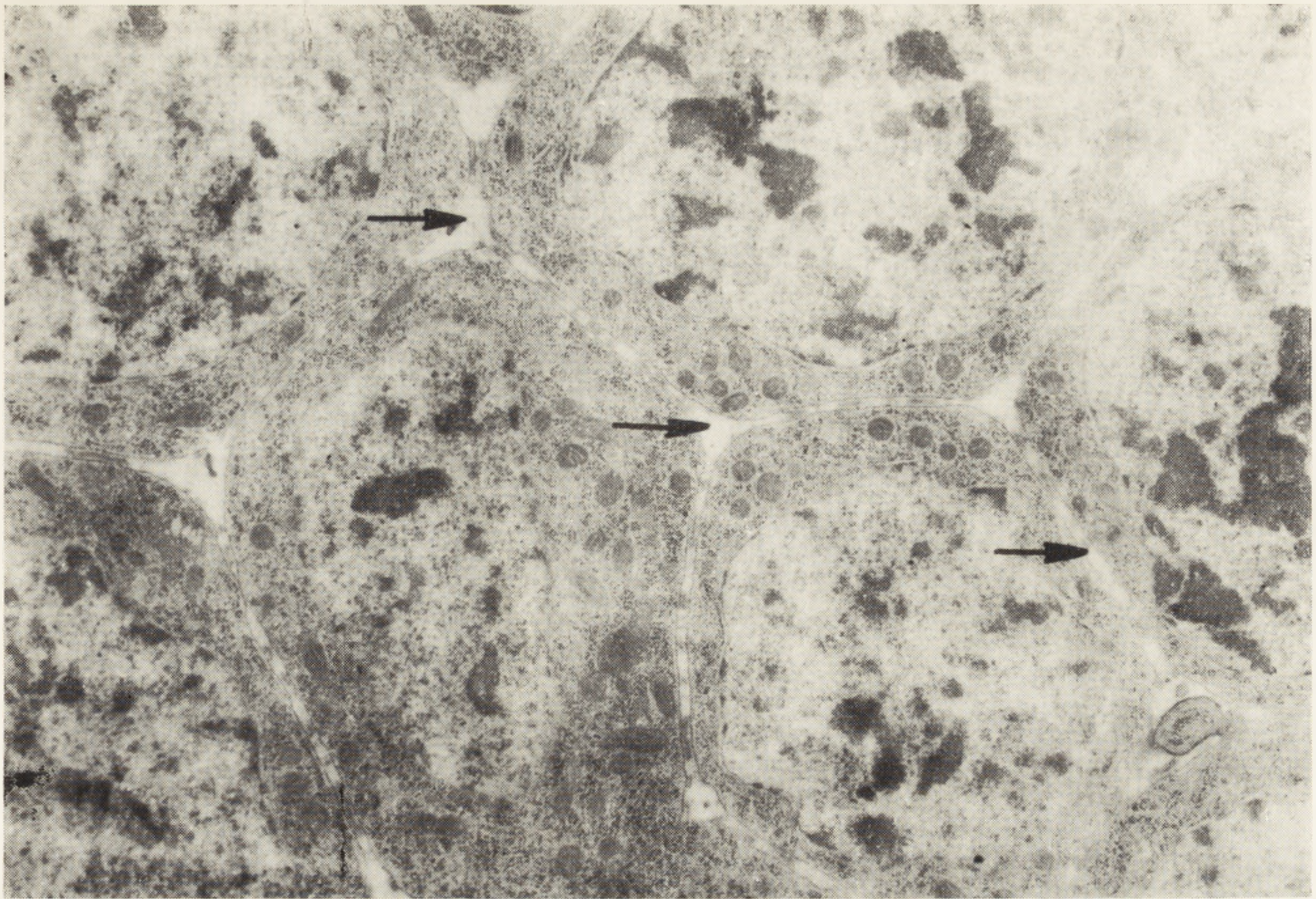


Rys. 4. Fragment komórki ciała tłuszczowego samicy *Galleria mellonella* sześć dni po przepoczwarczeniu.  $\times 35\ 000$

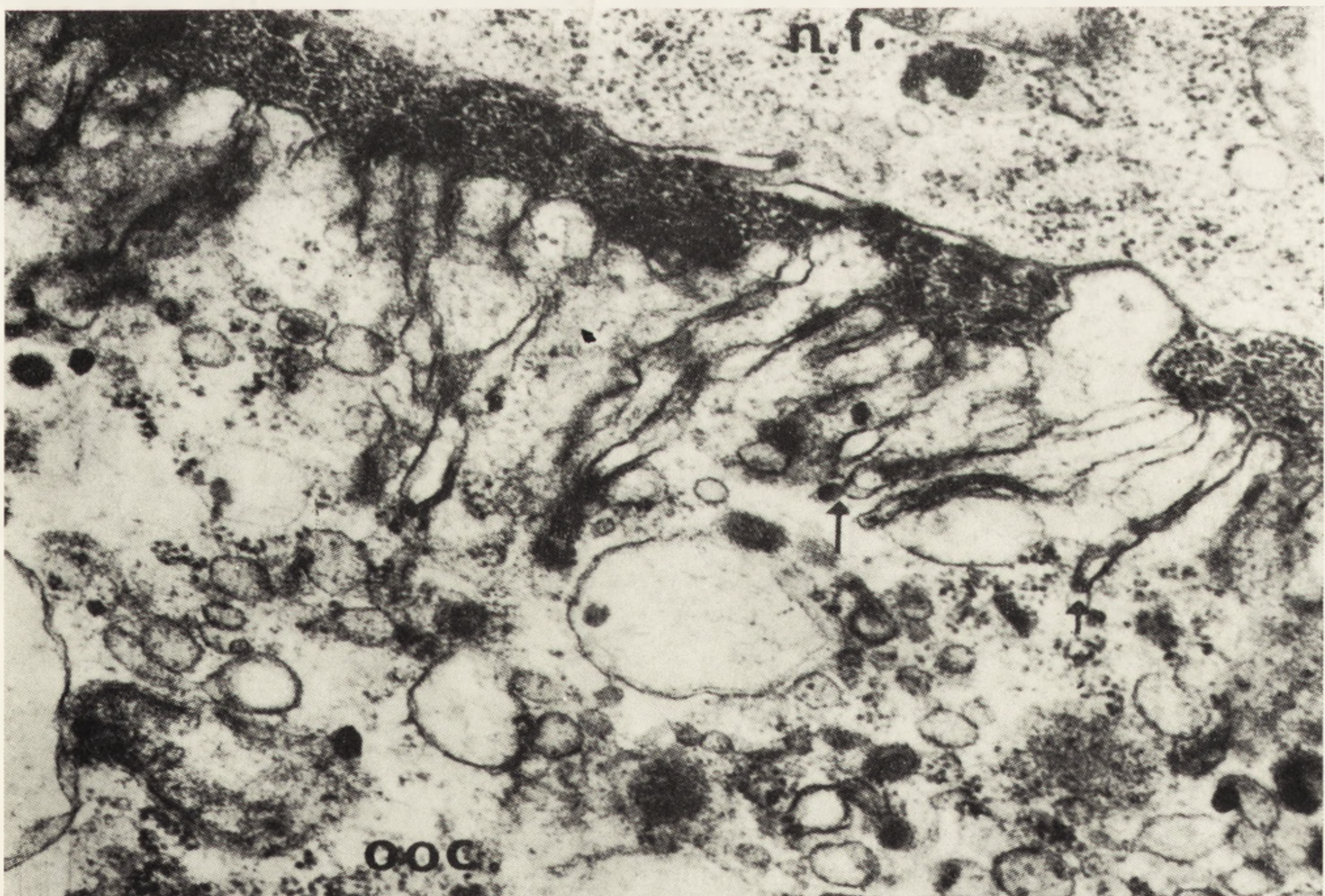


Rys. 5. Fragment komórki ciała tłuszczowego samicy *Galleria mellonella* osiem dni po przepoczwarczeniu.  $\times 35\ 000$





Rys. 6. Przekrój przez warstwę komórek nabłonka folikularnego witellogenetycznych pęcherzyków jajowych *Galleria mellonella*. Przestrzenie międzykomórkowe (strzałki) przez które substancje znajdujące się w hemolimfie docierają do powierzchni oocytu.  
 × 12 500

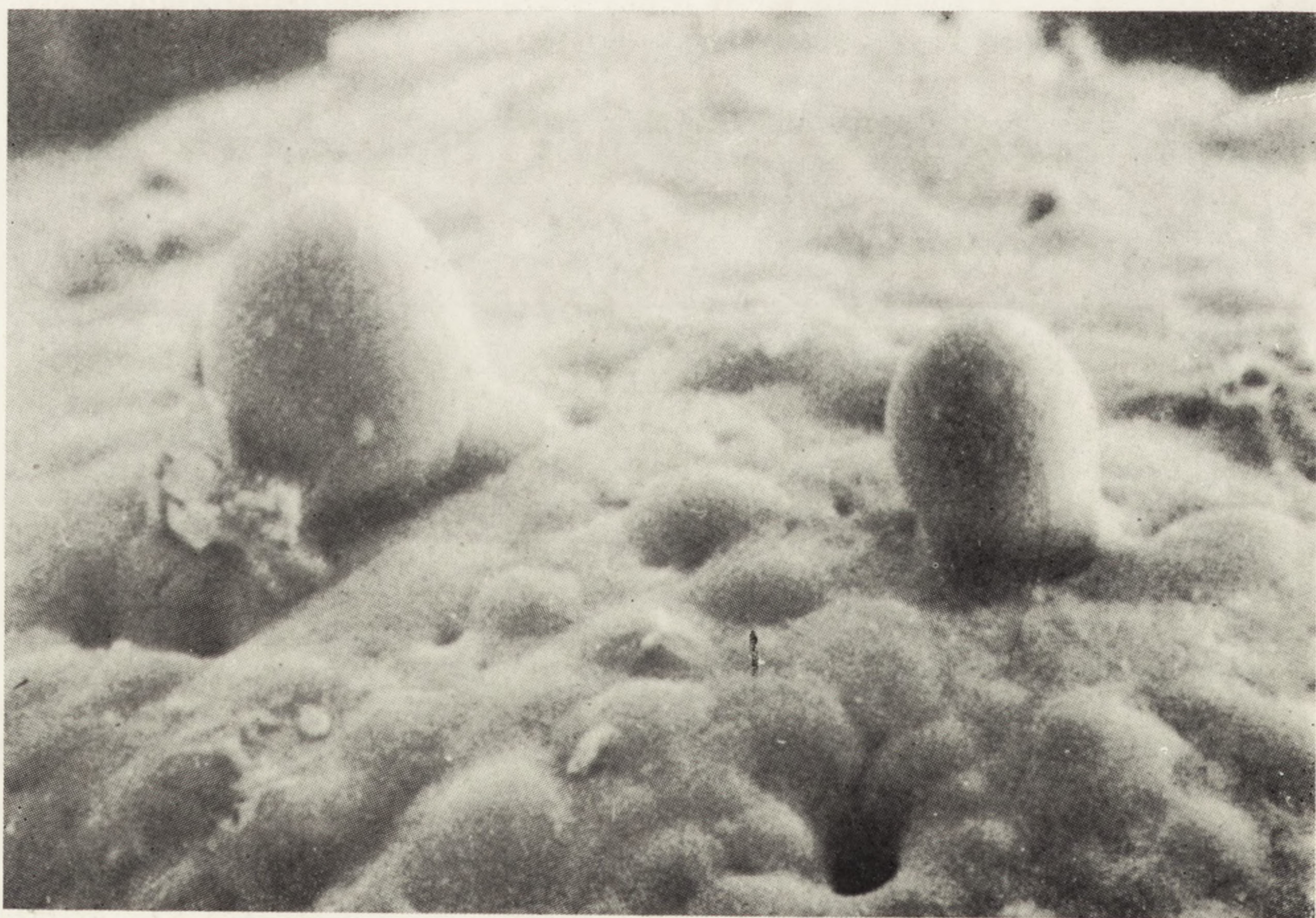


Rys. 7. Granica między komórką nabłonka folikularnego (n. f.) a oocytem (ooc.) witellogenetycznego pęcherzyka jajowego *Galleria mellonella*. Pęcherzyki pinocyto-  
 tyczne zaznaczone strzałkami, × 50 000





Rys. 8. Mikrofotografia elektronowa cieniowanych cząsteczek LP-I (a) i LP-II (b) z hemolimfy *Philosamia cynthia*. Zdjęcia udostępnione przez dra Chino [37].  $\times 125\ 000$



Rys. 9. Powierzchnia ciała tłuszczowego przedpoczwarki samicy *Galleria mellonella*. Nieliczne kuliste twory — prawdopodobnie adipocyty — na powierzchni tkanki.

$\times 1\ 800$



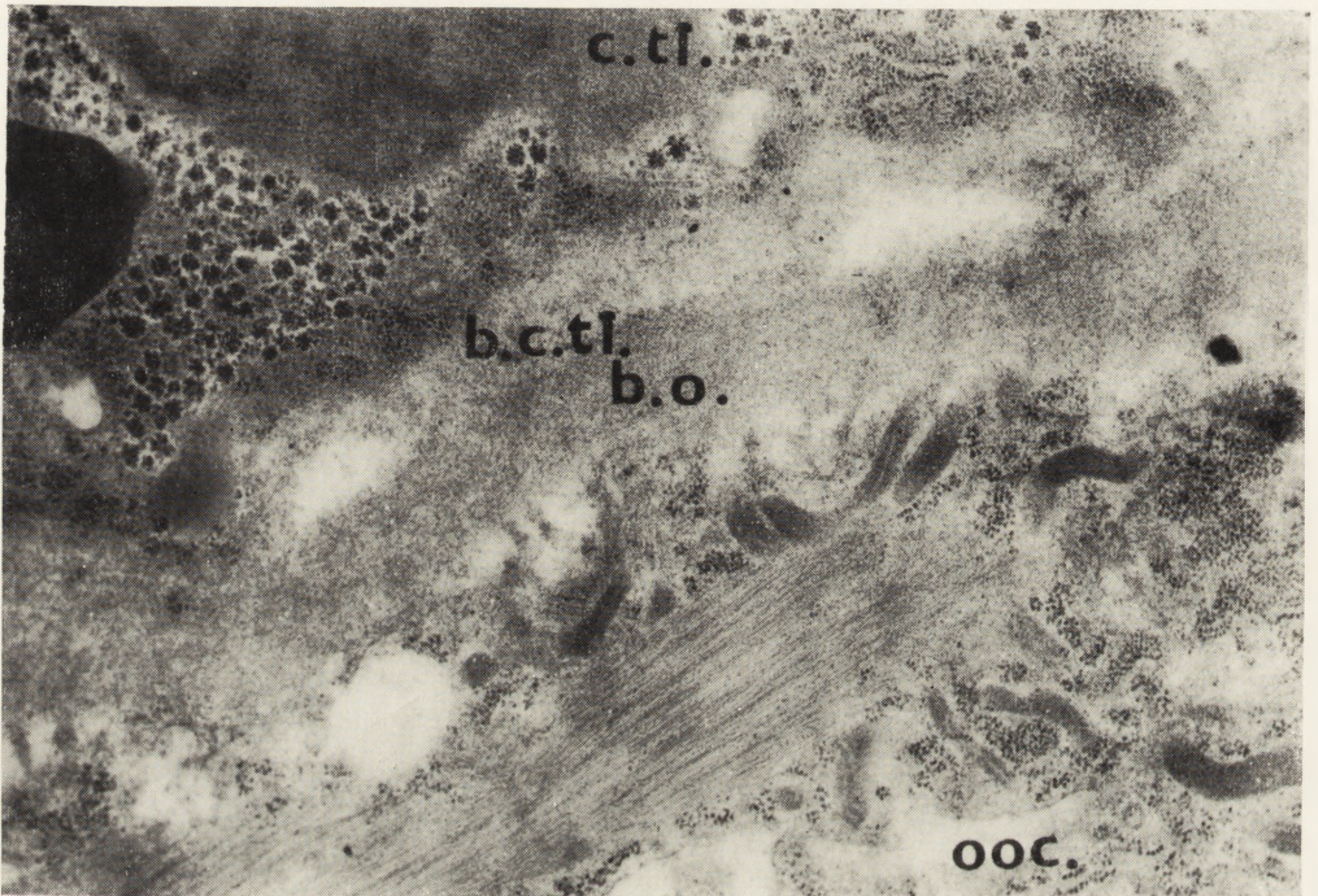


Rys. 10. Powierzchnia ciała tłuszczowego samicy *Galleria mellonella* sześć dni po przepoczwarczeniu. Liczne kuliste twory — prawdopodobnie adipocyty — na powierzchni tkanki.  $\times 1500$



Rys. 11. Fragmenty rureczek jajnikowych (r. j.) zawierających witellogenetyczne pęcherzyki jajowe z przylegającymi do nich płatami ciała tłuszczowego (c. tł.).  $\times 300$





Rys. 12. Powiązanie morfologiczne między ciałem tłuszczowym a rurką jajnikową *Galleria mellonella*. Wyraźny kontakt między błoną podstawną pokrywającą ścianę owarioli a analogiczną błoną pokrywającą płaty ciała tłuszczowego. c. tł. — ciało tłuszczowe, ooc. — oocyt, b. o. — błona podstawna zewnętrznej ściany owarioli, b. c. tł. — błona podstawna ciała tłuszczowego.  $\times 70\ 000$



nie w okresie bezpośrednio poprzedzającym witellogenezę. Stanowi to bezsprzecznie mechanizm ułatwiający dostęp zewnątrzowaryjnych substancji do oocytu [44, 94, 96, 99]. Podczas witellogenezy następuje również częściowe odklejenie się komórek nabłonka folikularnego od powierzchni oocytów [7, 99, 159]. Dzięki temu powierzchnia kontaktu między oocytem a dostarczonymi z zewnątrz substancjami zwiększa się. Innym procesem służącym powyższemu jest tworzenie przez oolemmę licznych mikrokosmków [6, 12, 23, 99, 106, 155]. Tworzeniu się wypustek oolemmy towarzyszy pojawienie się na terenie korowej ooplazmy pęcherzyków pinocytotycznych [7, 10, 11, 98, 99, 116, 152, 159] (rys. 7). Ferrytyna lub peroksydaza wprowadzone do hemolimfy owada pojawiają się najpierw w pęcherzykach pinocytotycznych, a następnie w kulach żółtka [11, 159]. Można zatem przyjąć, że wszystkie wielkocząsteczkowe substancje wbudowywane są w ooplazmę drogą pinocytozy. Brookes i Dejmala [31] wykazali, że podczas witellogenezy do oocytu dostają się zsyntetyzowane w ciele tłuszczowym podjednostki „sex protein” o stałej sedymentacji 14 S i dopiero na terenie ooplazmy z dwóch takich podjednostek tworzy się 27 S „sex protein”, charakterystyczne dla komórek jajowych.

Jaki jest mechanizm warunkujący wybiórcze wbudowanie „sex protein” do oocytów, powodujący, że ich zawartość w tych komórkach jest 20–30-krotnie wyższa niż w hemolimfie, dokładnie jeszcze nie jest wiadomo. Telfer i współpracownicy [10, 120, 166] uważają, że koncentracja „sex protein” zachodzi w przestrzeniach między komórkami folikularnymi bądź w przestrzeni między tymi komórkami a oocytem. Anderson i Spielman [11] natomiast sądzą, że sama oolemma zaangażowana jest w selektywną adsorpcję białek. Za proces ten odpowiedzialna ma być warstwa mukopolisacharydów związanych z błoną plazmatyczną oocytu, która wybiórczo wiąże cząsteczki określonych białek, dzięki czemu następuje ich zagęszczenie. Należy dodać, że obecność związanej z oolemmą warstwy mukopolisacharydów została stwierdzona w oocytach kilku gatunków owadów [8, 71].

Charakterystyczne dla samic białko wydaje się stymulować aktywność pinocytotyczną oocytu. Przypuszczenie to wynika z obserwacji Hausman i współautorów [87] dotyczących różnic we wbudowywaniu się do oocytów *Hyalophora cecropia* znakowanego trytem „sex protein” i związanej z fluoresceiną gamma globuliny. W warunkach *in vitro* pierwsze z tych białek łatwo uległo inkorporacji do ooplazmy, natomiast białko związane z fluoresceiną tylko w bardzo ograniczonym stopniu. Na tej podstawie autorzy uważają, że „sex protein” przyspiesza pinocytozę. Zjawisko to może być spowodowane bądź przez interakcję „sex protein” z oolemmą, bądź może być wynikiem stymulowania przez to białko pro-



dukcji w komórkach nabłonka folikularnego jakiejś substancji aktywującej proces pinocytozy. Pierwsza z tych możliwości pozostaje w zgodzie z opinią Anderson i Spielman [11] o selektywnym wiązaniu „sex protein” z oolemmą. Za drugą możliwością przemawia wykrycie w komórkach nabłonka folikularnego pęcherzyków jajowych *Hyalophora cecropia* [10] i *Musca domestica* [34] bogatej w histydynę wydzieliny, która pojawia się w okresie inicjacji procesów witellogenezy w tych pęcherzykach. Nie wiadomo jednak czy ta wydzielina rzeczywiście jest aktywatorem procesów pinocytozy. Można bowiem przypuszczać, że spełnia ona funkcję podobną do roli wykrytego przez de Loof i współpracowników [108] w komórkach nabłonka folikularnego *Leptinotarsa decemlineata* kompleksu białka z mukopolisacharydem. Kompleks ten zdaniem autorów reaguje z „sex protein” powodując, że białko to znajduje się w oocycie w formie nierozpuszczalnej, dzięki czemu może ono być gromadzone w komórce w dużej ilości nie naruszając jej ciśnienia osmotycznego. Ta nierozpuszczalna forma zapewnić ma charakterystycznemu dla samic białku znaczną trwałość w oocycie.

Problem transportu białek hemolimfy do oocyty, pomimo intensywnie prowadzonych badań, nie jest jeszcze w pełni wyjaśniony. Czynny udział komórek nabłonka folikularnego w transporcie tych substancji wydaje się jednak niewątpliwy. Niezależnie od tego jaką rolę spełnia wydzielina tych komórek, wydaje się, że ma ona istotne znaczenie dla tego procesu. Wykazano bowiem, że działanie aktynomycyny uniemożliwia pobieranie „sex protein” przez oocyty [141]. Wpływ zaś tego antybiotyku wiązać można z zablokowaniem syntezy substancji białkowych produkowanych przez komórki nabłonka folikularnego.

#### KONTROLA HORMONALNA SYNTEZY I POBIERANIA PRZEZ OOCYTY BIAŁKA CHARAKTERYSTYCZNEGO DLA SAMIC

Proces dojrzewania jaj owadów regulowany jest hormonalnie. Wzrost komórek jajowych większości gatunków owadów oraz odkładanie się w nich żółtka uwarunkowane są działaniem hormonu produkowanego przez corpora allata — hormonu juwenilnego. Dla pełnego rozwoju jaj niektórych gatunków owadów niezbędny jest również hormon wytwarzany przez komórki neurosekrecyjne mózgu. Tylko niektóre gatunki z rzędów *Phasmida*, *Diptera* i *Lepidoptera* stanowią pod tym względem wyjątek. Corpora allata nie kontrolują witellogenezy tych gatunków owadów należących do rzędu *Lepidoptera*, których postacie dorosłe nie odżywiają się. Wydaje się również, że w kontroli witellogenezy w przypadku tych owadów nie uczestniczą hormony produkowane przez komórki neurosekrecyjne mózgu i corpora cardiaca [65, 184].



Wobec istotnej roli białek, głównie „sex protein”, w procesie dojrzewania jaj, nic dziwnego, że badania dotyczące hormonalnej kontroli reprodukcji koncentrują się obecnie nad wyjaśnieniem mechanizmów regulujących syntezę białka charakterystycznego dla samic.

Pierwsze sugestie wskazujące na to, że corpora allata biorą udział w kontroli syntezy białek wysunęli Bodenstein [26] i L'Helias [104]. Przypuszczenia te znalazły potwierdzenie w wynikach badań przeprowadzonych na *Rhodnius prolixus* [178] i *Phormia regina* [131]. Usunięcie corpora allata nie tylko uniemożliwiało rozwój jaj obu owadów, lecz powodowało u samic *Rhodnius* znaczne obniżenie wbudowywania się piętnowanych aminokwasów w białka ciała tłuszczowego. Natomiast u *Phormia* zabieg ten powodował hipertrofię ciała tłuszczowego, w którym gromadziła się znaczna ilość białka. Wnioskuje się zatem, że hormon produkowany przez corpora allata kontroluje syntezę białek w ciele tłuszczowym owadów należących do pierwszego gatunku, w drugim zaś przypadku wydaje się być zaangażowany w regulację procesów uwalniania tych substancji z ciała tłuszczowego. Badania prowadzone w tym samym czasie na innych gatunkach owadów wykazały, że również komórki neurosekrecyjne mózgu zaangażowane są w kontrolę metabolizmu białkowego. Kauteryzacja zespołu komórek neurosekrecyjnych pars intercerebralis *Schistocerca gregaria* [88, 90] i *Gomphocerus rufus* [105] powodowała, prócz zahamowania rozwoju jaj, również znaczne obniżenie zawartości białek w hemolimfie. Można było przypuszczać, że spadek ten, spowodowany zniszczeniem komórek neurosekrecyjnych, jest efektem pośrednim. Wiadomo bowiem, że działanie corpora allata zależy od hormonu produkowanego przez komórki neurosekrecyjne mózgu. Jednak w przypadku omawianych owadów usunięcie samicom corpora allata nie powoduje istotnego obniżenia zawartości białek w hemolimfie. Zatem komórki neurosekrecyjne tych owadów bezpośrednio zaangażowane są w kontrolę syntezy białek.

Istnieją dane, że zarówno hormon produkowany przez corpora allata, jak i hormon produkowany przez komórki neurosekrecyjne mózgu zaangażowane mogą być w kontrolę syntezy białka charakterystycznego dla samic.

Podczas dojrzewania jaj *Rhodnius* pojawiają się dwie frakcje tego białka, których nie wykrywa się po allatektomii [41, 145]. Wskazuje to na udział usuniętych gruczołów w kontroli syntezy „sex protein”. Podobnie po allatektomii nie wykrywa się „sex protein” w hemolimfie *Leucophaea* [68]. Białko to ponownie pojawia się w hemolimfie operowanych owadów po podaniu hormonu juwenilnego [67]. Hormon ten stymuluje syntezę podjednostki „sex protein” o stałej sedymentacji 14 S, która zachodzi w ciele tłuszczowym osobników tego gatunku owadów [30]. Po-



dobną zależność syntezy „sex protein” od obecności hormonu juwenilnego stwierdzono również u innych owadów [92, 115, 134, 192].

Dwa różne eksperymenty wykazały, że dla dojrzewania jaj niezbędna jest zarówno obecność charakterystycznego dla samic białka, jak i hormonu juwenilnego. Wstrzyknięcie „sex protein” allatektomizowanym samicom *Periplaneta americana* nie wywołuje witellogenezy. Zachodzi ona jednak, jeżeli jednocześnie z tym białkiem wprowadzony został do organizmu owada hormon juwenilny [16]. Jak wspominaliśmy w hemolimfie samców nie ma „sex protein” lub występuje ono w śladowych ilościach. Komórki jajowe w przeszczepionych osobnikom tej płci rureczkach jajnikowych nie dojrzewały, mimo że poziom hormonu juwenilnego w organizmie biorcy był wysoki. Natomiast po parabiozie tych samców z samicami, przeszczepione owaria rozwijały się normalnie [185]. Hormon juwenilny warunkuje zatem nie tylko syntezę „sex protein”, ale również odkładanie się tego białka w komórkach jajowych. Przeciwnie, szybkość dojrzewania komórek jajowych najprawdopodobniej nie zależy od stężenia hormonu juwenilnego w hemolimfie, ale od zawartości w niej „sex protein” [186]. Badania Engelmana [66] wskazują, że ekdyzon może znosić stymulującą syntezę „sex protein” działanie hormonu juwenilnego. Po jednoczesnym wstrzyknięciu allatektomizowanym samicom *Leucophera* hormonu juwenilnego i ekdyzonu ilość zsyntetyzowanego białka jest znacznie mniejsza niż w przypadku kiedy do organizmu operowanego owada wprowadzano tylko hormon juwenilny. Ostatnio Lanzrein [102] wykazała, że hormon juwenilny stymuluje syntezę charakterystycznego dla samic białka również w stadium larwalnym *Nauphoeta cinerea*. W tym jednak przypadku ilość hormonu, która wywołuje ten efekt ściśle zależy od okresu kiedy hormon został wprowadzony do organizmu owada. Bezpośrednio po lince stymulację syntezy omawianego białka wywołuje stukrotnie wyższa ilość hormonu w porównaniu do tej ilości, która działa efektywnie gdy wstrzyknięta jest w kilka dni po lince. Ponieważ w okresie linienia owada poziom ekdyzonu w hemolimfie wzrasta, powyższe różnice mogą być spowodowane przez antagonistyczne działanie obu hormonów.

Szereg badań wskazuje, że jednak nie u wszystkich gatunków owadów synteza „sex protein” uwarunkowana jest obecnością hormonu juwenilnego [14, 24, 97, 103]. Wydaje się natomiast, że w przypadku niektórych gatunków hormon ten może kontrolować procesy związane z wykorzystywaniem tego białka przez komórki jajowe [14, 97]. I tak np. podczas diapauzy reprodukcyjnej *Drosophila* dojrzewanie jaj nie zachodzi, pomimo że zawartość „sex protein” w hemolimfie jest wysoka. Dopiero wstrzyknięcie hormonu juwenilnego przerywa diapauzę, komórki jajowe dojrzewają, czemu towarzyszy obniżenie zawartości „sex protein” w he-



molimfie. Zjawisko to może być związane z aktywacją przez hormon juwenilny substancji produkowanej przez komórki nabłonka folikularnego, która pobudza pinocytozę w oocytach.

Dla niektórych gatunków owadów inne niż corpora allata części ośrodkowego układu neuroendokrynalnego odgrywają istotną rolę w kontroli syntezy charakterystycznego dla samic białka. Zahamowanie syntezy „sex protein” obserwowano po usunięciu corpora allata i corpora cardiaca samicom *Leptinotarsa decemlineata*. Wstrzyknięcie operowanym owadom hormonu juwenilnego nie przywraca zdolności do syntezy „sex protein”. Zostaje ona dopiero przywrócona po jednoczesnym wstrzyknięciu tego hormonu i wszczepieniu mózgu lub corpora cardiaca [110]. Analogicznie sugerowano udział komórek neurosekrecyjnych w kontroli syntezy „sex protein” *Aedes aegypti* [14]. Obecnie jednak uważa się, że w przypadku tego owada hormon ten oddziałuje na syntezę omawianego białka pośrednio poprzez pobudzenie produkcji przez owaria specyficznego hormonu. Ten działać ma bezpośrednio na ciało tłuszczowe stymulując w nim syntezę „sex protein” [82, 83]. Interesująca chociaż nie wyjaśniona jest obserwacja, że  $\beta$ -ekdyzon może zastąpić u tych owadów działanie hormonu produkowanego przez owaria [69].

Omówiliśmy powyżej obecny stan badań dotyczący kontroli syntezy „sex protein”, ponieważ białko to u większości owadów jest podstawowym składnikiem żółtka białkowego. Należy jednak pamiętać, w ciele tłuszczowym owadów syntetyzowane mogą być również inne białka, które też, chociaż w znacznie mniejszym stopniu, mogą być w żółtko wbudowane. Synteza tych pozostałych białek jest również kontrolowana hormonalnie. Mechanizmu tej kontroli omawiać tutaj nie będziemy, przytoczymy tylko stwierdzenie Scheurer [156], która konkluduje na podstawie przeprowadzonych obserwacji, iż synteza poszczególnych białek produkowanych przez ciało tłuszczowe tego samego gatunku owadów może być kontrolowana przez różne gruczoły neuroendokrynalne.

Całkiem osobnym zagadnieniem, będącym przedmiotem opracowania, jest mechanizm działania hormonów prowadzący bądź do inicjacji, bądź zwiększenia intensywności syntezy białka. Ograniczymy się tylko do stwierdzenia, że poprzedzająca syntezę białka synteza RNA regulowana jest hormonalnie [cf. 148].

#### LIPIDOWY SKŁADNIK ŻÓŁTKA

Lipidy, podobnie jak białka, są gromadzone w komórce jajowej podczas witellogenezy. Tworzą one tzw. żółtko lipidowe, którego ilość, analogicznie jak żółtka białkowego, jest różna w komórkach jajowych po-



szczególnych gatunków owadów. Pomimo oczywistego znaczenia lipidów jako materiału energetycznego, zużywanego podczas embriogenezy, ilość prac dotyczących ich pochodzenia jest bardzo ograniczona. Do niedawna utrzymywało się przekonanie, oparte na wynikach badań cytochemicznych, które dominowały wśród badań dotyczących omawianego zagadnienia, że kule żółtka lipidowego tworzone są w cysternach aparatu Golgiego bądź też z mitochondrów samych oocytów. Badania mikroskopowo-elektronowe wykazały jednak, że wymienione organelle komórki jajowej nie uczestniczą w syntezie żółtka lipidowego [cf. 184]. Pojawianie się w początkowym okresie witellogenezy lipidów w pobliżu komórek nabłonka folikularnego w pęcherzykach jajowych jajników typu panoistycznego, a w pęcherzykach jajowych jajników typu meroistycznego również w pobliżu trofocytów, sugerowało udział komórek troficznych w procesie syntezy żółtka lipidowego [28, 45, 99]. Badania autoradiograficzne przeprowadzone na pęcherzykach jajowych obu typu jajników wykazały, że znakowany palmitynian sodu wbudowuje się początkowo zarówno w komórki nabłonka folikularnego, jak i trofocytów [59, 150, 151]. Obserwacje te wskazują również na komórki troficzne jako prawdopodobne miejsce syntezy lipidów, które magazynowane są w komórkach jajowych w czasie witellogenezy.

Można przypuszczać, że zainicjowane przez Telfera badania dotyczące pozaowaryjnego pochodzenia żółtka białkowego, zwróciły również uwagę na możliwość podobnego pochodzenia żółtka lipidowego. Zachodzący równocześnie z dojrzewaniem jaj spadek ilości lipidów ciała tłuszczowego *Protophormia terrae-novae* [86] i *Phormia regina* [131] sugerował możliwość pochodzenia z ciała tłuszczowego lipidów odkładanych w komórce jajowej. Bardziej szczegółowe badania przeprowadzone na gatunkach owadów, których jaja bogate są w lipidy jak *Pyrrhocoris apterus* [117] i *Galleria mellonella* [60] wykazały, że ilość lipidów gromadzonych w jajach podczas witellogenezy prawie dokładnie odpowiada ilości, o którą zmniejszyła się ich zawartość w ciele tłuszczowym w tym okresie. Po owariotektomii *Drosophila melanogaster* [32] bądź po usunięciu corpora allata *Periplaneta americana* [179], zabiegu powodującym zahamowanie rozwoju jaj tego owada, nie obserwowano spadku ilości lipidów ciała tłuszczowego. Dane powyższe, aczkolwiek pośrednio, to jednak wyraźnie wskazują, że ciało tłuszczowe jest tkanką która dostarcza lipidów rozwijającym się oocytom.

Pośrednich danych dotyczących omawianego zagadnienia dostarczają również nieliczne cytologiczne i ultrastrukturalne badania ciała tłuszczowego, w których korelowano obserwowane zmiany organizacji komórek tej tkanki z cyklem dojrzewania jaj. Cechą charakterystyczną komórek ciała tłuszczowego w czasie cyklu dojrzewania jaj jest bądź zupełny za-



nik w nich kul lipidowych, bądź znaczne zmniejszenie ich wielkości [21, 52, 72, 107, 175]. W ciele tłuszczowym samców w analogicznym stadium rozwojowym [21, 52], jak również u samic po owariotektomii [21, 52, 107] nie obserwuje się podobnego zmniejszenia ilości lipidów. W tym ostatnim przypadku ilość kul lipidowych i ich wymiary są podobne do występujących w tkance przed dokonaniem zabiegu bądź też następuje znaczne nagromadzenie kul lipidowych w porównaniu z komórkami ciała tłuszczowego samic rozwijających się normalnie.

Badania Gilberta [76] dostarczają bezpośredniego dowodu wskazującego na wbudowywanie się w komórki jajowe lipidów pochodzących z ciała tłuszczowego. Inkubował on ciało tłuszczowe *Leucophaea maderae* w roztworze zawierającym  $C^{14}$  palmitynian sodu. Związek ten wbudowywał się głównie w glicerydy tkanki. Przygotowane w ten sposób ciało tłuszczowe inkubował ponownie w środowisku nie zawierającym piętnowanego związku równocześnie z owariolami. Po godzinnej inkubacji i analizie radioaktywności frakcji lipidowych obu narządów okazało się, że owaria zawierają piętnowane lipidy oraz że aktywność lipidów ciała tłuszczowego uległa wyraźnemu obniżeniu. Wyniki powyższe wskazują, że w warunkach in vitro lipidy mogą być uwolnione z ciała tłuszczowego do środowiska i następnie wbudowane do komórek jajowych. Można przypuszczać, że podobne procesy zachodzą również in vivo. Jest to tym bardziej prawdopodobne, ponieważ obserwowano wzrost stężenia lipidów w hemolimfie samic w okresie inicjowania witellogenezy, w komórkach jajowych poprzedzany obniżeniem zawartości tych związków w ciele tłuszczowym [118, 121].

#### FORMA I MECHANIZMY UWALNIANIA LIPIDÓW Z CIAŁA TŁUSZCZOWEGO

Forma, w jakiej lipidy uwalniane są z ciała tłuszczowego owadów, jak również mechanizm tego procesu są przedmiotem szeregu badań prowadzonych w ostatnich latach. Tietz [176] pierwsza wykazała, że lipidy uwalniane są z ciała tłuszczowego *Locusta migratoria* w postaci glicerydów i wolnych kwasów tłuszczowych. Uwalnianymi glicerydami, jak okazało się z późniejszych jej badań, są dwuglicerydy [177]. Również u innych gatunków owadów, takich jak *Hyalophora cecropia* [35, 36], *Schistocerca gregaria* [33, 119], *Melanoplus differentialis* [36] i *Oncopeltus fasciatus* [172] dwuglicerydy są główną frakcją lipidową uwalnianą do hemolimfy. Natomiast trójglicerydy są tą formą lipidów, która uwalniana jest z ciała tłuszczowego *Pyrrhocoris apterus* [118], a wolne kwasy tłuszczowe uwalniane są przez tę tkankę *Galleria mellonella* [188, 190]. Wydawałoby się, że powyższe różnice można tłumaczyć różnicami ga-



tunkowymi badanymi owadów. Wyniki uzyskane przez różnych autorów, prowadzących badania na tym samym gatunku, przeczą jednak takiemu przypuszczeniu. I tak na przykład Cook i Eddington [43] wykazali, że lipidy uwalniane są z ciała tłuszczowego *Periplaneta* w postaci trójglicerydów i wolnych kwasów tłuszczowych, natomiast Downer i Steele [48] wskazują na dwuglicerydy, a Bhakthan i Gilbert [18] na wolne kwasy tłuszczowe jako główne formy w których lipidy uwalniane są z tej tkanki tego gatunku owada. Podobnie sprzeczne dane uzyskano dla innego gatunku *Manduca sexta*. Podczas gdy Bhakthan i Gilbert [19] wykazują, że dwuglicerydy uwalniane są przez ciało tłuszczowe, to dane uzyskane przez Changa i Friedmana [33] wskazują na wolne kwasy tłuszczowe jako związki uwalniane przez tę tkankę omawianego gatunku owadów. Czym można wytłumaczyć powyższe różnice? Można przypuszczać, że są one spowodowane odmienną metodyką badań lub też różnicami w stadiach rozwojowych owadów, na których przeprowadzono badania. Ostatnia ewentualność mogłaby mieć istotne znaczenie fizjologiczne. Pierwsza z wymienionych przyczyn wydaje się jednak nie mieć większego znaczenia. Badania przeprowadzone na *Periplaneta americana* pochodzą z tego samego laboratorium i wykonane są z zastosowaniem podobnej metodyki. Mimo to uzyskane wyniki różnią się znacznie. Według Chino i Gilberta [36] z ciała tłuszczowego tego owada uwalniane są dwuglicerydy, natomiast zgodnie z Bhakthan i Gilbertem [18] uwalniane są wolne kwasy tłuszczowe. Również cytowane powyżej badania Bhakthan i Gilberta [19] oraz Changa i Friedmana [33] dotyczące *Manduca sexta* przeprowadzone były bardzo podobnie.

Chino i Gilbert [36] wykazali, że z ciała tłuszczowego poczwerek *Hyalophora cecropia* uwalniana jest tylko niewielka ilość dwuglicerydów, natomiast w znacznym stopniu uwalniane są wolne kwasy tłuszczowe. Z ciała tłuszczowego osobników dorosłych uwalniane są przede wszystkim dwuglicerydy. Przeciwnie Chang i Friedman [33] stwierdzili jedynie różnice w intensywności uwalniania wolnych kwasów tłuszczowych z ciała tłuszczowego *Manduca sexta* w różnych stadiach rozwojowych, natomiast nie obserwowali żadnych różnic w formie w jakiej lipidy są uwalniane z tkanki. Wobec tych rozbieżności trudno jest obecnie określić czy i w jakim stopniu stadium rozwojowe owada warunkuje postać, w jakiej lipidy uwalniane są przez ciało tłuszczowe, a zatem czy rozbieżności danych dotyczących tego zagadnienia można im przypisać.

Interesujące dane pochodzą z badań nad składem kwasów tłuszczowych glicerydów ciała tłuszczowego i hemolimfy *Hyalophora cecropia* [13]. Skład ten różni się znacznie dla obu tkanek. Pamiętając, że większość lipidów hemolimfy pochodzi z ciała tłuszczowego można przypuszczać, że różnice te spowodowane są przez wybiórcze uwalnianie z ciała



tłuszczowego glicerydów o ściśle określonym składzie kwasów tłuszczowych. Autorzy omawianej pracy uważają, że w ciele tłuszczowym owadów znajdują się dwie pule glicerydów, z których tylko jedna uwalniana jest do hemolimfy. Zakładają oni, że zjawisko to jest spowodowane kompartmentalizacją ciała tłuszczowego, podobną do postulowanej w tkance tłuszczowej kręgowców. Przy takim założeniu, trójglicerydy będące głównym składnikiem lipidowym ciała tłuszczowego znajdują się w magazynującym kompartmentencie tkanki. W kompartmentencie tym ulegają one hydrolizie najprawdopodobniej do monoglicerydów. Powstałe monoglicerydy transportowane są do drugiego kompartmentu — zwanego aktywnym — gdzie resyntetyzowane są dwuglicerydy o składzie kwasów tłuszczowych charakterystycznym dla frakcji uwalnianej do hemolimfy.

W badaniach *in vitro* Chino i Gilbert [36] wykazali, że dwuglicerydy uwalniane są do środowiska przez ciało tłuszczowe *Hyalophora cecropia*, *Melanoplus differentialis* i *Periplaneta americana* tylko wtedy, kiedy środowisko inkubacyjne zawiera hemolimfę. Jeżeli hemolimfę zastąpiono albuminą z surowicy królika bądź użyto jako środowiska inkubacyjnego roztworu soli fizjologicznej, to uwalniania się dwuglicerydów z ciała tłuszczowego nie obserwowano. Wyniki te sugerowały istotny udział hemolimfy lub jakiegoś składnika w procesie uwalniania dwuglicerydów z ciała tłuszczowego i zostały poparte przez innych autorów [43, 172, 177].

Niezależnie od siebie Chino i współpracownicy [37, 38] oraz Thomas i Gilbert [171, 173, 174] wyizolowali z hemolimfy szeregu gatunków jedwabników lipoproteidy, które — jak wykazali — zaangażowane są w transport dwuglicerydów z ciała tłuszczowego do miejsca ich zużycia. Pierwsi nazwali je lipoproteidami przenoszącymi dwuglicerydy I i II, natomiast drudzy — lipoproteidem o wysokiej gęstości (high density lipoprotein — HDL) i lipoproteidem o bardzo wysokiej gęstości (very high density lipoprotein — VHDL). Ponadto, przynajmniej u jednego z wymienionych gatunków owadów, występuje w hemolimfie jeszcze jeden kompleks lipidowo-białkowy nazwany lipoproteidem o niskiej gęstości (low density lipoprotein — LDL) [179]. Właściwości obu wyizolowanych przez Chino i współpracowników lipoproteidów przenoszących dwuglicerydy są zasadniczo zbliżone do właściwości HDL i VHDL wyizolowanych przez Thomas i Gilberta i dlatego zostały one nazwane odpowiednio lipoproteidem I (LP-I) i lipoproteidem II (LP-II) [77].

Chino i współpracownicy [37] określili ciężar cząsteczkowy LP-I na 700 tys. i LP-II na 500 tys. podczas gdy Thomas i Gilbert [173] uzyskali nieznacznie niższe wartości. Także dane dotyczące innych właściwości fizykochemicznych tych lipoproteidów, pochodzące z laboratoriów obu zespołów autorów, różnią się nieco. Zgodnie z danymi pierwszej grupy autorów zawartość lipidów w LP-I wynosi 44% i 10% w LP-II, podczas



TABELA 1. Skład aminokwasowy „sex protein” wyizolowanych z hemolimfy *Leptinotarsa decemlineata* (wg [109]) (%)

Lizyna	7.70	Cysteina	0.64
Histydyna	2.89	Glicyna	5.14
Arginina	4.98	Alanina	5.47
Kwas asparaginowy	9.90	Walina	6.80
Treonina	5.32	Metionina	2.51
Seryna	9.64	Izoleucyna	5.65
Kwas glutaminowy	12.74	Leucyna	7.00
Prolina	5.16	Tyrozyna	3.76
		Fenylalanina	4.69

TABELA 2. Skład chemiczny lipoproteidów wyizolowanych z hemolimfy poczwarek *Philosamia cynthia* (wg [37])

Składnik	LP-I % masy		LP-II	
	Ilość [mg]	Ilość [mg]	Ilość [mg]	% masy
Białka	31.08	56.00	58.80	90.3
Lipidy całkowite	25.03	44.00	6.32	9.7
1. Trójglicerydy	0.30	1.2	NW	—
2. Dwuglicerydy	14.10	56.3	2.18	34.5
3. Monoglicerydy	NW	—	NW	—
4. Cholesterol	3.30	13.2	0.80	12.7
5. Estry cholesterolu	NW	—	NW	—
6. Fosfolipidy	6.46	25.8	3.13	49.5
7. suma 1 — 6	24.16	96.6	6.11	96.7

Poszczególne frakcje lipidowe (1—6) jako % lipidów całkowitych.  
NW — niewykrywalne.

TABELA 3. Skład aminokwasowy lipoproteidów wyizolowanych z hemolimfy poczwarek *Philosamia cynthia* (wg [37]) \*

Aminokwas	LP-I	LP-II
Kwas asparaginowy	126	118
Treonina	49	59
Seryna	69	78
Kwas glutaminowy	104	149
Prolina	47	50
Glicyna	67	48
Alanina	63	75
Walina	74	66
Metionina	5	4
Izoleucyna	58	48
Leucyna	90	66
Tyrozyna	28	44
Fenylalanina	48	33
Histydyna	28	32
Lizyna	107	90
Arginina	37	40

\*  $\mu$  moli/mol odzyskanych aminokwasów.



gdy zgodnie z wynikami drugiej grupy autorów odpowiednio 48% i 6%. Dwuglicerydy są głównymi lipidami LP-I i LP-II, przy czym stanowią one odpowiednio 55% i 35% według danych Chino i innych [37], a 70% i 45% według danych Thomas i Gilberta [173]. Wyniki obu laboratoriów wskazują na występowanie w badanych lipoproteidach fosfolipidów, przy czym bogatsze w nie wydaje się być LP-II. Fosfolipidom przypisuje się działanie stabilizujące omawiane kompleksy lipidowo-białkowe [173]. Analiza składu aminokwasowego części białkowych tych kompleksów, wyizolowanych z hemolimfy *Philosamia*, ujawnia duże podobieństwo między obydwoma lipoproteidami. Głównymi aminokwasami są kwasy asparaginowy i glutaminowy oraz lizyna i leucyna [37]. Tabele 2 i 3 podają wyniki analizy chemicznej lipoproteidów z hemolimfy *Philosamia cynthia*. Badania mikroskopowo-elektronowe wykazały, że oba lipoproteidy mają charakter globularny [37] (rys. 8). Na podstawie pomiarów dokonanych na elektronogramach określono średnice cząsteczek tych kompleksów. Wynoszą one około 13,5 nm dla LP-I i 10 nm dla LP-II.

W celu zbadania czy uwalnianie dwuglicerydów z ciała tłuszczowego uwarunkowane jest obecnością w hemolimfie omawianych lipoproteidów, wykonano następujące doświadczenie. Ciało tłuszczowe *Hyalophora cecropia* inkubowano w roztworze zawierającym znakowany palmitynian. W wyniku tej procedury tkanka zawiera piętnowane lipidy, głównie trójglicerydy i dwuglicerydy. Tak przygotowane ciało tłuszczowe inkubowano następnie w środowisku zawierającym oczyszczone preparaty LP-I bądź LP-II. Po inkubacji ekstrahowano dwuglicerydy i mierzono ich radioaktywność. Okazało się, że ilość dwuglicerydów uwalnianych przez ciało tłuszczowe, inkubowane w środowisku zawierającym LP-I, była wielokrotnie wyższa niż w zawierającym LP-II [37]. Omówiony eksperyment dostarcza przekonującego dowodu, że czynnikiem warunkującym uwalnianie dwuglicerydów z ciała tłuszczowego jest LP-I. Można przypuszczać, że LP-I jest nie tylko czynnikiem warunkującym uwalnianie dwuglicerydów z ciała tłuszczowego, ale również spełnia rolę nośnika tych lipidów u owadów. Zdolność wiązania dwuglicerydów przez LP-I jest hamowana przez cyjanki oraz wiązanie dwuglicerydów z LP-I zachodzi tylko w obecności nienaruszonej tkanki. Należy dodać, że ostatnio również z hemolimfy *Locusta migratoria* [135, 136] i *Musca domestica* [62] wyizolowano kompleksy lipidowo-białkowe o niektórych cechach podobnych do właściwości LP-I. Wyizolowany z hemolimfy *Locusta* lipoproteid o ciężarze cząsteczkowym około 350 tys. składem chemicznym zbliżony jest do LP-I.

Jak już wspomniano, białka hemolimfy syntetyzowane są w ciele tłuszczowym i tam też syntetyzowane są lipoproteidy [135, 174]. Uwalnia-



nie dwuglicerydów z ciała tłuszczowego owadów oraz synteza w nim lipoproteidów są dwoma niezależnymi procesami [135]. Należy zatem przyjąć, że kompleks dwugliceryd LP-I nie tworzy się w obrębie tkanki tłuszczowej, tak jak ma to miejsce w przypadku tworzenia podobnych kompleksów w wątrobie ssaków, ale tworzy się na powierzchni komórek ciała tłuszczowego [77].

Jaką rolę spełni a drugi lipoproteid LP-II? Thomas i Gilbert [174] wykazali wysoką zawartość LP-II w hemolimfie poczwerek samic *Hyalophora gloveri*, podczas gdy w hemolimfie samców w analogicznym okresie rozwoju obecność tego lipoproteidu jest zaledwie wykrywalna. W okresie dojrzwania jaj zawartość LP-II zmniejsza się pięciokrotnie. U dorosłych owadów po owariotektomii jest ona zbliżona do zawartości tego lipoproteidu w hemolimfie poczwerek. Powyższe wyniki sugerowały, że LP-II jest białkiem charakterystycznym dla samic, tym bardziej, że z żółtka jaj wyekstrahowano lipoproteid o cechach analogicznych do LP-II. LP-II może być akceptorem dwuglicerydu przenoszonego przez LP-I. Ta właściwość powoduje, iż LP-II uważany za charakterystyczne dla samic białko, selektywnie pobierane przez rozwijające się komórki jajowe drogą pinocytozy, jest uniwersalnym kompleksem dostarczającym zarówno lipidów, jak i białek (prawdopodobnie również węglowodanów) niezbędnych do syntezy żółtka.

Omówiony powyżej mechanizm wyjaśnia sposób transportu lipidów z ciała tłuszczowego do komórek jajowych opracowany na podstawie wyników uzyskanych dla przedstawicieli kilku gatunków owadów, z ciała tłuszczowego których lipidy uwalniane są w postaci dwuglicerydów. Nie ma jednak żadnych danych, na podstawie których można byłoby sądzić, że u innych gatunków owadów omawiany proces przebiega w podobny sposób. Jak już wspomniano, zgodnie z Changiem i Friedmanem [33], z ciała tłuszczowego *Manduca sexta* uwalniane są jedynie wolne kwasy tłuszczowe, przy czym ich uwalnianie stymulowane jest nie tylko przez hemolimfę obecną w środowisku inkubacyjnym, ale także przez albuminę z surowicy wołu. W przypadku *Pyrrhocoris* uwalnianie trójglicerydów z ciała tłuszczowego nie było stymulowane przez hemolimfę obecną w środowisku inkubacyjnym [118]. Można zatem przypuszczać, że uwalnianie lipidów z omawianej tkanki wymienionych owadów nie jest związane z obecnością w hemolimfie żadnego odpowiedzialnego za to czynnika. Również włączanie przynajmniej wolnych kwasów tłuszczowych w lipidy komórek jajowych nie wymaga uprzedniego związania ich z jakimkolwiek białkiem lub lipoproteidem [59, 76, 150, 151]. Mimo, że fakt ten stwierdzono w warunkach in vitro, nie ma żadnych podstaw by przypuszczać, że in vitro proces ten mógł zachodzić inaczej.

Inne procesy obserwowane u owadów wydają się również zapewniać



możliwość wykorzystania nagromadzonych w ciele tłuszczowym substancji. Adipocyty — bogate w lipidy komórki hemolimfy pochodzą z ciała tłuszczowego. Wskazują na to badania przeprowadzone przez Martin [118] na *Pyrrhocoris* i prowadzone przez nas na *Galleria* [54, 56]. W tym ostatnim przypadku obserwacje ciała tłuszczowego, prowadzono za pomocą mikroskopu elektronowego odbiciowego, wykazują obecność na powierzchni tkanki kulistych tworów (rys. 9 i 10). Jak można sądzić na podstawie porównania ich obrazów z obrazami analogicznych tworów, uzyskanych w mikroskopie elektronowym transmisyjnym, są to bogate w lipidy komórki. Martin [118] uważa, że adipocyty ulegają zniszczeniu w hemolimfie, dzięki czemu uwalniane są do niej nagromadzone w tych komórkach lipidy, które następnie mogą być zużyte przez inne tkanki. W różnych stadiach rozwojowych *Galleria mellonella* ilość adipocytów oddzielających się od powierzchni ciała tłuszczowego wydaje się ulegać zmianie. Być może znaczne zwiększenie ich ilości, obserwowane szóstego dnia po przepoczwarczeniu, pozostaje w związku ze zwiększonym w tym okresie zapotrzebowaniem na lipidy, związanym z rozpoczynającym się w tym czasie procesami witellogenezy w komórkach jajowych (rys. 7 porównaj z rys. 10).

Wiadomo ponadto, iż podczas rozwoju owadów część komórek ciała tłuszczowego ulega lizie (por. [82]). Zatem, również w wyniku cytolizy komórek ciała tłuszczowego, materiały nagromadzone w tej tkance mogą przedostać się do hemolimfy. Wydaje się, że i ten proces związany jest z zaspokojeniem zapotrzebowania na materiały zmagazynowane w ciele tłuszczowym w okresie witellogenezy. Stwierdzono bowiem, że w okresie dojrzewania jaj, cytoliza ciała tłuszczowego *Galleria mellonella* zachodzi intensywnie, podczas gdy po owariotomii jej intensywność jest znacznie obniżona [52, 55]. Lipidy, głównie trójglicerydy, które są podstawowym składnikiem lipidowym ciała tłuszczowego, uwolnione do hemolimfy zarówno w wyniku cytolizy komórek tej tkanki, jak i zniszczenia adipocytów, mogą być przed zużyciem w innych tkankach rozłożone przez obecne w hemolimfie lipazy [49, 61, 128]. Można przypuszczać, że u niektórych gatunków owadów lipidy mogą wydostawać się z ciała tłuszczowego do hemolimfy w wyniku jednego z powyżej omówionych procesów. Wydaje się również, że u owadów należących do innych gatunków, procesy te zachodzić mogą równolegle.

W ścisłym związku z zagadnieniem uwalniania materiałów z ciała tłuszczowego pozostaje funkcja jaką spełnia warstwa okrywająca ten narząd. Podobnie jak warstwa zewnętrzna ściany owarioli jest ona błoną podstawną omawianej tkanki. Poza rolę mechaniczną, prawdopodobnie uczestniczy ona w jakiś sposób w wymianie substancji między ciałem tłuszczowym a hemolimfą, jako że niezależnie od kierunku wymiany,



substancje te muszą się przez nią przedostać. Czy obserwowany w przypadku *Galleria mellonella* kontakt między płatami ciała tłuszczowego a odcinkami owarioli, zawierającymi pęcherzyki jajowe znajdujące się we wczesnym stadium witellogenezy (rys. 11), służy ułatwieniu wymiany substancji między tymi narządami? Ścisłe powiązanie morfologiczne warstw pokrywających te narządy (rys. 12) czyni takie przypuszczenie bardzo prawdopodobnym [153]. Można również sądzić, że dla obu narządów warstwa ta spełnia funkcje ochronne przed niekorzystnym działaniem metabolitów znajdujących się w hemolimfie.

Dane dotyczące struktury i chemizmu warstwy otaczającej ciało tłuszczowe ograniczają się jedynie do wyników aktualnie prowadzonych przez nas badań. Wstępne wyniki sugerują, że warstwa ta różni się od warstwy pokrywającej ścianę owarioli. Ma ona raczej charakter globularny, podczas gdy warstwa pokrywająca owariole jest wyraźnie włóknista. Warstwa otaczająca ciało tłuszczowe wiąże czerwień rutenową. Działanie neuraminidazy tylko w niewielkim stopniu obniża zdolność przyłączania barwnika. Można zatem przypuszczać, że ujemny ładunek błony podstawnej ciała tłuszczowego nie zależy od obecności w niej cząsteczek kwasu sialowego, jak ma to miejsce w przypadku warstwy pokrywającej ścianę owarioli. Można również przypuszczać, że w przeprowadzonych eksperymentach użyto zbyt niskiego stężenia enzymu, który w przypadku dużej zawartości nie usuwał go z niej całkowicie. Omawiana warstwa wiąże również silnie konkanawalinę A. I w tym przypadku, przeciwnie jak to stwierdzono dla warstwy otaczającej owaria, zdolność ta nie wydaje się być związana z obecnością w niej reszt mannopiranozy [53]. Dane powyższe potwierdzają opinię, iż różnice funkcjonalne poszczególnych organów odbijają się również w strukturze i jak się wydaje, chemizmie warstw pokrywających te organy. Zgodnie z Monis i współpracownikami [125] globularny charakter posiada warstwa podstawna pokrywająca organy aktywnie wydzielające, a do takich zaliczyć można również i ciało tłuszczowe, przynajmniej w niektórych okresach rozwoju owadów.

#### AKTYWNOŚĆ LIPOLITYCZNA CIAŁA TŁUSZCZOWEGO

Głównymi lipidami ciała tłuszczowego owadów są trójglicerydy (por. [70, 80]) i tak np. stanowią one około 90% lipidów tej tkanki *Hyalophora cecropia* [35], a u *Oncopeltus fasciatus* około 85% [172]. Również ten rodzaj lipidów jest głównym składnikiem lipidowym ciała tłuszczowego *Galleria mellonella* [60]. Lipidy uwalniane są z ciała tłuszczowego w większości badanych gatunków owadów w postaci dwugli-



cerydów i wolnych kwasów tłuszczowych. Wobec oczywistego udziału lipaz w uruchamianiu rezerw lipidowych zastanawiająca jest stosunkowo nieliczna ilość prac dotyczących tego zagadnienia. George i Eapen [74, 75] wykazali, zarówno metodami cytochemicznymi, jak i biochemicznymi, stosunkowo wysoką aktywność lipaz w ciele tłuszczowym *Schistocerca gregaria*. Podobnie wysoka aktywność lipaz została stwierdzona w ciele tłuszczowym *Leptinotarsa decemlineata* [162] i *Galleria mellonella* zarówno w okresie życia larwalnego [188, 180], jak i po przepoczwarczeniu się [61]. Larwalne ciało tłuszczowe *Hyalophora cecropia* natomiast nie wykazuje aktywności lipolitycznej, a aktywność lipolityczna tkanki dorosłych owadów tego gatunku jest bardzo niska [78]. Zdaniem Włodawer i Barańskiej [189] aktywność lipolityczna ciała tłuszczowego gąsienic *Galleria mellonella* wywołana jest obecnością w tej tkance dwóch lipaz, lipazy właściwej, której aktywność hamowana jest przez fluorki, oraz odpornej na ich działanie lipazy lipoproteidowej. Ponieważ jednak, jak do tej pory, cytowana powyżej praca jest jedyną wskazującą na obecność lipazy lipoproteidowej u owadów, nie ma pewności, czy jej występowanie w ciele tłuszczowym jest powszechne dla całej tej grupy zwierząt, czy też jest charakterystyczne tylko dla *Galleria mellonella*. Lipaza właściwa ciała tłuszczowego owadów wykazuje maksymalną aktywność w zakresie pH 7–8, jest ona aktywowana jonami wapnia [49, 78, 127, 162].

Wigglesworth [183] stwierdził aktywność lipaz w ciele tłuszczowym *Rhodnius prolixus* w obrębie małych dyskowatych tworów na powierzchni kul lipidowych. Być może zlokalizowane w obrębie tych tworów enzymy odpowiedzialne są za rozpad kul lipidowych. Bhathan i Gilbert [21] badając ultrastrukturę ciała tłuszczowego *Hyalophora* w okresie wzmożonej aktywności lipolitycznej obserwowali zmianę morfologii kul lipidowych. Zatracały one swoje regularne kształty, ich granice ulegały rozmyciu, wreszcie następował całkowity ich zanik. Zmiany te autorzy wiąźali z działaniem lipaz. Podobne zmiany obserwowano również w komórkach pochodzących z fragmentów ciała tłuszczowego inkubowanego *in vitro* w środowisku zawierającym lipazę trzustkową [20].

#### KONTROLA HORMONALNA METABOLIZMU LIPIDOWEGO CIAŁA TŁUSZCZOWEGO

Istnieją dane wskazujące na udział układu neuroendokrynalnego owadów w regulacji metabolizmu lipidowego ciała tłuszczowego. Stephen i Gilbert [161] stwierdzili, iż intensywność lipogenezy w ciele tłuszczowym zmienia się podczas rozwoju *Hyalophora cecropia*. Najintensywniej przebiega ona w okresie, kiedy poziom hormonu juwenilnego w hemo-

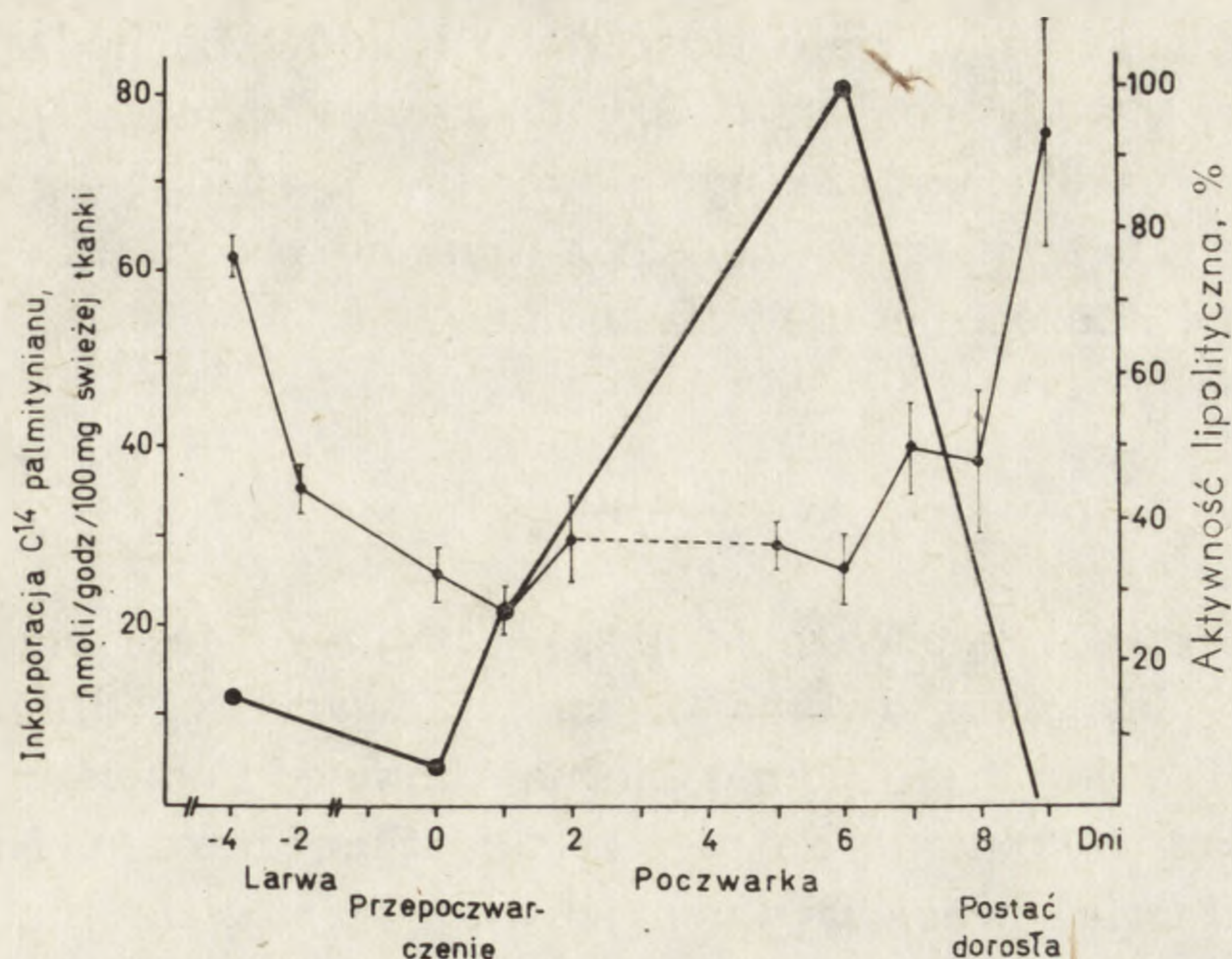


limfie jest niski. Wynikająca z tej obserwacji sugestia, że hormon produkowany przez corpora allata hamuje syntezę lipidów, znajduje potwierdzenie eksperymentalne. Ilość znakowanego palmitynianu, inkorporowanego w lipidy ciała tłuszczowego *in vitro*, znacznie obniża się jeżeli w środowisku inkubacyjnym znajdują się aktywne corpora allata [76]. W doświadczeniach *in vivo* wykazano, że usunięcie corpora allata powoduje wzrost ilości piętnowanego kwasu octowego, który inkorporował się w lipidy ciała tłuszczowego [93, 180]. W tym ostatnim przypadku wzrost lipogenezy został spowodowany przez usunięcie gruczołu produkującego hormon, który proces ten hamuje. Okres dojrzewania jaj niektórych *Lepidoptera* poprzedza wzrost poziomu hormonu juvenilnego w hemolimfie owada [79]. Można przypuszczać, że w tym okresie następuje przestawienie metabolizmu lipidowego tkanki. Wzrost aktywności lipolitycznej ciała tłuszczowego *Galleria mellonella* w okresie inicjowania procesu witellogenezy w komórkach jajowych poprzedza spadek intensywności zachodzącej w nim biosyntezy glicerydów. Odwrotnie, w okresie poprzedzającym wyklucie z poczwarki samicy dorosłej, kiedy większość komórek jajowych jest dojrzała, spadkowi aktywności lipolitycznej ciała tłuszczowego towarzyszy wzrost intensywności biosyntezy lipidów (rys. 13) [61]. Tak więc po okresie syntezy następuje okres uwalniania do hemolimfy materiałów magazynowanych w tkance tłuszczowej. Dzięki temu procesowi mogą one zostać wykorzystane przez rozwijające się komórki jajowe zarówno do syntezy żółtka lipidowego, jak i prawdopodobnie jako materiał budulcowy i energetyczny.

Allatektomia powoduje gromadzenie lipidów w ciele tłuszczowym niektórych owadów. Zabieg ten uniemożliwia również dojrzewanie jaj w większości owadów. Można zatem przypuszczać, że jest to, przynajmniej u niektórych gatunków, spowodowane niemożliwością zużytkowania przez komórki jajowe rezerw lipidowych ciała tłuszczowego [26, 130, 142, 179]. Zgodnie z opinią Adiyodi i Nayar [5] nagromadzenie lipidów w ciele tłuszczowym jest konsekwencją usunięcia gruczołu stymulującego aktywność lipaz w tej tkance. Tak więc można przyjąć, iż u niektórych gatunków owadów niski poziom hormonu juvenilnego w hemolimfie warunkuje procesy syntezy lipidów w ciele tłuszczowym, wysoki zaś warunkuje procesy umożliwiające ich zużycie.

Wydzielina drugiego gruczołu hormonalnego owadów — corpora cardiaca — zaangażowana jest również w regulację procesu uruchamiania materiałów lipidowych z ciała tłuszczowego. Mayer i Candy [119] po wstrzyknięciu wodnego wyciągu z corpora cardiaca dorosłym *Schistocerca gregaria* obserwowali wzrost zawartości lipidów głównie dwuglicerydów w hemolimfie, przy jednoczesnym obniżeniu zawartości lipidów w ciele tłuszczowym. Ekstrakt ten *in vitro* powoduje również uwal-





Rys. 13. Zmiany intensywności syntezy lipidów (inkorporacja C<sup>14</sup> palmitynianu — cienka linia) i ich rozkładu (aktywność lipolityczna — gruba linia) w ciele tłuszczowym samic *Galleria mellonella*.

nianie lipidów z ciała tłuszczowego do środowiska. Autorzy postulują występowanie w corpora cardiaca czynnika hormonalnego, określonego przez nich mianem hormonu adipokinetycznego, warunkującego obserwowane przez nich zmiany. Podobne działanie hormonu corpora cardiaca zarówno *in vivo*, jak i *in vitro* wykazano również w przypadku *Locusta migratoria* i *Tenebrio molitor* [81]. Można przypuszczać, że działanie tego hormonu powoduje aktywację lipaz ciała tłuszczowego co warunkuje uwalnianie z niej rezerw lipidowych.

Przytoczone powyżej badania wiązały udział wydzieliny corpora cardiaca w regulacji metabolizmu lipidowego ciała tłuszczowego z okresami wzrostu zapotrzebowania na materiały energetyczne, podczas wzmożonej aktywności ruchowej owadów np. lotu. Nie ma żadnych danych, które wskazywałyby, że w zupełnie odmiennym procesie wzmożonego zapotrzebowania na materiały lipidowe jakim jest okres dojrzewania jaj, proces uruchamiania ich rezerw jest pod podobną kontrolą corpora cardiaca. Takiej jednak możliwości wykluczyć nie można, ponieważ u wymienionych powyżej trzech gatunków owadów [88, 89, 124], jak i szeregu innych, produkt corpora cardiaca zaangażowany jest w procesy kontroli dojrzewania jaj (por. [65]). Nie można natomiast wiązać hypolipemicznego działania hormonu corpora cardiaca, stwierdzonego u *Periplaneta*, z regulacją zużytkowania lipidów ciała tłuszczowego przez dojrzewające komórki jajowe. Wstrzyknięcie wodnego wyciągu z tych gruczołów powoduje obniżenie zawartości lipidów w hemolimfie tego owada przy jednoczesnym wzroście ich ilości w ciele tłuszczowym [47, 49]. Można natomiast przypuszczać, że hormon ten ma istotne znaczenie



w kontroli włączania w ciało tłuszczowe lipidów pochodzących ze strawionego przez owady pokarmu. Czy działanie hormonu produkowanego przez corpora cardiaca może być odmienne u różnych gatunków owadów, czy też gruczoły te u różnych gatunków produkują różne w działaniu hormony, pozostaje niewyjaśnione.

#### ODDZIAŁYWANIE OWARIÓW NA PROCESY ZACHODZĄCE W CIELE TŁUSZCZOWYM

Źródłem żółtka pochodzenia pozaowaryjnego jest ciało tłuszczowe. W relacji między tymi dwoma organami owaria, zgodnie z przytoczonymi danymi, wydają się pełnić bierną funkcję. Pobierają one z hemolimfy materiały uwolnione do niej z ciała tłuszczowego. Nic więc dziwnego, że usunięcie owariów uniemożliwiające zużycie materiałów zmagazynowanych w ciele tłuszczowym, powoduje hipertrofię tej tkanki [21, 25, 46, 52, 55, 142, 146].

Istnieją jednak dane wskazujące, że owaria mogą pośrednio oddziaływać na ciało tłuszczowe poprzez działanie na corpora allata (lub na zawiadujące nimi komórki neurosekrecyjne mózgu), które kontrolują procesy zachodzące w tkance tłuszczowej. Adams i współpracownicy [1, 2] wykazali, że wstrzyknięcie samicom *Musca domestica* ekstraktu z owarii powoduje zahamowanie aktywności wydzielniczej corpora allata tych owadów. Ten zabieg, podobnie jak i usunięcie tych gruczołów, uniemożliwia dojrzewanie jaj i powoduje hipertrofię ciała tłuszczowego [3]. Cytowani autorzy uważają, że owaria wytwarzają substancję hamującą produkcję hormonu juwenilnego przez corpora allata. Brak zaś tego hormonu uniemożliwia prawidłowy rozwój jaj przez, jak można przypuszczać, zakłócenie procesów zachodzących w ciele tłuszczowym.

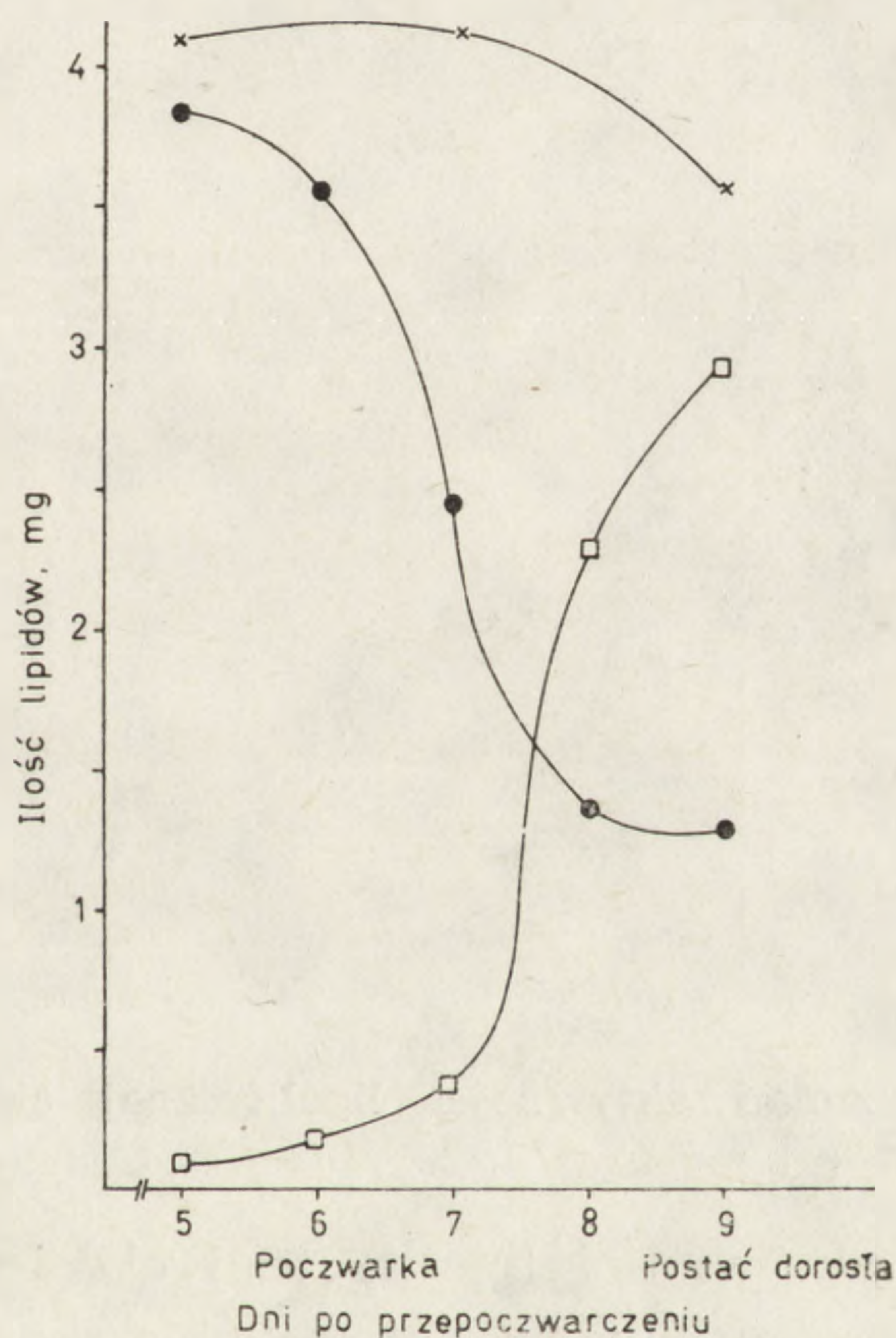
Wydaje się również, że owaria, przynajmniej u niektórych gatunków owadów, mogą bezpośrednio oddziaływać na ciało tłuszczowe. Poniżej omówimy wyniki prowadzonych przez nas badań, wskazujących na taki typ relacji między tymi dwoma organami.

Mól woskowy *Galleria mellonella* należy do grupy owadów z rzędu *Lepidoptera*, których postacie dorosłe nie odżywiają się. W przeciwieństwie do większości owadów, jak już wspominaliśmy, u tego gatunku dojrzewanie jaj nie jest kontrolowane przez corpora allata [63]. Również inne ośrodki centralnego układu neuroendokrynalnego nie wydają się być zaangażowane w kontrolę omawianego procesu *Galleria mellonella* [152].

Cykl życiowy mola woskowego trwa w warunkach hodowli laboratoryjnej 32–35 dni. Obejmuje on siedem stadiów larwalnych, 8-dniowy okres między przepoczwarczeniem a wykluciem postaci dorosłej oraz



liczący od 3 do 5 dni okres życia imaginalnego. Motyle zaraz po wykluciu są zdolne do składania jaj. Proces dojrzewania komórek jajowych rozpoczyna się między 5 a 6 dniem po przepoczwarczeniu i po kolejnych 3 dniach w każdej z ośmiu owariol znajduje się około czterdziestu w pełni dojrzałych jaj. W tym okresie ilość nagromadzonych w komórkach lipidów wzrasta prawie 15-krotnie tak, że substancje te dominują w odkładanym żółtku i stanowią około 30% suchej masy postwitellogenetycznych pęcherzyków jajowych [60] podczas gdy białko — tylko około 10% [54]. Gromadzeniu lipidów w owariolach towarzyszy spadek ich ilości w ciele tłuszczowym, przy czym ilość nagromadzonych lipidów w owariolach prawie dokładnie odpowiada ilości, o którą obniżyła się zawartość tych substancji w ciele tłuszczowym (rys. 14) [60]. W ana-



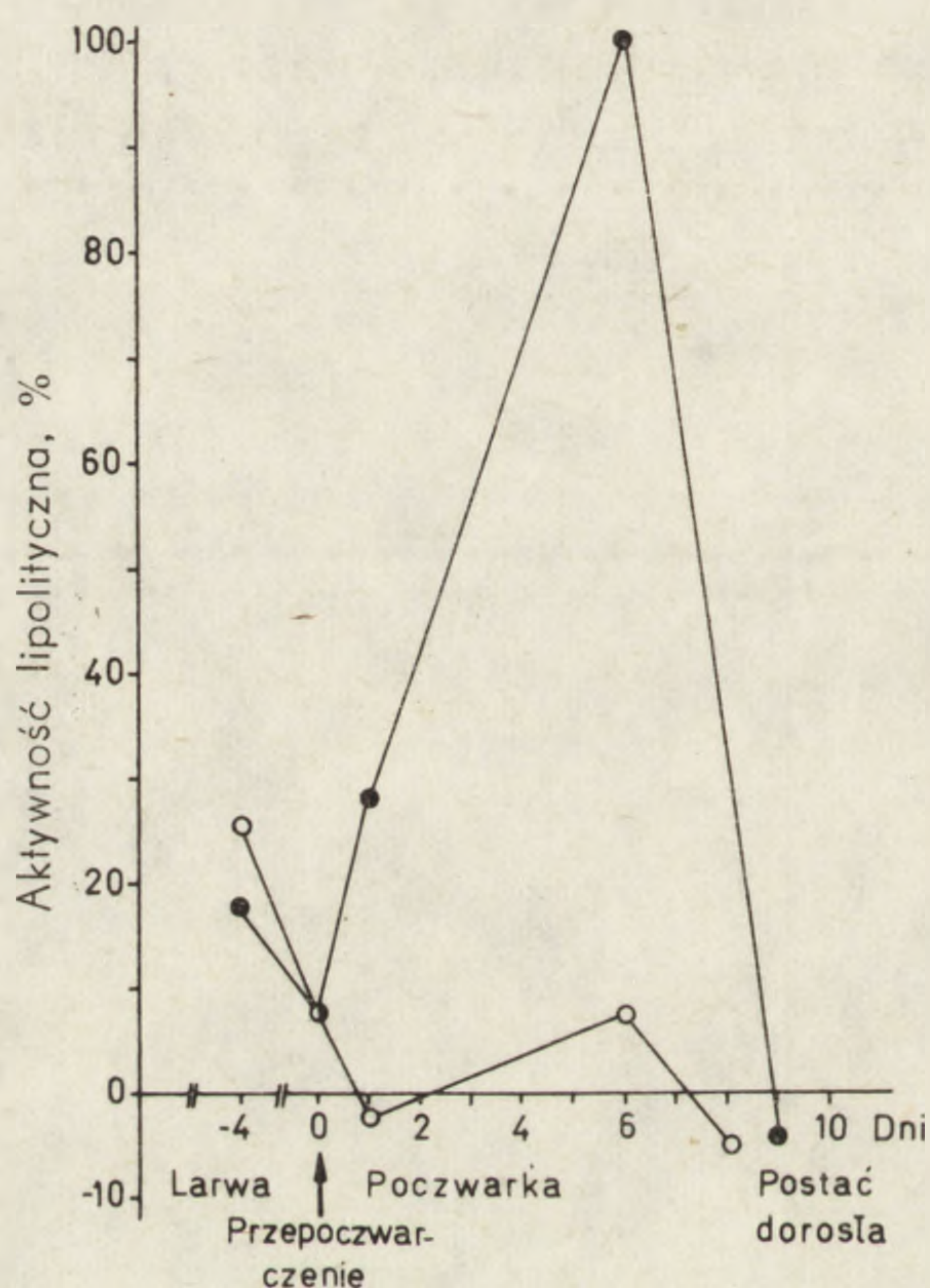
Rys. 14. Zmiany ilości lipidów ciała tłuszczowego normalnie rozwijających się samic *Galleria mellonella* —●—●—, ciała tłuszczowego owariotektomizowanych owadów —x—x— i owarii —□—□—

logicznym okresie rozwoju samców spadek ilości lipidów ciała tłuszczowego jest niewielki [55], zaś po owariotektomii ilość lipidów w ciele tłuszczowym samic praktycznie nie ulega zmianie (rys. 14). Można wobec tego przypuszczać, że z ciała tłuszczowego *Galleria mellonella*, podobnie jak u innych owadów, uwalniane są lipidy, które wbudowywane są w żółtko komórek jajowych podczas witellogenezy.

Trójglicerydy stanowią znakomitą większość lipidów obojętnych



omawianej tkanki (60), natomiast dwuglicerydy są głównymi lipidami hemolimfy [191]. Sugeruje to, że przed uwolnieniem lipidów z ciała tłuszczowego trójglicerydy ulegają hydrolizie w tej tkance. Przypuszczenie to zostało poparte eksperymentalnie. Aktywność lipolityczna ciała tłuszczowego samic po przepoczwarczeniu ulega wyraźnym zmianom. Najwyższą aktywność obserwuje się 6 dnia po przepoczwarczeniu tj. w okresie inicjowania procesów witellogenezy w komórkach jajowych. Przeciwnie, aktywność lipolityczna ciała tłuszczowego samców w analogicznym okresie rozwoju owada nie ulega zmianie (rys. 15) [51]. Obser-

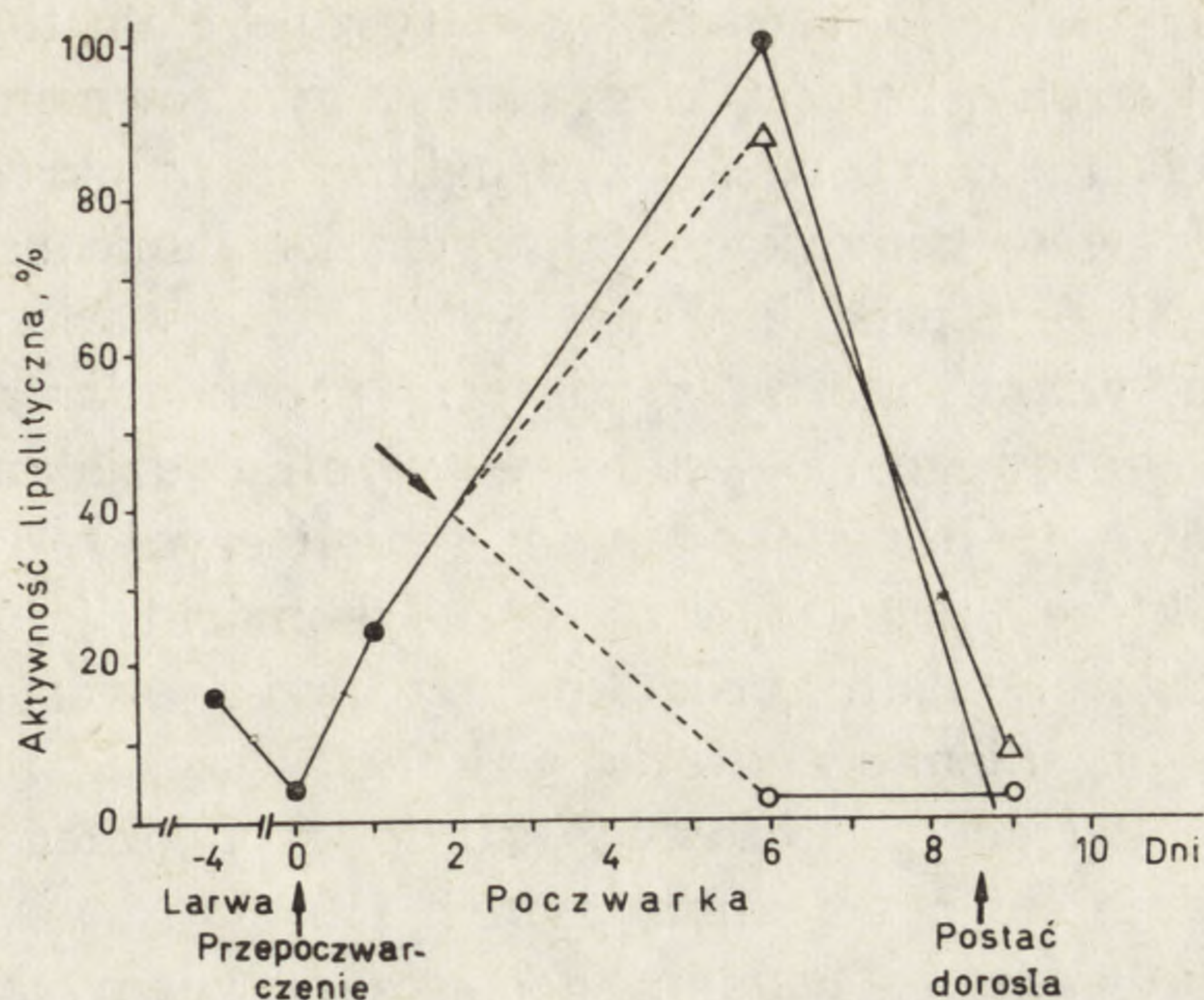


Rys. 15. Porównanie zmian aktywności lipolitycznej ciała tłuszczowego samic —●—●— i samców —○—○— *Galleria mellonella*

wowane różnice w aktywności lipolitycznej ciała tłuszczowego sugerowały oddziaływanie owariów na intensywność zachodzących w ciele tłuszczowym samic procesów lipolizy. Istotnie, po usunięciu owariów aktywność lipolityczna ciała tłuszczowego operowanych samic jest bardzo niska (rys. 16) [61].

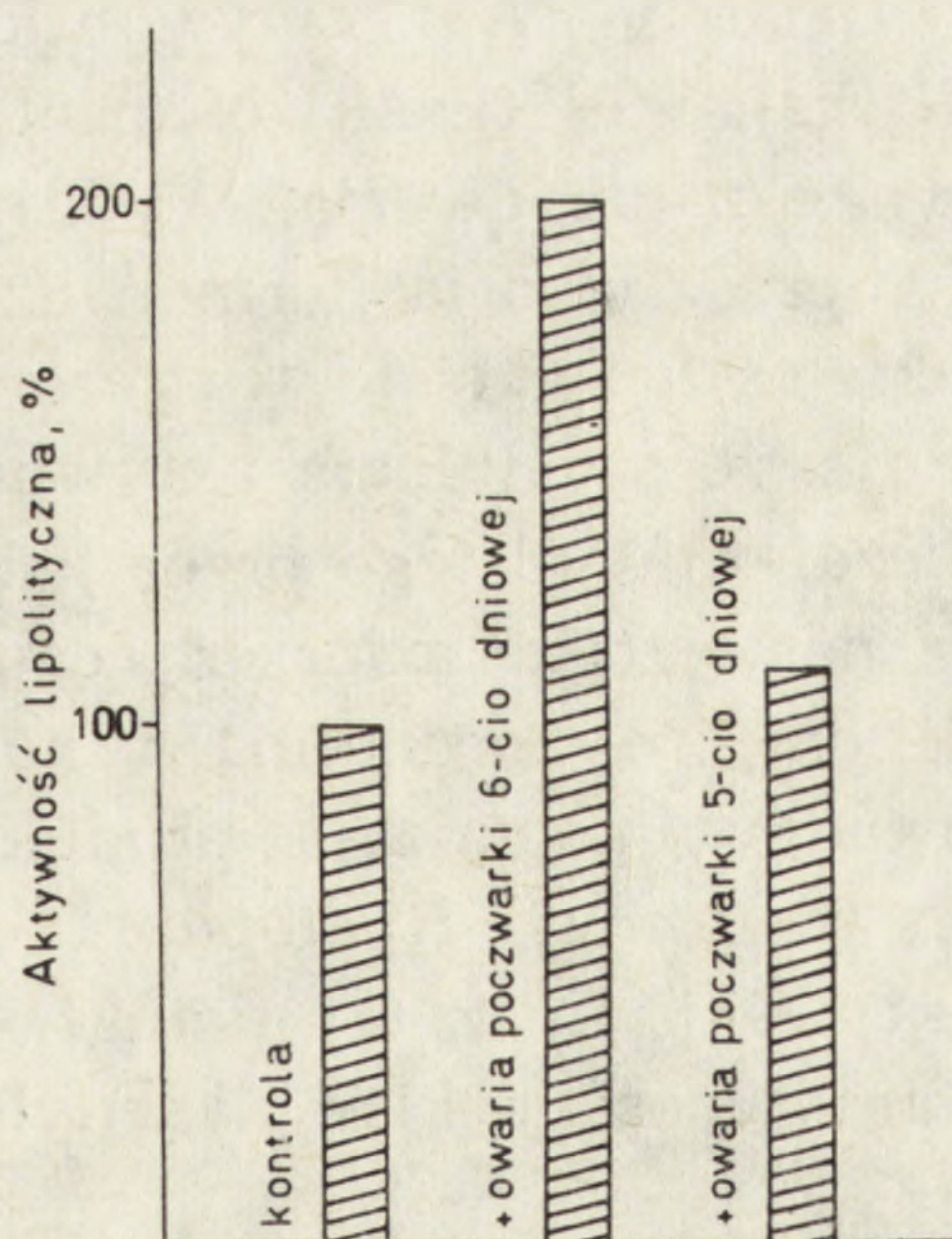
Pfeiffer [142] i Doane [46] sugerowali, że owaria produkują hormon zaangażowany w kontrolę metabolizmu lipidowego ciała tłuszczowego owadów. Podobnie i my interpretując cytowane powyżej wyniki postulowaliśmy istnienie czynnika natury hormonalnej, produkowanego przez owaria, który kontroluje aktywność lipolityczną tkanki tłuszczowej *Galleria*. In vitro, obecność owariów w środowisku inkubacyjnym powoduje znaczny wzrost aktywności lipolitycznej ciała tłuszczowego owariotekto-





Rys. 16. Zmiany aktywności lipolitycznej ciała tłuszczowego samic *Galleria mellonella* rozwijających się normalnie —●—●— i po owariotektomii —○—○—. Moment wykonania zabiegu zaznaczony strzałką.

mizowanych owadów (rys. 17) [57]. Tak więc, mimo że nie ma bezpośrednich danych wskazujących na obecność hormonu produkowanego przez owaria, założenie jego istnienia wydaje się w pełni uzasadnione. Co więcej, wydaje się, że owaria produkują postulowany hormon tylko w pewnym okresie swojego rozwoju. Wykazaliśmy bowiem, że o ile owaria pochodzące z owadów z 6 dnia po przepoczwarczeniu stymulują *in vitro* aktywność lipolityczną ciała tłuszczowego owariotektomizowanych samic, to owaria pochodzące z osobników młodszych tej właściwości nie posiadają (rys. 17) [57].



Rys. 17. Działanie *in vitro* owarii na aktywność lipolityczną ciała tłuszczowego owariotektomizowanych samic



Okres maksymalnej aktywności lipolitycznej ciała tłuszczowego zbiega się, z jednej strony, z początkiem okresu gwałtownego spadku zawartości lipidów ciała tłuszczowego, z drugiej zaś, z okresem rozpoczęcia odkładania lipidów w komórkach jajowych. Działanie zatem hipotetycznego hormonu, który produkowany jest przez owaria w tym okresie rozwoju owada, wiązać można z kontrolą uruchamiania rezerw lipidowych ciała tłuszczowego. Powstałe w wyniku działania lipaz wolne kwasy tłuszczowe (i prawdopodobnie dwuglicerydy) uwalniane są do hemolimfy, z której pobierane są przez komórki jajowe do syntezy żółtka lipidowego. Ponadto produkowany przez owaria hormon może kontrolować w organizmie *Galleria mellonella* szereg innych procesów. Cytoliza komórek ciała tłuszczowego samic, zachodząca podczas dojrzewania jaj, wydaje się być jednym z nich [52, 55].

Ostatnio prowadzone badania dostarczają pewnych danych wyjaśniających sposób w jaki postulowany hormon reguluje aktywność lipolityczną ciała tłuszczowego. Można przypuszczać, że wzmożona aktywność lipolityczna tkanki obserwowana sześć dni po przepoczwarczeniu samic związana jest ze stymulacją syntezy form molekularnych lipaz, które są nieobecne w ciele tłuszczowym we wcześniejszym okresie życia owada. Mogło to być również spowodowane przez stymulację syntezy lub aktywację różnych form lipaz stale obecnych w tkance. Ponieważ w ciele tłuszczowym samic, niezależnie od stadium rozwojowego owada, znajdują się trzy formy molekularne lipaz [58] drugie przypuszczenie jest bardziej prawdopodobne.

Cykliczny AMP dodany do środowiska inkubacyjnego powoduje *in vitro* wzrost aktywności lipolitycznej ciała tłuszczowego owariotektomizowanych samic [54]. Działanie AMP wywołuje więc podobny efekt jaki na aktywność lipolityczną tej tkanki owariotektomizowanych owadów wywierają inkubowane z nią owaria. Wydaje się wysoce prawdopodobne, że produkowany przez owaria hormon działa poprzez regulację poziomu cyklicznego nukleotydu w ciele tłuszczowym. Podobnie Bhakthan i Gilbert [18] uważają, że stymulacja aktywności lipolitycznej ciała tłuszczowego owadów, niezależnie od tego przez jaki czynnik hormonalny jest powodowana, może następować poprzez regulację poziomu cAMP w tej tkance. Wykazali oni, że adrenalina i noradrenalina, hormony występujące także u owadów, pobudzają produkcję wolnych kwasów tłuszczowych przez ciało tłuszczowe *Hyalophora cecropia* i *Periplaneta americana* w wyniku aktywacji lipaz tej tkanki. Wiadomo zaś jest, że hormony te stymulują aktywność cyklicznej adenylowej w tkance tłuszczowej kręgowców.

Omówione powyżej badania, prowadzone na *Galleria mellonella*, wskazują, iż w relacji między ciałem tłuszczowym a owariami, te ostatnie



mogą aktywnie uczestniczyć, dzięki wytwarzaniu hormonu bezpośrednio kontrolującego aktywność niektórych procesów zachodzących w ciele tłuszczowym.

#### PODSUMOWANIE

1. Białka i lipidy (prawdopodobnie również i polisacharydy) będące składnikami żółtka jaj owadów mogą być syntetyzowane poza owariami.
2. Ilość materiałów zsyntetyzowanych poza owariami i gromadzonych w formie żółtka w komórkach jajowych jest różna dla poszczególnych gatunków owadów i może być uważana za cechę charakterystyczną dla danego gatunku owadów.
3. Podstawowym składnikiem białkowym żółtka większości gatunków owadów jest charakterystyczne dla samic białko (sex protein).
4. Ciało tłuszczowe owadów jest miejscem syntezy bądź gromadzenia pozaowaryjnych składników żółtka.
5. Substancje zsyntetyzowane bądź zgromadzone są uwalniane z ciała tłuszczowego do hemolimfy, z której pobierane są przez komórki jajowe podczas witellogenezy.
6. Szereg procesów związanych z syntezą, gromadzeniem lub uwalnianiem pozaowaryjnych składników żółtka z ciała tłuszczowego, jak również ich pobieranie przez komórki jajowe, jest kontrolowane przez układ neuroendokryalny, przy czym u większości gatunków owadów w kontrolę tą zaangażowany jest hormon juvenilny produkowany przez corpora allata. Zakłócenie bądź uniemożliwienie działania tego gruczołu powoduje zahamowanie dojrzewania komórek jajowych, poprzez zakłócenie procesów zachodzących w ciele tłuszczowym.
7. Owaria mogą bezpośrednio bądź pośrednio oddziaływać na intensywność procesów zachodzących w tkance tłuszczowej, prawdopodobnie przez wytwarzanie hormonu, który oddziaływać może na poszczególne ośrodki centralnego układu neuroendokrynego bądź bezpośrednio na ciało tłuszczowe.

#### LITERATURA

- [1] ADAMS, T. S., Ovarian regulation of the corpus allatum in the housefly *Musca domestica*, *J. Insect Physiol.*, **16**: 349–360, 1970.
- [2] ADAMS T. S., HINTZ, A. M. and POMONIS, J. G., Oostatic hormone produc-



- tion in houseflies *Musca domestica* with developing ovaries, *J. Insect Physiol.*, **14**: 983-993, 1968.
- [3] ADAMS, T. S. and NELSON, D. R., The effect of the corpus allatum and the ovaries on the amount of pupal and adult fat body in the housefly *Musca domestica*, *J. Insect Physiol.*, **15**: 1729-1749, 1969.
- [4] ADIYODI, K. G., The nature of haemolymph protein in relation to the ovarian cycle in the viviparous roach *Nauphoeta anerea*, *J. Insect Physiol.*, **13**: 1189-1196, 1967.
- [5] ADIYODI, K. G. and NAYAR, K. K., Haemolymph proteins and reproduction in *Periplaneta americana*. The nature of conjugated proteins and the effect of cardiac — allatectomy on protein metabolism, *Biol. Bull.*, **133**: 271-286, 1967.
- [6] AGGARWAL, S. K., Pinocytosis during vitellogenesis in the mealworm *Tenebrio molitor* L. (*Loleoptera*, *Tenebrionidae*), *Acta Ent. Bohemoslov.*, **65**: 272-275, 1968.
- [7] ANDERSON, E., Oocyte differentiation and vitellogenesis in the roach *Periplaneta americana*, *J. Cell. Biol.*, **20**: 131-155, 1964.
- [8] — Oogenesis in the cocroach *Periplaneta americana*, with special reference to the specialization of the oolemma and the fate of coated vesicles, *J. Microsc.*, **8**: 721-738, 1969.
- [9] ANDERSON, L. M., Protein synthesis and uptake by isolated cecropia oocytes, *J. Cell. Sci.*, **8**: 735-750, 1971.
- [10] ANDERSON, L. M. and TELFER, W. H., Trypan blue inhibition of yolk deposition — a clue to follicle cell function in cercropia moth, *J. Embryol. Exp. Morphol.*, **23**: 35-52, 1970.
- [11] ANDERSON, W. A. and SPIELMAN, A., Permeability of the ovarian follicle of *Aedes aegypti*, *J. Cell. Biol.*, **50**: 201-221, 1971.
- [12] — Incorporation of RNA and protein precursors by ovarian follicles of *Aedes aegypti* mosquitoes, *J. Submicr. Cytol.*, **5**: 181-198, 1973.
- [13] BEENAKKERS, A. T. M. and GILBERT, L. J., The fatty acid composition of fat body and haemolymph lipids in *Hyalophora cecropia* and its relation to lipid release, *J. Insect Physiol.*, **14**: 481-494, 1968.
- [14] BELL, W. J., Dual role of juvenile hormone in the control of yolk formation in *Periplaneta americana*, *J. Insect Physiol.*, **15**: 1279-1290, 1969.
- [15] — Demonstration and characterization of two vitellogenic blood proteins in *Periplaneta americana*. An immunochemical analysis, *J. Insect Physiol.*, **16**: 291-299, 1970.
- [16] BELL, W. J. and BARTH, jr R. H., Initiation of yolk deposition by juvenile hormone, *Nature, New Biology*, **230**: 220-222, 1971.
- [17] BENTZ, F., GIRARDIE, A. et CAZAL, M., Etude electrophoretique des variations de la proteinemie chez *Locusta migratoria* pendant la maturation sexuelle, *J. Insect Physiol.*, **16**: 2257-2270, 1970.
- [18] BHAKTHAN, N. M. G. and GILBERT, L. J., Effects of some vertebrate hormones on lipid utilization in the insect fat body, *Gen. Comp. Endocr.*, **11**: 186-197, 1968.
- [19] — Studies on lipid transport in *Manduca sexta* (Insecta), *Comp. Biochem. Physiol.*, **33**: 705-706, 1970.
- [20] — Effects of epinephrine and lipase on the morphology of insect fat body, *Ann. Entomol. Soc. Am.*, **64**: 68-72, 1971.
- [21] — Studies on the cytophysiology of the fat body of the american silkworm, *Z. Zellforsch.* **124**: 433-444, 1972.



- [22] BIER, K., Oogenesetyten bei insecten und vertebraten, ihre bedeutung für embryogenese und phylogeneese, Zool. Anz. Suppl., **33**: 7–29, 1970.
- [23] BIER, K. und RAMAMUTRY, P. S., Electronoptische Untersuchungen zur Einlagerung der Dotterproteine in die Oocyte, Naturwissenschaften, **51**: 223–224, 1964.
- [24] BLUMENFELD, M. and SCHNEIDERMANN, H. A., Effect of juvenile hormone on the synthesis and accumulation of a sex-limited blood protein in the polyphemus silkmoth, Biol. Bull., **135**: 466–475, 1968.
- [25] BODENSTEIN, D., Investigation of the reproductive system of *Drosophila*, J. Exp. Zool., **1004**: 101–151, 1947.
- [26] — Studies on the humoral mechanisms in growth and metamorphosis of the cockroach, *Periplaneta americana* III. Humoral effects on metabolism, J. Exp. Zool., **124**: 105–115, 1953.
- [27] BODNARYK, R. P. and MORRISON, P. E., Immunochemical analysis of the origin of a sex-specific accumulated blood protein in female houseflies. J. Insect Physiol., **14**: 1141–1146, 1968.
- [28] BONHAG, P. F., Histochemical studies on the ovarial nurse tissues and oocytes of milkweed bug *Oncopeltus fasciatus* (Dallas) I. Cytology, nucleic acids and carbohydrates, J. Morphol., **96**: 381–440, 1955.
- [29] — Histological and histochemical studies on the ovary of the american cockroach *Periplaneta americana* (L.), Univ. Calif., Berkeley, Publ. Entomol., **16**: 81–124, 1959.
- [30] BROOKES, V. J., The induction of yolk protein synthesis in the fat body of an insect, *Leucophaea maderae*, by an analog of the juvenile hormone, Developm. Biol., **20**: 459–471, 1969.
- [31] BROOKES, V. J. and DEJMAL, R. R., Yolk protein structural changes during vitellogenesis in the cockroach *Leucophaea maderae*, Science, **160**: 999–1001, 1968.
- [32] BUTTERWORTH, F. W. and BODENSTEIN, D., Adipose tissue of *Drosophila melanogaster*. III. The effect of the ovary on cell growth and the storage of lipid and glycogen in the adult tissue, J. Exp. Zool., **167**: 207–218, 1968.
- [33] CHANG, F. and FRIEDMAN, S., A developmental analysis of the uptake and release of lipids by the fat — body of the tobacco hornworm, *Manduca sexta*, Insect Biochem., **1**: 63–80, 1971.
- [34] CHIA, W. K. and MORRISON, P. E., Autoradiographic and ultrastructural studies on the origin of yolk proteins in the housefly, *Musca domestica* L., Canadian J. Zool., **50**: 1509–1576, 1972.
- [35] CHINO, H. and GILBERT, L. J., Diglyceride release from insect fat body: a possible means of lipid transport, Science, **143**: 359–361, 1964.
- [36] — Lipid release and transport in insects, Biochim. Biophys. Acta, **98**: 94–110, 1965.
- [37] CHINO, H., MURAKAMI, S. and HARASHIMA, K., Diglyceride — carrying lipoproteins in insect hemolymph. Isolation, purification and properties, Biochim. Biophys. Acta, **176**: 1–26, 1969.
- [38] CHINO, H., SUDO, A. and HARASHIMA, K., Isolation of diglyceride bound lipoprotein from insect hemolymph, Biochim. Biophys. Acta, **144**: 177–179, 1967.
- [39] CHIPPENDALE, G. H., Metamorphic changes in haemolymph and midgut proteins of the southwestern corn borer, *Diatraea grandiosella*, J. Insect Physiol., **16**: 1909–1920, 1970.
- [40] CHIPPENDALE, G. M. and KILBY, B. A., Relationship between the proteins



- of the haemolymph and fat body during development of *Pieris brassicae*, *J. Insect Physiol.*, **15**: 905–926, 1969.
- [41] COLES, G. C., Some effects of decapitation on metabolism in *Rhodnius prolixus* Stål, *Nature*, **203**: 323, 1964.
- [42] — Haemolymph proteins and yolk formation in *Rhodnius prolixus* Stål, *J. Exp. Biol.*, **43**: 425–431, 1965.
- [43] COOK, B. J. and EDDINGTON, S. G., The release of triglycerides and free fatty acids from the fat-body of the cockroach, *Periplaneta americana*, *J. Insect Physiol.*, **13**: 1361–1372, 1967.
- [44] CRUICKSHANK, W. J., Ultrastructural modifications in the follicle cells and egg membranes during development of flour moth oocytes, *J. Insect Physiol.*, **18**: 485–498, 1972.
- [45] CUMMINGS, M. R. and KING, R. C., The cytology of the vitellogenic stages of oogenesis in *Drosophila melanogaster*. II. Ultrastructural investigations on the origin of protein yolk spheres, *J. Morphol.*, **130**: 467–478, 1970.
- [46] DOANE, W. W., Developmental physiology of the mutant female sterile (2) — adipose of *Drosophila melanogaster*. III. Corpus allatum complex and ovarian transplantations, *J. Exp. Zool.*, **146**: 275–298, 1961.
- [47] DOWNER, R. G. H. and STEELE, J. E., Interspecificity of lipid — regulating factors from insect corpus cardiacum, *Can. J. Zool.*, **50**: 63–65, 1972.
- [48] — Hormonal stimulation of lipid transport in the American cockroach, *Periplaneta americana*, *Gen. Comp. Endocrinol.*, **19**: 254–265, 1972.
- [49] DOWNER, R. G. H. and STEELE, J. E., Haemolymph lipase activity in the American cockroach, *Periplaneta americana*, *J. Insect Physiol.*, **19**: 523–532, 1973.
- [50] DUTKOWSKI, A. B., The development of female gonads in pupae of *Galleria mellonella* L. (*Lepidoptera*), *Zool. Poloniae*, **19**: 115–131, 1969.
- [51] — Sex differences in the lipolytic activity of *Galleria mellonella* fat body, *J. Insect Physiol.*, **19**: 1721–1726, 1973.
- [52] — Fat body of *Galleria mellonella* during metamorphosis. Cytochemical and ultrastructural studies, *Folia Histochem. Cytochem.*, **12**: 269–280, 1974.
- [53] — The basement membrane of the *Galleria mellonella* fat body, *Annals Med. Sect. Pol. Acad. Sci.*, w druku.
- [54] dane nieopublikowane.
- [55] DUTKOWSKI, A. B., CHACZATRIAN, L., ZIAJKA, B., MROZIŃSKA, K. and GADOWSKA, M. M., Biochemical studies of the fat body of *Galleria mellonella* (*Lepidoptera*) during metamorphosis, *Acta Ent. Bohemoslov.*, **71**: 222–232, 1974.
- [56] DUTKOWSKI, A. B. i REŃSKI, A., Obraz zewnętrznych powierzchni owariol i ciała tłuszczowego *Galleria mellonella* L., *Mikroskopia elektronowa skaningowa*, 65–69, 1974.
- [57] DUTKOWSKI, A. B. and SARZAŁA-DRABIKOWSKA, M. G., Some aspects of regulation of fat body lipolytic activity in *Galleria mellonella*, *J. Insect Physiol.*, **19**: 1341–1350, 1973.
- [58] DUTKOWSKI, A. B. and SKANGIEL-KRAMSKA, J., Heterogeneity of *Galleria mellonella* fat body lipase, *Insect Bioch.*, **5**: 1975 (w druku).
- [59] DUTKOWSKI, A. B., SKANGIEL-KRAMSKA, J. and PRZEŁĘCKA, A., Incorporation of  $l\text{-C}^{14}$ -sodium palmitate into lipids of the ovariole of *Galleria mellonella*, *Folia Histochem. Cytochem.*, **6**: 185–194, 1968.
- [60] DUTKOWSKI, A. B. and ZIAJKA, B., Sexual dimorphism in the content of lipid in fat body of *Galleria mellonella* L. (*Lepidoptera*) and utilization of



- these lipids by developing oocytes for vitellogenesis, *Zool. Poloniae*, **20**: 55–70, 1970.
- [61] — Synthesis and degradation of glycerides in fat body of normal and ovario-tectomized females of *Galleria mellonella*, *J. Insect Physiol.*, **18**: 1351–1367, 1972.
- [62] DWIVEDY, A. K. and BRIDGES, R. G., The effect of dietary changes on the phospholipid composition of the haemolymph lipoproteins of larvae of the housefly, *Musca domestica*, *J. Insect Physiol.*, **19**: 559–576, 1973.
- [63] EL-IBRASHY, M. F. and BACTOR, J., Effect of allatectomy upon lipid metabolism of the female moth *Spodoptera littoralis* Bois-duval, *Z. Vergl. Physiol.*, **68**: 111–116, 1970.
- [64] ENGELMANN, F., Female specific protein biosynthesis controlled by corpus allatum in *Leucophaea maderae*, *Science*, **165**: 407–409, 1969.
- [65] — Hormonal control of egg maturation. The physiology of insect reproduction, rozdz. 8. Kerkut G. A. (wyd.) Pergamon Press, 1970.
- [66] — Endocrine control of insect reproduction, a possible basis for insect control, *Acta Phytopath. Acad. Sci. Hungar.*, **6**: 211–217, 1971.
- [67] ENGELMANN, F., HILL, L. and WILKENS, J. L., Juvenile hormone control of female specific protein synthesis in *Leucophaea maderae*, *Schistocerca vaga* and *Sarcophaga bullata*, *J. Insect Physiol.*, **17**: 2179–2191, 1971.
- [68] ENGELMANN, F. and PENNEY, D., Studies on the endocrine control of metabolism in *Leucophaea maderae* (*Blattaria*). I. The hemolymph proteins during egg maturation, *Gen comp. Endocrinol.*, **7**: 314–325, 1966.
- [69] FALLON, A. M., HAGEDORN, H. H., WYATT, G. R. and LAUFER, H., Activation of vitellogenin synthesis in the mosquito *Aedes aegypti* by ecdysone, *J. Insect Physiol.*, **20**: 1815–1823, 1974.
- [70] FAST, P. G., Insect lipids: a review, *Mem. Ent. Soc. Canad.*, **37**: 1–50, 1964.
- [71] FAVARD-SÈREÑO, C., Capture de polysaccharides par micropinocytose dans l'ovocyte du grillon en vitellogenese, *J. Microsc.*, **8**: 401–414, 1969.
- [72] — Terminal differentiation of the adipose tissue in relation to vitellogenesis in the cricket, *Molecular Biol. Reports.*, **1**: 179–186, 1973.
- [73] GELTI-DOUKA, H., GINGERAS, T. R. and KAMBYSELLIS, M. P., Yolk proteins in *Drosophila*: Identification and site of synthesis, *J. Exp. Zool.*, **187**: 167–172, 1974.
- [74] GEORGE, J. C. and EAPEN, J., Histochemical demonstration of lipase and alkaline phosphatase activity in the fat body of the desert locust, *Nature*, **183**: 268–270, 1959.
- [75] — Lipase activity in the fat body of the desert locust, *Schistocerca gregaria*, *J. Cell. Comp. Physiol.*, **54**: 293–315, 1959.
- [76] GILBERT, L. J., Changes in lipid content during the reproductive cycle of *Leucophaea maderae* and effects of the juvenile hormone on lipid metabolism in vitro, *Comp. Biochem. Physiol.*, **21**: 237–257, 1967.
- [77] GILBERT L. J. and CHINO, H., Transport of lipids in insects, *J. Lipid Res.*, **15**: 439–453, 1974.
- [78] GILBERT, L. J., CHINO, H. and DOMROESE, K. A., Lipolytic activity of insect tissues and its significance in lipid transport, *J. Insect Physiol.*, **11**: 1057–1070, 1965.
- [79] GILBERT, L. J. and SCHNEIDERMAN, H. A., The content of juvenile hormone and lipid in *Lepidoptera*: Sexual differences and developmental changes, *Gen. Comp. Endocrin.*, **1**: 453–472, 1961.



- [80] GILBY, A. R., Lipids and their metabolism in insects, *Ann. Rev. Ent.*, **10**: 141-160, 1965.
- [81] GOLDSWORTHY, G. J., MORDUE, W. and GUTHKELICH, J., Studies on insect adipokinetic hormone, *Gen. Comp. Endocr.*, **18**: 545-551, 1972.
- [82] HAGEDORN, H. H., The control of vitellogenin synthesis in mosquito, *Amm. Zool.* 1975 (w druku).
- [83] HAGEDORN, H. H. and FALLON, A. M., Ovarian control of vitellogenin synthesis by the fat body in *Aedes aegypti*, *Nature*, **244**: 103-105, 1973.
- [84] HAGEDORN, H. H. and JUDSON, C. L., Purification and site of synthesis of *Aedes aegypti* yolk proteins, *J. Exp. Zool.*, **182**: 367-378, 1972.
- [85] HAMASAKI, S., On the effect of castration in the silkworm *Bombyx mori*, *Proc. Imp. Acad. Japan.*, **8**: 267-270, 1939.
- [86] HARLOW, P. H., A study of ovarian development and its relation to adult nutrition in the blowfly *Protophormia terrae novae*, *J. Exp.*, **33**: 777-798, 1956.
- [87] HAUSMAN, S. J., ANDERSON, L. M. and TELFER, W. H., The dependence of cecropia yolk formation in vitro on specific blood proteins, *J. Cell. Biol.*, **48**: 303-313, 1971.
- [88] HIGHNAM, K. C., Neurosecretory control of ovarian development in *Schistocerca gregaria*, *Quart. J. Micr. Sci.* **103**: 57-72, 1962.
- [89] HIGHNAM, K. C. and HASKELL, P. T., The endocrine systems of isolated and crowded *Locusta* and *Schistocerca* in relation to oocyte growth and the effects of flying upon maturation, *J. Insect Physiol.*, **10**: 849-864, 1964.
- [90] HILL, L., Neurosecretory control of haemolymph protein concentration during ovarian development in the desert locust, *J. Insect Physiol.*, **8**: 609-619, 1962.
- [91] — The incorporation of C<sup>14</sup> glycine into the proteins of the fat body of the desert locust during ovarian development, *J. Insect Physiol.*, **11**: 1605-1615, 1965.
- [92] HILL, L. and IZATT, M. E. G., Hormonal control of lipid and protein metabolism in the adult desert locust, Abstracts of papers presented at the British/Duch endocrine meeting of the Society for Endocrinology, 4-7, 1972.
- [93] — The relationships between corpora allata and fat body and haemolymph lipids in the adult female desert locust, *J. Insect Physiol.*, **20**: 2143-2156, 1974.
- [94] HOPKINS, C. R. and KING, P. E., An electron-microscopical and histochemical study of the oocyte periphery in *Bombus terrestris* during vitellogenesis, *J. Cell. Sci.*, **1**: 201-216, 1966.
- [95] HUDSON, A., Proteins in the haemolymph and other tissues of the developing tomato hornworm, *Protoparce quinquemaculata* Haworth, *Can. J. Zool.*, **44**: 541-555, 1966.
- [96] HUEBNER, E. and ANDERSON, E., A cytological study of the ovary of *Rhodnius prolixus* (Hem., Het., Reduviidae) 2. The ontogeny of the follicular epithelium, *J. Morphol.*, **136**: 459-494, 1972.
- [97] KAMBYSELLIS, M. P. and HEED, W. B., Juvenile hormone induces ovarian development in diapausing cave-dwelling *Drosophila* species, *J. Insect Physiol.*, **20**: 1779-1786, 1974.
- [98] KESSEL, R. G. and BEAMS, H. W., Micropinocytosis and yolk formation in the oocytes of the small milkweed bug, *Exper. Cell. Res.*, **30**: 440-443, 1963.
- [99] KING, R. C. and AGGARRAL, S. K., Oogenesis in *Hyalophora cecropia*, *Growth*, **29**: 17-83, 1965.
- [100] KING, R. C., ROBINSON, A. C. and SMITH, R. F., Oogenesis in adult *Drosophila melanogaster*, *Growth*, **20**: 121-157, 1956.



- [101] LAMY, M., Les proteines impliquees dans la vitellogenese des *Lepidopteres*, Ann. d'Endocrinologie, **31**: 485-503, 1970.
- [102] LANZREIN, B., Influence of juvenile hormone analogue on vitellogenin synthesis and oögenesis in larvae of *Nauphoeta cinerea*, J. Insect physiol., **20**: 1871-1885, 1974.
- [103] LAVERDURE, A. M., L'evolution de l'ovaire chez la femelle adulte de *Tenebrio molitor* — La vitellogenese, J. Insect Physiol., **18**: 1369-1385, 1972.
- [104] L'Helias, C., Etude comparee de l'azote total et de l'azote non proteinique chez le phasme *Dixippus morosus* apres ablation des corpora allata, C. R. Acad. Sci. Paris, **236**: 2439-2441, 1953.
- [105] LOHER, W., Hormonale kontrolle der oocytenentwicklung bei der Hauschrecke *Gomphocerus rufus* L. (*Acridinae*). Zool. Jahrb. Abt. Physiol., **71**: 677-684, 1965.
- [106] de LOOF, A. and LAGASSE, A., The ultrastructure of the follicle cells of the ovary of the colorado beetle in relation to yolk formation. J. Insect Physiol., **16**: 211-220, 1970.
- [107] — Juvenile hormone and the ultrastructural properties of the fat body of the adult Colorado beetle, *Leptinotarsa decemlineata*, Say. Z. Zellforsch., **106**: 439-450, 1970.
- [108] de LOOF, A., LAGASSE, A. and BOHIJN, W., Proteid yolk-formation in the Colorado beetle (*Leptinotarsa decemlineata*: Col., *Chrysomelidae*) with special reference to the mechanism of the selective uptake of haemolymph, Proc. Kon. Ned. Akad. Wetensch., Ser. C **15**: 125-143, 1972.
- [109] de LOOF, A. and de WILDE, J., The relation between haemolymph proteins and vitellogenesis in the Colorado beetle, *Leptinotarsa decemlineata*, J. Insect Physiol., **16**: 157-169, 1970.
- [110] — Hormonal control of synthesis of vitellogenic female protein in the Colorado beetle, *Leptinotarsa decemlineata*, J. Insect Physiol., **16**: 1455-1466, 1970.
- [111] LOCKE, M. and COLLINS, J. V., The structure and formation of protein granules in the fat body of an insect, J. Cell. Biol., **26**: 857-884, 1965.
- [112] — Sequestration of protein by the fat body of an insect, Nature, **210**: 552-553, 1966.
- [113] — Protein uptake into multivesicular bodies and storage granules in the fat body of an insect, J. Cell. Biol., **36**: 453-483, 1968.
- [114] LOUGHTON, B. G. and WEST, A. S., The development and distribution of haemolymph proteins in *Lepidoptera*, J. Insect Physiol., **11**: 919-932, 1965.
- [115] LÜSCHER, M., Oocyte protection — a function of a corpus cardiacum hormone in the cockroach *Nauphoeta cinerea*, J. Insect Physiol., **14**: 685-688, 1968.
- [116] MAHOWALD, A. P., Ultrastructural observations on oogenesis in *Drosophila* (*Dipt. Drosophilidae*) J. Morphol., **137**: 29-48, 1972.
- [117] MARTIN, J. S., Lipid composition of fat body and its contribution to the maturing oocytes in *Pyrrhocoris apterus*, J. Insect Physiol., **15**: 1025-1045, 1969.
- [118] — Studies on assimilation, mobilization and transport of lipids by the fat body and haemolymph of *Pyrrhocoris apterus*, J. Insect Physiol., **15**: 2319-2344, 1969.
- [119] MAYER, R. J. and CANDY, D. J., Control of haemolymph lipid concentration during locust flight. An adipokinetic hormone from the corpora cardiaca, J. Insect Physiol., **15**: 611-620, 1969.
- [120] MELIUS, M. E. and TELFER, W. H., An autoradiographic analysis of yolk deposition in the cecropia moth oocyte, J. Morphol., **129**: 1-16, 1969.



- [121] MANON, M., Endocrine influences on yolk deposition in insects, *J. Anim. Morph. Physiol.*, **12**: 76–80, 1965.
- [122] MILLS, R. R., GREENSLADE, F. G. and COUCH, E. F., Studies on vitellogenesis in the american cockroach, *J. Insect Physiol.*, **12**: 767–779, 1966.
- [123] MINKS, A. K., Biochemical aspects of juvenile hormone action in the adult *Locusta migratoria*, *Arch. Neerl. Zool.*, **17**: 175–258, 1967.
- [124] MORDUE, W., The neuro-endocrine control of oocyte development in *Tenebrio molitor* L., *J. Insect Physiol.*, **11**: 617–629, 1965.
- [125] MONIS, B., CARDIOLK, A. and FABRO, J. C., On the glycocalyx, the external coat of the plasma membrane of some secretory cells, *Z. Zellforsch.*, **99**: 64–73, 1969.
- [126] NAIR, K. S. S. and KARNAVAR, G. K., A cytological study of changes in the fat body of *Trogoderma granarium* during metamorphosis, with special reference to the proteinaceous globules, *J. Insect Physiol.*, **14**: 1651–1659, 1968.
- [127] NANDANAN, M. D., SEHGAL, S. S. and AGARWAL, H. C., Properties and distribution of extra-digestive lipase in the beetle *Trogoderma*, *Insect Biochem.*, **3**: 223–230, 1973.
- [128] NELSON, D. R., TERRANOVA, A. C. and SUKKESTAD, D. R., Fatty acid composition of the glyceride and free fatty acid fractions of the fat body and haemolymph of the cocroach, *Periplaneta americana*, *Comp. Biochem. Physiol.*, **20**: 907–917, 1967.
- [129] NIELSEN, D. J. and MILLS, R. R., Changes in electrophoretic properties of haemolymph and terminal oöcyte proteins during vitellogenesis in the american cocroach, *J. Insect Physiol.*, **14**: 163–170, 1968.
- [130] ORR, C. W. M., The influence of nutritional and hormonal factors on the egg development in the blowfly *Phormia regina* (Heig), *J. Insect Physiol.*, **10**: 53–64, 1964.
- [131] — The influence of nutritional and hormonal factors on the chemistry of the fat body, blood and ovaries of the blowfly *Phormia regina* (Heig), *J. Insect Physiol.*, **10**: 103–119, 1964.
- [132] PAN, M. L., The synthesis of vitellogenin in the *Cecropia silkworm*, *J. Insect Physiol.*, **17**: 677–689, 1971.
- [133] PAN, M. L., BELL, W. J. and TELFER, W. H., Vitellogenic blood protein synthesis in insect fat body, *Science*, **165**: 393–394, 1969.
- [134] PAN, M. L. and WYATT, G. R., Juvenile hormone induces vitellogenin synthesis in the monarch butterfly, *Science*, **174**: 503–505, 1971.
- [135] PELED, Y. and TIETZ, A., Fat transport in the locust, *Locusta migratoria*: The role of protein synthesis, *Biochim. Biophys. Acta*, **296**: 499–509, 1973.
- [136] — Isolation and properties of lipoprotein from the haemolymph of the locust, *Locusta migratoria*, *Biochim. Biophys. Acta*, w druku, 1975.
- [137] PEMRICK, S. M. and BUTZ, A., Protein synthesis of the fat body of adult *Tenebrio molitor*, *J. Insect Physiol.*, **16**: 643–651, 1970.
- [138] — RNA synthesis of the fat body of adult *Tenebrio molitor*, *J. Insect Physiol.*, **16**: 1171–1177, 1970.
- [139] Common electrophoretic properties of the fat body, haemolymph and oöcytes of adult *Tenebrio molitor*, *J. Insect Physiol.*, **16**: 1443–1453, 1970.
- [140] PERASSI, R., Female specific proteins in *Triatoma infertans* haemolymph, *J. Insect Physiol.*, **19**: 663–671, 1973.
- [141] PETZELT, C. and BIER, K., Synthese der Hämolympfproteine und die Auf-



- nahme der Dottefraktion in die Oocyte unter Actinomycin-Einfluß (Untersuchungen an *Musca domestica*) Wilhelm Roux' Archiv., **164**: 359-366, 1970.
- [142] PFEIFFER, J. W., Effect of the corpora allata on the metabolism of adult female grasshoppers, J. Exp. Zool., **99**: 183-233, 1945.
- [143] PINAMONTI, S., PETRIS, A. and COLOMBO, G., Nucleic acids, proteins and tryptofan pyrrolase activity of the fat body of *Schistocerca gregaria* Försh (*Orthoptera*) during ovarian maturation, J. Insect Physiol., **12**: 1403-1410, 1966.
- [144] PRABHU, V. K. K., ITTYCHERIA, P. J. and NAYAR, K. K., Influence of corpus allatum on reproduction of female *Iphita limbata* Stål. (*Hemiptera*), Acta Ent. Bohemoslov., **64**: 335-343, 1967.
- [145] PRATT, G. E. and DAVEY, K. G., The corpus allatum and oogenesis in *Rhodnius prolixus* (Stal) I. The effects of allatectomy, J. exp. Biol., **56**: 201-214, 1972.
- [146] PRELL, H., Über die Beziehungen zwischen primären und sekundären Sexualcharakteren bei Schmetterlingen, Zool. Jb. Physiol., **35**: 183-224, 1915.
- [147] PRICE, G. M., The in vitro incorporation of (U-<sup>14</sup>C) valine into fat body protein of the larva of the blowfly, *Calliphora erythrocephala*, J. Insect Physiol., **12**: 731-740, 1966.
- [148] — Protein and nucleic acid metabolism in insect fat body, Biol. Rev., **48**: (3) 333-375, 1973.
- [149] PRICE, G. M. and BOSMAN, T., The electrophoretic separation of proteins isolated from the larva of the blowfly, *Calliphora erythrocephala*, J. Insect Physiol., **12**: 741-745, 1966.
- [150] PRZEŁĘCKA, A., Incorporation of <sup>14</sup>C-sodium palmitate into lipids and cell interaction in ovarioles of *Galleria mellonella* (*Lepidoptera*), Ann. Histochem., **11**: 403-411, 1966.
- [151] PRZEŁĘCKA, A. and DUTKOWSKI, A., Autoradiographic investigation of incorporation of fatty acids into the lipids of insect ovarioles, Bull. Acad. Pol. Sci., Cl II. 573-575, 1965.
- [152] PRZEŁĘCKA, A. and DUTKOWSKI, A. B., Morphological basis of follicle cells — oocyte interaction in normal pupae and isolated pupal abdomina of *Galleria mellonella* L., Experientia, **28**: 556-558, 1972.
- [153] — The structure of the ovariole wall in *Galleria mellonella*, Folia Histochem. Cytochem., **11**: 269-274, 1973.
- [154] RAMAMUTRY, P. S., On the contribution of the follicle epithelium to the deposition of yolk in the oocyte of *Panorpa communis* (*Mecoptera*), Exp. Cell. Res., **33**: 601-605, 1964.
- [155] ROTH, T. F. and PORTER, K. R., Yolk protein uptake in the oocyte of the mosquito *Aedes aegypti* L., J. Cell. Biol., **20**: 313-332, 1964.
- [156] SCHEURER, R., Endocrine control of protein synthesis during oocyte maturation in the cockroach *Leucophaea maderae*, J. Insect Physiol., **15**: 1411-1419, 1969.
- [157] SHIGEMATSU, H., Synthesis of blood protein by the fat body in the silkworm, *Bombyx mori* L., Nature, **182**: 880-882, 1958.
- [158] SOCHA, R., The haemolymph and tissue proteins in relation to moulting and yolk formation in *Dixippus morosus* (*Phasmoidea*), Acta Ent. Bohemoslov., **68**: 289-299, 1971.
- [159] STAY, B., Protein uptake in the oocytes of the Cecropia moth, J. Cell. Biol., **26**: 49-62, 1965.
- [160] STAY, B. and CLARK, J. K., Fluctuation of protein granules in the fat



- body of the viviparous cocroach *Diploptera punctata*, during the reproductive cycle, *J. Insect Physiol.*, **17**: 1747-1762, 1971.
- [161] STEPHEN, W. F. and GILBERT, L. J., Alternations in fatty acid composition during the metamorphosis of *Hyalophora cecropia*: Correlations with juvenile hormone titre, *J. Insect Physiol.*, **16**: 851-864, 1970.
- [162] STEVENSON, E., Haemolymph lipids and fat body lipases of the southern armyworm moth, *J. Insect Physiol.*, **18**: 1751-1756, 1972.
- [163] TELFER, W. H., *Immunological studies of insect metamorphosis* II. The role of sex-limited blood protein in egg formation by the Cecropia silkworm, *J. Gen. Physiol.*, **37**: 539-558, 1954.
- [164] — The selective accumulation of blood proteins by the oocytes of saturniid moths, *Biol. Bull.*, **118**: 338-351, 1960.
- [165] — The route of entry and localization of blood proteins in the oocytes of saturniid moths, *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, **9**: 747-759, 1961.
- [166] — The mechanism and control of yolk formation, *Ann. Rev. Entomol.*, **10**: 161-184, 1965.
- [167] TELFER, W. H. and ANDERSON, L. M., Functional transformation accompanying the initiation of a terminal growth phase in the Cecropia moth oocyte, *Develop. Biol.*, **17**: 512-535, 1968.
- [168] TELFER, W. H. and MELIUS, jr M. E., The mechanism of blood protein uptake by insect oocytes, *Am. Zoologist*, **3**: 185-191, 1963.
- [169] TELFER, W. H. and RUTBERG, L. D., The effects of blood protein depletion on the growth of the oocytes in the Cecropia moth, *Biol. Bull.*, **118**: 352-366, 1960.
- [170] TELFER, W. H. and WILLIAMS, C. M., Immunological studies of insect metamorphosis. I. Quantitative and qualitative description of the blood antigen of the Cecropia silkworm, *J. Gen. Physiol.*, **36**: 389-413, 1953.
- [171] THOMAS, K. K., Studies on the synthesis of lipoproteins during larval-pupal development of *Hyalophora cecropia*, *Insect Biochem.*, **2**: 107-118, 1972.
- [172] — Lipid composition of the fat body and haemolymph and its relation to lipid release in *Oncopeltus fasciatus*, *J. Insect Physiol.*, **20**: 845-858, 1974.
- [173] THOMAS, K. K. and GILBERT, L. J., Isolation and characterization of the hemolymph lipoproteins of the American silkmoth, *Hyalophora cecropia*, *Arch. Biochem. Biophys.*, **127**: 512-521, 1968.
- [174] — The hemolymph lipoproteins of the silkmoth *Hyalophora gloveri*: Studies on lipid composition origin and function, *Physiol. Chem. Phys.*, **1**: 293-311, 1969.
- [175] THOMSEN, E. and THOMSEN, M., Fine structure of the fat body of the female of *Calliphora erythrocephala* during the first egg — maturation cycle, *Cell. Tiss. Res.*, **152**: 193-217, 1974.
- [176] TIETZ, A., Fat transport in the locust, *J. Lipid Res.*, **3**: 421-426, 1962.
- [177] — Fat transport in the locust: The role of diglycerides, *Eur. J. Biochem.*, **2**: 236-242, 1967.
- [178] VANDENBERG, J. P., The role of the gonadotropic hormone in the synthesis of protein and RNA in *Rhodnius prolixus* (Hemiptera), *Biol. Bull.* **125**: 576-581, 1963.
- [179] VROMAN, H. E., KAPLANIS, J. N. and ROBBINS, W. E., Effect of allatectomy on lipids biosynthesis and turnover in the female American cockroach, *Periplaneta americana*, *J. Insect Physiol.*, **11**: 897-905, 1965.
- [180] WALKER, P. R. and BAILEY, E., Effect of allatectomy on fat body lipid



- metabolism of the male desert locust during adult development, *J. Insect Physiol.*, **17**: 1125–1137, 1971.
- [181] WIGGLESWORTH, V. B., The fate of haemoglobin in *Rhodnius prolixus* (Hemiptera) and other blood — sucking arthropods, *Proc. Roy. Soc. London B.*, **131**: 313–339, 1943.
- [182] — The principles of insect physiology, Methuen, London, 1965.
- [183] — „Catalysosomes” or enzyme caps on lipid droplets: an intracellular organelle, *Nature*, **210**: 759–760, 1966.
- [184] de WILDE, A. and de LOOF, A., Reproduction-endocrine control. The physiology of insecta, t. 1 rozdz. 3 M. Rockstein (wyd.) Academic Press, 1973.
- [185] WILHELM, R. and LÜSCHER, M., Über die Reifung transplantierter Oocyten unter verschiedenen Bedingungen bei der Schabe *Nauphoeta cinerea*, *Rev. Suisse Zool.*, **77**: 621–624, 1970.
- [186] — On the relative importance of juvenile hormone and vitellogenin for oocyte growth in the cockroach *Nauphoeta cinerea*, *J. Insect Physiol.*, **20**: 1887–1894, 1974.
- [187] WILKENS, J. L., The control of egg maturation in *Sarcophaga bullata* (Diptera), *Am. Zoologist.*, **7**: 723–724, 1967.
- [188] WŁODAWER, P. and BARAŃSKA, J., Lipolytic activity of the fat body of the waxmoth larvae. I. Fatty acid composition of the fat body and of the haemolymph lipids and release of free fatty acids from the fat body during incubation, *Acta Biochim. Pol.* **12**: 23–37, 1965.
- [189] — Lipolytic activity of the fat body of the waxmoth larvae II. Characteristics of the two different lipases in the waxmoth fat body, *Acta Biochim. Pol.*, **12**: 39–47, 1965.
- [190] WŁODAWER, P., ŁĄGWIŃSKA, E. and BARAŃSKA, J., Estrification of fatty acids in the wax moth haemolymph and its possible role in lipid transport, *J. Insect Physiol.*, **12**: 547–560, 1966.
- [191] WŁODAWER, P. and WIŚNIEWSKA, A., Lipids in the haemolymph of wax-moth larvae during starvation, *J. Insect Physiol.*, **11**: 11–20, 1965.
- [192] WYSS-HUBER, M. and LÜSCHER, M., In vitro synthesis and release of proteins by fat body and ovarian tissue of *Leucophaea maderae* during the sexual cycle, *J. Insect Physiol.*, **18**: 689–710, 1972.

Otrzymano: 14 marca 1975.

Przyjęto: 8 kwietnia 1975.

Adres autora: ul. Pasteura 3, 02-093 Warszawa.







## WPŁYW METABOLIZMU GLUKOZY NA KOMÓRKOWE POTENCJAŁY CZYNNOŚCIOWE W MIĘŚNIU SERCOWYM

Elżbieta WASILEWSKA-DZIUBIŃSKA

Zakład Fizjologii Klinicznej Centrum Medycznego Kształcenia Podyplomowego  
w Warszawie

*Streszczenie.* Zauważono, że sprawny przebieg glikolizy jest czynnikiem wpływającym na czas trwania komórkowego potencjału czynnościowego (PC). Wysunięto przypuszczenie, że ATP powstający w procesie fosforylacji substratowej w przebiegu glikolizy dostarcza energii dla zapewnienia sprawności procesów błonowych. Mechanizm wpływu ATP na przebieg PC wydaje się być związany z regulacją przepływu prądów jonowych przez błonę komórkową. Uważa się, że skracanie się czasu trwania PC jest związane z zahamowaniem dośrodkowego prądu wapniowego, z kolei dośrodkowy prąd wapniowy ma zależeć od stanu metabolicznego komórki. Tłumaczenie skracania się czasu trwania PC pod wpływem niekorzystnych warunków metabolicznych zahamowaniem glikolizy i zahamowaniem dośrodkowego prądu wapniowego opiera się na dowodach pośrednich, tym niemniej rzuca nowe światło na udział glukozy w metabolizmie serca jako czynnika związanego z powstawaniem stanu czynnego.

### ZALEŻNOŚĆ ZMIAN W PRZEBIEGU KOMÓRKOWYCH POTENCJAŁÓW CZYNNOŚCIOWYCH OD ZAHAMOWANIA METABOLIZMU MIĘŚNIA SERCOWEGO

Od około 20 lat istnieją próby powiązania procesów metabolicznych zachodzących w komórce mięśnia sercowego z powstawaniem stanu czynnego w błonie komórkowej.

Zaburzenia w metabolizmie sercowym łączone są ze zmianami w przebiegu komórkowych potencjałów czynnościowych (PC) [7] oraz powstawaniem zaburzeń rytmu [1, 2, 16, 19, 45-50, 52]. Szczególną wrażliwość na zmiany metaboliczne stwierdzono w okresie repolaryzacji; przejawia się ona w skracaniu się czasu trwania PC oraz zmiennością przebiegu 2 i 3 fazy potencjału.

Z badań przeprowadzonych na różnych preparatach izolowanych wynika, że zahamowanie metabolizmu komórek mięśnia sercowego nie-



dotlenieniem [22, 24, 29, 30, 33, 34, 37, 53, 54, 58], inhibitorami metabolicznymi [5, 13, 23, 25, 28, 31, 32, 36, 37, 38, 46, 58], brakiem substratów energetycznych w płynie perfuzyjnym [36, 58] prowadzi do zmian w czynności elektrycznej serca, polegających głównie na skracaniu się czasu trwania komórkowych potencjałów czynnościowych.

#### ZALEŻNOŚĆ CZASU TRWANIA KOMÓRKOWYCH POTENCJAŁÓW CZYNNOSCIOWYCH OD PRZEBIEGU GLIKOLIZY W KOMÓRKACH MIĘŚNIA SERCOWEGO

W ciągu ostatnich lat szczególną uwagę zwrócono na możliwość powiązań między przebiegiem PC a metabolizmem glukozy w komórce mięśnia sercowego.

Zależność czasu trwania PC od obecności glukozy w płynie perfuzyjnym została po raz pierwszy przedstawiona w roku 1956 na izolowanych przedsionkach serca szczura przez Webb i Hollander [58]. Stwierdzili oni, że skrócenie czasu trwania PC pod wpływem braku substratów energetycznych w płynie perfuzyjnym ustępowało po dodaniu glukozy do płynu perfuzyjnego. W odróżnieniu od glukozy dodanie kwasu pirogronowego tylko częściowo wydłużało skrócony uprzednio czas trwania PC, natomiast dodanie kwasu bursztynowego (produkt pośredni cyklu Krebsa) nie miało wpływu na skrócony czas trwania PC.

Dziewięć lat później stwierdzono, że glukoza w stężeniu 50 mM zapobiega skracaniu się czasu trwania PC rejestrowanych z izolowanego niedotlenionego mięśnia brodawkowego kota oraz że jeżeli pod wpływem anoksji nastąpiło skrócenie czasu trwania PC rejestrowanych z tego samego preparatu w obecności 5 mM glukozy — to dodanie do środowiska 50 mM glukozy powodowało wydłużenie się czasu trwania PC do wartości kontrolnych. Stwierdzono również, że wpływ glukozy na czas trwania PC nie był związany z osmotycznym działaniem dużych stężeń glukozy [29].

Wyżej wymienione fakty inspirowały grupę badaczy kanadyjskich do wykonania szeregu prac na izolowanym mięśniu brodawkowym świnki morskiej, z których wynika, że istnieje powiązanie między przebiegiem PC i metabolizmem glukozy w komórce mięśnia sercowego. Przebadano wpływ samego transportu glukozy przez błonę komórkową oraz kolejnych etapów metabolizmu glukozy w komórce na przebieg PC.

Wykazano, że czas trwania PC zarówno w warunkach tlenowych, jak i beztlenowych zależy od stężenia glukozy w płynie perfuzyjnym [29, 30]. Oddziaływanie wysokich stężeń glukozy na skrócony czas trwania PC wywołany niedotlenieniem i niskim stężeniem glukozy w śro-



dowisku było hamowane podaniem florydzyiny [30], która jest czynnikiem hamującym transport glukozy przez błonę komórkową [9, 27]. Działanie florydzyiny było znoszone w obecności insuliny [30], która aktywuje transport glukozy przez błonę komórkową mięśnia sercowego [9, 10, 11, 27, 43]. Przebadano również wpływ innych cukrów na czas trwania PC w niedotlenieniu. Stwierdzono, że jedynie dodanie glukozy do środowiska powoduje wydłużenie skróconego czasu trwania PC pod wpływem niedotlenienia [29, 30].

Nie sam transport glukozy przez błonę komórkową, ale przede wszystkim sprawny przebieg glikolizy jest czynnikiem decydującym o przebiegu fazy repolaryzacji PC [30]. Do tego stwierdzenia upoważniły MacLeoda i Prasada [30] wyniki doświadczeń, w których przebadano wpływ działania na PC zahamowania i aktywacji różnych etapów metabolizmu komórkowego. Wykazano, że czynniki hamujące glikolizę — kwas jodoctowy (IAA) oraz 2-deoxy-D-glukoza powodowały skracanie się czasu trwania PC [46]. Zwiększenie poziomu glukozy w płynie perfuzyjnym do 50 mM nie powodowało wydłużenia się czasu trwania PC zarówno w warunkach tlenowych, jak i beztlenowych [46]. Czynniki hamujące metabolizm tlenowy — niedotlenienie [29], NaCN [46], dwunitrofenol (DNP) [36, 46] powodowały również skrócenie czasu trwania PC, ale było ono znoszone po dodaniu 50 mM glukozy do środowiska.

Czynniki aktywujące glikolizę i glikogenolizę — adrenalina [30], noradrenalina [30], izoprenalina [30, 35] i aminofilina [30, 46] powodowały wydłużenie się skróconego czasu trwania PC rejestrowanych zarówno w warunkach beztlenowych, jak i w warunkach tlenowych przy 5 mM glukozy w środowisku. Wpływ izopropylonoradrenaliny na czas trwania PC był blokowany przez propranolol (lek  $\beta$ -adrenolityczny hamujący efekty metaboliczne katecholamin) i acetylocholinę [30]. Antagonistyczny wpływ acetylocholiny w stosunku do katecholamin na aktywację glikogenolizy był stwierdzony na izolowanych sercach szczura przez Vincent i Ellis [56]. Stwierdzono również, że katecholaminy nie mają wpływu na skrócony czas trwania PC, jeżeli pod wpływem długotrwałej perfuzji płynem bez substratów energetycznych i niedotlenienia zostanie znacznie obniżony albo wyczerpany zasób glikogenu w komórkach mięśnia sercowego.

Stwierdzono również, że w obecności IAA i 2-deoxy-D-glukozy katecholaminy nie miały wpływu na skrócony niedotlenieniem czas trwania PC [30].

Według MacLeoda i Prasada [30, 48] wpływ dużych stężeń glukozy w zapobieganiu skracania się PC można tłumaczyć dodatkową aktywacją glikolizy. To tłumaczenie wydaje się być słuszne, gdyż wykazano, że zwiększenie stężenia glukozy w płynie perfuzyjnym powyżej 5 mM



nie ma wpływu na zwiększenie tlenowego spalania glukozy, tylko powoduje zwiększoną produkcję kwasu mlekowego, a więc nasila przebieg beztlenowej glikolizy [42, 61].

Następny etap prac tej grupy autorów [33, 34] doprowadził do wysunięcia hipotezy, według której w komórce mięśnia sercowego istnieją dwie pule energetyczne. Jedna — związana głównie z powstawaniem ATP w procesie fosforylacji substratowej w przebiegu glikolizy dostarcza energii dla zapewnienia sprawności procesów błonowych; druga — związana głównie z powstawaniem ATP w przebiegu fosforylacji oksydacyjnej dostarcza energię dla sprawnego działania układów kurczliwych.

Hipoteza ta wydaje się być uzasadniona również rozmieszczeniem enzymów glikolitycznych i enzymów oddechowych cyklu Krebsa w komórce, gdyż stwierdzono, że aktywność enzymów glikolitycznych związana jest z cytoplazmą okolic błony komórkowej [3, 44], natomiast mitochondria, w których przebiega cykl Krebsa i fosforylacja oksydacyjna znajdują się w bliskim sąsiedztwie układów kurczliwych [33].

Potwierdzeniem tej hipotezy są wyniki pracy [37], w której w warunkach beztlenowych znaleziono ścisłą zależność między poziomem glukozy w płynie perfuzyjnym, powstawaniem kwasu mlekowego (wskaźnik aktywności cyklu glikolitycznego), zawartością ATP w komórce i czasem trwania PC. Stwierdzono, że przy stężeniu glukozy 50 mM w płynie perfuzyjnym po 1 godz. anoksji czas trwania PC prawie się nie zmienił, poziom kwasu mlekowego utrzymywał się stale na tym samym poziomie, natomiast siła skurczu zmalała do około 1/3 wartości wyjściowej. Po obniżeniu poziomu glukozy do 5 mM w płynie perfuzyjnym występowało znaczne skrócenie czasu trwania PC, spadek szybkości powstawania kwasu mlekowego i dalszy spadek siły skurczu. Po powtórным zwiększeniu poziomu glukozy do 50 mM w środowisku występowało wydłużenie czasu trwania PC do wartości kontrolnych oraz przyspieszenie powstawania kwasu mlekowego. Natomiast występował tylko niewielki wzrost siły skurczu.

Zależność czynności elektrycznej serca od ATP powstającego w reakcjach glikolizy (fosforylacja substratowa) została potwierdzona również w innych układach doświadczalnych. Girardier [15] wykazał, że w hodowli komórek mięśnia sercowego w warunkach tlenowych i przy wysokim poziomie kwasu pirogronowego w środowisku (zapewniającym optymalne warunki do sprawnego przebiegu cyklu Krebsa i fosforylacji oksydacyjnej) po podaniu 2-deoxy-D-glukozy występowało skrócenie czasu trwania PC. Według Girardiera [15] zahamowanie glikolizy nawet przy sprawnie przebiegającej fosforylacji oksydacyjnej prowadzi do skracania czasu trwania PC.



Wykazano, że w mięśniu sercowym ludzkim istnieje również ścisła zależność między metabolizmem glukozy a przebiegiem fazy repolaryzacji i czasu trwania PC. Prasad i Callaghan [47] na pobranych śródoperacyjnie skrawkach komory stwierdzili, że skrócony pod wpływem działania niedotlenienia czas trwania PC wydłużał się po dodaniu 50 mM glukozy do środowiska.

#### WPLYW ATP NA CZAS TRWANIA KOMÓRKOWYCH POTENCJAŁÓW CZYNNOSCIOWYCH

Mechanizm wpływu ATP na przebieg PC do tej pory nie został w pełni poznany, ale wydaje się być związany z regulacją przepływu prądów jonowych przez błonę komórkową [15, 17, 18, 21, 35, 60]. Uważa się, że początkowy, szybki okres fazy narastania PC jest związany z gwałtownym napływem jonów sodu do komórki [39, 59]. Późniejszy, wolniej przebiegający okres fazy narastania PC jest związany z napływem zarówno jonów sodu, jak i jonów wapnia do komórki [8]. Mechanizm jonowy powstawania fazy repolaryzacji PC w dalszym ciągu nie jest jeszcze w pełni przebadany [12, 17, 18, 60]. Uważa się, że powstawanie fazy repolaryzacji jest związane z dwoma przeciwstawnymi procesami [12, 40, 60]; z jednej strony ze zmniejszającym się w czasie napływem do komórki jonów wapniowych (wolny dośrodkowy prąd wapniowy) oraz w mniejszym stopniu jonów sodu [4, 49, 51], z drugiej strony z narastającym wypływem jonów potasu [59, 60].

Skracanie się czasu trwania PC zarówno pod wpływem niedotlenienia, jak i pod wpływem działania inhibitorów metabolicznych początkowo tłumaczono wzrostem wypływu jonów potasu z komórek [30, 38, 54, 58]. Obecnie uważa się, że skracanie się czasu trwania PC jest związane z zahamowaniem dośrodkowego prądu wapniowego. Z kolei dośrodkowy prąd wapniowy ma zależeć od stanu metabolicznego komórki [37]. Za tym poglądem, według McDonalda i MacLeoda [37], przemawia szereg następujących faktów:

1. Skracanie się czasu trwania PC zarówno pod wpływem braku glukozy w płynie perfuzyjnym [36], jak też pod wpływem anoksji [20, 36] występowało bez wzrostu wypływu  $^{42}\text{K}$  z komórek mięśnia sercowego; spadek całkowitej zawartości potasu wewnątrzkomórkowego, występujący pod wpływem niedotlenienia, łączony jest nie ze zwiększonym wypływem potasu z komórki, ale ze zmniejszonym napływem do komórki [20, 35, 36].
2. W doświadczeniach wykonanych techniką potencjału stabiliza-



cji (voltage clamp) stwierdzono, że zmniejszenie wolnego prądu dośrodkowego jest związane ze skróceniem czasu trwania PC [14, 49, 57], natomiast zwiększenie wolnego prądu dośrodkowego jest związane z wydłużeniem czasu trwania PC [55].

3. Stwierdzono, że mangan, który jest inhibitorem dośrodkowego prądu wapniowego [41] powodował skrócenie czasu trwania PC w izolowanym mięśniu brodawkowatym świnki morskiej w anoksji przy stężeniu 50 mM glukozy w środowisku. Wpływ manganu na potencjał występował o wiele szybciej przy 10-krotnie niższym stężeniu glukozy w środowisku [35].
4. Stwierdzono, że izoprenalina nasila dośrodkowy prąd wapniowy [55], to działanie izoprenaliny jest hamowane manganem [55]. Izoprenalina powoduje również wydłużenie się czasu trwania skróconych pod wpływem anoksji potencjałów, to działanie izoprenaliny jest hamowane przez mangan [35].

Tłumaczenie skracania się czasu trwania PC pod wpływem niekorzystnych warunków metabolicznych, zahamowaniem glikolizy i zahamowaniem dośrodkowego prądu wapniowego, opiera się na szeregu dowodów pośrednich. Jednak ostateczne rozstrzygnięcie problemu mogą przynieść doświadczenia wykonane techniką potencjału stabilizacji (voltage clamp) [37].

Według McDonalda i MacLeoda [35] zapewnienie optymalnej aktywności glikolitycznej wydaje się szczególnie istotne w warunkach niedotlenienia mięśnia sercowego.

Wyżej przedstawione dane doświadczalne rzucają nowe światło na udział glukozy w metabolizmie mięśnia sercowego, jako czynnika związanego z powstawaniem stanu czynnego w komórkach mięśnia sercowego.

#### LITERATURA

- [1] ARMITAGE, A. K., BURN, J. H. and GUNNING, A. J., Ventricular fibrillation and ion transport, *Circulation Res.*, **5**: 98-104, 1957.
- [2] BAGDONAS, A. A., STUCKEY, J. M., PIERA, J., AMEK, N. S. and HOFFMAN, B., Effects of ischemia and hypoxia on the specialized conducting system of the canine heart, *Amer. Heart J.*, **61**: 206-218, 1961.
- [3] BAUM, H., MURER, E., LAUTTERBACK, D. C. B. and MCCONNELL, D. G., Association of integrated metabolic pathway with membranes. II. Electron micrographic studies on glycolytically active preparation from erythrocytes, *Archiv. Biochem.*, **113**: 487-495, 1966.
- [4] BEELER, G. W. and REUTER, H., Membrane calcium current in ventricular myocardial fibres, *J. Physiol.*, **207**: 191-208, 1970.
- [5] BOULPAEP, E., Influence de l'acid monoiodoacetique sur la dures du potential



- d'action du muscle ventriculaire de grenouille, *Arch. Int. Pharmacodyn.*, **120**: 502-504, 1959.
- [6] BROOKS, W. W., STURCKOW, B. and BING, O. H. J., Myocardial hypoxia and reoxygenation: electrophysiologic and mechanical correlates, *Amer. J. Physiol.*, **226**: 523-527, 1974.
- [7] BURN, J. H. and HUKOWIĆ, S., Anoxia and ventricular fibrillation, with a summary of evidence on the cause of fibrillation, *Brit. J. Pharmacol.*, **15**: 67-70, 1960.
- [8] CORABOEUF, E. and VASSORT G., Effects of some inhibitors of ionic permeabilities on ventricular action potential and contraction of rat and guinea pig hearts, *J. Electrocardiol.*, **1**: 19-30, 1968.
- [9] DIEDRICH, D. F., Competitive inhibition of intestinal glucose transport by phlorizin analogs, *Arch. Biochem. Biophys.*, **117**: 248-256, 1966.
- [10] FISHER, R. B. and LINDSAY, D. B., The action of insulin on the penetration of sugars into the perfused heart, *J. Physiol.*, **131**: 526-541, 1956.
- [11] FISHER, R. B. and ZACHARIAH, P., The mechanism of the uptake of sugars by the rat heart and the action of insulin on this mechanism, *J. Physiol.*, **158**: 73-85, 1961.
- [12] FOZZARD, M. A. and GIBBONS, W. R., Action potential and contraction of heart muscle — *Amer. J. Cardiol.*, **31**: 182-192, 1973.
- [13] GARDNER, E. A., WILSON, M. and FARAH, A., Action of iodoacetate on the isolated rabbit auricle, *J. Pharmacol. Exptl. Therap.*, **111**: 166-173, 1954.
- [14] GARNIER, D., ROUGIER, O., GARGOUIL, Y. M. and CORABOEUF, E., Electrophysiological analysis of myocard membrane properties during the plateau of the action potential. Existence of a slow inward current in solutions without divalent ions, *Pflügers Arch.*, **313**: 321-342, 1969.
- [15] GIRARDIER, L., Dynamic energy partition in cultured heart cells, *Cardiology*, **56**: 88-92, 1971/72.
- [16] GOODFORD, P. J., Metabolic factors and ventricular fibrillation, *Brit. J. Pharmacol.*, **13**: 144-150, 1958.
- [17] HAAS, H. G., KERN, R. and EINWACHTER, H. M., Electrical activity and metabolism in cardiac tissue: An experimental and theoretical study, *J. Membrane Biol.*, **3**: 180-209, 1970.
- [18] HAAS, H. G., Active ion transport in heart muscle, [w] *Electrical Phenomena in the Heart*, red. De Mello W. C. New York, Academic Press 1963-1989, 1972.
- [19] HOLLAND, W. C. and TINSLEY, B., Factors affecting the incidence of atrial fibrillation, *Amer. J. Physiol.*, **193**: 235-238, 1958.
- [20] HUNTER, E. G., MCDONALD, T. F. and MACLEOD, D. P., Metabolic depression and myocardial potassium, *Pflügers Archiv.*, **335**: 266-278, 1972.
- [21] HYDE, A., CHENAVAL, J. P., BLONDEL, B. and GIRARDIER, L., Electrophysiological correlates of energy metabolism in cultured rat heart cells, *J. Physiol. Paris*, **64**: 269-292, 1972.
- [22] KARDESH, H., HOGANCAMP, C. E. and BING, R. J., The effects of complete ischemia on the intracellular electrical activity of the whole mammalian heart, *Circulation Res.*, **6**: 715-720, 1958.
- [23] KLEINFELD, M., STEIN, E., MAGIN, J., KOSSMAN, C. E., The action of iodoacetate on the electrical and mechanical activities of the isolated perfused frog heart, *J. Clin. Invest.*, **34**: 1802-1806, 1955.
- [24] KLEINFELD, M., STEIN, E. and MAGIN, J., Electrical alternans in single ventricular fibres of the frog, *Amer. J. Physiol.*, **187**: 139-142, 1956.



- [25] KLEINFELD, M., MAGIN, J. and STEIN, E., Effect of 2,4-dinitrophenol on electrical and mechanical activities of isolated heart, *Amer. J. Physiol.*, **201**: 467-470, 1961.
- [26] KLEINFELD, M., MAGIN, J., MURPHY, B., STEIN, E., Effect of 2,4-dinitrophenol on electrical activity in Purkinje and ventricular muscle fibers of dog heart, *Circulation Res.*, **12**: 10-17, 1962.
- [27] LOTSPEICH, W. D., Phlorizin and cellular transport of glucose, *Harvey Lect.*, **56**: 63-91, 1960.
- [28] LÜLLMAN, H., Das Verhalten der Cellularen Potentiale der Herzmuskulatur bei verschenden Experimentellen „Insuffizienzformen“, *Arch. Exp. Pathol. u. Pharmakol.*, **237**: 447-452, 1961.
- [29] MACLEOD, D. P. and DANIEL, E. E., Influence of glucose on the transmembrane action potential of anoxic papillary muscle, *J. Gen. Physiol.*, **48**: 887-899, 1965.
- [30] MACLEOD, D. P. and PRASAD, K., Influence of glucose on the transmembrane action potential of papillary muscle. Effects of concentration, phlorizin and insulin, nonmetabolizable sugars and stimulators of glycolysis, *J. Gen. Physiol.*, **53**: 792-815, 1969.
- [31] MACFARLANE, W. V., Cardiac repolarization and metabolic blockade, *Nature*, **178**: 1050-1051, 1956.
- [32] — Plateau of the action potential of the frog ventricle, *Circulation Res.*, **8**: 47-56, 1960.
- [33] MCDONALD, T. F., HUNTER, E. G. and MACLEOD, D. P., Adenosintri-phosphate partition in cardiac muscle with respect to transmembrane electrical activity, *Pflügers Arch.*, **322**: 95-108, 1971.
- [34] MCDONALD, T. F. and MACLEOD, D. P., Recovery cycle in ventricular muscle: action potential duration, contractility and ATP content, *Pfugers Arch.*, **325**: 305-322, 1971.
- [35] — Effects of manganese, glucose and isoprenaline on the action potential of anoxic ventricular muscle., *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Exp. Path. Pharmac.*, **275**: 169-181, 1972.
- [36] — The effect of 2,4-dinitrophenol on the electrical and mechanical activity, metabolism and ion movements in guinea-pig ventricular muscle, *Brit. J. Pharmacol.*, **44**: 711-722, 1972.
- [37] — Metabolism and the electrical activity of anoxic ventricular muscle, *J. Physiol.*, **229**: 559-582, 1973.
- [38] de MELLO, W. C., Metabolism and electrical activity of the heart action of 2,4-dinitrophenol and ATP, *Amer. J. Physiol.*, **196**: 377-380, 1959.
- [39] NIEDERGERKE, R. and ORKAND, K., The dependence of the action potential of the frog's heart on the external and intracellular sodium concentration., *J. Physiol. (London)*, **184**: 312-334, 1966.
- [40] NOBLE D. and TSIEN, R. W., The repolarization process of heart cells, [w] *Electrical Phenomena in the Heart*, red. de Mello W. C. New York, Academic Press, 133-161, 1972.
- [41] OCHI, R., The slow inward current and the action of manganese ions in guinea pig's myocardium *Pflügers Arch.*, **316**: 81-94, 1970.
- [42] OPIE, L. H., SCHIPP, J. C., EVENS, J. R. and LEBOEUF, B., Metabolism of glucose U — C<sup>14</sup> in perfused rat heart, *Amer. J. Physiol.*, **203**: 839-843, 1962.
- [43] PARK, C. R., REINWEIN, D., HENDERSON, M. J., CADENAS, E. and MORGAN, H. E., The action of insulin on the transport of glucose through the cell membrane, *Amer. J. Med.*, **26**: 674-684.



- [44] PARKER, J. S. and HOFFMAN F., The role of membrane phosphoglycerate kinase in the control of glycolytic rate by active cation transport in human red blood cells, *J. Gen. Physiol.*, **50**: 893–916, 1967.
- [45] PENNA, M., ILLANES, A., PUPKIN, M., Effects of adenosine triphosphate and potassium chloride on ventricular fibrillation induced by lack of substrates, *Circulation Res.*, **10**: 642–646, 1962.
- [46] PRASAD, K. and MACLEOD, D. P., Influence of glucose on guinea-pig papillary muscle. Metabolic inhibitors, ouabain,  $\text{CaCl}_2$  and their interaction with glucose, sympathomimetic amines, and aminophylline, *Circulation Res.*, **24**: 939–950, 1969.
- [47] PRASAD, K., Influence of energy supply and calcium on the low sodium induced changes in the transmembrane potential and concentration of guinea papillary muscle, *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, **48**: 241–250, 1970.
- [48] PRASAD, K. and CALLAGHAN J. C., Influence of glucose metabolism on ouabain-induced changes in the transmembrane potential and contraction of human heart in vitro, *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, **48**: 801–812, 1970.
- [49] ROUGIER, O., VASSORT, G., GARNIER, D., GARGOUIL, Y. M. and CORABOEUF, E., Existence and role of a slow inward current during the frog atrial action potential, *Pflügers Arch.*, **308**: 91–110, 1969.
- [50] SURAWICZ, B., Ventricular Fibrillation, *Amer. J. Cardiol.*, **28**: 268–287, 1971.
- [51] TARR, N., Two inward current in frog atrial muscle, *J. Gen. Physiol.*, **58**: 523–543, 1971.
- [52] TÉTREAU, L. and BEAULNES, A., The role of glucose in the initiation and maintenance of ventricular fibrillation, *Canad. J. Biochem.*, **41**: 335–339, 1963.
- [53] TRAUTWEIN, W., GOTTSTEIN, V. und DUDEL, J., Der Aktionsstrom der Myokardfaser im Sauerstoffmangel, *Pflügers Arch.*, **260**: 40–60, 1954.
- [54] TRAUTWEIN, W. und DUDEL, J., Aktion potential und Kontraktion des Herzmuskels im Sauerstoffmangel, *Pflügers Arch.*, **263**: 23–32, 1956.
- [55] VASSORT, G., ROUGIER, O., GARNIER, D., SAUVIAT, M. P., CORABOEUF, E. and GARGOUIL, Y. M., Effects of adrenaline on membrane inward currents during the cardiac action potential, *Pflügers Arch.*, **309**: 70–81, 1969.
- [56] VINCENT, N. H. and ELLIS, S., Inhibitory effect of acetylcholine on glycolysis in the isolated guinea-pig heart, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **139**: 60–68, 1963.
- [57] VITEK, M. and TRAUTWEIN, W., The effect of manganese ions on cation potential and ionic current in cardiac Purkinje fibres, *Pflügers Arch. Ges. Physiol.*, **316**: 113, 1970.
- [58] WEBB, J. L. and HOLLANDER, P. B., Metabolic aspects of the relationship between the contractility and membrane potentials of the rat atrium, *Circulation Res.*, **4**: 618–626, 1956.
- [59] WEIDMANN, S., The effect of the cardiac membrane potential on the rapid availability of the sodium carrying system. *J. Physiol.*, **207**: 165–173, 1955.
- [60] — Heart electrophysiology, *Ann Rev. Physiol.*, **36**: 155–169, 1974.
- [61] WILLIAMSON, J. R., Effects of insulin and diet on the metabolism of L (+) lactate and glucose by the perfused rat heart, *Biochem. J.*, **38**: 377–383, 1962.

Otrzymano: 15 marca 1975.

Przyjęto: 8 kwietnia 1975.

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







## SOLUBILIZACJA I REKONSTYTUCJA BŁON BIOLOGICZNYCH

Elżbieta ZUBRZYCKA

Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN Zakład Biochemii Układu Nerwowego i Mięśni

**STRESZCZENIE.** Różne metody solubilizacji (ang. solubilization), tj. uwalniania składników błon do roztworu i frakcjonowania stosuje się w celu bliższego scharakteryzowania białek błonowych. Wśród nich można wymienić: działanie na błony roztworami o niskiej lub wysokiej sile jonowej, odczynnikami chelatującymi jony dwuwartościowych metali, związkami chaotropowymi, rozpuszczalnikami organicznymi i detergentami. Zastosowanie tych metod omówiono na przykładzie różnych rodzajów błon, między innymi: błon erytrocytów, błon plazmatycznych, a w szczególności błon sarkoplazmatycznego retikulum.

Metody solubilizacji i frakcjonowania są bardzo pomocne przy ustalaniu lokalizacji poszczególnych białek w błonie. Przy ich udziale białka te można podzielić na tzw. białka wewnętrzne, silnie związane z lipidami błonowymi wiązaniami hydrofobowymi i stanowiące szkielet błony oraz tzw. białka powierzchniowe związane luźniej z błoną i zlokalizowane na jej powierzchni.

Do poznania molekularnej organizacji błon przyczyniają się także badania nad ich rekonstytucją, które omówiono również głównie na przykładzie błon sarkoplazmatycznego retikulum.

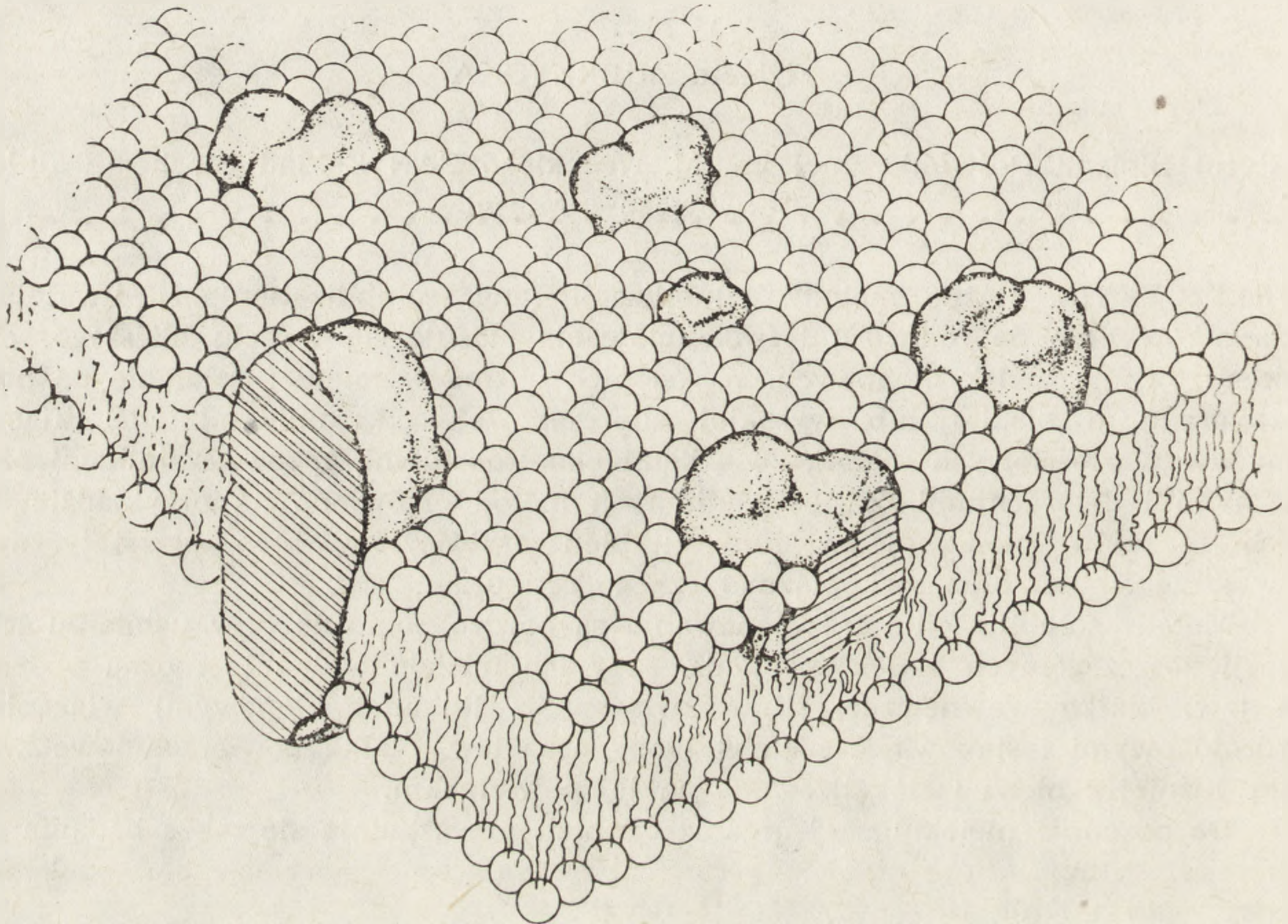
### BUDOWA BŁON BIOLOGICZNYCH

Badania Danielliego i Davsona [6] nad strukturą molekularną błon biologicznych są kontynuowane przez wielu autorów do dziś. Nie pozwoliły one jednak uzyskać pełnej odpowiedzi na pytanie jak zbudowana jest błona. Opierając się na bezsprzecznie wykazanym fakcie, że podstawowymi składnikami błon biologicznych są białka i lipidy, różni badacze tworzą coraz to nowe modele ich struktury. Autorzy są zgodni co do faktu, że fosfolipidy ułożone są w błonach dwuwarstwowo. Ich hydrofobowe łańcuchy skierowane są do środka błony, natomiast hydrofilowe reszty na zewnątrz.

Różnice w poglądach poszczególnych badaczy dotyczą przede wszystkim sposobu rozmieszczenia białek w podwójnej warstwie fosfolipidów. Obecnie najbardziej przekonujący wydaje się model zaproponowany w 1972 r. przez Singera i Nicolsona [51]. Model ten traktuje strukturę



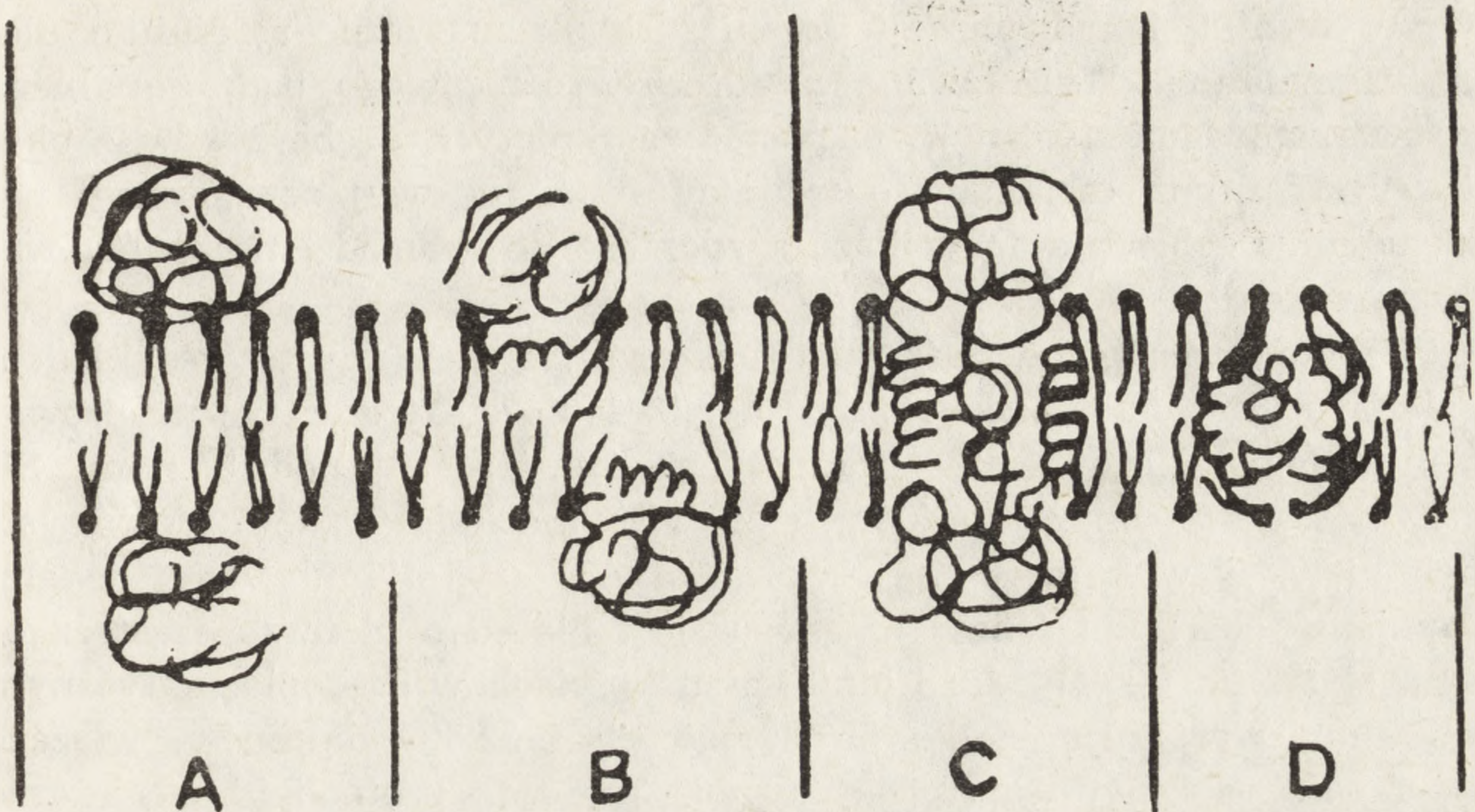
błony jako rodzaj mozaiki. Zarówno ten model, jak i inne modele (Vandercooi i Greena [56, 57], Capaldiiego [5]) pozwalają na rozróżnienie dwóch rodzajów białek błonowych w zależności od ich lokalizacji w błonie w stosunku do warstwy fosfolipidowej, tzw. białek wewnętrznych lub integralnych („intrinsic” lub „integral”) i białek powierzchniowych, inaczej zewnętrznych („extrinsic” lub „peripheral”). Białka wewnętrzne pływają jak góry lodowe w morzu fosfolipidów (rys. 1).



Rys. 1. Mozaikowy model budowy błon biologicznych wg Singera i Nicolsona [51]

Badania biochemiczne i biofizyczne wskazują, że zasadniczymi wiązaniami, które utrzymują strukturę błony biologicznej są wiązania hydrofobowe między lipidami i białkami wewnętrznymi błon. Białka te mogą być uwalniane z błon pod wpływem czynników przerywających wiązania hydrofobowe. Zahler [62] w przedstawionej ostatnio klasyfikacji białek błonowych rozgranicza dwie grupy białek wewnętrznych (patrz rys. 2). Jedne z nich posiadają hydrofobowy trzon cząsteczki, przechodzący przez podwójną warstwę fosfolipidów oraz dwa hydrofilowe końce, wystające zarówno ponad zewnętrzną, jak i wewnętrzną powierzchnię błony (rys. 2C). Pozostałe białka integralne odznaczają się tym, że cała ich powierzchnia ma charakter hydrofobowy (rys. 2D). W błonie są one otoczone ze wszystkich stron przez fosfolipidy. Te ostatnie białka posiadają właściwości proteolipidów i mogą być uwalniane z błon za





Rys. 2. Sposoby lokalizacji białek w błonie w stosunku do podwójnej warstwy lipidów wg Zahlera [62]

pomocą rozpuszczalników ekstrahujących lipidy. Proteolipidy zostały wykryte w 1951 r. przez Folcha i Leesa [11] w tkance mózgowej i dopiero później okazało się, że występują one jako stały składnik błon biologicznych różnych tkanek [25, 29, 63]. Osobną grupę białek błonowych stanowią białka powierzchniowe (rys. 2A). Są one najczęściej luźno związane z błoną, a ich usunięcie nie prowadzi do zniszczenia struktury błony. Niektóre z tych białek mają charakter zasadowy, np. cytochrom c [18], i wiążą się z fosfolipidami błonowymi poprzez wiązania elektrostatyczne [43, 62], jednakże większość z nich posiada charakter kwaśny. W tym przypadku grupy karboksylowe w ich cząsteczce są najczęściej związane z grupami fosforanowymi fosfolipidów przez dwuwartościowe kationy [43]. Niektóre białka powierzchniowe są połączone z błoną poprzez inne białka, do grupy takich białek należy ATPaza z błon *Streptococcus faecalis* [1].

Pośrednią formę między białkami powierzchniowymi a integralnymi stanowią białka przedstawione na rys. 2B. Przy wiązaniu ich zaangażowane są zarówno wiązania hydrofobowe, jak i elektrostatyczne.

Jednym z intensywnie badanych systemów błon biologicznych są błony sarkoplazmatycznego retikulum (SR).

Sarkoplazmatyczne retikulum stanowi wyspecjalizowaną odmianę błon śródplazmatycznych w komórce mięśniowej. Odgrywa ono kluczową rolę w regulacji poziomu jonów wapnia podczas cyklu skurczowo-rozkurczowego mięśnia. Budowa morfologiczna oraz funkcja błon sarkoplazmatycznego retikulum została ostatnio dokładnie omówiona w przeglądowym artykule w „Postęпах Biochemii” [48].



W wyniku homogenizacji mięśni sarkoplazmatyczne retikulum ulega fragmentacji. Wyizolowane na drodze różnicowego bądź zonalnego wirowania fragmenty SR mają postać zamkniętych pęcherzyków z charakterystycznymi cząstkami o średnicy 40 Å na swej zewnętrznej powierzchni. Pęcherzyki te wykazują zdolność do gromadzenia jonów wapnia na koszt ATP.

Sarkoplazmatyczne retikulum odznacza się dużo prostszym składem białkowym niż inne błony biologiczne. Badania elektroforetyczne prowadzone równoległe w kilku pracowniach [14, 19, 33] nad błonami SR wskazują, że głównym białkiem, stanowiącym około 60 do 70% wszystkich białek i wykazującym właściwości ATPazy stymulowanej jonami wapnia w obecności jonów magnezu, jest białko o ciężarze cząsteczkowym około 100 000. W dużo mniejszym ilościach w sarkoplazmatycznym retikulum występują białka 55 000, 45 000 i 32 000 daltonów, wiążące najprawdopodobniej wapń [24, 25, 26, 38] oraz proteolipid o ciężarze cząsteczkowym 10 000 – 14 000 [25, 47].

Ze względu na prosty skład, błony sarkoplazmatycznego retikulum stały się często używanym modelem do badania molekularnej organizacji błon biologicznych przy zastosowaniu różnorodnych metod solubilizacji i frakcjonowania, a także rekonstrukcji.

#### SOLUBILIZACJA I FRAKCJONOWANIE BIAŁEK BŁONOWYCH

Frakcjonowanie, i dalsza charakterystyka białek wymaga ich uprzedniej solubilizacji [28]. Jako kryteria kompletnej solubilizacji Razin [43] podaje następujące warunki:

- 1) W wyniku wirowania w ciągu 1 godz. przy  $100\ 000 \times g$  nie powstaje osad,
- 2) Zsolubilizowany materiał nie wypływa wraz z pustą objętością z kolumny Sepharozy 4B nasyconej detergentem w takim stężeniu w jakim użyto go do solubilizacji błony,
- 3) Zsolubilizowany materiał nie zawiera żadnych struktur błonowych widocznych w mikroskopie elektronowym.

Stosowane metody solubilizacji błon biologicznych można podzielić na:

1. metody mechaniczne,
2. metody mające na celu przerwanie wiązań elektrostatycznych,
3. metody pozwalające na zniszczenie wiązań hydrofobowych.

Niektóre błony biologiczne udaje się solubilizować za pomocą ultradźwięków [3, 45]. Dzięki tej metodzie można otrzymać przezroczyste roztwory dające w wirówce analitycznej jeden symetryczny szczyt. Nie-



mniej jednak materiał uzyskany w wyniku działania ultradźwięków zawiera często fragmenty błon o wyraźnej budowie trójwarstwowej [44, 60].

Białka związane z błoną elektrostatycznie lub przez jony dwuwartościowych metali mogą być łatwo uwalniane za pomocą metod opartych na zmianie siły jonowej i pH środowiska czy też przy użyciu roztworów chelatujących kationy metali dwuwartościowych [43]. Tak na przykład dializa wyizolowanych błon erytrocytów wobec wody dejonizowanej prowadzi do solubilizacji pewnej ilości białek [4, 12]. Ilość białka uwalnianego z błon erytrocytów wzrasta, jeżeli do ekstrakcji zastosuje się rozcieńczone roztwory EDTA [55].

Potraktowanie błon sarkoplazmatycznego retikulum roztworem EDTA w alkalicznym pH powoduje uwolnienie z błon około 15 do 20% całkowitej ilości białka. W osadzie pozostaje głównie białko o ciężarze cząsteczkowym 100 000, do ekstraktu zaś przechodzą praktycznie wszystkie białka o niższych ciężarach cząsteczkowych [47]. Uwolnienie ich powoduje zwiększenie przepuszczalności błony. Pęcherzyki stają się jakby „cieknące”, w związku z czym wapń, który był transportowany do środka, wypływa na zewnątrz, a jego obecność w środowisku powoduje aktywację  $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ -ATPazy [8, 32]. Mechanizm działania roztworów o niskiej sile jonowej polega najprawdopodobniej na zwiększeniu odpychania elektrostatycznego, natomiast EDTA powoduje zniszczenie mostków utworzonych przez dwuwartościowe kationy [28], co w sumie prowadzi do solubilizacji białek luźno związanych z błoną.

Hatefi i Hanstein [13] wykazali, że cały szereg błon biologicznych, np. „cienie” erytrocytów, błony mikrosomów wątrobowych, błony bakteryjne i mitochondrialne ulegają częściowej solubilizacji pod wpływem związków chaotropowych takich jak mocznik, chlorowodorek guanidyny, NaSCN i  $NaClO_4$ . Ilość uwalnianego białka waha się w tym przypadku od 6,5% do 42,0%, w zależności od rodzaju błony i użytego roztworu.

Inny związek chaotropowy — NaJ — solubilizuje z kolei około 60% białek błon SR z mięśni szkieletowych królika [46].

Jednym ze sposobów prowadzących do zniszczenia struktury błon jest zastosowanie różnego rodzaju rozpuszczalników organicznych. Od dawna już używa się mieszaniny chloroformu i metanolu do ekstrakcji lipidów błonowych. Pośród białek błonowych jedynie proteolipidy nie ulegają w tych warunkach denaturacji i przechodzą wraz z lipidami do fazy organicznej [11, 62], skąd mogą być izolowane. Dotychczas udało się z powodzeniem izolować proteolipidy z wielu narządów, między innymi z mięśnia sercowego i szkieletowego, z wątroby, nerek i macicy.

W 1966 r. Maddy [27] zastosował do ekstrakcji błon erytrocytów inny rozpuszczalnik organiczny, a mianowicie alkohol n-butyłowy. W wyniku działania mieszaniny n-butanolu z wodą następowała prawie całko-



wita dysocjacja lipidów i białek. Lipidy przechodziły do fazy organicznej, natomiast pozbawione lipidów białka stawały się rozpuszczalne w wodzie. Solubilizacji ulegało w tych warunkach 90 do 95% ogólnej ilości białek błon erytrocytów.

Podobne wyniki uzyskali następnie Zwaal i van Deenen [64]. Dotyczyły one błon erytrocytów różnych gatunków ssaków, jak człowiek, szczur, królik, osioł i świnia. We wszystkich wymienionych przypadkach pod wpływem n-butanolu solubilizowało się około 90 do 95% lipidów i 85 do 90% białek.

Niektórzy autorzy wykorzystali tę metodę do badania innych rodzajów błon biologicznych.

Okazało się, że potraktowanie błon SR wodną mieszaniną n-butanolu prowadzi po odwirowaniu do rozfrakcjonowania białek błonowych [47]. Wszystkie białka o ciężarach cząsteczkowych mniejszych od 100 000 ulegają rozpuszczeniu i przechodzą do fazy wodnej. Białko gromadzące się w postaci „kożuszka” na granicy fazy wodnej z fazą organiczną ma ciężar cząsteczkowy 100 000 i odpowiada ATPazie stymulowanej jonami wapnia i magnezu. Pod wpływem n-butanolu ulega ono nieodwracalnej denaturacji. Praktycznie wszystkie lipidy błonowe oddysocjują od białek na skutek działania n-butanolu i przechodzą do fazy organicznej. W fazie tej znajduje się również proteolipid, który można wyizolować działając na powstały ekstrakt lipidowy odpowiednią ilością eteru etylowego [47]. Białko to zostało również wyizolowane przez MacLennana i wsp. [25] z ekstraktu chloroformowo-metanolowego.

Larraga i wsp. [17] zastosowali ostatnio alkohol n-butyłowy do frakcjonowania białek błon bakteryjnych. Autorzy ci wykorzystali tę metodę do wyizolowania białek zewnętrznych tych błon. Białka te ulegały rozpuszczeniu po oddzieleniu lipidów i przechodziły do fazy wodnej.

Jednym z najbardziej skutecznych czynników solubilizujących błony okazał się 2-chloroetanol. W 1970 r. Zahler i Weibel [61] zastosowali 90% 2-chloroetanol w pH 2, uzyskując w tych warunkach całkowitą solubilizację białek i lipidów błon erytrocytów. Podobne wyniki otrzymała Sarzała i wsp. [46] używając 2-chloroetanolu do solubilizacji błon sarkoplazmatycznego retikulum. Związek ten zastosowany w identycznych warunkach jak w przypadku błon erytrocytów powodował kompletną solubilizację błon pęcherzyków SR.

Innym sposobem solubilizacji błon jest zastosowanie 33% wodnego roztworu pirydyny. Okazało się, że pirydyna solubilizuje około 50% białek z błon plazmatycznych komórek wątroby [52] i około 40% białek z błon erytrocytów [2]. W przypadku obydwóch rodzajów błon większość lipidów pozostaje we frakcji nierozpuszczalnej.

Na podstawie podanych przykładów widać, że rozpuszczalniki orga-



niczne są na ogół skutecznymi czynnikami solubilizującymi. Zasadnicza ich wada polega na tym, że często powodują denaturację białek, a więc nieodwracalnie niszczą ich aktywność biologiczną. Uniemożliwia to badanie właściwości funkcjonalnych zsolubilizowanych białek, stąd też tego rodzaju metody nie nadają się do wszystkich celów eksperymentalnych.

Odmiennym rodzajem frakcjonowania błon jest traktowanie ich roztworem dwujodosalicylanu litu [30]. Metoda ta wydaje się szczególnie korzystna z punktu widzenia izolowania glikoproteidów z „cieni” erytrocytów.

Coraz częściej błony biologiczne solubilizuje się przy użyciu detergentów. Wybór detergentu powinien zależeć od celu pracy. Detergenty niejonowe, np. Triton X-100 lub Lubrol, są z reguły mniej drastyczne w swym działaniu niż detergenty jonowe. Na ogół nie niszczą one aktywności enzymatycznej białek, dlatego niektórzy badacze wykorzystują je do izolowania enzymów błonowych [10, 40]. Za to ich efekt solubilizujący jest słabszy niż efekt detergentów jonowych [36, 37]. Wadą niejonowych detergentów jest ponadto fakt, że trudno je usunąć z układu [37].

Jednym z najłagodniejszych i najwygodniejszych w użyciu detergentów jonowych jest dezoksycholan sodu. Detergent ten solubilizując błony tworzy głównie micelle z lipidami, natomiast z białkami wiąże się nieznacznie. Stąd też jego wpływ denaturujący na białka jest niewielki w porównaniu z innymi jonowymi detergentami [36]. Zaobserwowano, że w utworzonych micellach może przypadać aż 13 cząsteczek dezoksycholenu na jedną cząsteczkę fosfolipidu [41]. Zaletą dezoksycholenu jest również fakt, że można go stosunkowo łatwo usunąć z układu. Wiele błon ulega pod wpływem dezoksycholenu solubilizacji w 85 do 90% [36, 41].

Efekt solubilizujący siarczanu dodecyłu jest jednak jeszcze silniejszy. Na ogół powoduje on prawie całkowitą solubilizację wszystkich rodzajów błon biologicznych, ale przy jednoczesnym działaniu denaturującym. Stwierdzono, że siarczan dodecyłu wiąże się w znacznych ilościach do białek (ponad 2 g na g białka) [43], nadając im ładunek ujemny i niwelując dzięki temu ładunek własny białka. Właściwość ta została wykorzystana przez Shapiro [49], który zastosował ten detergent do rozdzielania białek na drodze elektroforezy w żelu poliakrylamidowym. Jeżeli rodzima cząsteczka białkowa składa się z podjednostek, to w tych warunkach następuje jednocześnie dysocjacja do form monomerycznych.

Kompleksy białek z siarczanem dodecyłu poruszają się w polu elektrycznym w żelu poliakrylamidowym zgodnie z wielkością cząsteczek, bez względu na indywidualny ładunek białka. Na podstawie analizy białek o znanych ciężarach cząsteczkowych Weber i Osborn [59] wyprowadzili liniową zależność między logarytmem ciężaru cząsteczkowego białka a jego ruchliwością w żelu poliakrylamidowym w obecności siarczanu



dodecyłu, co posłużyło do opracowania nowej, bardzo prostej i wygodnej metody oznaczania ciężarów cząsteczkowych.

Zarówno jonowe, jak i niejonowe detergenty są od kilku lat stosowane do solubilizacji błon sarkoplazmatycznego retikulum, umożliwiając dalsze frakcjonowanie i charakterystykę białek tych błon. Dezoksyholan sodu w niskim stężeniu (0,3 mg na mg białka) powoduje częściową solubilizację błon sarkoplazmatycznego retikulum i uwolnienie większości białek, poza białkiem 100 000 daltonów [47]. Przy wyższym stężeniu dezoksyholanu (1 mg na mg białka) solubilizacji ulega ponad 80% ogólnej ilości białek w tym także białko 100 000 daltonów. Do wyizolowania tego białka, posiadającego właściwości ATPazy, z frakcji zsolubilizowanej przez dezoksyholan MacLennan i wsp. [22, 23] zastosowali wysalanie octanem amonu.

Oprócz ATPazy MacLennan i Wong [24] wyizolowali z ekstraktu uzyskanego z błon SR za pomocą dezoksyholanu kwaśne białko o ciężarze cząsteczkowym 45 000, które ze względu na wysokie powinowactwo do wapnia nazwali „calsequestrin”. Biorąc pod uwagę właściwości jakimi odznaczało się to białko, MacLennan i Wong sugerowali, że być może wiąże ono wapń nagromadzony wewnątrz sarkoplazmatycznego retikulum. Późniejsze prace tych samych autorów [38] pozwoliły na wyizolowanie z ekstraktu, uzyskanego w wyniku solubilizacji błon SR dezoksyholanem, innych białek o charakterze kwaśnym, o ciężarze cząsteczkowym 55 000 i 32 000, które być może również biorą udział w wiązaniu wapnia przez te błony.

Szereg autorów [21, 47] zastosowało do badań nad składem białkowym błon SR niejonowy detergent — Triton X-100. Detergent ten solubilizuje około 80% białek pęcherzyków sarkoplazmatycznego retikulum [21, 47]. Błównym białkiem występującym w ekstrakcie jest białko 100 000 daltonów. W ekstrakcie tym stwierdzono aktywność ATPazy stymulowanej jonami wapnia, natomiast niezsolubilizowany osad wykazywał aktywność  $Mg^{2+}$ -ATPazy [21]. Frakcja rozpuszczalna w Tritonie X-100 zawiera oprócz białka 100 000 daltonów również jedno z wymienionych powyżej białek kwaśnych. Badania MacLennana i wsp. [26] wskazują, że białko to odpowiada najprawdopodobniej wyizolowanemu przez tych autorów białku „calsequestrin”. Stanowi ono około 15% wszystkich białek SR. Ze względu na wysokie powinowactwo do wapnia białko to ulega łatwo wytrąceniu w obecności 4 mM  $CaCl_2$ .

Ostatnio Louis i wsp. [20] użyli do solubilizacji błon sarkoplazmatycznego retikulum inny niejonowy detergent — Lubrol PX. Okazało się, że jego działanie solubilizujące jest tak samo skuteczne jak Tritonu X-100 i dezoksyholanu. Pod wpływem Lubrolu błona ulegała całkowitej destrukcji, a do roztworu przechodziło około 90% wszystkich białek SR.



Badania nad różnymi sposobami solubilizacji błon pozwalają obok innych technik, jak używanie znaczników powierzchniowych nie penetrujących w głąb błon, na ustalenie lokalizacji białek w błonie. W ten sposób w przypadku białek SR stwierdzono, że białka o ciężarach cząsteczkowych niższych od ATPazy są na pewno białkami stosunkowo luźno związanymi z błoną. Możliwość łatwego wypłukania ich za pomocą roztworu EDTA oraz inne kryteria sugerują, że w ich wiązaniu z błoną biorą udział jony dwuwartościowych metali. Te białka wydają się należeć do grupy białek zewnętrznych. Nie wiadomo jednak czy są one związane z wewnętrzną, czy z zewnętrzną powierzchnią błony pęcherzyków SR. Jedynie ATPaza oraz białko o ciężarze cząsteczkowym około 10 000–14 000, mające charakter proteolipidu [25, 47], są białkami hydrofobowymi związanymi silnie z lipidami błonowymi, tworzącymi wraz z nimi szkielet błony i należącymi do białek wewnętrznych. W przeciwieństwie do innych białek ATPaza solubilizuje się jedynie pod wpływem bardzo drastycznych czynników, takich np. jak detergenty. W tych warunkach następuje całkowite zniszczenie struktury błony, a lipidy i hydrofobowe białka ulegają solubilizacji.

Do poglądów na taką lokalizację białek SR przyczyniły się również wyniki trawienia pęcherzyków SR trypsyną [20, 53]. Okazuje się, że białka 55 000 i 45 000 daltonów są odporne na działanie trypsyny w warunkach, gdy ATPaza ulega całkowitej degradacji, natomiast po zniszczeniu struktury błony za pomocą detergentu (Lubrolu PX) stają się bardzo podatne na działanie enzymów proteolitycznych. Podobnie trawienie trypsyną tych białek po ich wyizolowaniu z błony prowadzi do łatwego rozpadu proteolitycznego.

Wyniki te świadczą, że białka 55 000 i 45 000 daltonów znajdują się na wewnętrznej powierzchni błon SR. Pogląd powyższy wydaje się jednak pozostawać w sprzeczności z wnioskami Duggana i Martonosiego [8], Sarzały i wsp. [47], Martonosiego [32] oraz Thorley-Lawsona i Greena [54], którzy bądź na podstawie ekstrakcji pęcherzyków SR za pomocą roztworu EDTA, bądź na podstawie znakowania ich  $^{131}\text{J}$  za pomocą lakto-peroksydazy twierdzą, że białka te, a szczególnie białko 45 000, związane są z zewnętrzną powierzchnią błony SR.

Zastosowanie różnych metod solubilizacji i frakcjonowania pozwoliło wykazać, że poszczególne rodzaje błon występujące w komórkach tej samej tkanki mogą się znacznie różnić pod względem właściwości. Stwierdzono na przykład, że sarkolemma w przeciwieństwie do sarkoplazmatycznego retikulum jest odporna nawet na działanie tak drastycznych rozpuszczalników jak n-butanol, a jonowe i niejonowe detergenty w bardzo wysokim stężeniu (10 mg na mg białka) praktycznie nie solubilizują białek tej błony. Wyjątek stanowi Lubrol stosowany przez wielu autorów



do izolowania preparatów  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPazy z różnych tkanek. Detergent ten powoduje uwolnienie z błon sarkolemy białka o ciężarze cząsteczkowym 110 000, które najprawdopodobniej również i w tym przypadku odznacza się właściwościami ATPazy transportującej  $\text{Na}^+$  i  $\text{K}^+$  [7].

#### REKONSTYTUCJA BŁON

Jedną z dróg prowadzących do poznania organizacji błon na poziomie molekularnym jest ich rekonstytucja. W literaturze używa się zastępczo kilku terminów, jak rekonstytucja, reformacja, reagregacja i rekombinacja, opisujących powstanie się błon z solubilizowanych składników, tj. lipidów i białek. Razin [43] definiuje rekonstytucję jako odtworzenie struktury i funkcji błony po jej uprzedniej solubilizacji. Rekombinacją natomiast nazywa ten rodzaj rekonstytucji, gdy błona powstaje z lipidów i białek oddzielonych od siebie po solubilizacji, a następnie połączonych i wspólnie dializowanych. Termin „reformacja” zastrzega Razin [43] wyłącznie dla takich przypadków, kiedy nowo utworzona błona ma strukturę charakterystyczną dla błony wyjściowej, ale nie posiada odpowiednich właściwości funkcjonalnych. Określenia „reagregacja” autor [43] używa wtedy, gdy następuje połączenie zsolubilizowanych składników błony w nierozpuszczalne agregaty, które ani pod względem struktury, ani funkcji nie spełniają warunków, jakie powinna spełniać błona. Typowym przykładem rekombinacji była procedura zastosowana przez Zahlera i Weibela [61] oraz Sarzałę i wsp. [46]. Po całkowitym zsolubilizowaniu „cieni” erytrocytów lub błon SR przy użyciu 2-chloroetanolu, oddzielano lipidy od białek na kolumnie Sephadex'u LH-20, a następnie łączono oba roztwory i dializowano wobec odpowiedniej mieszaniny, uzyskując w efekcie odtworzenie zarówno błon erytrocytów, jak i w drugim przypadku pęcherzyków sarkoplazmatycznego retikulum.

Do rekonstytucji wykorzystuje się ekstrakty uzyskane w wyniku solubilizacji błon detergentami. Najwcześniejsze prace, w których zastosowano tę metodę, pochodzą z roku 1956 [50, 58]. W każdym przypadku odtwarzania błon należy detergent usunąć ze środowiska. Jako najprostszy i najwygodniejszy sposób pozbycia się detergentu stosuje się rozcieńczenie [9, 31], dializę [34, 35] lub filtrację na żelach Sephadex'u [31]. Wykazano, że po to aby nastąpiła rekonstytucja nie jest konieczne usunięcie detergentu w 100%. Proces ten zachodzi jeżeli ilość pozostałego detergentu nie przekracza 100  $\mu\text{g}/\text{mg}$  białka [15]. Ernster i wsp. [9] stwierdzili, że rozcieńczanie roztworu błon mikrosomalnych w 0,25% dezoksycholanie kilkoma objętościami wody, powodowało utworzenie się



osadu, który jak się okazało, zawierał pęcherzyki powstałe z uformowanych na nowo błon.

Zaobserwowano [43], że w wielu przypadkach aby mogła powstać w pełni zrekonstruowana błona, niezbędna jest obecność w środowisku dializacyjnym dwuwartościowych kationów. Wiąże się to prawdopodobnie z faktem, że jony tych metali tworzą, jak wspomniano wcześniej, mostki, poprzez które łączą się z błoną białka powierzchniowe. Badania składu zrekonstruowanych błon *Mycoplasma laidlawii* [16, 42] wskazują, że obecność jonów magnezu w środowisku dializacyjnym ma wpływ na wartość stosunku lipidów do białek w nowo utworzonych błonach. Zaobserwowano, że im większe stężenie jonów magnezu, tym więcej białka wiąże się do zrekonstruowanej błony i dopiero przy stężeniu  $Mg^{2+}$  równym 20 mM, stosunek lipidy : białko przyjmuje wartość charakterystyczną dla błon natywnych.

Sarkoplazmatyczne retikulum stanowi ze względu na prosty skład białkowy doskonały model do badania rekonstrukcji błon.

Pierwsze próby rekonstrukcji pęcherzyków SR podjęto pod koniec lat sześćdziesiątych równoległe z zastosowaniem detergentów do ich solubilizacji. Martonosi [31] stwierdził, że usunięcie dezoksyholanu z ekstraktu poprzez rozcieńczenie wodą lub przepuszczenie zsolubilizowanej frakcji przez kolumnę Sephadex'u G-25 prowadzi do reagregacji zsolubilizowanego materiału. Również MacLennan i wsp. [23] zauważyli, że po usunięciu dezoksyholanu, izolowane białko 100 000 daltonów, a więc ATPaza, formowało pęcherzyki.

Badania Sarzały i wsp. (dane przygotowywane do druku) nad rekonstrukcją błon SR wskazują, że obraz mikroskopowy zrekonstruowanych pęcherzyków po kontrastowaniu negatywowym jest identyczny z obrazem wyjściowych pęcherzyków SR. Szkielet zrekonstruowanej błony tworzy ATPaza wraz z fosfolipidami, natomiast kwaśne białka o ciężarze cząsteczkowym 45 000 i 55 000 tylko w niewielkim stopniu wiążą się do morfologicznie zrekonstruowanej (a właściwie zreformowanej wg terminologii Razina) błony. Podobne wyniki otrzymali niedawno Meissner i Fleischer [35], którzy w zrekonstruowanych strukturalnie pęcherzykach SR stwierdzili również obecność tylko niewielkich ilości białek o niskim ciężarze cząsteczkowym. Niestety, do tej pory nie udało się otrzymać kompletnej rekonstrukcji funkcjonalnej pęcherzyków SR. Najlepsze pod tym względem okazały się warunki opracowane przez Meissnera i Fleischera [35]. Zdolność do gromadzenia  $Ca^{2+}$  w pęcherzykach SR mierzona w obecności szczawianu oraz zdolność pobierania  $Ca^{2+}$ , oznaczona w nieobecności szczawianu, były odtworzone w przypadku tak zrekonstruowanych błon odpowiednio tylko w 50% i 25%. Wyniki te wydają się wskazywać, że częściowa rekonstrukcja funkcjonalna pęche-



rzyków była spowodowana niewystarczającą ilością w nich białek wiążących wapń.

Szeregu interesujących danych na temat molekularnej budowy natywnych i zrekonstruowanych błon SR dostarczyły badania przy użyciu techniki „freeze-fracture” [14, 39, 53]. Po rozłupaniu natywnej błony SR widać cząstki o średnicy 90 Å, które utworzone są przez cząsteczki ATPazy. Przeważająca ilość tych cząstek występuje na wklęsłej powierzchni rozłupanej błony, podczas gdy na wypukłej powierzchni znajdują się tylko nieliczne cząstki. Inesi [14] sugeruje, że taki obraz może być spowodowany występowaniem silniejszych interakcji między ATPazą i zewnętrzną połową błony w porównaniu z połową wewnętrzną. W zrekonstruowanych pecherzykach SR można przy użyciu techniki „freeze-fracture” również wykazać obecność cząstek o średnicy 90 Å.

Ostatnio jednak Packer i wsp. [39] stwierdzili, że w czasie rekonstrukcji przeprowadzonej w warunkach Fleischera i Meissnera ulega zanikowi charakterystyczna asymetria błony. Obraz obu powierzchni jest wtedy podobny, gdyż cząstki o średnicy 90 Å są obecne mniej więcej w jednakowej ilości zarówno na wklęsłej, jak i na wypukłej powierzchni. Świadczyć to może, że w zrekonstruowanych błonach ATPaza jednako silnie wiąże się z zewnętrzną i wewnętrzną warstwą lipidów błonowych.

Omówione w niniejszym artykule wyniki świadczą, że w ostatnich latach dokonano znacznego postępu w badaniach nad błonami biologicznymi. Pierwsze próby uzyskania zrekonstruowanych błon z rozdzielonych składników również zostały uwieńczone powodzeniem. Stwierdzono jednak, że na przykład zrekonstruowane pecherzyki SR nie są identyczne z natywnymi. Świadczy to, że mimo znalezienia właściwego podejścia w badaniach, wiele pracy należy jeszcze włożyć w opracowanie szeregu szczegółów metodycznych, tak bardzo, jak się okazuje, istotnych do uzyskania pełnej funkcjonalnej i strukturalnej rekonstrukcji błon.

#### LITERATURA

- [1] BARON, C. and ABRAMS, A., Isolation of a bacterial membrane protein, nectin, essential for the attachment of adenosine triphosphatase, *J. Biol. Chem.*, **246**: 1542–1544, 1971.
- [2] BLUMENFELD, O. O., CALLOP, P. M., HOWE, C. and LEE, L., Erythrocyte membrane proteins. Their study using aqueous pyridine solutions, *Biochim. Biophys. Acta*, **211**: 109–123, 1970.
- [3] BUTLER, T. F., SMITH, G. L. and GRULA, E. A., Bacterial cell membranes I. Reaggregation of membrane subunits from *Micrococcus lysodeikticus*, *Can. J. Microbiol.*, **13**: 1471–1479, 1967.



- [4] CAPALDI, R. A., The structure of erythrocyte membranes, *Eur. J. Biochem.*, **29**: 74–79, 1972.
- [5] — A dynamic model of cell membranes, *Scien. Americ.*, **230**: 27–33, 1974.
- [6] DANIELLI, J. F. and DAVSON, H., A contribution to the theory of permeability of thin films, *J. Cell. Comp. Physiol.*, **5**: 495–508, 1935.
- [7] DRABIKOWSKI, W. and ZUBRZYCKA, E., Characterization of sarcolemma from rabbit skeletal muscle, [w] *Recent Advances in Studies in Cardiac Structure and Metabolism*, red. N. S. Dhalla, University Park Press — Baltimore, London, Tokyo, w druku.
- [8] DUGGAN, P. F., and MARTONOSI, A., Sarcoplasmic reticulum. IX. The permeability of sarcoplasmic reticulum membranes, *J. Gen. Physiol.*, **56**: 147–167, 1970.
- [9] ERNSTER, L., SIEKEVITZ, P. and PALADE, G. E., Enzyme structure relationships in the endoplasmic reticulum of rat liver. A morphological and biochemical study, *J. Cell Biol.*, **15**: 541–562, 1962.
- [10] FEDELESOVA, M., DZURBA, A. and ZIEGELHÖFFER, A., Partial purification of dog heart (Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>)-ATPase by Lubrol, *Acta Biol. Med. Germ.*, **33**: 169–180, 1974.
- [11] FOLCH, J. and LEES, M., Proteolipids a new type of tissues lipoproteins. Their isolation from brain, *J. Biol. Chem.*, **191**: 807–817, 1951.
- [12] HAMAGUCHI, H. and CLEVE, H., Properties of the water dissolved membrane proteins of human erythrocytes, *Biochim. Biophys. Acta*, **233**: 320–333, 1971.
- [13] HATEFI, Y. and HANSTAIN, W. G., Solubilization of particulate proteins and nonelectrolytes by chaotropic agents, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **62**: 1129–1136, 1969.
- [14] INESI, G. and SCALES, D., Tryptic cleavage of sarcoplasmic reticulum protein, *Biochemistry*, **13**: 3298–3306, 1974.
- [15] KAGAWA, Y. and RACKER, E., Partial resolution of the enzyme catalyzing oxidative phosphorylation. XXV. Reconstitution of vesicles catalyzing <sup>32</sup>P<sub>i</sub>-adenosine triphosphate exchange, *J. Biol. Chem.*, **246**: 5477–5487, 1971.
- [16] KAHANE, I. and RAZIN, S., Characterization of the *Mycoplasma* membrane proteins. I. Reaggregation of solubilized membrane proteins of *Acholeplasma laidlawii*, *Biochim. Biophys. Acta*, **249**: 159–168, 1971.
- [17] LARRAGA, V. and MUNOZ, E., Molecular organization in bacterial cell membranes. III. Components of a „soluble” fraction obtained by n-butanol extraction of *Streptomyces albus* membranes, *Biochim. Biophys. Acta*, **363**: 9–25, 1974.
- [18] LENAZ, G. and MACLENNAN, D. H., Extraction and estimation of cytochrome c from mitochondria and submitochondrial particles, [w] *Methods in Enzymology*, red S. P. Colowick, N. O. Kaplan, Academic Press — New York, **10**: 499–504, 1967.
- [19] LOUIS, C. F. and SHOOTER, E. M., The proteins of rabbit skeletal muscle sarcoplasmic reticulum, *Arch. Biochem. Biophys.*, **153**: 641–655, 1972.
- [20] LOUIS, C. F., BUONAFFINA, R. and BINKS, B., Effect of trypsin on the protein of skeletal muscle sarcoplasmic reticulum, *Arch. Biochem. Biophys.*, **161**: 83–92, 1974.
- [21] MACFERLAND, B. H., INESI, G., Solubilization of sarcoplasmic reticulum with Triton X-100, *Arch. Biochem. Biophys.*, **145**: 456–464, 1971.
- [22] MACLENNAN, D. H., Purification and properties of an adenosine triphosphatase from sarcoplasmic reticulum, *J. Biol. Chem.*, **245**: 4508–4518, 1970.
- [23] MACLENNAN, D. H., SEEMAN, P., ILES, G. H. and YIP, C. C., Membrane



- formation by the adenosine triphosphatase of sarcoplasmic reticulum, *J. Biol. Chem.*, **246**: 2702-2710, 1971.
- [24] MACLENNAN, D. H. and WONG, P. T. S., Isolation of a calcium-sequestering protein from sarcoplasmic reticulum, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **68**: 1231-1235, 1971.
- [25] MACLENNAN, H., YIP, C. C., ILES, G. H. and SEEMAN, P., Isolation of sarcoplasmic reticulum protein, [w] *Cold Spring Harb. Symp. quant. Biol.*, **37**: 469-477, 1973.
- [26] MACLENNAN, D. H., Isolation of a second form of calsequestrin, *J. Biol. Chem.*, **249**: 980-984, 1974.
- [27] MADDY, A. M., The properties of the plasma membrane of ox erythrocytes, *Biochim. Biophys. Acta*, **117**: 193-200, 1966.
- [28] — The isolation and purification of membrane proteins, *Sub. Cell Biochem.*, **1**: 293-304, 1972.
- [29] MARAKAMI, M., SEKINE, H. and FUNAHASHI, S., Proteolipid from beef heart muscle. Application of organic dialysis to preparation of proteolipid. *J. Biochem.*, **51**: 431-435, 1962.
- [30] MARCHESI, V. T. and ANDREWS, E. P., Glycoproteins: Isolation from cell membranes with lithium diiodosalicyte, *Science*, **174**: 1247-1248, 1971.
- [31] MARTONOSI, A., Sarcoplasmic reticulum. Solubilization of microsomal adenosine triphosphatase, *J. Biol. Chem.*, **243**: 71-81, 1968.
- [32] — Some recent observations on the structure and function of sarcoplasmic reticulum, [w] *Biomembranes, Lipids, Proteins and Receptors*, red. R. M. Burton, L. Packer, BI-Science Publications Division Webster Groves, Missouri 16.1-16.22, 1974.
- [33] MARTONOSI, A. and HALPIN, R. A., Sarcoplasmic reticulum. X. The protein composition of sarcoplasmic reticulum membranes, *Arch. Biochem. Biophys.*, **144**: 66-77, 1971.
- [34] MEISSNER, G., FLEISCHER, S.,  $Ca^{2+}$  uptake in reconstituted SR vesicles, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **52**: 913-920, 1973.
- [35] — Dissociation and reconstitution of functional sarcoplasmic reticulum vesicles, *J. Biol. Chem.*, **249**: 302-309, 1974.
- [36] NE'EMAN, Z., KAHANE, I. and RAZIN, S., Characterization of the mycoplasma membrane proteins. II. Solubilization and enzymic activities of *Acholeplasma laidlawii* membrane proteins. *Biochim. Biophys. Acta*, **249**: 169-176, 1971.
- [37] NE'EMAN, Z., KAHANE, I., KOVARTORSKY, J. and RAZIN, S., Characterization of the mycoplasma membrane proteins. III. Gel filtration and immunological characterization of *Acholeplasma laidlawii* membrane proteins, *Biochim. Biophys. Acta*, **266**: 255-268, 1972.
- [38] OSWALD, T. J. and MACLENNAN, D. H., Isolation of a high affinity calcium-binding protein from sarcoplasmic reticulum, *J. Biol. Chem.*, **249**: 974-979, 1974.
- [39] PACKER, L., MEHAROL, C. W., MEISSNER, G., ZAHLER, W. L. and FLEISCHER, S., The structural role of lipids in mitochondrial and sarcoplasmic reticulum membranes. Freeze-fracture electron microscopy studies, *Biochim. Biophys. Acta*, **363**: 159-181, 1974.
- [40] PALATINI, P., DABBENI-SALA, F. and BRUNI, A., Reactivation of a phospholipid-depleted sodium potassium-stimulated ATPase, *Biochem. Biophys. Acta*, **288**: 413-422, 1972.
- [41] PHILIPPOT, J., Study of human red blood cell membrane using sodium deoxy-



- cholate. I. Mechanism of the solubilization, *Biochim. Biophys. Acta*, **225**: 201–213, 1971.
- [42] RAZIN, S., NE'EMAN, Z. and OHAD, I., Selective reaggregation of solubilized Mycoplasma-membrane proteins and the kinetics of membrane reformation, *Biochim. Biophys. Acta*, **193**: 277–293, 1969.
- [43] RAZIN, S., Reconstitution of biological membranes, *Biochim. Biophys. Acta*, **265**: 241–296, 1972.
- [44] ROSENBERG, E. A. and MCINTOSH, J. R., Erythrocyte membranes: Effects of sonication, *Biochim. Biophys. Acta*, **163**: 285–289, 1968.
- [45] SALTON, M. R. J. and NETSCHEY, A., Physical chemistry of isolated bacterial membranes, *Biochim. Biophys. Acta*, **107**: 539–545, 1965.
- [46] SARZAŁA, M. G., ZUBRZYCKA, E., PILARSKA, M. and DRABIKOWSKI, W., Solubilization and reaggregation of sarcoplasmic reticulum membranes, [w] *Protides of the Biological Fluids*, red. H. Peeters, Pergamon Press — Oxford, New York, **21**: 109–113, 1973.
- [47] SARZAŁA, M. G., ZUBRZYCKA, E. and DRABIKOWSKI, W., Characterization of the constituents of sarcoplasmic reticulum membrane, [w] *Calcium Binding Proteins*, red. W. Drabikowski, H. Strzelecka-Gołaszewska, E. Carafoli, Elsevier Co and Polish Scientific Publishers, 315–346, 1974.
- [48] SARZAŁA, M. G., Struktura i funkcja błon sarkoplazmatycznego retikulum (mięśni szkieletowych), *Post. Biochem.*, **20**: 403–424, 1974.
- [49] SHAPIRO, A., Molecular weight estimation of polypeptide chains by electrophoresis in SDS-polyacrylamide gels, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **28**: 815–820, 1967.
- [50] SIEKEVITZ, P. and WATSON, M. L., Cytochemical studies of mitochondria. II. Enzymes associated with a mitochondrial membrane fraction, *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, **2**: 653–669, 1956.
- [51] SINGER, S. J. and NICOLSON, G. I., The fluid mosaic model of the structure of cell membranes, *Science*, **175**: 720–731, 1972.
- [52] SIMON, F. R., BLUMENFELD, O. O. and ARIAS, I. M., Two protein fractions obtained from hepatic plasma membranes. Studies on their composition and differential turnover, *Biochim. Biophys. Acta*, **219**: 349–360, 1970.
- [53] STEWART, P. S. and MACLENNAN, D. H., Surface particles of sarcoplasmic reticulum membranes. Structural features of the adenosine triphosphatase, *J. Biol. Chem.*, **249**: 985–993, 1974.
- [54] THORLEY-LAWSON, D. A. and GREEN, N. M., Studies on the location and orientation of proteins in the sarcoplasmic reticulum, *Eur. J. Biochem.*, **40**: 403–413, 1973.
- [55] TILLACK, T. W., MARCHESI, S. L., MARCHESI, V. T. and STEERS, L., A comparative study of spectrin: A protein isolated from red blood cell membranes, *Biochim. Biophys. Acta*, **200**: 125–131, 1970.
- [56] VANDERKOOI, G. and GREEN, D. E., New insights into biological membrane structure, *Bioscience*, **21**: 409–415, 1970.
- [57] — Biological membrane structure. I. The protein crystal model for membranes, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **66**: 615–621, 1970.
- [58] WATSON, M. L. and SIEKEVITZ, P., Cytochemical studies of mitochondria. I. The separation and identification of a membrane fraction from isolated mitochondria, *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, **2**: 639–652, 1956.
- [59] WEBER, K. and OSBORN, M., The reliability of molecular weight determi-



- nation by dodecyl sulphate — polyacrylamide gel electrophoresis, *J. Biol. Chem.*, **244**: 4406–4412, 1969.
- [60] YU, B. P. and MASORO, E. J., Isolation and characterization of the major protein component of sarcotubular membranes, *Biochemistry*, **9**: 2909–2917, 1970.
- [61] ZAHLER, P. and WEIBEL, E. R., Reconstitution of membranes by recombining proteins and lipids derived from erythrocyte stroma, *Biochim. Biophys. Acta*, **219**: 320–338, 1970.
- [62] ZAHLER, P., Protein-lipid interactions in red cell membranes, [w] *Biomembranes, Lipids, Proteins and Receptors*, red. R. M. Burton, L. Packer, BI-Science Publications Division Webster Groves, Missouri, 1.1–1.25, 1974.
- [63] ZILL, L. P. and HARMON, E. A., Chloroplast proteolipid, *Biochim. Biophys. Acta*, **53**: 579–581, 1961.
- [64] ZWAAL, R. F. A. and van DEENEN, L. L. M., Protein patterns of red cell membrane from different mammalian species, *Biochim. Biophys. Acta*, **163**: 44–49, 1968.

*Otrzymano: 8 kwietnia 1975.*

*Przyjęto: 18 kwietnia 1975.*

*Adres autora: ul. Pasteura 3, 02-093 Warszawa.*



## TEGOROCZNI LAUREACI NAGRODY NOBLA W DZIEDZINIE NAUK MEDYCZNYCH

Konrad RYDZYŃSKI i Barbara KACZMAREK

Zakład Histologii i Embriologii IBM WAM Łódź

Nagrody Nobla z dziedziny medycyny i fizjologii w tym roku przyznane zostały trzem badaczom związanym z Instytutem Rockefellera, których badania wpłynęły w zasadniczy sposób na obecny stan wiedzy o komórce. Można śmiało powiedzieć, że żadna z grup biologów nie zrobiła więcej niż oni, aby przyspieszyć postęp i poszerzyć wiedzę o czynności i organizacji wewnętrznej komórki.

Szczególne zasługi przypadają 75-letniemu dziś Albertowi Claude Belgowi z pochodzenia.



Albert Claude

Albert Claude urodził się w 1899 r. w Longlier w Luksemburgu. W wieku 14 lat porzuca szkołę i po roku przerwy pracuje, aż do wybuchu I wojny światowej, jako kreślarz w fabryce metalurgicznej. Potem wstępuje jako ochotnik do brytyjskiego korpusu ekspedycyjnego w Belgii. Za zasługi wojenne otrzymuje prawo wyboru dowolnego kierunku studiów. Decyduje się najpierw na technologię ale zapisuje się na studia medyczne, które kończy w 1928 r. W tym samym jeszcze roku wyjeżdża na staż do Alberta Fishera do Berlina, gdzie pracuje nad kulturami tkankowymi. W 1930 r. opuszcza Berlin i wiąże się na długie lata z Instytutem Rockefellera w Nowym Jorku.

Pod koniec lat trzydziestych pracuje w Laboratorium Patologii Jamesa B. Murphy'ego nad wyizolowaniem i scharakteryzowaniem wirusa



mięsa Rousa. Wyniki tych badań pozwoliły mu stwierdzić obecność innych niż wirusy cząsteczek o porównywalnych wielkościach i charakterze fosfolipido-rybonukleoproteinowym. Nie będąc zdecydowanym co do ich pochodzenia, nazwał je „małymi cząsteczkami” i postanowił zająć się ulepszeniem ówczesnych technik frakcjonowania homogenatów tkankowych, jako że dotychczas stosowane techniki nie zadowalały go. Jego wysiłki zostały uwieńczone, na początku lat czterdziestych, wprowadzeniem do badań wirowania różnicowego. Technika ta po zmodyfikowaniu jej w 1948 r. przez uczniów Claude’a — Hogebooma, Schneidera, Palade’a — do dziś pozostała podstawową techniką rozdziału na frakcje składników komórkowych. Wirowanie różnicowe umożliwiło Claude’owi uzyskanie nowych frakcji subkomórkowych. Jedną z nich były „mikrosomy” (tak nazwał w 1943 r. dawne „małe cząsteczki”). Również w 1948 roku zaczął interesować się mikroskopią elektronową. Dostrzegł jej olbrzymie możliwości, które w powiązaniu z badaniami biochemicznymi mogły zdecydowanie zaważyć na przyszłości badań nad składnikami komórek.

Ponieważ mikrosomów nie uważał wtedy za organelle komórkowe, a raczej za cząsteczki luźno zawieszane w cytoplazmie, zainteresował się mitochondriami. Izolował je z komórek limfosarcoma szczura. Były one znacznie zanieczyszczone innymi składnikami komórki, ale zarówno zastosowana metodyka, jak i uzyskane zdjęcia były na owe czasy rewelacją. Claude zdawał sobie jednak sprawę, że badanie frakcji subkomórkowych w sytuacji, gdy nie można uzyskać czytelnych zdjęć komórki jako całości, nie jest właściwą drogą. Ponieważ postępy w ultramikrotomii nie gwarantowały uzyskania dobrych rezultatów, postanowił zająć się wspólnie z Porterem i Fullamem badaniem fibroblastów w hodowli z embrionów kurzych, które hodował na szklanych płytkach pokrytych formwarem (rys. 1). Zastosowali wtedy po raz pierwszy utrwalanie w parach osmu. W obwodowych częściach fibroblastów znaleźli koronkową siateczkę „lace-like reticulum”, na której zawieszane były „cząsteczki pęcherzykowe” o wielkości 100–500 m $\mu$ . Nie kojarzyli jednak uzyskanych z wirowania cząsteczek z mikrosomami. Zachęcenii uzyskanymi wynikami, podjęli badania kultur komórkowych zakażonych wirusem mięsa Rousa. Opisali tam, po raz pierwszy, wewnątrzkomórkowe cząstki wirusa, jak również wcześniej opisane „lace-like-reticulum” (rys. 2).

Badanie komórek z hodowli miało jednak wiele ujemnych stron. Był to system *in vitro*, wyrwany z normalnych warunków życia komórek w żywym organizmie, który umożliwiał badanie tylko jej obwodowych części bez wglądu w część centralną. Była ona zbyt gruba, by uzyskać czytelne wyniki. Jedynym wyjściem odpowiadającym Claude’owi była dostatecznie doskonała ultramikrotomia. W 1948 r., wspólnie z inżynierem Blumem z Instytutu Rockefellera, konstruuje on prototyp ultra-





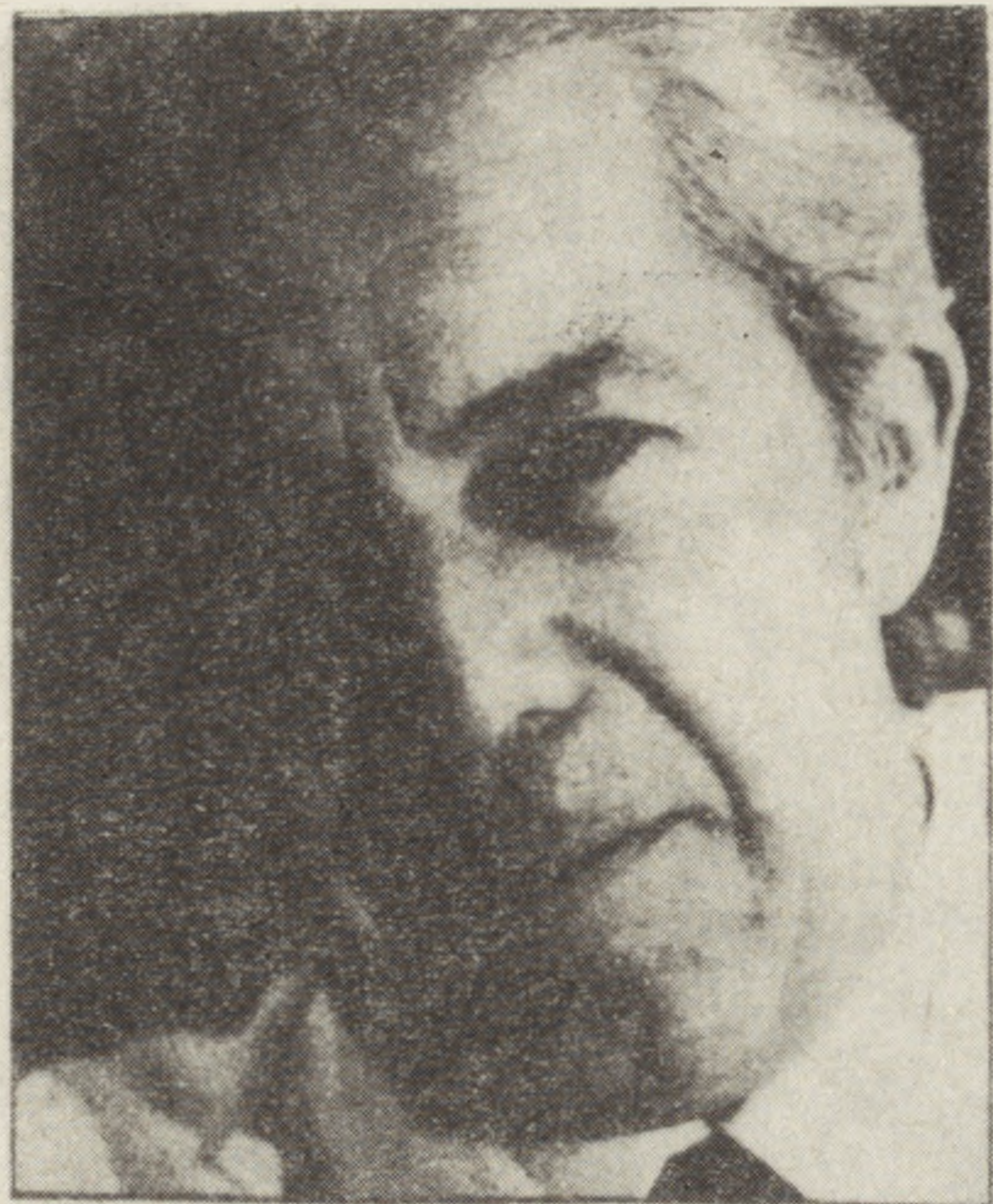
mikrotomu, który posiadał podstawowe cechy współczesnego urządzenia tego rodzaju.

W rok później Claude opuszcza Instytut Rockefellera i obejmuje stanowisko Dyrektora Instytutu Jules Bordet w Brukseli. Fakt ten nie pozostał bez wpływu na Duve'a, który w tym czasie kierował Katedrą Chemii Fizjologicznej na Uniwersytecie w Louvain.

Christian de Duve — drugi z tegorocznych laureatów nagrody Nobla — urodził się w 1917 r. w Thames-Dilton w Belgii. W 1941 r. uzyskał dyplom lekarza na Uniwersytecie w Louvain. W 1947 r. zostaje mianowany profesorem, a w 1951 r. szefem Instytutu Chemii Fizjologicznej w tymże Uniwersytecie. W 1946 r. odbył 18-miesięczny staż u Hugo-Thorella w Sztokholmie, a w 1947 r. 6-miesięczny staż u Carla Coriego w St. Louis. Od 1962 r. jest profesorem na Uniwersytecie Rockefellera.

W chwili przyjazdu Claude'a do Belgii grupa de Duve'a pracowała, w bardzo źle wyposażonym laboratorium, nad problemem działania insuliny na homogenaty tkanki wątrobowej. Homogenizacje przeprowadzono za pomocą maszynki do mięsa, nie oglądając się zbytnio na to, co dzieje się z komórkami. Bliskość osoby Claude'a spowodowała istotną zmianę w profilu badań grupy z Louvain (de Duve, H. Hers, J. Berthet). Zasto-





Christian de Duve

sowanie ultrawirówki z rotorem wychyleniowym doprowadziło w 1955 r. de Duve'a i współpracowników do wyodrębnienia frakcji „lekkich mitochondriów” lub „ciężkich mikrosomów” ze zhomogenizowanych komórek wątroby szczura. Frakcja ta była bogata w enzymy hydrolytyczne o kwaśnym optimum działania: kwaśną fosfatazę, RNA-zę, DNA-zę i beta-glukuronidazę, nie zawierała zaś charakterystycznych dla mitochondriów — oksydazy cytochromowej i glukozy-6-fosfatazy cechującej mikrosomy. Ciekawym zjawiskiem był stan utajonego działania tych enzymów w obecności substratów, gdy frakcja ta zawieszona była w roztworze

izotonicznym. Zastosowanie czynników uszkodzających błony komórek, tzn. środowisko hypotoniczne, zamrażanie i rozmrażanie, ostra homogenizacja itd., prowadziły do nagłego przyrostu aktywności. De Duve wprowadził w związku z tym pojęcie „enzymów latentnych” i postulował istnienie nowej grupy organelli komórkowych otoczonych błoną, które nazywał lizosomami. Dalsze badania enzymatyczne tej frakcji wykazały, że nie wszystkie enzymy zawarte w niej posiadają wyżej wymienione własności. Nie wykazywały ich enzymy biorące udział w przemianach  $H_2O_2$ , tj. urykaza, oksydaza D-aminokwasów i L-aminokwasów oraz hydroksykwasów. Spostrzeżenie to doprowadziło do kontynuacji badań w tym kierunku i uwieńczone zostało wyizolowaniem i opisem submikroskopowym peroksysomów w 1966 r.

Opisane odkrycia były w dużym stopniu wynikiem wprowadzonej przez de Duve'a dokładnej ilościowej analizy otrzymanych frakcji i ustalenia pojęcia „balance sheets” dla markerów enzymatycznych badanych frakcji. Zastosował on też wiele nowych technik, jak: wirowanie zonalne, wirowanie w fikolu, glikolu i gradiencie sacharozy.

Jemu to w ogromnej mierze zawdzięczamy nasz stan wiedzy o enzymach komórkowych.

Trzecim z laureatów jest uczeń Claude'a, Georg Emil Palade, Rumun z pochodzenia.

Georg Emil Palade urodził się w Jassach w Rumunii w roku 1912. Studia medyczne kończy na Uniwersytecie Bukareszteńskim w 1940 r. W okresie II wojny światowej służy w armii rumuńskiej, pracując jednocześnie w Instytucie Anatomii w Bukareszcie.



George Palade



Georg Palade

W 1946 r. odbywa dwuletni staż w Instytucie Rockefellera w Nowym Jorku, po którego ukończeniu decyduje się na pozostanie w Stanach Zjednoczonych na stałe.

Pierwszym jego większym osiągnięciem było wyizolowanie mitochondriów z wątroby szczura ulepszoną przez Palade'a, Hogebooma, i Schneidera w 1948 r. techniką wirowania różnicowego. Wkrótce po opublikowaniu tej pracy zajął się Palade ulepszeniem preparatyki do mikroskopu elektronowego. Jemu to zawdzięczamy nowe techniki utrwalania tkanek i frakcji subkomórkowych, które to techniki są do dziś stosowane. Wprowadzenie ich pozwoliło Palade'owi zaproponować w 1951 r. model mitochondriów z podwójną błoną. W połowie lat pięćdziesiątych zwrócił swe zainteresowania na mikrosomy. Wspólnie z Siekevitzem wykazali w 1956 r., że pochodzą one z siatki ergastoplazmatycznej. Długotrwała i owocna współpraca z Siekevitzem doprowadziła do pierwszego potwierdzenia, że synteza białka w komórce odbywa się na rybosomach. Wykazali oni, że aktywne rybosomy mogą występować zarówno w postaci wolnej, jak i związanej z membranami. Zapomina się również często, że podstawy do badań translacji i przekazywania informacji genetycznej, które dziś dokonuje się na modelu bakteryjnym *E. coli*, zostały opracowane w pracowni Palade'a i Zamecnika z tym, że na modelu rybosomu komórki wątrobowej szczura.

W latach sześćdziesiątych grupa Palade'a zainteresowała się wydzielaniem białek z komórki trzustki. W serii bardzo ciekawych doświadczeń udowodnili oni, że synteza białek wydzielonych z komórek trzustki odbywa się wyłącznie na rybosomach związanych z błonami endoplazmatycznymi, a nie na wolnych polisomach.

Opisali także cykl przechodzenia zsyntetyzowanego białka do pęcherzyków o gładkiej błonie i następnie do aparatu Golgiego, skąd przenieszone jest ono na obwód komórki. W ostatnich latach Palade zwrócił swe zainteresowania na biogenezę błon komórkowych. Badania jego w znacznym stopniu wpłynęły na przyjęcie przez Singera i Nicolsona mozaikowego modelu błony komórkowej.

Wprowadzenie przez tegorocznych laureatów Nagrody Nobla wielu nowych technik zarówno do mikroskopii elektronowej, jak i biochemii



pozwołyły zintegrować dane o budowie i funkcji struktur komórkowych. Im to w olbrzymim stopniu zawdzięczamy dzisiejszą wiedzę o substrukturze i funkcji komórki.

*Otrzymano: 4 marca 1975.*

*Przyjęto: 8 kwietnia 1975.*

*Adres autorów: Zakład Histologii i Embriologii IBM WAM 90-647 Łódź Plac 9 Maja 1.*







## 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., Initiation of synchronous mitosis in *Physarum polycephalum*, Exptl. Cell Res., 73: 41-48, 1972.
- [2] Hnilica L. S., McClure M. E., Speltzberg T. C., Histone biosynthesis and the cell cycle, [w] Histone and Nucleohistones, red. D. M. P. Philips, Plenum Press. London, New York 1977, 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 Upowszechnienia Prasy i Książki, ul. Hubska 8/14, 50-502 Wrocław (w terminie do 10 dnia miesiąca poprzedzającego okres prenumeraty).

Prenumeratę ze zleceniem wysyłki za granicę, która jest 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 zamawiać we Wzorcowni Wydawnictw Naukowych PAN-Ossolineum-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. Hubska 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 and 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**



## SPIS TREŚCI

A. B. DUTKOWSKI, Współzależność między ciałem tłuszczowym a owariami owadów . . . . .	181
E. WASILEWSKA-DZIUBIŃSKA, Wpływ metabolizmu glukozy na komórkowe potencjały czynnościowe w mięśniu sercowym . . . . .	223
E. ZUBRZYCKA, Solubilizacja i rekonstytucja błon biologicznych . . . . .	233
K. RYDZYŃSKI i B. KACZMAREK, Tegoroczni laureaci nagrody Nobla w dziedzinie nauk medycznych . . .	249