

**POLSKIE
TOWARZYSTWO
ANATOMICZNE**

TOM 4 · NR 1

1977 (1-90)

Postępy Biologii Komórek

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 we Wrocławiu

Nakład 440 + 110 egz. Ark. wyd. 7. Ark. druk. 5²/₃ + wkl. Papier druk. sat. III kl.
80 g. 70 × 100 cm. Oddano do składania w listopadzie 1976 r. Podpisano do druku w styczniu
1977 r. Druk ukończono w lutym 1977 r. Zam. 560/76 — L-3. Cena zł 20.—

Wrocławska Drukarnia Naukowa, Wrocław, ul. Lelewela 4

METABOLIZM PLAZMALOGENÓW ETANOLOAMINOWYCH

Joanna STROSZNAJDER

Zespół Neurochemii Centrum Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej
Polskiej Akademii Nauk

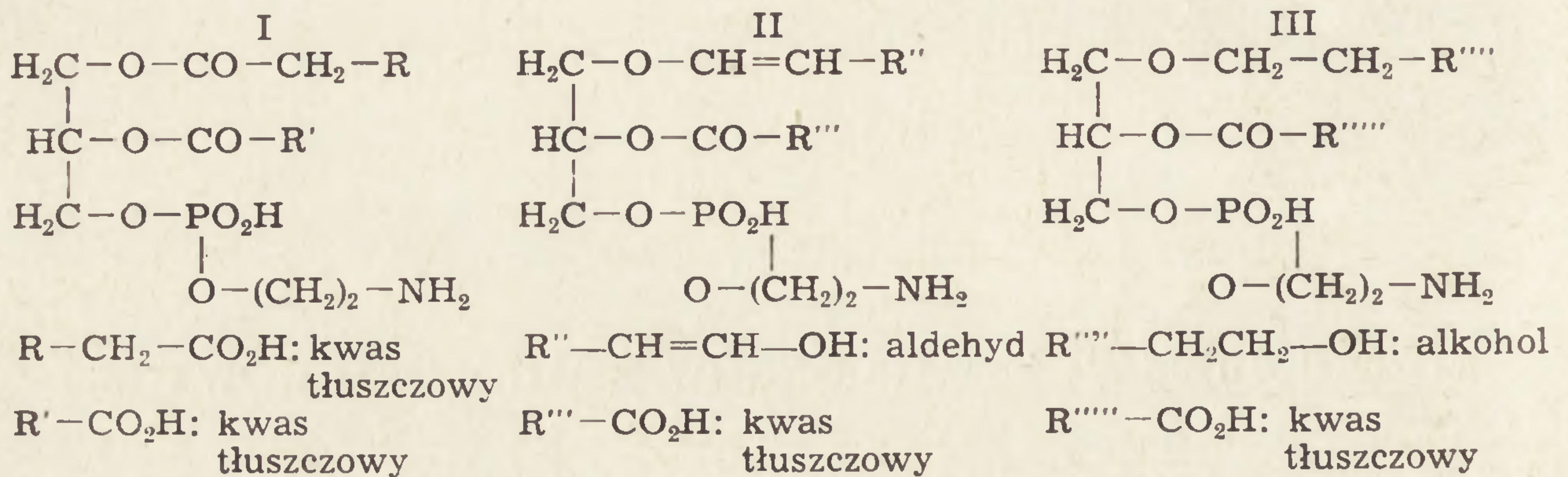
Streszczenie. W przedstawionym szerzej zagadnieniu biosyntezy plazmalogenów etanoloaminowych zwrócono szczególną uwagę na proces biosyntezy wiązania enoloeterowego. Aktualnie przeważa pogląd, że nasycone związki eterowe są bezpośrednimi prekursorami w syntezie lipidów enoloeterowych. Stwierdzono bezpośrednie przejście 0 (-1 - alkilo - 2 - acylo - sn - glicero - 3 - fosforyloetanoloaminy) do 0 (-1 - alkenylo - 2 - acylo - sn - glicero - 3 - fosforyloetanoloaminy) przy udziale preparatu enzymatycznego z frakcji mikrosomalnej zredukowanych nukleotydów pirydynowych ATP, Mg⁺⁺ i tlenu. Omówiono rolę biologiczną plazmalogenów w warunkach fizjologicznych oraz niektórych stanach patologicznych. Zwrócono uwagę, że zaburzenie metabolizmu plazmalogenów etanoloaminowych w niedotlenieniu może być jednym z czynników odgrywających rolę w patomechanizmie zaburzeń strukturalno-funkcjonalnych ośrodkowego układu nerwowego.

STRUKTURA I WYSTĘPOWANIE LIPIDÓW ETEROWYCH NA PRZYKŁADZIE
FRAKCJI FOSFATYDYLLOETANOLOAMINOWEJ

W skład frakcji fosfatydyloetanoloaminowej, jednej z frakcji glicerofosfolipidów, wchodzi trzy komponenty, które różnią się między sobą rodzajem wiązania łańcucha węglowodorowego przy 1 - atomie węgla glicerolu. Systematyczne nazewnictwo tych związków to:

- I. 1,2 - dwuacylo - sn - glicero - 3 - fosforyloetanoloamina;
synonimy: dwuacyloglicerofosfatydyloetanoloamina,
dwuacylo - GPE, kolamino - kefalina,
fosfatydyloetanoloamina względnie fosfatydylokolamina.
- II. 0 - alkeno - 1' - enylo - 2 - acylo - sn - glicero - 3 - fosforyloetanoloamina;
synonimy: alkenyloacylo — GPE,
plazmalogeny etanoloaminowe lub kolaminowe,
fosfatydałoetanoloamina względnie fosfatydałokolamina.
- III. 0 - 1 - alkilo - 2 - acylo - sn - glicero - 3 - fosforyloetanoloamina;
synonimy: alkiloacylo — GPE,
„eterfosfatyd” kefalinowy lub etanoloaminowy.

Odpowiednie formy strukturalne wyglądają następująco:



W pozycji C-1 glicerolu w przypadku związku I występują związane estrowo kwasy tłuszczowe, w związku II aldehyd tłuszczowy połączony wiązaniem enoloeterowym, w związku III alkohol tłuszczowy związany wiązaniem eterowym.

W mózgu ssaków, np. w mózgu 14-dniowych szczurów, stosunek fosfolipidu dwuacylowego w frakcji fosfatydyloetanoloamin do alkenylo-acylo-glicerofosforyloetanoloaminy wynosi 3:2, natomiast alkilo-acylo-GPE stanowi znikomy procent.

Jak już wspomniano, alkenylo-acylo-glicerofosforyloetanoloaminy nazywane są potocznie etanoloaminowymi plazmalogenami. Nazwę tę zawdzięczają Feulgenowi. Odkryte zostały przez tego badacza w 1924 r. za pomocą reakcji „plazmalowej”, tj. histochemicznej reakcji na aldehydy.

Poza plazmalogenami etanoloaminowymi występują również plazmalogeny cholinowe, serynowe, inozytolowe i inne. Plazmalogeny są szeroko rozpowszechnione w świecie zwierzęcym od najniższych organizmów aż do człowieka. Stwierdza się je prawie we wszystkich tkankach. Występują również w świecie roślin. W świecie zwierzęcym zawartość plazmalogenów wzrasta od najniżej do najwyżej stojących w hierarchii zwierząt, stąd najwyższy poziom plazmalogenów stwierdza się w tkankach kręgowców.

Zawartość plazmalogenów w tkance nerwowej podczas rozwoju była badana przez Hogena, Josepha [34]. Ilość plazmalogenów etanoloaminowych, cholinowych, inozytolowych wzrasta prawie dwukrotnie w mózgu szczura między 12 a 24 dniem życia [89, 90]. Tkanka nerwowa należy do najbogatszych tkanek pod względem zawartości plazmalogenów i to w głównej mierze plazmalogenów etanoloaminowych. Do tkanek o wysokiej zawartości plazmalogenów należą mięśnie gładkie i prążkowane. Wysoką ich zawartość stwierdza się w nerce [82] oraz w tkankach nowotworowych.

W mózgu plazmalogeny występują w różnych ilościach w poszcze-

gólnych strukturach. Najliczniej występują w białej substancji mózgu — w mielinie [50, 73, 74]. We frakcji mielinowej z mózgu dorosłego człowieka stanowią one 80% frakcji fosfolipidów etanoloaminowych, w substancji szarej — 50% tejże frakcji. W okresie mielinizacji stwierdza się wyjątkowo intensywną biosyntezę plazmalogenów [9, 22, 42, 90]. W przeciwieństwie do tkanki nerwowej, w wątrobie stwierdza się niską zawartość plazmalogenów, które stanowią około 4% wszystkich fosfatydów [57], natomiast w niektórych guzach wątroby, jak w wątrobiaku Morrisa, obserwowany jest wysoki poziom plazmalogenów [68]. Snyder i wsp. przypuszczają, że podwyższony poziom związków o wiązaniu enoloeterowym i eterowym w tkankach nowotworowych jest uwarunkowany brakiem enzymu hydrolizującego to wiązanie a nie wzrostem biosyntezy.

Eichberg i wsp. [20] przeprowadzili badania na mózgu świnek morskich. Określili skład lipidowy frakcji małych i dużych fragmentów mieliny, frakcji jąder, mitochondriów, mikrosomów, synaptosomów i pęcherzyków synaptycznych. Stwierdzili, że prawie wszystkie frakcje posiadają względnie wysoką zawartość plazmalogenów etanoloaminowych (9–25% całkowitego fosforu lipidowego). Plazmalogeny cholinowe znaleźli w pęcherzykach synaptycznych (0,6% całkowitego fosforu) i śladowe ilości w dużych fragmentach mieliny. Plazmalogeny serynowe (0,3% całkowitego fosforu lipidowego) stwierdzano tylko w dużych fragmentach mieliny. Alkilo - acylo - fosfatydy we wszystkich frakcjach stanowią średnio 2–4% całkowitego fosforu lipidowego. W następnych latach wraz z rozwojem techniki izolacji frakcji komórek neuronalnych i glejowych zanalizowano skład lipidowy wymienionych komórek [32]. Zawartość plazmalogenów w obu frakcjach komórek z mózgu szczura wynosi około 10% fosfolipidów [49]. Wskaźnik syntezy etanoloaminowych plazmalogenów 0 - (1 - alk - 1' - enylo - 2 - acylo - sn - glycero - 3 - fosforyloetanoloaminy) wynosi 1,7 nmol/godz/mg białka neuronalnego, natomiast wskaźnik syntezy cholinowych plazmalogenów wynosi 3,4 nmol/godz/mg białka neuronalnego [75]. Ten wysoki wskaźnik syntezy plazmalogenów cholinowych jest zgodny z aktywnym metabolizmem tych fosfolipidów w o.u.n. [24], pomimo niskiego ich poziomu w tkance nerwowej. Stanowią one mniej niż 1% całkowitych fosfolipidów.

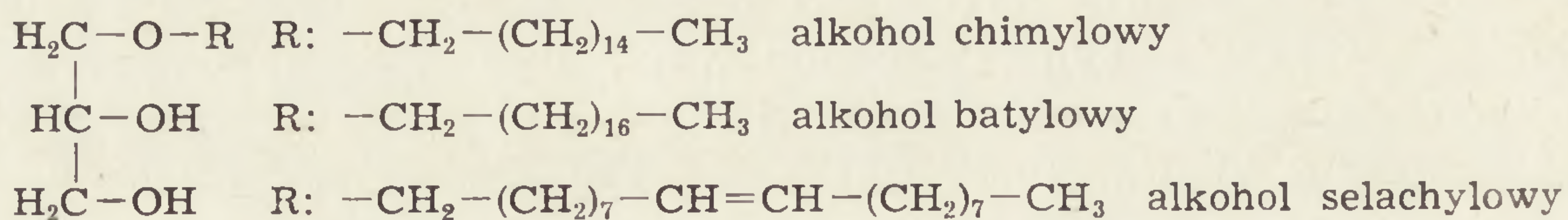
SKŁAD KWASÓW TŁUSZCZOWYCH I ALDEHYDÓW W PLAZMALOGENACH

Gray [29], Gray i MacFarlane [30], Kates i wsp. [38] oraz Debuch [15–17] w badaniach składu aldehydów fosfolipidów z mózgow różnych ssaków stwierdzili, że aldehydy plazmalogenów są to nierozgałęzione łańcuchy węglowodorowe $C_{16:0}$, $C_{18:0}$, $C_{18:1}$. Wood i wsp. [98] wykazali, że nie tylko mózg szczura, lecz cały szereg jego organów posiada ana-

logiczny skład aldehydów w frakcji plazmalogenów. Łańcuchy węglowodorowe $C_{16:0}$, $C_{18:0}$ i $C_{18:1}$ stanowią więcej niż 95% całkowitego składu aldehydów. Analogiczny skład aldehydowy znaleźli Sun i Horrocks [79] w mózgu myszy i wołu. Bywają oczywiście pewne wyjątki od podanego składu, o czym świadczą dane Schmida i wsp. [62]. Stwierdzili oni w obojętnych plazmalogenach wątroby ryby *Hydrolagus collei* aldehyd $C_{20:1}$, który stanowi 40% składu aldehydów tych lipidów. O innych wyjątkach donosi Winterfeld [91]. Porównano skład aldehydów w plazmalogenach ze składem kwasów tłuszczowych w pozycji C-1 glicerolu w dwuacyloglicerofosforyloetanoloaminie. Dla przykładu w 14-dniowym mózgu szczurów, według danych Etzrodt i Debuch [23], skład aldehydów w plazmalogenach etanoloaminowych jest następujący: 42% — $C_{16:0}$, 40% — $C_{18:0}$ i 18% — $C_{18:1}$. Skład kwasów tłuszczowych w związku dwuacylowym w pozycji C-1 glicerolu jest następujący: 20% — $C_{16:0}$, 60% — $C_{18:0}$, 18% — $C_{18:1}$. Godny uwagi jest fakt, że w obu przypadkach nie stwierdza się łańcuchów wielonienasyconych, a jakościowy skład jest bardzo podobny. Jeżeli chodzi o skład kwasów tłuszczowych w 2 pozycji glicerolu, to stwierdza się jeszcze większe podobieństwo w omówionych związkach szczególnie pod względem zawartości wielonienasyconych kwasów tłuszczowych.

Jak wynika z prac Sun i Horrocksa [79], kwasy $C_{20:4}$, $C_{22:6}$ stanowią więcej jak połowę całego składu kwasów tłuszczowych. Strukturę plazmalogenów szerzej opracował Graig i wsp. Wykazali oni, że plazmalogeny posiadają konfigurację cis i D.

Ze względu na ważną rolę nasyconych obojętnych lipidów eterowych w procesie biosyntezy plazmalogenów, należy wspomnieć o związkach, które w pozycji C-1 glicerolu posiadają alkohol tłuszczowy. Są to znane od dawna: alkohol chimyłowcy, batyłowcy i selachyłowcy.



O występowaniu nasyconych alkoxyglicerydów, jak i nienasyconych obojętnych lipidów eterowych (plazmalogenów) w frakcji obojętnych lipidów w różnych tkankach ssaków donosi Gilbertson i Karnovsky [27]. Obojętne lipidy eterowe zostały również wyizolowane z różnych tkanek organizmu ludzkiego: z nadnerczy, tkanki tłuszczowej podskórnej, mięśnia sercowego i aorty [60, 61, 72]. Nasycone i nienasycone obojętne lipidy eterowe stanowią tylko nieznaczny procent wszystkich obojętnych lipidów. Obojętne lipidy eterowe (alkoxydwuglicerydy i plazmalogeny) stanowią w o.u.n. około 0,9% wszystkich obojętnych lipidów [97]. Podobnie

niską zawartość tych lipidów stwierdza się we frakcji obojętnych lipidów różnych ludzkich tkanek [65]. Wysoką zawartością alkoxydwuglicerydów charakteryzują się tkanki nowotworowe zarówno zwierzęce [64, 68], jak również ludzkie [65].

BIOSYNTENZA PLAZMALOGENÓW

Biosynteza plazmalogenów nie jest w pełni wyjaśniona. Pierwsze badania w tej dziedzinie dotyczą wbudowywania ^{32}P ortofosforanu [59] i ^{14}C octanu do plazmalogenów, a więc związków bardzo niespecyficznych. W 1960 r. Kiyasu i Kennedy [41] wykazali, że monoglicerydy zawierające w pozycji C-1 aldehyd związany wiązaniem enoloeterowym reagują z cytydynofosfocholiną i cytydynofosfoetanolaminą, tworząc cholinowe i etanoloaminowe plazmalogeny. McMurray [47, 48] w badaniach *in vitro* i Ansell [1] w badaniach *in vivo* stwierdzili wbudowywanie fosforylochliny i fosforyloetanolaminy w plazmalogeny mózgu szczura. Szczególnie interesujące pozostawało zagadnienie biosyntezy wiązania enoloeterowego. Tworzenie wiązania enoloeterowego w plazmalogenach jest całkowicie niezależne od tego, na jakim poziomie zachodzi ten proces: lipidu obojętnego czy fosfolipidu. Do chwili obecnej problem ten pozostaje nie rozwiązany. W ostatnim dziesięcioleciu zostały przedyskutowane przez różne możliwości. Najważniejsze teorie to:

1. Bezpośrednia reakcja aldehydu tłuszczowego w formie uwodnionej z wolną grupą hydroxylową glicerolu. W wyniku tej reakcji powstaje półacetal. Następną reakcją jest odwodorowanie półacetalu do enoloeteru.
2. Redukcją estru do półacetalu, powstawanie enoloeteru w wyniku odwodorowania.
3. Utlenienie (odwodorowanie) eteru do enoloeteru.

BEZPOŚREDNIA REAKCJA ALDEHYDU TŁUSZCZOWEGO Z WOLNĄ GRUPĄ HYDROXYLOWĄ GLICEROLU

Pierwsza hipoteza znalazła oparcie w obserwacji, że przy enzymatycznym rozpadzie plazmalogenów stwierdza się wolne aldehydy. Nasuło się pytanie, w jaki sposób powstają aldehydy w organizmie. Vignais [88] uważa, że przez redukcję odpowiednich kwasów tłuszczowych. Nie wielkie ilości wolnych aldehydów wyizolowano z mięśnia sercowego szeregu ssaków.

Badania Carr i wsp. [13] z homogenatem z mózgu szczurów wykazują brak wbudowywania aldehydu ^{14}C palmitynowego do plazmalogenów, podczas gdy po podaniu znakowanego kwasu palmitynowego i stea-

rynowego stwierdza się aktywność w łańcuchu alkenylowym. Z kolei badania Baumana i wsp. [5] z *Clostridium butyricum* wskazują, że zarówno kwas palmitynowy, jak również aldehyd palmitynowy wbudowywany jest w kwasy tłuszczowe i aldehydy fosfolipidów. Żadnej specyficznej roli nie przyznano aldehydom w procesie biosyntezy plazmalogenów.

REDUKCJA WIĄZANIA ESTROWEGO DO ENOLOETEROWEGO

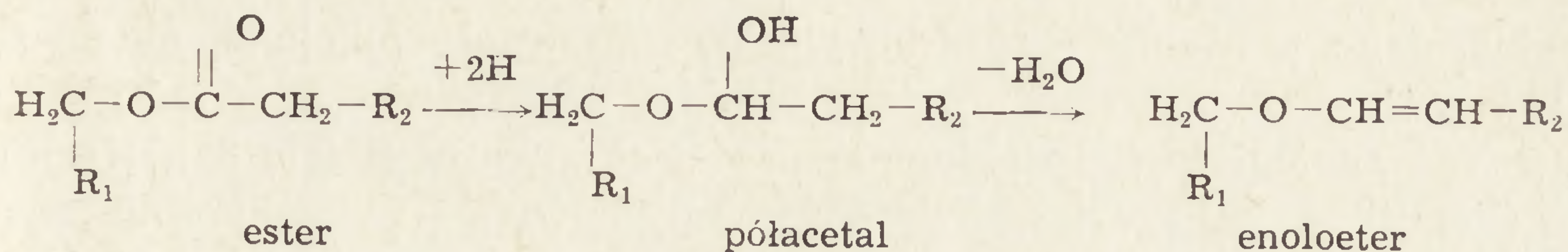
Na podstawie badań wbudowywania ^{32}P do lipidów estrowych i plazmalogenów stwierdzono wyższą specyficzną aktywność w tych pierwszych związkach. Przyjęto hipotezę, że być może wiązanie estrowe ulega zredukowaniu do enoloeterowego. Wskutek tego jednak że aldehydy są wbudowywane w plazmalogeny powstało pytanie, czy nie ulegają najpierw utlenianiu do kwasów, a następnie powstałe wiązanie estrowe zredukowaniu do enoloeterowego. W tym celu zastosowano do badań aldehyd znakowany przy pierwszym atomie węgla, węglem ^{14}C i wodorem ^3H . W przypadku gdyby aldehyd ulegał najpierw utlenianiu do kwasów musiałby utracić znakowany wodór.

W doświadczeniu z *Clostridium butyricum* stwierdzono w aldehydach wyizolowanych z plazmalogenów utratę znakowanego ^3H w 85% [31]. Z doświadczeń tych wynikało, że większa część inkubowanych aldehydów ulegała utlenieniu do kwasów tłuszczowych przed wbudowaniem w plazmalogeny. Niewielki procent aldehydów był wbudowywany bezpośrednio w plazmalogeny.

Inne wyniki w bardzo podobnych badaniach (wbudowywanie znakowanych aldehydów w plazmalogeny) otrzymał Ellingboe i Karnovsky [21]. Stwierdzili oni tylko 10–30% utratę znakowanego ^3H z podawanego aldehydu. Aldehydy znacznie aktywniej ulegały wbudowywaniu w plazmalogeny aniżeli kwasy tłuszczowe lub długołańcuchowe alkohole. Bell i White [6] podawali domózgowo młodym szczurom (1 - ^{14}C , 1 - ^3H) aldehyd palmitynowy. W otrzymanych z plazmalogenów aldehydach uzyskali względnie stały stosunek $^3\text{H}/^{14}\text{C}$. Przyjęli na tej podstawie hipotezę, że aldehydy mogą bezpośrednio być wbudowywane w plazmalogeny.

Podsumowując doświadczenie z podwójnie znakowanymi aldehydami można powiedzieć, że nie przemawiają one przeciwko bezpośredniemu wbudowywaniu aldehydów ani przeciwko poprzedzającej oksydacji aldehydów do kwasów tłuszczowych. Nie można również na podstawie tych badań wykluczyć redukcji aldehydów do alkoholi.

Bickerstaffe i Mead [7] uważają, że wiązanie enoloeterowe plazmalogenów powstaje w wyniku redukcji wiązania estrowego.

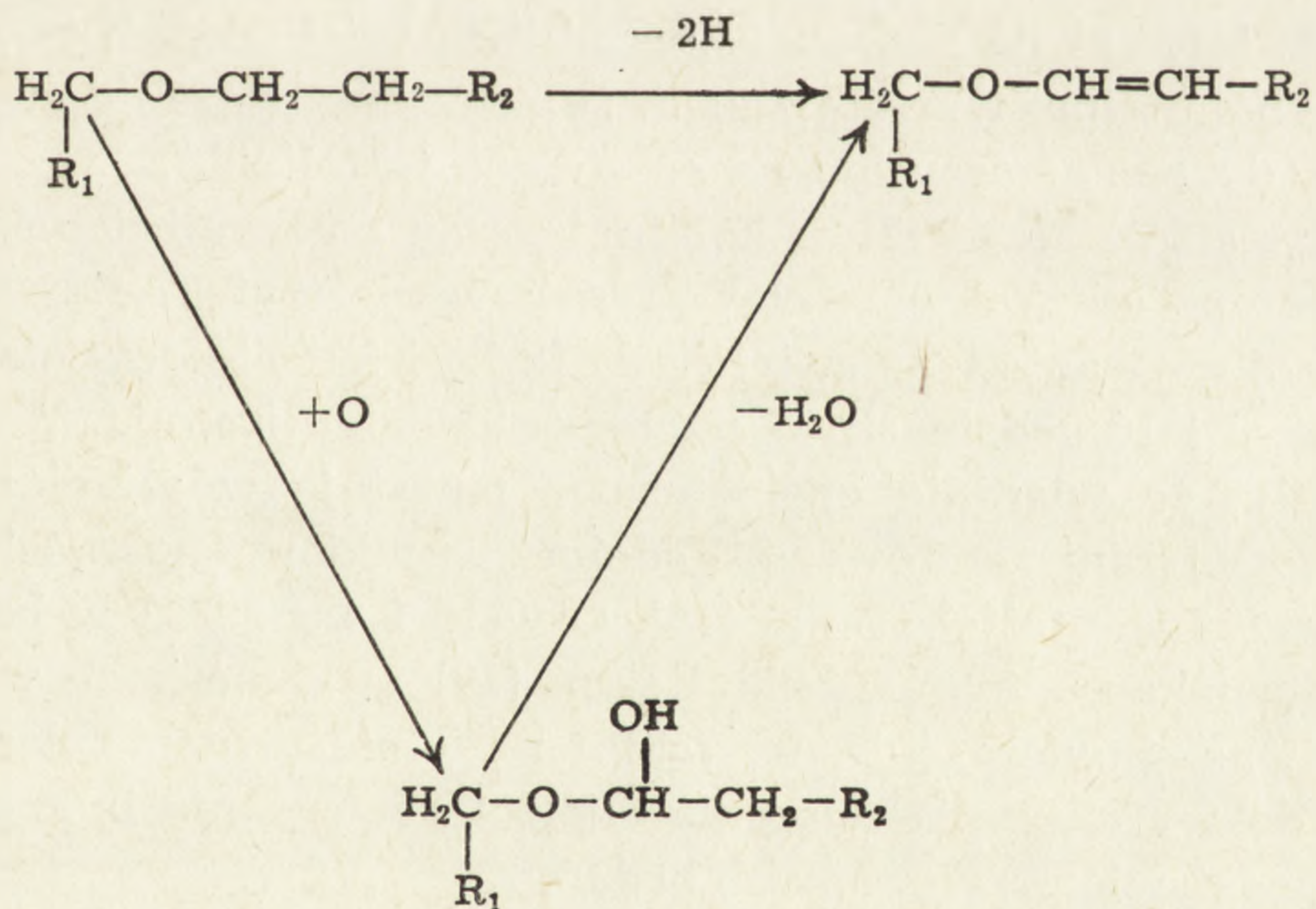


Hipotezę swoją oparli na wynikach badań aktywności kwasów tłuszczowych i aldehydów fosfolipidów mózgu w różnych czasach po podaniu aldehydu ^{14}C palmitynowego.

W celu ostatecznego wyjaśnienia, czy wiązanie estrowe ulega zredukowaniu do enoloeterowego, zastosowano jako bezpośredniego prekursora syntezy plazmalogenów znakowaną 1,2 - dwuacyloglicero - 3 - fosforylo - etanoloaminę w badaniach *in vivo* [18]. Stwierdzono zaledwie śladowe ilości izotopu w łańcuchu alkenylovym plazmalogenów. Z tych doświadczeń należy wyciągnąć wniosek, że redukcja wiązania estrowego do enoloeterowego na pewno nie zachodzi na poziomie fosfolipidu.

UTLENIANIE (ODWODOROWANIE) ETEROLIPIDU DO ENOLOLIPIDU

Według obecnych danych uważa się, że nasycone wiązanie eterowe jest bezpośrednim prekursorem w syntezie związków enoloeterowych.



R_1 — reszta cząsteczki fosfolipidowej, R_2 — reszta łańcucha alifatycznego

Snyder i Pflieger [63] badali wbudowywanie 1 - ^{14}C - alkiloglycerolu do plazmalogenów wątroby szczura w badaniach *in vitro* i *in vivo*. Niestety nie zaobserwowali oni przejścia wiązania eterowego w enoloeterowe. Podawany związek ulegał rozbiciu w wyniku działania enzymu hydrolyzującego wiązanie eterowe. Enzym ten jest szczególnie aktywny w wą-

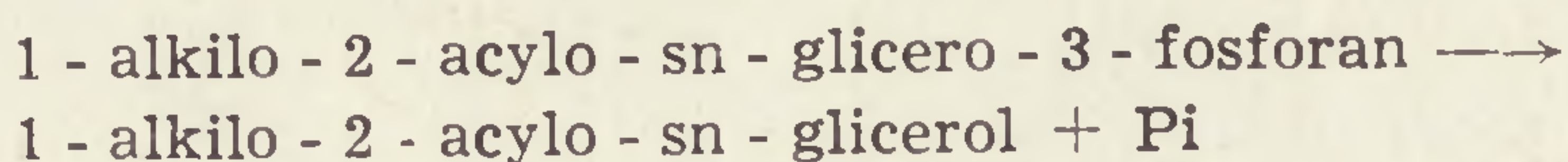
trobie. Jako produkty rozpadu wyizolowane zostały alkohole, aldehydy i kwasy tłuszczowe.

Nad analogicznym problemem pracował Thompson [85, 86]. Karmił on ślimaki radioaktywnym kwasem palmitynowym i radioaktywnie znakowanym alkoholem chymylowym. Następnie badał wbudowywanie izotopu do kwasów tłuszczowych, do łańcucha alkilowego i alkenylowego w wyekstrahowanych lipidach. Po 16 godzinach od podania izotopu stwierdzano jego dobre wbudowanie w kwasy tłuszczowe i łańcuch alkilowy, podczas gdy związki alkenylove wykazywały tylko nieznaczną aktywność. Natomiast po 3 dniach specyficzna aktywność plazmalogenów przekroczyła kilkakrotnie specyficzną aktywność lipidów estrowych. Najaktywniej znakowane były nasycone lipidy eterowe. Poprzez zastosowanie alkoholu chymylowego, znakowanego w glicerolu, jak również łańcuchu alkilowym, Thompson [87] wykazał, że wiązanie eterowe przy wbudowywaniu alkoholu chymylowego pozostaje nienaruszone. Z wyników swoich doświadczeń Thompson wyciągnął wniosek, że nasycone lipidy eterowe są bezpośrednim prekursorem w syntezie plazmalogenów. Wskutek tego, że obojętne plazmalogeny szybciej i aktywniej były znakowane aniżeli plazmalogeny z frakcji fosfolipidów, przyjął on, że utlenianie nasyconych lipidów eterowych do enoloeterowych zachodzi na poziomie obojętnego lipidu.

Malins [44, 45] na podstawie wyników swoich badań, w przeciwieństwie do Thompsona, wyraża pogląd, że nasycone wiązanie eterowe ulega utlenieniu do enoloeterowego na cząsteczce fosfolipidu.

Bickerstaffe i Mead [8] w kolejnej pracy podawali domózgowo młodym szczurom alkohol chymylowy znakowany trytem ^3H , a następnie badali wbudowywanie tego związku do frakcji fosfolipidów etanoloaminowych po 4, 8 i 16 godzinach od momentu podania izotopu. Wyniki badań potwierdziły, że wiązanie enoloeterowe powstaje w wyniku utleniania nasyconego wiązania eterowego. Podobne wyniki w badaniach na mózgu szczura otrzymał Stoffel i wsp. [78], Oswald i wsp. [51] w badaniach na przewodzie pokarmowym, Blank i wsp. [10] w komórkach wysiękowego raka Ehrlicha. Stwierdzenie, na jakim poziomie syntezy plazmalogenów dochodzi do wytworzenia wiązania enoloeterowego nie było jednak możliwe na podstawie przytoczonych badań.

Przebieg syntezy plazmalogenów w mózgu szczura przedstawia i dyskutuje Horrocks i Radomińska - Pyrek [36]. W badaniach in vitro stosowano naturalny prekursor syntezy plazmalogenów alkilo - acyloglicero - fosforyloetanolaminę. Z załączonego schematu wynika, że odwodorowanie nasyconego wiązania eterowego zachodzi na cząsteczce fosfolipidu.



1 - alkilo - 2 - acylo - sn - glicerol + CDP etanoloamina \longrightarrow

1 - alkilo - 2 - acylo - sn - glicero - 3 - fosforyloetanoloamina + CMP

1 - alkilo - 2 - acylo - sn - glicero - 3 - fosforyloetanoloamina \longrightarrow

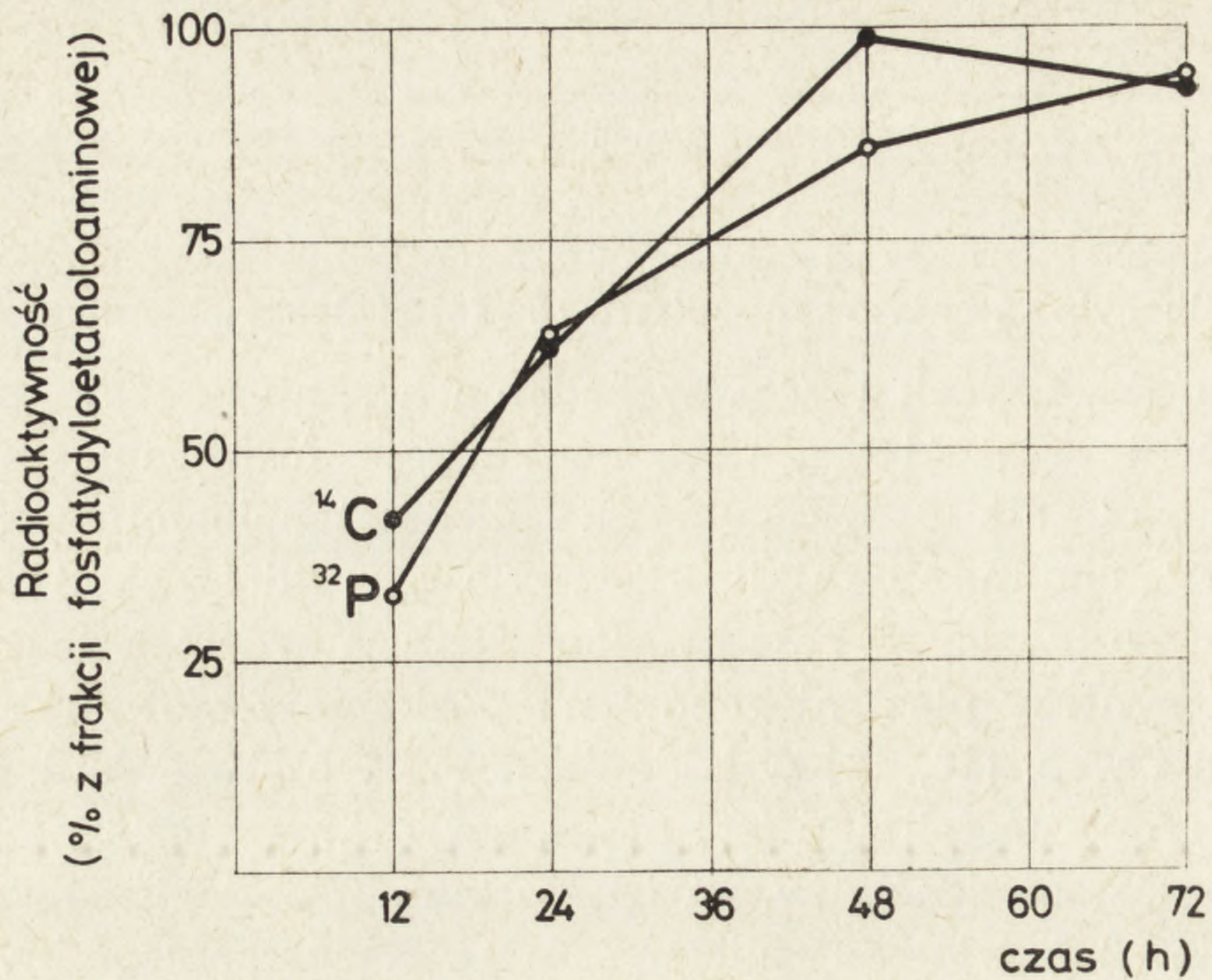
1 - alkenylo - 2 - acylo - sn - glicero - 3 - fosforyloetanoloamina + 2H

Radomińska - Pyrek i wsp. w badaniach syntezy fosfolipidów eterowych zwrócili szczególną uwagę na reakcję fosfotransferazową: CDP etanoloamino - 1 - alkilo - 2 - acylo - sn - gliceroetanoloamino fosfotransferazę i CDP cholino - 1 - alkilo - 2 - acylo - sn - glicerocholinosfosfotranferazę. Zwrócono uwagę na rolę kwasów tłuszczowych jako czynnika regulującego biosyntezę plazmalogenów na poziomie fosfotransferaz [54-56].

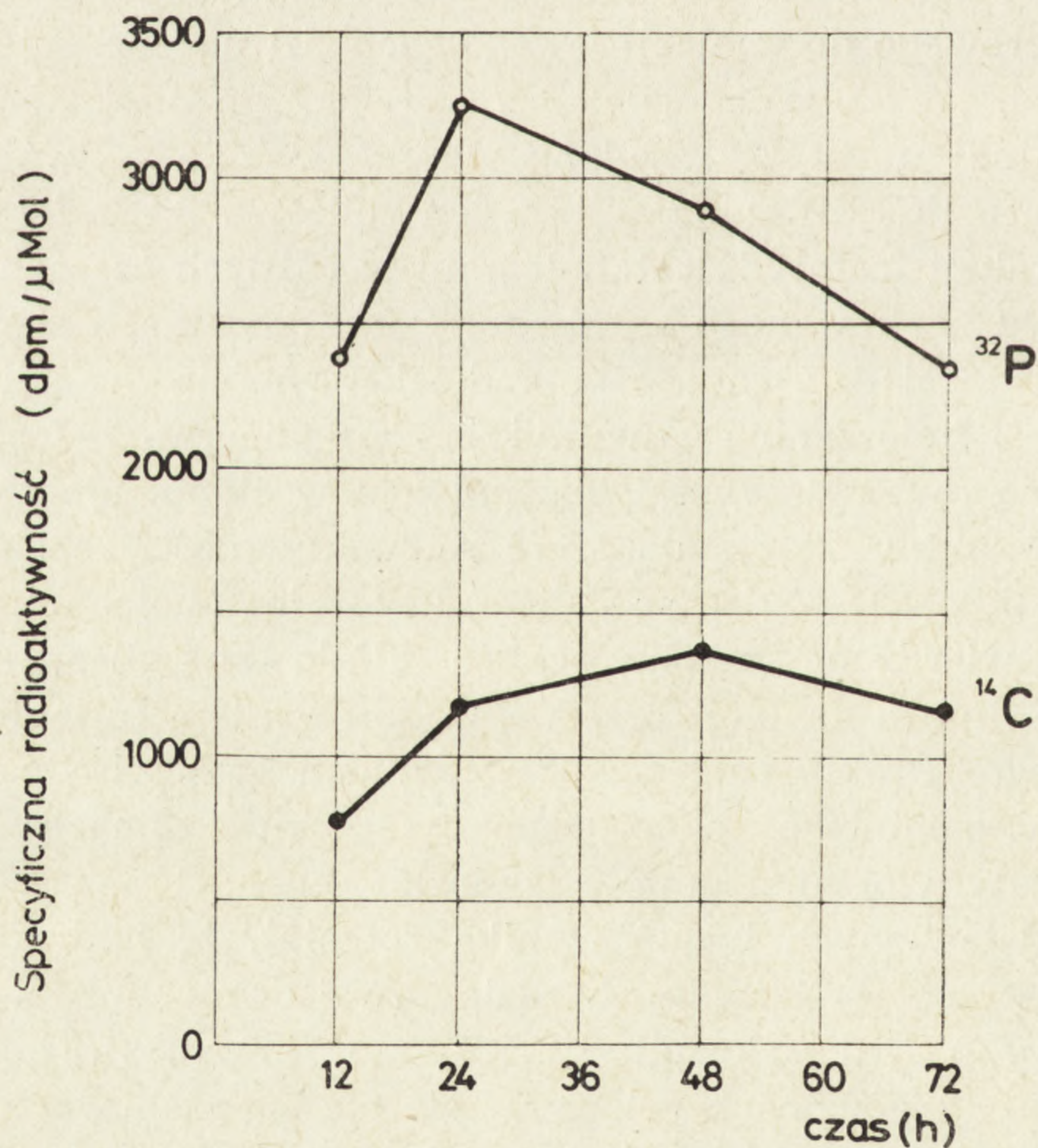
Debuch i wsp. [18, 19] w badaniach in vivo stwierdzili, że nasycone wiązanie eterowe fosfolipidu jest prekursorem w syntezie wiązania enoloeterowego plazmalogenów w mózgu szczura. Po domózgowym podaniu ^{14}C 1 - alkilo - 2 - acylo - sn - glicero - 3 - fosforyloetanoloaminy stwierdzono tylko 2% z podanej aktywności w łańcuchu alkenylowym plazmalogenów. Natomiast w przypadku domózgowego podania 1 - alkilo - glicero - 3 - fosforyloetanoloaminy, a więc lizozwiązku, stwierdzono wyraźnie wyższą aktywność w aldehydach plazmalogenów. Na podstawie pierwszych obserwacji autorzy wysunęli hipotezę, że oksydacja nasyconego wiązania eterowego do enoloeterowego zachodzi na poziomie lizofosfolipidu, a następnie lizoplazmalogen ulega acylacji do plazmalogenu.

W kolejnej pracy [26] badano wbudowywanie podwójnie znakowanego substratu ^{14}C , ^{32}P O - (1 - alkilo - sn - glicero - 3 - fosforylo -) etanoloaminy do frakcji fosfatydyloetanoloamin w różnych czasach po domózgowym podaniu znakowanego substratu. Po 12 godzinach stwierdzono wyraźną różnicę między całkowitą radioaktywnością frakcji fosfatydyloetanoloamin (mieszaniną dwuradylo - sn - glicero - 3 - fosforyloetanoloamin) a sumą radioaktywności plazmalogenów etanoloaminowych i fosfatydyloetanoloaminy. Pozostała część radioaktywności musiała być związana z 1 - alkilo - 2 - acylo - sn - glicerofosforyloetanoloaminą. Wobec powyższego stwierdzono możliwość, że alkilo - sn - glicero - 3 - fosforyloetanoloamina ulega acylacji przed odwodorowaniem (utlenieniem) wiązania eterowego. Praktycznie po 48 godzinach całkowita radioaktywność frakcji etanoloaminowej była obecna w plazmalogenach etanoloaminowych i fosfatydyloetanoloaminie (związku dwuacylowym).

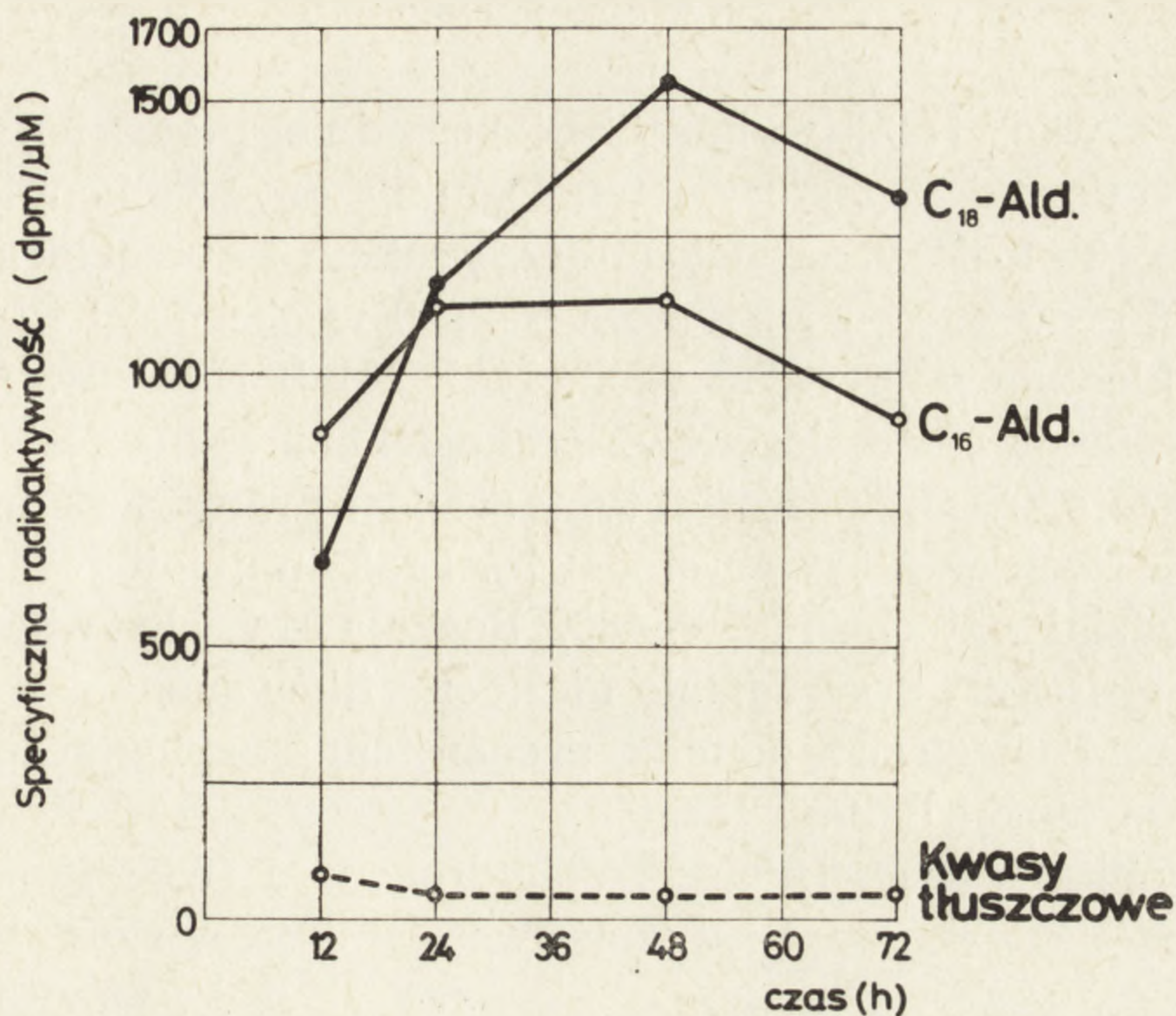
Z przedstawionych badań wynika również, że hydrofilna część fosfolipidu jest metabolizowana bardziej gwałtownie aniżeli część lipofilna. Świadczy o tym wskaźnik $^{14}\text{C}/^{32}\text{P}$, który w substracie wynosi 0,17, natomiast po 12 godzinach osiąga w plazmalogenach wartość 0,31, a po 72 godzinach — 0,50 na korzyść ^{14}C . Alkilowy fosfatyd zawierający alkohol C_{16} utleniany był bardziej gwałtownie do enoloeteru aniżeli analogiczny związek zawierający alkohol C_{18} .



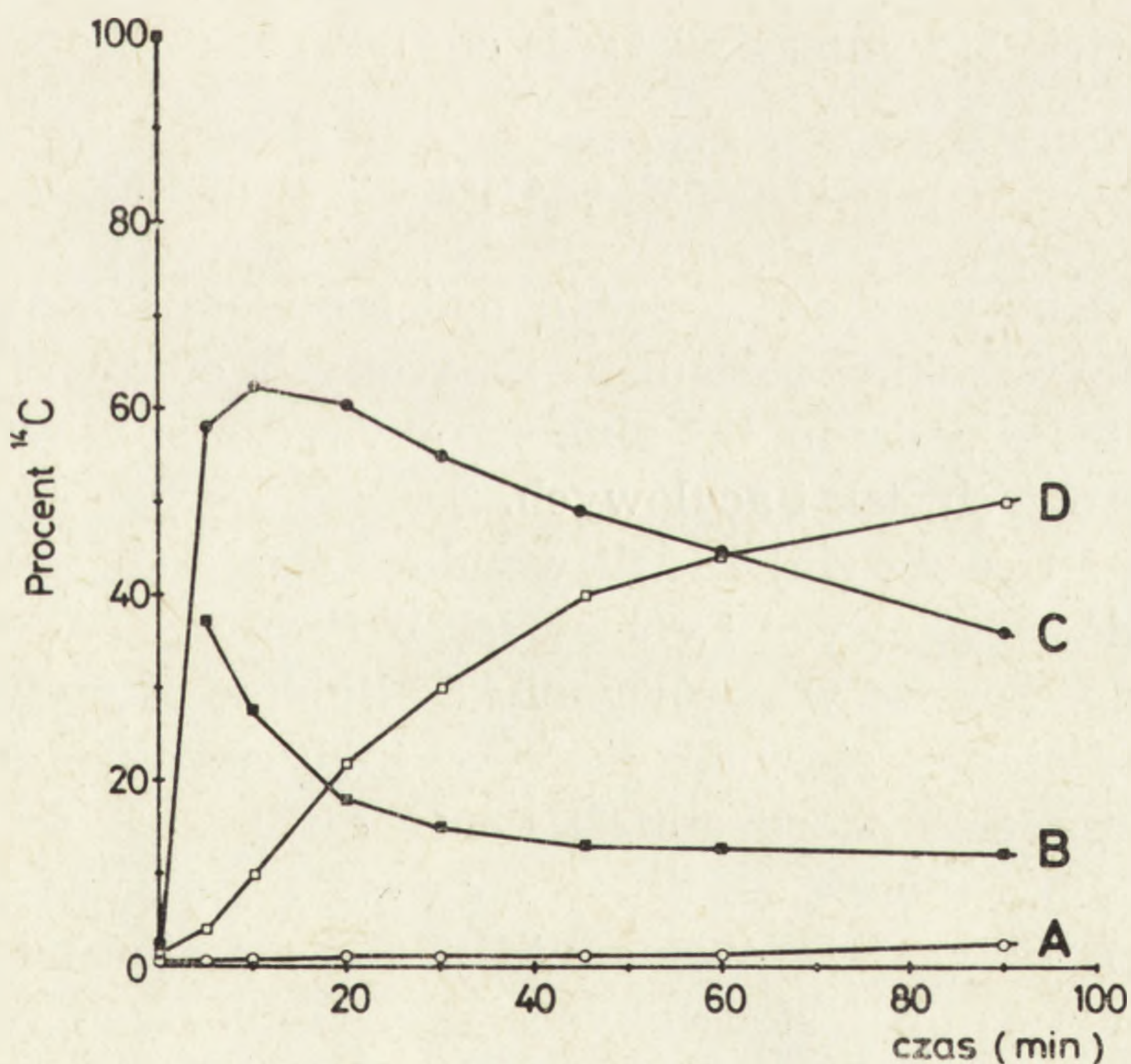
Wykres 1. Procentowy rozkład radioaktywności w plazmalogenach etanoloaminowych łącznie z fosfatydyloetanoloaminą w frakcji fosfolipidów etanoloaminowych mózgu szczura po domózgowym podaniu ^{14}C , ^{32}P alkilo - GPE. Fűrnis, Strosznajder, Debuch [26]



Wykres 2. Specyficzna radioaktywność ^{14}C i ^{32}P w plazmalogenach etanoloaminowych z mózgu szczura po domózgowym podaniu ^{14}C , ^{32}P 0 - alkyl - GPE. Fűrnis, Strosznajder, Debuch [26]



Wykres 3. Specyficzna radioaktywność ^{14}C w aldehydach C_{16} i C_{18} z plazmalogenów etanoloaminowych oraz w kwasach tłuszczowych z frakcji fosfatydyloetanolaminowej mózgu szczura po domózgowym podaniu ^{14}C , ^{32}P alkilo-GPE. Fűrnis, Strosznajder, Debuch [26]



Wykres 4. Biosynteza plazmalogenów etanoloaminowych w zależności od czasu w nadsączu nadmitochondrialnym sarcomy Fischera. Środowisko inkubacyjne: ATP (10 mM), Mg^{++} (4 mM), NADP^+ (2 mM), CoA (0.1 mM), 6 nmoli ^{14}C alkilo-GPE. Całkowita objętość 3 ml, bufor Tris-HCl (0,1 M, pH 7,1). Odzysk całkowity ^{14}C radioaktywności po inkubacji $101 \pm 4,5\%$. Wszystkie wartości na wykresie uwzględniają polarne glicerolipidy zawierające grupę 0-alkilową lub 0-alk-1-enylową
 A — alk-1-enylo-GPE, B — alkilo-GPE, C — alkiloacylo-GPE, D — alk-1-enyloacylo-GPE.
 Wykle i wsp. [102]

Wykle i wsp. [102] wykazali bezpośrednie przejście 1 - alkilo - 2 - acylo - sn - glicero - 3 - fosforyloetanoloaminy do 1 - alkenylo - 2 - acylo - sn - glicero - 3 - fosforyloetanoloaminy. Reakcja ta przebiega przy udziale enzymu z guzu Sarcomy Fischera R-3259 w obecności tlenu, zredukowanych nukleotydów pirydynowych, NADH lub NADPH. ATP i Mg^{++} stymuluje syntezę plazmalogenów. Reakcja hamowania jest przez cyjaniki co wskazuje, że w procesie tym zaangażowany jest mikrosomalny transport elektronów z cytochromem b_5 . Brak inhibicji reakcji przez CO wyklucza udział cytochromu P-450. Reakcja ta aktywniej przebiega w atmosferze tlenu i przy udziale niezidentyfikowanego czynnika z frakcji cytosolu. Analogiczne dane z preparatem enzymatycznym z jelita oraz mózgu otrzymał Paltauf [52, 53].

Jak wynika z prac Snydera, dehydrogenaza (wielofunkcyjna oksydaza) plazmalogenowa różni się właściwościami od wielofunkcyjnej oksydazy biorącej udział w syntezie nienasyconych kwasów tłuszczowych [81]. Możliwe, że kontrolowane są one przez różne komponenty mikrosomalnego systemu przenoszącego elektrony.

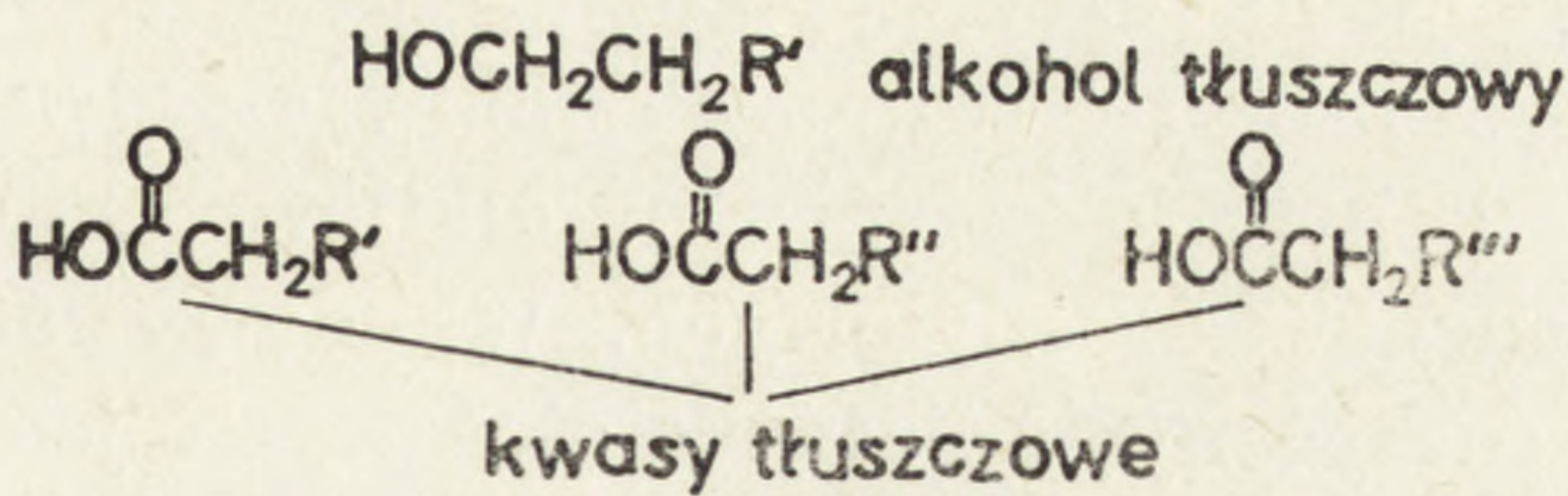
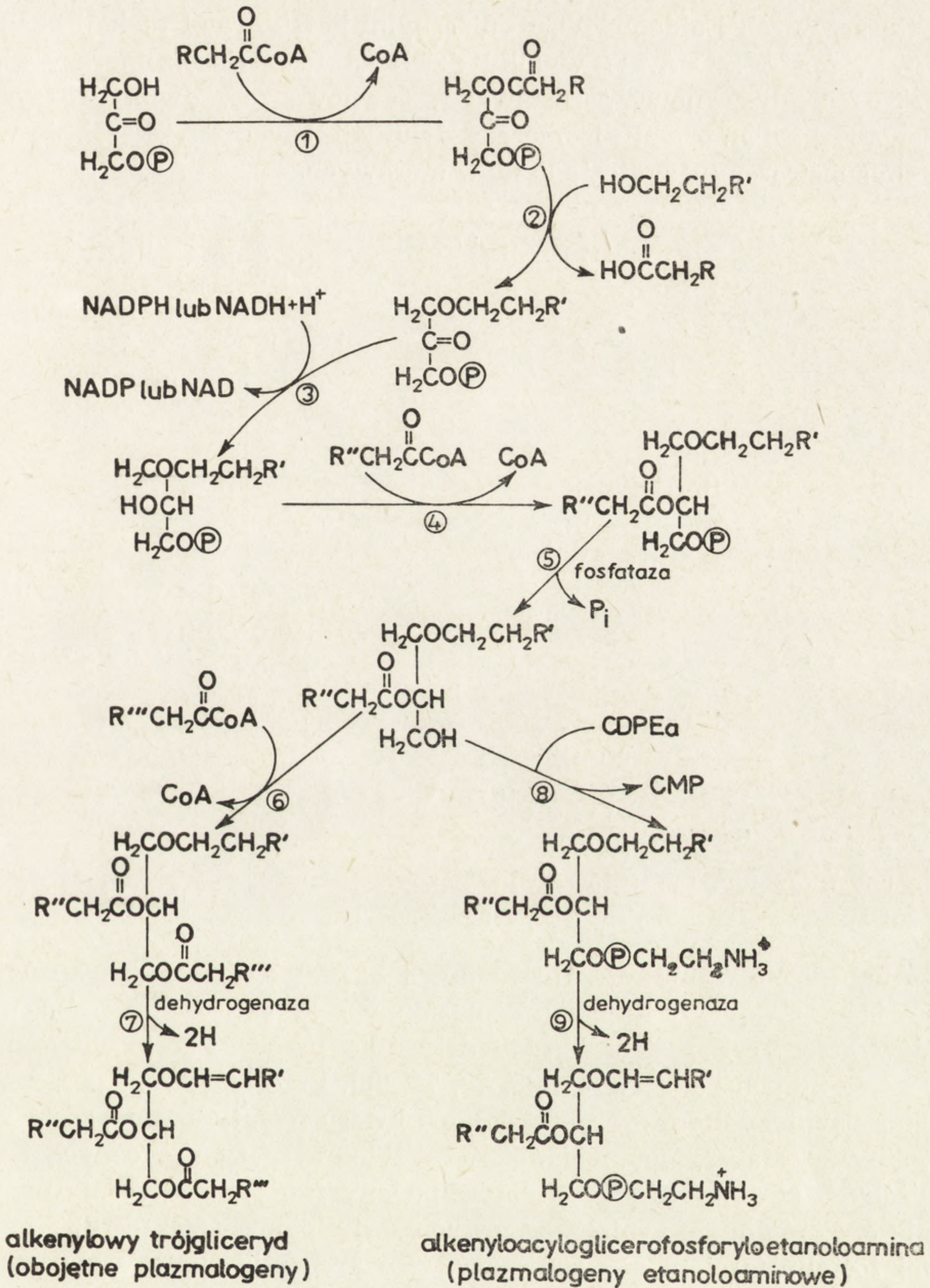
Przyjmując teorię, że wiązanie eterowe jest bezpośrednim prekursorem w syntezie wiązania enoloeterowego nasuwa się kolejne zagadnienie, mianowicie biosynteza wiązania eterowego.

BIOSYNTENZA WIĄZANIA ETTEROWEGO

Pierwsze dane pochodzą z badań nad szpikiem kostnym, który charakteryzuje się wysokim poziomem nasyconych eterowych glicerofosfatydów [83, 84]. Po podaniu ^{14}C glukozy stwierdzano aktywność zarówno w lipidach eterowych, jak i acylowych.

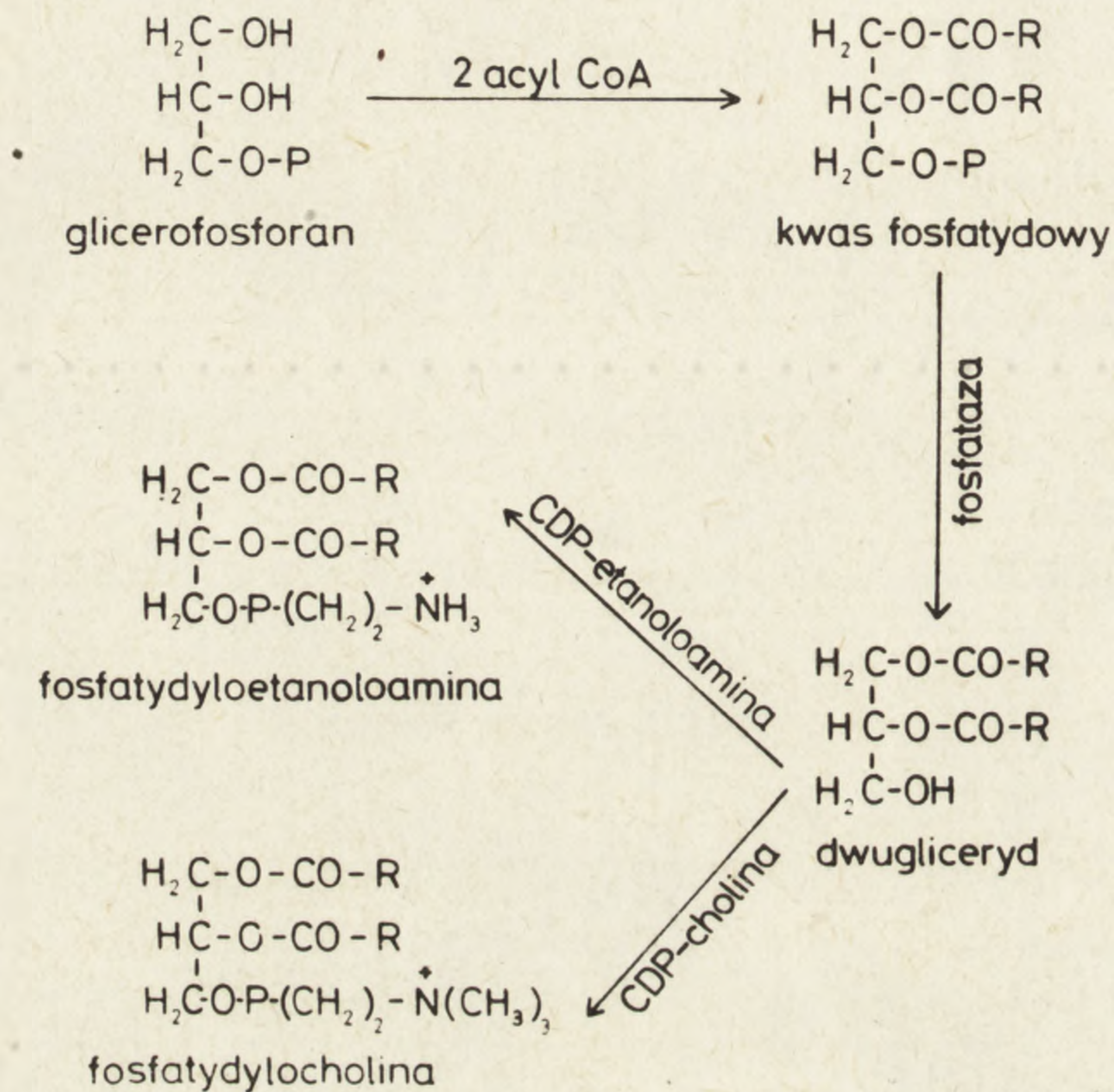
Friedberg i Greene [25] badali wbudowywanie (1,2 - ^{14}C , 2 - 3H) - glicerolu do lipidów estrowych i eterowych u *Protoza* — *Tetrahymena pyriformis*. Lipidy eterowe w porównaniu do lipidów estrowych wykazywały wyraźnie odmienny stosunek $^3H/^{14}C$. Lipidy eterowe traciły znacznie więcej znakowanego wodoru aniżeli lipidy estrowe. Z doświadczeń tych autorzy wysunęli wniosek, że lipidy eterowe w przeciwieństwie do lipidów estrowych są syntetyzowane nie z glicerofosforanu a z aldehydu fosfoglicerynowego lub fosfodwuhydroksyacetonu. Tego rodzaju przypuszczenia zostały potwierdzone w badaniach in vitro. Snyder i wsp. [66, 67, 69] zsyntetyzowali gliceryd alkilowy przy użyciu preparatu enzymatycznego z guzów napletka. Glicerol w syntetyzowanym lipidzie eterowym pochodził z aldehydu 3 - fosfoglicerynowego, natomiast glicero - 3 - fosforan nie był zużywany do syntezy.

W pierwszą pozycję aldehydu - 3 - fosfoglicerynowego wbudowany został alkohol wiązaniem eterowym. Nie stwierdzono wbudowywania kwa-



Wykres 5. Biosynteza alkylicy i alkenylicy glicerydów. Schemat według L. Horroksa

sów tłuszczowych i aldehydów. Koniecznymi kofaktorami reakcji okazały się ATP, Mg^{++} i CoA. W wyniku działania fosfotrioizomerazy aldehyd - 3 - fosfoglicerynowy pozostawał w równowadze z dwuhydroksyacetone. Przy zahamowaniu izomerazy dwuhydroksyacetone okazał się właściwym substratem w syntezie lipidów eterowych.



Wykres 6. Biosynteza fosfatydów dwuacylowych. Schemat zmodyfikowany według Kennedy'ego

Analogiczne wyniki otrzymał Hajra [33] przy użyciu preparatu enzymatycznego z wątroby i mózgu. W następnych latach synteza nasyconych lipidów eterowych została bardzo dokładnie przebadana in vitro przez Snydera i innych badaczy [37, 69, 70, 71, 99]. Prześledzili oni poszczególne etapy syntezy eterowych pochodnych kwasu fosfatydowego, fosfatydylocholiny i fosfatydyloetanoloaminy. Przebieg syntezy nasyconych i nienasyconych eterowych glicerolipidów podany jest schematycznie na wykresie 5. Porównując syntezę estrowych fosfolipidów (wykres 6) z eterowymi fosfolipidami należy zauważyć, że w procesie syntezy obu typów lipidów przebiegają podobne reakcje, pomimo oddzielnych dróg syntezy. Należy podkreślić, że w procesie syntezy lipidów eterowych in vitro zostają wbudowywane alkohole jako łańcuchy alkilowe, a te z kolei ulegają utlenieniu do łańcuchów alkenylowych. Wbudowywanie długołańcuchowych alkoholi do nasyconych lipidów eterowych jak i do łańcucha alkenylowego plazmalogenów w badaniach in vivo zaobserwował po raz pierwszy Keenan i wsp. [39]. Wolne alkohole znajdują się w tkankach

ssaków w bardzo małej ilości [11, 80]. Wood i Healy [95, 96], Takahashi i Schmid [80] uważają, że powstają one w wyniku redukcji kwasów tłuszczowych.

ENZYMATYCZNA DEGRADACJA PLAZMALOGENÓW

Ansell i Spanner [2] stwierdzili obecność enzymu plazmalogenazy w mózgu szczura. Enzym ten hydrolizuje wiązanie enoloeterowe w plazmalogenach etanoloaminowych.

Warner i Lands opisali enzym hydrolizujący wiązanie alkenylowe w mózgu i wątrobie i stwierdzili różnice w specyficzności substratowej i wpływie kofaktorów na aktywność enzymów.

Ansell i Spanner [2, 3] stwierdzili optimum pH 7,4 dla plazmalogenazy oraz konieczność jonów Mg^{++} dla pełnej aktywności enzymu.

Yavin i Gatt badali również hydrolizę plazmalogenów etanoloaminowych i cholinowych przez plazmalogenazę. Badania ich potwierdziły wcześniejsze obserwacje Ansella i wsp. Ponadto stwierdzili oni, że enzym jest absolutnie stabilny w postaci proszku acetonowego, natomiast w formie rozpuszczalnej — tylko 48 godzin. K_m dla etanoloaminowych plazmalogenów jako substratu wynosi $180 \mu M$. Dwuacyloglicerofosforylocholina i dwuacyloglicerofosforyloetanoloamina oraz cholinowe plazmalogeny są kompetycyjnymi inhibitorami plazmalogenazy etanoloaminowej. Z cholinowymi plazmalogenami jako substratem K_m wynosi $208 \mu M$, a kompetycyjną inhibicję enzymu obserwowano z dwuacyloglicerofosforylocholiną i etanoloaminowymi plazmalogenami. Ten sam enzym odpowiedzialny jest za hydrolizę wiązania winylowego u obu plazmalogenów. Aktywność plazmalogenazy dla przykładu w mózgu szczura wynosi $3,4 \mu mol/godz/g$ mózgu [14]. Ci sami autorzy zaobserwowali, że lizofosfolipaza jest znacznie bardziej aktywna w hydrolizowaniu grupy acylowej z 2 - acylo - sn - glicero - 3 - fosforyloetanolaminy jeżeli plazmalogenaza hydrolizuje wiązanie alkenylowe. Funkcją lizofosfolipazy jest usuwanie związków litycznych chroniąc tym samym błony przed ich uszkadzającym wpływem. Normalnie aktywność lizofosfolipazy jest wyższa aniżeli aktywność plazmalogenazy. Jednakże w warunkach kiedy plazmalogenaza jest aktywowana [3, 46], aktywność lizofosfolipazy może być za niska i dochodzi do uszkodzenia błon przez lizozwiązki. Hydroliza fosfolipidów eterowych przez lipazy, fosfolipazę A_2 [92] i fosfolipazę C jest wolniejsza aniżeli związków dwuacylowych. Lands i wsp. [43] stwierdzili, że fosfolipaza D wolniej hydrolizuje zasadę z plazmalogenów etanoloaminowych aniżeli z fosfolipidów dwuacylowych.

Tietz i wsp. w mikrosomach wątroby stwierdzili obecność hydrolazy eterowej wymagającej dla swojej aktywności czterohydropterydyny

i NADPH jako kofaktora. Enzym ten hydrolizując wiązanie eterowe wydaje się być bardzo istotny w regulacji poziomu eterowych lipidów w komórce. Pflieger i wsp. zaobserwowali, że komórki bogate w eterowe lipidy charakteryzują się niską aktywnością lub brakiem tego enzymu, jak np. tkanki nowotworowe lub tkanka nerwowa, natomiast bardzo wysoką aktywność enzymu stwierdza się w wątrobie. Wykle, Schremmer [101] stwierdzili w mikrosomach mózgu szczura aktywność lizofosfolipazy D hydrolizującej eterowe lizofosfolipidy. Nieznaczna hydroliza ma miejsce w przypadku, gdy grupa OH pozycji drugiej glicerolu jest zestryfikowana kwasem tłuszczowym. Enzym ten jest aktywowany przez jony Mg^{++} , a hamowany przez jony Ca^{++} , co różni go ewidentnie od stymulowanej przez jony wapnia wymiany zasad. Stwierdzenie lizofosfolipazy D w mikrosomach mózgu ma istotne znaczenie dla interpretacji badań nad syntezą plazmalogenów przy użyciu prekursora syntezy, eterowego lizofosfatydu.

ZNACZENIE BIOLOGICZNE PLAZMALOGENÓW ORAZ ZALEŻNOŚĆ MIĘDZY ZABURZONYM METABOLIZMEM PLAZMALOGENÓW A PROCESAMI PATOLOGICZNYMI

Na temat biologicznej funkcji plazmalogenów do chwili obecnej niewiele wiadomo. Niemniej jednak istnieje cały szereg prac na temat biologicznego działania długołańcuchowych alkoholi, które występują w lipidach eterowych.

Gottfried i Rapport [28] zaobserwowali, że hemolityczne działanie lizolecytyny zostaje w znacznym stopniu zmniejszone w przypadku, gdy reszta kwasu tłuszczowego zostanie zastąpiona przez resztę alkilową lub alkenylową.

Shah i Schulman [58] stwierdzili, że napięcie powierzchniowe cholinowych plazmalogenów jest znacznie niższe aniżeli związków dwuacylowych (lecytyny). Związane to jest z dipolowym efektem podwójnego wiązania enoloeterowego. Na podstawie różnic we właściwościach tych związków wysunięto hipotezę, że lipidy eterowe mogą reagować odmiennie z białkami błon w porównaniu ze związkami dwuacylowymi. Plazmalogeny mogą odgrywać istotną rolę w transporcie jonów metali ze względu na powinowactwo tych związków do wiązania winylowego.

Jeżeli chodzi o przyczynowy związek między patologicznymi zmianami tkanek a zawartością lub metabolizmem plazmalogenów, to stwierdzono przesunięcie stosunków poszczególnych łańcuchów alifatycznych w plazmalogenach w chorobach demielinizacyjnych, np. w mózgu ludzi chorych na stwardnienie rozsiane [4].

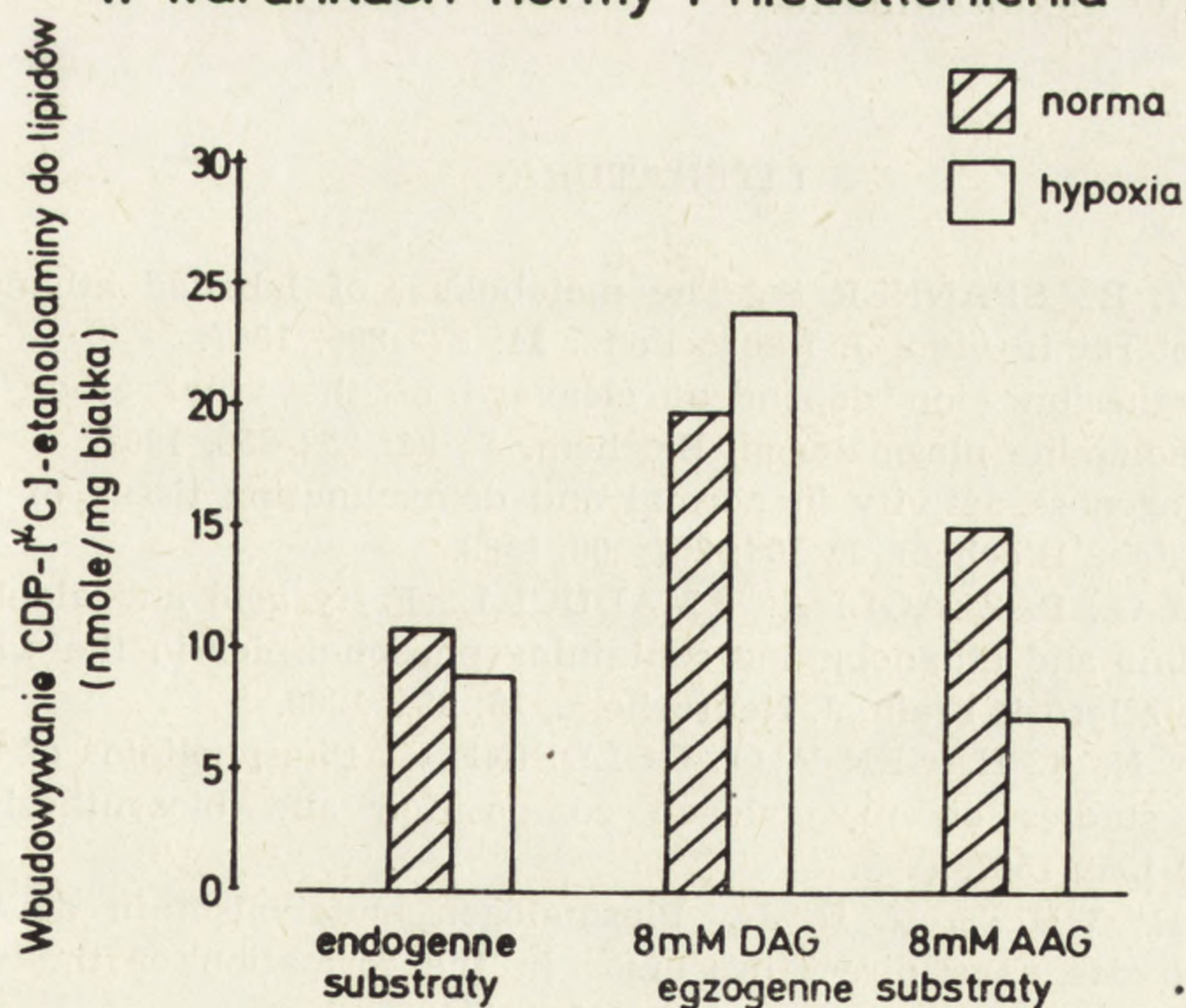
McMartin stwierdził 67% wzrost aktywności plazmalogenazy w móz-

gu psów ze zmianami demielinizacyjnymi w przebiegu nosówki. Wzrost aktywności plazmalogenazy, a więc hydroliza plazmalogenów, doprowadza do akumulacji lizofosfatydów etanoloaminowych, które mogą być odpowiedzialne za destrukcję błon plazmatycznych oligodendrocytów [35].

Blank i wsp. [12] zwrócili uwagę na możliwą rolę plazmalogenów w metabolizmie wielonienasyconych kwasów tłuszczowych. W jądrach szczurów utrzymywanych na diecie z niedoborem „niezbędnych” nienasyconych kwasów tłuszczowych stwierdzono, że kwas ^3H arachidonowy jest metabolizowany aktywniej w dwuacylowych fosfolipidach aniżeli w eterowych fosfolipidach. Badacze ci uważają, że plazmalogeny mogą być ważnym magazynem tego kwasu będącego z kolei prekursorem dla syntezy prostaglandyn.

Strosznajder i wsp. [76] zaobserwowali obniżenie wbudowywania CDP — [^{14}C] etanoloaminy do fosfolipidów etanoloaminowych w frakcji mikrosomalnej otrzymanej po niedotlenieniu zwierząt. Obserwowano to zarówno w obecności endogennych dwuglicerydów (21% inhibicji), jak również w obecności dwuglicerydu alkilowego (54% hamowanie). Nie obserwowano obniżenia stopnia wbudowywania CDP — [^{14}C] etanoloaminy do fosfolipidów etanoloaminowych w obecności dwuglicerydu dwuacylowego.

Aktywność fosfotransferazy etanoloaminowej w mózgu szczura w warunkach normy i niedotlenienia



Wykres 7. DAG — 1,2 dwuacyl glicerol, AAG — 1 - alkyl - 2 - acyl glicerol. Strosznajder i wsp. [76]

Biorąc pod uwagę badania Radomińskiej-Pyrek i wsp. [56] nad wpływem kwasów tłuszczowych na aktywność CDP-etanoloaminowej i CDP-cholinowej fosfotransferazy oraz wyniki badań, wskazujące na wzrost wolnych kwasów tłuszczowych w o.u.n. w niedotlenieniu, uważa się, że mogą one tak zmieniać konformacje fosfotransferaz, że enzymy te wchodzą aktywniej w reakcje z dwuglicerydem dwuacylowym. W mikrosomach z mózgu zwierząt poddanych uprzednio ischemii lub niedotlenieniu obserwowano poza tym wyraźne obniżenie aktywności dehydrogenazy plazmalogenowej [77]. Obniżenie poziomu lipidów eterowych w warunkach niedotlenienia o.u.n. może wywierać bezpośredni wpływ na zmiany strukturalno-funkcjonalne błon o.u.n. i aktywność niektórych enzymów. Wiadomo, że plazmalogeny etanoloaminowe i cholinowe są kompetycyjnymi inhibitorami fosfolipazy A₁ z mikrosomów. Fosfolipaza A₁ z neuronów katalizująca *in vitro* hydrolizę fosfatydylocholiny jest również kompetycyjnie hamowana przez plazmalogeny cholinowe [93, 94]. Obniżenie poziomu plazmalogenów etanoloaminowych w warunkach niedotlenienia powoduje zmiany ilościowe i jakościowe w składzie komponenty lipidowej błon. W wyniku tego dochodzi do zaburzenia prawidłowej równowagi między aktywnością fosfolipaz a ich kompetycyjnymi inhibitorami. Zjawisko to może pozostawać w bezpośrednim związku ze wzrostem aktywności tych enzymów w niedotlenieniu. Badania metabolizmu fosfolipidów błon, w tym również plazmalogenów etanoloaminowych, mogą być pomocne w wyjaśnieniu patomechanizmu zaburzeń o.u.n. w niedotlenieniu.

LITERATURA

- [1] ANSELL G. B., SPANNER S., The metabolism of labelled ethanolamine in the brain of rat *in vivo*, *J. Neurochem.*, **14**: 873-885, 1967.
- [2] — The magnesium-ion dependent cleavage of the vinyl ether linkage of brain ethanolamine plasmalogen, *Biochem. J.*, **94**: 252-258, 1965.
- [3] — Plasmalogenase activity in normal and demyelinating tissue of the central nervous system, *Biochem. J.*, **108**: 207-209, 1968.
- [4] ARNETOLI G., PAZZAGLI A., AMADUCI L., Fatty acid and aldehyde changes in choline and ethanolamine containing phospholipids in the white matter of multiple sclerosis brain, *J. Neurochem.*, **16**: 461, 1969.
- [5] BAUMANN N. A., HAGEN P. O., GOLDFINE H., Phospholipids of *Clostridium butyricum* studies on plasmalogen composition and biosynthesis, *J. Biol. Chem.*, **240**: 1559-1567, 1965.
- [5] BELL O. E., WHITE H. B. Jr., Plasmalogen metabolism in developing rat brain aldehydes as a direct precursor in the formation of the vinyl ether linkage, *Biochem. Biophys. Acta*, **164**: 441-444, 1968.
- [7] BICKERSTAFFE R., MEAD J. F., Metabolism of palmitaldehyde -¹⁴C — in the rat brain, *Biochem.*, **6**: 655-662, 1967.

- [8] — Metabolism of chmyl alcohol and phosphatidyl ethanolamine in the rat brain, *Lipids*, **3**: 317-320, 1968.
- [9] BIETH R., FREYSZ L., MANDEL P., Etude quantitative des divers composé phosphatidyl et phospatidal du cerveau de rat au cours de la croissance post - natale, *Biochim. Biophys. Acta*, **53**: 576-578, 1961.
- [10] BLANK M. L., WYKLE R. L., PIANTADOSI C., SNYDER F., The biosynthesis of plasmalogens from labeled O - alkyl - glycerols in Ehrlich ascites cells, *Biochim. Biophys. Acta*, **210**: 442-447, 1970.
- [11] BLANK M. L., SNYDER F., Long chain fatty alcohols in normal and neoplastic tissues, *Lipids*, **5**: 337-341, 1970.
- [12] BLANK M. L., WYKLE R. L., SNYDER F., The retention of arachidonic acid in ethanolamine plasmalogens of rat testes during essential fatty acid deficiency, *Biochim. Biophys. Acta*, **316**: 28-34, 1973.
- [13] CARR H. G., HAERLE H., EILER J. J., Phospholipid and plasmalogen synthesis in rat - brain homogenates, *Biochim. Biophys. Acta*, **70**: 205-207, 1963.
- [14] D'AMATO R. A., HORROCKS L. A., RICHARDSON K. E., Kinetic properties of plasmalogenase from bovine brain, *J. Neurochem.*, **24**: 1-5, 1975.
- [15] DEBUCH H., Über die Stellung des Aldehydes im Colaminplasmalogen aus Gehirn, *Z. Physiol. Chem.*, **314**: 49-50, 1959.
- [16] — Über die Stellung des Aldehydes im Colaminplasmalogen aus Gehirn, *Z. Physiol. Chem.*, **317**: 182-189, 1959.
- [17] — Über die Aldehyde aus den Gehirnen verschiedener Säugetiere, *Z. Physiol. Chem.*, **327**: 65-73, 1962.
- [18] DEBUCH H., FRIEDEMANN H., MÜLLER J., Über die Bildung der Plasmalogene zur Zeit der Myelinisierung bei der Ratte III, *Z. Physiol. Chem.*, **351**: 613-621, 1970.
- [19] DEBUCH H., MÜLLER J., FÜRNISS H., Über die Bildung der Plasmalogene zur Zeit der Myelinisierung bei der Ratte IV, *Z. Physiol. Chem.*, **351**: 984-990, 1971.
- [20] EICHBERG J., WHITTAKER V. P., DAWSON R. M. C., Distribution of lipids in subcellular particles of guinea pig brain, *Biochem. J.*, **92**: 91-000, 1964.
- [21] ELLINGBOE J., KARNOVSKY M. L., Origin of glycerol ethers, biosynthesis from labelled acetate, stearic acid, stearyl - aldehyd and stearyl alcohol, *J. Biol. Chem.*, **242**: 5693-5699, 1967.
- [22] ENG L. F., NOBEL E. P., The maturation of rat brain myelin, *Lipids*, **3**: 157, 1968.
- [23] ETZRODT A., DEBUCH H., Über den Einbau von ^{14}C Acetat in die Fettsäuren und Aldehyde der athanolaminhaltigen Phospholipide des Gehirns junger Ratten, *Z. Physiol. Chem.*, **251**: 603-612, 1970.
- [24] FREYSZ L., BIETH R., MANDEL P., Kinetics of the biosynthesis of phospholipids in neurons and glial cells isolated from rat brain cortex, *J. Neurochem.*, **16**: 1417-1424, 1969.
- [25] FRIEDBERG S. J., GREENE R. C., The synthesis of glyceryl - ether glycerol in *Tetrahymena pyriformis*, *Biochim. Biophys. Acta*, **164**: 602-603, 1968.
- [26] FÜRNISS H., STROSZNAJDER J., DEBUCH H., Über die Bildung der Plasmalogene zur Zeit der Myelinisierung bei der Ratte VI. Einbau von ^{14}C ^{32}P markiertem O - (1 - Alkyl - sn - glycerin - 3 - phosphoryl) äthanolamin zu verschiedenen Zeiten, *Z. Physiol. Chem.*, **354**: 697-704, 1973.

- [27] GILBERTSON J. R., KARNOVSKY M. L., Nonphosphatide fatty acyl esters of alkenyl and alkyl ethers of glycerol, *J. Biol. Chem.*, **238**: 893-897, 1963.
- [28] GOTTFRIED E. L., RAPPORT M. M., The biochemistry of plasmalogens II. Hemolytic activity of some plasmalogen derivatives, *J. Lip. Res.*, **4**: 57, 1963.
- [29] GRAY G. M., The phospholipids of ox spleen with special reference to the fatty acid and fatty aldehyde composition of the lecithin and kephalin fractions, *Biochem. J.*, **77**: 82-91, 1960.
- [30] GRAY G. M., MACFARLANE M. G., Composition of phospholipids of rabbit, pigeon and trout muscle and various pig tissues, *Biochem. J.*, **81**: 480-488, 1961.
- [31] HAGEN P. O., GOLDFINE H., Phospholipids of clostridium butyricum. III. Further studies on the origin of the aldehyde chains of plasmalogens, *J. Biol. Chem.*, **242**: 5700-5708, 1967.
- [32] HAMBERGER A., SVENNERHOLM L., Composition of gangliosides and phospholipids of neuronal and glial cell enriched fractions, *J. Neurochem.*, **18**: 1821-1829, 1971.
- [33] HAJRA A. K., Biosynthesis of alkyl-ether containing lipids from dihydroxyacetone phosphate, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **37**: 486-492, 1969.
- [34] HOGEN E. L., JOSEPH K. C., Composition of cerebral lipids in murine leukodystrophy. The quaking mutant, *J. Neurochem.*, **17**: 1209-1214, 1970.
- [35] HORROCKS L. A., D'AMATO R. A., KRAKOWSKA S., Elevation of plasmalogenase activity during demyelination due to canine distemper virus or to anti myelin antibody. Abstracts Fifth International Meeting of the ISN.
- [36] HORROCKS L. A., RADOMIŃSKA - PYREK A., Enzymic synthesis of ethanolamine plasmalogens from 1-alkyl-2-acyl-sn-glycero-3-(³²P)-phosphoryl ethanolamines by microsomes from rat brain, *FEBS Lett.*, **22**: 190-192, 1972.
- [37] KAPOULAS V. M., THOMPSON G. A., The formation of glyceryl ethers by free tetrahymena extracts, *Biochim. Biophys. Acta*, **187**: 594-597, 1969.
- [38] KATES M., ALLISON A. C., JAMES A. T., Phosphatides of human blood cells and their role in spherocytosis, *Biochim. Biophys. Acta*, **48**: 571-582, 1961.
- [39] KEENAN R. W., BROWN J. B., MARKS B. H., Plasmalogen and esterphospholipid biosynthesis in dog heart-lung preparations, *Biochim. Biophys. Acta*, **51**: 226-229, 1961.
- [40] KENNEDY E. P., Biosynthesis of complex lipids, *Federation Proc.*, **20**: 934-940, 1961.
- [41] KIYASU J. Y., KENNEDY E. P., The enzymic synthesis of plasmalogens, *J. Biol. Chem.*, **235**: 2590-2594, 1960.
- [42] KOREY S. R., ORCHEN M., Plasmalogens of the nervous system. I. Deposition in developing rat brain and incorporation of ¹⁴C isotope from acetate and palmitate into the unsaturated chain, *Arch. Biochim. Biophys.*, **83**: 381-389, 1959.
- [43] LANDS W. E. M., HART P., Metabolism of plasmalogen. III. Relative reactivities of acyl and alkenyl derivatives of glycerol-3-phosphorylcholine, *Biochim. Biophys. Acta*, **98**: 532-538, 1965.
- [44] MALINS D. C., Metabolism of glycerol ether containing lipids in dogfish (*squalus scanthias*), *J. Lipid. Res.*, **9**: 687-692, 1968.
- [45] — The biosynthesis of plasmalogens of glycerol ethers, *Biochem. J.*, **29P**, 1967.

- [46] McMARTIN D. N., HORROCKS L. A., KOESTNER A., Enzyme activities associated with the demyelinating phase of canine distemper. II. Plasmalogenase, *Acta Neuropath. (Berl.)*, **22**: 288–294, 1972.
- [47] McMURRAY W. C., Metabolism of phosphatides in developing rat brain. I. Incorporation of radioactive precursors, *J. Neurochem.*, **11**: 287, 1964.
- [48] — Metabolism of phosphatides in developing rat brain. II. Labelling of plasmalogens and other alkali stable lipids from radioactive cytosine nucleotides, *J. Neurochem.*, **11**: 315–326, 1964.
- [49] NORTON W. T., PODUSLO S. E., Neuronal perikarya and astroglia of rat brain: chemical composition during myelination, *J. Lipid Res.*, **12**: 84–90, 1971.
- [50] NUSSBAUM J. L., MANDEL P., La distribution des phospholipides dans les gaines de myeline, les mitochondries et les microsomes du cerveau de rat, *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **47**: 395, 1965.
- [51] OSWALD E. O., ANDERSON C. E., PIANTODOSI C., LIM J., Metabolism of alkyl glycerol ethers in the rat, *Lipids*, **5**: 611, 1970.
- [52] PALTAUF F., Biosynthesis of plasmalogens from alkyl and alkyl - acyl - glycerophosphoryl ethanolamine in the rat brain, *FEBS Letters*, **17**: 118–120, 1971.
- [53] — Plasmalogen biosynthesis in a cell - free system. Enzymic desaturation of 1 - 0 - alkyl(2 - acyl) glycerophosphoryl ethanolamine, *FEBS Lett.*, **20**: 79–82, 1972.
- [54] RADOMIŃSKA - PYREK A., HORROCKS L. A.: Enzymic synthesis of 1 - alkyl - 2 acyl - sn - glycerol - 3 - phosphorylethanolamines by the CDP - ethanolamine: 1 - radyl - 2 - acyl - sn - glycerol ethanolamine phosphotransferase from microsomal fraction of rat brain, *J. Lipid Res.*, **13**: 580–587, 1972.
- [55] RADOMIŃSKA - PYREK A., STROSZNAJDER J., DĄBROWIECKI Z., CHOJNACKI T., HORROCKS L. A., Enzymic synthesis of ether types of choline and ethanolamine phosphoglycerides by microsomal fraction from rat brain and liver, *J. Lipid Res.*, in press.
- [56] — Effects of free fatty acids on the enzymic synthesis of diacyl and ether types of choline and ethanolamine phosphoglycerides, *J. Lipid Res.*, **17**: 657–662, 1976.
- [57] RAPPORT M. M., LERNER B., The structure of plasmalogens. IV. Lipids in normal and neoplastic tissues of man and normal tissues of rabbit and rat, *Biochim. Biophys. Acta*, **33**: 319–325, 1959.
- [58] SHAH D. O., SCHULMAN J. H., Binding of metal ions to monolayers of lecithins, plasmalogen, cardiolipin and dicetyl phosphate, *J. Lip. Res.*, **6**: 341, 1965.
- [59] SCHMIDT G., FINGERMAN L., SPENCER W. A., THANNHAUSER S. J., Incorporation of ³²P - Orthophosphate into ester phospholipids plasmalogens, and sphingolipids of skeletal muscle and heart of intact rats, *Federation Proc.*, **18**: 318, 1959.
- [60] SCHMID H. H. O., MANGOLD H. K., Neutrale Plasmalogene und Alkoxydiglyceride in menschlichem Depotfett, *Biochem. Z.*, **346**: 13–25, 1966 b.
- [61] SCHMID H. H. O., TUNA N., MANGOLD H. K., The composition of 0 - alk - 1 - enyl - diglycerides and 0 - alkyl diglycerides of human subcutaneous tissue, *Z. Physiol. Chem.*, **348**: 730–732; 1967.
- [62] SCHMID H. H. O., BANDI P. C., MANGOLD H. K., BAUMANN W. J., Alkoxylipids. V. The isomeric monounsaturated substituents of neutral alko-

- xylipids and triglycerides of ratfish liver, *Biochim. Biophys. Acta*, **187**: 208-213, 1969.
- [63] SNYDER F., PFLEGER R. C., Metabolism of alphaalkoxy glycerol monoethers in rat liver in vivo and in vitro, *Lipids*, **1**: 328-334, 1966.
- [64] SNYDER F., WOOD R., The occurrence and metabolism of alkyl and alk-1-enyl ethers of glycerol in transplantable rat and mouse tumors, *Cancer Res.*, **28**: 972-978, 1968.
- [65] — Alkyl and alk-1-enyl ethers of glycerol in lipids from normal and neoplastic human tissues, *Cancer Rev.*, **29**: 251-257, 1969.
- [66] SNYDER F., WYKLE R. L., MALONE B., A new metabolic pathway: biosynthesis of alkyl ether bonds from glyceraldehyd-3-phosphate and fatty alcohols by microsomal enzymes, *Biochim. Biophys. Res. Commun.*, **34**: 315-321, 1969.
- [67] — The biosynthesis of alkyl ether bonds in lipids by a cellfree system, *Biochim. Biophys. Res. Commun.*, **34**: 40-47, 1969.
- [68] SNYDER F., BLANK M. L., MORRIS H. P., Occurrence and nature of 0-alkyl and 0-alk-1-enyl moieties of glycerol in lipids of Morris transplanted hepatomas and normal rat liver, *Biochim. Biophys. Acta* **176**: 502-510, 1969.
- [69] SNYDER F., BLANK M. L., MALONE B., WYKLE R. L., Identification of 0-alkyldihydroxyacetone phosphate, 0-alkyldihydroxyacetone and diacyl glyceryl ethers after enzymic synthesis, *J. Biol. Chem.*, **245**: 1800-1805, 1970.
- [70] SNYDER F., MALONE B., BLANK M. L., Enzymic synthesis of 0-alkyl bonds in glycerolipids, *J. Biol. Chem.*, **245**: 1790-1799, 1970.
- [71] — Requirement of cytidine derivatives in the biosynthesis of 0-alkyl phospholipids, *J. Biol. Chem.*, **245**: 4016-4018, 1970.
- [72] SPENER F., MANGOLD H. K., Composition of alkoxylipids of human heart and aorta, *J. Lipid Res.*, **10**: 609-613, 1969.
- [73] STAMMLER A.: Über die Verteilung der Acetalphosphatide im Zentralnervensystem des Menschen mit besonderer Berücksichtigung des Hypophysen-Hypothalamus - system, *Dtsch. Z. Nervenhk.*, **168**: 305, 1952.
- [74] STAMMLER A., DEBUCH H., Die quantitative Verteilung des Plasmalogens im Gehirn, *Z. Physiol. Chem.*, **296**: 80, 1954.
- [75] STROSZNAJDER J., RADOMIŃSKA - PYREK A., ŁAZAREWICZ J., HORROCKS L. A., Synthesis in vitro of 1-alkyl-2-acyl- and 1,2-diacyl-sn-glycero-3-phosphorylcholines and ethanolamines by neuronal, glial and synaptosomal fractions from adult brain, *J. of Neurochemistry*, in press.
- [76] STROSZNAJDER J., DĄBROWIECKI Z., RADOMIŃSKA - PYREK A., Effect of hypoxia on enzymic synthesis of diacyl and ether types of choline and ethanolamine phosphoglycerides in rat brain microsomes. Proceedings of International Symposium "Pathophysiological, Biochemical and Morphological Aspects of Cerebral Ischemia and Arterial Hypertension", Warszawa, 1975.
- [77] STROSZNAJDER J., DĄBROWIECKI Z., Enzymatic biosynthesis of ethanolamine plasmalogens in rat brain microsomal fraction under normoxia and oxygen deficiency, *Bull. Acad. Polon. Sci.*, 1976, in press.
- [78] STOFFEL W., LE KIM D., Studies on the biosynthesis of plasmalogens: on the stereospecificity of the biochemical dehydrogenation of the 1-0-alkyl glyceryl to the 1-0-alkyl-1'-enyl glyceryl ether bond, *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, **352**: 501-511, 1971.
- [79] SUN G. Y., HORROCKS L. A., Acyl and alk-1-enyl group compositions

- of the alk - 1 - enyl - acyl and the diacyl glycerophosphoryl ethanolamine of mouse and ox brain, *J. Lip. Res.*, **10**: 153-157, 1969.
- [80] TAKAHASHI T., SCHMID H. H. O., Long chain alcohols in mammalian tissues, *Chem. Phys. Lipids*, **4**: 243-246, 1970.
- [81] TEN - CHING LEE, WYKLE R. L., BLANK M. L., SNYDER F., Dietary control of stearly CoA and alkylacylglycerophosphorylethanolamine, *Bioch. Biophys. Research Communications*, vol. 55, **3**: 574-579, 1973.
- [82] THIELE O. W., SCHRÖDER H., von BERG W., Über die Phosphatide der Muskulatur mit besonderer Berücksichtigung der Plasmalogene, *Hoppe - Seyler's Z. Physiol. Chem.*, **322**: 147-157, 1960.
- [83] THOMPSON G. A., HANAHAN D. J., Origin of the glyceryl component of α - glyceryl ethers, *Arch. Biochem. Biophys.*, **96**: 671, 1962.
- [84] — Studies on the nature and formation of α - glyceryl ether lipids in bovine bone marrow, *Biochemistry*, **2**: 641, 1963.
- [85] THOMPSON G. A., The biosynthesis of ether containing phospholipids in the slug, *Arion ater*. I. Incorporation studies in vivo, *J. Biol. Chem.*, **240**: 1912, 1965.
- [86] — The biosynthesis of ether containing phospholipids in the slug, *Arion ater*. II. The role of glyceryl ether lipids as plasmalogen precursors, *Biochemistry*, **5**: 1290-1296, 1966.
- [87] — The biosynthesis of ether containing phospholipids in the slug, *Arion ater*. III. Origin of the vinylic ether bond of plasmalogens, *Biochim. Biophys. Acta*, **152**: 409-411, 1968.
- [88] VIGNAIS P. V., ZABIN I., Réduction enzymatique du palmitylcoenzym A en aldehydpalmitique, *Proc. Intern. Cong. Biochem.* 4 th. Vienna 1958, p. 78.
- [89] WELLS M. A., DITTMER J. C., A microanalytical technique for the quantitative determination of twenty four classes of brain lipids, *Biochemistry*, **5**: 3405-3418, 1966.
- [90] — A comprehensive study of the postnatal changes in the concentration of the lipids of developing rat brain, *Biochemistry*, **6**: 3169-3175, 1967.
- [91] WINTERFELD M., DEBUCH H., Die Lipoide einiger Gewebe und Organe des Menschen, *Z. Physiol. Chem.*, **345**: 11-21, 1966.
- [92] WOELK H., GORACCI G., PORCELLATI G., The action of brain phospholipases A₂ on Purified Specifically labelled 1,2 - diacyl -, 2 - acyl - 1 - alk - 1' - enyl - and 2 - acyl - 1 - alkyl - sn - glycerol - 3 - phosphorylcholine, *Z. Physiol. Chem.*, **355**: 75-81, 1974.
- [93] WOELK H., GORACCI G., GAITI A., PORCELLATI G., Phospholipase A₁ and A₂ activities of neuronal and glial cells of the rabbit brain, *Hoppe - Seyler's Z. Physiol. Chem.*, **354**: 729-736, 1973.
- [94] WOELK H., PORCELLATI G., Subcellular distribution and kinetic properties of rat brain phospholipases A₁ and A₂, *Hoppe - Seyler's Z. Physiol. Chem.*, **354**: 90-100, 1973.
- [95] WOOD R., HEALY K., Tumor lipids: biosynthesis of plasmalogens, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **38**: 205-211, 1970.
- [96] — Tumor lipids: biosynthesis of plasmalogens, *J. Biol. Chem.*, **245**: 2640-2648, 1970.
- [97] WOOD R., SNYDER F., Quantitative determination of alk - 1 - enyl and alkyl - glycerol ethers in neutral lipids and phospholipids, *Lipids*, **3**: 129-135, 1968.
- [98] WOOD R., HARLOW R. D., SNYDER F., Alkyl and alk - 1 - enyl, glyceryl

- ethers derived from various rat tissue phospholipids, *Biochim. Biophys. Acta*, **176**: 641-643, 1969.
- [99] WYKLE R. L., SNYDER F., Biosynthesis of a 0-alkyl analogue of phosphatidic acid and 0-alkyl-glycerols via 0-alkyl ketone intermediates by microsomal enzymes of Ehrlich ascites tumor, *J. Biol. Chem.*, **245**: 3047-3058, 1970.
- [100] WYKLE L.R., BLANK M. L., SNYDER F., The enzymic incorporation of arachidonic acid into ether containing choline and ethanolamine phosphoglycerides by deacylation — acylation reactions, *Biochim. Biophys. Acta*, **326**: 26-33, 1973.
- [101] WYKLE R. L., SCHREMMER J. M., A lysophospholipase D pathway in the metabolism of ether-linked lipids in brain microsomes, *J. Biol. Chem.*, **249**: 1742-1746, 1974.
- [102] WYKLE R. L., BLANK M. L., MALONE B., SNYDER F., Evidence for a mixed function oxidase in the biosynthesis of ethanolamine plasmalogens from 1-alkyl-2-acyl-sn-glycero-3-phosphorylethanolamine, *J. Biol. Chem.*, **247**: 5442-5447, 1972.

Otrzymano: 2 czerwca 1976.

Przyjęto: 3 lipca 1976.

Adres autorki: ul. Dworkowa 3, 00-784 Warszawa.

MECHANIZMY ODRZUCENIA PRZESZCZEPÓW

Marek JAKÓBISIAK

Zakład Transplantologii, Instytut Biostruktury Akademii Medycznej w Warszawie

Streszczenie. W odpowiedzi transplantacyjnej związanej z odrzuceniem przeszczepu allogenicznego można wyróżnić łuk dośrodkowy, obejmujący rozpoznanie przez komórki immunologicznie kompetentne biorcy antygenów transplantacyjnych dawcy, oraz łuk odśrodkowy, odpowiedzialny za zniszczenie przeszczepu. W łuku dośrodkowym dochodzi do proliferacji komórek immunologicznie kompetentnych i do kooperacji limfocytów T i B oraz makrofagów. W łuku odśrodkowym można wyróżnić wiele mechanizmów efektorowych, do najważniejszych należą: cytotoksyczność limfocytów T, uwarunkowana przez przeciwciała cytotoksyczność komórek posiadających receptor dla fragmentu Fc przeciwciał, zależna od dopełniacza cytotoksyczność przeciwciał krążących. Bardzo istotną rolę w mechanizmie odrzucenia przeszczepu odgrywają zmiany zachodzące w naczyniach przeszczepu, zainicjowane przez wspomniane procesy i prowadzące do wzrostu przepuszczalności naczyń, mikrozakrzepów i zmian obliteracyjnych.

WSTĘP

Tkanki można przeszczepiać w obrębie tego samego organizmu (przeszczepy autogeniczne), między osobnikami tego samego szczepu wsobnego lub między bliźniętami monozygotycznymi (przeszczepy izogeniczne), między osobnikami tego samego gatunku (przeszczepy allogeniczne) i gdy dawca i biorca należą do różnych gatunków (przeszczepy ksenogeniczne).

O ile przeszczepy auto- i izogeniczne nie ulegają odrzuceniu ze względu na identyczność antygenów transplantacyjnych dawcy i biorcy, o tyle przeszczepy allo- i ksenogeniczne wywołują w organizmie biorcy szereg reakcji immunologicznych prowadzących do odrzucenia przeszczepu.

Mechanizm odrzucenia przeszczepu nie został do końca poznany. Wyjaśnienie tego mechanizmu pozwoliłoby skuteczniej zapobiegać odrzucaniu przeszczepu, a także pomogłoby w odpowiedzi na pytanie, dla-

czego nowotwory złośliwe nie ulegają (w olbrzymiej większości przypadków) odrzuceniu przez gospodarza mimo istnienia pewnych różnic między nowotworem a gospodarzem w zakresie antygenów [118].

W odpowiedzi transplantacyjnej można wyróżnić: łuk dośrodkowy związany z rozpoznaniem obcych antygenów transplantacyjnych dawcy i łuk odśrodkowy związany z odrzuceniem przeszczepu.

ŁUK DOŚRODKOWY

Część limfocytów krąży stale w organizmie. Niektóre spośród tych limfocytów opuszczają krew przechodząc przez ścianę naczyń włosowatych żylnych i dostają się do tkanki łącznej wiotkiej [46]. „Patrolowanie” tkanki łącznej kończy się ich przechodzeniem do naczyń chłonnych doprowadzających, skąd przez węzły chłonne, naczynia chłonne odprowadzające i większe naczynia chłonne wracają ponownie do krwi.

Z chwilą przeszczepienia tkanki limfocyty krążące wchodzą w kontakt z antygenami transplantacyjnymi dawcy (kontakt obwodowy) [103] albo, jak sugerują inni badacze, antygeny dawcy docierają na komórkach dawcy lub w stanie wolnym do węzła chłonnego regionalnego (kontakt centralny) [8]. Prawdopodobnie dochodzi zarówno do kontaktu centralnego, jak i obwodowego. W większości przeszczepów (np. przeszczepy nerek, wątroby, serca, płuc) obieg krwi zostaje wznowiony zaraz po założeniu przeszczepu, w innych przeszczepach (np. przeszczepy skóry) krew zaczyna krążyć w przeszczepie dopiero w trzeciej dobie [105, 106]. Mimo to w tym ostatnim przypadku już kilkugodzinny kontakt przeszczepu z łożem przeszczepu bez wznowienia krążenia wystarcza do uczulenia biorcy. Przypisywano początkowo naczyniom chłonnym doprowadzającym główną rolę w łuku dośrodkowym odpowiedzi transplantacyjnej [8]. Badania przeszczepów połączonych z organizmem biorcy za pomocą szypuły naczyniowej pozbawionej naczyń chłonnych wykazały jednak, że przeszczepy takie ulegają odrzuceniu i tylko jest ono nieco opóźnione [108]. W łuku dośrodkowym pewną rolę wydają się odgrywać makrofagi [52]. Jest to o tyle zrozumiałe, że jedna z funkcji makrofagów polega na przekształcaniu antygenów w formy bardziej immunogenne [14] lub na „prezentacji” na swej powierzchni antygenów, które tym samym łatwiej pobudzają limfocyty [94, 115].

ZMIANY W NARZĄDACH LIMFATYCZNYCH I UOGÓLNIENIE ODPOWIEDZI TRANSPLANTACYJNEJ

Już pod koniec drugiej doby po założeniu przeszczepu obserwuje się w węzle chłonnym regionalnym w stosunku do danego przeszczepu odczyn blastyczny. W węzle tym pojawiają się liczne komórki blastycz-

ne [123, 124], a równolegle zaczyna wzrastać aktywność mitotyczna komórek węzła [122] i jego waga [96]. Zmiany te dotyczą głównie strefy przykorowej czyli grasiczozależnej węzła.

Podobne zmiany, choć mniej nasilone obserwuje się następnie w innych węzłach chłonnych i w śledzionie [1]. Wiąże się to prawdopodobnie z uogólnieniem odpowiedzi transplantacyjnej. Limfocyty od uczulonego zwierzęcia przenoszą na izogenicznego biorcę stan uczulenia, w wyniku którego odrzuca on w sposób przyspieszony założony mu przeszczep od tego samego dawcy [13]. Mimo zdolności do przenoszenia uczulenia, limfocyty takie w bardzo niewielkim stopniu uczestniczą w nacieku przeszczepu [63]. Istnieją więc podstawy, aby przypuszczać, że uczulone limfocyty „wciągają” do swoistej odpowiedzi immunologicznej inne limfocyty, które nie zetknęły się bezpośrednio z antygenem.

Wykryto co najmniej dwie substancje humoralne, które teoretycznie mogą odpowiadać za przenoszenie na inne limfocyty zdolności do swoistej odpowiedzi na dany antygen. Jedną z nich to „immunologiczne” RNA, które po wyizolowaniu z limfocytów od zwierzęcia C przenosi na limfocyty od zwierzęcia D zdolność do produkcji przeciwciał identycznych pod względem swoistości i markerów allotypowych z przeciwciałami produkowanymi przez limfocyty C [10]. „Immunologiczne” RNA w analogiczny sposób przenosi również zdolność do odpowiedzi typu komórkowego [79]. Na marginesie warto dodać, że pobudzone limfocyty mają zdolność do uwalniania do środowiska nowo syntetyzowanego DNA i może być ono następnie wychwytywane przez inne limfocyty [77]. Znaczenie tego ostatniego zjawiska nie jest znane. Inną substancją to czynnik przenoszenia (transfer factor) zdolny do przeniesienia nadwrażliwości typu późnego z jednego osobnika na drugiego [2]. W ostatnim czasie pojawiają się jednak doniesienia sugerujące, że czynnik przenoszenia ma własności nieswoistego adjuwantu zwiększającego już istniejącą reaktywność limfocytów [18]. Obok RNA wolnego od domieszek antygenowych w łuku dośrodkowym odpowiedzi transplantacyjnej mogą uczestniczyć kompleksy RNA z antygenami, których immunogenność w takich kompleksach prawdopodobnie wzrasta [43].

Nie można dotychczas odpowiedzieć na pytanie, w jakim stopniu wspomniane substancje humoralne uczestniczą w uogólnieniu odpowiedzi transplantacyjnej.

ŁUK ODŚRODKOWY

W mechanizmie odrzucenia przeszczepu uczestniczą zarówno swoiste przeciwciała humoralne skierowane przeciw antygenom transplantacyj-

nym dawcy [16], jak i komórki naciekające przeszczep, z których niektóre zdolne są do efektu cytotoksycznego w stosunku do komórek dawcy [109]. Oddziaływanie przeciwciał humoralnych i komórek naciekających jest ściśle ze sobą powiązane. Przeciwciała mogą warunkować efekt cytotoksyczny komórek naciekających lub mogą go blokować. Odrzucenie przeszczepu allogenicznego przez człowieka może mieć przebieg nadostry, ostry i przewlekły [86].

Wśród komórek obecnych w nacieku przeszczepu allogenicznego przeważają: limfocyty, makrofagi i granulocyty obojętnochłonne [41, 109]. Obecne są również: komórki tuczne [21] i plazmocyty [9, 41]. Limfocyty naciekające przeszczep allogeniczny wydają się być głównie limfocytami T [4, 12]. Większość limfocytów pojawia się w nacieku przeszczepu allogenicznego w układzie silnej niezgodności tkankowej między 4 a 6 dniem po założeniu przeszczepu [53]. Wiadomo natomiast z badań *in vitro*, że limfocyty wyizolowane z nacieku odrzucanego przeszczepu allogenicznego [109] lub pochodzące z węzłów chłonnych biorcy przeszczepu [25] mają zdolność do wywierania swoistego efektu cytotoksycznego w stosunku do komórek docelowych. Mechanizm tego efektu nie jest do końca poznany. Enzymy lizosomalne wydają się mieć udział w tym mechanizmie [24]. Większość badań sugeruje konieczność ścisłego kontaktu między limfocytym cytotoksycznym i komórką docelową [69]. Jeżeli po 6 - minutowym kontakcie obydwie komórki zostaną rozdzielone, komórka docelowa mimo to zostaje zniszczona w ciągu 3-4 godzin [69, 113]. Jeden limfocyt zdolny jest do zniszczenia wielu komórek docelowych [62, 70]. Substancje uszkadzające mikrofilamenty lub mikrotubule znoszą efekt cytotoksyczny limfocyta [57, 85].

Do wywierania efektu cytotoksycznego zdolne są również komórki mające na swojej powierzchni receptor dla fragmentu Fc przeciwciał [36, 88]. Są to niektóre limfocyty [90], a także makrofagi i granulocyty obojętnochłonne [38, 126]. Działają one na komórki docelowe opłaszczone przeciwciałami, które to przeciwciała nie wiążą dopełniacza i same przez się nie niszczą komórek docelowych. Przeciwciała warunkujące ten efekt wiążą się swoiście przez fragment Fab z komórką docelową i nieswoiście przez fragment Fc z receptorem komórki cytotoksycznej. Wydaje się, że makrofagi mogą niszczyć komórki docelowe również przy współdziałaniu pewnych humoralnych mediatorów uwalnianych przez limfocyty T, które to mediatory lokują się na makrofagach „uzbrajając” je [26, 44]. Oprócz tego makrofagi mogą prawdopodobnie uwalniać czynniki humoralne zdolne do swoistego [84] lub, jak sugerują inne badania, do nieswoistego [64, 74] niszczenia komórek docelowych. Makrofagi uwalniają również czynniki ułatwiające przeżycie [82] i proliferację [40]

limfocytów. Granulocyty obojętnochłonne oprócz zdolności do uwarunkowanego przez przeciwciała efektu cytotoksycznego mogą selektywnie uwalniać swe enzymy lizosomalne w wyniku fagocytozy kompleksów immunologicznych [48]. Podobne własności mają również makrofagi [17].

Wydaje się, że dla mechanizmu odrzucenia przeszczepu najważniejszy jest swoisty efekt cytotoksyczny limfocyta T (nie wymagający udziału przeciwciał). Pośrednim na to dowodem jest znaczna przewaga limfocytów T w nacieku odrzucanego przeszczepu allogenicznego [4], a także wydłużający przeżycie przeszczepów wpływ noworodkowej tymektomii. Naciek komórkowy może dominować w obrazie histologicznym ostrego odrzucenia allogenicznego przeszczepu nerki u człowieka [86].

LIMFOKINY

Wiadomo, że uczulone limfocyty T uwalniają w wyniku kontaktu ze swoistym antygenem szereg substancji humoralnych zwanych limfokinami [27]. Limfokiny uwalniane są również przez limfocyty pobudzone mitogenami takimi jak fitohemaglutynina i concanavalina A [89], a także przez limfocyty B [92] oraz komórki nielimfoidalnego pochodzenia [78, 110]. Do limfokin mogących mieć znaczenie dla mechanizmu odrzucenia przeszczepu zalicza się: działającą nieswoiście i niezależnie od dopełniacza limfotoksynę czyli cytotoksynę [39], czynnik mitogenny lub blastogenny (mitogenic factor — MF) [60], czynnik hamujący proliferację (proliferation inhibitory factor — PIF) [3], czynnik wzmagający przepuszczalność naczyń [83], czynniki chemotaktyczne dla makrofagów, granulocytów [19, 61] i limfocytów [20], czynnik zahamowania migracji makrofagów (macrophage inhibitory factor — MIF) [83], czynnik zahamowania migracji leukocytów (leukocyte inhibitory factor — LIF) [91], czynnik aktywujący makrofagi (macrophage activating factor — MAF) [114]. Do czynników tych można również zaliczyć interferon [45] i czynniki „uzbrajające” makrofagi [44], które również uwalniane są do środowiska przez pobudzone swoistym antygenem limfocyty.

Limfokiny najczęściej wykrywano *in vitro*. Nie wiadomo na pewno, jaki jest ich udział w mechanizmie odrzucenia przeszczepu, choć wykazano produkcję limfokin przez limfocyty wyizolowane z nacieku odrzucanego przeszczepu allogenicznego [47]. Można przypuszczać, że za pośrednictwem limfokin limfocyty mogą nie tylko wywierać efekt cytotoksyczny w stosunku do otaczających komórek (limfotoksyna), ale także mogą „ściągać” dzięki czynnikom chemotaktycznym inne komórki do miejsca nacieku, zatrzymywać je w miejscu nacieku przez czynniki za-

hamowania migracji, a także „uzbrajać” tak, że stają się one również komórkami cytotoksycznymi.

Wiadomo, że limfocyty T uwalniają w kontakcie ze swoistym antygenem czynniki, które nadają makrofagom zdolność do swoistego [44] i nieswoistego [26] efektu cytotoksycznego. Być może czynnikami tymi są: swoisty [31, 44] i nieswoisty [26] czynnik „uzbrajający” makrofagi. Są również sugestie, że czynniki swoisty i nieswoisty współdziałają ze sobą warunkując cytotoksyczność makrofagów [125].

Interferon obok znanych własności przeciwwirusowych hamuje proliferację komórek [73] i wzmacnia efekt cytotoksyczny limfocyta [67, 97].

PRZECIWCIAŁA HUMORALNE

U biorcy przeszczepu allogenicznego można wykryć różne swoiste przeciwciała skierowane przeciw antygenom transplantacyjnym dawcy. Są to: cytotoksyny, hemolizyny [16, 76], leukoaglutyniny [42, 120] i hemaglutyniny [42, 98]. Tradycyjnie uważało się, że przeciwciała humoralne nie mają istotnego udziału w mechanizmie odrzucenia przeszczepu allogenicznego. Nadwrażliwość na przeszczep łatwo było przenieść na innego osobnika przez limfocyty od uczulonego zwierzęcia [13], lecz nie przez surowicę [13]. Okazało się jednak, że humoralne przeciwciała odgrywają bardzo istotną rolę w odrzucaniu przeszczepów ksenogenicznych [119], a także przeszczepów allogenicznych przez uprzednio swoiście uczulonego biorcę [86, 117]. Pojawiają się również doniesienia o możliwości przeniesienia swoistej nadwrażliwości na przeszczep allogeniczny przez surowicę pobraną od biorcy, który odrzucił przeszczep [80]. Przeciwciała są odpowiedzialne za nadostre odrzucenie allogenicznego przeszczepu nerki u ludzi, którzy uprzednio uczuleni zostali swoiście w wyniku wielokrotnych ciąży, przetoczeń krwi lub przeszczepów skóry [86].

Przeciwciała cytotoksyczne wiążą dopełniacz i zabijają komórki docelowe. Istnieje również, jak wspomniano, grupa przeciwciał, które nie wiążą dopełniacza i same nie niszczą komórek docelowych, ale opłaszczając je warunkują efekt cytotoksyczny komórek mających receptor dla fragmentu Fc przeciwciała. Przeciwciała odpowiedzialne za efekt cytotoksyczny komórek należą głównie do klasy IgG, lecz także do klasy IgM [65].

U człowieka biorcy przeszczepu allogenicznego wykrywa się często przeciwciała przeciw erytrocytom szczura [71], a także erytrocytom owcy i krowy [59, 116]. Powstają one prawdopodobnie w wyniku podobieństwa antygenów obecnych na komórkach jądrzastych człowieka, erytrocytach niektórych ssaków i bakteriach gram ujemnych [71].

UŁATWIENIE IMMUNOLOGICZNE

Pewne przeciwciała wiążąc się z komórkami docelowymi nie tylko ich nie niszczą ani nie warunkują ich niszczenia przez komórki, lecz chronią je przed cytotoksycznym działaniem mechanizmów immunologicznych [81]. „Maskując” antygeny transplantacyjne opłaszczonej komórki hamują one obok łuku odśrodkowego również łuk dośrodkowy odpowiedzi transplantacyjnej [81]. Przeciwciała te odpowiedzialne są za tzw. ułatwienie immunologiczne i jak można się domyślać są błogosławieństwem dla transplantologii i przekleństwem dla onkologii. Wykryto je badając przeżycie przeszczepów nowotworów u zwierząt [58]. Obecnie, choć mechanizm ułatwienia immunologicznego nie został wyjaśniony całkowicie, wiadomo że występuje ono zarówno u biorców przeszczepów allogenicznych [112], jak i u chorych z rozwijającym się nowotworem [104]. Jest oczywiste, że występowanie tego zjawiska u osób posiadających nowotwór złośliwy jest niepożądane. Z drugiej strony, u biorców przeszczepów tkankowych ułatwienie immunologiczne wydaje się rzadko wpływać istotnie na przeżycie przeszczepów. Transplantologom udało się opracować na szczurach model swoistego uczulenia zwierzęcia tak, aby jego odpowiedź immunologiczna została skierowana głównie na produkcję przeciwciał odpowiedzialnych za ułatwienie immunologiczne. Gdy tak przygotowanemu zwierzęciu przeszczepi się nerkę od swoistego dawcy, przeżycie takiego przeszczepu jest wybitnie przedłużone [33, 66]. Z podobnym skutkiem można biernie stosować surowicę pobraną od odpowiednio uczulonego zwierzęcia [32, 107]. Dzięki tej metodzie można otrzymać trwałe przyjęcie allogenicznego przeszczepu nerki u szczura [35]. Istnieją również próby izolowania przeciwciał odpowiedzialnych za to zjawisko [55].

Niestety przeszczepy pewnych tkanek, np. skóry, są bardziej odporne na chroniący przeszczep wpływ ułatwienia immunologicznego [34, 75]. Nadal toczy się spór, czy przeciwciała za nie odpowiedzialne są różne, czy też identyczne z przeciwciałami odpowiedzialnymi za niszczenie komórek docelowych. Istnieją doniesienia sugerujące, że te same przeciwciała mogą w jednych okolicznościach chronić, a w innych warunkować niszczenie komórek docelowych przy udziale dopełniacza [54] lub przy udziale komórek [68, 121]. Przeciwciała odpowiedzialne za ułatwienie immunologiczne należą do klasy IgG [54].

Wydaje się, że w wielu czy też w większości przypadków efekt ułatwienia immunologicznego nie warunkują wolne przeciwciała, ale krążące kompleksy antygen-przeciwciało [30, 49]. Oddziałują one nie tylko „maskując” determinanty antygenowe komórek docelowych (działanie obwodowe) [56], ale także na komórki efektorowe (działanie cen-

tralne) [50]. Wykazano, że czynniki blokujące lub inne czynniki towarzyszące im mają zdolność pobudzania wzrostu guza [37]. Niektóre przeciwciała użyte w niskich stężeniach pobudzają proliferację komórek docelowych [99].

Istnieją również doniesienia, że makrofagi mogą w pewnych okolicznościach również chronić komórki docelowe analogicznie do ochronnego działania przeciwciał odpowiedzialnych za ułatwienie immunologiczne [50, 51].

Należy zaznaczyć, że dla celów immunoterapii nowotworów czynione są próby „przełamania” ułatwienia immunologicznego [6]. Istotną rolę mogą tu odgrywać „czynniki odblokowujące” [6].

ZMIANY W NACZYNIACH PRZESZCZEPU

Dla napływających drogą krwi przeciwciał i komórek efektorowych biorcy pierwszymi komórkami docelowymi dawcy są komórki śródbłonna naczyń przeszczepu. Dlatego też zmiany w naczyniach przeszczepu należą do najwcześniejszych zmian związanych z odrzuceniem przeszczepu i są odzwierciedleniem reakcji immunologicznych prowadzących do odrzucenia. Doniesienia sugerujące zastępowanie śródbłonna komórek naczyń przeszczepu przez komórki gospodarza w długotrwanie przeżywających przeszczepach nie znalazły potwierdzenia [15, 100].

Jednym z pierwszych objawów odrzucenia przeszczepu skóry jest rozszerzenie naczyń, a następnie zatrzymanie krążenia ze zmianami krwotocznymi [105, 106]. Nadostre odrzucenie nerki u człowieka rozpoczyna się już w ciągu 10 minut po wznowieniu krążenia krwi w przeszczepie [86]. W tętniczkach i w naczyniach włosowatych gromadzą się granulocyty obojętnochłonne, płytki krwi i tworzą się mikrozakrzepy, w których oprócz czynników krzepnięcia krwi można wykryć składniki dopełniacza [86, 117]. Może to wiązać się z obecnością przeciwciał cytotoksycznych wiążących dopełniacz.

W przewlekłym odrzuceniu nerki u człowieka obserwuje się zwężenie światła i pogrubienie ściany tętniczek i tętnic. Jest to spowodowane zmianami proliferacyjnymi i pogrubieniem błony wewnętrznej [86, 117]. Błona środkowa może ulegać zmianom zanikowym, a błona sprężysta wewnętrzna może tracić swą ciąłość [86]. Zmiany te wydają się być wynikiem uszkodzenia śródbłonna, stałego odkładania się na ścianach naczyń płytek krwi i włókniaka. Tworzące się w tych naczyniach mikrozakrzepy pokrywają się często śródbłonkiem [86].

Pojawienie się granulocytów obojętnochłonnych w naczyniach włosowatych kłębuszków nerkowych w nadostrym odrzuceniu przeszczepu można wytłumaczyć uwalnianiem czynników chemotaktycznych powsta-

łych w czasie aktywacji dopełniacza [28]. Inne czynniki powstałe w czasie aktywacji dopełniacza mogą być odpowiedzialne za przyleganie do uszkodzonych komórek śródbłonna granulocytów i płytek krwi. Wiadomo zaś, że granulocyty obojętnochłonne mogą być toksyczne w stosunku do opłaszczonych przeciwciałami komórek docelowych [38] i mogą uwalniać przyżyciowo swoje enzymy lizosomalne w wyniku kontaktu z podlegającymi fagocytozie kompleksami immunologicznymi [48]. Uszkodzone komórki śródbłonna i gromadzące się płytki krwi mogą uwalniać aktywatory krzepnięcia krwi. Tworzące się lokalnie kompleksy immunologiczne mogą aktywować czynnik kontaktu [29]. Z kolei w procesie krzepnięcia krwi plazmina może inicjować zarówno klasyczny, jak i alternatywny łańcuch aktywacji dopełniacza [28]. Za tym, że wspomniane zjawiska uczestniczą w mechanizmie odrzucenia przeszczepu przemawia obniżenie poziomu trombocytów w krwi obwodowej [5], odkładanie się w przeszczepie znakowanego fibrynogenu [95], a także podwyższenie poziomu produktów degradacji fibrynogenu w surowicy krwi [11] obserwowane w okresie odrzucenia przeszczepu.

Mikrozakrzepy nie są chyba najistotniejszym elementem mechanizmu odrzucenia, gdyż po pierwsze, nie zawsze obserwuje się je w naczyniach odrzucanego przeszczepu, a po drugie, leki przeciwzakrzepowe nie mają istotnego wpływu na przeżycie przeszczepów [22].

W niektórych przypadkach ostrego odrzucenia nerki u człowieka w okresie histologicznym dominują nacieki komórek jednojądrzastych wokół naczyń [86].

Przykład zmian obserwowanych w naczyniach odrzucanego przeszczepu ilustruje złożoność związanych z tym mechanizmem procesów, w których swoiste reakcje immunologiczne (zarówno typu humoralnego jak i komórkowego) bezpośrednio oddziałują na komórki dawcy i prowadzą do uwolnienia szeregu nieswoistych mediatorów, a także zapoczątkowania takich procesów jak krzepnięcie krwi i aktywacja dopełniacza.

REAKCJA PRZESZCZEPU PRZECIW GOSPODARZOWI

W każdym przeszczepie narządowym znajduje się na ogół dostateczna ilość limfocytów dawcy, aby w odpowiednio czułym układzie wywołać reakcję przeszczepu przeciw gospodarzowi (graft versus host — gvh). Nawet przeszczep skóry zawiera dostateczną ilość limfocytów, aby móc wywołać tą reakcję [7]. Reakcja gvh rozwija się w pełni w tych wypadkach, gdy biorca nie jest zdolny do odpowiedzi przeciw antygenom transplantacyjnym dawcy [93]. Klasycznie do sytuacji takiej dochodzi, gdy krzyżujemy przedstawicieli dwóch szczepów wsobnych, a następnie

przeszczepiamy komórki limfoidalne rodzica osobnikowi z pokolenia F1. Biorca nie odrzuca przeszczepu, ponieważ posiada sam zawarte w przeszczepie antygeny transplantacyjne. Limfocyty dawcy rozpoznają natomiast obcość antygenową gospodarza i inicjują odpowiedź immunologiczną — reakcję gvh.

W tranplantologii klinicznej reakcja gvh może się ujawnić, gdy biorca przeszczepu ma niesprawny układ immunologiczny (w wyniku choroby z niedoboru immunologicznego lub w wyniku naświetlenia promieniami jonizującymi, lub podania leków immunosupresyjnych). Jeżeli w przeszczepionym od allogenicznego dawcy narządzie znajduje się dostateczna ilość limfocytów, dochodzi do przewlekłej lub ostrej reakcji gvh, która w wypadku przeszczepów szpiku określana jest często jako choroba wtórna lub choroba homologiczna. Objawami tej choroby u człowieka są: podwyższona temperatura ciała, utrata wagi, wysypka, biegunka i splenomegalia [93]. Jest ona jedną z głównych przyczyn niepowodzeń przy przeszczepach szpiku i często prowadzi do zgonu. Większość limfocytów proliferujących i tworzących nacieki w czasie trwania reakcji gvh to komórki gospodarza (biorcy), a nie komórki dawcy [111]. Przypuszcza się, że komórki dawcy są inicjatorami odpowiedzi immunologicznej, do której wciągane są wtórnie komórki gospodarza [101, 102]. Dochodzi w wyniku tego do odpowiedzi autoimmunologicznej (autoagresyjnej) [87, 102]. U zwierząt z rozwijającą się reakcją gvh obserwuje się stan nieswoistej immunosupresji [72] i zwiększoną skłonność do spontanicznego powstawania nowotworów [23].

LITERATURA

- [1] ANDRÉ J. A., SCHWARTZ R. S., MITUS W. J., DAMESHEK W., The morphological responses of the lymphoid system to homografts, *Blood*, **19**: 313-334, 1962.
- [2] ASCHER M. S., SCHNEIDER W. J., VALENTINE F. T., LAWRENCE H. S., In vitro properties of leukocyte dialysates containing transfer factor, *Proc. Nat. Acad. Sci. US*, **71**: 1178-1182, 1974.
- [3] BADGER A. M., COOPERBAND S. R., GREEN J. A., Culture conditions affecting induction and release of lymphocyte produced proliferation inhibitory factor, *Cell. Immunol.*, **8**: 12-27, 1973.
- [4] BALCH C. M., WILSON C. B., LEE S., FELDMAN J. D., Thymus dependent lymphocytes in tissue sections of rejecting rat renal allografts, *J. Exp. Med.*, **138**: 1584-1590, 1973.
- [5] BALLANTYNE D. L., COBURN R. J., HAWTHORNE G. A., NATHAN P., Platelet levels during rat skin allograft rejection, *Transplantation*, **13**: 531-533, 1972.
- [6] BANSAL S. C., SJÖGREN H. O., Demonstration of "unblocking" serum activity in vitro in the Polyoma system and possible correlation with antitumor effects of antiserum in vivo, *Nature New Biol.* **233**: 76-78, 1971.

- [7] BARKER C. F., Immunologically competent passenger cells in mouse skin, *Transplantation*, **14**: 525-527, 1972.
- [8] BARKER C. F., BILLINGHAM R. E., The role of regional lymphatics in the skin homograft response, *Transplantation*, **5**: 962-966, 1967.
- [9] BARNES B. A., FLEX M. H., BURKE J. F., BARR G., Experimental pulmonary homografts in the dog. I. Morphological studies, *Transplantation*, **1**: 351-365, 1963.
- [10] BELL C., DRAY S., Conversion of homozygous lymphoid cells to produce IgM antibodies and IgG immunoglobulins of allelic lightchain allotype by injection of rabbits with RNA extracts, *Cell. Immunol.*, **5**: 52-65, 1972.
- [11] BENNETT N. M., BENNETT D., HOLLAND N. H., LUKE R. G., Serum fibrin degradation products in the diagnosis of transplantation rejection, *Transplantation*, **14**: 311-316, 1972.
- [12] BHAN A. K., REINISH C. L., LEVEY R. H., MCCLUSKEY R. T., SCHLOSSMAN S. F., T-cell migration into allograft, *J. Exp. Med.*, **141**: 1210-1215, 1975.
- [13] BILLINGHAM R. E., BRENT L., MEDAWAR P. B., The origin, strength and duration of actively and adoptively acquired immunity, *Proc. Roy. Soc. Lond., B*, **143**: 58-80, 1954.
- [14] BONA C., ROBINEAUX R., ANTEUNIS A., HEUGLIN C., ASTESANO A., Transfer of antigen from macrophages to lymphocytes. II. Immunological significance of the transfer of lipopolysaccharide, *Immunology*, **24**: 831-840, 1973.
- [15] de BONO D. P., Host repopulation of endothelium in human kidney transplants, *Transplantation*, **14**: 438-441, 1972.
- [16] CANTY T. G., WUNDERLICH J. R., Quantitative assessment of cellular and humoral responses to skin and tumor allografts, *Transplantation*, **11**: 111-116, 1971.
- [17] CARDELLA C. J., DAVIES P., ALLISON A. C., Immune complexes induce selective release of lysosomal hydrolases from macrophages, *Nature*, **247**: 46-48, 1974.
- [18] COHEN L., HOLZMAN R. S., VALENTINE F. T., LAWRENCE H. S., Requirement of precommitted cells as targets for the augmentation of lymphocyte proliferation by leukocyte dialysates, *J. Exp. Med.*, **143**: 791-804, 1976.
- [19] COHEN S., WARD P. A., In vitro and in vivo activity of a lymphocyte and immune complex - dependent chemotactic factor for eosinophils, *J. Exp. Med.*, **133**: 133-146, 1971.
- [20] COHEN S., WARD P. A., YOSHIDA T., BUREK C. L., Biologic activity of extracts of delayed hypersensitivity skin reaction sites, *Cell. Immunol.*, **9**: 363-376, 1973.
- [21] COLVIN R. B., DVORAK H. F., Basophils and mast cells in renal allograft rejection, *Lancet*, **1**: 212-213, 1975.
- [22] CONWAY H., STARK R. B., JOSLIN D., Effect of anticoagulant (dicumarol) on homologous skin grafts, *Plast. Reconst. Surg.*, **12**: 74-76, 1953.
- [23] CORNELIUS E. A., Induction of both host - and donor - type tumors as a result of the graft - versus - host - reaction, *Transplantation*, **13**: 589-591, 1972.
- [24] CURTIS G. L., RYAN W. L., Antisera to lysosomes. Effect on allograft rejection, *Transplantation*, **15**: 48-51, 1973.
- [25] DEGIOVANNI G., LEJEUNE G., Antibody response measured by a plaque

- assay, compared to cellular response after skin allograft in mice, *Europ. J. Immunol.*, **3**: 653-654, 1973.
- [26] DIMITRIU A., DY M., THOMSON N., HAMBURGER J., Macrophage cytotoxicity in the mouse immune response against a skin allograft, *J. Immunol.*, **114**: 195-199, 1975.
- [27] DUMONDE D. C., WOLSTENCROFT R. A., PANAYI G. S., MORLEY J., HOWSON W. T., "Lymphokines": Non-antibody mediators of cellular immunity generated by lymphocyte activation, *Nature*, **224**: 38-42, 1969.
- [28] EISEN H. N., Complement, [w] *Microbiology*, Harper and Row Publishers, New York, San Francisco, London, 1973, 511-526.
- [29] — Antibody-mediated (immediate-type) hypersensitivity, [w] *Microbiology*, Harper and Row Publishers, New York, San Francisco, London, 1973, 527-556.
- [30] ELKINS W. L., HELLSTRÖM I., HELLSTRÖM K. E., Transplantation tolerance and enhancement, *Transplantation*, **18**: 38-45, 1974.
- [31] EVANS R., GRANT C. K., COX H., STEELE K., ALEXANDER P., Thymus-derived lymphocytes produce an immunologically specific macrophage-arming factor, *J. Exp. Med.*, **136**: 1318-1322, 1972.
- [32] FABRE J. W., BATCHELOR J. R., Passive enhancement of renal allografts. Specificity of the enhancing antisera, *Transplantation*, **20**: 269-271, 1975.
- [33] FABRE J. W., MORRIS P. J., The effect of donor strain blood pretreatment on renal allograft rejection in rats, *Transplantation*, **14**: 608-617, 1972.
- [34] — Mechanism of specific immunosuppression of renal allograft rejection by donor strain blood, *Transplantation*, **14**: 634-640, 1972.
- [35] — Passive enhancement of homozygous renal allografts in the rat, *Transplantation*, **18**: 429-435, 1974.
- [36] FERRANNI M., MORETTA L., ABRIEL R., DURANTE M. L., Receptors for IgG molecules on human lymphocytes forming spontaneous rosettes with sheep red cells, *Europ. J. Immunol.*, **5**: 70-72, 1975.
- [37] FIDLER J., BRODEY R. S., BECH-NIEBEN S., In vitro stimulation-inhibition to spontaneous canine tumors of various histological types, *J. Immunol.*, **112**: 1051-1060, 1974.
- [38] GALE R. P., ZIGHELBOIM J., Polymorphonuclear leukocytes in antibody-dependent cellular cytotoxicity, *J. Immunol.*, **114**: 1047-1051, 1975.
- [39] GATELY M. K., MAYER M. M., The effect of antibodies to complement components C2, C3 and C5 on the production and action of lymphotoxin, *J. Immunol.*, **109**: 728-734, 1972.
- [40] GEIGER B., GALLILY R., GERY I., The effect of irradiation on the release of lymphocyte activating factor (LAF), *Cell. Immunol.*, **7**: 177-180, 1973.
- [41] GIBSON T., MEDAWAR P. B., The fate of skin homografts in man, *J. Anatomy*, **77**: 299-308, 1943.
- [42] GORER P. A., The antibody response to skin homografts in mice, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **59**: 365-373, 1955.
- [43] GOTTLIEB A. A., SCHWARTZ R. H., Antigen-RNA interactions, *Cell. Immunol.*, **5**: 341-362, 1972.
- [44] GRANT C. K., EVANS R., ALEXANDER R., Multiple effector roles of lymphocytes in allograft immunity, *Cell. Immunol.*, **8**: 136-146, 1973.
- [45] GREEN J. A., COOPERBAND S. R., KIBRICK S., Immune specific induction of interferon production in cultures of human blood lymphocytes, *Science*, **164**: 1415-1417, 1969.
- [46] HALL J., SCOLLAY R., SMITH M., Studies on the lymphocytes of sheep.

- I. Recirculation of lymphocytes through peripheral lymph nodes and tissues, *Europ. J. Immunol.*, **6**: 117-120, 1976.
- [47] HATLER B. G., ROCKLIN R. E., WARD P. A., RICKLES F. R., Functional features of lymphocytes recovered from a human renal allograft, *Cell. Immunol.*, **9**: 289-296, 1973.
- [48] HAWKINS P., Neutrophilic leukocytes in immunologic reactions in vitro, *Clin. Immunopathol.*, **2**: 141-152, 1974.
- [49] HAYAMI M., HELLSTRÖM I., HELLSTRÖM K. E., LANNIN D. R., Further studies on the ability of regressor sera to block cell-mediated destruction of *Rous sarcoma*, *Int. J. Cancer*, **13**: 43-53, 1974.
- [50] HERSEY P., MACLENNAN I., Two unconventional mechanisms for immunological enhancement, *Transplant. Proc.*, **4**: 277-280, 1972.
- [51] — Macrophage dependent protection of tumour cells, *Immunology*, **24**: 385-393, 1973.
- [52] HULLEY S. B., DVORAK H. F., WAKSMAN B. H., Effect of macrophages on primary immunization of lymph node cells against homografts in diffusion chambers, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **117**: 110-115, 1964.
- [53] JAKÓBISIAK M., Quantitative data concerning the development of the cellular infiltration of skin allograft in mice, *Transplantation*, **12**: 364-367, 1971.
- [54] JÄNSEN J. L. J., KOENE R. A. P., KAMP G. J. v, TAMBOER W. P. M., WIJDEVELD P. G. A. B., Isolation of pure IgG subclasses from mouse alloantiserum and their activity in enhancement and hyperacute rejection of skin allografts, *J. Immunol.*, **115**: 387-391, 1975.
- [55] JONES J., FELDMAN J. D., Reactions in vitro with target cells and subcellular fractions of enriched rat alloantibodies with enhancing activity, *Transplantation*, **12**: 114-120, 1971.
- [56] JONES J., PETER H. H., FELDMAN J. D., Binding in vivo of enhancing antibodies to skin allografts and specific allogeneic tumors, *J. Immunol.*, **108**: 301-309, 1972.
- [57] KALINA M., HOLLANDER N., The effect of cytochalasin B on effector-target cell interaction. Quantitative and ultrastructural study, *Immunology*, **29**: 709-719, 1975.
- [58] KALLIS N., BRYANT B. F., Factors determining homograft destruction and immunological enhancement in mice receiving successive tumour inocula, *J. Nat. Cancer Inst.*, **40**: 691-704, 1958.
- [59] KANO K., LOZA V., GERBASI J. R., MILGROM F., Studies on heterophile antibodies in transplantation sera, *Transplantation*, **19**: 20-26, 1975.
- [60] KASAKURA S., Heterogeneity of blastogenic factors produced in vitro by antigenically stimulated and unstimulated leukocytes, *J. Immunol.*, **105**: 1162-1167, 1970.
- [61] KAY A. B., AUSTEN K. F., Chemotaxis of human basophil leukocytes, *Clin. Exp. Immunol.*, **11**: 557-563, 1972.
- [62] KOREN H. S., AX W., FREUND-MOELBERT E., Morphological observations on the contact-induced lysis of target cells, *Europ. J. Immunol.*, **3**: 32-37, 1973.
- [63] KOSUNEN T. V., Radioautographic study of cellular mechanism in delayed hypersensitivity. IV. Distribution of injected lymph node, spleen, thymus and bone marrow cells, *Immunology*, **19**: 117-124, 1970.
- [64] KRAMER J. J., GRANGER G. A., The in vitro induction and release of

- a cell toxin by immune C57B1/1 mouse peritoneal macrophages, *Cell. Immunol.*, **3**: 88-100, 1972.
- [65] LAMON E. W., SKURZAK H. M., ANDERSSON B., WHITTEN H. D., KLEIN E., Antibody - dependent lymphocyte cytotoxicity in the murine sarcoma virus system: activity of IgM and IgG with specificity for Murine Leukemia Virus determined antigens, *J. Immunol.*, **114**: 1171-1177, 1975.
- [66] LIE T. S., EBATA H., KIM W. I., GRÜNN U., Active enhancement of rat kidney, *Transplantation*, **21**: 103-109, 1976.
- [67] LINDAHL P., LEARLY P., GRESSER I., Enhancement by interferon of the specific cytotoxicity of sensitized lymphocytes, *Proc. Nat. Acad. Sci. US*, **69**: 721-725, 1972.
- [68] MANTOVANI A., VEECHII A., SPREAFICO F., The attacker - cell ratio and serum effects on in vitro cell - mediated immunity, *J. Nat. Cancer Inst.*, **55**: 483-484, 1975.
- [69] MARTZ E., Early steps in specific tumor cell lysis by sensitized mouse T lymphocytes, *J. Immunol.*, **115**: 261-267, 1975.
- [70] — Multiple target cell killing by the cytolytic T lymphocyte and the mechanism of cytotoxicity, *Transplantation*, **21**: 5-11, 1976.
- [71] MCDONALD J. C., A heterophile system in human renal transplantation. I. Distribution of antigens and reactivity of antibodies, *Transplantation*, **15**: 116-122, 1973.
- [72] MCMASTER R., LEVY J. G., Immunosuppression of normal lymphoid cells by serum from mice undergoing chronic gvh disease, *J. Immunol.*, **115**: 1400-1403, 1975.
- [73] MCNEILL T. A., Inhibition of hemopoietic colony growth by interferon preparations from different sources, *Nature New Biol.*, **244**: 173-174, 1973.
- [74] MELSOM H., KEARNY G., GRUCA S., SELJELID R., Evidence for a cytolytic factor released by macrophages, *J. Exp. Med.*, **140**: 1085-1096, 1974.
- [75] MULLEN Y., HILDEMANN W., Characteristics of specific unresponsiveness toward kidney and skin allografts in adult rats inoculated at birth with allogeneic bone marrow or kidney cells across a strong H - 1 barrier, *Transplantation*, **20**: 281-290, 1975.
- [76] NORDIN A. A., CEROTTINI J. C., BRUNNER K. T., The antibody response of mice to allograft as determined by a plaque assay with allogeneic target cells, *Europ. J. Immunol.*, **1**: 55-56, 1971.
- [77] OLSEN I., HARRIS G., Uptake and release of DNA by lymphoid tissue and cells, *Immunology*, **27**: 973-987, 1974.
- [78] PAPAGEORGIOU P. S., HENLEY W. L., GLADE P. R., Production and characterization of migration inhibitory factor (MIF) by established lymphoid and non - lymphoid cell lines, *J. Immunol.*, **108**: 494-504, 1972.
- [79] PAQUE R. E., DRAY S., Monkey to human transfer of delayed hypersensitivity, *Cell. Immunol.*, **5**: 30-41, 1972.
- [80] PEDERSEN N. C., MORRIS B., The role of humoral antibody in the rejection of primary renal allografts in sheep, *J. Exp. Med.*, **140**: 619-630, 1974.
- [81] PHILLIPS S. M., STROM T. B., CORSON J. M., CARPENTER C. B., MERRILL P., Enhancing antibody: in vitro studies on mechanism of action upon the sensitization and effector arc, *Transplant. Proc.*, **5**: 577-580, 1973.
- [82] PIERCE C. W., KAPP J. A., WOOD D. D., BENACERRAF B., Immune responses in vitro. X. Functions of macrophages, *J. Immunol.*, **112**: 1181-1189, 1974.

- [83] PIOK E., TURK J. L., Interaction between sensitized lymphocytes and antigen in vitro: IV. Studies on the mechanism of release of skin reactive and macrophage migration - inhibitory factors, *Immunology*, **22**: 39-50, 1972.
- [84] PIPER C. E., MCIVOR K. L., Alloimmune peritoneal macrophages as specific effector cells: Charakterization of specific macrophage cytotoxin, *Cell. Immunol.*, **17**: 423-430, 1975.
- [85] PLAUT M., LICHTENSTEIN L. M., HENNEY C. S., Studies on the mechanism of lymphocyte - mediated cytolysis. 3. The role of microfilaments and microtubules, *J. Immunol.*, **110**: 771-780, 1973.
- [86] PORTER K. A., Histopatology in clinical renal transplantation, *Transplant. Proc., Supplement*, **6**: 79-84, 1974.
- [87] PTAK W., HANCZAKOWSKA M., SKOWRON - CENDRZAK A., Cytotoxic macrophage in graft versus - host reaction, *Transplantation*, **19**: 12-19, 1975.
- [88] RABELLINO E. M., METCALF D., Receptors for C3 and IgG on macrophage, neutrophil and eosinophil colony cells grown in vitro, *J. Immunol.*, **115**: 688-692, 1975.
- [89] REMOLD H. G., DAVID R. A., DAVID J. R., Charakterization of migration inhibitory factor (MIF) from guinea pig lymphocytes stimulated with concanavalin A, *J. Immunol.*, **109**: 578-586, 1972.
- [90] RESCH K., GELFAND E. W., PRESTER M., Antibody - mediated target cell lysis by nonimmune cells: the use of anti - immunoglobulin to distinguish effector cell populations, *J. Immunol.*, **112**: 792-803, 1974.
- [91] ROCKLIN R. E., Products of activated lymphocytes: leukocyte inhibitory factor (LIF) distinct from migration inhibitory factor (MIF), *J. Immunol.*, **112**: 1461-1466, 1974.
- [92] ROCKLIN R. E., DERMOTT R. P., CHESS L., SCHLOSSMAN S. F., DAVID J. R., Studies on mediator production by highly purified human T and B lymphocytes, *J. Exp. Med.*, **140**: 1303-1316, 1974.
- [93] ROITT I. M., *Essential Immunology*, Blackwell Scientific Publications, Oxford, London, Edinburgh, Melbourne, 1974, 183-189.
- [94] ROSENTHAL A. S., SHEVACH E. M., Function of macrophages in antigen recognition by guinea pig T lymphocytes. I. Requirement for histocompatible macrophages and lymphocytes, *J. Exp. Med.*, **138**: 1149-1212, 1973.
- [95] SALAMAN J. R., Renal allograft rejection in the rat studied with ¹²⁵J - fibrinogen, *Transplantation*, **14**: 74-78, 1972.
- [96] SCOTHORNE R. J., Studies on the response of the regional lymph node to skin homografts, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **64**: 1028-1039, 1957.
- [97] SCURKOVICH S. V., KLINOVA E. G., ALEKSANDROVSKY I. M., LEVINA N. V., ARKHIPOVA N. A., BULICHEVA T. I., Stimulation of transplantation immunity and plasma cell reaction by interferon in mice, *Immunology*, **25**: 317-322, 1973.
- [98] SHABART E. J., KODAMA H., HARROWER J. R., SACHIN I. N., BANKOWSKI R. A., Transplantation immunity and haemagglutinin response in mice immunized with allogeneic skin grafts or splenic preparations, *Transplantation*, **4**: 404-415, 1966.
- [99] SHEARER W. T., PHILPOTT G. W., PARKER C. W., Stimulation of cells by antibody, *Science*, **182**: 1357-1359, 1973.
- [100] SINCLAIR R. A., Failure of endothelial repopulation to explain prolonged renal allograft survival, *Transplant. Proc.*, **5**: 125-128, 1973.
- [101] SINGH N., SABBADINI E., SEHON A. H., Cytotoxicity in graft - versus -

- host reaction. I. Role of donor and host spleen cells, *J. Exp. Med.*, **136**: 39-48, 1972.
- [102] STREILEIN J. W., STONE M. J., GVH disease: unmasking of forbidden clones, *Transplant. Proc.*, **5**: 861-864, 1973.
- [103] STROBER S., GOWANS J. L., The role of lymphocytes in the sensitization of rats to renal homografts, *J. Exp. Med.*, **122**: 347-360, 1965.
- [104] TAMERIUS J., NEPOM J., HELLSTRÖM I., HELLSTRÖM K. E., Tumor-associated blocking factors: isolation from sera of tumor-bearing mice, *J. Immunol.*, **116**: 724-730, 1976.
- [105] TAYLOR A. C., LEHRFELD J. W., Determination of survival time of skin homografts in the rat by observation of vascular changes in the graft, *Plast. Reconst. Surg.*, **12**: 423-432, 1953.
- [106] — Definition of survival of homografts, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **59**: 351-360, 1955.
- [107] TILNEY N. L., BELL P. R. F., Studies on enhancement of cardiac and renal allografts in the rat, *Transplantation*, **18**: 31-37, 1974.
- [108] TILNEY N. L., FORD W. L., Host cell proliferation in response to skin allografts on alymphatic pedicles, *Cell, Immunol.*, **14**: 146-150, 1974.
- [109] TILNEY N. L., STROM T. B., MACOHERSON S. G., CARPENTER C. B., Surface properties and functional characteristics of infiltrating cells harvested from acutely rejecting cardiac allografts in inbred rats, *Transplantation*, **20**: 323-330, 1975.
- [110] TUBERGEN D. G., FELDMAN J. D., POLLOCK E. M., LERNER R. A., Production of macrophage migration inhibitory factor by continuous cell lines, *J. Exp. Med.*, **135**: 255-266, 1972.
- [111] VOLKMAN A., The host cell response in the local graft-versus-host reaction induced in the kidneys of F1 rats by parental thoracic duct lymphocytes, *J. Exp. Med.*, **136**: 21-38, 1972.
- [112] VRIESMAN van P. J. C. B., SWAHEN-SIERAG L., VLEK L. F. M., Cytotoxic and enhancing properties of early γ M alloantibodies elicited by first set renal allografts, *Transplantation*, **20**: 385-392, 1975.
- [113] WAGNER H., RÖLLINGHOFF M., T cell-mediated cytotoxicity: discrimination between antigen recognition, lethal hit and cytolysis phase, *Europ. J. Immunol.*, **4**: 745-750, 1974.
- [114] WAHL S. M., WILTON J. M., ROSENSTREICH D. L., OPPENHEIM J. J., The role of macrophages in the production of lymphokins by T and B lymphocytes, *J. Immunol.*, **114**: 1296-1301, 1975.
- [115] WALDRON J. A., HORN R. G., ROSENTHAL A. S., Antigen-induced proliferation of guinea-pig lymphocytes in vitro: obligatory role of macrophages in recognition of antigen by immune T-lymphocytes, *J. Immunol.*, **111**: 58-64, 1973.
- [116] WALLER M., PIERCE J. C., LEE H. M., LEVINSON H. J., Humoral antibody responses following transplantation in man, *Transplantation*, **19**: 210-218, 1975.
- [117] WILLIAMS G. M., Clinical aspects of allograft rejection, *Transplant. Proc., Supplement*, **6**: 71-77, 1974.
- [118] WILLIAMS W. H., KRUEGER R. G., Tumor-associated transplantation antigens, *J. Nat. Cancer Inst.*, **49**: 1613-1620, 1972.
- [119] WINN H. J., BALDAMUS C. A., JOOSTE S. V., RUSSELL P. S., Acute

- destruction by humoral antibody of rat skin grafted to mice, *J. Exp. Med.*, **137**: 893-910, 1973.
- [120] YOUNG R. M., HOPKINS J. P., ESPARZA A., Humoral aspects of skin transplantation in the rabbit, *Amer. J. Pathol.*, **43**: 227-242, 1963.
- [121] YUTOKU M., SENOH H., MATSUOKA Y., KITAGAWA M., Suppression and enhancement of allografted tumour, *Immunology*, **26**: 623-637, 1974.
- [122] ZALESKI M., RYMASZEWSKA T., DARZYNKIEWICZ Z., WŁODARSKI K., Autoradiographic studies of cells from lymph nodes draining the tissue graft area, *Bull. Acad. Polon. Sci.*, **13**: 43-47, 1965.
- [123] ZALESKI M., RYMASZEWSKA - KOSSAKOWSKA T., KOSSAKOWSKA - PAUL B., WŁODARSKI K., Cytodynamika pierwotnej odpowiedzi immunologicznej regionalnego węzła chłonnego, *Acta Physiol.*, **22**: 767-773, 1971.
- [124] ZALESKI M., RYMASZEWSKA T., KURNATOWSKI W., ŁOJEK T., Evaluation of the blastic reaction evoked by tissue grafts in regional lymph nodes, *Transplantation*, **2**: 207-211, 1964.
- [125] ZIEGLER F. G., LOHMANN - MATTHES M. L., FISCHER H., Studies on the mechanism of macrophage - mediated cytotoxicity, *Int. Archs. Allergy and Immun.*, **48**: 182-191, 1975.
- [126] ZIGHELBOIM J., BONAVIDA B., FAHEY J. L., Evidence for several cell populations active in antibody dependent cellular cytotoxicity, *J. Immunol.*, **111**: 1737-1742, 1973.

Otrzymano: 10 lipca 1976.

Przyjęto: 31 lipca 1976.

Adres autora: ul. Chałubińskiego 5, 00-613 Warszawa.

ŚCIANA KOMÓRKOWA GLONÓW (SINIC I ZIELENIC) — JEJ BUDOWA I FUNKCJA

Jan BURCZYK

Instytut Zootechniki, Pracownia Biochemii Stosowanej przy ZZD Grodziec Śl.

Streszczenie. Dokonano przeglądu aktualnego stanu badań nad budową ściany komórkowej glonów, przedstawicieli sinic i zielenic (ze szczególnym uwzględnieniem glonów z rzędu *Chlorococcales*). Omówiono podobieństwa i różnice budowy chemicznej oraz ultrastruktury ściany komórkowej tych glonów, nawiązując do filogenetycznego ich pokrewieństwa z bakteriami i roślinami wyższymi. Przedstawiono wpływ różnych czynników środowiskowych i procesu starzenia na ultrastrukturę ściany komórkowej. Szczególną uwagę poświęcono przyczynom odporności tych glonów na trawienie różnorodnymi enzymami. Wyrażono pogląd, że niezwykła odporność niektórych przedstawicieli zielenic może wynikać z występowania w ich ścianie komórkowej bardzo odpornej substancji — sporopolleniny, polimeru o charakterze izoprenoidowym, który może powstawać z karotenoidów występujących w ścianach komórkowych. Podkreślono możliwość stosowania metod immunologicznych do analizy składników występujących w ścianie komórkowej glonów. Praca ma być przyczynkiem ułatwiającym dalsze badania budowy i funkcji ściany komórkowej glonów.

W odróżnieniu od komórek zwierzęcych, których cytoplazma jest ograniczona jedynie błoną cytoplazmatyczną, komórki roślinne posiadają dodatkowe warstwy nałożone na zewnątrz tej błony — tworzą one ścianę komórkową SK (CW).

Bezpośredni kontakt glonów ze środowiskiem i stała konieczność reagowania na wahania takich czynników środowiskowych, jak pH, temperatura, promieniowanie i wilgotność, ukształtowały w trakcie ewolucji SK w kompleksowy system makrocząsteczek zdolny do pełnienia różnorodnych funkcji. SK spełniają rolę szkieletu nadającego komórce sztywność, a przez to charakterystyczny dla danego gatunku kształt, chronią ją przed rozerwaniem wskutek zmian ciśnienia osmotycznego i mechanicznym uszkodzeniom, zapewniają prawidłowy przebieg podziału ko-

mórkowego, spełniają funkcję rozpoznawczą. Leżąca pod nią błona cytoplazmatyczna jest odpowiedzialna za transport składników oraz regulację różnych procesów morfogenetycznych.

Szczególne zainteresowanie SK glonów wynika z perspektywy praktycznego wykorzystania bogactwa składników ich wnętrza komórek. Wiadomo, że przeszkodą na drodze wykorzystania tych składników jest szczególnie odporna SK zarówno na działanie enzymów trawiennych, jak i czynników chemicznych. Inny praktyczny aspekt zainteresowania SK wiąże się ze zdolnością sedymentacji i agregacji komórek glonów uzależnionej od występowania na ich powierzchni odpowiednich substancji oraz możliwością przyspieszenia tego procesu. Obecność substancji powierzchniowych determinuje także odporność lub wrażliwość poszczególnych szczepów na zakażenia czynnikami biologicznymi, np. fagami.

W ostatnich latach znacznie pogłębiła się wiedza o SK glonów dzięki zastosowaniu nowoczesnych metod pozwalających na uzyskiwanie czystych SK na skalę preparatywną oraz dzięki metodom biochemicznym i mikroskopii elektronowej.

Glony — będąc roślinami — zajmują w drzewie genealogicznymżywionego świata miejsce pośrednie między bakteriami a grzybami. Pokrewieństwo z tymi grupami systematycznymi nie jest dotąd wyczerpująco wytłumaczone. Przedwcześnie byłoby zatem mówić o biochemicznych konsekwencjach filogenetycznego pokrewieństwa.

Celem niniejszego rozważania nie będzie szczegółowe studium taksonomiczne, lecz próba przedstawienia ogólnego schematu budowy SK sinic i zielenic, podobnie jak dokonano tego w odniesieniu do bakterii gram - dodatnich i gram - ujemnych.

Rozróżniamy glony o stosunkowo prostej budowie zbliżonej do budowy bakterii — nie posiadających jądra (prokaryoty) — przykładem są sinice (*Cyanophyceae*) oraz organizmy posiadające jądra komórkowe (eukaryoty), zwane zielenicami (*Chlorophyceae*). SK obu typów glonów mają wielowarstwową budowę. Grubość SK wielokrotnie przewyższa grubość membrany cytoplazmatycznej.

ŚLUZY

Podobnie jak liczne bakterie, wiele glonów posiada śluzową otoczkę. Wytworzony śluz może się cechować różną konsystencją, od niemal galaretowatej — u organizmów nieporuszających się, do wodnistej — rozplywającej się i stale odnawiającej się masy — u poruszających się glonów jak *Hormogonium* i *Nostoc*. Ruch tych organizmów jest ściśle związany z wytwarzaniem śluzu cechującego się ultrastrukturą [11, 15, 59].

Ostatecznie nie rozstrzygnięto, czy śluz wytwarzany jest w gotowej postaci we wnętrzu komórki i następnie wydalany na zewnątrz, czy też powstaje on przez polimeryzację jego prekursorów w trakcie przechodzenia przez błonę i ścianę komórkową.

Śluz sinic posiada ultrastrukturę fibrylarną (fibrylle o średnicy od 3–10 nm). Dzięki spiralnemu ruchowi warstwy śluzowej [22] wytwarzanej wzdłuż całej powierzchni trichomu i dzięki sprężystemu odkształceniu się śluzu możliwe jest przesuwanie się trichomu glonów, np. *Oscillatoria* czy *Spirullina*, w stałym podłożu. Śluzy występują u licznych przedstawicieli sinic [22, 30, 36, 38, 60]. Grubość warstwy śluzowej waha się w granicach od 0,5 do 1,0 μm. Pod względem chemicznym śluzy są polisacharydami występującymi również we wnętrzu komórki [26, 36]. Bakteryjne śluzy zawierają często — obok obojętnych cukrów — kwasy uronowe lub kwas N - acetylneuraminowy. Budowa chemiczna śluzów jest determinowana genetycznie; jest ona niezależna od źródła węgla. U niektórych sinic, jak np. *Aphanotheca stagnina*, *Nostoc communae* czy *Spirullina platensis*, wytwarzanie śluzu może być tak intensywne, że całe trichomy glonu zostają zatopione w masie śluzu. Intensywność wytwarzania śluzu warunkuje skład pożywki.

OTOCZKI

Podobnie jak u licznych bakterii, zewnętrzną warstwę SK sinic cechuje wodnista, galaretowato - plastyczna konsystencja. Tą bezbarwną warstwę o nieznacznym kontraście w mikroskopie elektronowym nazywamy otoczką. Umożliwia ona przytwierdzenie się komórki do innych powierzchni oraz zaadsorbowanie fagów.

TABELA 1. Cukry wchodzące w skład zewnętrznej warstwy ściany komórkowej sinic [11]

Gatunek	Mannoza	Galaktoza	Glukoza	Ramnoza	Fukoza	Ksyloza	2-amino- 2-dezoksy-heptoza	Glukozamina	2-keto-3-de-zoksyoktoza
<i>Anabaena cylindrica</i>	+	+	+		+	+			
<i>Tolypothrix tenuis</i>	+	+	+			+			
<i>Phormidium foveolarum</i>	+		+						
<i>Anacystis nidulans</i>	+	+	+	+		+			
<i>A. nidulans</i>	+	+	+	+	+		+	+	+
<i>Anabaena variabilis</i>	+	+	+	+				+	

Otoczka staje się widoczna pod wpływem negatywnego barwienia barwnikami koloidalnymi, jak np. tuszu, czerwieni Kongo, nigrozyny [11]. Dla wybarwienia jej stosuje się czerwień rutenową, błękit metylenowy, błękit alcjanowy 8GX lub specyficzne fluoryzujące przeciwciała. Składnikami otoczek są zazwyczaj polisacharydy mogące zawierać kwasy uronowe, czasem także polipeptydy [53].

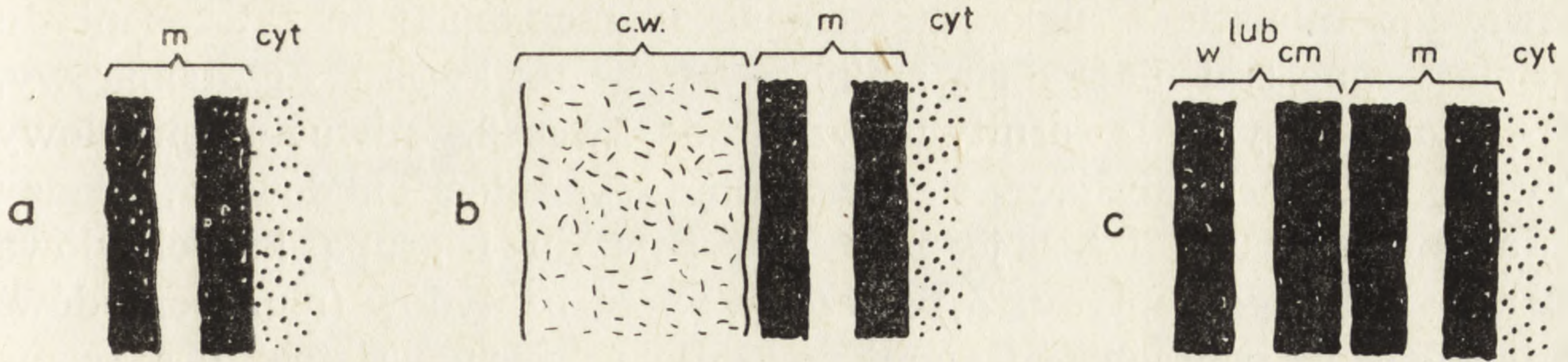
Komórki zielenic wydzielają aktywnie w czasie swego wzrostu do płynu hodowlanego wielkocząsteczkowe składniki. U *Scenedesmus* [9] są to glikoproteidy, pochodzące z SK. Rola tych składników w prawidłowym funkcjonowaniu komórki, mechanizm i dynamika sekrecji oraz czynniki wpływające na wydzielanie należą do najmniej poznanych zagadnień.

ŚCIANA KOMÓRKOWA SINIC

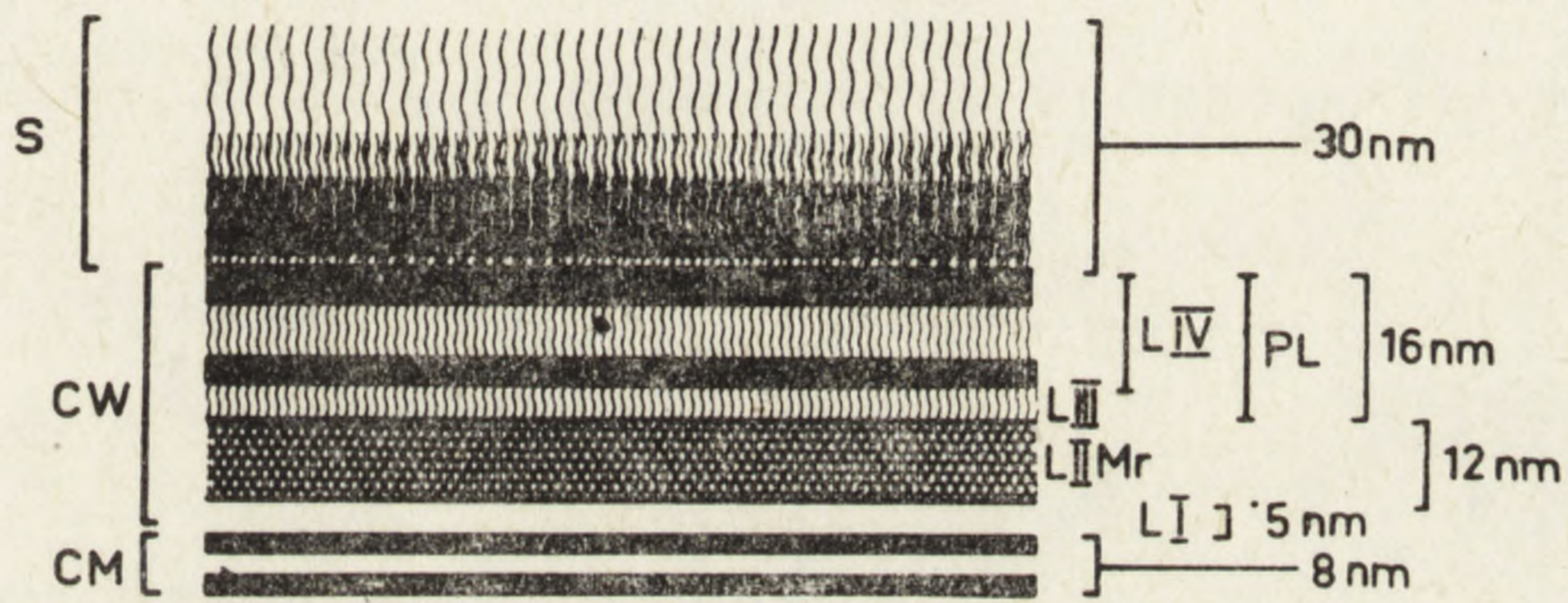
SK sinic przypomina pod względem składników bardziej SK bakterii niż roślin [11, 23]. Podobnie jak u bakterii, jej syntezę hamuje penicylina [17, 21]. Głównymi składnikami SK sinic są: mureina, polisacharydy, białka, lipidy [52] i lipopolisacharydy [11, 14]. Sugerowano także obecność pektyn [11]. Dotąd nagromadzono stosunkowo mało danych analitycznych o budowie SK sinic. SK można uwidocznic barwnikami tworzącymi strąty oraz przeciwciałami fluoryzującymi [11–13].

M u r e i n a (synonimy: mukopeptyd, peptydoglikan). Występowanie mureiny jest cechą charakterystyczną dotąd przebadanych SK bakterii i sinic [11]. Podobnie jak SK bakterii gram - ujemnych, mureina tworzy grubą warstwę (murein sacculus) otaczającą z zewnątrz błonę plazmatyczną. U bakterii gram - dodatnich mureina występuje w postaci trójwymiarowej — przestrzennie usieciowanej otaczającej komórkę. Przestrzenna struktura tej warstwy jest bardziej złożona niż u gram - ujemnych organizmów. Rys. 1b) przedstawia schematyczną budowę SK bakterii gram - dodatnich, rys. 1c gram - ujemnych, rys. 2 SK sinic, rys. 3 zielenic oraz rys. 4 SK roślin wyższych.

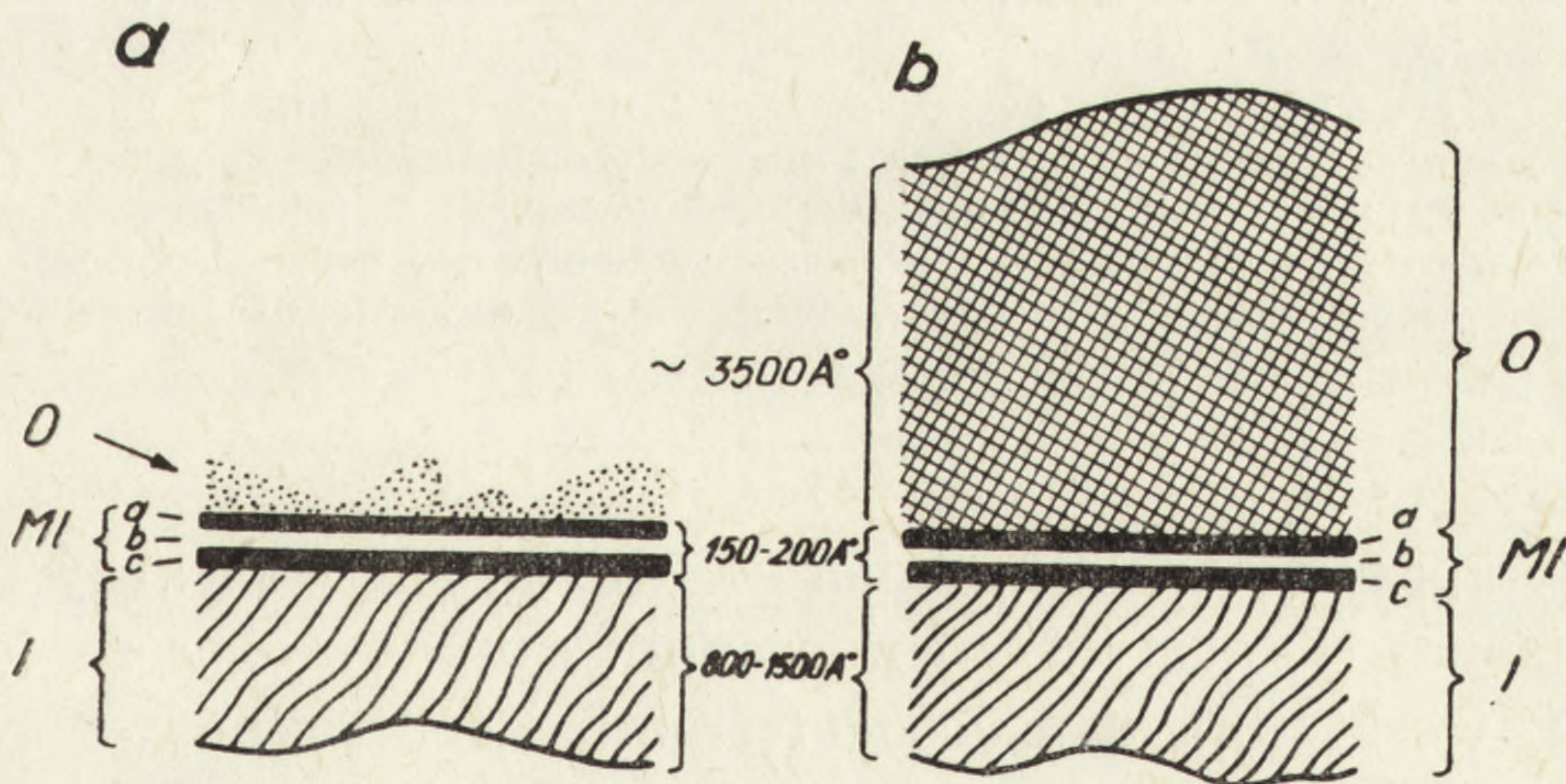
Szkielet mureinowy składa się z β - 1,4 - glikozydowo połączonych aminocukrów, a mianowicie N - acetylo - D - glukozaminy i jej eteru z kwasem mlekowym (kwasu muraminowego) tj. 2 - amino - 2 - dezoksy - 3 - 0 (α - D - carboxy - etylo) D - glukozy. Łańcuch polisacharydowy mureiny posiada stały skład i sposób wiązania. Do reszty kwasu muraminowego przyłączone są krótkołańcuchowe peptydy (przeważnie cztero-peptydy zwane też muropeptydami). Muropeptydy wzajemnie z sobą połączone tworzą rodzaj siateczki (rys. 8–10). W skład cztero-peptydów wchodzi następujące aminokwasy: L - lub D - alanina (występuje na pierwszym miejscu w łańcuchu), kwas mezo - dwuamino - pimelinowy (DAP) na



Rys. 1. a — Pojedyncza membrana (m) występująca na powierzchni niektórych bakterii i protoplastów. b — gruba amorficzna SK (CW) i pod nią leżąca błona cytoplazmatyczna (m), (u bakterii gram - dodatnich) c — wielowarstwowa struktura SK (CW) i pod nią leżąca membrana (m), (u bakterii gram - ujemnych) [52]



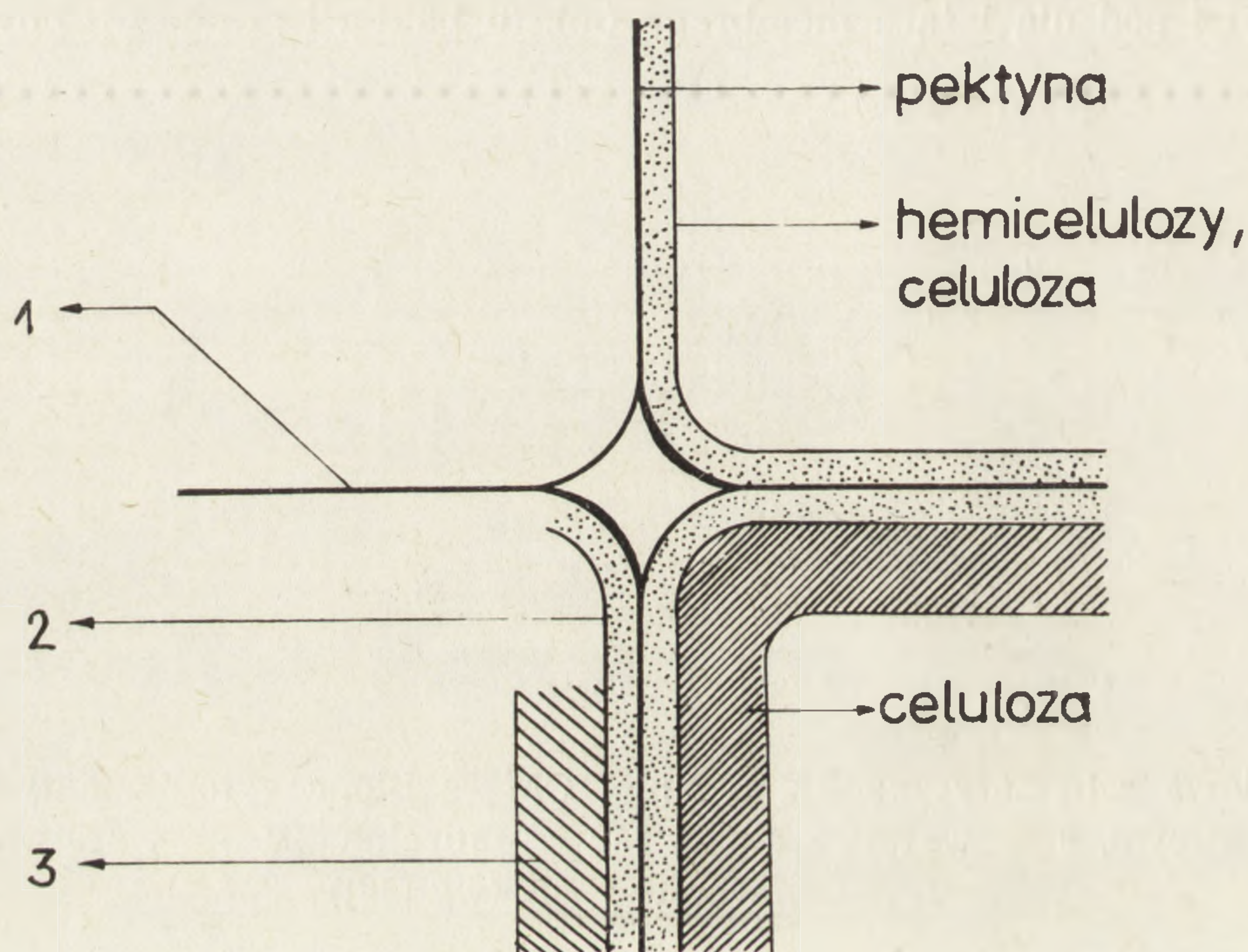
Rys. 2. Budowa schematyczna SK u sinic: CM — błona cytoplazmatyczna, CW — ściana komórkowa, s — warstwa śluzu, Mr — mureina, PL — warstwa plastyczna, L_{I-IV} warstwy SK (wg [36])



Rys. 3. Schematyczna budowa SK zielenic: a — *Scenedesmus obliquus*, szczep 633; b — *Scenedesmus quadricauda* wg [5, 9]

O — zewnętrzna warstwa (a) — prawdopodobnie warstwa śluzu, (b) — epistruktury, MI — środkowa warstwa (a, b, c — podwarstwy), I — wewnętrzna warstwa (warstwa zawierająca celulozę)

czwartym miejscu. Drugie i trzecie miejsce w łańcuchu cztero-peptydu zajmują inne zmieniające się aminokwasy, są to: kwas D - glutaminowy, L - lizyna, glicyna, D - ornityna względnie kwas 2,4 - dwuaminomasłowy (rys. 7). Muropeptydy łączą się wzajemnie wiązaniem amidowym, między ϵ - aminową grupą DAP jednego muropeptydu i grupą karboksylową alaniny drugiego peptydu. Z połączenia wielu peptydów (muropeptydów) z łańcuchami polisacharydowymi powstaje usieciowana struktura zwana murein sacculus (rys. 8). W mureinie gram - dodatnich bakterii występują ponadto dodatkowe wiązania w postaci mostków poliglicynowych;

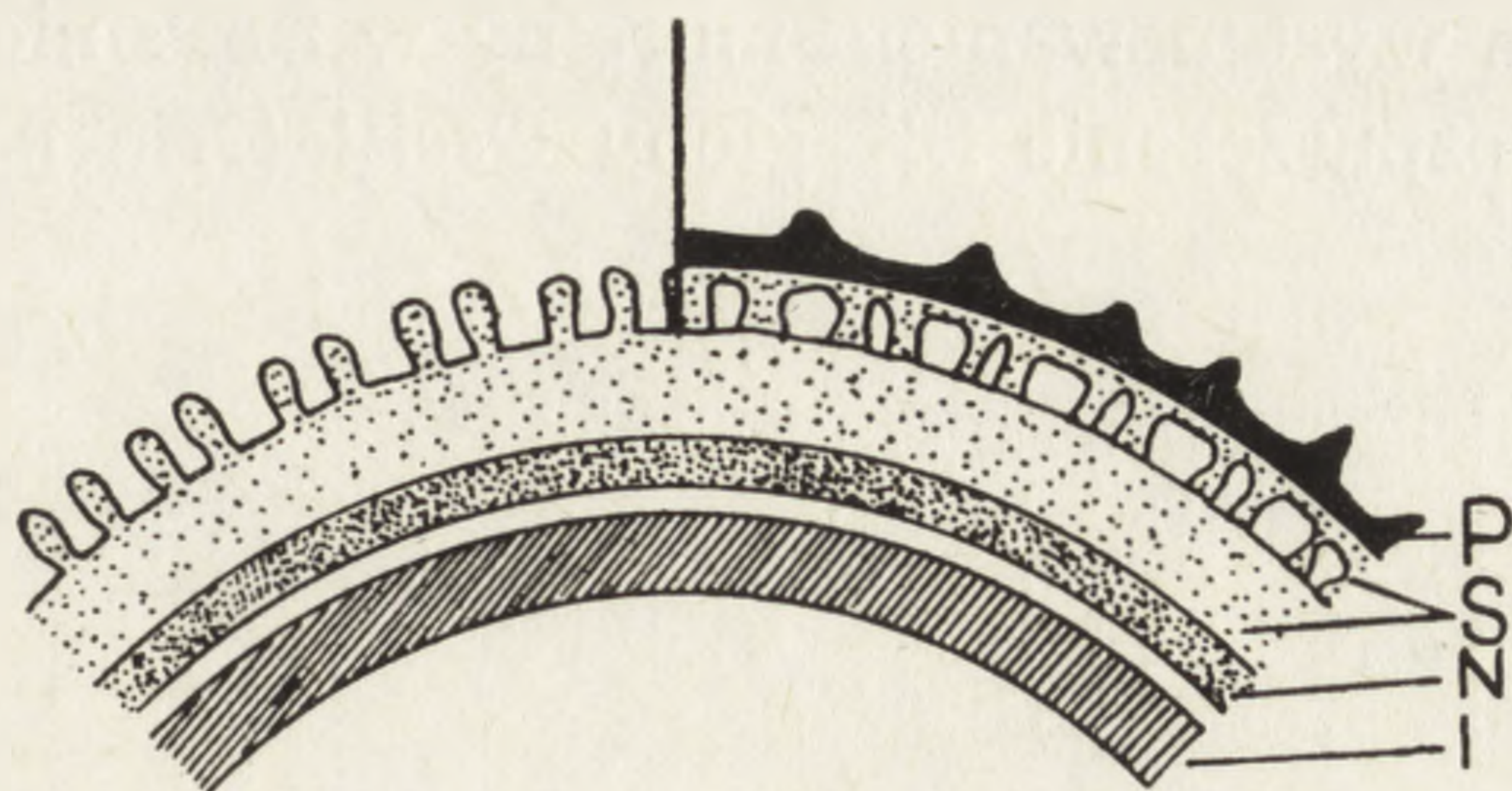


Rys. 4. Przekrój przez typową SK roślin wyższych

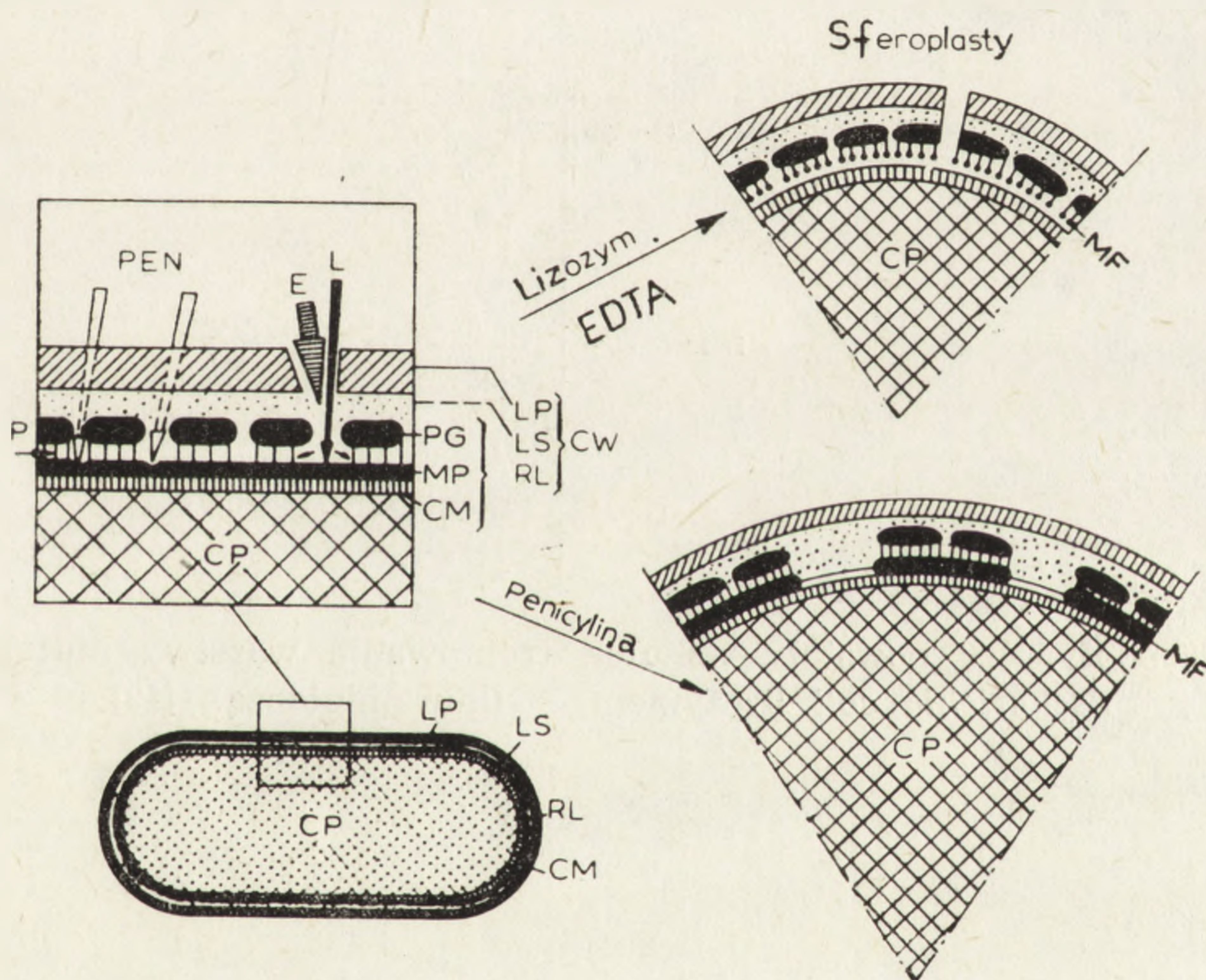
1 — Błazka śródkowa — jest pierwszą warstwą utworzoną po podziale komórki — zbudowana z galaretowatych związków pektynowych, później infiltrowana celulozą. 2 — Warstwa środkowa (ściana pierwotna) złożona z homo- i heteroglikanów typu pentozanów i heksozanów. Wśród tych hemiceluloz występują hemicelulozy uronowe. W mniejszej ilości występują w tej warstwie włókienka celulozowe. 3 — Warstwa celulozowa (ściana wtórna) — przeważają substancje wspierające (do 90% celulozy). Warstwa może zawierać inkrustacje w postaci ligniny lub adkrustacje (kutynę i suberynę)

mogą też być przyłączone wiązaniami kowalencyjnymi kwasy tejchonowe (kwasy glukozo - N - acetylo - mannozamino - uronowe), a za ich pośrednictwem D - woski (np. u *Mycobacterium*). Różnorodne wzory połączeń składników SK ściśle określają architektoniczne różnice SK gram - ujemnych i gram - dodatnich bakterii. Te ostatnie zawierają od 10 do 80% mureiny, natomiast SK bakterii gram - ujemnych jedynie do 10%. Pod wpływem swoistego enzymu — lizozymu następuje hydroliza mureiny (rys. 6, 9), której produktami u bakterii gram - dodatnich są oligomuro-

peptydy częściowo związane z kwasami teichonowymi i innymi składnikami SK, u gram-ujemnych bakterii powstają muropetydy. Liza



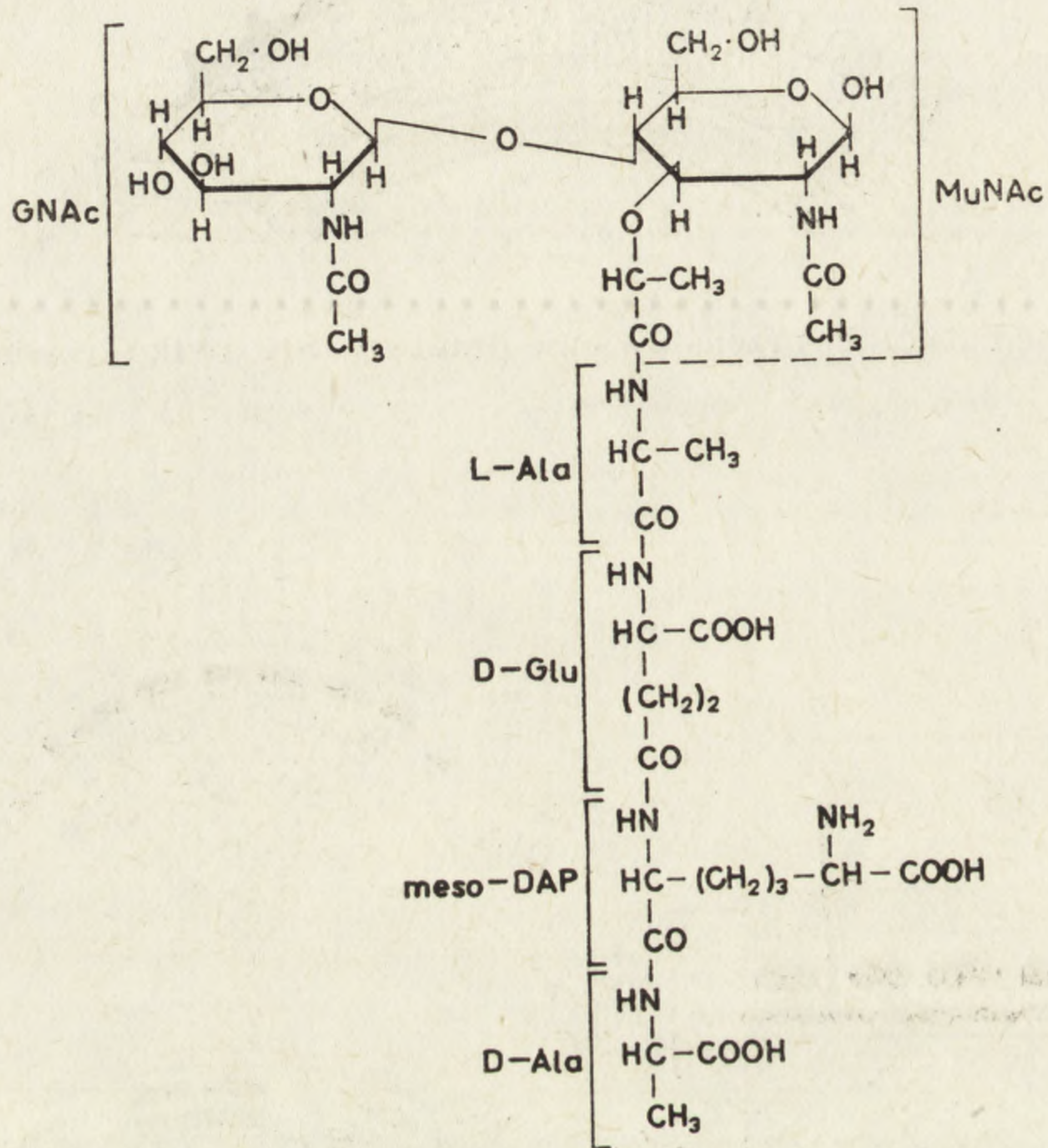
Rys. 5. Schematyczne przedstawienie budowy SK pyłku roślin wyższych
I — intyna, N — n-egzyna, S — egzyna, P — peryna, (wg [55])



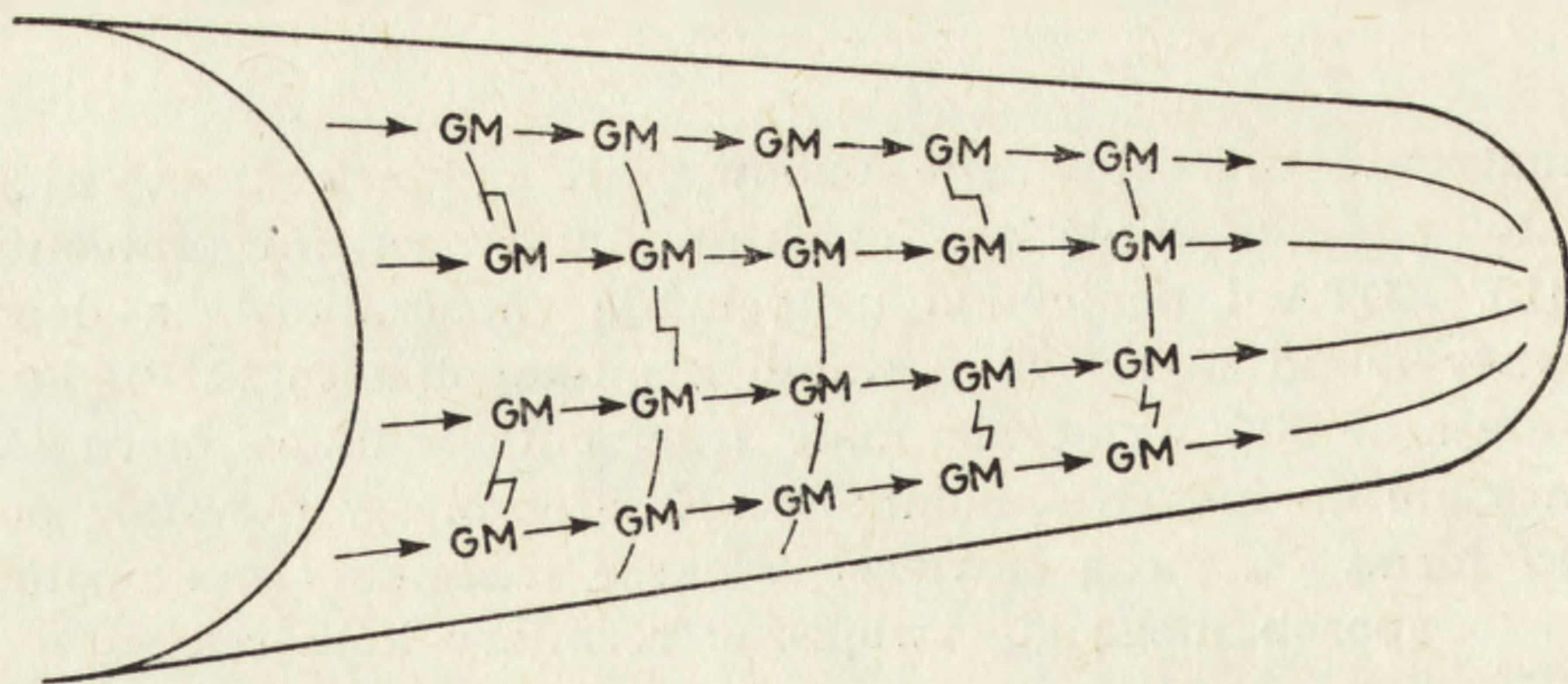
Rys. 6. Schematyczne przedstawienie budowy SK bakterii gram-ujemnych: Oddzielenie warstw może nastąpić po potraktowaniu enzymami proteolitycznymi (P) i lizozymem (L). EDTA i penicylina uzupełniają zapoczątkowaną depolimeryzację sztywnej warstwy (rigid layer) zbudowanej z mukopolimeru (MP). Po zadziałaniu lizozymu pozostają w SK wyłącznie małe fragmenty mukopolimeru (MF), przyłączone kowalencyjnie do innych składników SK. Sferoplasty powstałe pod wpływem penicyliny oraz formy - L mogą zawierać większe fragmenty mukopolimeru; w ten sposób mogą się zwiększać rozmiary komórek

LP — warstwa lipoproteidowa, LS — warstwa lipopolisacharydowa, RL — „rigid layer” (warstwa nadająca kształt); PG — drobiny białka, MP — mukopolimer, CM — błona cytoplazmatyczna, CP — cytoplazma, MF — fragmenty mukopolimeru, PEN — penicylina, L — lizozym, E — EDTA, P — enzymy proteolityczne (wg [43])

gram - dodatniej SK zachodzi znacznie łatwiej niż u organizmów gram - ujemnych. W przypadku tych ostatnich, rozkład lizozymem musi być poprzedzony współdziałaniem dodatkowych czynników chemicznych jak EDTA (rys. 6). Za występowaniem mureiny w SK sinic przemawia obecność DAP [64], rozpuszczenie SK glonu *Oscillatoria* pod wpływem lizo-

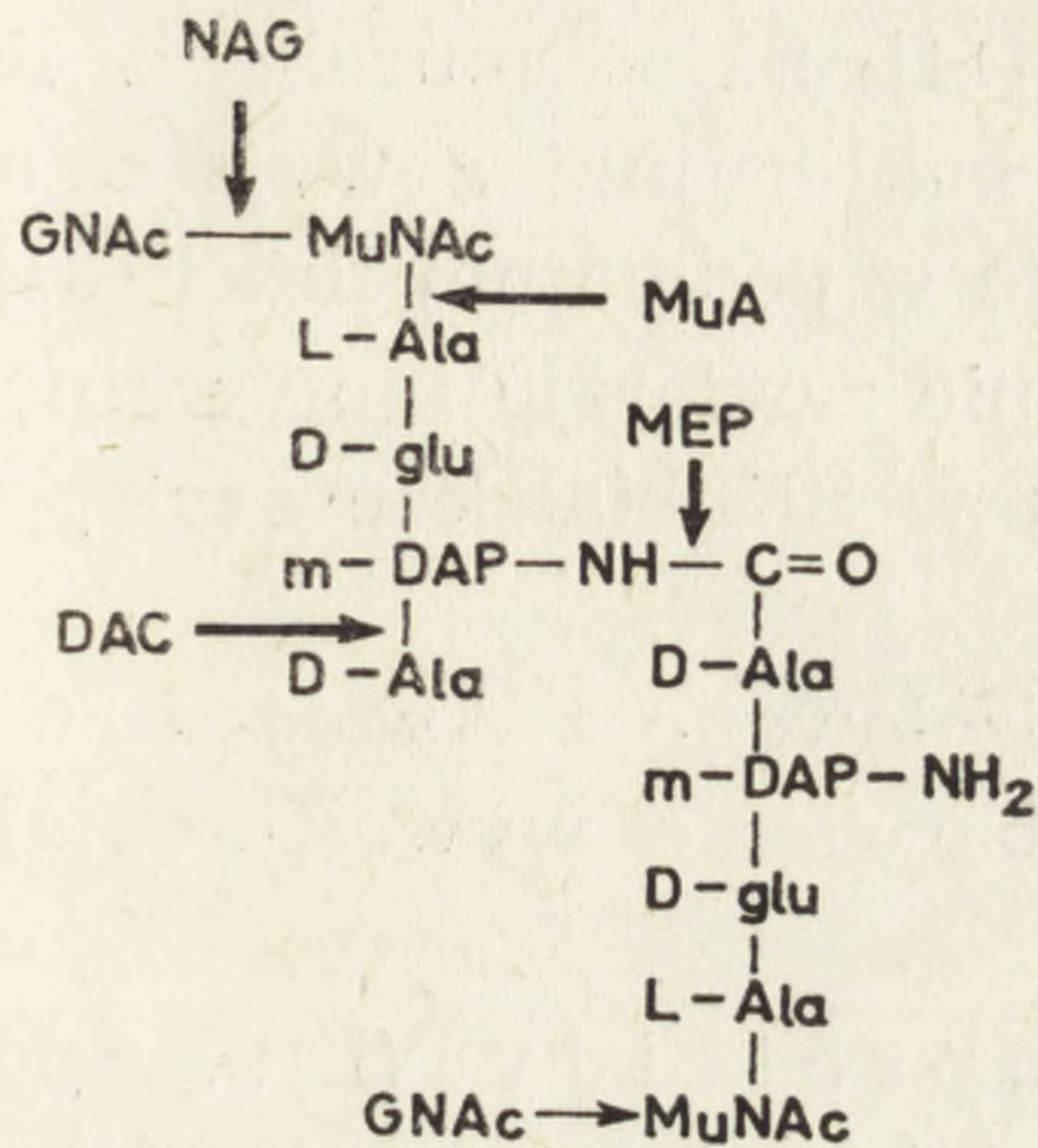


Rys. 7. Muropeptyd C6 powstały wskutek traktowania warstwy mureinowej SK *Escherichia coli* lizozymem — (muraminidazą), [13]

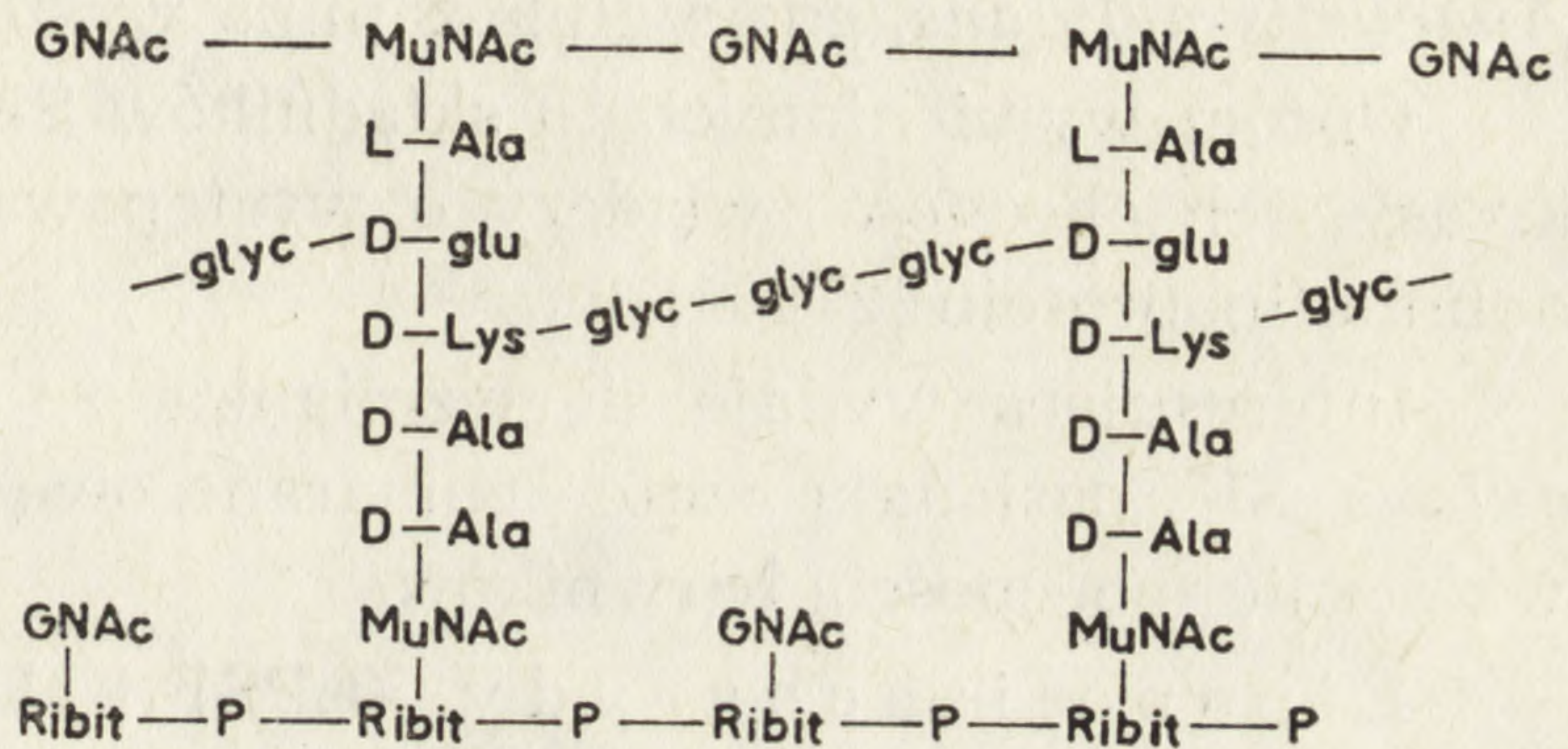


Rys. 8. Warstwa mureinowa (murein sacculus), czyli "rigid layer" SK *Escherichia coli* [13].

zymu [24] i obraz SK po zadziałaniu penicyliny [17, 21]. Udało się wykazać obecność mureiny w SK *Hormidium uncinatum* i zidentyfikowano ją z typem A często spotykanych murein u bakterii [21, 25].



Rys. 9. Muropeptyd C3 z SK *E. coli* wraz z enzymami rozszczepiającymi mureinę. NAG — β -N-Acetyloglukozamida, MuA — Muramyloamida, DAC — D-Alanino-Carboksy-peptydaza, MEP — Mu-roendopeptydaza, GNAc — N-Acetylo-glukozamina, MuNAc — N-Acetylo-muraminowy kwas



Rys. 10. Fragment polimeru gram-dodatnich SK utworzony z mureiny, mostków wieloglicynowych i kwasów ribotejchonowych; hipotetyczny model wg Stromingera i Rogersa cyt. [13]

Tabela 2 uwidacznia podobieństwo stosunków molarnych komponent wchodzących w skład mureiny różnego pochodzenia. U sinic, podobnie jak u gram-ujemnych bakterii, warstwa mureinowa bezpośrednio przy-

TABELA 2. Składniki mureiny ściany komórkowej sinic wyrażone w stosunkach molarnych [11]

Gatunek	NAc Mur	NAc Glc	ALA	Glu	DAP
<i>Anacystis nidulans</i>	1.07	1.34	2.4	1.52	1.0
<i>Chlorogloea fritschii</i>	+	+	+	+	+
<i>Anacystis nidulans</i>	0.9	1.9	2.0	1.1	1.0
<i>Phormidium uncinatum</i>	0.63	1.0	2.0	0.94	1.0
<i>P. foveolarum</i>	0.8	1.1	1.85	1.1	1.0
<i>Tolypothrix tenuis</i>	0.8	1.1	1.9	1.1	1.0

lega do zewnętrznej strony cytoplazmatycznej błony. Jej grubość wynosi u bakterii 2–3 nm czasem sięga 20 nm, u sinic natomiast warstwa ta jest znacznie grubsza. U *Oscillatoria* grubość tej warstwy osiąga 120–250 nm [36]; nadaje ona SK i komórce kształt (rigid layer) — warstwa L₂ na

rys. 2. Znaczna grubość tej warstwy oraz wrażliwość na działanie lizozymu [35] tłumaczy fakt, że sinice zachowują się w trakcie barwienia jak organizmy gram - dodatnie [35]. Udział mureiny w suchej masie SK wynosi 50% [21, 31]. Zawartość ta przemawia za ubytkiem innych składników SK, np. warstwy L₂ podczas izolacji SK [11]. Skład mureiny sinic pokrywa się w zasadzie ze składem mureiny bakteryjnej z wyjątkiem *Anacystis nidulans*, gdzie glukozamina występuje w podwójnej ilości [31].

Oprócz wymienionych tu składników SK sinic zawierają inne aminokwasy. Ich obecność świadczy o występowaniu w SK białek prawdopodobnie lipoprotein [21, 31].

Interesująca wydaje się wzmianka, że wyizolowane z *Anacystis nidulans* SK posiadają żółto - pomarańczowe zabarwienie wywołane najwidoczniej obecnością barwników.

Lipopolisacharydy (LPS) i lipoproteidy (LP). Spośród innych składników występujących w SK sinic należy wymienić polisacharydy, aminokwasy i kwasy tłuszczowe [12, 14, 16, 20, 31, 63] występujące najwidoczniej w postaci kompleksów jako LPS i LP. W skład typowych lipopolisacharydów bakterii gram - ujemnych, jak *E. coli*, wchodzi lipoid A i polisacharyd. Ten ostatni — zbudowany z pięciocukrów zajmuje centralne miejsce w cząsteczce. Pentasacharyd jest zbudowany z N - acetylo - D - glukozaminy, D - glukozy, D - galaktozy i hepatozy. Heptozą jest 2 - keto - 3 - dezoxyoktoza (KDO), wiąże ona lipoid A poprzez grupę fosforanową z polisacharydem. Obecność KDO wykazano u *Anacystis nidulans* [62]. Komponenta polisacharydowa posiada masę cząsteczkową ok. 20000–30000. Jest ona zbudowana z części centralnej (core) o wspólnej dla wielu gatunków budowie i części zewnętrznej będącej nosicielem cech antygenowych —O. Antygeny —O są związane z obecnością bardzo różnorodnych pod względem konfiguracji cukrów łańcuchów bocznych utworzonych z heksoz, heksozamin i innych rzadkich cukrów. Lipopolisacharydy (O - antygeny) zostały najwnikliwiej przebadane u rodziny *Enterobacteriaceae* i zebrane w tej dziedzinie dane mogą posłużyć jako pomocny model w badaniach struktury lipopolisacharydów sinic.

Z interesujących własności fizykochemicznych tych składników warto wspomnieć, że ich masa cząsteczkowa waha się w granicach $1 \cdot 10^6$ do $10 \cdot 10^6$. Podczas ekstrakcji ich z *Anacystis nidulans* układem fenol-woda przechodzą one do fazy wodnej. Opalizujący materiał uzyskany z tej fazy sedymentuje przy $50000 \times g$ tworząc nieregularne struktury świadczące o wielkiej masie cząsteczkowej substancji [31, 63]. W obecności 1% dodecylosiarczanu sodu (SDS) w buforze Tris [63] substancje te dają klarowny roztwór. Podczas filtracji przez kolumnę z żelem Sephadex

G - 75 i przy eluowaniu tym samym buforem Tris - SDS przechodzą one do objętości ekskluzyjnej. Po usunięciu SDS ponownie pojawia się opalescencja świadcząca o agregacji cząsteczek w micelle. Powyższa właściwość jest charakterystyczną dla LPS. Skład molowy LPS niektórych sinic przedstawiono w tabeli 2. Jest on bardzo zbliżony do analogicznego pochodzącego z bakterii należących do rodziny *Enterobacteriacee*. Uwagę zwraca niższa zawartość fosforanu oraz brak heptozy. LPS wyizolowane z *Anacystis nidulans* zawierają 30–40% lipidów i około 60% polisacharydów. W skład komponenty lipidowej wchodzi glikozamina i kwasy tłuszczowe (C 20 : 0, C 18 : 2, C 16 : 0, C 12 : 0 i C 14 : β OH). W przeciwieństwie do bardzo toksycznych własności LPS z rodziny *Enterobacteriacee*, LPS sinic wykazywały nieznaczną toksyczność [63]. Substancje te można wyizolować z SK lub całych komórek, świadczy to o tym, że są one zlokalizowane na ich powierzchni [63]. Można przypuszczać, że podobnie jak LPS i LP u *E. coli* spełniają one u sinic rolę receptorów fagowych.

ŚCIANA KOMÓRKOWA ZIELENIC Z SZCZEGÓLNYM UWZGLĘDNIENIEM PROTOCOCALES

Wiadomości na temat ultrastruktury i budowy chemicznej SK glonów zielonych są ciągle jeszcze zbyt skąpe, chociaż należy zanotować znaczny postęp w tej dziedzinie w ostatnim czasie [2–5, 7–9, 27, 32, 39–51, 56, 61–62].

Do najbardziej szczegółowo zbadanych należą SK glonów rodzajów *Scenedesmus* i *Chlorella*. Oprócz tego objęto badaniami rodzaje *Pediastrum*, *Prototheca*, *Chlamydomonas* oraz inne glony.

SK glonu *Chlorella* (*Protococcales*) stanowi 13,6% suchej masy. Zawiera ona 15,4% α - celulozy, 31,0% hemicelulcz, 27,0% białka w postaci glikoprotein, 9,2% lipidów, 3,3% glikozamin i 5,2% popiołu [46]. Skład chemiczny SK glonu *Scenedesmus* jest podobny: 34,5% celulozy, 28,4% białka w postaci glikoprotein, 9,06% lipidów, 0,9% P - ogólnego w tym 0,8% fosforu lipidowego. Stwierdzono obecność heksozaminy, której jednak nie zidentyfikowano [8, 9]. Wielowarstwową strukturę SK sinic i zielenic stwierdzono w SK nagromadzonych w pożywce oraz wyizolowanych z dezintegrowanych glonów. Kompleksową ultrastrukturę SK uwidacznia rys. 3a, b. Grubość SK *Chlorella* wynosi 210 Å [46], u *Scenedesmus* 800–1000 Å [8, 9].

Zasadniczo SK glonów z rzędu *Protococcales* jest zbudowana z 2 głównych warstw, u niektórych przedstawicieli stwierdza się trzecią zewnętrzną warstwę (0 - outer layer) zawierającą różnorodne struktury powierzchniowe zwane epistrukturami. Warstwa wewnętrzna (I - inner layer), bezpośrednio przyległa do błony cytoplazmatycznej, posiada

w obrazie uzyskanym w mikroskopie elektronowym stosunkowo małą gęstość. W tej warstwie osadzone są liczne mikrofibrylle celulozowe o średnicy 30–50 Å [46] w bezpostaciowej masie zwanej matrix. Mikrofibrylle tworzą rodzaj siateczki (przypominającej strukturę żelbetonu, w której rolę prętów stalowych pełnią mikrofibrylle celulozowe, oblane substancją matrix zbudowanej z białek, lipidów i polisacharydów). Zawartość celulozy w SK *Chlorella* stanowi 15,4% suchej masy. Celuloza mikrofibrylli tego glonu różni się od celulozy roślin wyższych, ponieważ jest zbudowana nie tylko z glukozy, lecz zawiera ponadto galaktozę, mannozę, arabinozę, ramnozę. U glonu *Scenedesmus* [8, 9] i *Chlorella* [46] warstwa I rozpuszczała się całkowicie pod wpływem soku trawiennego ślimaka *Helix pomatia* zawierającego celulazę [8, 9]. Produktami hydrolizy tej warstwy SK glonu *Scenedesmus* pod wpływem celulazy były: glukoza, mannoza oraz glikoproteidy. Obecność obu cukrów wśród produktów hydrolizy przemawia za tym, że celuloza SK tego glonu jest kopolimerem glukozy i mannozy [8, 9]. Z uwagi na zbyt skąpe wiadomości na ten temat trudno rozstrzygnąć, czy różnice składu cukrowego celulozy SK są gatunkowo swoiste.

Pod wpływem celulazy soku trawiennego *Helix pomatia* uwalniają się także inne skałdniki SK, jak 43% lipidów, 13% hemiceluloz, 70% białka i celulozy (licząc względem całkowitej zawartości poszczególnych substancji w SK). Jest bardzo prawdopodobne, że zawartość celulozy w SK obliczona z ubytku masy pod działaniem celulazy zależy od stopnia dezintegracji SK. Takiej zależności należy się spodziewać biorąc pod uwagę fakt, że różnemu stopniowi dezintegracji komórek towarzyszy stopniowo postępujące w miarę upływu czasu uszkodzenie SK i odsłanianie mikrofibryll celulozowych. Nie można ponadto rozstrzygnąć, czy uwolnienie tych związków należy rzeczywiście przypisać działaniu celulazy, ponieważ sok z *Helix pomatia* zawiera oprócz celulazy także inne enzymy, jak np. lipazę czy karbohydrazę. W ścianach komórkowych *Scenedesmus* nagromadzonych w pożywce nie stwierdzono warstwy I. Na tej podstawie należałoby sądzić, że proces tworzenia i uwalniania aplanospor [8, 9] z komórek macierzystych jest sprzężony z uwalnianiem lub aktywacją enzymów celulolitycznych.

W hemicelulozie wyodrębnionej z SK pod wpływem 24–10% KOH i następnie wytrąconej 85% alkoholem stwierdzono obecność 2 komponent A i B zbudowanych z galaktozy, arabinozy, mannozy, ksylozy i ramnozy.

Warstwą bezpośrednio przylegającą do wewnętrznej warstwy celulozowej jest kompleksowo zbudowana warstwa środkowa (Ml - middle layer) o grubości 150–200 Å [29]. Jest ona utworzona z 3 wyraźnie widocznych podwarstw a, b, c, (rys. 3a, b). Grubości poszczególnych pod-

warstw wynosiły dla przykładu u *Scenedesmus verrucosus* Roll [41, 42] dla podwarstwy *a* — 11 nm, *b* — 8 nm i *c* — 6 nm. Podwarstwy *a* i *c* cechowała w odróżnieniu od podwarstwy *b* wielka gęstość elektronowa. Z rozkładu gęstości optycznej w elektronogramach SK można sądzić, że podwarstwy *a* oraz *c* są zbudowane z substancji hydrofilnych, jak np. białek, mukopolisacharydów lub polisacharydów, natomiast podwarstwa *b* — z substancji hydrofobowych przypuszczalnie z lipidów. U niektórych rodzajów *Scenedesmus* warstwa M1 jest warstwą zewnętrzną [8, 9, 41, 42]. Warstwa ta nadaje SK i komórce charakterystyczny kształt, na który nie wywiera wpływu traktowanie celulazą. Z poszczególnych podwarstw warstwy M1 biorą swój początek różnorodne niekiedy bardzo złożone struktury powierzchniowe wyrostki podpierające (props), siateczka itd. Kierując się kryteriami morfologicznymi można by je rozpatrywać jako trzecią najbardziej zewnętrzną warstwę (0).

STRUKTURY POWIERZCHNIOWE — EPISTRUKTURY

W odróżnieniu od gładkiej, pokrytej śluzem, ubogiej w epistruktury powierzchni sinic, powierzchnia przedstawicieli zielenic przedstawia bardziej różnorodny obraz. Występowanie epistruktur jest związane z przynależnością taksonomiczną.

Spośród 41 przebadanych szczepów rodzaju *Chlorella* wszystkie posiadały gładką powierzchnię bez epistruktur [18]. Rodzaj *Scenedesmus*, najwnikliwiej dotąd poznany, przedstawia szczególne bogactwo form epistruktur, można je porównać z bogactwem barokowej ornamentyki.

Szczególny kłopot dla oceny taksonomicznej sprawiają szczepy reprezentujące cechy dwóch rodzajów. Tak np. szczepy wstępnie zaliczone jako *Chl. ultrasquamata* Clem., szczep 1966/11 i *Chl. fusca* Shih. et Krauss, które nie tworzą cenobii typowych dla *Scenedesmus*, zostały na podstawie występowania epistruktur i pyrenoidów (typowych dla *Scenedesmus*) ostatecznie zaszeregowane do rodzaju *Scenedesmus* [18, 19].

Pewne utrudnienie w wykorzystaniu morfologii epistruktur jako kryterium taksonomicznego wynika ze zmienności tych struktur pod wpływem starzenia się komórek, składu pożywki, warunków hodowli oraz z odmiennego u różnych szczepów reagowania na te same czynniki. Dotąd nie ustalono ogólnych korelacji między morfologią epistruktur a czynnikami środowiskowymi [18, 19]. Zauważono, że istnieją zasadnicze różnice w ultrastrukturze powierzchni, tj. warstwy 0. W piśmiennictwie określano ją niekiedy jako warstwę pektynową [11]. Pogląd taki opierano wyłącznie na wyniku histochemicznej reakcji z czerwienią rutenową. Z uwagi na małą swoistość tej metody i braku jego potwierdzenia meto-

dami analitycznymi u *Chlorella* i *Scenedesmus* [9, 48], należy tę informację traktować jako godną dalszego sprawdzenia.

Różnice ultrastruktury powierzchni różnych rodzajów *Scenedesmus* polegają na obecności lub braku niektórych submikroskopowych elementów strukturalnych. Są nimi: brodawki, kolumienki, ząbki, wiązki, żeberkowate struktury, kraterowe zagłębienia, otwory w kształcie rozetek oraz kolce. Są one rozmieszczone na powierzchni w różnym zagęszczeniu, charakterystycznym dla poszczególnych odmian. Występowanie względnie brak poszczególnych elementów jest obecnie wliczane do listy gatunkowo swoistych kryteriów taksonomicznych, pomocnych w diagnozowaniu szczepów. Na powierzchni jednych szczepów *Scenedesmus* spotyka się wielkie bogactwo struktur, inne szczepy mają powierzchnię bardziej gładką. Spotyka się także szczepy, u których na gładkiej powierzchni występują miejscami wspomniane struktury. Tak np. u *Scenedesmus spinosus* Chod. [41, 42] występują obok zupełnie gładkich fragmentów powierzchni miejsca bogate w epistruktury. W tym przypadku elementy powierzchniowe pojawiają się w miejscach, w których warstwa 0 wykazuje zgrubienia. Zestawienie elementów powierzchniowych przedstawia rys. 11.

Brodawki mogą występować na powierzchni pojedynczo lub w skupiskach posiadających 2, 3, 4 - wierzchołkowe, okrągłe lub gwiaździste twory lub także występują w połączeniu z kolumienkami (props). Te ostatnie mogą mieć czworokątny, cylindryczny obrys zewnętrzny, wewnątrz są puste. Ich średnica jest różna. Często posiadają lejkowato rozszerzony wierzchołek, podstawę korzeniopodobną, spotyka się także śrubowatą strukturę. Ząbki i kolce (spines) są zbudowane z długich kolumienek. U niektórych szczepów powierzchnię przykrywa siateczka o regularnych cztero- lub siedmiobocznych oczkach (zwykle przeważają 6 - boczne). Siateczka ta jest podparta pełnymi wewnątrz, niekiedy częściowo zrosniętymi ze sobą kolumienkami. Oczka siateczki posiadają śrubowatą strukturę. Wzdłuż długiej osi komórki przebiegają u niektórych szczepów żeberkowate twory utworzone z szeregu pustych wewnątrz palisadowo ustawionych kolumienek. Należy jeszcze wymienić rozetkowe twory i otworki. Są one wyścielone elektronowo gęstą warstwą analogiczną do występującej w ścianach kolumienek. Na całej powierzchni występują ponadto szczególnie subtelne pory o średnicy 6 nm. Dotąd przebadano 26 szczepów należących do 13 rodzajów gatunku *Scenedesmus*.

W poczet nie wyjaśnionych problemów należy zaliczyć mechanizm powstawania epistruktur, ich chemiczną naturę oraz biologiczną rolę. Wiadomo jedynie, że kolumienki (tubular props) oraz siateczka biorą swój początek w trój laminarnej warstwie SK [48]. Wydaje się bardzo

Rzeźba powierzchniowa	kształt brodawek												
kolumienki / props /	przekrój kolumienek												
kolce	kształt kolców												
twory	kształt widok boczny												
rozetkowane	przekrój podłużny												
twory	widok z góry												
żeberkowane	widok boczny												

Rys. 11. Zestawienie najbardziej typowych elementów morfotycznych (epistruktur) występujących na powierzchni glonów z rodzaju *Scenedesmus* [42].

prawdopodobne, że kolumienki, pory i epistruktury pełnią wydzielnicze funkcje komórki. Trudno obecnie rozstrzygnąć, czy wszystkie wydzielane do pożywki substancje są identyczne ze składnikami warstwy M1, względnie innych warstw SK. Za pomocą specyficznych przeciwciał względem wyizolowanych z homogenatu SK wykazano u glonu *Scenedesmus*, że nagromadzone w filtracie kultury substancje podczas wzrostu glonu pochodzą z SK [9], gdyż dają z nimi reakcje krzyżowe. W porównaniu z SK żywych komórek, posiadających w pełni zachowaną ornamentację epistruktur, SK macierzyste nagromadzone w pożywce można pod względem ultrastruktury uważać za niekompletne (brak kolumienek i żeberek) [18]. Jest prawdopodobne, że nagromadzenie składników SK w płynie hodowlanym ma m. in. związek z częściowym zanikiem epistruktur w czasie uwalniania macierzystych SK.

Do czynników wywierających wpływ na strukturę SK należą: metaboliczny stan komórki, jej wiek, składniki pożywki, jady podziałów komórkowych. Pomimo niepełnego wyobrażenia o zmianach wywołanych w SK różnych przedstawicieli zielenic, wiadomo już obecnie, że efekty są różne. Tak np. w miarę starzenia się komórek *Spongiochloris typica* dochodzi do pogrubiania SK [44]; natomiast komórki *Chlorella fusca* 211-15 odkładają podczas 4-6 - tygodniowego głodowania azotowego 2 do 5 warstw kompletnych SK pod normalną SK. Po przeniesieniu tych komórek z medium bez azotu do medium bogatego w azot dochodzi w ciągu 24-26 godzin do zsynchronizowanego podziału komórek, przy czym wskutek degeneracji znika pogrubiona SK; jej trój laminarna warstwa zostaje odrzucona jakby podczas linienia i pozostaje w medium wzrostowym [50].

U *Scenedesmus* brak jonów Ca^{++} wywołuje proliferację trój laminarnej warstwy [45]. Podobny wpływ wywiera na komórki *Chlorella* kolchicyna [55]. U komórek *Chlamydomonas eugametos* nieposiadających trój laminarnej warstwy w SK dochodziło pod wpływem kolchicyny do proliferacji całej SK [61].

Grubość SK u różnych szczepów podlega znacznym wahaniom, przyjmuje się, że jest uwarunkowana genetycznie [18] i w pewnym zakresie zależy od warunków hodowli [2]. Na uwagę zasługuje np. brak wewnętrznej warstwy SK u komórek *Chlorella* żyjących w symbiozie wewnątrz komórek *Paramecium* [40].

Budowa SK wielu spośród dotąd zbadanych glonów zielonych jest bardzo zbliżona i charakteryzuje się obecnością trój laminarnej warstwy M1 (rys. 3a, b) często utożsamianej z warstwą zewnętrzną. Przykładem takich glonów są: *Chlorella*, *Scenedesmus*, *Prototheca*, *Pediastrum*, *Pyrocystis*, *Volvulina*, *Eudorina*, *Volvox*, *Heamatococcus*, *Spongiochloris*, *Hydrodictyon*, *Kirchinella* [2, 10, 27, 46, 51, 56, 62]. Niektóre szczepy

Chlorella posiadają zamiast trój laminarnej warstwy M1 jednolaminarną warstwę M1 [2]. Trój laminarna warstwa ma występować wyłącznie u glonów, które są zdolne do wytwarzania wtórnych karotenoidów (ketokarotenoidów) i sporopolleniny. Jako jedną z głównych substancji tworzących warstwę M1 uważa się sporopolleninę, polimer o charakterze izoprenoidowym, odznaczający się wprost niesłychaną odpornością. Sporopollenina jest substancją bardzo rozpowszechnioną w świecie roślinnym. Występuje ona przede wszystkim w zewnętrznej warstwie pyłków i zarodników, tj. w egzynie. Z obecnością sporopolleniny wiąże się niewątpliwie możliwość przetrwania zarodników w niekorzystnych warunkach. Podobną niezwykłą odporność posiadają ściany komórkowe glonów zielonych, a szczególnie ich trój laminarna struktura, co tłumaczy się obecnością sporopolleniny. Jej zawartość w suchej masie SK *Chlorella* wynosi 0,6% [2]. Tym tłumaczy się, że SK i trój laminarna jej warstwa *Chlorella* 211/8p jest odporna na hydrolizę 6N ługiem, 10 - dniowe działanie 85% kwasu fosforowego i acetolizę. Jedynie bardzo silne utleniacze jak kwas chromowy rozpuszczają SK, niszczą sporopolleninę i trój laminarną warstwę SK [2]. U *Scenedesmus* stwierdzono, że detergenty nie wywierają widocznego wpływu na ultrastrukturę SK [8, 9]. Do interesujących własności sporopolleniny należy całkowity brak zdolności rozpuszczania się w rozpuszczalnikach organicznych i charakterystyczne widmo podczerwone [54]. W ekstraktach SK *Chlorella* wykryto 12 składników lipidowych [2]. Na uwagę zasługuje znacznie wyższa procentowa zawartość nienasyconych kwasów tłuszczowych w SK *Chlorella* C_{18:1} i C_{18:2} w porównaniu z analogiczną w całych komórkach z fazy D wzrostu [33]. W ekstrakcie zawierającym lipidy SK stwierdzono także obecność „wosku” oraz fosfolipidów [8]. Ekstrakt eterowy SK *Scenedesmus* [8] zawiera ponadto barwniki karotenoidowe, które rozdzielono wstępnie na 4 frakcje [8]. Wśród nich znajdowały się amarantowo zabarwione ketokarotenoidy. Należy przypuszczać, że przez ich polimeryzację powstaje sporopollenina. Dotąd nie rozstrzygnięto, które z substancji — sporopollenina, białko czy polisacharydy — tworzą powierzchnię SK, czyli tzw. kutikulę glonu [2]. Za tym, że jest nią sporopollenina przemawia szczególna odporność na enzymatyczne trawienie wieloma enzymami, w tej liczbie: celulazą, macerozymem, meicelazą P, pektynazą z grzybów, proteazą typu D wyizolowaną z *Streptomyces griseus*, enzymami soku trawiennego ślimaka *Helix pomatia*, bromelainą, lipazą z trzustki wieprzowej, hyaluronidazą, ficyną, hemicelulazą, lipazą kiełków (typu 1) i lizozymem [2].

Obecności sporopolleniny w SK zielenic przypisuje się, że komórki *Chlorella* i *Scenedesmus* mogą nienaruszone przechodzić przez przewód pokarmowy ślimaka *Helix pomatia* [2], podobnie przechodzą one także

przez przewód pokarmowy niektórych zwierząt, jak np. kury i kota [8, 9].

Powszechnie wiadomo, że zarodniki i pyłki zawierają 40 do 70% sporopolleniny [57] i że posiadają one zadziwiającą odporność względem bakterii i grzybów. Odporność ta jest tak wielka, że spory mogą niezłożone przebywać w ziemi przez 250 do 350 milionów lat. Widma podczerwone sporopolleniny z SK glonów i spor obecnie żyjących roślin są niemal identyczne z sporopolleniną organizmów kopalnych, np. z wiciowcami (*Dinoflagellata*) i *Tasmanites huronensis* [2, 6]. Sporopolleninę stwierdzono także w meteorytach Murray i Orgueill [57], co przemawia za występowaniem ożywionej materii poza naszym globem.

LITERATURA

- [1] ALLEN M. M., Ultrastructure of the cell wall and cell division of unicellular blue - green algae, *J. Bact.*, **96**: 842-852, 1968.
- [2] ATKINSON A. W., GUNNING B. E. S., JOHN P. C. L., Sporopollenin in the cell wall of *Chlorella* and other algae: Ultrastructure Chemistry and Incorporation of ¹⁴C - Acetate, Studied in Synchronous Cultures, *Planta (Berl.)*, **107**: 1-32, 1972.
- [3] BISALPUTRA T., The origin of the pectic layer of the cell wall of *Scenedesmus quadricauda*, *Amer. J. Bot.*, **43**: 1549-1552, 1965.
- [4] BISALPUTRA T., WEIER T. E., The cell wall of *Scenedesmus quadricauda*, *Amer. J. Bot.*, **50**: 1011, 1019, 1963.
- [5] BISALPUTRA T., WEIER T. E., RISLEY E. B., ENGELBRECHT A. P. H., The pectic layer of the cell wall of *Scenedesmus quadricauda*, *Amer. J. Bot.*, **51**: 548-551, 1964.
- [6] BROOKS J., SHAW G., Recent development in the chemistry, biochemistry, geochemistry and post-tetrad ontogeny of sporopollenins derived from pollen and spore exines in pollen: Development and physiology (J. Heslop - Harrison ed.) pp. 99-114 London: Butterworths, 1971.
- [7] BUDD T. W., TJOSTEN J. L., DUYSSEN M. E., Ultrastructure of *Chlorella pyrenoidosa* as affected by environmental changes, *Amer. J. Bot.*, **56**: 540-545, 1969.
- [8] BURCZYK J., The chemical composition of the cell wall of *Scenedesmus obliquus*. I. General chemical characterization, *Folia Histochemica et Cytochemica*, **11**: 119-134, 1973.
- [9] — The composition and ultrastructure of cell wall of *Scenedesmus obliquus* II. Aminoacids, proteins, and antigens, *Folia Histochemica et Cytochemica*, **11**: 135-154, (1973).
- [10] CRONSHAW J., MYERS A., PRESTON R., A chemical and physical investigation of the cell walls of some marine algae, *Biochem. et Biophys. Acta*, **27**: NI, 89, 1958.
- [11] DREWS G., Fine structure and chemical composition of the cell envelopes, Ed. by Carr N. G. and Whitton B. A. Blackwell Scientific Publications pp. 99-116, 1973.

- [12] DREWS G., GOLLWITZER W., Untersuchungen an der Polysacharidfraction der Zellwände von *Anacystis nidulans*, Arch. Mikrobiol., 51: 179–185, 1965.
- [13] DREWS G., Grundlagen der Cytologie (G. C. Hirsch, H. Ruska, P. Sitte eds.) VEB Gustav Fischer Verlag, Jena 1973.
- [14] DREWS G., MEYER H., Untersuchungen zum chemischen Aufbau der Zellwände von *Anacystis nidulans* und *Chlorogloea fritschi*, Arch. Mikrobiol., 48: 259–267, 1964.
- [15] DREWS G., NULTSCH W., Spezielle Bewegungsmechanismen der Mikroorganismen, [in] Handb. Pflanzenphysiol. Bd. XVII, 2; S. 876–919, Springer Verlag, Heidelberg 1962.
- [16] DUNN J. H., WOLK C. P., Composition of the cellular envelopes of *Anabaena cylindrica*, J. Bact., 103: 153–158, 1970.
- [17] FOTER M. J., PALMER C. M., MALONEY T. E., Antialgal properties of various antibiotics, Antibiotics and Chemoterapy, 3: 505–508, 1953.
- [18] FOTT B., LOCHHEAD R., CLEMENCON H., Taxonomie der Arten *Chlorella ultrasquamata* Clem et Fott und *Chl. fusca* Shih. et Krauss, Arch. Protistenk. Bd., 117: 288–296, 1975.
- [19] FOTT B., NOVÁKOVA M., A monograph of the genus *Chlorella*. The fresh water species, [in] Studies in Phycology. Academia, Praha 1969, 10–74.
- [20] FRANK H., DEKEGEL D., Zur Interpretation von Zellwandstrukturen gramnegativer Bakterien, Zentbl. Bakt. Parasit Kde Abt. 1. Orig., 198: 81–88, 1965.
- [21] FRANK H., LEFORT M., MARTIN H. H., Elektronenoptische und chemische Untersuchungen an Zellwänden der Blaualgen, *Phormidium uncinatum*, Z. Naturf. B. 17: 262–268, 1962.
- [22] FREY - WYSSLING A., STECHER H., Über den Feinbau des Nostoc Schleims, Z. Zellforsch., 39: 515–519, 1954.
- [23] FUHS G. W., Cytochemical examination of blue - green algae, [in] Ed. Carr N. G. and Whitton B. A.: The biology of bluegreen algae, Blackwell Scientific Publications 119–120, 1973.
- [24] — Enzymatischer Abbau der Membranen von *Oscillatoria amoena* (Kütz.) Gomont mit Lysosym, Arch. Mikrobiol., 29: 51–52, 1958.
- [25] GHUYSEN J. M., Use of bacteriolytic enzymes in determination of wall structure and their role in cell metabolism, Bact. Rev., 32: 425–464, 1968.
- [26] GIESY R. M., A light and electron microscopic study of interlamellar polyglucoside bodies of *Oscillatoria chalybia*, Am. J. Bot., 51: 388–396, 1964.
- [27] GRIFFITS D. A., GRIFFITS D. J., The fine structure of autotrophic and heterotrophic cells of *Chlorella vulgaris* (Emerson strain), Pl. Cell. Physiol., 10: 11–19, 1969.
- [28] HALFEN L. N., CASTENHOLZ R. W., Gliding motility in the bluegreen alga *Oscillatoria prineps*, J. Phycol., 7: 133–145, 1971.
- [29] HEGEWALD E., SCHNEPT E., Beitrag zur verrucosus Roll. Arch. Hydrobiol. Suppl. 46 Algological Studies, 11: 151–162, 1974.
- [30] HOPWOOD D. A., GLAUERT A. M., The fine structure of the nuclear material of the blue - green alga, *Anabaena cylindrica* Lemm., J. Biophys. Biochem. Cytol., 8: 813–823, 1960.
- [31] HÖCHT H., MARTIN H. H., KANDLER O., Zur Kenntnis der chemischen Zusammensetzung der Zellwänden der Blaualgen, Z. Pflanzphysiol., 53: 39–57, 1965.

- [32] HYAMS J., DAVIES D. R., The induction and characterisation of cell wall mutants of *Chlamydomonas reinhardi*, *Mutation Res.*, **14**: 381-389, 1972.
- [33] HÜLSEN W., KUBIN D., Isolierung und Eigenschaften der Zellhülle der Grünalge *Chlorella fusca*, *Z. Naturforsch.*, **30c**: 684-686, 1975.
- [34] JANISZEWSKA W., WOJCIECHOWSKI Z., Biosynteza polisacharydów ściany komórkowej roślin wyższych, *Post. Biochem.*, **17**: 291-303, 1971.
- [35] JENSEN T. E., SICKO L. M., The effect of lysosyme on cell wall morphology in a blue-green alga, *Cylindrossporum* sp., *J. Gen. Microbiol.*, **68**: 71-75, 1971.
- [36] JOST M., Die Ultrastruktur von *Oscillatoria rubescens*, *Arch. Mikrobiol.*, **50**: 211-245, 1965.
- [37] LAMONT H. C., Shear-oriented microfibrils in the mucilaginous investments of two motile *Oscillatoriacean* Blue-green algae, *J. Bacteriol.*, **97**: 350-361, 1969.
- [38] LEAK L. V., WILSON G. B., Electron microscopic observation on a blue-green alga, *Anabaena* sp., *Can. J. Genet. Cytol.*, **7**: 237-249, 1965.
- [39] KARAKASHIAN S. J., Morphological plasticity and the evolution of algal symbionts, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **175**: 474-487, 1970.
- [40] KARAKASHIAN S. J., KARAKASHIAN M. W., RUDZINSKA M., Electron microscopoc observations on the symbiosis of *Paramecium bursaria* and its intracellular algae, *J. Protozool.*, **15**: 113-128, 1968.
- [41] KOMAREK J., The ultrastructure of the cell wall in the genus *Scenedesmus*, [in] Nečas J., Lhotský O. (ed). *Ann. Rep. Algolog. Labor. Třebon* for 29-34, 1969.
- [42] KOMAREK J., LUDVIK J., Die Zellwandultrastruktur als taxonomisches Merkmal in der Gattung *Scenedesmus* 2, *Arch. Hydrobiol. Suppl.* 41, *Algological Studies*, **6**: 11-47, 1972.
- [43] MARTIN H. H., Bacterial protoplasts, *J. Theoret. Biol.*, **5**: 1-34, 1963.
- [44] McLEAN R. J., Ultrastructure of *Spongiochloris typica* during senescence, *J. Phycol.*, **4**: 277-283, 1968.
- [45] NILSHAMMER M., WALLEES B., KYLIN A., The effect of calcium deficiency on the ultrastructure of the green alga *Scenedesmus*, *Z. Pflanzenphysiol.*, **66**: 197-205, 1972.
- [46] NORTHCOTE D. H., GOULDING H. J., The chemical composition and structure of the cell wall of *Chlorella pyrenoidosa*, *Biochem. J.*, **70**: N. 3, 391-397, 1958.
- [47] OLAITAN S. A., NORTHCOTE D. H., Polysacharides of *Chlorella pyrenoidosa*, *Biochem. J.*, **82**: 509, 1962.
- [48] PELICARIČ S., SULEK J., LUDVIK J., Ultrastructure of the cell wall of *Scenedesmus quadricauda* (Turp) Breb. strain Graifswald, *Arch. Hydrobiol. Suppl.* 39, *Algological Studies* 2/3, 1-6, 1970.
- [49] PELICARIČ C., Verschidene Typen der Ultrastruktur der Zellwand bei drei Arten der Gattung *Scenedesmus* Meyen, *Arch. Hydrobiol. Suppl.* 39, *Algological Studies* 137-145, 1971.
- [50] PYLIOTIS N. A., GOODCHILD D. J., GRIMME L. H., The regreening of nitrogen-deficient *Chlorella fusca*. II. Structural changes during synchronous regreening, *Arch. Microbiol.*, **103**: 259-270, 1975.
- [51] RODRIGUEZ-LOPEZ M., Morphological and structural changes produced in *Chlorella pyrenoidosa* by assimilable sugars, *Arch. Mikrobiol.*, **52**: 319-324, 1965.

- [52] SALTON M. R. J., The bacterial Cell Wall, Elsevier Publ. Amsterdam, 1964.
- [53] SHABON N., Polysacharides, Ann. Rev. Biochem., 35: 485-520, 1966.
- [54] SHOW G., Sporopollenin, [in] Phytochemical phylogeny (J. B. Harborne ed.), 31-58, London, Acad. Press 1970.
- [55] SITTE P., Struktura i ultrastruktura komórki roślinnej, PWRL, Warszawa, 233, 1970.
- [56] SOEDER C. J., Elektronenmikroskopische Untersuchungen an ungeteilten Zellen von *Chlorella fusca Shihira et xrauss*, Arch. Mikrobiol., 47: 311-324, 1964.
- [57] SWAIN T., Biochemical evolution in plants. Chapter II. [in] Florkins M. and Stotzs E. M. (eds.). Comprehensive Biochemistry, 29: part A, 252-256, 1974.
- [58] TAYLOR F. J., Genetic recombination in blue - green alga *Cylindrosporum Majus* Kuetz, Nature, 207: 782-783, 1965.
- [59] TOMCSIK J., Complex structure of the bacterial capsule in the genus *Bacillus*, Experientia, 7: 459, 1951.
- [60] TUFFERY A. A., Light and electron microscopy of the sheat a blue - green alga, J. Gen. Microbiol., 57: 41-50, 1969.
- [61] WALNE P. L., The effects of colchicine on cellular organization in *Chlamydomonas*. II. Ultrastructure, Amer. J. Bot., 54: 564-577, 1967.
- [62] WANKA F., Ulstrastructural changes during normal and colchicine inhibited cell division of *Chlorella*, Protoplasma (Wien), 66: 105-130, 1968.
- [63] WEISE G., DRAWS G., JANN B., JANN K., Identification and analysis of a lipopolisacharide in cell walls of the blue - green alga *Anacystis nidulans*, Arch. Mikrobiol., 71: 89-98, 1970.
- [64] WORK E., DEWEY L. L., The distribution of ϵ - diaminopimelic acid among various microorganisms, J. Gen. Microbiol., 9: 1953.

Otrzymano: 27 lipca 1976.

Przyjęto: 10 września 1976.

Adres autora: 43-400 Cieszyn/Gumna 43.

ZRÓŻNICOWANIE WŁÓKIEN MIĘŚNIOWYCH W MIĘŚNIACH SZKIELETOWYCH KRĘGOWCÓW

Franciszek KACZMARSKI

Pracownia Mikroskopii Elektronowej, Instytut Pediatrii
Akademii Medycznej im. Mikołaja Kopernika w Krakowie

Streszczenie. W artykule przedstawiono zróżnicowanie włókien mięśniowych w mięśniach kręgowców wykazane przy użyciu różnych metod. Zróżnicowanie to stwarza problemy ustalenia mianownictwa i klasyfikacji włókien. Mianownictwo oparte jest obecnie na badaniach morfologicznych uzupełnionych lub poszerzonych badaniami fizjologicznymi i biochemicznymi. Brak jest również, jak dotychczas, powszechnie akceptowanego systemu klasyfikacyjnego. Dla pełniejszego zrozumienia istniejącego zróżnicowania opisanego w mięśniach osobników dorosłych i zdrowych bada się przemiany włókien mięśniowych w rozwoju zarodkowym i w różnych eksperymentach, wykazując iż zróżnicowanie to nie jest stałe i podlegać może bardzo zasadniczym przemianom. Dalszy postęp w zrozumieniu zróżnicowania i w tworzeniu coraz to pełniejszej jego definicji powinno wnieść zastosowanie nowych metod badawczych takich jak immunocytochemia i autoradiografia, szersze stosowanie analizy ilościowej struktur komórkowych i kompleksowe stosowanie kilku jednocześnie metod badawczych.

WSTĘP

Poszczególne mięśnie szkieletowe dorosłych i zdrowych kręgowców składają się z włókien mięśniowych morfologicznie, fizjologicznie i biochemicznie zróżnicowanych. Zebrane od drugiej połowy XIX w. do dziś dane pozwalają na takie uogólnienie. Już dawno wielu badaczy próbowało wyjaśnić funkcjonalne znaczenie różnic między mięśniami tak w kolorze, jak i w cechach histologicznych wyraźnych nawet dla nieuzbrojonego oka. Na przykład Ranvier [88] sugerował iż włókna mięśniowe czerwone kurczą się wolniej niż włókna mięśniowe białe. Grützner [44] podzielił włókna mięśniowe wszystkich kręgowców, w tym i człowieka, na dwa typy: pierwszy — jasny o większej średnicy, drugi — ciemny o mniejszej

średnicy. Różnice w odcieniu tych włókien wiązał autor z zawartością ziarnistości. Knoll [66] wzmiankował iż ciemniejsze włókna mięśniowe mają więcej protoplazmy między miofibrylami niż jasne włókna mięśniowe i nazwał je odpowiednio „protoplasmareiche” i „protoplasmaarme”. Stwierdził on iż mięśnie, które są stale aktywne, jak mięśnie oczne, mięśnie umożliwiające żucie oraz mięśnie związane z oddychaniem, składają się głównie z ciemnych włókien mięśniowych. U jednych zwierząt włókna ciemne i jasne są zgrupowane w osobnych rejonach, natomiast u innych zwierząt mięśnie mają zmieszane oba typy włókien. W mięśniach żaby, które są makroskopowo jasne, znalazł on również ciemne włókna z większą ilością ziarnistości. Bullard [9] stwierdził w badaniach porównawczych kilku mięśni tułowiowych kota, iż wszystkie składają się z trzech typów włókien mięśniowych: jasnych, ciemnych i pośrednich, występujących w poszczególnych mięśniach w rozmaitych proporcjach i różniących się w odmiennych mięśniach średnicą. Obszerniejsze opracowanie funkcjonalnego i morfologicznego znaczenia różnorodności włókien mięśniowych w mięśniach szkieletowych przedstawił Denny - Brown [21]. On też ustalił, że istnieją dwa typy włókien mięśniowych, tj. cienkie czerwone z obfitą sarkoplazmą, licznymi mitochondriami i kroplami tłuszczu oraz grube białe włókna o mniejszej zawartości sarkoplazmy, mitochondriów i kropli tłuszczu. Zróżnicowanie to, nie widoczne przy zastosowaniu rutynowych metod histologicznych, nie wywołało zainteresowania następnych badaczy. Dopiero w latach pięćdziesiątych naszego stulecia zaczęto stosować do mięśni reakcje histochemiczne, wykazujące obecność różnych enzymów [39, 74, 80, 105]. Od tego czasu opublikowano bardzo wiele prac dokumentujących zróżnicowanie włókien mięśniowych w mięśniach szkieletowych kręgowców. Oprócz szczegółowej dokumentacji i prób klasyfikacji histologicznej [5, 8, 23, 38, 74, 80, 95, 105] i ultrastrukturalnej [29, 38, 56–58, 61, 63, 64, 77] przedstawiono także próby klasyfikacji fizjologicznych [14, 17, 28, 49, 67, 68, 84] oraz biochemicznych [2, 34, 83, 84].

MIANOWNICTWO I KLASYFIKACJA

Zróżnicowanie włókien mięśniowych stwarza problemy mianownictwa włókien i ich klasyfikacji. Mianownictwo oparte jest obecnie na badaniach morfologicznych, dokonywanych metodami histologicznymi, histochemicznymi i ultrastrukturalnymi. Ostatnio, w wielu pracach metody morfologiczne uzupełniano lub poszerzono badaniami fizjologicznymi i biochemicznymi [5, 8]. Zależność mianownictwa włókien od metody badawczej powoduje, że zaznaczają się znaczne rozbieżności (tabela) nawet przy zastosowaniu tej samej metody badawczej przez odmiennych

Tabela. Przykłady klasyfikacji włókien mięśniowych w mięśniach szkieletowych kręgowców

Kryteria klasyfikacyjne	fazowe	Włókna	licznicze	Autor	Materiał
A. Morfoloiczne					
1. Kolor mięśnia i cechy histologiczne	czerwone, mała średnica, ciemne, ziarniste	—	białe, duża średnica jasne, bezziarniste	Ranvier L., 1874 Grützner P., 1884	szczur
2. Intensywność reakcji na dehydrogenazę burzysianową	wysoka (C)	pośrednia (B)	niska (A)	Stein J. M., Padykula H. A., 1962	przepony ssaków
3. Intensywność reakcji na różne enzymy mitochondrialne	wysoka (czerwone)	pośrednia (pośrednie)	niska (białe)	Edström L., Kugelberg E., 1968 Gauthier G. F., Padykula H. A., 1966	szczur
4. Intensywność reakcji na fosforylazę	niska (typ I)	—	wysoka (typ II)	Dubowitz V., Pearse A.G.E., 1960	gółb
5. Intensywność reakcji na ATPazę aktomiozynową	wysoka (typ II)	—	wysoka	Dubowitz V., Pearse A.G.E., 1960 Dubowitz V., Pearse A.G.E., 1960	pazurnica (Xenopus sp.) szczur
6. Intensywność reakcji na ATPazę aktomiozynową stabilną po preinkubacji w środowisku zasadowym	stabilna	niska (typ I)	wysoka (typ II)	Stein J. M., Padykula H. A., 1962	człowiek
— ta sama reakcja z preinkubacją w środowisku kwaśnym	stabilna	labilna	stabilna	Engel W. K. Giuh L., Samaha F. J., 1969 Yellin H., 1969	szczur, królik szczur
7. Zawartość mitochondriów	wysoka	stabilna	labilna	Guth L., Samaha F. J., 1969 Yellin H., 1969	m. oczne szczur
8. Grubość linii Z	szeroła	pośrednia	wąska	Gauthier G. F., 1975	szczur i inne ssaki
9. Częstotliwość triad i regularność rozmieszczenia	pośrednia	szeroła	wąska	Gauthier G. F., 1969, 1975 Eisenberg B. R., Kuda A. M., 1976	szczur i inne ssaki świnka morska
B. Fizjologiczne					
1. Reakcja na pojedyncze pobudzenie nerwowe	impuls propagowany i skurcz 73 msec	impuls propagowany i skurcz 40 msec	impuls propagowany i skurcz 34 msec	Eisenberg B. R., Kuda A. M., 1976 Schmalbruch H., 1971	świnka morska królik, kot
2. Trwanie skurczu	duża	pośrednia	mała	Kuffler S. W., Vaughan — Williams E. M., 1953	żaba
3. Odporność na zmęczenie	wysoka	niska	niska	Burke R. E., Levine D. N., Zajac F. E., 1971 Burke R. E., Tsafiris P., 1974	kot kot
C. Biochemiczne					
1. Zawartość mioglobiny	wysoka	niska	niska	James N. T., 1968 Bárány M., 1967	różne kręgowce
2. Aktywność ATPazy	fazowe — szybkie — czerwone	fazowe — powolne — pośrednie	fazowe — szybkie — białe	Bernard R. J., Edgerton V. R., Furukawa T., Peter J. B., 1971	świnka morska
D. Równoczesne zastosowanie kilku metod	kie — utleniające	kie — utleniające	kie — glikolityczne	Peter J. B., Bernard R. J., Edgerton V. R., Gillespie C. A., Stepel K. E., 1972	świnka morska

autorów w stosunku do tych samych mięśni. Schmalbruch [91] wyróżnił w mięśniu płaszczkowatym (m. soleus) kota włókna mięśniowe, które określa jako czerwone, podczas gdy inni [47, 78] twierdzą, że w mięśniu tym u kota występują wyłącznie włókna mięśniowe pośrednie. Jeszcze inni autorzy [59, 79] uważają, że w mięśniu tym występują oba wymienione typy włókien. Podobne rozbieżności istnieją w odniesieniu do mięśnia płaszczkowatego królika. Według Luckera i Hagyarda [70] i Schmalbrucha [91] mięsień ten zawiera tylko włókna czerwone, a Peter i wsp. [84] podają, że zawiera on prawie wyłącznie włókna pośrednie. Natomiast Bergman i Afifi [4] znaleźli tam włókna czerwone o szerokim spektrum średnic, podczas gdy według Jöbsisa i Meijera [55] mięsień ten zawiera dwa rodzaje włókien mięśniowych (czerwone i pośrednie).

Obserwując zróżnicowanie włókien mięśniowych w mięśniach szkieletowych kręgowców nasuwa się pytanie, czy w ogóle możliwa jest jego jednoznaczna klasyfikacja. Chodzi o to, czy można ustalić kategorie włókien uznane przez wszystkich badaczy, a następnie zakwalifikować każde rozpatrywane włókno mięśniowe do jednej z tych kategorii lub, czy też ma miejsce ciągłe przejście w nasileniu właściwości włókien mięśniowych. Druga możliwość jest aktualnie słabiej udokumentowana, chociaż bierze się ją pod uwagę [53, 81] na co wskazują także wyniki Sharmarimy [92], Nasledova [75] oraz Smitha i Lännergrena [93]. Wydaje się, że pomimo iż nie wszystkie właściwości włókien mięśniowych ustalają się według ciągłego gradientu, jednak niektóre cechy mogą wykazywać ciągłe przejście (np. zawartość glikogenu [68]). Dotychczasowe wyniki badań w większości popierają pogląd, że istnieją jednak odrębne kategorie włókien mięśniowych i przynajmniej u dorosłych, zdrowych osobników można wszystkie włókna mięśniowe zaliczyć do jednej z wyróżnionych kategorii [36]. Natomiast zróżnicowanie włókien mięśniowych nie musi być stałe i może zmieniać się pod wpływem zmiany unerwienia, treningu przeciążenia lub przerwania połączenia z przyczepem [10, 103].

ZRÓŻNICOWANIE MORFOLOGICZNE W METODACH HISTOLOGICZNYCH I HISTOCHEMICZNYCH

W czasie obserwacji całych mięśni lub ich fragmentów można różnić makroskopowo tylko mięśnie białe lub różowe. Metody histologiczne pozwalają dostrzec dalsze zróżnicowanie włókien mięśniowych. Różnią się one przede wszystkim średnicą jak również kształtem włókienek mięśniowych, intensywnością wybarwienia i unaczynienia. Zbadanie włókien mięśniowych w świetle kryteriów histologicznych pozwoliło jeszcze w XIX w. na przedstawienie klasyfikacji włókien mięśniowych, która w niektórych przypadkach nie odbiega od klasyfikacji później-

szych, przeprowadzonych przy zastosowaniu nowocześniejszych metod badań morfologicznych (tabela I).

Rozwój technik histochemicznych wykazał, że zróżnicowanie włókien mięśniowych ma charakter znacznie bardziej skomplikowany i wyraża się różną zawartością materiałów zapasowych i enzymów. Reakcja na tłuszcze obojętne [20] była jednym z pierwszych testów różnicujących włókna mięśniowe. Pod względem zawartości glikogenu włókna mięśniowe wykazują ciągłe spektrum intensywności wybarwienia [68]. W różnicowaniu włókien mięśniowych pod względem zawartości enzymów, najwcześniej zastosowano reakcję na aktywność dehydrogenazy bursztynianowej [80, 95]. Reakcja ta wykazując lokalizację jednego z enzymów utleniających zawartych w mitochondriach wyjaśniła problem ziarnistości we włóknach mięśniowych obserwowanych znacznie wcześniej. Jednocześnie stopień intensywności tej reakcji pozwolił podzielić włókna na trzy kategorie. Włókna czerwone, najbogatsze w mitochondria, mają zazwyczaj najmniejszą średnicę; włókna białe, najuboższe w mitochondria, mają największą średnicę, wreszcie włókna pośrednie, wykazują właściwości pośrednie [95] (tabela I).

Reakcje wykazujące aktywność innych enzymów utleniających, różnicują włókna mięśniowe podobnie jak reakcja na aktywność dehydrogenazy bursztynianowej [8, 14, 23, 69].

W badaniach wykazujących aktywność enzymów utleniających we włóknach mięśniowych starano się powiązać zróżnicowanie włókien z ich funkcją — z szybkością skurczu i odpornością na zmęczenie. Białe włókna mięśniowe wszyscy autorzy zgodnie zaliczają do fazowych szybko kurczących się. Natomiast włókna czerwone zalicza się do fazowych szybkich [27, 41] lub, w innych pracach, do fazowych powolnych [8, 14]. Także włókna pośrednie jedni autorzy zaliczają do typowych fazowych powolnych [84], a inni do fazowych szybkich [14, 15]. Zależność szybkości skurczu od ilości mitochondriów nie jest jednoznaczna, natomiast powiązanie ilości mitochondriów z odpornością na zmęczenie wskazuje, jak sprawdzono eksperymentalnie, że odporność jest wprost proporcjonalna do ilości mitochondriów we włóknie [14, 28].

W poszukiwaniu testu histochemicznego, który byłby bezpośrednią odpowiedzią określającą szybkość skurczu, skierowano uwagę na ATPazę aktomiozynową, związaną ze sprawną hydrolizą ATP w czasie skurczu. Test ten zastosowany w mięśniach szczura w 1962 r. [95] wykazał, że najcieńsze i najgrubsze włókna dawały intensywną reakcję, natomiast włókna pośrednie wykazywały słabą aktywność ATPazy. Wprowadzenie przez Gutha i Samahę [41] preinkubacji w środowisku kwaśnym i zasadowym w tej reakcji jeszcze bardziej szczegółowo różnicuje włókna mięśniowe. Metoda ta wskazuje na istnienie dwóch typów ATPazy aktomio-

zynowej. W jednych włóknach mięśniowych dominuje ATPaza stabilna po preinkubacji w środowisku zasadowym, a w innych dominuje ATPaza stabilna po preinkubacji w środowisku kwaśnym. Równocześnie przeprowadzone badania biochemiczne [41] wskazują, że ATPaza stabilna po preinkubacji w środowisku zasadowym występowała we włóknach określonych jako szybkie, a ATPaza stabilna po preinkubacji w środowisku kwaśnym występowała we włóknach fazowych powolnych.

Włókna mięśniowe wykazujące obecność ATPazy stabilnej po preinkubacji w środowisku zasadowym można dalej podzielić na dwa rodzaje: jedne zawierają ATPazę hamowaną częściowo przez utrwalanie w formalinie i te włókna odpowiadają według autorów włóknom o dużej średnicy opisanym przez Stein i Padykulę [95] jako włókna A; drugie włókna mają małą średnicę i zawierają ATPazę odporną na utrwalanie w formalinie, włókna te odpowiadają włóknom mięśniowym C, opisanym przez Stein i Padykulę [95].

Zastosowanie testu na aktywność ATPazy z preinkubacją w środowisku zasadowym lub kwaśnym u różnych gatunków zwierząt wykazało, że najczęściej dane włókno mięśniowe zawiera tylko jedną z form tego enzymu. Test ten zastosowany do włókien wewnątrzwrzecionowych i mięśni ocznych ssaków wykazał obecność unikalnych włókien zawierających obie formy tego enzymu [107]. Fakt ten tłumaczyć można unerwieniem tych włókien przez dwa aksony stymulujące w swym troficznym działaniu syntezę dwóch form ATPazy. Na możliwość takiego unerwienia wskazują morfologiczne i fizjologiczne obserwacje tych mięśni [6, 7, 49]. Wykazano również [7, 49], że są to włókna toniczne o nie propagowanym skurczu. Podobne morfologiczne i fizjologiczne toniczne włókna mięśniowe płazów nie wykazują jednak w badaniach histochemicznych aktywności ATPazy aktomiozynowej [32]. Nakazuje to dużą ostrożność w stosowaniu nomenklatury i klasyfikacji włókien mięśniowych. Niektórzy autorzy stosujący kilka metod histochemicznych jednocześnie wykazują w badanych mięśniach więcej niż dwa lub trzy typy włókien mięśniowych. Suzuki i Tomate [98] stosując testy histochemiczne na obecność trzech enzymów utleniających, ATPazy aktomiozynowej i fosforylasy, wyróżnili pięć typów włókien mięśniowych w mięśniach tułowiowych byka. Sugerują oni też rezygnację z klasyfikacji włókien na trzy typy, jak to ma miejsce przy stosowaniu testów na enzymy utleniające, oraz podziału na dwa typy, co zwykle wykazuje się stosując test na ATPazę czy fosforylase. Proponują natomiast każdorazowe badania histochemiczne mięśni przy użyciu kilku testów, a wyróżnione kategorie oznaczać dużymi literami alfabetu.

Ostatnio zaproponowano nowy system mianownictwa włókien mięśniowych [84], w stosunku do którego nie wysuwa się zastrzeżeń. Autorzy

na podstawie równocześnie przeprowadzonych badań biochemicznych, histochemicznych i fizjologicznych mięśni świnki morskiej i królika podzielili fazowe włókna mięśniowe na: fazowe–szybkie–utleniające–glikolityczne, fazowe–powolne–utleniające i fazowe–szybkie–glikolityczne (tabela). Należy jednak zaznaczyć, że podział ten można stosować tylko do zbadanych mięśni świnki morskiej i królika, a przenoszenie tych obserwacji na inne zwierzęta powinno być traktowane z wielką ostrożnością.

Peter i wsp. oraz inni autorzy (tabela) zaliczają włókna C opisane przez Stein i Padykulę [95] w mięśniach szczura do fazowych szybkich, natomiast u człowieka, włókna mięśniowe barwiące się podobnie w testach na obecność enzymów utleniających związanych z mitochondriami zaliczone zostały do fazowych powolnych [8]. Podobne różnice klasyfikacji mają bardzo często miejsce w stosunku do wszystkich testów histochemicznych stosowanych dla różnicowania włókien mięśniowych, jeżeli obserwacje dokonane na mięśniach jednego rodzaju uogólnia się na inne mięśnie.

ZRÓŻNICOWANIE MORFOLOGICZNE W BADANIACH MIKROSKOPOWO-ELEKTRONOWYCH

Opis włókien mięśniowych pod mikroskopem elektronowym uwzględnia zazwyczaj struktury o stosunkowo dobrze poznanym znaczeniu funkcjonalnym. W taki sposób zajęto się siateczką sarkoplazmatyczną, ze względu na jej rolę w procesach skurczów i rozkurczów mięśni [76]. Porównując fazowe i toniczne włókna mięśniowe stwierdzono, że włókna mięśniowe toniczne zawierają wyraźnie mniej zorganizowanej nieregularnie siateczki sarkoplazmatycznej [48]. Różnica ta jest mniej wyraźna tylko w mięśniach ryb [62]. Kilariski [62] stwierdził, że podskórne mięśnie ryb, uznane przez fizjologów jako powoli kurczące się [3], posiadają równie dobrze rozwiniętą i regularnie zorganizowaną siateczkę sarkoplazmatyczną jak głębiej leżące włókna mięśni fazowych. Dokonane później ilościowe badania porównawcze na podobnych dwóch typach włókien mięśniowych z mięśni ocznych lina wykazały jednak, że powierzchnia i objętość siateczki sarkoplazmatycznej w czerwonych włóknach mięśniowych jest mniejsza niż w białych [64]. Porównując siateczkę sarkoplazmatyczną kilku typów włókien mięśniowych fazowych z włóknem tonicznym można dostrzec wyraźne różnice. Natomiast włókna fazowe nie wykazują między sobą takiego różnicowania. Wykazały to jednoznacznie ilościowe badania Eisenberg i Kuda [29]. Autorki te zbadały mięśnie świnki morskiej dobrze poznane przy użyciu innych metod. Biochemicznie, fizjologicznie i histochemicznie wyróżniono trzy odmienne typy włókien fazowych [84]. Wykazały one, ku swojemu zdziwieniu, że pod względem ilości

siateczki sarkoplazmatycznej włókna te nie różnią się w sposób statystycznie istotny.

Włókna mięśniowe różnią się między sobą także pod względem ilości mitochondriów, stopniem rozwoju kanalików systemu T i grubości linii Z. Obserwując przede wszystkim ilość i rozmieszczenie mitochondriów oraz grubość linii Z, Padykula i Gauthier w cyklu prac na mięśniach ssaków wyróżniły trzy typy fazowych włókien mięśniowych (tabela). Najwięcej mitochondriów obserwowano we włóknach o najszerszej linii Z, tj. włóknach czerwonych, odpowiadających według Gauthier [36] prawdopodobnie włóknom fazowym–szybkim–utleniającym–glikolitycznym [84]. Mniej mitochondriów i cieńszą linię Z posiadają włókna pośrednie, odpowiadające włóknom fazowym–powolnym–utleniającym [84]. Natomiast włókna o najmniej licznych mitochondriach i najcieńszej linii Z odpowiadają według Gauthier włóknom fazowym–szybkim–glikolitycznym [84]. Autorka proponując ten podział opierała się przede wszystkim na obserwacjach mięśni szczura, porównując z nimi wyniki Petera i wsp. uzyskane na mięśniach świnki morskiej. Ultrastrukturalna analiza tych samych mięśni świnki morskiej [29] podaje wyniki sprzeczne z sugestiami Gauthier. Eisenberg i Kuda wykazały że najszersza linia Z występuje nie we włóknach najbogatszych w mitochondria (włókna czerwone), ale we włóknach pośrednich, występujących w homogennym mięśniu płaszczkowatym zawierającym włókna fazowe powolne. Linia Z pośredniej szerokości występuje we włóknach o największej liczbie mitochondriów z czerwonej części mięśnia obszernego bocznego (*m. vastus lateralis*), zawierającej według Petera i wsp. włókna fazowe–szybkie–utleniające–glikolityczne. W odniesieniu do białych włókien z białej części tego mięśnia sugestie Gauthier oraz pomiary Eisenberg i Kuda są zgodne i przypisują im najwęższą linię Z i najmniejszą ilość mitochondriów. Rozbieżność ta dokumentuje, w jaki sposób porównywanie obserwacji uzyskanych z różnych rodzajów mięśni i różnymi metodami może stać się powodem niezgodności.

Na podstawie zróżnicowania ultrastruktury włókien mięśniowych czyniono próby różnicowania i klasyfikacji [29, 36, 56–58, 63]. Jednak nie wszystkie cechy morfologiczne są jednakowo użyteczne. Eisenberg i Kuda dowiodły, że dla wykazania odrębności kategorii włókien mięśniowych należy brać pod uwagę przede wszystkim więcej niż jedną cechę morfologiczną, np. grubość linii Z i ilość mitochondriów. Stosując te kryteria, autorki w 9 przypadkach na 10 trafnie klasyfikowały włókno do jednej z trzech wyróżnionych przez siebie kategorii (pełne rozgraniczenie włókien ma miejsce przy porównywaniu równoczesnym kilku dalszych danych ilościowych z włókien mięśniowych). Gdy natomiast brały pod uwagę powierzchnię kanalików systemu T i ilość mitochondriów, tylko w 7 przypadkach na 10 trafnie określały przynależność włókien mięśni-

wych. Wykazały one również, że metoda klasyfikowania włókien mięśniowych „na oko” według przedstawionych kryteriów dawała trafność w 84%, a metoda analizy ilościowej — w 90%. Pomimo to uważają jednak, że przeprowadzając analizę zróżnicowania włókien mięśniowych należy stosować metody ilościowe. Jest to szczególnie istotne w wypadku porównania ultrastruktury mięśni różnych zwierząt, zmian ultrastrukturalnych w różnych eksperymentach oraz w stanach chorobowych.

ZRÓŻNICOWANIE W METODACH FIZJOLOGICZNYCH

Dzięki fizjologicznym badaniom włókien mięśniowych możliwe jest wyświetlenie funkcjonalnego znaczenia różnic w budowie, stwierdzonych metodami morfologicznymi. Fizjologiczne obserwacje dają bowiem bezpośrednią informację o szybkości i sile skurczu, a także o odporności na zmęczenie poszczególnych włókien mięśniowych, jednostek motorycznych czy homogennych mięśni. Analizując sposób powstawania potencjału czynnościowego i szybkości skurczu wyodrębniono dwie kategorie włókien. Dla pełnego skurczu pewnych włókien wystarcza impuls z jednego tylko rejonu kontaktu z zakończeniem aksonalnym. Impuls ten propagowany potencjałem czynnościowym rozchodzi się szybko w całym włóknie i doprowadza w rezultacie do szybkiego skurczu. Są to włókna fazowe. Druga kategoria włókien osiąga potencjał czynnościowy dopiero w wyniku sumowania się kilku potencjałów składowych wywoływanych w kilku rejonach styku z zakończeniami aksonalnymi, co daje skurcz powolny i dłużej trwający. Są to włókna toniczne [48, 49, 57, 67]. Toniczne włókna mięśniowe są mniej liczne; zachowały się u ssaków tylko w niektórych specyficznych mięśniach [102]. W obserwacjach fizjologicznych nie wykazano jak dotychczas ich zróżnicowania, pomimo iż sugerować to mogą wyniki obserwacji morfologicznych [56].

Fazowe włókna mięśniowe wykazują zróżnicowanie fizjologiczne na co najmniej trzy typy, jeśli weźmie się pod uwagę szybkość i siłę skurczu oraz odporność na zmęczenie. Porównanie wyniku badań fizjologicznych z budową morfologiczną mięśnia biodrowo - strzałkowego (m. iliofibularis) pazurnicy (*Xenopus*) wykazały, że włókna mięśniowe o niskiej zawartości lipidów i niskiej aktywności dehydrogenazy bursztynianowej kurczyły się najszybciej i najszybciej ulegały zmęczeniu. Natomiast włókna mięśniowe o wysokiej zawartości lipidów i o intensywnej reakcji na enzymy mitochondrialne były powolniejsze w skurczu, ale odporne na zmęczenie [69]. Ponadto autorzy opisali włókna toniczne, powoli kurczące się, wykazujące brak reakcji na enzymy mitochondrialne i obecność lipidów (tabela). Edström i Kugelberg [28] porównali odporność na

zmęczenie jednostek motorycznych w mięśni pierszelowym przednim (m. tibialis anterior) szczura i wykazali obecność trzech typów jednostek. Jednostki motoryczne składające się z włókien mięśniowych o dużej intensywności reakcji na dehydrogenazę bursztynianową i o niskiej intensywności na fosorylazę nie wykazały objawów zmęczenia. Natomiast włókna mięśniowe o małej intensywności reakcji na dehydrogenazę bursztynianową a dużej na fosorylazę męczyły się szybko. Trzeci typ jednostek motorycznych zawierał włókna mięśniowe o pośrednich cechach fizjologicznych i histochemicznych.

Podobnie w mięśni brzuchatym łydki (m. gastrocnemius) kota, Burke i wsp. [14, 15] opisali trzy typy różniących się fizjologicznie jednostek motorycznych, które różniły się odpornością na zmęczenie, czasem trwania skurczu oraz maksymalną siłą w skurczu tężcowym. Równocześnie prowadzono badania histochemiczne. Jednostki motoryczne pobudzano seriami impulsów, przy czym przeprowadzono równocześnie pomiary siły napięcia mięśnia. W pierwszym opisanym typie jednostek motorycznych po dwóch minutach stymulacji siła napięcia nie zmieniała się. W drugim, siła napięcia zmniejszyła się o 25%. W trzecim, siła napięcia zmalała o 75%. Mierzony równocześnie czas trwania pojedynczego skurczu wynosił odpowiednio: u nie męczących się — średnio o 0,73 sek., w drugim — 0,40 sek. i w najbardziej wrażliwych na zmęczenie — 0,34 sek. W kontroli histochemicznej pierwszy typ jednostek motorycznych wykazywał intensywne wybarwienie enzymów mitochondrialnych i słabą reakcję na ATPazę aktomiozynową. Typ drugi wykazywał średnią intensywność reakcji na enzymy mitochondrialne i wysoką na ATPazę aktomiozynową. Trzeci typ jednostek, najbardziej wrażliwych na zmęczenie, wykazywał niską intensywność reakcji enzymów mitochondrialnych, a wysoką ATPazy.

ZRÓŻNICOWANIE WŁÓKIEN MIĘŚNIOWYCH W BADANIACH BIOCHEMICZNYCH

Trudno wykazać metodami biochemicznymi różnicowanie pojedynczych włókien mięśniowych. Dlatego o różnicowaniu takim wnioskuje się pośrednio poprzez badanie całych mięśni o budowie homogennej lub zawierających w dominującym procencie jeden tylko rodzaj włókien mięśniowych.

Najlepiej poznanymi białkami miofibrylarnymi są aktyna, miozyna, tropomiozyna, troponina I, troponina C, troponina T i α -aktynina. Białka te stanowią 85% białek miofibrylarnych.

Wyizolowana z różnych mięśni szkieletowych aktyna wykazuje bardzo podobny charakter [83]. Co więcej, aktyna wyizolowana z komórek

niemięśniowych podobna jest do mięśniowej, jak to wykazano m. in. metodami immunologicznymi [83]. Dlatego aktyny nie bierze się pod uwagę przy różnicowaniu włókien mięśniowych.

Wyniki wielu badań wskazują natomiast na znaczne zróżnicowanie miozyny. Na jej podstawie różnorodność biochemiczna włókien mięśniowych zaznacza się najwyraźniej. Miozyny różnych rodzajów mięśni różnią się m. in. pod względem zawartości 3 - metyl - histydy, aktywności ATPazowej, podatności na enzymy proteolityczne, a także właściwościami immunologicznymi [82]. Furukawa i wsp. [34] wykazali, że lekkie łańcuchy miozynowe z mięśni fazowych powolnych świnki morskiej zupełnie różnią się od łańcuchów z mięśni fazowych szybkich, a ponadto jedna z komponent (LC - 3) o ciężarze cząsteczkowym 15 000 nie występuje w mięśniach fazowych powolnych. Inne białka mięśniowe były według autorów znacznie podobniejsze. Miozyna z mięśni czerwonych karpia jest 6 - krotnie odporniejsza na trawienie trypsyną i bardziej termostabilna od miozyny mięśni białych, a jej aktywność ATPazowa jest o połowę mniejsza od aktywności miozyny mięśni białych [99].

Analiza biochemiczna białek regulacyjnych dostarcza dalszych dowodów na zróżnicowanie włókien mięśniowych. Badania kompleksu troponin (troponina I, C, T) wykazały, że występują one w kilku formach charakterystycznych dla tkanki, z której pochodzą. Jednak dla wykazania różnorodności włókien mięśniowych mięśni szkieletowych bierze się pod uwagę troponinę I i częściowo troponinę T. Troponina C występuje w mięśniach poprzecznie prążkowanych kurczęcia w dwóch formach, z których jedna charakterystyczna jest dla mięśni szkieletowych, a druga — dla mięśnia sercowego. Troponina I występuje w co najmniej trzech formach w mięśniach poprzecznie prążkowanych królika [83]. Wielu autorów [19, 46, 101] wykazało różnicę między troponiną I z mięśni białych i mięśnia sercowego. Syska i wsp. wykazali, że mięśnie białe, czerwone i mięsień sercowy zawierają odmienne troponiny [101]. Troponina T z mięśni białych różni się od troponiny z mięśnia sercowego i mięśnia czerwonego [19].

Tropomiozyna wyizolowana z mięśni szkieletowych składa się w różnej proporcji z dwóch podjednostek (α i β) różniących się immunologicznie, składem aminokwasów i szybkością wędrówki elektroforetycznej w żelu poliakrylamidowym [18, 83]. Według Perry [83] istnieje w mięśniu szkieletowym korelacja między szybkością skurczów mięśnia a stosunkiem podjednostek α i β . Wyraża się ona przewagą podjednostek α we włóknach mięśniowych kurczących się szybciej [83].

Wyizolowana przez Ebashich [24] α - aktynina znajdująca się w linii Z zasługuje na uwagę ze względu na ścisłą korelację grubości linii z szybkością skurczu [29]. Białko to wykazuje również zróżnicowanie w zależ-

ności od rodzaju mięśnia, z którego pochodzi i dlatego powinno być brane pod uwagę w różnicowaniu biochemicznym włókien mięśniowych [89, 97].

ZRÓŻNICOWANIE WŁÓKIEN MIĘŚNIOWYCH W ROZWOJU OSOBNICZYM
I W BADANIACH DOŚWIADCZALNYCH

Dla pełniejszego zrozumienia istniejącego zróżnicowania włókien mięśniowych opisanego w mięśniach szkieletowych osobników dorosłych i zdrowych bada się zróżnicowanie włókien w rozwoju osobniczym i w doświadczeniach takich, jak: długotrwałe drażnienie nerwu, długotrwały trening, krzyżowe unerwienie, odnerwienie, odcięcie ścięgien, regeneracja po posiekaniu mięśnia czy głodzenie.

Młode szczury, myszy i niektóre inne ssaki, które rodzą się z mięśniami niezróżnicowanymi są częstym obiektem badań kształtowania się zróżnicowań. U dorosłej myszy mięsień płaszczkowaty (m. soleus — SOL) zawiera niemal wyłącznie włókna mięśniowe fazowe powolne, zaś w mięśniu długim prostowniku palców (m. ekstensor digitorum longus — EDL) przeważają dwa razy szybsze włókna fazowe szybkie. Luff i Atwood [72] dokonali analizy ilościowej w mikroskopie elektronowym obu tych mięśni w ciągu pierwszych 60 dni życia myszy, śledząc przekształcenia siateczki sarkoplazmatycznej i kanalików T. W obu mięśniach w momencie urodzenia występowały podobne włókna mięśniowe, a słabszy stopień rozwoju wymienionych struktur pozwolił zaliczyć je do powoli kurczących się. W następnych dniach życia pozapłodowego we włóknach mięśniowych obu badanych mięśni ilość siateczki sarkoplazmatycznej i kanalików systemu T rosły, jednak w EDL znacznie szybciej. W konsekwencji, gęstość siateczki sarkoplazmatycznej i kanalików systemu T we włóknach tego mięśnia była kilkakrotnie większa [79]. Także w mięśniach szczura uzyskano podobne wyniki [45].

Gutmann i wsp. [43] badali czas skurczu i aktywność ATPazy tych mięśni od urodzenia od jednego roku życia u szczura, królika i świnki morskiej. Obydwa mięśnie w momencie urodzenia u szczura i świnki morskiej różnią się wyraźnie. Później różnice te pogłębiają się. W kontroli histochemicznej procentowy udział włókien o wysokiej aktywności ATPazy (typ II) aktomiozynowej wzrastał w mięśniu EDL. Natomiast w SOL rósł procentowy udział włókien o niskiej aktywności ATPazy (typ I). U królika zaś, obydwie mięśnie miały podobny czas skurczu w momencie urodzenia. Później następujące przemiany spowodowały, że EDL kurczył się 3,5 razy szybciej niż SOL. Kontrola histochemiczna wykazała, że udział procentowy włókien o wysokiej aktywności ATPazy (typ II) rósł w fazowym szybkim EDL, a o niskiej aktywności (typ I) w fazowym powolnym SOL [76].

Pod wpływem długotrwałej stymulacji mięśnia królika, zawierającego głównie włókna fazowe szybkie, impulsami „powolnymi” naśladującymi częstotliwością impulsy skurczowe biegnące w nerwach zaopatrujących mięśnie fazowe-powolne, włókna mięśniowe tracą swój charakter włókien fazowych szybkich [85]. Stopniowo zmieniała się też aktywność najważniejszych enzymów, typowych dla włókien fazowych szybkich. Mięsień zaczął kurczyć się jak fazowy powolny, a kontrola histologiczna po zakończeniu eksperymentu wykazała dominację włókien fazowych powolnych [85]. W analizie biochemicznej podobnego eksperymentu Streter i wsp. [96] stwierdzili, że EDL królika, zawierający głównie włókna fazowe szybkie, zaczął — pod wpływem długotrwałej „powolnej” stymulacji — syntetyzować lekkie łańcuchy miozynowe, typowe dla fazowych powolnych włókien mięśniowych, jak w mięśniu SOL. Natomiast aktywność ATPazowa zmalała o kilkadziesiąt procent, a czas skurczu wydłużył się.

Syrový i wsp. [100] poddali długotrwałemu wysiłkowi młode szczury, w następstwie czego, w SOL wzrosła o 11,8% liczba włókien fazowych szybkich. Indentyczne doświadczenie przeprowadzone na dorosłych szczurach nie doprowadziło do zmiany w proporcji włókien mięśniowych [100]. Edgerton i wsp. [26] stwierdzili po 6 - miesięcznym treningu lemura sene-galskiego (*Galago senegalensis*) zmiany tylko w niektórych mięśniach, a ich nasilenie zależało od położenia anatomicznego mięśnia, stopnia zaangażowania w treningu i od proporcji włókien mięśniowych. Przede wszystkim polegały one na znacznym zwiększeniu proporcji włókien fazowych-szybkich-utleniających-glikolitycznych (czerwone) kosztem włókien fazowych-szybkich-glikolitycznych (białe).

Pierwsze doświadczenia z unerwieniem krzyżowym dokonano w 1960 r. [10, 25] na mięśniach kota zawierających przede wszystkim włókna fazowe szybkie (m. flexor hallucis longus) lub fazowe powolne (m. flexor digitorum longus). Zmiana unerwienia między tymi dwoma mięśniami także powodowała zmianę szybkości skurczu. W późniejszych latach dokonano wielu podobnych eksperymentów na mięśniach fazowych różnych zwierząt. We wszystkich przypadkach obserwowano znaczne zmiany w mięśniach, wskazujące jednoznacznie na bardzo duże znaczenie unerwienia w kształtowaniu i podtrzymywaniu zróżnicowania włókien mięśniowych [11-13, 71]. Niektóre wyniki badań fizjologicznych i morfologicznych wskazują, że w przypadku krzyżowego unerwienia przemiany wywołane nowym unerwieniem nie są równomierne, tzn. że jeden z dwóch mięśni w takim doświadczeniu podlega metamorfozie szybciej i w większym stopniu. Nerwy z mięśni powolnych, dochodzące w wyniku eksperymentu do mięśni szybkich, mają w większym stopniu zmieniać ten mięsień niż nerwy szybkie zaopatrujące mięsień powolny [10, 22].

O ile w przypadku krzyżowego unerwienia mięśni fazowych następują, jak widzimy, przemiany w mięśniach, o tyle w przypadku krzyżowego unerwienia mięśni fazowych i tonicznych nadrzędne, troficzne znaczenie nerwu nie jest dominujące. Hnik i wsp. [51] krzyżowali nerwy między dwoma mięśniami grzbietu u kurczęcia; m. anterior latissimus dorsi (ALD), zawierający w 100% włókna toniczne, eksperymentalnie zaopatrzono nerwem z m. posterior latissimus dorsi (PLD), zawierającym wyłącznie włókna fazowe, nerw z PLD zaś przeszczepiono do ALD. W doświadczeniu tym, wbrew oczekiwaniom, mięśnie nie zmieniły się ani fizjologicznie, ani morfologicznie. Jednakowoż w późniejszych latach autorzy rozszerzyli eksperyment z krzyżowym unerwieniem, dokonując obserwacji u młodych kurcząt. W takim wypadku mięsień toniczny (ALD) unerwiony fazowym nerwem zmienił się fizjologicznie i morfologicznie pod wpływem nowego unerwienia fazowego. Po kilku miesiącach od operacji 60–80% włókien w ALD przeobraziło się we włókna fazowe [108].

Doświadczalne przerwanie zaopatrzenia nerwowego mięśni fazowych wywołuje w następstwie cały szereg zmian, m. in. powoduje, że zróżnicowanie włókien mięśniowych staje się coraz mniej wyraźne. Najszybciej upodabniają się włókna pod względem ilości mitochondriów [1, 33]. Opierając się na nie zawsze porównywalnych wynikach różnych autorów wydaje się, że w ciągu pierwszych dwóch tygodni rośnie liczba włókien o większej ilości mitochondriów [36, 37], a później ilość mitochondriów we włóknach maleje [37, 74]. W wyniku odnerwienia obserwowano również stopniowy zanik intensywności reakcji ATPazy aktomiozynowej we włóknach dotychczas bogatych w ten enzym [31, 40, 60], natomiast według Tomanka i Lunda [104] intensywność jej nie zmieniała się. Gutmann i wsp. [42] odnerwiali dwa mięśnie różniące się szybkością skurczu (m. extensor digitorum longus — EDL i m. soleus — SOL). Szybkość skurczów mięśni pobudzanych bezpośrednio przez bodziec elektryczny w EDL tak u młodych, jak i u dorosłych szczurów po odnerwieniu wydłużyła się, a aktywność ATPazy malała w ciągu pierwszych 3–7 dni doświadczenia. W SOL młodych szczurów skurcz wydłużał się do 7 dnia doświadczenia, a potem skracał nieznacznie. U dorosłych szczurów wydłużanie się czasu skurczu trwało tylko 2–3 dni, natomiast aktywność ATPazy zmieniała się w bardzo małym stopniu. Ultrastrukturalne obserwacje Gauthier i Dunn [37] wykazały, że włókna mięśniowe o wąskiej linii Z (fazowe szybkie) szybciej podlegają degeneracji i że są one odpowiedzialne za relatywny wzrost liczby włókien bogatszych w mitochondria. Inne rodzaje włókien fazowych wolniej podlegają przemianom w doświadczalnym odnerwieniu [37, 92, 104].

Mięśnie toniczne wykazują znacznie słabszą reakcję na odcięcie zaopatrującego je nerwu. Mięsień toniczny gołębia po odnerwieniu wyka-

zuje w ciągu następnych tygodni rozrost i brak jest w nim wyraźnych objawów degeneracyjnych [73].

Unieczynnienie przez tendotomię mięśnia zawierającego głównie włókna fazowe szybkie i fazowe powolne wykazało, że poszczególne typy włókien mięśniowych reagują rozmaicie. Najwyraźniejszym przemianom degeneracyjnym ulegają włókna fazowe powolne, dwa pozostałe rodzaje włókien fazowych wykazały większą odporność na odcięcie ścięgien, w tym fazowe szybkie, o najmniejszej ilości mitochondriów, są najodporniejsze [103].

Po eksperymentalnym posiekaniu mięśnia i pozostawieniu go w pierwotnej pozycji i przy równoczesnym zachowaniu unerwienia ma miejsce w ciągu następnych tygodni proces regeneracji mięśnia. W badaniach takich wykazano, iż mięśnie regenerują w różnym tempie w zależności od dominującego typu włókna mięśniowego [16, 94]. Hikida i wsp. [50] wykazali, że mięśnie toniczne gołębia regenerują znacznie wolniej niż mięśnie fazowe, co autorzy wiążą z wolniejszym odtwarzaniem się skomplikowanego, wielokrotnego unerwienia mięśni tonicznych.

Utrzymywanie zwierząt na bardzo ubogiej diecie spowodowało w 21 - dniowym eksperymencie utratę 30% ciężaru ciała myszy. Równocześnie analiza średnicy włókien mięśniowych w różnych mięśniach wykazała, że powolne włókna mięśniowe w mięśniu płaszczkowatym uległy mniejszym zmianom średnicy niż włókna fazowe szybkie [90]. Petterson i Goldspin [86] wykazali w eksperymentalnym 16 - tygodniowym całkowitym głodzeniu ryb, że zawartość białek mitochondrialnych spadła w mięśniu zawierającym włókna białe (tj. fazowe szybkie) z 89,6% do 70,7%, a w mięśniu zawierającym włókna czerwone (tj. toniczne) z 72,2 tylko do 70,7%, co wskazuje na ich większą odporność na głodzenie.

UWAGI KOŃCOWE

Dotychczasowe badania dowodzą szerokiego zróżnicowania włókien mięśniowych; i o ile fakt ten jest szeroko akceptowany, to brak jest, pomimo nagromadzenia wielu danych, zgodności co do definicji typów włókien mięśniowych i powszechnie zaakceptowanej ich klasyfikacji.

Raczej trudno obecnie odpowiedzieć na pytanie, czy uniwersalna klasyfikacja włókien mięśniowych jest w ogóle możliwa. Aktualnie istniejące podziały włókien stosować można tylko do badanego mięśnia i gatunku zwierzęcia, próby uogólnień zaś często prowadzą do nieporozumień. Do bardziej uniwersalnej definicji typów włókien mięśniowych powinny przyczynić się nowe metody badawcze, takie jak immunocytochemia i autoradiografia, szersze stosowanie analizy ilościowej struktur komór-

kowych [29, 64] i kompleksowe stosowanie kilku jednocześnie metod badawczych [84]. Dla pełniejszego zrozumienia zróżnicowania włókien mięśniowych i jego znaczenia funkcjonalnego powinno przyczynić się również rozszerzenie badań poza najczęściej obserwowane mięśnie ssaków. Wydaje się, że sporo danych mogą dostarczyć dalsze badania mięśni ocznych i mięśni naciągających kostki słuchowe, w których zróżnicowanie włókien mięśniowych wykazane w mikroskopie elektronowym jest największe [57, 65, 102].

W każdym przypadku opisywania zróżnicowania włókien mięśniowych należy brać pod uwagę, iż podlega ono w znacznym stopniu czynnikom modyfikacyjnym (unerwienie, aktywność fizjologiczna, choroba, głodzenie).

LITERATURA

- [1] BAJUSZ E., "Red" skeletal muscle fibres: Relative independence of neural control, *Science*, **145**: 938-940, 1964.
- [2] BÁRÁNY M., ATPase activity of myosin correlated with speed of muscle shortening, *J. Gen. Physiol.*, **56**: 197-218, 1967.
- [3] BARETS A., Contribution à l'étude des systèmes moteurs "lent" et "rapide" du muscle latéral des téléostéens, *Arch. Anat. Micr. Morph. Exp.*, **50**: 91-187, 1961.
- [4] BERGMAN R. A., AFIFI A. K., The structure of the rabbit soleus muscle and structural alternations resulting from tenotomy, *John Hopkins Med. J.*, **124**: 119-131, 1969.
- [5] BERNARD R. J., EDGERTON V. R., FURUKAWA T., PETER J. B., Histochemical, biochemical, and contractile properties of red, white, and intermediate fibers, *Am. J. Physiol.*, **220**: 410-425, 1971.
- [6] BOYD I. A., The structure and innervation of the nuclear bag muscle fibre system and the nuclear chain muscle fibre system in mammalian muscle spindles, *Phil. Trans. Roy. Soc. London, Ser. B.*, **245**: 81-136, 1962.
- [7] — The behaviour of isolated mammalian muscle spindles with intact innervation, *J. Physiol.*, **186**: 109-110, London 1966.
- [8] BUCHTAL F., KAMIENIECKA Z., Schmalbruch H., Fibre types in normal and diseased muscles and their physiological correlates, red. A. T. Milhorat, [w] *Expl. Conc. in Muscular Dystrophy T. II. Excerpta Medica*, Amsterdam 1974, 526-554.
- [9] BULLARD H. H., Histological as related to physiological and chemical differences in certain muscles of the cat, *Johns Hopkins Hosp. Rep.*, **18**: 324-358, 1919.
- [10] BULLER A. J., ECCLES J. C., ECCLES R. M., Interactions between motoneurons and muscle in respect of the characteristic speeds of their responses, *J. Physiol.*, **150**: 417-439, London 1960.
- [11] BULLER A. J., LEWIS D. M., Further observations on mammalian cross innervated skeletal muscle, *J. Physiol.*, **178**: 343-358, London 1965.
- [12] BULLER A. J., KEAN C. J. C., Further observations on the force velocity

- characteristics of cross-innervated cat skeletal muscle, *J. Physiol.*, **233**: 24-25, London 1973.
- [13] BULLER A. J., KEAN C. J. C., RANATUNGA K. W., The force-velocity characteristics of cat fast and slow-twitch skeletal muscle following cross-innervation, *J. Physiol.*, **213**: 66-67, London 1971.
- [14] BURKE R. E., LEVINE D. N., ZAJĄC F. E., Mammalian motor units: Physiological-histochemical correlation in threetypes in cat gastrochemius, *Science*, **174**: 709-712, 1971.
- [15] BURKE R. E., TSAIRIS P., The correlation of physiological properties with histochemical characteristic in single muscle units, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **228**: 145-153, 1974.
- [16] CARLSON B. M., GUTMANN E., Development of contractile properties of minced muscle regeneration in the rat, *Exp. Neurol.*, **36**: 239-249.
- [17] CLOSE R. J., Dynamic properties of mammalian skeletal muscles, *Physiol. Rev.*, **52(1)**: 129-197, 1972.
- [18] CUMMING P., PERRY S. V., The subunits and biological activity of polymorphic forms of tropomyosin, *Biochem. J.*, **133**: 765-777, 1973.
- [19] DĄBROWSKA R., DYDYŃSKA A. M., SZPACENKO A., DRABIKOWSKI W., Comparative studies on the composition and properties of troponin from fast, slow and cardiac muscles, *Int. J. Biochem.*, **4**: 189-195, 1973.
- [20] DEMPSEY E. W., WISLOCKI G. B., SINGER M., Some observations on the chemical cytology of striated muscle, *Anat. Rec.*, **96**: 221-248, 1956.
- [21] DENNY-BROWN D., The histological features of striped muscles in relation to its functional activity, *Proc. Roy. Soc., (London)* **104**: 371-411, 1929.
- [22] DUBOWITZ V., Cross-innervated a mammalian skeletal muscle. Histochemical, physiological and biochemical observations, *J. Physiol.*, **193**: 481-496, London 1967.
- [23] DUBOWITZ V., PEARSE A. G. E., A comparative histochemical study of oxidative enzyme and phosphorylase activity in skeletal muscle, *Histochemie*, **2**: 105-117, 1960.
- [24] EBASHI S., EBASHI F., α -actinin a new structural protein from striated muscle. II. Action on actin. *J. Biochem.*, **58**: 7-12, Tokyo 1965.
- [25] ECCLES J. C., Specificity of neural influence on speed of muscle contraction. The effect of use and disuse on neuromuscular function, red. E. Gutmann i P. Hnik, Publishing House of the Czechoslovak Academy of Sciences, Prague 1963, 111-128.
- [26] EDGERTON V. R., BERNARD R. J., PETER J. B., GILLESPIE C. A., Overloaded skeletal muscles of a nonhuman primate (*Galago senegalensis*), *Exp. Neurol.*, **37**: 322-339, 1972.
- [27] EDGERTON V. R., SIMPSON D. R., The intermediate muscle fiber of rats and guinea pigs, *J. Histochem. Cytochem.*, **17**: 828-838, 1969.
- [28] EDSTRÖM L., KUGELBERG E., Histochemical composition, distribution of fibres and fatiguability of single motor units. Anterior tibial muscle of the rat, *J. Neurol. Neurosurg. and Psych.*, **31**: 424-435, 1968.
- [29] EISENBERG B. R., KUDA A. M., Discrimination between fiber populations in mammalian skeletal muscle by using ultrastructural parameters, *J. Ultrastr. Res.*, **54**: 76-88, 1976.
- [30] ENGEL W. K., The essentiality of histo- and cytochemical studies of skeletal muscle in the investigation of neuromuscular disease, *Neurology*, **12**: 778-786.

- [31] ENGEL W. R., BROOKE M. N., NELSON P. G., Histochemical studies of denervated or tenotomized cat muscle: Illustrating difficulties in relating experimental animal conditions to human neuromuscular junctions, *Ann N.Y. Acad. Sci.*, **138**: 160-172, 1966.
- [32] ENGEL W. K., IRVIN R. I., A histochemical - physiological correlation of frog skeletal muscle fibres, *Am. J. Physiol.*, **213**: 511-518, 1967.
- [33] FENG T. P., LU D. K., New lights on the phenomenon of transient hypertrophy in the denervated hemidiaphragm of the rat, *Scientia Sin.*, **14**: 1772-1784, 1965.
- [34] FURUKAWA T., SUGITA H., TOYOKURA Y., Comparative studies on myofibrillar proteins in different types of skeletal muscle fibres, *Exp. Neuro.*, **37**: 515-525, 1972.
- [35] GAUTHIER F. G., On the relationship of ultrastructure and cytochemical features to color in mammalian skeletal muscle, *Z. Zellforsch.*, **95**: 462-482, 1969.
- [36] GAUTHIER G. F., Fiber types in mammalian skeletal muscle and their relationship to functional activity, [w] *Advances in Muscle Biology T. II.* red. A. M. Pearson, 1975.
- [37] GAUTHIER G. F., DUNN R. A., Ultrastructural and cytochemical features of mammalian skeletal muscle fibres following denervation, *J. Cell Science*, **12**: 525-547, 1973.
- [38] GAUTHIER G. F., PADYKULA H. A., Cytological studies of fiber types in skeletal muscle. A comparative study of the mammalian diaphragm, *J. Cell Biol.*, **28**: 333-354, 1966.
- [39] GEORGE J. C., NAIK R. M., Studies on the structure and physiology of the flight muscles of bats: 1. The occurrence of two types of fibers in the pectoralis major muscle of the bat (*Hipposideros speoris*) their relative distribution, nature of fuel store and mitochondrial content, *J. Animal Morphol. and Physiol.*, **4**: 96-101, 1957.
- [40] GUTH L., DEMPSEY P. J., COOPER T., Maintenance of neurotrophically regulated proteins in denervated skeletal and cardiac muscle, *Exp. Neurol.*, **32**: 478-488, 1971.
- [41] GUTH L., SAMAHA F. J., Qualitative differences between actomyosin ATPase of slow and fast mammalian muscle, *Exp. Neurol.*, **25**: 138-152, 1969.
- [42] GUTMANN E., MELICHNA J., SYROVY I., Contractile properties and ATPase activity in fast and slow muscle of the rat during denervation, *Exp. Neurol.*, **36**: 488-495, 1972.
- [43] — Developmental changes in contraction time and muscle fibre pattern of fast and slow muscles, *Experientia*, **29**: 435-436, 1973.
- [44] GRÜTZNER P., Zur Anatomie und Physiologie der quegestreiften Muskeln, *Rec. Zool. Suisse*, **1**: 665-684, 1884.
- [45] HANZLIKOVA V., SCHIFFINO S., Studies on the effect of denervation in developing muscle. III. Diversification of myofibrillar structure and origin of the heterogeneity of muscle fiber types, *Z. Zellforsch.*, **147**: 75-85, 1973.
- [46] HEAD J. F., PERRY S. V., The interaction of the calcium binding protein (troponin C) with bivalent cations and the inhibitory protein (troponin I), *Biochem. J.*, **137**: 145-152, 1974.
- [47] HENNEMAN E., OLSON C. B., Relations between structure and function in the design of skeletal muscles, *J. Neurophysiol.*, **28**: 581-598, 1965.
- [48] HESS A., Vertebrate slow muscle fibres, *Physiol. Rev.*, **50**: 40-62, 1970.

- [49] HESS A., PILAR G., Slow fibres in the extraocular muscles of the cat, *J. Physiol.*, **169**: 780-788, London 1963.
- [50] HIKIDA R. S., LOMBARDO J. A., Regeneration of pigeon fast and slow muscle fiber types after partial excision and mincing, *Journal of Cell Biology*, **61**: 414-426, 1974.
- [51] HNIK P., JIRMANOVA I., VYKLISKÝ L., ZELENA J., Fast and slow muscles of the chick after nerve cross - union, *J. Physiol.*, **193**: 309-325, London 1967.
- [52] HUDDARD H., *The Comparative structure and Function of Muscle*, Pergamon Press, Oxford, New York, Toronto, Sydney 1975, 1-397.
- [53] HUXLEY A. F., Muscle, *Ann. Rev. Physiol.*, **26**: 131-152, 1964.
- [54] JAMES N. T., Histochemical demonstration of myoglobin in skeletal muscle fibers and muscle spindles, *Nature*, **219**: 1174-1175, London 1968.
- [55] JÖBSIS A. C., MEIJER A. E. F. H., Evaluation of enzyme histochemical observations for metabolic studies. A combined histochemical and biochemical investigation of experimentally induced skeletal muscle - changes, *Histochemie*, **36**: 51-61, 1973.
- [56] KACZMARSKI F., The fine structure of extraocular muscles of the lizard, *Lacerta agilis* L., *Z. Mikr. - Anat. Forsch.*, **80**: 517-531, 1969.
- [57] — The fine structure of extraocular muscles of the bank vole, *Clethrionomys glareolus* Schr., *Acta Anat. Basel*, **77**: 570-582, 1970.
- [58] — The fine structure of extraocular muscles of the sparrow, *Passer montanus* L., *Z. Mikr. - Anat. Forsch.*, **82**: 523-536.
- [59] KARPATI G., ENGEL W. K., Neuronal trophic function. A new aspect demonstrated histochemically in developing solus muscle, *Arch. Neurol.*, **17**: 542-545, 1967.
- [60] — Histochemical investigation of fibre type ratios with the myofibrillar ATPase reaction in normal and denervated skeletal muscles of guinea pig, *Am. J. Anat.*, **122**: 145-157, 1968.
- [61] KILARSKI W., Organizacja siateczki sarkoplazmatycznej mięśni szkieletowych ryb. Część II. Okoń (*Perca fluviatilis* L.) The organization of the sarcoplasmic reticulum in skeletal muscles of fishes. Part. II. The Perch (*Perca fluviatilis* L.), *Acta Biol. Cracov. Ser. Zool.*, **8**: 51-57, 1965.
- [62] — Organization of the sarcoplasmic reticulum in skeletal muscles of fishes. III. Pike (*Esox lucius* L.), *Bull. Acad. Pol. Sci., Cl. II*, **14**: 575-580, 1966.
- [63] — The fine structure of striated muscles in teleost, *Z. Zellforsch.*, **94**: 562-580, 1967.
- [64] — Cytomorphometry of sarcoplasmic reticulum in extrinsic eye muscles of the teleost (*Tinca tinca* L.) *Z. Zellforsch.*, **136**: 535-544, 1973.
- [65] KILARSKI W., BIGAJ J., Organization and fine structure of extraocular muscles in *Carassius* and *Rana*, *Z. Zellforsch.*, **94**: 194-204, 1969.
- [66] KNOLL P., Über protoplasmaarme und protoplasmareiche Musculatur, *Denkschr. Kaiserl. Acad. Wissensch., Wien, Math. - Naturw. Kl.* **101**: 315-348, 1892.
- [67] KUFFLER S. W., VAUGHAN - WILLIAMS E. M., Small - nerve junctional potentials. The distribution of small motor nerves to frog skeletal muscle and the membrane characteristics of the fibres they innervate, *J. Physiol.*, **121**: 280-301, London 1953.
- [68] KUGELBERG E., EDSTRÖM L., Differential histochemical effects of muscle contractions on phosphorylase and glycogen in various types of fibres: relation to fatigue, *J. Neurol. Neurosurg. and Psych.*, **31**: 415-424, 1968.

- [69] LANNERGREN J., SMITH R. S., Types of muscle fibers in toad skeletal muscle, *Acta Physiol. Scand.*, **68**: 263-274, 1966.
- [70] LOCKER R. H., HAGYARD C. J., The myosin of rabbit red muscle, *Arch. Biochem. Biophys.*, **127**: 370-375, 1968.
- [71] LUFF A. R., Dynamic properties of fast and slow skeletal muscles in the cat and rat following cross-reinnervation, *J. Physiol.*, **248**: 83-96, London 1975.
- [72] LUFF A. R., ATWOOD H. L., Changes in the sarcoplasmic reticulum and transverse tubular system of the fast and slow skeletal muscles of the mouse during postnatal development, *J. Cell Biol.*, **51**: 369-384, 1971.
- [73] MALVEY J. E., SCHOTTELIUS D. D., SCHOTTELIUS B. A., Electrical mechanical, and physical properties of denervated latissimus dorsi muscles of the chicken, *Exp. Neurol.*, **36**: 239-249, 1973.
- [74] NACHMIAS V. T., PADYKULA H. A., A histochemical study of normal and denervated red and white muscles of the rat, *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, **4**: 47-54, 1958.
- [75] NASLEDOV G. A., Electrical excitability of different types of frog skeletal muscle fibres, *Fed. Proc. Transactions, Supp.*, **25**, T. 443, 1966.
- [76] NAYLER W. G., Influx and efflux of calcium in the physiology of muscle contraction, *Clin. Orthop.*, **46**: 157-182, 1966.
- [77] NOWOGRODZKA - ZAGÓRSKA M., The organization of extraocular muscles in *Anura*, *Acta Anat. Basel*, **82**: 22-44, 1974.
- [78] NYSTROM B., Histochemistry of developing cat muscles, *Acta Neurol. Scand.*, **44**: 405-425, 1968.
- [79] OGATA T., A histochemical study of the red and white muscle fibers. Part I. Activity of the succinoxidase system in muscle fibers, *Acta Med. Okayama*, **12**: 216-227, 1958.
- [80] PADYKULA H. A., The localization of succinic dehydrogenase in tissue sections of the rat, *Am. J. Anat.*, **91**: 107-146, 1952.
- [81] PEACHEY L. D., Muscle, *Ann. Rev. Physiol.*, **30**: 401-440, 1968.
- [82] PERRY S. V., Aspects of cell motility symposia of the society of experimental biology 22, Cambridge University Press, London 1968.
- [83] — Variation in the contractile and regulatory proteins of the myofibril with muscle type, [w] *Expl. Conc. in Muscular Dystrophy* red. A. T. Milhorat, *Excerpta Medica*, Amsterdam 1974, 319-330.
- [84] PETER J. B., BERNARD R. J., EDGERTON V. R., GILLESPIE C. A., STEMPER K. E., Metabolic profiles of three fiber types of skeletal muscle in guinea pigs and rabbits, *Biochemistry*, **11**: 2627-2632, 1972.
- [85] PETTE D., SMITH M. E., STAUDTE H. W., VRBOVA G., Effects of long-term electrical stimulation on some contractile and metabolic characteristics of fast rabbit muscle, *Pflügers Arch. Eur. J. Physiol.*, **338**: 257-272, 1973.
- [86] PETERSON S., GOLDSPIN G., The effect of starvation on the ultrastructure of red and white myotomal muscles of the crucian carp (*Carassius carassius*), *Z. Zellforsch.*, **146**: 375-384, 1973.
- [87] RANVIER L., De quelques faits relatifs à l'histologie et à la physiologie des muscles striés, *Arch. Physiol. Norm. Path.*, **2**, ser I, 1874.
- [88] — Leçons d'Anatomie Générale sur les Systèmes Musculaires, De La Haye, Paris 1880.
- [89] ROBSON R. M., ZEECE M. G., Comparative studies of α -actinin from porcine cardiac and skeletal muscle, *Biochem. Biophys. Acta*, **295**: 208-210, 1973.

- [90] ROWE R. W. D., Effect of low nutrition on size of striated muscle fibres in the mouse, *J. Exp. Zool.*, **167**: 353-359, 1968.
- [91] SCHMALBRUCH H., "Rote" Muskelfasern, *Z. Zellforsch.*, **119**: 120-146, 1971.
- [92] SHAMARIMA N. M., Electrical response of "tonic" muscle fibres to rhythmical stimulation, [w] *The effect of use and disuse on neuromuscular function*, red. E. Gutmann i P. Hnik, Elsevier, Amsterdam 1963, 499-514.
- [93] SMITH R. S., LÄNNERGRÉN J., Types of motor units in the skeletal muscle of *Xenopus laevis*, *Nature*, **217**: 281-293, London 1968.
- [94] SNOW M. H., Metabolic activity during the degenerative and early regenerative stages of minced skeletal muscle, *Anat. Rec.*, **176**: 185-204, 1973.
- [95] STEIN J. M., PADYKULA H. A., Histochemical classification of individual skeletal muscle fibres of the rat, *Am. J. Anat.*, **110**: 103-124, 1962.
- [96] STRETER F. A., GERGELY J., SALMONS S., ROMANUL F., Synthesis by fast muscle of myosin light chains characteristic of slow muscle in response to long-term stimulation, *Nature, New Biology*, **241**: 17-18, 1973.
- [97] SUZUKI A., GOLL D. E., STROMER A., SINGH I., TEMPLE I., α -aktinin from red and white porcine muscle, *Biochem. Biophys. Acta*, **295**: 168-170, 1973.
- [98] SUZUKI A., TOMATE H., Histochemical classification of skeletal muscle fibres in the cattle, *Acta Histochem. Cytochem.*, **7**: 319-327, 1974.
- [99] SYROVÝ I., GASPAR - GODFROID A., HAMOIR G., Comparative study of the myosin from red and white muscles of the carp, *Arch. Int. Physiol. Biochim.*, **78**: 919-934, 1970.
- [100] SYROVÝ I., GUTMANN E., MELICHNA J., Effect of exercise on skeletal muscle myosin ATPase activity, *Physiol. Bohemoslov.*, **21**: 633-638, 1972.
- [101] SYSKA H., PERRY S. V., TRAYER I. P., A new method of preparation of troponin I (inhibitory protein) using affinity chromatography. Evidence for three different forms of troponin I in striated muscle, *FEBS Letters*, **40**: 1-7, 1972.
- [102] TEIG E., DAHL H. A., Actomyosin ATPase activity of middle ear muscles in the cat, *Histochemie*, **29**: 1-7, 1972.
- [103] TOMANEK R. T., COOPER R. R., Ultrastructural changes in tenotomized fast and slow twitch muscle fibers, *J. Anat.*, **113**: 409-424, 1972.
- [104] TOMANEK R. J., LUND D. D., Degeneration of different types of skeletal muscle fibers. I. Denervation, *J. Anat.*, **116**: 395-405, 1973.
- [105] WACHSTEIN M., MEISEL S., The distribution of demonstrable succinic dehydrogenase and of mitochondria in tongue and skeletal muscle, *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, **1**: 483-488, 1955.
- [106] WUERKER R. B., BODLEY H. E., Changes in muscle morphology and histochemistry produced by denervation 3,3 - iminodipropionitrile and epineural vinblastine, *Am. J. Anat.*, **136**: 221-234, 1973.
- [107] YELLIN H., Unique intrafusal and extrafusal muscle fibre exhibiting dual actomyosin ATPase activity, *Exp. Neurol.*, **25**: 153-163, 1969.
- [108] ZELENÁ J., JIRMANOWA I., Ultrastructure of chicken slow muscle after nerve cross union, *Exp. Neurol.*, **38**: 272-285, 1973.

Otrzymano: 10 września 1976.

Przyjęto: 23 września 1976.

Adres autora: ul. Wielicka 265, 30-663 Kraków

KOMUNIKAT

Sekcja Mikroskopii Elektronowej Polskiego Towarzystwa Patologów i Instytut Reumatologiczny w Warszawie

organizują w dniu 16 maja 1977 r. (poniedziałek) Sympozjum na temat **Kolagen — jego struktura i funkcja**. Sympozjum odbędzie się w Instytucie Reumatologicznym. Referaty i udział w Sympozjum oraz rezerwację hotelu należy zgłaszać do dnia 28 lutego 1977 r. pod adresem

Komitet Organizacyjny Sympozjum
„Kolagen — jego struktura i funkcja”

Instytut Reumatologiczny
ul. Spartańska 1, 02-637 Warszawa
(telefon: 44-42-41, wewn. 170, 173)

RECENZJA

R. H. PAIN and B. J. SMITH, editors. *New Techniques in Biophysics and Cell Biology*. Volume 2.

Str. 397, bogato ilustrowane wykresami i schematami aparatów; kilka fotografii z mikroskopu świetlnego. Wydane przez J. Wiley and Sons w Londynie.

Recenzowana książka należy do serii nigdy nie kończącej się, gdyż ilość następnych tomów może stale przyrastać w miarę jak pojawiają się nowe metody badawcze i nowe instrumenty pomiarowe. Niemniej jednak książki tego typu są nieodzowne w każdym nowoczesnym laboratorium zajmującym się badaniem biologii komórki.

Wydawcy drugiego tomu niniejszego wydania zatroszczyli się w doborze autorów o właściwy zestaw specjalistów w danej dziedzinie biologii molekularnej i biofizyki, co daje pewność czytelnikowi, iż metody przez nich opisywane są nowoczesne, teoretycznie dobrze uzasadnione, a wyniki uzyskane z ich pomocą — powtarzalne. Książka podzielona jest na 9 rozdziałów i mały słowniczek biologiczny (1 strona) przeznaczony wyłącznie dla fizyków lub chemików, gdyż zawiera jedynie kilkanaście bardzo elementarnych pojęć biologicznych. Książka kończy się zwartym indeksem rzeczowym.

Rozdział 1, napisany przez J. M. Grahama, omawia w sposób wyczerpujący metody frakcjonowania błony komórkowej. Rozdział liczy 37 stron, zawiera stosunkowo liczny spis literatury z ostatnich 10 lat, dotyczący badań błony komórkowej. Autor omawia w swoim rozdziale kolejno metody identyfikacji frakcji błon komórkowych zarówno pod względem morfologicznym, histochemicznym, jak i biochemicznym. Jest to dość istotna część tego rozdziału. W następnej części autor omawia różne metody homogenizacji oraz ich zastosowanie dla różnych tkanek czy komórek. Następnie szczegółowo opisuje metody oczyszczania i frakcjonowania pozyskanego materiału oraz sposób przetrzymywania w stanie biochemicznie aktywnym. Rozdział napisany jest bardzo przejrzysto i daje czytelnikowi pełny obraz kolejnych etapów izolowania błon komórkowych.

W następnym rozdziale C. V. Hanson zajmuje się techniką izolowania i frakcjonowania chromosomów. Ogranicza się on do chromosomów eukariotów, głównie ssaków i muszki owocowej. W rozdziale tym znaj-

dujemy opisy własności izolowanych chromosomów — morfologiczne i chemiczne — jak również zastosowanie frakcjonowanych i niefrakcjonowanych chromosomów do różnych zagadnień. Rozdział — jak zwykle — kończy zestaw literatury dotyczącej badań chromosomów z ostatnich kilku lat.

Trzeci rozdział, napisany przez Ingemara Wadsö, zawiera opisy szeregu metod (8) mikrokalorymetrycznych do badań aktywności zespołów komórek. Autor wiele miejsca poświęca źródłom błędów, jakie napotyka eksperymentator w czasie pomiarów. Znajdujemy również krótki odcinek poświęcony konstrukcji mikrokalorymetrów oraz zastosowaniu tej metody w naukach biologicznych.

W rozdziale 4, napisanym przez Evansa i Cackinga, znajdujemy kilka prostych metod izolowania i hodowli komórek roślinnych. Autorzy opisują metody izolowania komórek i protoplastów na drodze enzymatycznej przez trawienie pektynazą w obecności EDTA, jak również na drodze mechanicznej prostym sposobem zeskrobywania miękiszowej tkanki roślin za pomocą skalpela, wytrząsania skrawków liści z piaskiem i wreszcie rozcierania tkanek roślinnych w porcelanowym moździerzu. Autorzy podają skład chemiczny środowiska hodowlanego. Pod koniec rozdziału znajdziemy krótkie omówienie możliwości spontanicznych i indukowanych fuzji między komórkowych oraz hybrydyzacji somatycznej. Metoda hodowli tkanek roślinnych oraz dokonywania kontrolowanych fuzji somatycznych jest bezcennym narzędziem dla genetyka i hodowcy.

W rozdziale 5 znajdujemy dość szczegółowy opis 6 metod wykrywania przeciwciał skierowanych przeciw antygenom wirusowym i nowotworowym. Autorzy zaczynają od bardzo prostego testu cytotoksycznego, podkreślając jego ograniczenia. Następnie zajmują się testem hemadsorpcyjnym, dość powszechnie stosowanym w niektórych laboratoriach, oraz immunofluorescencyjnym, jako bardzo czułym, ale wymagającym doświadczenia u eksperymentatora. Omawiany kolejno test immunoelektromikroskopowy daje możliwości bezpośredniego określenia miejsca lokalizacji antygeny. Następne trzy testy wykorzystują izotopy pierwiastków do określania antygenów wirusowych oraz niektórych nowotworowych.

Cztery następne rozdziały zajmują się metodami badawczymi na poziomie cząsteczkowym. Metody te są bardzo wyrafinowane, wymagają od eksperymentatora dużej wiedzy w dziedzinie fizyki oraz umiejętności swobodnego stosowania równań różniczkowych.

W rozdziale 6 Alan Suggett opisuje szereg metod określania stopnia uwodnienia cząsteczek.

W następnym rozdziale (7) Wahl daje przegląd techniki nanosekundowej pulsofluorometrii przydatnej do określania emisji chromoforów

w układach biologicznych. Chromofory mogą być częścią składową układów biologicznych, np. tyrozyna i tryptofan, lub sztucznie wprowadzonymi fluorochromami. Opisywane metody pozwalają wykrywać zmiany w emisji, jakie zachodzą w odstępach nanosekundowych i stąd wnioskować o strukturze cząsteczki. W rozdziale obok rozważań teoretycznych i opisu metody znajdujemy również schematy przeprowadzania pomiarów i schematy aparatów.

Rozdział 8 opisuje zastosowanie izotopu węgla (^{13}C) w metodzie rezonansu magnetycznego jądra do układów biologicznych. Autor zajmuje się własnościami spektralnymi węgla ^{13}C , metodami polepszania czułości pomiarów i wreszcie zastosowaniem izotopu węgla ^{13}C w biologii. Znajdujemy tutaj opisy pożyteczne w analizie aminokwasów i peptydów, białek, badania sposobu rozwijania się łańcuchów białek, struktury nukleotydów, udziału fosfolipidów w błonach biologicznych naturalnych oraz współdziałania małych cząsteczek (np. CO_2) z białkami.

W ostatnim rozdziale (9) Cammarck opisuje wykorzystanie efektu Mössbauera do badań struktury białek zawierających żelazo. W pierwszej części autor wyjaśnia w dużym skrócie zasady spektroskopii Mössbauera dla izotopu żelaza ^{57}Fe . W części drugiej omawia techniki doświadczeń i wreszcie ich praktyczne zastosowanie.

W. Kilariski

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. 12 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.

Warunki prenumeraty kwartalnika

POSTĘPY BIOLOGII KOMÓRKI

Cena prenumeraty krajowej:

rocznie zł 80.— półrocznie zł 40.—

Prenumeratę na kraj przyjmują Oddziały RSW „Prasa - Książka - Ruch” oraz urzędy pocztowe i doręczyciele w terminach:

— do dnia 25 listopada na styczeń, I kwartał, I półrocze roku następnego i na cały rok następny,

— do dnia 10 miesiąca, poprzedzającego okres prenumeraty, na pozostałe okresy roku bieżącego.

Jednostki gospodarki uspołecznionej, instytucje i organizacje społeczno-polityczne, składają zamówienia w miejscowych Oddziałach RSW „Prasa - Książka - Ruch”.

Zakłady pracy w miejscowościach, w których nie ma Oddziałów RSW, oraz prenumeratorzy indywidualni zamawiają prenumeratę w urzędach pocztowych lub u doręczycieli.

Prenumeratę ze zleceniem wysyłki za granicę, która jest o 50% droższa od prenumeraty krajowej, przyjmuje RSW „Prasa - Książka - Ruch”, Centrala Kolportażu Prasy i Wydawnictw, ul. Towarowa 28, 00-958 Warszawa, konto PKO nr 1531-71, w terminach podanych dla prenumeraty krajowej.

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

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, 00-068 Warszawa, 7 Krakowskie Przedmieście, 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.

