

APARAT KURCZLIWY I CYTOSZKIELETOWY KOMÓREK MIĘŚNI GŁADKICH KRĘGOWCÓW

CONTRACTILE AND CYTOSKELETAL APPARATUS OF THE SMOOTH MUSCLE CELLS OF THE VERTEBRATES

Anna RATAJSKA i Halina MOŁAK-OLCZAKOWA

Zakład Anatomii Patologicznej Instytutu Biostruktury
Warszawskiej Akademii Medycznej

Streszczenie. Współcześnie ukształtował się pogląd, że aparat kurczliwy komórek mięśni gładkich składa się z dwu rodzajów filamentów: cienkich, o średnicy 7,0–8,0 nm, i grubych, o średnicy 14,0–16,0 nm. Obok tych struktur komórki mięśni gładkich, tak jak inne komórki eukariotyczne, zawierają filamenty pośrednie o średnicy 10,0 nm, które stanowią podtrzymujące rusztowanie aparatu kurczliwego mięśni gładkich. Białkami cienkich filamentów są aktyna i tropomiozyna. Cienkie filamenty zawierają też prawdopodobnie leiotoninę. Głównym białkiem grubych filamentów jest miozyna, ale ultrastruktura grubych filamentów jest prawdopodobnie inna od struktury grubych filamentów mięśni szkieletowych, o czym świadczą obserwacje mikroskopowe oraz badania nad agregacją cząsteczek miozyny *in vitro*. Sądzi się, że skurcz komórek mięśni gładkich odbywa się na zasadzie przesuwania się względem siebie dwóch rodzajów filamentów, podczas którego dochodzi do wielokrotnego krótkotrwałego kontaktu aktyny z miozyną. Regulacja tego procesu odbywa się poprzez fosforylację jednego z lekkich łańcuchów miozyny i zależy od obecności jonów wapnia w sarkoplazmie. Proponowane są również inne mechanizmy.

Summary. It is generally accepted, that contractile apparatus of the smooth muscle cells of the vertebrates consists of two kinds of filaments: thin — of diameter 7.0–8.0 nm and thick — of diameter 14.0–16.0 nm. In addition to these structures smooth muscle cells, as other eucaryotic cells, contain intermediate-sized filaments of diameter 10.0 nm, which serve as a supporting framework of the contractile apparatus in smooth muscle. Proteins of thin filaments are actin and tropomyosin. Thin filaments contain probably leiotonin also. The main protein of thick filaments is myosin, but ultrastructure of the thick filaments is probably different from that of skeletal muscle, which is known from electron microscopic studies and from assembly of myosin molecules *in vitro*. It is believed, that contraction of the smooth muscle cells depends on the sliding of two kinds of

filaments one by another, during which actin and myosin are many times in transient contact. Regulation of this process is probably fulfilled by phosphorylation of one of the light chain of myosin molecule, depending on the presence of calcium ions in sarcoplasm, however, other mechanisms can be considered.

WPROWADZENIE

Prawie każda komórka Eucaryota zawiera zestaw białek kurczliwych, które biorą udział w wielu procesach fizjologicznych i patologicznych, takich jak: skurcz, przemieszczanie komórek, transport wewnątrzkomórkowy, endo- i egzocytoza, podział komórki, morfogeneza, krzepnięcie krwi, obkurczanie się ran oraz rozprzestrzenianie się komórek nowotworowych [4, 6, 16, 24, 25, 30, 58, 93, 120, 147, 152, 155, 158, 203].

Do białek tych należą aktyna i miozyna. W cytoplazmie komórek aktyna występuje przeważnie w postaci filamentów, o średnicy 7,0–8,0 nm, zwanych filamentami cienkimi lub mikrofilamentami. Miozyna w komórkach mięśniowych nie tworzy zwykle filamentów [24, 143, 145], natomiast w komórkach mięśniowych cząsteczki miozyny zagregowane są filamenty grube o średnicy 14,0–16,0 nm. Filamenty cienkie i grube są składnikami aparatu kurczliwego.

Trzeci rodzaj filamentów komórkowych [60], zwanych pośrednimi ze względu na grubość wynoszącą 10,0 nm, jest niejednorodny chemicznie. Do tej grupy struktur komórkowych zalicza się filamenty keratynowe (tonofilamenty) komórek nabłonkowych, neurofilamenty neuronów, filamenty wimetynowe komórek mezenchymalnych, filamenty glijowe komórek glijowych oraz filamenty skeletynowe (desminowe) komórek mięśniowych [105].

Filamenty pośrednie szczególnie obficie występują w komórkach mięśni gładkich, gdzie wprawdzie nie biorą bezpośredniego udziału w skurczu komórek, ale pełniąc rolę elementu podporowego dla filamentów aktynowych i miozynowych tworzą niewątpliwie rodzaj cytoszkieletu.

Elementami łączącymi morfologicznie aparat kurczliwy miocytów z filamentami pośrednimi są obszary gęste elektronowo, zwane polami gęstymi (ang. dense bodies). Składnik białkowy tych obszarów — α aktynę wykryto w połączeniu z mikrofilamentami w wielu komórkach mięśniowych [202]. Jak wiadomo, białko to występuje w liniach Z sarkomerów mięśni prążkowanych, łączących filamenty aktynowe.

Cechą charakterystyczną miocytów, właściwą również wielu komórkom mięśniowym [99, 180], jest wyższy stosunek masy aktyny do miozyny [132, 153, 186] w porównaniu z mięśniami szkieletowymi. Ponadto, niektóre właściwości aktyny i miozyny mięśni gładkich są zbli-

żone do ich niemięśniowych odpowiedników. Należy dodać, że układ regulujący ATP-azę aktomiozynową w niektórych komórkach niemięśniowych [2, 41, 187, 206] wydaje się być identyczny z proponowanym przez wielu autorów systemem regulacji skurczu mięśni gładkich, związanym z fosforylacją lekkiego łańcucha miozyny. Stąd komórki mięśni gładkich stanowią w pewnej mierze ogniwo pośrednie między wyspecjalizowanymi włóknami mięśni szkieletowych a niemięśniowymi komórkami kurczliwymi.

Filamenty aktynowe i miozynowe mięśni gładkich odznaczają się dużą wrażliwością na czynności związane z przygotowaniem tkanki oraz na stosowane w preparatyce czynniki utrwalające [165, 179], co ma znaczenie w mikroskopii elektronowej. Ponadto brak jest jednolitości w metodyce oczyszczania białek kurczliwych mięśni gładkich w poszczególnych laboratoriach. Fakty te sprawiają, że obecna wiedza na temat mechanizmu skurczu i ultrastruktury aparatu kurczliwego mięśni gładkich jest uboższa w porównaniu z wiedzą na temat mięśni szkieletowych. Fakty te prawdopodobnie przyczyniły się do panującego w nauce rozłam poglądów na temat regulacji skurczu mięśni gładkich. Wydaje się zatem celowe przedstawienie obecnego stanu wiedzy w zakresie struktur kurczliwych i cytoszkieletowych miocytów kręgowców.

AKTYNA

Aktyna pochodząca z miocytów kręgowców wykazuje duże podobieństwo pod względem składu i właściwości do aktyny z komórek mięśniowych i niemięśniowych [145]. Podobieństwo to dotyczy: sekwencji aminokwasowej, zawartości nietypowego aminokwasu 3-metylohistydyny, zdolności do polimeryzacji z formy monomerycznej, globularnej G do fibrylarnej F w odpowiednich warunkach jonowych *in vitro* [70, 151], aktywowania *in vitro* Mg^{2+} — ATP-azy miozynowej z mięśni szkieletowych [20, 61, 153].

Struktura czwartorzędowa fibrylarnej aktyny z mięśni gładkich jest taka sama jak struktura F-aktyny z mięśni szkieletowych: dwie spiralnie skręcone względem siebie nici aktynowe zbudowane z liniowo ułożonych jednostek globularnych. W takiej formie aktyna stanowi trzon cienkich filamentów komórek mięśni gładkich i prążkowanych oraz mikrofilamentów licznych komórek niemięśniowych.

Według wcześniejszych poglądów, polimeryzacja aktyny z mięśni gładkich przebiega znacznie wolniej w porównaniu z polimeryzacją aktyny z mięśni szkieletowych [20, 61, 62, 64, 124], co upodabniałoby ją do aktyny niemięśniowej [99]. Z ostatnio prowadzonych badań natomiast

wynika, że sposób oczyszczania aktyny z acetonowego proszku mięśni gładkich ma wpływ na niektóre jej właściwości [184], między innymi na szybkość polimeryzacji [181].

Różnice w sekwencji aminokwasowej między aktyną z mięśni gładkich a innymi aktynami dotyczą kilku podstawień aminokwasowych [189, 190], dlatego aktynę często nazywa się białkiem ewolucyjnie konserwatywnym. Pozostaje to w związku z jej niską immunogennością [68]. Wyniki badań prowadzonych przez Vanderkerckhove i Weber [191] nad strukturą pierwszorzędową wskazują, że cząsteczki aktyny pochodzącej z różnych tkanek mogą wykazywać jednak pewną swoistość tkankową. Znajduje to ilustrację w prowadzonych już wcześniej badaniach techniką elektroogniskowania, w których wykryto cztery formy aktyny różniące się punktami izoelektrycznymi: α , β , γ i δ . Aktyna mięśni gładkich jest mieszaniną form β i γ [63].

Rola aktyny w skurczu mięśni polega na oddziaływaniu z miozyną i aktywowaniu ATP-azy miozynowej, która hydrolizując ATP wyzwala energię z wiązań chemicznych i powoduje skurcz mięśnia [146].

TABELA 1

Białka aparatu kurczliwego i cytoszkieletu miocytów kręgowców

system kurczliwy	cienkie filamenty (średnica 7,0–8,0 nm) aktyna (42 000 – ciężar cząsteczkowy monomeru) tropomiozyna (dwa łańcuchy polipeptydowe: 36 000 i 39 000) leiotonina (?) (dwie podjednostki: 80 000 i 18 000) grube filamenty (średnica 14,0–16,0 nm) miozyna (dwa ciężkie łańcuchy po 200 000 + dwie pary lekkich łańcuchów: 17 000 i 20 000)
system szkieletowy	pośrednie filamenty (średnica 10,0 nm) skeletyna (desmina) 55 000 50 000 aktyna pola gęste α -aktynina
system regulacji skurczu	tropomiozyna kinaza lekkiego łańcucha miozyny podjednostka katalityczna (105 000) podjednostka docelowa dla Ca^{2+} – kalmodulina (16 500) fosfataza I lekkiego łańcucha miozyny (60 000, 55 000, 38 000) fosfataza II lekkiego łańcucha miozyny (43 000) leiotonina podjednostka C (18 000) podjednostka A (80 000)
białko wiążące aktynę	filamina (498 000)

Ostatnio wyłoniła się sugestia, że aktyna mięśni gładkich kręgowców może pełnić również rolę podporową jako składnik cytoszkieletu komórki [82, 106] (tabela 1).

TROPOMIOZYNA

Tropomiozyna jest jednym ze składników cienkich filamentów mięśni poprzecznie prążkowanych, gdzie zlokalizowana jest wzdłuż zagłębienia utworzonego przez skręcone spiralnie dwie nici aktynowe. Badania porównawcze nad izolowanymi filamentami mięśni gładkich i prążkowanych kręgowców z zastosowaniem techniki dyfrakcji promieni X wskazują, że tropomiozyna znajduje się również w cienkich filamentach mięśni gładkich [73, 74].

Cząsteczki tropomiozyny wyizolowane z mięśni gładkich wielu narządów kręgowców [21, 133, 134, 175] mają kształt i właściwości biochemiczne bardzo podobne do cząsteczek tropomiozyny z mięśni szkieletowych [21, 55, 98]. Oba białka różnią się jednak składem aminokwasowym i właściwościami immunochemicznymi, za czym przemawiają wyniki badań Cummins i Perry [32]. Tropomiozyna jest cząsteczką pałeczkowatą, o długości 40,0 nm, zbudowaną z dwu łańcuchów polipeptydowych o ciężarach 36 000 i 39 000 i strukturze drugorzędowej α -spiralii. Oba łańcuchy zwinięte są w superspiralę. Cząsteczki tropomiozyny mają zdolność do liniowego agregowania *in vitro*.

Jak wynika z badań prowadzonych ostatnio przez Dąbrowską i wsp. [42], tropomiozyna z żąłdka kurczenia ma bardzo podobne właściwości biochemiczne do tropomiozyny z mięśni szkieletowych i wykazuje powinowactwo *in vitro* do troponiny pochodzącej z mięśni szkieletowych. (Troponina jest białkiem zbudowanym z trzech funkcjonalnie odrębnych podjednostek: troponiny C, troponiny I i troponiny T, zlokalizowanych w cienkich filamentach mięśni szkieletowych, które w połączeniu z tropomiozyną regulują oddziaływanie aktyny z miozyną i sprawiają, że aktomiozyna reaguje na zmianę stężenia jonów wapnia [37]). Hybrydowy kompleks tropomiozyny z mięśni gładkich i troponiny z mięśni szkieletowych jest aktywny biologicznie: „uczula” aktomiozynę na wapń, tj. przy braku jonów wapnia hamuje aktywność enzymatyczną ATP-azy aktomiozynowej.

Według aktualnej hipotezy, podczas skurczu mięśni szkieletowych, tropomiozyna — pod wpływem zmiany konformacyjnej kompleksu troponiny po przyłączeniu Ca^{2+} do troponiny C — zmienia pozycję w cienkich filamentach. Wówczas zostają odblokowane miejsca na cząsteczkach aktyny oddziałujące z wypustkami miozynowymi grubych filamentów

[37, 39, 40]. Rola tropomiozyny w skurczu mięśni gładkich nie została ostatecznie ustalona, tym bardziej że na temat obecności troponiny w mięśniach gładkich nie ma jednoznacznych dowodów doświadczalnych. Intrygujące jest zatem odkrycie, w którym — posługując się dyfrakcją promieni X — wykazano, że cienkie filamenty mięśni gładkich zmieniają swoją konformację podczas skurczu, podobnie jak cienkie filamenty mięśni szkieletowych. Te zmiany strukturalne cienkich filamentów nie są związane z łączeniem miozyny, lecz prawdopodobnie są powodowane przesuwaniem się nici tropomiozynowej [192].

In vitro, w układzie rekonstruowanej aktomiozyny tropomiozyna mięśni gładkich wzmacnia efekt stymulujący aktyny na ATP-azę miozynową [23, 126, 177].

„TROPONINA”

Po raz pierwszy Ebashi i wsp. [49] wysunęli sugestię, że w mięśniu gładkim żołądka kurczęcia znajduje się składnik podobny do troponiny. Frakcja rodzimej tropomiozyny zawierająca ten składnik przywraca zdolność reagowania na zmiany stężenia jonów wapnia odczulonym (czyli „niewrażliwym” na wapń) preparatom aktomiozyny. Autorzy przypuszczają, że jednym ze składników tej frakcji może być białko podobne do troponiny.

Badania w tym kierunku kontynuowała Carsten [22], otrzymując troponinę z mięśnia macicy ssaków za pomocą opisanych wcześniej metod oczyszczania tego białka z mięśni szkieletowych. Autorka wykazała, że białko to ma taką samą aktywność biologiczną jak troponina z mięśni szkieletowych: w połączeniu z tropomiozyną hamuje aktywność ATP-azy aktomiozynowej z macicy i z mięśni szkieletowych w obecności EGTA* czynnika wiążącego jony wapnia.

Korzystając z techniki rozdzielania chromatograficznego za pomocą troponiny I sprzężonej z sefarsą otrzymano z mięśnia macicy ssaków składnik białkowy podobny pod względem składu aminokwasowego i niektórych właściwości do troponiny C z mięśni szkieletowych [69].

Makioka i Hirabayashi donoszą o wyizolowaniu z żołądka kurczęcia białka o ciężarze cząsteczkowym 40 000 i aktywności hamującej ATP-azę aktomiozynową, którego działanie jest neutralizowane dodaniem troponiny C z mięśni szkieletowych królika. Białko to, w przeciwieństwie do troponiny I z mięśni szkieletowych, nie wymaga jednak do aktywacji tropomiozyny [118]. Metodami immunodysztyfacji i immunohisto-

* EGTA — sól sodowa kwasu etylenoglikolo-bis(eter-aminometylo)NN'-czterooctowego.

chemii zlokalizowano tę jednostkę w cienkich filamentach mięśni gładkich. Autorzy [118] oczyszczili z żołądka kurczęcia białko o dużym powinowactwie do podjednostek troponiny I i troponiny T z mięśni szkieletowych, z którymi tworzy kompleks. Białko to (ciężar cząsteczkowy 15 500) nie wykazuje jednak aktywności biologicznej troponiny C, gdyż w połączeniu z troponiną I i troponiną T oraz tropomiozyną z mięśni szkieletowych nie „uczula” aktomiozyny na jony wapnia [119].

Sobieszek i Bremel [175], korzystając z techniki rozdzielania frakcji białkowych metodą elektroforezy na żelu poliakrylamidowym, nie stwierdzili troponiny w mięśniach gładkich żołądka kurczęcia.

Ostatnio Grand i wsp. [66] wyizolowali z mięśni gładkich kręgowców białko kwaśne — kalmodulinę. Kalmodulina jest białkiem o ciężarze cząsteczkowym 16 500, łączącym jony wapnia i wśród białek mających powinowactwo do tego kationu wykazuje największy stopień homologii do troponiny C [47, 102]. Kalmodulina występuje powszechnie, gdyż wyizolowano ją z różnych tkanek kręgowców [43, 44, 101, 201, 204]. Białko to pełni rolę w aktywowaniu wielu procesów regulowanych przez jony wapnia [102], a w mięśniach gładkich kręgowców poprzez udział w fosforylacji miozyny partycypuje w regulacji skurczu [142, 173]. Jej udział w procesie fosforylacji miozyny mięśni szkieletowych wydaje się nie mieć wpływu na stymulowaną przez aktywną aktywność ATP-azy miozynowej (w przeciwieństwie do mięśni gładkich), jakkolwiek wyniki ostatnich badań nie wykluczają modulującego wpływu tego procesu na skurcz mięśni szkieletowych [9, 182, 183].

FILAMINA

W ostatnich latach Wang i wsp. [199] wyizolowali z mięśnia gładkiego białko o dużym ciężarze cząsteczkowym, które nazwali filaminą. Nazwa pochodzi stąd, że przeciwciała dla tego białka reagują w metodzie pośredniej immunofluorescencji z wiązkami mikrofilamentów różnych komórek hodowanych *in vitro*.

Cząsteczka filaminy ma kształt nieco asymetryczny. Jest dimerem o ciężarze cząsteczkowym 498 000 [160], składającym się z jednakowych podjednostek. Filamina rozpuszcza się łatwo w roztworach o wysokiej i niskiej sile jonowej [199]. W fizjologicznych warunkach jonowych filamina tworzy agregaty niepodobne do filamentów [160, 198]. Filamina nie wykazuje podobieństwa immunochemicznego do innych białek o podobnym ciężarze cząsteczkowym, obecnych w tej samej komórce [198, 199], natomiast pod względem składu aminokwasowego i właściwości przypomina białko makrofagów wiążące aktynę [76].

Filamina z mięśni gładkich kręgowców oddziałuje z fibrylarną aktywną *in vitro* [35]. Łączenie się tych dwu białek manifestuje się powstawaniem żelu, w którym molekuly aktywny są krzyżowo połączone za pomocą agregatów filaminy [195]. Charakter tej interakcji polega prawdopodobnie na konkurencyjnym oddziaływaniu filaminy z miejscami cząsteczek aktywny łączącymi się z miozyną, gdyż powstały *in vitro* kompleks aktywny i filaminy hamuje aktywność ATP-azy miozynowej [33]. Fizjologiczna rola tego hamowania jest nieznana.

Filaminę wykryto w różnych ilościach w komórkach niemięśniowych [34, 197]. Jak się wydaje, białko to może w tych komórkach odgrywać rolę w regulacji oddziaływania aktywny z miozyną oraz wpływać na stopień spolimeryzowania aktywny. Prawdopodobnie w komórkach mięśni gładkich filamina łącząc aktywną pełni rolę w regulowaniu ilości aktywny dostępnej do oddziaływania z miozyną. Nie ustalono dotąd, czy zależna od c-AMP fosforylacja filaminy ma znaczenie w kontroli funkcji regulacyjnej tego białka, gdyż nie wykazano żadnej zależności między fosforylacją filaminy a jej interakcją z aktywną lub innymi białkami kurczliwymi [196].

FILAMENTY CIENKIE

Cienkie filamenty odpowiadające filamentom aktywnym z mięśni szkieletowych kręgowców [73, 74] wykryto w mięśniach gładkich różnych narządów [7]. Bezpośredni dowód na to, że cienkie filamenty zawierają aktywną pochodzi od Ishikawa i wsp. [90], którzy wykazali powstawanie charakterystycznych układów jodełkowych w obecności ciężkiej meromiozyny (HMM)* w skrawkach mięśni gładkich. Układy te tworzą się w wyniku swoistego łączenia się rozpuszczalnych fragmentów ciężkiej meromiozyny z filamentami aktywnymi [129].

Filamenty aktynowe ułożone są skośnie do długiej osi komórki, pojedynczo lub w wiązках [104, 149]. Każda wiązka zawiera zmienną liczbę filamentów, od kilku do ponad stu. Polarność sąsiednich filamentów w wiązce, tj. kierunek układania się „jodełek” w skrawkach tkanekowych po traktowaniu ciężką meromiozyną, jest dowolna, w przeciwieństwie do mięśni szkieletowych, gdzie polarność filamentów aktynowych po jednej stronie linii Z jest jednakowa. W niektórych wiązках filamente aktynowe ułożone są regularnie, dając obraz układów heksagonalnych dobrze widocznych na przekrojach poprzecznych [77,

* HMM — ciężka meromiozyna, fragment cząsteczki miozyny zawierający część globularną z centrum aktywnym, powstały w wyniku trawienia cząsteczki trypsyną lub chymotrypsyną.

78, 117, 149]. Cienkie filamenty mogą też układać się rozetkowo wokół położonego centralnie grubego filamentu [77, 148, 149, 169, 179].

W pierwszych pracach dotyczących mięśni gładkich opisano w komórkach mięśniowych włókienka kurczliwe, tzw. miofibryle [123]. Obecnie niektórzy autorzy wracają ponownie do tego określenia, uważając, że filamenty grube i cienkie są zebrane w jednostki kurczliwe [78, 168, 169]. Opisane wiązki z centralnie położonym filamentem miozynowym mogą odpowiadać jednostkom kurczliwym.

Budowa cienkich filamentów mięśni gładkich i szkieletowych kręgowców jest podobna do budowy aktyny fibrylarnej. Nić tropomiozyna umieszczona jest wzdłuż rowka podwójnej spirali F-aktyny, tak jak w mięśniach szkieletowych. Stosunek wagowy aktyny do tropomiozyny w mięśniach gładkich różnych narządów jest, podobnie jak w mięśniach szkieletowych, wartością stałą i wynosi 4:1 [132].

Filamina, białko łączące aktynę, może być też związana z cienkimi filamentami mięśni gładkich, ale nie ma na to przekonywających dowodów doświadczalnych. Powiązania międzymolekularne aktyny i filaminy nie są znane. Ostatnio autorzy japońscy, prowadząc badania fizykochemiczne nad interakcją białek mięśnia gładkiego *in vitro* [122], stwierdzili, że filamina wykazuje działanie precypitujące na preparaty F-aktyny. Ten efekt „zlepiający” filaminy jest w pewnym stopniu analogiczny do wpływu α -aktyminy na preparaty aktyny [48]. Badacze ci twierdzą, że tropomiozyna znosi to oddziaływanie filaminy na aktynę *in vitro* [122]. Położenie tropomiozyny wzdłuż rowka spirali F-aktyny zapobiegałoby więc zlepianiu się wiązek cienkich filamentów w agregaty w obecności filaminy.

Długość cienkich filamentów wynosi 1–2 μm [104, 149]. Należy zwrócić uwagę, że stosunek ilościowy filamentów aktynowych do miozynowych jest znacznie wyższy w mięśniu gładkim niż w prążkowanym i wynosi w przybliżeniu 15:1, czyli na 15 filamentów aktynowych przypada jeden miozynowy [11, 45, 78, 148, 169]. Z powodu przewagi ilościowej cienkich filamentów prawdopodobnie niektóre filamenty aktynowe nie łączą się z wypustkami miozynowymi podczas skurczu, lecz pozostają „wolne” w cytoplazmie. Wydaje się, że te „wolne” filamenty aktynowe mogą pełnić w komórce mięśniowej gładkiej dodatkowe funkcje, np. elementów podporowych, składników cytoszkieletu.

Cienkie filamenty nie pozostają luźno zawieszane w cytoplazmie, lecz są przymocowane do specjalnych struktur komórki, pól gęstych [7, 11, 45, 50, 77, 140, 200]. Są to obszary gęstej elektronowo cytoplazmy widoczne w mikroskopie elektronowym w postaci ciemnych, podłużnych plamek. Metodami immunohistochemicznymi wykazano, że jednym ze składników ciałek gęstych jest α -aktynina [154]. Zatem pola gęste, bę-

dące miejscem zakotwiczenia filamentów aktynowych, byłyby pod względem składu chemicznego i funkcji strukturami analogicznymi do linii Z [150].

Cząsteczki α -aktyminy z mięśni gładkich i szkieletowych kręgowców mają identyczną strukturę drugo- i trzeciorzędową. Są to pałeczki o wymiarach $2-4 \times 30-40$ nm składające się z dwu podjednostek migrujących podczas elektroforezy na żelu poliakrylamidowym z szybkością odpowiadającą cząsteczkom o ciężarze 100 000. α -Aktymina łączy się z fibrylarną aktyną *in vitro*. Istnieje częściowe podobieństwo immunochemiczne między α -aktyniną z mięśni gładkich a α -aktyniną z mięśni szkieletowych, zatem oba białka mają kilka wspólnych determinant antygenowych [14].

Pola gęste mogą być rozrzucone dowolnie w cytoplazmie (dense bodies) lub przytwierdzone do wewnętrznej powierzchni błony komórkowej (dense patches), mogą też występować w grupach [7, 140, 200]. Rozmiary tych struktur wynoszą według różnych autorów: $3000 \times 200-500$ nm [140], $300-700$ nm [28], 4500 nm [45], $330-500$ nm [200].

MIOZYNA

Podstawowym elementem strukturalnym grubego filamentu jest miozyna. Grube filamenty mięśni prążkowanych są strukturami złożonymi. Obok miozyny zawierają inne składniki białkowe o różnym znaczeniu [94]. Ultrastruktura grubych filamentów mięśni gładkich kręgowców nie jest dobrze poznana. Czynnikiem utrudniającym badania w tym kierunku jest między innymi labilność grubych filamentów na różne czynniki stosowane podczas przygotowania tkanki (utrwalacze, warunki jonowe, pH) [165, 179]. Sposób agregowania miozyny *in vitro* przemawia za tym, że filamenty mięśni gładkich są strukturami o innej geometrii przestrzennej w porównaniu z filamentami mięśni szkieletowych.

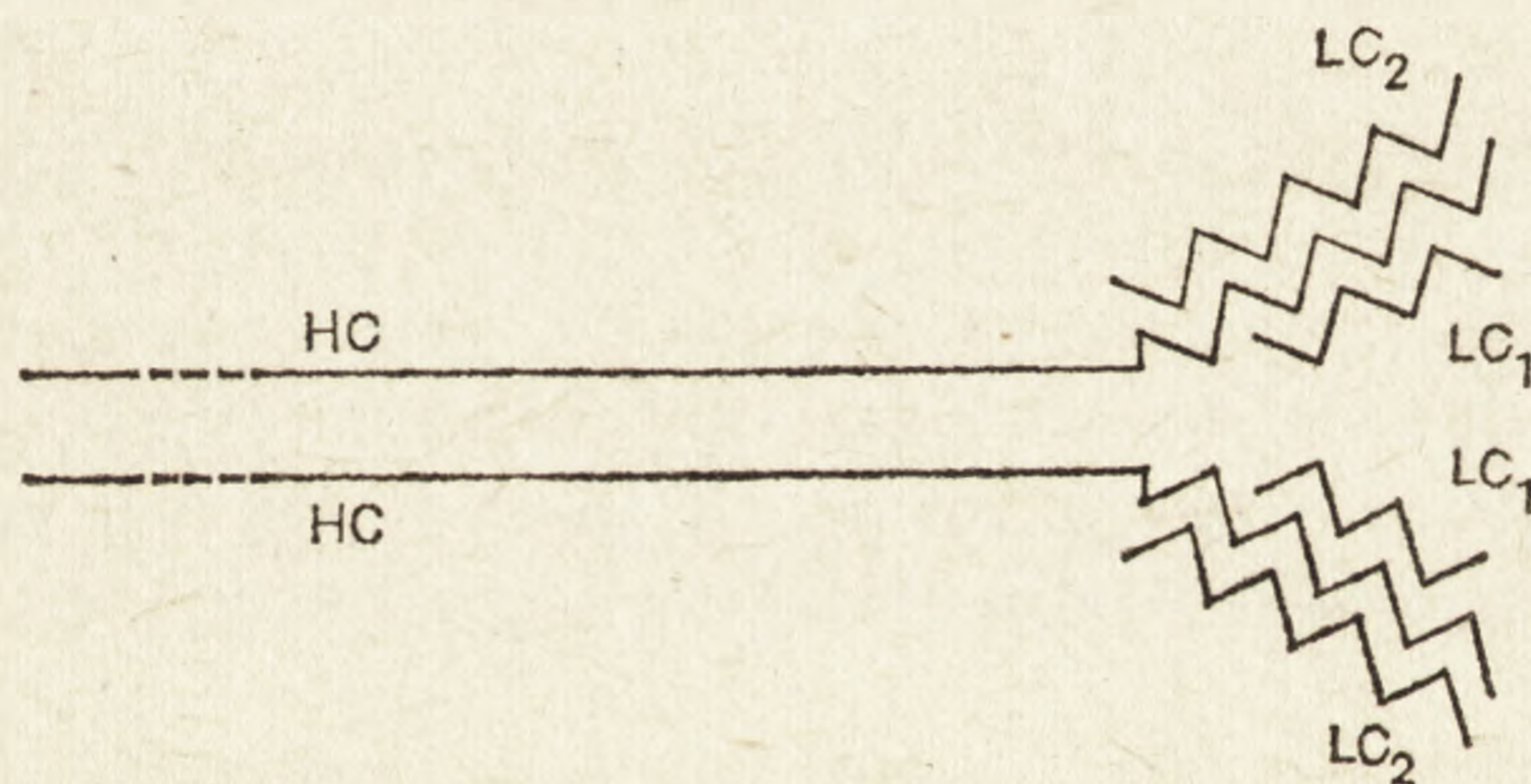
Cząsteczka miozyny pochodząca z mięśni gładkich kręgowców jest pod względem ogólnego planu budowy oraz niektórych właściwości podobna do miozyny z innych komórek mięśniowych i niemięśniowych [17, 180]. Molekuły miozyny oglądane w mikroskopie elektronowym przy użyciu techniki jednokierunkowego napyłania metalami ciężkimi mają jednakowy wygląd: są to pałeczki zakończone dwiema globularnymi „głowami” [51, 167]. W części globularnej każdej cząsteczki miozyny zlokalizowana jest aktywność enzymatyczna ATP-azy oraz miejsce łączące aktynę. Struktura i właściwości części pałeczkowatej miozyny decydują o swoistym sposobie agregowania cząsteczek w filamenty [30].

W wyniku łagodnego trawienia miozyny mięśni gładkich enzymami

proteolitycznymi, chymotrypsyną lub trypsyną, otrzymano jednostki: ciężką i lekką meromiozynę, analogicznie do takich samych podjednostek z mięśni szkieletowych [83, 84].

Podstawowe różnice między miozynami mięśni gładkich i szkieletowych dotyczą składu aminokwasowego ciężkich łańcuchów, składu i rodzajów lekkich łańcuchów, aktywności enzymatycznej [8], właściwości immunochemicznych [67] oraz różnic w rozpuszczalności, co sprawia, że miozynę mięśni gładkich można wyekstrahować z homogenatu tkankowego roztworami o względnie niskiej sile jonowej [72].

Miozynę wyizolowano z mięśni gładkich różnych narządów: z macicy ssaków [193], żołądka królika [95], tętnicy szyjnej ssaków [57, 83, 84], przelyku konia [100, 205] oraz żołądka kurczęcia. Ciężar cząsteczkowy miozyny waha się w granicach 460 000–470 000, długość cząsteczki wynosi 160,0 nm, a grubość części pałeczkowatej 2,0–3,0 nm. Cząsteczka zbudowana jest z dwu ciężkich łańcuchów polipetydowych o ciężarach około 200 000 oraz z dwu par lekkich o ciężarach 17 000 i 20 000 [97, 109]. Rozmieszczenie i wzajemne powiązania łańcuchów polipetydowych cząsteczki miozyny są analogiczne do ułożenia podjednostek miozynowych z mięśni szkieletowych [5, 94] (ryc. 1).



Ryc. 1. Schemat budowy cząsteczki miozyny mięśni gładkich kręgowców. HC — ciężkie łańcuchy polipeptydowe o ciężarach cząsteczkowych po 200 000, LC₁, LC₂ — łańcuchy lekkie, o ciężarach cząsteczkowych 17 000 i 20 000

Aktywność enzymatyczna ATP-azy miozynowej stymulowanej aktywną, mierzona w warunkach niskiej siły jonowej w obecności Mg²⁺, jest kilkakrotnie mniejsza w porównaniu z aktywnością ATP-azy miozynowej mięśni szkieletowych [8, 133].

Przejawem aktywności enzymatycznej ATP-azy aktomiozynowej *in vitro* jest zjawisko superprecypitacji, czyli oddziaływania aktyny z miozyną w obecności ATP w warunkach niskiej siły jonowej. Superprecypitacja aktomiozyny mięśni gładkich przebiega ze znacznie mniejszą

szybkością w porównaniu z aktomiozyną mięśni szkieletowych. Aktywność enzymatyczną ATP-azy aktomiozynowej mięśni gładkich można wielokrotnie zwiększyć podwyższając siłę jonową środowiska, podczas gdy aktywność ATP-azy aktomiozynowej mięśni szkieletowych w tych warunkach maleje [71].

FILAMENTY GRUBE

W komórkach mięśniowych gładkich cząsteczki miozyny występują w filamentach. Jednakże fakt ten przez długi czas poddawany był w wątpliwość, zanim dobrano optymalne dla utrzymania tych struktur warunki przygotowania i utrwalania tkanki. Jedną z hipotez dotyczących mechanizmu skurczu głosiła, że jednostkami kurczliwymi w mięśniu gładkim są dimery cząsteczek miozyny, oddziałujące z filamentami aktynowymi na zasadzie mechanizmu podobnego do ślizgowego [139, 140]. Według innej koncepcji, miozyna agregowałaby w filamenty tuż przed rozpoczęciem skurczu, po uwolnieniu jonów wapnia, a po rozkurczu filamenty zanikałyby [149, 162, 163].

Pogląd, że formą miozyny w komórkach mięśni gładkich są taśmy (ang. ribbons) [117, 170], został odrzucony również przez jego twórców [169], gdyż taśmy uznano za artefakty powstałe na skutek bocznego agregowania grubych filamentów pod wpływem nadmiernego rozciągnięcia mięśnia przed utrwalaniem. Filamenty miozynowe w mięśniu gładkim obserwował po raz pierwszy Choi w 1962 r. (cyt. za [165]).

Liczne późniejsze badania z zastosowaniem ugięcia promieni X [116], barwienia negatywowego izolowanych filamentów [92, 96] oraz obserwacji skrawków tkankowych w mikroskopie elektronowym potwierdziły, że grube filamenty znajdują się w komórkach skurczonych, jak i rozkurczonych [11, 29, 45, 59, 148, 169, 178].

W zależności od techniki pomiaru, stosowanego utrwalacza oraz rodzaju badanej tkanki wymiary filamentów miozynowych wynoszą: szerokość od 12 do 18 nm [18, 29, 45, 59, 96, 135, 169], długość od 0,35 do 1,4 μm . Obserwując kolejne skrawki poprzeczne mięśnia gładkiego stwierdzono, że długość filamentów grubych może osiągać 2,2 μm [7].

Filamenty miozynowe w ultracienkich skrawkach mięśni gładkich mają lity rdzeń o szorstkiej powierzchni [29, 45]. To wrażenie szorstkości (ang. fuzzy) spowodowane jest prawdopodobnie istnieniem poprzecznych wypustek utworzonych przez globularne części cząsteczek miozyny [45, 149, 163]. Trzon filamentów miozynowych jest zbudowany z części pałeczkowatych cząsteczek, które odpowiadają fragmentom lekkiej mero-miozyny (LMM). Fragmenty te charakteryzują się większą rozpuszczal-

nością i większą ruchliwością elektroforetyczną w porównaniu z fragmentami LMM mięśni szkieletowych, co może być związane z małą stabilnością grubych filamentów mięśni gładkich kręgowców [7, 45, 96, 135].

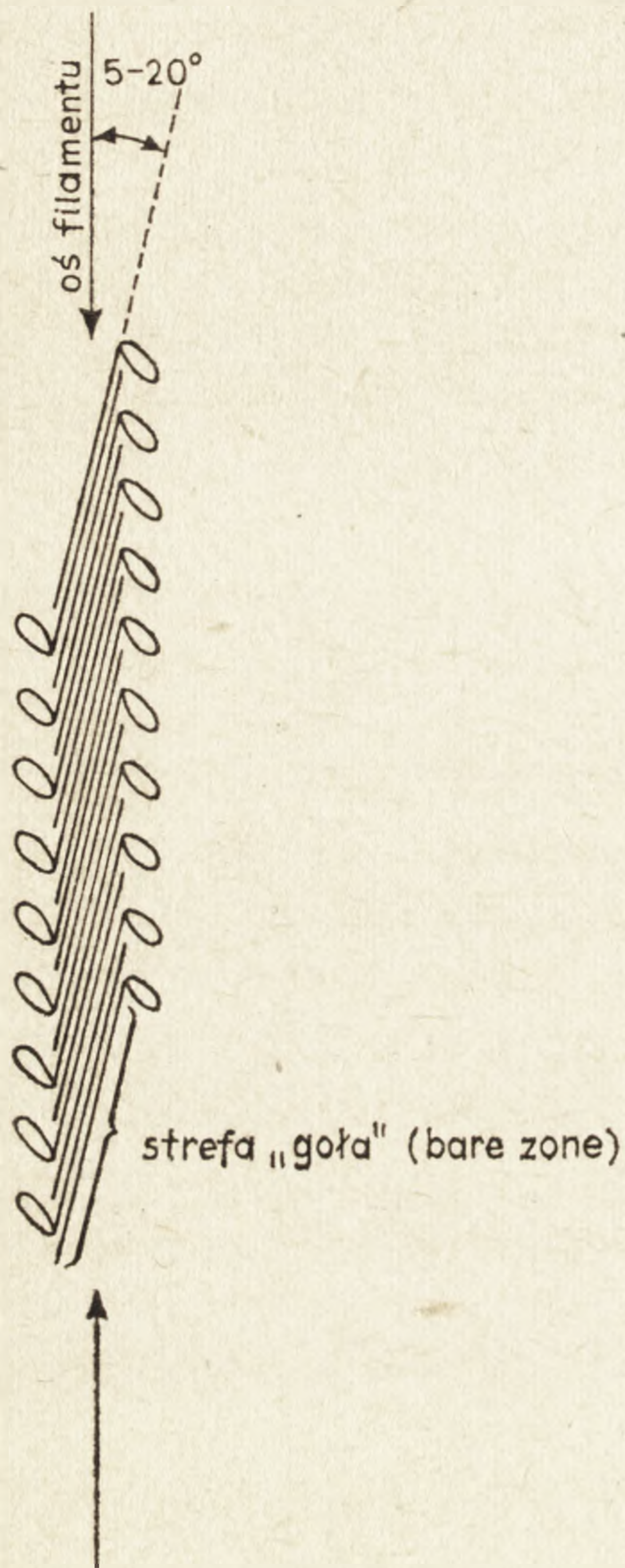
Z powodu labilności filamentów miozynowych badanie ich ultrastruktury w utrwalonych skrawkach tkankowych jest ograniczone. Stąd jedną z metod jest badanie filamentów syntetycznych. Filamenty takie otrzymuje się najczęściej przez obniżenie siły jonowej oczyszczonych preparatów miozyny. Na sposób agregowania miozyny mają wpływ również wartości pH i obecność niektórych kationów dwuwartościowych [165, 180].

Jedną z form filamentów syntetycznych powstałych z cząsteczek miozyny wyizolowanych z żołądka kurczęcia [92], macicy [75, 161], taśmy okrężnicy i nasieniowodu ssaków [174] jest układ dwupolarny, w którym głowy cząsteczek miozyny są spolaryzowane przeciwnie względem osi prostopadłej do trzonu filamentu — tak samo jak w filamentach mięśni szkieletowych otrzymanych przez Huxleya [85]. Powstałe w ten sposób agregaty są krótsze od filamentów Huxleya. Filamenty te na ogół nie mają tzw. gołej strefy (ang. bare zone), pozbawionej wypustek miozynowych, chociaż niektórzy autorzy obserwowali gołe strefy o długości około 0,15–0,2 nm w środkowej części filamentu [92, 96]. W innych filamentach wypustki poprzeczne są rozmieszczone wzdłuż całej długości, w regularnych odstępach co 40,0 nm, nie pozostawiając centralnej gołej strefy [144, 174]. Podobne filamenty o niewyraźnie zaznaczonej strefie gładkiej obserwowali Wachsberger i Pepe [194]. Jak twierdzą ci autorzy, takie agregaty z niezbyt ostro zaznaczoną strefą gładką są wynikiem liniowego układania się krótszych filamentów dwupolarnych w obecności 10 mM Mg^{2+} .

Inną formą filamentów otrzymanych przez Graiga i Megermana [31] są agregaty, w których cząsteczki miozyny układają się w postaci przeciwrównoległych dimerów, złączonych wzdłuż swoich części pałeczko-watych w ten sposób, że wszystkie pałeczki cząsteczek miozyn tworzą kąt 5–20° z główną osią filamentu. Wypustki miozynowe po jednej stronie filamentu mają wzdłuż całej długości jednakową polarność, a po drugiej stronie przeciwną (ryc. 2). Konsekwencją takiego układu wypustek miozynowych może być zdolność komórek mięśni gładkich do znacznego kurczenia się, co morfologicznie manifestuje się w postaci kilkakrotnego nieraz zmniejszenia długości komórki [169]. Podczas takiego maksymalnego skurczu cienkie filamenty mogą przesuwac się wzdłuż całej długości filamentów grubych aż do ich końca nie napoty-kając wypustek miozynowych o przeciwnej polarności.

Izolowane za pomocą łagodnych metod ekstrakcji filamenty z taśmy

okreźnicy świnek morskich mają podobny wygląd do filamentów Craiga i Megermana: wypustki miozynowe na całej długości filamentu bez centralnej gładkiej strefy oraz dodatkowo tzw. gładkie krawędzie na obu końcach, pozbawione wypustek miozynowych na długości około 220 nm [169].



Ryc. 2. Proponowany schemat budowy syntetycznego grubego filamentu według Craiga i Megermana [31]. Dla przejrzystości obrazu zaznaczono tylko jedną „głowę” w każdej cząsteczce miozyny

Pojedyncze filamenty miozynowe w komórkach rozkurczonych są izolowane od siebie jednym lub dwoma rzędami filamentów aktynowych [169]. Grube filamenty nie wykazują połączeń z polami gęstymi [7, 45].

SKELETYNA

Nazwa „skeletyna” wprowadzona przez Small i Sobieszek [171] na określenie białka budującego pośrednie filamenty mięśni gładkich wiąże się z funkcją tych struktur [27, 111, 112]. Skeletynę wyizolowano z bo-

gatej w filamenty pośrednie frakcji komórkowej taśmy okrężnicy świnki morskiej i żołądka świni. Ciężar cząsteczkowy skeletyny wynosi 55 000. Jest ona nierozpuszczalna w stężonych roztworach soli, natomiast stosunkowo łatwo ekstrahuje się z homogenatów mięśni gładkich kwasem octowym. W środowisku o pH równym punktowi izoelektrycznemu białko to tworzy filamenty, o średnicy 10,0 nm, różniące się morfologicznie od filamentów *in vivo* [171]. Skeletyna ma charakter kwaśny ze względu na dużą zawartość kwasu asparaginowego i glutaminowego, nie zawiera mostków dwusiarczkowych. Skład aminokwasów skeletyny przypomina skład białka neurofilamentów kręgowców. Zawartość skeletyny w komórce stanowi 15–20% zawartości wszystkich białek strukturalnych.

DESMINA

Lazarides i Hubbard [107] wyizolowali z filamentów pośrednich komórek mięśni gładkich żołądka kurczęcia białko o ciężarze cząsteczkowym 50 000, które nazwali desminą. Desminę wykryto też metodami immunohistochemicznymi w pobliżu linii Z dojrzałych mięśni szkieletowych, chociaż morfologicznie (mikroskop elektronowy) nie zidentyfikowano w mięśniach szkieletowych filamentów pośrednich. Przypuszcza się, że funkcja desminy polega na łączeniu mikrofilamentów aktynowych do struktur komórkowych mięśni: linii Z i pól gęstych. Stąd też pochodzi nazwa tego białka, która w języku greckim oznacza „wiązaną” [107]. Desmina jest nierozpuszczalna w roztworach o wysokiej sile jonowej, co upodabnia ją do skeletyny, rozpuszcza się natomiast w obecności mocznika. Przeciwciała przeciwko oczyszczonej desminie barwią metodą pośredniej immunofluorescencji delikatną sieć filamentów w cytoplazmie komórek mięśni gładkich [19, 107].

Badania porównawcze nad składem peptydowym i sekwencją aminokwasową desminy z mięśni gładkich i szkieletowych ptaków oraz ssaków przemawiają za tym, że desmina nie wykazuje swoistości tkankowej, lecz gatunkową [106]. Desminę wykryto również w komórkach niemięśniowych — fibroblastach [188]. Desmina ma bardzo podobny skład aminokwasowy do skeletyny [138].

FILAMENTY POŚREDNIE

Filamenty pośrednie są stałym składnikiem komórek mięśni gładkich kręgowców [7, 18, 19, 28, 29, 52, 79, 171]. Pojawiają się one okresowo w rozwijających się mięśniach szkieletowych, gdzie opisali je po raz pierwszy Ishikawa i wsp. [89]. Zidentyfikowano je także w wielu

komórkach niemięśniowych [89], w komórkach rozrostów patologicznych, np. w komórkach białaczkowych [53, 54], komórkach międzybłoniaka [113] i w komórkach rakowiaka jelita grubego [113]. Filamenty pośrednie są morfologicznie podobne do neurofilamentów znajdujących się w neuronach [36] oraz do tonofilamentów komórek nabłonkowych [79, 105].

Filamenty pośrednie są strukturami trwałymi, nierozpuszczalnymi w roztworach o wysokiej sile jonowej, które wypłukują miozynę oraz większość aktyny z komórek mięśniowych [28, 79, 171]. Filamenty te są odporne na wysokie temperatury, natomiast bardzo podatne na trawienie proteolityczne. W obecności odpowiednich stężeń mitostatyków, takich jak kolcemid czy kolchicina, filamenty pośrednie tworzą agregaty w komórkach hodowanych *in vitro* [19, 89].

W przeciwieństwie do filamentów miozynowych filamenty pośrednie mają gładką powierzchnię [19] i przekrój poprzeczny o zarysie okrągłym. Od filamentów grubych i cienkich odróżnia je zatem stały wymiar poprzeczny na całej długości filamentu.

Filamenty pośrednie są rozmieszczone między filamentami aktynowymi i miozynowymi nieregularnie lub w wiązках równoległych do długiej osi komórki. Przytwierdzone są do pól gęstych błony komórkowej lub do pól gęstych cytoplazmatycznych, z którymi łączą się też filamenty aktynowe. Nie zaobserwowano żadnej ciągłości anatomicznej ani funkcjonalnej między filamentami cienkimi a pośrednimi [29, 89]. Uważa się, że filamenty pośrednie w komórkach mięśni gładkich tworzą rusztowanie komórki, niezależne od aktomiozynowego systemu kurczliwego. Jednakże dzięki temu, że są one połączone z polami gęstymi, z którymi związane są również filamenty aktynowe, mogą one wpływać pośrednio na ułożenie filamentów aktynowych i miozynowych oraz kształt komórki [27]. Mogą też spełniać rolę podporową w stosunku do innych struktur komórkowych [171]. Stwierdzono np. że w komórkach hodowanych *in vitro* przytwierdzają one jądro komórkowe do podłoża [114].

Funkcjonalną niezależność cytoszkieletu od kurczliwego systemu komórki wykazano w doświadczeniu, w którym usunięcie filamentów pośrednich z komórek mięśni gładkich bez naruszenia aparatu kurczliwego nie powodowało utraty właściwości kurczliwych komórek w obecności ATP [171].

Filamenty pośrednie zawierają skeletynę i desminę. Przeprowadzone ostatnio badania biochemiczne wskazują, że aktyna może być integralnym składnikiem filamentów pośrednich [15, 91], za czym przemawia m. in. jej duże powinowactwo do desminy w warunkach *in vitro* [15, 82, 106].

MIKROTUBULE

Mikrotubule są stałym składnikiem cytoplazmy komórek roślinnych i zwierzęcych. Występują w zmiennej ilości w zależności od typu komórki lub jej cyklu życiowego. Mikrotubule uważa się za struktury cytoszkieletalne. Podkreśla się też ich rolę w transporcie wewnątrzkomórkowym [103]. Wydaje się, że znaczenie mikrotubul w komórkach mięśni gładkich jest drugorzędne w porównaniu z rolą układu filamentów kurczliwych i pośrednich. Mikrotubule obserwowano w mięśniu jelita czczego myszy [104], w mięśniu taśmy okrężnicy świnki morskiej [149]. Przebiegają one równolegle do długiej osi komórki w obszarze cytoplazmy pozbawionym mikrofibryli. W mięśniu rozciągniętym i utrwalonym glutaraldehydem mają kształt rurek o średnicy 20,0-30,0 nm i ścianach zbudowanych z podjednostek o średnicy 5,0 nm [104, 149, 179].

MECHANIZM SKURCZU MIĘŚNI GŁADKICH

Przyjmuje się obecnie, że skurcz mięśni gładkich, podobnie jak prążkowanych, odbywa się na zasadzie mechanizmu ślizgowego [86, 87, 143, 164, 165, 173], tzn. przesuwania się względem siebie dwu rodzajów filamentów: cienkich i grubych. Warunkiem tego przesuwania się jest swoiste oddziaływanie wypustek miozynowych, tj. globularnych części cząsteczek miozyny wystających z powierzchni grubych filamentów, z filamentami aktynowymi. Efektem przesuwania się filamentów w komórkach mięśni szkieletowych jest skracanie się sarkomerów. W komórkach mięśni gładkich odpowiedź na bodźce indukujące skurcz manifestuje się nieco inaczej morfologicznie w porównaniu z mięśniem szkieletowym. Wiąże się to z inną geometrią przestrzennego rozmieszczenia cienkich i grubych filamentów, które nie układają się w formę sarkomerów, lecz tworzą w sarkoplazmie skupienia (wiązki) ułożone pod pewnym kątem w stosunku do długiej osi komórki. Inny jest również system regulacji skurczu, czyli kontroli oddziaływania aktyny z miozyną, chociaż w obu przypadkach proces regulacji jest sterowany zmianą stężenia jonów wapnia w sarkoplazmie.

W przyrodzie znane są dwa systemy regulacji cyklu skurczowo-rozkurczowego: związany z aktyną (actin-linked), występujący w mięśniach poprzecznie prążkowanych oraz związany z miozyną (myosin-linked) [37]. Istnieje też możliwość, że w jednej komórce mogą działać oba systemy regulacji [110, 115]. Koncepcję tę potwierdził ostatnio Marston i wsp. [121] badając systemy regulujące mięśni gładkich naczyń kręgowców.

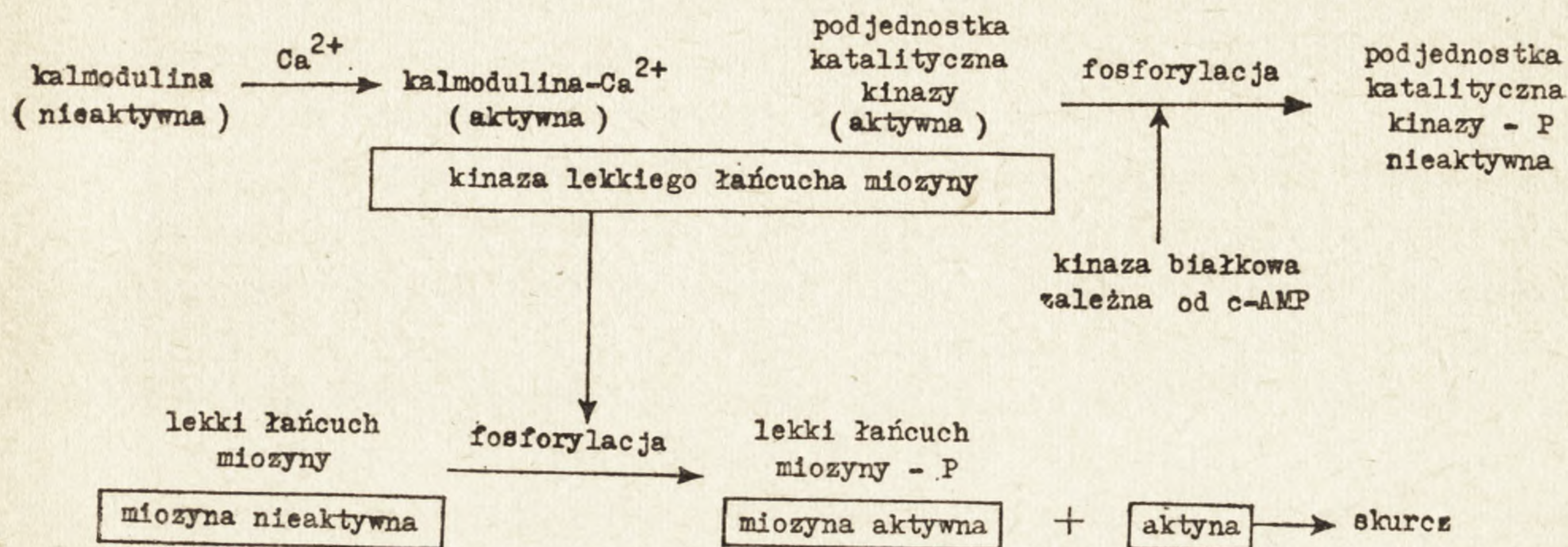
W systemie związanym z miozyną, wykrytym początkowo w mięśniach mięczaków, sterowanie aktywności aktyny i miozyny odbywa się za pośrednictwem jednego z lekkich łańcuchów miozyny. Podczas skurczu łańcuch ten przyjmuje taką konformację, która zapobiega przyłączeniu aktyny. W czasie skurczu indukowanego wzrostem stężenia jonów wapnia w sarkoplazmie, miejsce łączące aktynę na cząsteczce miozyny zostaje odblokowane, co umożliwia oddziaływanie z aktyną.

SYSTEM REGULACJI SKURCZU ZWIĄZANY Z FOSFORYLACJĄ LEKKIEGO ŁAŃCUCHA MIOZINY

Po raz pierwszy Bremel [13] wysunął sugestię, że regulacja skurczu w mięśniach gładkich kręgowców związana jest z cząsteczką miozyny. Zgodnie z tą hipotezą, rolę regulującą pełniłyby lekkie łańcuchy [12, 176], gdyż po ich usunięciu aktywność ATP-azowa miozyny przestaje być wrażliwa na wapń [131]. W wyniku dalszych badań prowadzonych w wielu laboratoriach wykryto system fosforylacji jednego z lekkich łańcuchów miozyny o ciężarze cząsteczkowym 20 000 i wykazano związek tego procesu ze wzrostem aktywności ATP-azy miozynowej w obecności jonów wapnia [5, 23, 43, 56, 65, 88, 172]. W systemie tym induktorem oddziaływania aktyny z miozyną jest kinaza lekkiego łańcucha, która katalizując fosforylację lekkiego łańcucha umożliwia stymulowanie przez aktynę aktywności ATP-azy miozynowej. Kinazę wykryto również w mięśniach szkieletowych kręgowców oraz w komórkach niemięśniowych [2]. Kinazy białkowe lekkiego łańcucha, które są enzymami zależnymi od wapnia, nie są aktywowane przez c-AMP [1].

Dalsze badania prowadzone przez Dąbrowską i wsp. [38, 43] wykazały, że kinaza miozyny mięśni gładkich składa się z dwu podjednostek o ciężarach cząsteczkowych 17 000 i 105 000, które tylko w połączeniu są aktywne biologicznie. Lżejszy składnik jest białkiem docelowym dla jonów wapnia, podobnie jak troponina C z mięśni szkieletowych. Podjednostka ta jest kalmoduliną, na co wskazują jej skład aminokwasowy, ruchliwość elektroforetyczna i spektrum absorpcji. Cięższa podjednostka kinazy, katalityczna ulega regulującemu wpływowi fosforylującej kinazy zależnej od wysokiego poziomu c-AMP [3, 166]. Ufosforylowanie podjednostki przez kinazę zależną od c-AMP powoduje, że aktywność kinazy lekkiego łańcucha maleje, prawdopodobnie na skutek osłabienia wiązania kalmoduliny do enzymu [26]. Zatem obniżenie poziomu c-AMP w komórce mięśni gładkich za pośrednictwem mechanizmu aktywującego fosfodwuesterazę cyklicznych nukleotydów powodowałoby hamowanie fosforylacji podjednostki 105 000, co w konsekwencji prowadziłoby do wzrostu aktywności kinazy lekkiego łańcucha i skurczu (ryc. 3).

Znaczenie fosforylacji miozyny polega na takiej zmianie konformacyjnej cząsteczki, która umożliwi przyłączenie aktyny. Jak wykazały liczne badania, w izolowanych systemach kurczliwych, aktywność ATP-azowa takiej ufosforylowanej miozyny stymulowanej aktyną jest kilkakrotnie większa w porównaniu z preparatami miozyny nieufosforylo-



Ryc. 3. Schemat regulacji skurczu mięśni gładkich związany z fosforylacją lekkiego łańcucha miozyny. P — grupa fosforanowa

wanej [23, 43, 65, 172]. Efekt, jaki wywiera fosforylacja na aktywność ATP-azy miozynowej, można otrzymać również w inny sposób, np. modyfikując cząsteczkę miozyny czynnikami reagującymi z grupami SH [157] lub na skutek proteolitycznego działania papainy lub trypsyny na miozynę [136, 156], co potwierdza, że grupa fosforanowa nie bierze udziału w aktywności enzymatycznej miozyny, lecz zmienia jedynie jej konformację.

Wyniki badań nad superprecypitacją aktomiozyny dostarczają dalszych dowodów na regulacyjne znaczenie procesu fosforylacji [88, 108]. Nieufosforylowana miozyna nie podlega superprecypitacji i wykazuje bardzo niską aktywność enzymatyczną w obecności aktyny, mierzona w standardowych warunkach niskiej siły jonowej.

Mamy obecnie coraz więcej danych, aby twierdzić, że fosforylacja miozyny odbywa się *in vivo*. Wykazano bowiem bezpośredni związek fosforylacji ze skurczem mięśnia, mierzonym metodami fizjologicznymi [10, 81].

Sygnalem do skurczu mięśni jest podwyższenie stężenia jonów wapnia w sarkoplazmie. Znaczenie jonów wapnia w systemie regulacji skurczu mięśni gładkich nie jest jeszcze ostatecznie wyjaśnione. Efekt działania jonów wapnia w mięśniach gładkich kręgowców może być plejotropowy. Mogą one oddziaływać na poziomie kinazy lekkiego łańcucha miozyny — poprzez stymulację aktywności enzymatycznej kinazy, na

poziomie oddziaływania aktyny z miozyną, poprzez wzmaganie aktywności enzymatycznej ATP-azy [23, 108], lub też jony wapnia mogą się łączyć bezpośrednio z cząsteczką miozyny [177]. O ile pierwsza z tych możliwości niewątpliwie została udowodniona [5, 46, 108, 159], pozostałe dwie wydają się nie mieć znaczenia fizjologicznego.

Jak już wspomniano, fosforylacja jest procesem odwracalnym. Po zakończeniu skurczu, gdy stężenie Ca^{2+} w sarkoplazmie spada, ma miejsce defosforylacja miozyny, która jest katalizowana przez endogenną fosfatazę swoistą w stosunku do lekkiego łańcucha miozyny [172]. Aktywność fosfatazy swoistej w stosunku do ufosforylowanej miozyny stwierdzono w mięśniach gładkich i szkieletowych kręgowców [88, 130]. Pełną jej charakterystykę podano dopiero w ostatnich latach [137, 141]. Enzym ten powoduje obniżenie aktywności ATP-azy aktomiozynowej oraz hamuje zjawisko superprecypitacji aktomiozyny. Pato i Adelstein donoszą, że w mięśniach gładkich żołądka ptaków istnieją dwie fosfatazy: fosfataza I, składająca się z trzech podjednostek o ciężarach 60 000, 55 000 i 38 000 oraz fosfataza II, której ciężar cząsteczkowy wynosi 43 000. Oba enzymy defosforylują lekki łańcuch miozyny. Fosfataza I ma nadto aktywność defosforylującą w stosunku do kinazy miozynowej.

Jak wynika z przytoczonych doniesień, w mięśniach gładkich kręgowców do stymulowania przez aktynę aktywności ATP-azy niezbędna jest kinaza i jony wapnia. Pełną aktywność osiąga ten enzym, gdy w środowisku reakcji znajduje się tropomiozyna [177]. Mechanizm regulacyjnego wpływu tropomiozyny nie jest jeszcze poznany.

SYSTEM REGULACJI ZWIĄZANY Z CIENKIMI FILAMENTAMI

Niektórzy autorzy reprezentują pogląd, że regulacja skurczu w mięśniach gładkich związana jest z cienkimi filamentami.

Mikawa i wsp. [80, 127, 128] przeprowadzili ostatnio eksperymenty, z których wynika, że białkami regulującymi oddziaływanie aktyny z miozyną są: leiotonina składająca się z dwu podjednostek o ciężarach cząsteczkowych 80 000 i 18 000. Leiotoninę wyizolowano z frakcji rodzimej tropomiozyny mięśni gładkich żołądka kurczęcia i tętnicy głównej ssaków. Białko to nie wykazuje aktywności kinazy lekkiego łańcucha miozyny, chociaż wywiera działanie stymulujące na aktywność ATP-azy aktomiozynowej mięśni gładkich w obecności tropomiozyny i jonów wapnia oraz przyspiesza superprecypitację aktomiozyny. Ostatnio Mikawa [125] dokonał rekonstytucji cienkich filamentów z wyizolowanych składników żołądka kurczęcia: aktyny, tropomiozyny i leiotoniny. Komplex tych białek utrwalony w odpowiednich warunkach funkcjonuje

jako zależny od wapnia regulator aktywności ATP-azy miozynowej. W przeciwieństwie do systemu mięśni szkieletowych leiotonina działa jako aktywator systemu kurczliwego, podczas gdy jej odpowiednik — troponina — działa jako derepresor [125].

LITERATURA

- [1] ADELSTEIN R. S., Myosin phosphorylation, cell motility and smooth muscle contraction, *Trends in Biochem. Sciences*, **3**: 27–30, 1978.
- [2] ADELSTEIN R. S., CONTI M. A., Phosphorylation of platelet myosin increases actin-activated myosin ATP-ase activity, *Nature*, **256**: 597–598, 1975.
- [3] ADELSTEIN R. S., CONTI M. A., HATHAWAY D. R., KLEE C. B., Phosphorylation of smooth muscle myosin light chain kinase by the catalytic subunit of adenosine 3'-5' cyclic monophosphate-dependent protein kinase, *J. Biol. Chem.*, **253**: 8347–8350, 1978.
- [4] ADELSTEIN R. S., SCORDILIS S. P., TROTTER J. A., The cytoskeleton and cell movement: general considerations, [w:] *Methods and Achievements in Experimental Pathology*, red. Gabbiani G., Karger, Basel, **8**: 1–41, 1979.
- [5] AKSOY M. O., WILLIAMS D., SHARKEY E. M., HARTSHORNE D. J., A relationship between Ca^{2+} — sensitivity and phosphorylation of gizzard actomyosin, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **69**: 35–41, 1976.
- [6] ALLEN R. D., TAYLOR D. L., The molecular basis of ameboid movement, [w:] *Molecules and Cell Movement*, red. Inoué S., Stephens R. E., Raven Press, Publishers, New York, **30**: 239–258, 1975.
- [7] ASHTON F. T., SOMLYO A. V., SOMLYO A. P., The contractile apparatus of vascular smooth muscle, *Intermediate high voltage stereo electron microscopy*, *J. Mol. Biol.*, **98**: 17–29, 1975.
- [8] BÁRÁNY M., BÁRÁNY K., GAETJENS E., BAILIN G., Chicken gizzard myosin, *Arch. Biochem. Biophys.*, **113**: 205–221, 1966.
- [9] BÁRÁNY K., BÁRÁNY M., GILLIS J. M., KUSHMERICK M. J., Myosin light chain phosphorylation during the contraction cycle of frog muscle, *Fed. Proc.*, **39**: 1547–1551, 1980.
- [10] BARRON J. T., BÁRÁNY M., BÁRÁNY K., Phosphorylation of the 20 000-dalton light chain of myosin of intact arterial smooth muscle in rest and in contraction, *J. Biol. Chem.*, **254**: 4954–4956, 1979.
- [11] BOIS R. M., PEASE D. C., Electron microscopic studies of the state of myosin aggregation in the vertebrate smooth muscle cell, *Anat. Rec.*, **180**: 465–481, 1974.
- [12] BOREJDO J., OPLATKA A., Evidence for myosin-linked regulation in guinea pig taenia coli muscle, *Pflüg. Arch.*, **366**: 177–184, 1976.
- [13] BREMEL R. D., Myosin-linked calcium regulation in vertebrate smooth muscle, *Nature*, **252**: 405–407, 1974.
- [14] BRETSCHER A., VANDERKERCKHOVE J., WEBER K., α -Actinins from chicken skeletal muscle and smooth muscle show considerable chemical and immunological differences, *Eur. J. Biochem.*, **100**: 237–243, 1979.
- [15] BUCKLEY I. K., RAJU T. R., STEWART M., Some intermediate-sized filaments in cultured chick embryo fibroblasts contain F-actin, *J. Cell. Biol.*, **75**: 257a, 1977.

- [16] BURGESS D. R., SCHROEDER T. E., The cytoskeleton and cytomusculature in embryogenesis — an overview, [w:] *Methods and Achievements in Experimental Pathology*, red. Gabbiani G., Karger, Basel, 8: 171–189, 1979.
- [17] BURRIDGE K., A comparison of fibroblasts and smooth muscle myosins, *FEBS Letters*, 45: 14–17, 1974.
- [18] CAMPBELL G. R., CHAMLEY J. H., Thick filaments in vertebrate smooth muscle, *Cell Tiss. Res.*, 156: 201–216, 1975.
- [19] CAMPBELL G. R., CHAMLEY-CAMPBELL J., GRÖSCHEL-STEWART U., SMALL J. V., 100 A filaments in cultured smooth, cardiac and skeletal muscle cells, *J. Cell Biol.*, 75: 251a, 1977.
- [20] CARSTEN M. E., A study of uterine actin, *Biochemistry*, 4: 1049–1053, 1965.
- [21] CARSTEN M. E., Tropomyosin from smooth muscle of the uterus, *Biochemistry*, 7: 960–967, 1968.
- [22] CARSTEN M. E., Uterine smooth muscle: troponin, *Arch. Biochem. Biophys.*, 147: 353–357, 1971.
- [23] CHACKO S., CONTI M. A., ADELSTEIN R. S., Effect of phosphorylation of smooth muscle myosin on actin activation and Ca^{2+} regulation, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 74: 129–133, 1977.
- [24] CLARKE M., SPUDICH J. A., Nonmuscle contractile proteins: the role of actin and myosin in cell motility and shape determination, *Ann. Rev. Biochem.*, 46: 797–822, 1977.
- [25] COHEN I., The contractile system of blood platelets and its function, [w:] *Methods and Achievements in Experimental Pathology*, red. Gabbiani G., Karger, Basel, 9: 40–86, 1979.
- [26] CONTI M. A., ADELSTEIN R. S., Phosphorylation by cyclic adenosine 3'5'-monophosphate-dependent protein kinase regulates myosin light chain kinase, *Fed. Proc.*, 39: 1569–1573, 1980.
- [27] COOKE P., A filamentous cytoskeleton in vertebrate smooth muscle fibers, *J. Cell Biol.*, 68: 539–556, 1976.
- [28] COOKE P. H., CHASE R. H., Potassium chloride-insoluble myofilaments in vertebrate smooth muscle cells, *Exp. Cell Res.*, 66: 417–425, 1971.
- [29] COOKE P. H., FAY F. S., Thick myofilaments in contracted and relaxed mammalian smooth muscle, *Exp. Cell Res.*, 71: 265–272, 1972.
- [30] COOKE P. H., POISNER A. M., The role of cytoskeleton in adrenomedullary secretion, [w:] *Methods and Achievements in Experimental Pathology*, red. Gabbiani G., Karger, Basel, 9: 137–146, 1979.
- [31] CRAIG R., MEGERMAN J., Assembly of smooth muscle myosin into side-polar filaments, *J. Cell. Biol.*, 75: 990–996, 1977.
- [32] CUMMINS P., PERRY S. V., Chemical and immunochemical characteristics of tropomyosin from striated and smooth muscle, *Biochemistry*, 141: 43–49, 1974.
- [33] DAVIES P., BECHTEL P., PASTAN I., Filamin inhibits actinactivation of heavy meromyosin ATP-ase, *FEBS Letters*, 77: 228–232, 1977.
- [34] DAVIES P., SHIZUTA Y., OLDEN K., GALLO M., PASTAN I., Phosphorylation of filamin and other proteins in cultured fibroblasts, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 74: 300–307, 1977.
- [35] DAVIES P., WALLACH D., WILLINGHAM M. C., PASTAN I., Filaminactin interaction, *J. Biol. Chem.*, 253: 4036–4042, 1978.
- [36] DAY W. A., Solubilization of neurofilaments from central nervous system myelinated nerve, *J. Ultr. Res.*, 60: 362–372, 1977.

- [37] DĄBROWSKA R., Systemy regulujące cykl skurczowo-rozkurczowy mięśni, *Post. Biochem.*, **22**: 467-481, 1976.
- [38] DĄBROWSKA R., AROMATORIO D., SHERRY J. M. F., HARTSHORNE D. J., Composition of the myosin light chain kinase from chicken gizzard, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **78**: 1263-1272, 1977.
- [39] DĄBROWSKA R., DRABIKOWSKI W., Regulacja cyklu skurczowo-rozkurczowego mięśni szkieletowych, *Post. Biochem.*, **16**: 405-420, 1970.
- [40] DĄBROWSKA R., DRABIKOWSKI W., Molekularne podstawy skurczu mięśni, *Post. Biochem.*, **19**: 343-359, 1973.
- [41] DĄBROWSKA R., HARTSHORNE D. J., A Ca^{2+} — and modulatordependent myosin light chain kinase from nonmuscle cells, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **85**: 1352-1359, 1978.
- [42] DĄBROWSKA R., NOWAK E., DRABIKOWSKI W., Comparative studies of chicken gizzard and rabbit skeletal tropomyosin, *Comp. Biochem. Physiol.*, **65B**: 75-83, 1980.
- [43] DĄBROWSKA R., SHERRY J. M. F., AROMATORIO D. K., HARTSHORNE D. J., Modulator protein as a component of the myosin light chain kinase from chicken gizzard, *Biochemistry*, **17**: 253-258, 1978.
- [44] DEDMAN J. R., POTTER J. D., MEANS A. R., Biological cross-reactivity of rat testis phosphodiesterase activator protein and rabbit skeletal muscle troponin C, *J. Biol. Chem.*, **252**: 2437-2440, 1977.
- [45] DEVINE C. E., SOMLYO A. P., Thick filaments in vascular smooth muscle, *J. Cell Biol.*, **49**: 636-649, 1971.
- [46] DiSALVO J., GRUENSTEIN E., SILVER P., Ca^{2+} — dependent phosphorylation of bovine aortic actomyosin, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **158**: 410-414, 1978.
- [47] DRABIKOWSKI W., KUŹNICKI J., GRABAREK Z., Distribution of troponin-C and protein activation of 3':5'-cyclic nucleotide phosphodiesterase in vertebrate tissues, *Comp. Biochem. Physiol.*, **C60**: 1-6, 1978.
- [48] DRABIKOWSKI W., NONOMURA Y., MARUYAMA K., Effect of tropomyosin on the interaction between F-actin and the 6S component of α -actinin, *J. Biochem.*, **63**: 761-766, 1968.
- [49] EBASHI S., IWAKURA H., NAKAJIMA H., NAKAMURA R., OOI Y., New structural proteins from dog heart and chicken gizzard, *Biochem. Z.*, **345**: 201-211, 1966.
- [50] ELLIOTT G. F., LOWY J., Organization of actin in a mammalian smooth muscle, *Nature*, **219**: 156-157, 1968.
- [51] ELLIOTT G. F., OFFER G., Electron microscopy of myosin molecules from muscle and nonmuscle sources, *Proc. Roy. Soc. Lond. B*, **193**: 45-53, 1976.
- [52] FAY F. S., COOKE P. H., Reversible disaggregation of myofilaments in vertebrate smooth muscle, *J. Cell Biol.*, **56**: 399-411, 1973.
- [53] FELIX H., STRÖULI P., Different distribution pattern of 100 A-filaments in resting and locomotive leukaemia cells, *Nature*, **261**: 604-606, 1976.
- [54] FELIX H., STRÖULI P., Intermediate-sized filaments in leukaemia cells, *Virchows Arch. B Cell Pathol.*, **28**: 59-75, 1978.
- [55] FINE R. E., BLITZ A. L., A chemical comparison of tropomyosins from muscle and nonmuscle tissues, *J. Mol. Biol.*, **95**: 447-454, 1975.
- [56] FREANSON N., FOCANT B. W. W., PERRY S. V., Phosphorylation of a light chain component of myosin from smooth muscle, *FEBS Letters*, **63**: 27-32, 1976.

- [57] FREDRIKSEN D. W., Physical properties of myosins from aortic smooth muscle, *Biochemistry*, **18**: 1651-1656, 1979.
- [58] GABBIANI G. The role of contractile proteins in wound healing and fibrocontractive diseases, [w:] *Methods and Achievements in Experimental Pathology*, red. Gabbiani G., Karger, Basel, **9**: 187-206, 1979.
- [59] GARAMVÖLGYI N., VIZI E. S., KNOLL J., Regular occurrence of thick filaments in stretched mammalian smooth muscle, *J. Ultr. Res.*, **34**: 135-143, 1971.
- [60] GASKIN F., SHELANSKI M. L., Microtubules and intermediate filaments, *Essays Biochem.*, **12**: 115-146, 1976.
- [61] GASPAR-GODFROID A., HAMOIR G., LASZT L., Influence de la méthode de préparation sur des propriétés macromoléculaires de l'actine de carotides de bovidé, *Angiologica*, **4**, 323-340, 1967.
- [62] GASPAR-GODFROID A., HAMOIR G., LASZT L., Isolement de la F-actine de carotides de bovidé par fractionnement de la tonomyosine au sulfate ammonique, *Angiologica*, **5**: 186-200, 1968.
- [63] GORDON D. J., BOYER J. L., KORN E. D., Comparative biochemistry of non-muscle actins, *J. Biol. Chem.*, **252**, 8300-8309, 1977.
- [64] GOSSELIN-REY C., GERDAY C., GASPAR-GODFROID A., CARSTEN M. E., Amino-acid analysis and peptide mapping of bovine carotid actin, *Biochim. Biophys. Acta*, **175**: 165-173, 1969.
- [65] GÓRECKA A., AKSOY M. O., HARTSHORNE D. J., The effect of phosphorylation of gizzard myosin on actin-activation, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **71**: 325-331, 1976.
- [66] GRAND R. J., PERRY S. V., WEEKS R. A., Troponin C-like proteins (calmodulins) from mammalian smooth muscle and other tissues, *Biochem. J.*, **177**: 521-529, 1979.
- [67] GRÖSCHEL-STEWART U., Comparative studies of human smooth and striated muscle myosins, *Biochim. Biophys. Acta*, **229**: 322-334, 1971.
- [68] GRÖSCHEL-STEWART U., CEURREMANS S., LEHR I., MAHLMEISTER C., PAAR E., Production of specific antibodies to contractile proteins and their use in immunofluorescence microscopy. II. Species-specific and species non-specific antibodies to smooth and striated chicken muscle actin, *Histochemistry*, **50**: 271-279, 1977.
- [69] HAED J. F., WEEKS R. A., PERRY S. V., Affinity chromatographic isolation and some properties of troponin C from different muscle types, *Biochem. J.*, **161**: 465-471, 1977.
- [70] HAMOIR G., Extractibility and properties of the contractile proteins of vertebrate smooth muscle, *Philos. Trans. Roy. Soc. Lond. B*, **265**: 169-181, 1973.
- [71] HAMOIR G., Biochemistry of the myometrium, [w:] *Biology of the uterus*, red. Wynn R. M., Plenum Press, New York, London 1977, 377-421.
- [72] HAMOIR G., LASZT L., Tonomyosin of arterial muscle, *Nature*, **193**: 682-684, 1962.
- [73] HANSON J., LOWY J., The structure of F-actin and actin filaments isolated from muscle, *J. Mol. Biol.*, **6**: 46-60, 1963.
- [74] HANSON J., LOWY J., The structure of actin filaments and the origin of the axial periodicity in the I-substance of vertebrate striated muscle, *Proc. Roy. Soc. B*, **160**: 449-460, 1964.

- [75] HANSON J., LOWY J., The problem of the location of myosin in vertebrate smooth muscle (discussion), *Proc. Roy. Soc. B*, **160**: 523-524, 1964.
- [76] HARTWIG J. H., STOSSEL T. P., Isolation and properties of actin, myosin and a new actin-binding protein from rabbit alveolar macrophages, *J. Biol. Chem.*, **250**: 5696-5705, 1975.
- [77] HEUMANN H. G., A regular actin filament lattice in a vertebrate smooth muscle, *Experientia*, **26**: 1131-1132, 1970.
- [78] HEUMANN H. G., Über die Funktionsweise glatter Muskelfasern Elektronenmikroskopische Untersuchungen an der Darmmuskulatur der Hausmaus, *Cytobiologie*, **3**: 259-281, 1971.
- [79] HEUMANN H. G., WEIGOLD M., Are intermediate filaments of vertebrate smooth muscle cells and tonofilaments of epithelial cells identical cell structures?, *Experientia*, **34**: 649-650, 1978.
- [80] HIRATA M., MIKAWA T., NONOMURA Y., EBASHI S., Ca²⁺-regulation in vascular smooth muscle, *J. Biochem.*, **82**: 1793-1796, 1977.
- [81] HOAR P. E., KERRICK W. G. L., CASSIDY P. S., Chicken gizzard: relation between calcium-activated phosphorylation and contraction, *Science*, **204**: 503-506, 1979.
- [82] HUBBARD B. D., LAZARIDES E., Copurification of actin and desmin from chicken smooth muscle and their copolymerization in vitro to intermediate filaments, *J. Cell Biol.*, **80**, 166-182, 1979.
- [83] HURIAUX F., Digestion de la tonomyosine de carotides de bovidés par la trypsine et propriétés des L- et H-méromyosines correspondentes, *Angiologica*, **2**: 153-181, 1965.
- [84] HURIAUX F., Subfragment-1 of cow carotid myosin, *FEBS Letters*, **10**: 194-197, 1970.
- [85] HUXLEY H. E., Electron microscope studies on the structure of natural and synthetic protein filaments from striated muscle, *J. Mol. Biol.*, **7**: 281-308, 1963.
- [86] HUXLEY H. E., HANSON J., Changes in the cross-striations of muscle during contraction and stretch and their structural interpretation, *Nature*, **173**: 973-976, 1954.
- [87] HUXLEY H. E., NIEDERGERKE R., Structural changes in muscle during contraction. Interference microscopy of living fibers, *Nature*, **173**: 971-973, 1954.
- [88] IKEBE M., AIBA T., ONISHI H., WATANABE S., Calcium sensitivity of contractile proteins from chicken gizzard muscle, *J. Biochem.*, **83**: 1643-1655, 1978.
- [89] ISHIKAWA H., BISCHOFF R., HOLTZER H., Mitosis and intermediatesized filaments in developing skeletal muscle, *J. Cell Biol.*, **38**: 538-555, 1968.
- [90] ISHIKAWA H., BISCHOFF R., HOLTZER H., Formation of arrowhead complexes with heavy meromyosin in a variety of cell types, *J. Cell Biol.*, **43**: 312-328, 1969.
- [91] JONSON P., YUN J. S., Intermediate filaments of bovine pulmonary artery smooth muscle: distribution, isolation and polypeptide composition, *Int. J. Biochem.*, **11**: 143-154, 1980.
- [92] KAMINER B., Synthetic myosin filaments from smooth muscle, *J. Mol. Biol.*, **39**: 257-264, 1969.
- [93] KAPANCI Y., MoCOSTABELLA P., CERUTTI P., ASSIMACOPOULOS A., Distribution and function of cytoskeletal proteins in lung cells with parti-

- cular reference to "contractile interstitial cells", [w:] *Methods and Achievements in Experimental Pathology*, red. Gabbiani G., Karger, Basel, **9**: 147-168, 1979.
- [94] KASMAN K., Budowa grubego filamentu mięśnia szkieletowego, *Post. Biochem.*, **24**: 77-91, 1978.
- [95] KATOH N., KUBO S., Purification and some properties of rabbit stomach myosin, *J. Biochem.*, **81**: 1497-1503, 1977.
- [96] KELLY R. E., RICE R. V., Localization of myosin filaments in smooth muscle, *J. Cell. Biol.*, **37**: 105-116, 1968.
- [97] KENDRICK-JONES J., The sub-unit structure of gizzard myosin, *Philos. Trans. Roy. Soc. Lond. B*, **265**: 183-189, 1973.
- [98] KOMINZ D. R., SAAD F., GLADNER J. A., LAKI K., Mammalian tropomyosins, *Arch. Biochem. Biophys.*, **70**: 16-28, 1957.
- [99] KORN E. D., Biochemistry of actomyosin-dependent cell motility, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **75**: 588-599, 1978.
- [100] KOTERA A., YOKOYAMA M., YAMAGUCHI M., MIYAZAWA Y., Studies on the myosin molecule from smooth muscle, *Biopolymers*, **7**: 99-106, 1969.
- [101] KUO I. C. Y., COFFEE C. J., Purification and characterization of a troponin C — like protein from bovine adrenal medulla, *J. Biol. Chem.*, **251**: 1603-1609, 1976.
- [102] KUŹNICKI J., Występowanie i właściwości kalmoduliny, aktywatora procesów regulowanych przez jony wapnia. Praca doktorska, wykonana w Zakładzie Biochemii Układu Nerwowego i Mięśni Instytutu Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN pod kierunkiem prof. dr W. Drabikowskiego, Warszawa 1980.
- [103] KWIATKOWSKA M., Mikrotubule. II Funkcje mikrotubul, *Post. Biol. Kom.*, **1**: 255-275, 1974.
- [104] LANE B. P., Alterations in the cytologic detail of intestinal smooth muscle cells in various stages of contraction, *J. Cell Biol.*, **27**: 199-213, 1965.
- [105] LAZARIDES E., Intermediate filaments as mechanical integrators of cellular space, *Nature*, **283**: 249-256, 1980.
- [106] LAZARIDES E., BALTZER D. R., Heterogeneity of desmins between mammalian and avian muscles and their coisolation with a specific isoelectric variant of actin, *J. Cell Biol.*, **75**: 255a, 1977.
- [107] LAZARIDES E., HUBBARD B. D., Immunological characterization of the subunit of the 100 A filaments from muscle cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **73**: 4344-4348, 1976.
- [108] LEBOWITZ E. A., COOKE R., Phosphorylation of uterine smooth muscle myosin permits actin activation, *J. Biochem.*, **85**: 1489-1494, 1979.
- [109] LEGER J. J., FOCANT B., Low molecular weight component of cow smooth muscle myosins: characterization and comparison with those of striated muscle, *Biochim. Biophys. Acta*, **328**: 166-172, 1973.
- [110] LEHMAN W., Phylogenetic diversity of the proteins regulating muscular contraction, *Int. Rev. Cytol.*, **44**: 55-92, 1976.
- [111] LENK R., RANSON L., KAUFMANN Y., PENMAN S., A cytoskeletal structure with associated polyribosome obtained from HeLa Cells, **10**: 67-78, 1977.
- [112] LETHO V. P., VIRTANEN J., Association of intermediate filaments with other cell organelles in carcinoid tumor of the colon, *Experientia*, **35**: 35-37, 1979.

- [113] LETHO V. P., VIRTANEN I., Intermediate (10 nm) filaments in human malignant mesothelioma, *Virchows Arch. B Cell Pathol.*, **28**: 229-234, 1978.
- [114] LETHO V. P., VIRTANEN I., KURKI P., Intermediate filaments anchor the nuclei in nuclear monolayers of cultured human fibroblasts, *Nature*, **272**: 175-176, 1977.
- [115] LITTEN R. Z., SOLARO R. J., FORD G. D., Nature of the calcium regulatory system of bovine arterial actomyosin, *Blood Vessels*, **16**: 26-34, 1979.
- [116] LOWY J., POULSEN F. R., VIBERT P. J., Myosin filaments in vertebrate smooth muscle, *Nature*, **225**: 1053-1054, 1970.
- [117] LOWY J., SMALL J. V., The organization of myosin and actin in vertebrate smooth muscle, *Nature*, **227**: 46-51, 1970.
- [118] MAKIOKA A., HIRABAYASHI T., Isolation and localization from chicken gizzard of an inhibitory protein for Mg^{2+} -activated skeletal muscle actomyosin ATP-ase, *J. Biochem.*, **84**: 947-955, 1978.
- [119] MAKIOKA A., HIRABAYASHI T., Troponin C-like protein in chicken gizzard muscle, *J. Biochem.*, **85**: 967-975, 1979.
- [120] MALAISSE W. J., ORCI L., The role of the cytoskeleton in pancreatic B-cell function, [w:] *Methods and Achievements in Experimental Pathology*, red. Gabbiani G., Karger, Basel, **9**: 112-136, 1979.
- [121] MARSTON S. B., TREVETT R. M., WALTERS M., Calcium-ion regulated thin filaments from vascular smooth muscle, *Biochem. J.*, **185**: 355-365, 1980.
- [122] MARUYAMA K., OHASHI K., Tropomyosin inhibits the interaction of F-actin and filamin, *J. Biochem.*, **84**: 1017-1019, 1978.
- [123] MCGILL C., The structure of smooth muscle in the resting and in the contracted conditions, *Am. J. Anat.*, **9**: 493-545, 1909.
- [124] MEGERMAN J., MURPHY R. A., Myosin from arterial smooth muscle: isolation following actin depolymerization, *Biochim. Biophys. Acta*, **412**: 241-255, 1975.
- [125] MIKAWA T., "Freezing" of the calcium-regulated structures of gizzard thin filaments by glutaraldehyde, *J. Biochem.*, **85**: 879-881, 1979.
- [126] MIKAWA T., NONOMURA Y., EBASHI S., Does phosphorylation of myosin light chain have direct relation to regulation in smooth muscle?, *J. Biochem.*, **82**: 1789-1791, 1977.
- [127] MIKAWA T., NONOMURA Y., HIRATA M., EBASHI S., KAKIUCHI S., Involvement of acidic protein in regulation of smooth muscle contraction by the tropomyosin-leiotonin system, *J. Biochem.*, **84**: 1633-1635, 1978.
- [128] MIKAWA T., TOYO-OKA T., NONOMURA Y., EBASHI S., Essential factor of gizzard "troponin" fraction, *J. Biochem.*, **81**: 273-275, 1977.
- [129] MOORE P. B., HUXLEY H. E., DEROSIER D. J., Three-dimensional reconstruction of F-actin thin filaments and decorated thin filaments, *J. Mol. Biol.*, **50**: 279-295, 1970.
- [130] MORGAN M., PERRY S. V., OTTAWY J., Myosin-light chain phosphatase, *Biochem. J.*, **157**: 687-697, 1976.
- [131] MRWA U., RÜEGG J. C., Myosin-linked calcium regulation in vascular smooth muscle, *FEBS Letters*, **60**: 81-84, 1975.
- [132] MURPHY R. A., HERLIHY J. T., MEGERMAN J., Force-generating capacity and contractile protein content of arterial smooth muscle, *J. Gen. Physiol.*, **64**: 691-705, 1974.
- [133] NEEDHAM D. M., SHOENBERG C. F., Proteins of the contractile mechanism

- of mammalian smooth muscle and their possible location in the cell, *Proc. Roy. Soc. B*, **160**: 517-524, 1964.
- [134] NEEDHAM D. M., WILLIAMS J. M., Proteins of the uterine contractile mechanism, *Biochem. J.*, **89**: 552-561, 1963.
- [135] NONOMURA Y., Myofilaments in smooth muscle of guinea pig's taenia coli, *J. Cell Biol.*, **39**: 741-745, 1968.
- [136] OKAMOTO Y., SEKINE T., Effects of tryptic digestion on the enzymatic activities of chicken gizzard myosin, *J. Biochem.*, **83**: 1375-1379, 1978.
- [137] ONISHI H., LIJIMA S., ANZAI H., WATANABE S., Possible role of the myosin light chain phosphatase in the relaxation of chicken gizzard muscle, *J. Biochem.*, **86**: 1283-1290, 1979.
- [138] O'SHEA J. M., ROBSON R. M., HUIATT T. W., HARTZER M. K., STROMER M. H., Purified desmin from adult mammalian skeletal muscle: a peptide mapping comparison with desmins from adult mammalian and avian smooth muscle, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **89**: 972-980, 1979.
- [139] PANNER B. J., HONIG C. R., Filament ultrastructure and organization in vertebrate smooth muscle. Contraction hypothesis based on localization of actin and myosin, *J. Cell Biol.*, **35**: 303-321, 1967.
- [140] PANNER B. J., HONIG C. R., Locus and state of aggregation of myosin in tissue sections of vertebrate smooth muscle, *J. Cell Biol.*, **44**: 52-61, 1970.
- [141] PATO M. D., ADELSTEIN R. S., Dephosphorylation of the 20 000-dalton light chain of myosin by two different phosphatases from smooth muscle, *J. Biol. Chem.*, **255**: 6535-6538, 1980.
- [142] PERRY S. V., GRAND R. J., Mechanisms of contraction and the specialized protein components of smooth muscle, *Brit. Med. Bull.*, **35**: 219-226, 1979.
- [143] POLLARD T. D., Functional implications of the biochemical and structural properties of cytoplasmic contractile proteins: [w:] *Molecules and Cell Movement*, red. Inoué S., Stephens R. E., Raven Press, Publishers, New York 1975, 259-286.
- [144] POLLARD T. D., Electron microscopy of synthetic myosin filaments. Evidence for cross-bridge flexibility and copolymer formation, *J. Cell Biol.*, **67**: 93-104, 1975.
- [145] POLLARD T. D., WEIHING R. P., Actin and myosin and cell movement, *Crit. Rev. Biochem.*, **2**: 1-65, 1974.
- [146] PRÓCHNIEWICZ E., Fizykochemiczne właściwości aktyny i jej rola w skurczu mięśnia, *Post. Biochem.*, **22**: 77-89, 1976.
- [147] PUSZKIN S., SCHOOK W., The role of cytoskeleton in neuron activity, [w:] *Methods and Achievements in Experimental Pathology*, red. Gabbiani G., Karger, Basel, **9**: 87-111, 1979.
- [148] RICE R. V., McMANUS G. M., DEVINE C. E., SOMLYO A. P., Regular organization of thick filaments in mammalian smooth muscle, *Nature New Biology*, **231**: 242-243, 1971.
- [149] RICE R. V., MOSES J. A., McMANUS G. M., BRADY A. C., BLASIK L. M., The organization of contractile filaments in a mammalian smooth muscle, *J. Cell Biol.*, **47**: 183-196, 1970.
- [150] ROBSON R. M., HUIATT T. W., ZEECE M. G., PHILIPS T. A., GOLL D. E., STROMER M. H., Purification and properties of vertebrate smooth muscle α -actinin, *Fed. Proc.*, **33**: 1580, 1974.
- [151] RÜEGG J. C., STRASSNER E., SCHIRMER R. H., Extraktion und Reinigung

- von Arterien-Aktomyosin, Aktin und Extraglobulin, *Biochem. Z.*, **343**: 70–85, 1965.
- [152] SANGER J. W., SANGER J. M., The cytoskeleton and cell division, [w:] *Methods and Achievements in Experimental Pathology*, red. Gabbiani G., Karger, Basel, **8**: 110–142, 1979.
- [153] SCHIRMER R. H., Die Besonderheiten des kontraktilen Proteins der Arterien, *Biochem. Z.*, **343**: 269–282, 1965.
- [154] SCHOLLMAYER J. E., GOLL D. E., ROBSON D. E., STROMER M. H., Localization of α -actinin and tropomyosin in different muscles, *J. Cell Biol.*, **59**: 306a, 1973.
- [155] SCHROEDER T. E., Dynamics of the contractile ring, [w:] *Molecules and Cell Movement*, red. Inoué S., Stephens R. E., Raven Press, Publishers, New York 1975, 305–334.
- [156] SEIDEL J. C., Chymotryptic heavy meromyosin from gizzard myosin: a proteolytic fragment with the regulatory properties of the intact myosin, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **85**: 107–113, 1978.
- [157] SEIDEL J. C., Activation by actin of ATP-ase activity of chemically modified gizzard myosin without phosphorylation, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **89**: 958–964, 1979.
- [158] SENDA N., SHIBATA N., TAMURA H., YOSHITAKA J., Leucocytic movement and contractile protein, [w:] *Methods and Achievements in Experimental Pathology*; red. Gabbiani G., Karger, Basel, **9**: 169–186, 1979.
- [159] SHERRY J. M., GÓRECKA A., AKSOY M. O., DĄBROWSKA R., HARTSHORNE D. J., Roles of calcium and phosphorylation in the regulation of the activity of gizzard myosin, *Biochemistry*, **17**: 4411–4418, 1978.
- [160] SHIZUTA Y., SHIZUTA H., GALLO M., DAVIES P., PASTAN I., Purification and properties of filamin, an actin-binding protein from chicken gizzard, *J. Biol. Chem.*, **251**: 6562–6567, 1976.
- [161] SHOENBERG C. F., Contractile proteins of vertebrate smooth muscle, *Nature*, **206**: 526–527, 1965.
- [162] SHOENBERG C. F., An electron microscope study of the influence of divalent ions on myosin filament formation in chicken gizzard extracts and homogenates, *Tiss. Cell*, **1**: 83–96, 1969.
- [163] SHOENBERG C. F., A study of myosin filaments in extracts and homogenates of vertebrate smooth muscle, *Angiologica*, **6**: 233–246, 1969.
- [164] SHOENBERG C. F., The contractile mechanism and ultrastructure of the myometrium, [w:] *Biology of the Uterus*, red. Wynn R. M., Plenum Press, New York, London 1977, 497–544.
- [165] SHOENBERG C. F., NEEDHAM D. M., A study of the mechanism of contraction in vertebrate smooth muscle, *Biol. Rev.*, **51**: 53–104, 1976.
- [166] SILVER P. J., DiSALVO J., Adenosine 3'5'-monophosphate-mediated inhibition of myosin light chain phosphorylation in bovine aortic actomyosin, *J. Biol. Chem.*, **254**: 9951–9954, 1979.
- [167] SLAYTER H. S., LOWEY S., Substructure of the myosin molecule as visualized by electron microscopy, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **58**: 1611–1618, 1967.
- [168] SMALL J. V., Contractile units in vertebrate smooth muscle cells, *Nature*, **249**: 324–327, 1974.

- [169] SMALL J. V., Studies on isolated smooth muscle cells: the contractile apparatus, *J. Cell Sci.*, **24**: 327-349, 1977.
- [170] SMALL J. V., SQUIRE J. M., Structural basis of contraction in vertebrate smooth muscle, *J. Mol. Biol.*, **67**: 117-149, 1972.
- [171] SMALL J. V., SOBIESZEK A., Studies on the function and composition of the 10nm (100 Å) filaments of vertebrate smooth muscle, *J. Cell Sci.*, **23**: 243-268, 1977.
- [172] SMALL J. V., SOBIESZEK A., Ca — regulation of mammalian smooth muscle actomyosin via a kinase-phosphatase dependent phosphorylation and dephosphorylation of the 20 000-light chain of myosin. *Eur. J. Biochem.*, **76**: 521-530, 1977.
- [173] SMALL J. V., SOBIESZEK A., The contractile apparatus of smooth muscle, *Int. Rev. Cytol.*, **64**: 241-299, 1980.
- [174] SOBIESZEK A., Cross-bridges on self-assembled smooth muscle myosin filaments, *J. Mol. Biol.*, **70**: 741-744, 1972.
- [175] SOBIESZEK A., BREMEL R. D., Preparation and properties of vertebrate smooth muscle myofibrils and actomyosin, *Eur. J. Biochem.*, **55**: 49-60, 1975.
- [176] SOBIESZEK A., SMALL J. V., Myosin-linked calcium regulation in vertebrate smooth muscle, *J. Mol. Biol.*, **101**: 75-92, 1976.
- [177] SOBIESZEK A., SMALL J. V., Regulation of the actin-myosin interaction in vertebrate smooth muscle: activation via a myosin light chain kinase and the effect of tropomyosin, *J. Mol. Biol.*, **112**: 559-576, 1977.
- [178] SOMLYO A. P., DEVINE C. E., SOMLYO A. V., Thick filaments in unstretched mammalian smooth muscle, *Nature New Biology*, **233**: 218-219, 1971.
- [179] SOMLYO A. V., SOMLYO A. P., Vascular smooth muscle. I Normal structure, pathology, biochemistry and biophysics, *Pharmacol. Rev.*, **20**: 197-272, 1968.
- [180] STOSSEL T. P., Contractile proteins in cell structure and function, *Ann. Rev. Med.*, **29**: 427-457, 1978.
- [181] STRZELECKA-GOŁASZEWSKA H., PRÓCHNIEWICZ E., NOWAK E., ZMORZYŃSKI S., DRABIKOWSKI W., Chicken gizzard actin: polymerization and stability, *Eur. J. Biochem.*, **104**: 42-52, 1980.
- [182] STULL J. T., BLUMENTHAL D. K., COOKE R., Regulation of contraction by myosin phosphorylation. A comparison between smooth and skeletal muscles, *Biochem. Pharmacol.*, **29**: 2537-2543, 1980.
- [183] STULL J. T., MANNING D. R., HIGH C. W., BLUMENTHAL D. K., Phosphorylation of contractile proteins in heart and skeletal muscle, *Fed. Proc.*, **39**: 1552-1557, 1980.
- [184] SUZUKI K., YAMAGUCHI M., SEKINE T., Two forms of chicken gizzard F-actin depending on preparation with or without added calcium. *J. Biochem.*, **83**: 689-878, 1978.
- [185] TILNEY L. G., The role of actin in nonmuscle cell motility, [w:] *Molecules and Cell Movement*, red. Inoué S., Stephens R. E., Raven Press, Publishers, New York, **30**: 339-388, 1975.
- [186] TREGGAR R. T., SQUIRE J. M., Myosin content and filament structure in smooth and striated muscle, *J. Mol. Biol.*, **77**: 279-290, 1973.
- [187] TROTTER J. A., ADELSTEIN R. S., Macrophage myosin. Regulation of

- actin-activated ATP-ase activity by phosphorylation of the 20 000 dalton light chain, *J. Biol. Chem.*, **254**: 8781-8785, 1979.
- [188] TUSZYŃSKI G. F., FRANK E. D., DAMSKY C. H., BUCK C. A., WARREN L., The detection of smooth muscle desmin-like protein in BHK₂₁/C₁₃ fibroblasts, *J. Biol. Chem.*, **254**: 6138-6143, 1979.
- [189] VANDERKERCKHOVE J., WEBER K., At least six different actins are expressed in a higher mammal: an analysis based on the amino acid sequence of the aminoterminal tryptic peptide, *J. Mol. Biol.*, **126**: 783-802, 1978.
- [190] VANDERKERCKHOVE J., WEBER K., The amino acid sequence of Physarum actin, *Nature*, **276**: 720-721, 1978.
- [191] VANDERKERCKHOVE J., WEBER K., The amino acid sequence of actin from chicken skeletal muscle and chicken gizzard smooth muscle, *FEBS Letters*, **102**: 219-222, 1979.
- [192] VIBERT P. J., HASELGROVE J. C., LOWY J., POULSEN F. R., Structural changes in actin-containing filaments of muscle, *J. Mol. Biol.*, **71**: 757-767, 1972.
- [193] WACHSBERGER P., KALDOR G., Studies on uterine myosin A and actomyosin, *Arch. Biochem. Biophys.*, **143**: 127-137, 1971.
- [194] WACHSBERGER P., PEPE F. A., Purification of uterine myosin and synthetic filament formation, *J. Mol. Biol.*, **88**: 385-391, 1974.
- [195] WALLACH D., DAVIES P., BECHTEL P., WILLINGHAM M., PASTAN I., Cyclic AMP-dependent phosphorylation of the actin-binding protein filamin, *Adv. Cycl. Nucl. Res.*, **9**: 371-379, 1978.
- [196] WALLACH D., DAVIES P., PASTAN I., Cyclic AMP-dependent phosphorylation of filamin in mammalian smooth muscle, *J. Biol. Chem.*, **253**: 4739-4745, 1978.
- [197] WALLACH D., DAVIES P. J. A., PASTAN I., Purification of mammalian filamin, *J. Biol. Chem.*, **253**: 3328-3335, 1978.
- [198] WANG K., Filamin, a new high-molecular weight protein found in smooth muscle and nonmuscle cells. Purification and properties of chicken gizzard filamin, *Biochemistry*, **16**: 1857-1865, 1977.
- [199] WANG K., ASH J. F., SINGER S. J., Filamin, a new high-molecular weight protein found in smooth muscle and nonmuscle cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **72**: 4483-4486, 1975.
- [200] WATANABE H., YAMAMOTO T. Y., Freeze-etch study of smooth muscle cells from vas deferens and taenia coli, *J. Anat.*, **117**: 553-563, 1974.
- [201] WATTERSON D. M., HARRELSON W. G., KELLER P. M., SHARIEF F., VANAMAN T. C., Structural similarities between the Ca²⁺-dependent regulatory proteins of 3'5'-cyclic nucleotide phosphodiesterase and actomyosin ATP-ase, *J. Biol. Chem.*, **251**: 4501-4513, 1976.
- [202] WEIHING R. R., Cytoskeleton and plasma membrane [w:] *Methods and Achievements in Experimental Pathology*, red. Gabbiani G., Karger, Basel, **8**: 42-109, 1979.
- [203] WHITE J. G., GERRARD J. M., Interaction of microtubules and microfilaments in platelet contractile physiology, [w:] *Methods and Achievements in Experimental Pathology*, red. Gabbiani G., Karger, Basel, **9**: 1-39, 1979.
- [204] YAGI K., YAZAWA M., Identification of an activator protein for myosin light chain kinase as the Ca²⁺ dependent modulator protein, *J. Biol. Chem.*, **253**: 1338-1340, 1978.

- [205] YAMAGUCHI M., MIYAZAWA Y., SEKINE T., Preparation and properties of smooth muscle myosin from horse esophagus, *Biochim. Biophys. Acta*, **216**: 411-421, 1970.
- [206] YERNA M. Y., DĄBROWSKA R., HARTSHORNE D. J., GOLDMAN R. D., Calcium sensitive regulation of actin-myosin interaction in baby hamster kidney (BHK-21) cells, *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, **76**: 184-188, 1979.

Otrzymano: 29 września 1980.

Przyjęto: 17 lutego 1981.

Adres autorów: Chałubińskiego 5, 02-004 Warszawa.

CHARAKTERYSTYKA BŁONY KOMÓRKOWEJ MIĘŚNI SZKIELETOWYCH

CHARACTERISTIC OF CELL MEMBRANE IN SKELETAL MUSCLE

Danuta KOSK-KOSICKA

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

Streszczenie. Przedstawiono dane dotyczące budowy i funkcji sarkolemmy. Omówiono różne metody stosowane do izolowania tej błony oraz właściwości otrzymanych preparatów, zwracając uwagę na różnice występujące zarówno w strukturze, składzie chemicznym, jak i w aktywnościach enzymatycznych preparatów otrzymanych przez różnych autorów.

Summary. Data are presented concerning the structure and function of the sarcolemma. Various methods used for isolation of this membrane and the properties of the obtained preparations are discussed. Attention is called to the differences appearing in the structure, chemical composition and activity of the enzymatic preparations described by various authors.

Błona komórkowa mięśni szkieletowych — typowa błona plazmatyczna — otacza włókno mięśniowe, a jej podstawowe właściwości są związane z pełnioną funkcją [38, 83, 89, 97, 98, 100]. Stwierdzono m. in., że oprócz charakterystycznych dla każdej błony plazmatycznej aktywności Na^+ , K^+ -ATPazy, 5'-nukleotydazy czy cyklazy adenyłowej zawiera ona również receptor acetylocholino (AChR), którego obecność umożliwia transmisję nerwowo-mięśniową w wyodrębnionym obszarze zwanym synapsą [82]. Badania wielu autorów [38, 39, 85] wykazały, że cechą wspólną błony plazmatycznej różnych tkanek jest wysoka zawartość cholesterolu i kwasu sialowego. Natomiast wydaje się, że skład ilościowy i jakościowy pozostałych lipidów i węglowodanów oraz białek w błonie plazmatycznej z różnych tkanek nie jest jednakowy.

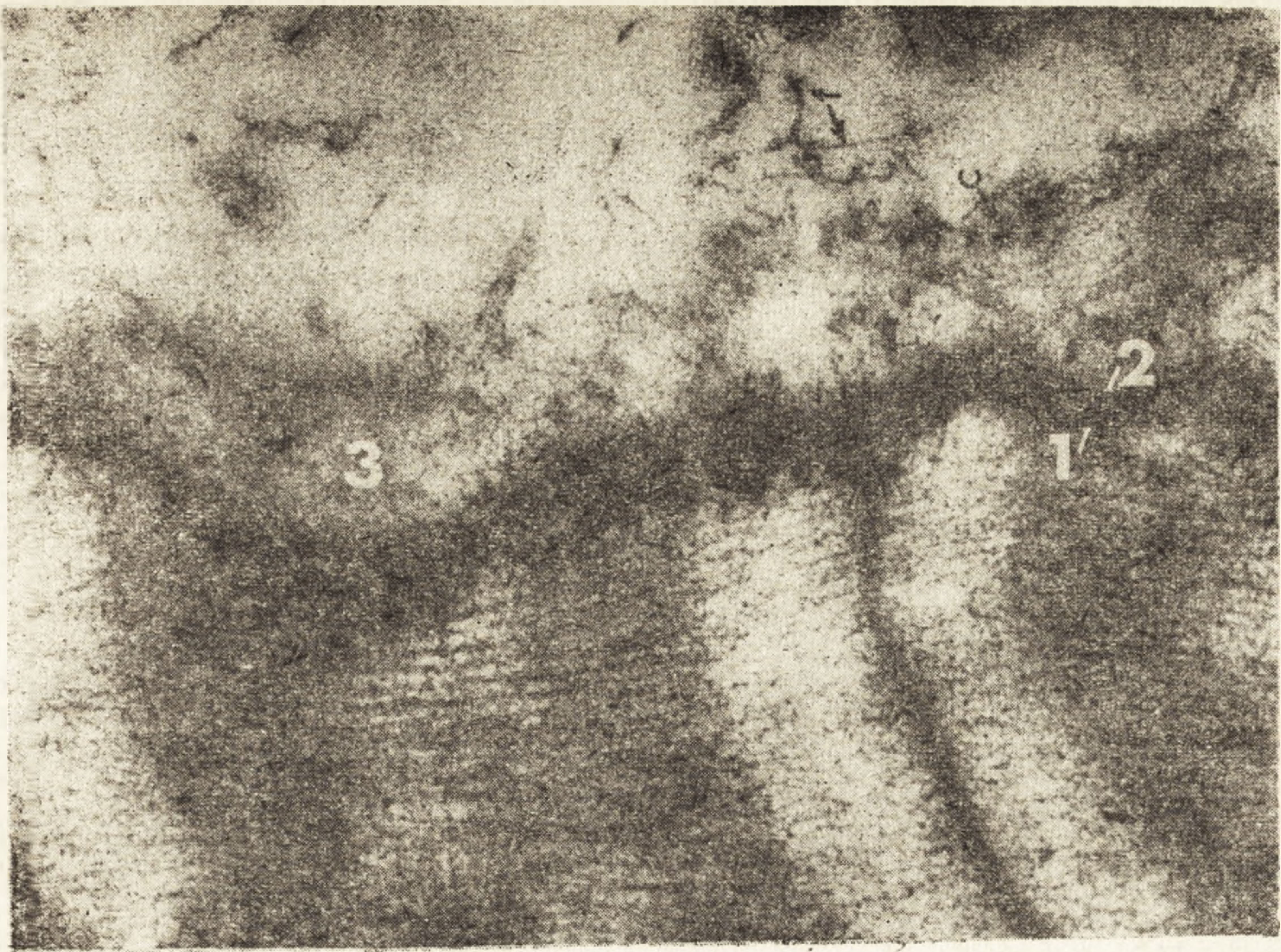
Oznaczenia składu chemicznego i aktywności enzymatycznych błon przeprowadza się po wyizolowaniu ich z tkanki. Trudności występujące

przy izolowaniu błony komórkowej z mięśni szkieletowych, spowodowane obecnością warstw zewnętrznych oraz miofibryli i siateczki śródplazmatycznych błon, powodują, że dane dotyczące właściwości sarkolemmy są nieliczne i rozbieżne. Celowy wydaje się przegląd i uporządkowanie wiadomości uzyskanych przez różnych autorów w ciągu ostatnich kilkunastu lat badań mięśni szkieletowych, głównie wyższych kręgowców. Dotychczas tylko część wyników została opublikowana [102].

BUDOWA I FUNKCJA BŁONY KOMÓRKOWEJ MIĘŚNI SZKIELETOWYCH

Włókno mięśnia szkieletowego otoczone jest błoną plazmatyczną, następnie błoną podstawną i warstwą włókien kolagenu [69, 94] (ryc. 1A).

Błona plazmatyczna o grubości 10 nm przylega bezpośrednio do cytoplazmy. Błona w wielu miejscach wpukła się do wnętrza włókna tworząc kanaliki o przebiegu poprzecznym, zwane systemem T. Obserwując w mikroskopie elektronowym ultracienkie skrawki mięśni szkieletowych kręgowców stwierdzono, że kanaliki systemu T znajdują się na wysokości linii Z lub na granicy prążków A i I. Po obu stronach kanalików systemu T widoczne są cysterny siateczki śródplazmatycznych błon zwanych sarkoplazmatycznym retikulum (SR). Dwie cysterny SR i położony między nimi kanalik systemu T tworzą tzw. triadę. W zależności od gatunku zwierzęcia w różnych rodzajach mięśni występują także diady, które składają się z kanalika systemu T i towarzyszącej mu jednej cysterny SR [34, 35, 77, 78, 92]. Diady i triady są miejscem przechodzenia fali depolaryzacji z sarkolemmy poprzez system T do błon SR w pierwszej fazie cyklu skurczowo-rozkurczowego mięśnia. Skurcz mięśnia jest końcowym efektem szeregu reakcji wywołanych przez impuls nerwowy. Pobudzenie z nerwu przechodzi do włókna mięśniowego w wyodrębnionym obszarze zwanym synapsą nerwowo-mięśniową. W procesie tym acetylocholina wydzielana z zakończenia nerwowego jest przyłączana do miejsc receptorowych w błonie mięśnia. Błona komórkowa mięśnia w obszarze synapsy jest silnie pofałdowana i zawiera ogromną ilość cząsteczek receptora acetylocholiny [26, 82]. Na szczycie fałd ich gęstość dochodzi do $30\,000 \pm 6000$ miejsc receptorowych na $1\ \mu\text{m}^2$. Związanie acetylocholiny z AChR powoduje otwarcie kanałów dla jonów Na^+ i K^+ i depolaryzację błony. Fala depolaryzacji przenosi się przez błonę systemu T do błon SR powodując uwolnienie zmagazynowanych tam jonów Ca^{2+} . W wyniku zwiększenia wewnątrzkomórkowego stężenia wolnych jonów Ca^{2+} i w następstwie szeregu reakcji aktywna reaguje z miozyną i zachodzi skurcz mięśnia [22, 23, 36, 43, 47, 90]: Działanie i właściwości AChR, integralnego białka błony plazmatycznej mięśni, omówiono dokładniej w odrębnym artykule przeglądowym [55].



A



B

C



D



Ryc. 1. A — Fragment włókna mięśnia szkieletowego żaby. Przekrój podłużny [94] (1 — błona plazmatyczna sarkolemma, 2 — błona podstawna, 3 — warstwa włókien kolagenu); B-D — Struktura sarkolemmy w preparatach otrzymanych przy zastosowaniu różnych metod: B — sarkolemma w postaci tubul; zdjęcie z mikroskopu kontrastowo-fazowego [63], C, D — sarkolemma w postaci pęcherzyków; zdjęcia z mikroskopu elektronowego; preparaty barwione negatywowo [56]

W błonie plazmatycznej włókna mięśniowego — podobnie jak w błonie plazmatycznej innych tkanek — działa wiele enzymów, które regulują transport jonów i metabolitów przez błonę i inne procesy zachodzące w błonie, a także we wnętrzu włókien mięśniowych. Stwierdzono m. in. aktywności: ATPaz(y) [4, 6, 7, 13, 14, 19, 28, 44, 54, 66, 76, 79, 95, 105, 106], cyklazy adenyłowej [31, 85, 86, 96, 109], 5'-nukleotydu [2, 49, 56, 58, 91, 112, 116], kinazy białkowej [5, 81, 88, 112].

Na zewnątrz błony plazmatycznej we włóknach mięśni szkieletowych obecna jest błona podstawna. Przyjęto, że grubość tej warstwy wynosi około 50 nm, aczkolwiek może się ona różnić w zależności od gatunku zwierzęcia i rodzaju mięśni [9, 102]. W badaniach składu chemicznego błony podstawnej stosowano barwienie czerwienią rutenową i reakcję histochemiczną z odczynnikiem Schiffa [61]. W obu przypadkach obserwuje się intensywne, równomierne zabarwienie błony podstawnej [117, 118]. Potraktowanie błony podstawnej enzymami, takimi jak hialuronidaza czy kolagenaza, nie zmniejsza intensywności tego zabarwienia, co oznacza, że glikoproteidy obecne w tej błonie nie zawierają kwasu hialuronowego ani siarczanu chondroityny. Zaobserwowano natomiast wyraźne zmniejszenie intensywności barwienia czerwienią rutenową po uprzednim traktowaniu błon 3,5-dwujodosalicylanem, który ekstrahuje glikoproteidy. Z późniejszych prac [110] wynika, że stosując dwujodosalicylan można wyekstrahować z błony jej część zewnętrzną, tzw. ektolaminę, składającą się głównie z białek o zwiększonej — w porównaniu z całą izolowaną błoną — zawartości kwaśnych aminokwasów. Autorzy tych prac przypuszczają, że te grupy kwasowe oraz charakterystyczna, duża ilość kwasu glikuronowego i glukozoaminy są odpowiedzialne za barwienie błony przez czerwień rutenową, a w warunkach fizjologicznych za wiązanie jonów wapnia [117, 118]. Ektolamina charakteryzuje się także zdolnością wiązania toru i koloidalnego żelaza, szczególnie w rejonie płytki nerwowo-mięśniowej. Na podstawie uzyskanych danych stwierdzono, że głównym składnikiem błony podstawnej są glikoproteidy, a jedną z funkcji tej warstwy może być udział w wiązaniu kationów [110]. Wydaje się, oprócz tego, że błona podstawna odgrywa ważną rolę w procesie regeneracji włókien mięśniowych, stanowiąc szkielet zewnętrzny włókien [111].

Na zewnątrz od błony podstawnej rozciąga się warstwa włókien kolagenu, rozrzedzająca się stopniowo. U różnych gatunków zwierząt i zależnie od rodzaju mięśni grubość jej może dochodzić nawet do 1000 nm. Najbardziej zewnętrzne włókna kolagenu ułożone są w dwie przeciwstawne helisy [94], zapewniające mięśniom elastyczność. Prawdopodobnie kolagen odgrywa też specjalną rolę w umocowaniu cząsteczek esterazy acetylocholinowej w obrębie synapsy nerwowo-mięśniowej, albo-

wiem trawienie kolagenazą powoduje uwolnienie esterazy z błony [12, 14]. Stwierdzono, że podjednostka strukturalna enzymu ma sekwencję aminokwasów podobną do kolagenu [62].

W literaturze występuje często nazwa sarkolemma — używana dla określenia bądź tylko błony plazmatycznej mięśnia szkieletowego [9, 25, 27], bądź też zarówno dla błony plazmatycznej, jak i otaczających ją z zewnątrz błony podstawnej i warstwy włókien kolagenu [32, 58, 69, 87, 91, 94]. Jednakże stosowanie tej nazwy wydaje się uzasadnione tylko w odniesieniu do błony plazmatycznej mięśnia.

Również preparaty izolowanej błony komórkowej mięśni nazywa się sarkolemmą, zakładając, że zarówno błona podstawna, jak i warstwa włókien kolagenu uległy zniszczeniu w wyniku zastosowanej procedury. Warunek ten nie zawsze jest spełniony w praktyce.

METODY IZOLOWANIA BŁONY KOMÓRKOWEJ MIĘŚNI SZKIELETOWYCH

Błona komórkowa mięśni opornie poddaje się wszelkim działaniom mającym na celu wyizolowanie jej. Trudności, które trzeba przy tym pokonać, są spowodowane przede wszystkim ścisłym powiązaniem błony plazmatycznej z otaczającymi ją od zewnątrz błoną podstawną i warstwą włókien kolagenu, a z drugiej strony — obecnością systemu błon SR oraz miofibryli wewnątrz włókna mięśniowego.

Początkowo do izolowania błony komórkowej mięśni szkieletowych stosowano bardzo drastyczne metody. Włókna mięśniowe traktowano roztworami kwasów lub zasad [8, 60], poddawano zgniataniu [16] i gotowaniu [113], aby błonę „podziurawić” i w ten sposób spowodować wypływanie cytoplazmy.

Metody, które stosuje się obecnie, można podzielić na trzy zasadnicze grupy ze względu na stopień rozdrobnienia mięśnia podczas homogenizacji, sposób usuwania miofibryli i warunki wirowania.

Pierwszą grupę stanowią metody oparte na płukaniu delikatnie pociętych włókien mięśniowych roztworami o niskiej sile jonowej [10, 15, 25, 28, 46, 58, 71, 72, 79, 87, 110, 115, 117]. Po inkubacji, wirując przy niskiej sile odśrodkowej, usuwa się z wnętrza włókien sarkoplazmę z napęczniałymi miofibrylami i innymi organellami komórkowymi.

Do drugiej grupy należą metody, według których pocięte włókna mięśniowe ekstrahuje się roztworami o wysokiej sile jonowej usuwając następnie, także przez wirowanie przy niskiej sile odśrodkowej, rozpuszczone miofibryle [50, 51]. W obu przypadkach otrzymuje się sarkolemmę w postaci tubul (ryc. 1B).

Metody grupy drugiej ulegały licznym modyfikacjom. W latach sześćdziesiątych wprowadzono silną homogenizację włókien mięśni-

wych i wirowanie przy wysokiej sile odśrodkowej, a następnie wirowanie w gradiencie stężeń sacharozy, otrzymując w ten sposób sarkolemmę w postaci pęcherzyków [4, 5, 11, 13, 30, 70, 73, 91, 95, 96, 104] (ryc. 1C).

Do trzeciej grupy zaliczyć można metody eliminujące najbardziej drastyczny etap w omawianych dotychczas preparatykach, a więc szok osmotyczny, inkubację i ekstrakcję roztworami soli. Do usuwania miofibryli stosuje się specjalne sączenie homogenatu mięśni [49] lub silną homogenizację w roztworach sacharozy o wysokich stężeniach i w obecności jonów Ca^{2+} w kolejnych etapach preparatyki, co zapobiega zanieczyszczeniu materiału białkami kurczliwymi. Następnie otrzymane błony oczyszcza się stosując wirowanie w ciągłym lub skokowym gradiencie stężeń sacharozy. Otrzymuje się w ten sposób sarkolemmę w postaci lekkich pęcherzyków (ryc. 1D), które „nie wchodzą” w sacharozę o stężeniu 27⁰/_o.

W przypadku izolowania błon z hodowanych *in vitro* komórek mięśniowych stosowane są łagodniejsze warunki preparatyki [17, 18, 93].

Porównując różne preparaty sarkolemmy, otrzymywane przy zastosowaniu omówionych metod, zaobserwowano istotny wpływ warunków

TABELA 1

Aktywność Na^+ , K^+ -ATPazy i 5'-nukleotydazy w różnych preparatach sarkolemmy

Rodzaj preparatu sarkolemmy	Pochodzenie mięśni szkieletowych	Aktywność enzymu μ mole Pn/mg białka/godz			
		aktywność ATPazy		aktywność 5'-nukleotydazy	odnośnik
		stymulowanej jonami Na^+ , K^+	hamowanej ouabainą		
pęcherzyki	chomik	—	86,0	—	74
		16,0	15,0	6,0	49*
		27,0	18,0	—	4
		30,0	28,0	—	30
	szczur	—	11,0	1,6	91
		32,0	—	—	6*
		17,0	—	—	99
		9,0	—	—	85
		4,8	3,6	—	76
		45,0	—	—	7*
		—	5,6	0,24	93
	hodowane mioblasty	—	5,0	0,17	2
	królik	—	5,0	0,17	2
	królik	49,2	15,9	2,2	56*
żaba	—	18,0	0,9	2	
kura	—	11,5	3,6	74	
tubule	szczur	4,8	1,8	—	79
	mysz	—	3,2	—	58

* Preparaty sarkolemmy wyizolowanej przy zastosowaniu metod grupy trzeciej (objaśnienia w tekście).

preparatyki na skład chemiczny i aktywności enzymatyczne wyizolowanej sarkolemmy. Wydaje się, że użycie roztworów o wysokiej sile jonowej do ekstrakcji homogenatu mięśni jest najbardziej efektywne w usuwaniu białek miofibrylarnych, ale jednocześnie powoduje obniżenie aktywności enzymatycznych w otrzymywanych preparatach sarkolemmy. Prawdopodobnie stosowanie metod grupy trzeciej, obywających się bez stężonych roztworów soli, umożliwia wyizolowanie sarkolemmy, w której aktywności enzymów są wysokie (tab. 1) i być może najbardziej zbliżone do aktywności w natywnej błonie komórkowej mięśni [104].

Nie wiadomo dokładnie, jakim zmianom ulega błona komórkowa w trakcie jej izolowania. Wnioskując na podstawie różnic w strukturze, składzie chemicznym i aktywnościach między różnymi preparatami sarkolemmy, zmiany te są duże i zależne od stosowanej metody preparatyki.

OCENA STOPNIA CZYSTOŚCI PREPARATÓW SARKOLEMMY

Wyizolowaną błonę plazmatyczną, sarkolemę identyfikuje się stosując metody podane w tabeli 2. Następnie należy ocenić stopień czystości otrzymanego preparatu. Problemom związanym z określeniem pochodzenia i stopnia czystości preparatów izolowanych błon biologicz-

TABELA 2

Metody stosowane do identyfikacji błony plazmatycznej [3, 20, 21, 37, 38, 39, 40, 41, 48, 59, 75, 83, 100, 101, 107]

Metody	Cechy charakterystyczne błony plazmatycznej
Oznaczanie aktywności enzymatycznych	Obecność: Na ⁺ , K ⁺ -ATPazy, 5'-nukleotydazy cyklicznej adenylowej
Oznaczenia chemiczne	Wysoka zawartość: cholesterolu, kwasu sialowego, fukozy
Oznaczanie przyłączania specyficznych inhibitorów (znakowanych radioaktywnymi izotopami)	obecność specyficznych jednostek funkcjonalnych (w tym receptorów)
(a) tetradoksyna	kanały dla Na ⁺ ,
(b) α-bungarotoksyna	receptor acetylocholiny,
(c) insulina	receptor insuliny
Znakowanie powierzchni komórki	Obecność:
(a) jodowanie katalizowane przez lakto-peroksydazę	białek dostępnych z zewnętrznej strony błony
(b) wiązanie kompleksu ferrytyna-przeciwciała	określonych białek
(c) wiązanie [³ H]ouabainy	Na ⁺ , K ⁺ -ATPazy
(d) wiązanie znakowanych lektyn i aglutynin	określonych węglowodanów

nych poświęcono wiele prac [38, 80]. W przypadku sarkolemmy potencjalne źródło zanieczyszczeń stanowią miofibryle i inne błony (włókna mięśniowego oraz błony z sąsiednich tkanek: nerwowej, tłuszczowej i krwi).

Rodzaj zanieczyszczeń spotykanych w preparatach sarkolemmy zależy od metody ich otrzymywania. Sarkolemma wyizolowana w postaci tubul może być zanieczyszczona błonami mitochondrialnymi oraz osłonką jądrową, natomiast sarkolemma w postaci pęcherzyków — głównie pęcherzykami powstającymi z błon SR lub aparatu Golgiego. Do oceny stopnia czystości preparatu stosuje się przede wszystkim oznaczenia aktywności enzymów charakterystycznych dla innych rodzajów błon. Jeżeli w otrzymanym preparacie stwierdza się brak aktywności enzymów charakterystycznych dla innych rodzajów błon, można przypuszczać, że sarkolemma jest wolna od zanieczyszczeń tymi błonami.

Stopień czystości preparatu sarkolemmy określa się również stosując technikę mikroskopii. Tubule sarkolemmy są widoczne w mikroskopie świetlnym (ryc. 1B), podczas gdy pęcherzyki sarkolemmy — w mikroskopie elektronowym (ryc. 1C, D). Preparat sarkolemmy uważa się za stosunkowo czysty, jeżeli jest on jednorodny, tzn. w polu widzenia nie ma włókien kolagenu, aktomiozyny, charakterystycznych błon mitochondriów czy „cienkościennych” pęcherzyków SR z cząstkami o średnicy 4 nm na ich powierzchni.

Obecność błon wewnątrzkomórkowych lub białek kurczliwych można także stwierdzić stosując ekstrakcję preparatu sarkolemmy roztworami o niskiej lub wysokiej sile jonowej, rozpuszczalnikami organicznymi bądź roztworami detergentów. Wykorzystując fakt odporności sarkolemmy na ekstrakcję [24, 29, 44] usuwa się w ten sposób inne białka.

STRUKTURA PREPARATÓW SARKOLEMMY

W pracach poświęconych właściwościom sarkolemmy autorzy często nie podają czy wyizolowali ją w postaci tubul, czy pęcherzyków i czy oprócz błony plazmatycznej w preparacie obecna jest błona podstawna i włókna kolagenu. Tubule, jak wynika z obserwacji w mikroskopie elektronowym, mogą składać się ze wszystkich trzech warstw, przy czym warstwa włókien kolagenu może być widoczna wyraźnie [51] lub słabo [64, 110]. Na ogół jednak uważa się, że sarkolemma jest pozbawiona tej warstwy, ponieważ dodanie kolagenazy nie zmienia ultrastruktury otrzymanego preparatu [65, 79, 87].

Przypuszcza się, że pęcherzyki sarkolemmy powstają albo wyłącznie z błony plazmatycznej, albo z błony plazmatycznej i podstawnej. Z badań mikroskopowych pęcherzyków sarkolemmy izolowanych z mięśni

zarodków kurczęcia [103] wynika, że mają one wewnątrz błonę podstawną. Autor sugeruje, że błona komórkowa, pocięta w czasie preparatyki, zamyka się w ten sposób, że tworzy pęcherzyki „odwrócone”. W większości prac na elektronogramach pęcherzyków badanej sarkolemmy widać tylko błonę plazmatyczną.

SKŁAD CHEMICZNY SARKOLEMMY

1. BIAŁKA SARKOLEMMY

Porównawcza analiza wyników otrzymanych przez różnych autorów wykazuje, że sarkolemma składa się z szeregu białek o ciężarach cząsteczkowych od około 15 000 do około 200 000 [2, 4, 5, 7, 17, 24, 65, 74, 99, 110, 112]. W preparatach tubul sarkolemmy po rozdziale elektroforetycznym stwierdzono obecność od kilku do kilkudziesięciu prążków, przy czym we wszystkich badanych preparatach najwięcej jest prążków, których ruchliwość odpowiada białkom standardowym o ciężarach cząsteczkowych około 44 000, 100 000–140 000 i 170 000–200 000 [24, 52, 65, 110].

Duże różnice w składzie białkowym zaobserwowano również w preparatach pęcherzyków sarkolemmy otrzymywanych różnymi metodami [2, 4, 5, 7, 11, 17, 74, 99, 112]. Stosunkowo najprostszy skład mają pęcherzyki sarkolemmy poddawanej końcowemu wirowaniu w gradiencie stężeń sacharozy. Zawierają one głównie białka o ciężarach cząsteczkowych około 40 000 i 95 000–109 000 oraz w mniejszej ilości białka o ciężarach cząsteczkowych 20 000–30 000, 40 000 i 90 000. Fakt, że pęcherzyki te zachowują aktywności charakterystycznych enzymów wyższe niż preparaty sarkolemmy otrzymywane przy zastosowaniu innych metod pozwala sądzić, że preparaty te zawierają najmniej zanieczyszczeń innymi błonami [54, 56, 57, 84, 86, 99].

Wyniki doświadczeń, w których przeprowadzono fosforylację białek sarkolemmy świadczą o obecności w tej błonie białek występujących w tak małych ilościach, że nie zawsze są one widoczne w wybarwionym żelu po rozdziale elektroforetycznym. Stwierdzono np., że fosforylacja przy udziale endogennej kinazy, niezależnej od cAMP powoduje włączenie ^{32}P z dodanego ($\gamma^{32}\text{P}$)-ATP do białek o ciężarach cząsteczkowych 51 000 [81], 30 000 i 50 000 [88], bądź też do białka o ciężarze cząsteczkowym 15 000 [112]. Fosforylacja białka o ciężarze cząsteczkowym 15 000 jest wyraźnie stymulowana dodaniem insuliny i autorzy przypisują mu rolę w transporcie jonów lub cukrów przez błonę komórkową [112].

Właściwości i funkcja większości białek w sarkolemmie nie zostały jeszcze w pełni wyjaśnione. Wyizolowanie i oczyszczenie białek sarkolemmy następuje z wieloma trudnościami, ponieważ sarkolemma — szczególnie

w postaci tubul — jest bardzo odporna na działanie wszelkich odczynników stosowanych do ekstrakcji białek z błon, nawet tak silnych jak n-butanol czy roztwory detergentów [24, 29, 44]. Być może trudności z frakcjonowaniem białek sarkolemmy w postaci tubul są spowodowane warunkami preparatyki, w czasie której struktura błony ulega zmianie; prawdopodobnie luźno związane białka powierzchniowe, a także część białek integralnych i lipidów zostaje wtedy wyekstrahowana. Świadczy o tym także fakt, że sarkolemma wyizolowana w postaci pęcherzyków prawdopodobnie z lepiej zachowaną strukturą błony jest mniej odporna na działanie detergentów. Stosując 1% roztwór niejonowego detergentu o nazwie Lubrol PX wyekstrahowano z pęcherzyków sarkolemmy białka o ciężarach cząsteczkowych około 40 000, 90 000 i 100 000, a więc m. in. białka o ciężarach cząsteczkowych podjednostek Na^+ , K^+ -ATPazy [85]. Z oznaczeń aktywności enzymatycznych wynika, że w tych warunkach zarówno Na^+ , K^+ -ATPaza, jak i cyklaza adenylova zostały uwolnione z błony [85].

Cyklaza adenylova i Na^+ , K^+ -ATPaza są stosunkowo najlepiej poznаныmi białkami sarkolemmy mięśni szkieletowych [31, 32, 84, 85, 86, 114]. Stwierdzono, że podjednostka katalityczna Na^+ , K^+ -ATPazy ma ciężar cząsteczkowy około 100 000–108 000 [32, 53], podobnie jak w błonie plazmatycznej innych tkanek. W oczyszczonych preparatach tego enzymu obserwowano obecność białek o niższych ciężarach cząsteczkowych w ilości porównywalnej z białkiem o ciężarze cząsteczkowym 100 000 [24, 56]. Skład białkowy Na^+ , K^+ -ATPazy w sarkolemmie mięśni szkieletowych nie został jeszcze całkowicie wyjaśniony. Wyniki oznaczeń aktywności tego enzymu w różnych preparatach sarkolemmy przedstawiono w tabeli 1.

Poza aktywnością Na^+ , K^+ -ATPazy stwierdzono w sarkolemmie aktywności także innych ATPaz. W większości badanych preparatów znajdowano wysoką aktywność Mg^{2+} -ATPazy [6, 32, 49, 56] i jedynie nieliczni autorzy uważają, że sarkolemma jest jej pozbawiona [13, 112]. Nie wiadomo, które białko jest odpowiedzialne za tę aktywność ani jaka jest rola tego enzymu w sarkolemmie.

W literaturze spotyka się też wzmianki na temat obecności w sarkolemmie ATPazy stymulowanej jonami Ca^{2+} , która mogłaby brać udział w regulacji stężenia wolnych jonów Ca^{2+} , we włóknach mięśni szkieletowych. Wyróżniono aktywność ATPazy zależną od dodanych jonów Mg^{2+} i niskich (μmolar nych) stężeń jonów Ca^{2+} (Mg^{2+} , Ca^{2+} -ATPaza; podobnie jak w błonach SR lub w błonie plazmatycznej erytrocytów) [56, 105] oraz aktywność niezależną od jonów Mg^{2+} , w obecności milimolowych stężeń Ca^{2+} (Ca^{2+} -ATPaza, podobnie jak w błonach erytrocytów) [44, 56, 68, 79, 96, 105]. Ciągłe jednak brak bezpośredniego

dowodu na obecność takiego enzymu (enzymów) w sarkolemmie mięśni szkieletowych.

Wątpliwości dotyczące obecności Mg^{2+} -ATPazy i Mg^{2+} , Ca^{2+} -ATPazy w sarkolemmie wynikają prawdopodobnie z faktu stosowania różnych metod izolowania sarkolemmy; jak wspomniano warunki preparatyki mają istotny wpływ na właściwości izolowanej błony. Na przykład porównując różne preparaty tubul sarkolemmy pod względem ich zdolności aktywnego wiązania jonów Ca^{2+} stwierdzono [104], że preparaty otrzymywane w niskiej sile jonowej [71, 72] są całkowicie pozbawione tej właściwości w przeciwieństwie do preparatów otrzymanych po ekstrakcji włókien mięśniowych roztworami stężonych soli [87], [108].

2. LIPIDY SARKOLEMMY

W preparatach sarkolemmy w postaci tubul stosunek wagowy lipidów do białek waha się w granicach 0,19–0,26 [24, 50, 51, 67, 110], z wyjątkiem preparatu otrzymanego przez de Kretser i wsp. [58] z mięśni myszy, gdzie wartość ta równa się 0,04.

W preparatach pęcherzyków sarkolemmy stosunek wagowy lipidów do białek jest zdecydowanie wyższy i wynosi około 1,0 [2, 49, 56, 57, 74].

Fosfolipidy i lipidy obojętne występują w mniej więcej równych ilościach [24, 58, 67]. Głównym lipidem obojętnym w sarkolemmie jest

TABELA 3

Skład fosfolipidowy (w %) sarkolemmy

Fosfolipidy	Pochodzenie mięśni szkieletowych					
	królik [45]	królik [28]	królik [67]	rak [67]	mysz [58]	królik* [56]
Fosfatydylocholina	51,1	50,1	53,0	51,0	57,2	50,0
Fosfatydyloetanolamina	31,3	6,4	20,8	22,3	20,3	27,0
Sfingomielina	—	18,3	13,8	14,4	11,2	12,0
Fosfatydyloseryna	7,2	7,8	6,1	6,6	13,3	10,0
Fosfatydyloinozytol	—	10,1	śl.	—	—	—

* Sarkolemma w postaci pęcherzyków; w pozostałych preparatach — w postaci tubul.

cholesterol, podczas gdy w błonach wewnątrzkomórkowych, jak SR czy błony mitochondrialne, więcej jest trójglicerydów [33]. Stosunek masy cholesterolu do fosfolipidów — pomocny przy ocenie stopnia czystości preparatu — wynosi 0,3–0,7 [1, 24, 33, 49, 56, 57, 67] dla preparatów otrzymanych z mięśni różnych zwierząt. Wyjątkowo w preparatach otrzymywanych przez Kidwaia stosunek cholesterolu do fosfolipidów jest zdecydowanie niższy — 0,11 [49].

W tabeli 3 przedstawiono skład lipidowy różnych preparatów sarkolemmy [28, 45, 56, 58, 67]. Większość wyników dotyczy sarkolemmy wyizolowanej w postaci tubul. We wszystkich badanych preparatach dominują wśród fosfolipidów fosfatydylocholina i fosfatydyloetanolamina. Jedynie w preparacie otrzymanym przez Ferdman i wsp. [28] jest mniej fosfatydyloetanolaminy, a więcej sfingomieliny.

3. WĘGLOWODANY SARKOLEMMY

Zawartość węglowodanów w sarkolemmie nie przekracza 3% suchej masy [1, 50, 65]. Wykazano obecność zarówno glikoproteidów, glikolipidów, jak i aminoglikanów [1]. Stwierdzono, że stosunek ilościowy kwasu sialowego i heksoz, związanych z białkami, różni się w poszczególnych preparatach [1, 24, 50, 65]. Z otrzymanych danych wynika, że w preparatach tubul dominują N-acetylogalaktozamina, N-acetyloglukozamina i glukoza [24, 110]. W pęcherzykach sarkolemmy stwierdzono obecność dwóch [30] lub czterech glikoproteidów [2], zależnie od rodzaju zwierzęcia, z mięśni którego otrzymywano preparat.

Autorka składa serdeczne podziękowanie doc. dr hab. M. Gabrieli Sarzale-Drabikowskiej za pomoc przy opracowaniu niniejszego artykułu.

LITERATURA

- [1] ABOOD L. G., KURAJASI K., BRUNNGRABER E., KOKETSU K., Biochemical analysis of isolated bullfrog sarcolemma, *Biochim. Biophys. Acta*, **112**, 330-339, 1966.
- [2] AGAPITO M. M., CABEZAS J. A., Isolation and chemical composition of sarcolemmal membranes from rabbit and frog skeletal muscle, *Int. J. Biochem.*, **8**: 811-817, 1977.
- [3] ALLAN D., AUGER J., CRUMPTON M. J., Glycoprotein receptors for concanavalin A isolated from pig lymphocyte plasma membrane by affinity chromatography in sodium deoxycholate, *Nature New. Biol.* **236**: 23-25, 1972.
- [4] ANDREW C. G., APPEL S. H., Micromolecular characterization of muscle membranes. I. Proteins and sialic acid of normal and denervated muscle, *J. Biol. Chem.*, **248**: 5156-5163, 1973.
- [5] ANDREW C. G., ALMON R. R., APPEL S. H., Macromolecular characterization of muscle membrane. Endogenous membrane kinase and phosphorylated protein substrate from normal and denervated muscle, *J. Biol. Chem.*, **250**: 3972-3980, 1974.
- [6] BARCHI R. L., BONILLA E., WONG M., Isolation and characterization of muscle membranes using surface specific labels, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, **74**: 34-38, 1977.
- [7] BARCHI R. L., WEIGELE J. B., CHALIKIAN P. M., MURPHY L. E., Muscle surface membrane. Preparative methods affect apparent chemical properties and neurotoxin binding, *Biochim. Biophys. Acta*, **550**: 59-76, 1979.
- [8] BARER R., Observations on muscle-fibre structure. The swelling of muscle fibers by acid and alkalis, *J. Anat.*, **81**: 259-285, 1947.
- [9] BENNET H. S., The structure of striated muscle as seen by the electron

- microscope, [w:] *The Structure and Function of Muscle*, red. G. H. Bourne, Academic Press, New York 1960, 137-181.
- [10] BERINGER T., KOENIG E., The sarcolemmal membrane: evacuation of short myofiber bundles, *Exp. Neurol.*, **46**: 20-31, 1975.
- [11] BERMEJO M. E. M., Del MOLINO A. M., Isolation and chemical composition of sarcolemmal membranes from carp skeletal muscle, *Biochimie*, **60**: 1323-1327, 1978.
- [12] BETZ W., SAKMANN B., "Disjunction" of frog neuromuscular synapses by treatment with proteolytic enzymes, *Nature New Biol.*, **232**: 94, 1971.
- [13] BOEGMAN R. J., MANERY J. F., PINTERIC L., The separation and partial purification of membrane-bound (Na^+ , $+\text{K}^+$)-dependent Mg^{2+} -ATPase and Na^+ $+\text{K}^+$ -independent Mg^{2+} -ATPase from frog skeletal muscle, *Biochim. Biophys. Acta*, **203**: 506-531, 1970.
- [14] BOLDYREV A. A., Na^+ , K^+ -zavisimaja ATPaza sarkolemmy, *Biochimja*, **36**: 826-833, 1977.
- [15] CALVALHO A. P., MADEIRA V. M. C., ANTUNES-MADEIRA M. C., Effect of potentiators of muscular on contractile and enzymatic activities of sarcolemma, *Biochim. Biophys. Acta*, **234**: 210-221, 1971.
- [16] CASELLA C., Tensile force in total striated muscle, isolated fibre and sarcolemma, *Acta Physiol. Scand.*, **21**: 380-401, 1950.
- [17] CATES G. A., HOLLAND P. C., Biosynthesis of plasma-membrane proteins during myogenesis of skeletal muscle in vitro, *Biochem. J.*, **174**: 873-881, 1978.
- [18] CATES G. A., HOLLAND P. C., Surface-labelling studies on skeletal muscle cells in vitro, *Biochem. J.*, **186**: 211-216, 1980.
- [19] CHENG L. C., ROGUS E. M., ZIERLER K., Catechol, a structural requirement for (Na^+ $+\text{K}^+$)-ATPase stimulation in rat skeletal muscle membrane, *Biochim. Biophys. Acta*, **464**: 338-346, 1977.
- [20] COLEMAN R., MICHELL R. M., FINEAN J. B., HAWTHORNE J. N., A purified plasma membrane fraction isolated from rat liver under isotonic conditions, *Biochim. Biophys. Acta*, **135**: 573-579, 1967.
- [21] COOPER R. A., DILOY-PURAY M., LANDO P., GREENBERG M. S., An analysis of lipoproteins, bile acids, and red cell membrane associated with target cells and spur cells in patients with liver disease, *J. Clin. Invest.*, **51**: 3182-3193, 1972.
- [22] DĄBROWSKA R., DRABIKOWSKI W., Regulacja cyklu skurczowo-rozkurczowego mięśni szkieletowych, *Postępy Biochem.*, **16**: 405-420, 1970.
- [23] DĄBROWSKA R., DRABIKOWSKI W., Molekularne podstawy skurczu mięśni, *Postępy Biochem.*, **19**: 343-359, 1973.
- [24] DRABIKOWSKI W., ZUBRZYCKA E., Characterization of sarcolemma from rabbit skeletal muscle, [w:] *Recent Advances in Studies on Cardiac Structure and Metabolism*, red. P-E. Roy i in., University Park Press, Baltimore, 1976, 133-147.
- [25] ENGEL H., GORGAS K., Isolation of sarcolemma from human skeletal muscle, *Z. Anat. Entwicklungs-gesch.*, **145**: 187-196, 1974.
- [26] FAMBROUGH D. M., Cellular and development biology of acetylcholine receptors in skeletal muscle, [w:] *Neurochemistry of Cholinergic Receptors*, red. de Robertis E. i in., Raven Press Publishers, New York 1974, 85-111.
- [27] FAWCETT D. W., McNUTT N. S., The ultrastructure of the cat myocardium. I. Ventricular papillary muscle, *J. Cell Biol.*, **42**: 1-45, 1969.

- [28] FERDMAN D. D., HIMMELREICH N. G., Adenozintrifosfatazy sarkolemmy skeletnych mysc, Dokl. Akad. Nauk SSSR, **179**: 979-981, 1968.
- [29] FERDMAN D. D., HIMMELREICH N. G., DYADYUSHA G. P., The enzyme activity in a detergent-treated sarcolemma of skeletal muscles, Biochim. Biophys. Acta, **219**: 372-378, 1970.
- [30] FESTOFF B. W., ENGEL W. K., In vitro analysis of the general properties and junctional receptor characteristics of skeletal muscle membranes. Isolation, purification and partial characterization of sarcolemmal fragments, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **71**: 2435-2439, 1974.
- [31] FESTOFF B. W., OLIVER K. L., REDDY N. B., In vitro studies of skeletal muscle membranes. Adenylate cyclase of fast and slow twitch muscle and the effects of denervation, J. Membr. Biol., **32**: 331-343, 1977.
- [32] FESTOFF B. W., OLIVER K. L., REDDY N. B., Effects of denervation on the macromolecular components of cation transport in red and white skeletal muscle, J. Membr. Biol., **32**: 345-360, 1977.
- [33] FIEHN W., PETER J. B., MEAD J. F., GAN-ELEPANO M., Lipids and fatty acids of sarcolemma, sarcoplasmic reticulum and mitochondria from rat skeletal muscle, J. Biol. Chem., **246**: 5617-5620, 1971.
- [34] FRANZINI-ARMSTRONG C., PORTER K. R., Sarcolemmal invaginations constituting the T system in fish muscle fibers, J. Cell. Biol., **22**: 675-696, 1964.
- [35] FRANZINI-ARMSTRONG C., The comparative structure of intracellular junctions in striated muscle fibers, [w:] Pathogenesis of Human Muscular Dystrophies, red. L. P. Rowland, Excerpta Medica, Amsterdam-Oxford 1977, 612-625.
- [36] GERGELY J., Some aspects of the role of the sarcoplasmic reticulum and the tropomyosin-troponin system in the control of muscle contraction by calcium ions, Circ. Res., **34**: 74-82, 1974.
- [37] GLICK M. C., COMSTOCK C. A., WARREN L., Membranes of animal cells. VII. Carbohydrates of surface membranes and whole cells, Biochim. Biophys. Acta, **219**: 290-300, 1970.
- [38] GLICK M. C., Isolation of surface membranes from mammalian cells, [w:] Mammalian Cell Membranes, red. G. A. Jamieson i in. Butterworths, London 1976, 45.
- [39] GLOSSMANN H., NEVILLE D. M., Glycoproteins of cell surfaces. A comparative study of three different cell surfaces of the rat, J. Biol. Chem., **246**: 6339-6346, 1971.
- [40] GRAHAM J. M., Isolation and characterization of membranes from normal and transformed tissue-culture cells, Biochem. J., **130**: 1113-1124, 1972.
- [41] GREENBERG J. H., JAMIESON G. A., The effects of various lectins on platelet aggregation and release, Biochim. Biophys. Acta, **345**: 231-242, 1974.
- [42] HALL Z. W., KELLY R. B., Enzymatic detachment of endplate acetylcholinesterase from muscle, Nature New Biol., **232**: 62-63, 1971.
- [43] HASSELBACH W., Relaxing factor and the relaxation of muscle, [w:] Prog. Biophys. Mol. Biol., red. J. A. V. Butler i in., Pergamon Press, Oxford 1974, 167-222.
- [44] HIMMELREICH N. G., SANINA O. L., Vlijanie tritona X-100 na sarkolemmu skeletnych mysc krolikov. Nekotoryje svojstva Ca²⁺-zavisimoj ATP-azy, Cytologija, **15**: 847-854, 1973.

- [45] HOTTA K., USAMI Y., Enzymatic activity of isolated skeletal muscle sarcolemma, *J. Biochem.*, **61**: 407-410, 1967.
- [46] HULTIN H. O., WESTORT C., Sarcolemma from chicken skeletal muscle, *J. Food Sci.*, 34-43, 1969.
- [47] INESI G., MALAN N., Mechanism of calcium release in sarcoplasmic reticulum, *Life Sci.*, **18**: 773-780, 1976.
- [48] KAWIAK J., Metody znakowania powierzchni komórek, *Post. Biol. Komórki*, **3**: 265-285, 1976.
- [49] KIDWAI A. M., RADCLIFFE M. A., LEE E. Y., DANIEL E. E., Isolation and properties of skeletal muscle plasma membrane, *Biochim. Biophys. Acta*, **298**: 593-607, 1973.
- [50] KONO T., COLOWICK S. P., Isolation of skeletal muscle cell membrane and some of its properties, *Arch. Biochem. Biophys.*, **93**: 520-533, 1961.
- [51] KONO T., KAKUMA F., HOMME M., FUKUDA S., The electronmicroscopic structure and chemical composition of the isolated sarcolemma of the rat skeletal muscle cell, *Biochim. Biophys. Acta*, **88**: 155-176, 1964.
- [52] KOSK-KOSICKA D., Porównanie sarkolemmy z mięśni szkieletowych królików w różnych stadiach rozwojowych, *XV Zjazd PTBioch.*, Gdańsk, Streszczenia komunikatów, str. 70, 1977.
- [53] KOSK-KOSICKA D., MICHALAK M., SARZAŁA M. G., Properties of sarcolemma from mature and developing skeletal muscle, *12th FEBS Meeting*, Drezno, Streszczenia komunikatów, nr 3209, 1978.
- [54] KOSK-KOSICKA D., SARZAŁA M. G., Characterization of skeletal muscle sarcolemma, *Proceedings of the 7th European Conference on Muscle and Motility*, Warszawa, str. 54, 1978.
- [55] KOSK-KOSICKA D., Receptor acetylocholino w mięśniu szkieletowym, *Postępy Biochem.*, **26**: w druku, 1980.
- [56] KOSK-KOSICKA D., Charakterystyka sarkolemmy z mięśni szkieletowych królików w różnych stadiach rozwoju, *praca doktorska*, 1980.
- [57] KOSK-KOSICKA D., SARZAŁA M. G., Characterization of sarcolemma from rabbit skeletal muscle, *J. Muscle Res. Cell Motility*, w przygotowaniu, 1980.
- [58] De KRETZER T. A., LIVETT B. G., Skeletal-muscle sarcolemma from normal and dystrophic mice. Isolation, characterization and lipid composition, *Biochim. J.*, **168**: 229-237, 1977.
- [59] LANGER G. A., FRANK J. S., NUDD L. M., SERAYDARIAN K., Sialic acid: effect of removal on calcium exchangeability of cultured heart cells, *Science*, **193**: 1013-1015, 1976.
- [60] LORINCZ F., BIRO G., Nature of sarcolemma, the striated muscle fiber membrane, *Nature*, **190**: 317-318, 1961.
- [61] LUFT J. H., Ruthenium red and violet. I. Chemistry, purification, methods of use for electron microscopy and mechanism of action, *Anat. Rec.*, **171**: 347-368, 1971.
- [62] LWEBUGA-MUKASA J. S., LAPPI S., TAYLOR P., Molecular forms of acetylcholinesterase from *Torpedo californica*: their relationship to synaptic membranes, *Biochemistry*, **15**: 1425-1434, 1976.
- [63] MADEIRA V. M. C., CARVALHO A. P., Interaction of ATP, ADP, and AMP with sarcolemma isolated from rabbit skeletal muscle, *Memorias e Estudos do Museu Zoologica Da Universidade de Coimbra*, **310**: 5-17, 1969.
- [64] MADEIRA V. M. C., ANTUNES-MADEIRA M. C., CARVALHO A. P., Isola-

- tion of skeletal muscle sarcolemma and its chemical composition, *Cienc. Biol.*, **1**: 9-24, 1972.
- [65] MADEIRA V. M. C., ANTUNES-MADEIRA M. C., Chemical composition of sarcolemma isolated from rabbit skeletal muscle, *Biochim. Biophys. Acta*, **298**: 230-238, 1973.
- [66] MADEIRA V. M. C., ANTUNES-MADEIRA M. C., Interaction of ruthenium red with isolated sarcolemma, *J. Membr. Biol.*, **17**: 41-50, 1974.
- [67] MAHRLA Z., ZACHAR J., Lipid composition of isolated external and internal skeletal muscle membranes, *Comp. Biochem. Physiol.*, **47 B**: 493-502, 1974.
- [68] MALOUF N. N., MEISSNER G., Localization of a Mg^{2+} or Ca^{2+} -activated ("basic") ATPase in skeletal muscle, *Exp. Cell Res.*, **122**: 233-250, 1979.
- [69] MAURO A., ADAMS W. R., The structure of the sarcolemma of the frog skeletal muscle fiber, *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, **10**: 177-185, 1961.
- [70] MAWATARI S., TAKAGI A., HOWLAND L. P., Adenyl cyclase in normal and pathologic human muscle, *Arch. Neurol.*, **30**: 96-101, 1974.
- [71] McCOLLESTER D. L., A method for isolating skeletal muscle cell membrane components, *Biochim. Biophys. Acta*, **57**: 427-437, 1962.
- [72] McCOLLESTER D. L., SEMENTE G., Membrane isolation and cytoskeleton breakdown. I. The effect of endogenous enzymes, ions, pH, temperature and dissolved gases, *Biochim. Biophys. Acta*, **90**: 146-158, 1964.
- [73] McNAMARA D. B., SULAKHE P. V., DHALLA N. S., Properties of the sarcolemmal calcium ion-stimulated adenosine triphosphatase of hamster skeletal muscle, *Biochem. J.*, **125**: 525-530, 1971.
- [74] Del MOLINO A. M., CABEZAS J. A., Sarcolemmal membranes from hamster and chicken skeletal muscle: isolation and chemical composition, *Int. J. Biochem.*, **9**: 253-262, 1978.
- [75] MORGAN I. G., WOLFE L. S., MANDEL P., GOMBOS G., Isolation of plasma membranes from rat brain, *Biochem. Biophys. Acta*, **241**: 737-751, 1971.
- [76] NAGATOMO T., PETER J. B., The solubilization of membrane-bound $Na^{+}K^{+}$ -ATPase from rat skeletal muscle, *Biochem. Med.*, **19**: 344-350, 1978.
- [77] PEACHEY L. D., The sarcoplasmic reticulum and transverse tubules of the frog's sartorius, *J. Cell Biol.*, **25**: 209-231, 1965.
- [78] PEACHEY L. D., SCHILD R. E., The distribution of the T-system along the sarcomeres of frog and toad sartorius muscles, *J. Physiol.*, **194**: 249-258, 1968.
- [79] PETER J. B., A (Na^{+} , K^{+})-ATPase of sarcolemma from skeletal muscle, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **40**: 1362-1367, 1970.
- [80] De PIERRE J. N., KARNOVSKY M. K., Plasma membranes of mammalian cells. A review of the methods for their characterization and isolation, *J. Cell Biol.*, **56**: 275-303, 1973.
- [81] PINKETT M. O., PERLMAN R. L., Phosphorylation of muscle plasma membrane protein by a membrane-bound protein kinase, *Biochim. Biophys. Acta*, **372**: 379-387, 1974.
- [82] PORTER C. W., BARNARD E. A., The density of cholinergic receptors at the endplate postsynaptic membrane: Ultrastructural studies in two mammalian species, *J. Membr. Biol.*, **20**: 31-49, 1975.
- [83] QUINN P. J., Characterization of animal cell membranes, w *The Molecular Biology of Cell Membranes*, red. P. J. Quinn, The MacMillan Press, Ltd., London 1976, 1.

- [84] REDDY N. B., ENGEL W. K., FESTOFF B. W., In vitro studies of skeletal muscle membranes. Characterization of a phosphorylated intermediate of sarcolemmal ($\text{Na}^{++}\text{K}^{+}$ ATPase), *Biochim. Biophys. Acta*, **433**: 365-382, 1976.
- [85] REDDY N. B., OLIVER K. L., FESTOFF B. W., ENGEL W. K., Adenylate cyclase system of human skeletal muscle. Subcellular distribution and general properties, *Biochem. Biophys. Acta*, **540**: 371-388, 1978.
- [86] REDDY N. B., OLIVER K. L., FESTOFF B. W., ENGEL W. K., Characteristic of catecholamine stimulation and nucleotide regulation, *Biochim. Biophys. Acta*, **540**: 389-401, 1978.
- [87] ROSENTHAL S. L., EDELMAN P. M., SCHWARTZ A., A method for the preparation of skeletal muscle sarcolemma, *Biochim. Biophys. Acta*, **109**: 512-517, 1965.
- [88] ROSES A. D., APPEL S. H., Muscle membrane protein kinase in myotonic muscular dystrophy, *Nature*, **250**: 245-247, 1974.
- [89] ROTHMAN J. E., LEONARD J., Membrane asymmetry, *Science*, **195**: 743-753, 1977.
- [90] SARZAŁA M. G., Struktura i funkcja błon sarkoplazmatycznego retikulum mięśni szkieletowych, *Postępy Biochem.*, **20**: 403-423, 1974.
- [91] SCHAPIRA G., DOBOSZ I., PIAU J.-P., DELAIN E., An improved technique for preparation of skeletal muscle cell plasma membrane, *Biochim. Biophys. Acta*, **345**: 348-358, 1974.
- [92] SCHIAFFINO S., MARGRETH A., Coordinated development of the sarcoplasmic reticulum and T system during postnatal differentiation of rat skeletal muscle, *J. Cell Biol.*, **41**: 855-875, 1969.
- [93] SCHIMMEL S. D., KENT C., BISCHOFF R., VAGELOS P. R., Plasma membranes from cultured muscle cells: isolation procedure and separation of putative plasma-membrane marker enzymes, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **70**: 3195-3199, 1973.
- [94] SCHMALBRUCH G., The sarcolemma of skeletal muscle fibres as demonstrated by a replica technique, *Cell Tissue Res.*, **150**: 377-387, 1974.
- [95] SEVERIN S. E., BOLDYREV A. A., TKACHUK V. A., Some properties of Na^{+} , K^{+} -stimulated ATPase from normal and denervated muscles of rabbit with a special reference to its sensitivity to acetylcholine, *Comp. Gen. Pharmacol.*, **5**: 181-185, 1974.
- [96] SEVERSON D. L., DRUMMOND H. I., SULAKHE P. V., Adenylate cyclase in skeletal muscle. Kinetic properties and hormonal stimulation, *J. Biol. Chem.*, **247**: 2949-2958, 1972.
- [97] SINGER S. J., The molecular organization of membranes, [w:] *Structure and Function of Biological Membranes*, red. L. Rothfield, Academic Press, New York, 1971, 145.
- [98] SINGER S. J. NICHOLSON G. L., The fluid mosaic model of the structure of cell membranes, *Science*, **175**: 720-731, 1972.
- [99] SMITH P. B., APPEL S. H., Isolation and characterization of the surface membranes of fast and slow mammalian skeletal muscle, *Biochim. Biophys. Acta*, **446**: 109-123, 1977.
- [100] SOMLYO A., TRAMS E. G., Enzyme marker in characterization of isolated plasma membranes, *Enzyme*, **13**: 329, 1972.
- [101] SOMLYO A., LAUTER C. J., A study of sex differences in enzyme activities of rat liver plasma membranes, *Biochim. Biophys. Acta*, **298**: 743-749, 1973.
- [102] SOMER H., WILLNER J., MAWATARI S., ROWLAND L. P., Surface mem-

- branes of skeletal muscle, [w:] Pathogenesis of Human Muscular Dystrophies, red. L. P. Rowland, 1977, 547-561.
- [103] SPERELAKIS M., Na⁺, K⁺-ATPase activity of embryonic chick heart and skeletal muscle as a function of age, *Biochim. Biophys. Acta*, **266**: 230-237, 1972.
- [104] SULAKHE P. V., DRUMMOND G. I., NG D. C., Calcium binding by skeletal muscle sarcolemma, *J. Biol. Chem.*, **248**: 4150-4157, 1973.
- [105] SULAKHE P. V., DRUMMOND G. I., NG D. C., Adenosine triphosphatase activities of muscle sarcolemma, *J. Biol. Chem.*, **248**: 4158-4162, 1973.
- [106] SULAKHE P. V., DRUMMOND G. I., Protein kinase-catalyzed phosphorylation of muscle sarcolemma, *Arch. Biochem. Biophys.*, **161**: 448-455, 1974.
- [107] SUTHERLAND E. W., ROBINSON G. A., BUTCHER R. W., Some aspects of the biological role of adenosine 3',5'-monophosphate (cyclic AMP), *Circulation*, **37**: 279, 1968.
- [108] THORPE W. R., SEEMAN P., The site of action of caffeine and procaine in skeletal muscle, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **179**: 324, 1972.
- [109] TOIVONEN H., MARNIEMI J., An assay for adenylate cyclase in skeletal muscle, *Int. J. Biochem.*, **8**: 207-217, 1977.
- [110] VANDENBURGH H. H., SHEFF M. F., ZACKS S. I., Chemical composition of isolated rat skeletal sarcolemma, *J. Membr. Biol.*, **17**: 1-12, 1974.
- [111] VRACKO R., BENDITT E. P., Basal lamina: the scaffold for orderly cell replacement observations on regeneration of injured skeletal muscle fibers and capillaries, *J. Cell Biol.*, **55**: 406-419, 1972.
- [112] WALAAS O., WALAAS E., LYSTED E., ALERTSEN A. R., HORN R. S., FOSSUM S., A stimulatory effect of insulin on phosphorylation of a peptide in sarcolemma-enriched membrane preparation from rat skeletal muscle, *FEBS Lett.*, **80**: 417-422, 1977.
- [113] WANG H., The sarcolemma and fibrous envelope of striated muscles in beef, *Exp. Cell Res.*, **11**: 452-463, 1956.
- [114] WEI J.-W., NARAYANAN N., SULAKHE P. V., Adenylate cyclase of guinea pig skeletal muscle sarcolemma: comparison of the properties of the enzyme with Mg²⁺ and Mn²⁺ as divalent cation cofactors, *Int. J. Biochem.*, **10**: 109-116, 1979.
- [115] WESTORT C., HULTIN H. O., A procedure for the preparation of empty cell segments from skeletal muscle using solutions of low ionic strength, *Anal. Biochem.*, **16**: 314-319, 1966.
- [116] WINAND R., LUZZATI D., Cell surface changes during myoblast differentiation: preparation and carbohydrate composition of plasma membranes, *Biochimie (Paris)*, **57**: 764-771, 1975.
- [117] ZACKS S. I., SHEFF M. F., SAITO A., Structure and staining characteristics of myofiber external lamina, *J. Histochem. Cytochem.*, **21**: 703-714, 1973.
- [118] ZACKS S. I., VANDENBURGH H. H., SHEFF M. F., Cytochemical and physical properties of myofiber external lamina, *J. Histochem. Cytochem.*, **21**: 895-901, 1973.

Otrzymano: 30 czerwca 1980.

Przyjęto: 20 marca 1981.

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

SPRZEŻENIE ELEKTROMECHANICZNE W KOMÓRCIE MIĘŚNIOWEJ

ELECTROMECHANICAL COUPLING IN THE MUSCLE CELL

Elżbieta OLSZEWSKA

Zakład Fizjologii Zwierząt Instytutu Biologii UMK w Toruniu

Streszczenie. W artykule przedstawiono przegląd współczesnej literatury dotyczącej sprzężenia elektromechanicznego w komórce mięśniowej. Omówiono poszczególne etapy tego procesu z uwzględnieniem badań nad wpływem różnych czynników na sprzężenie elektromechaniczne, jak również środków działających destrukcyjnie.

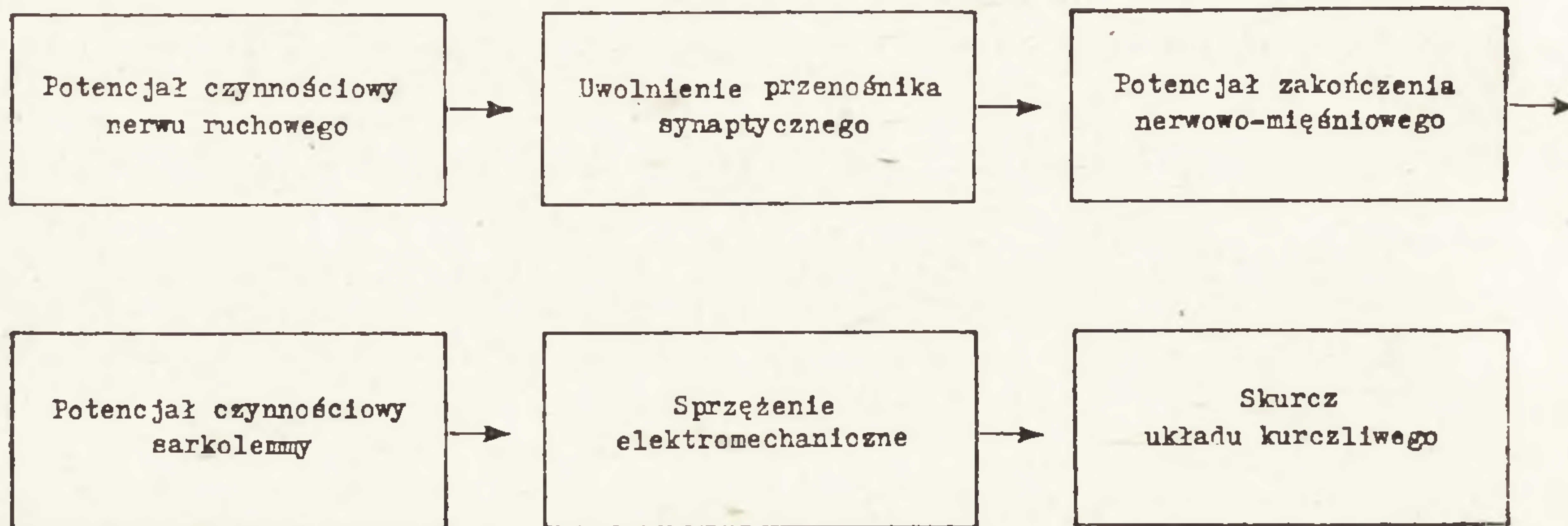
Summary. A review is given of contemporary literature dealing with electromechanical coupling in the muscle cell. The successive steps of this process are discussed in reference to the investigations on the influence of various factors on this process and those causing a destructive effect.

Termin sprzężenie elektromechaniczne wprowadził Sandow w 1952 r. [4, 43] dla określenia istoty i kolejności wypadków w mechanizmie pośredniczącym między depolaryzacją sarkolemmy a aktywacją układu kurczliwego w komórce mięśniowej. Bodźcem do skurczu włókna mięśniowego jest potencjał czynnościowy nerwu ruchowego unerwiającego to włókno. Poszczególne ogniwa w tym procesie można przedstawić najogólniej schematycznie [3] (ryc. 1).

Liczne badania doprowadziły do odkrycia złożoności sprzężenia elektromechanicznego. Okazało się bowiem, że u podstawy tego ogniwa leży przewodnictwo potencjału czynnościowego z sarkolemmy w głąb komórki drogą cewek poprzecznych T (zwanym także układem kanalików poprzecznych lub po prostu układem T).

Depolaryzacja błony cewki poprzecznej T doprowadza do uwolnienia jonów wapnia ze zbiorników końcowych (cystern końcowych) siateczki sarkoplazmatycznej. Jony wapnia uwolnione wiążą się z tropoiną zlokalizowaną w miofilamentach cienkich, co wywołuje skurcz (in-

nymi słowy następuje aktywacja układu kurczliwego polegająca na współdziałaniu miofilamentu grubego z cienkim miofilamentem). Z kolei, z chwilą zaniku depolaryzacji, jony wapniowe zostają ponownie wychwytywane przez siateczkę sarkoplazmatyczną z wykorzystaniem energii ATP i następuje relaksacja odzwierciedlająca inaktywację układu kurczliwego [10, 35-37, 56, 97, 137].

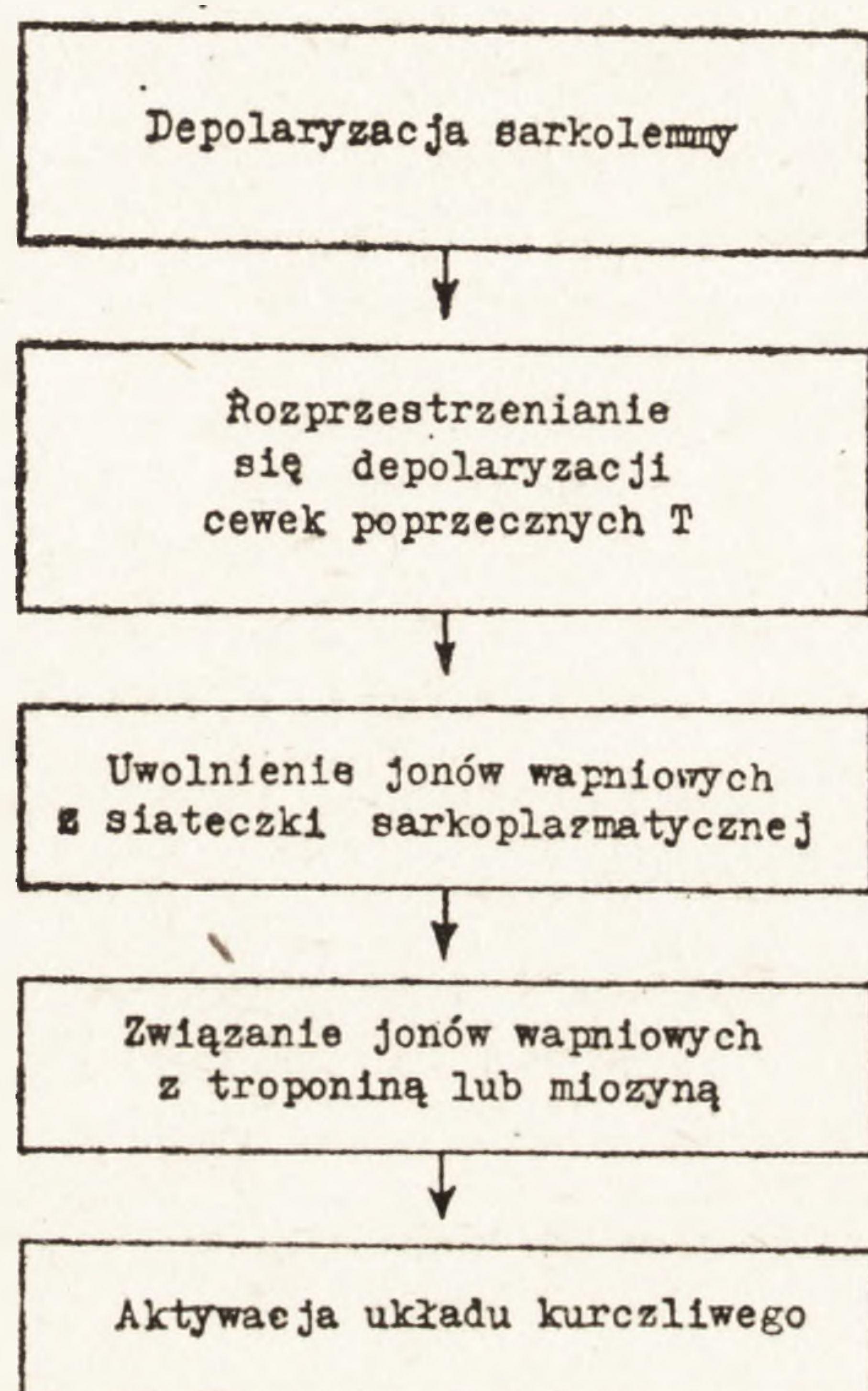


Ryc. 1. Schemat kolejności zjawisk towarzyszących sprzężeniu elektromechanicznemu [3]

Szczególne zainteresowanie badaczy koncentruje się na problemie, w jaki sposób depolaryzacja cewki przenosi się do siateczki sarkoplazmatycznej wywołując uwalnianie jonów wapnia. Podłożem funkcjonalnego związku tych dwu ogniw wydaje się być bezpośrednie połączenie przestrzeni cewki poprzecznej T ze środowiskiem zewnątrzkomórkowym. Istnienie kontaktu morfologicznego zostało już udowodnione w 1958 r. [43]. Stało się również pewne, na podstawie badań wielu autorów, że depolaryzacja cewki poprzecznej T jest konieczna dla aktywacji układu kurczliwego. Pod względem właściwości elektrofizjologicznych błony tej cewki, chociaż wykazują one jakościowe podobieństwo do sarkolemy, różnią się od niej w sposób zasadniczy. W stanie spoczynku błony cewki poprzecznej T wykazują niskie przewodnictwo dla jonów chlorkowych, stanowiące $1/36$ wartości przewodnictwa tego jonu przez sarkolemmę, a przewodnictwo dla jonów potasowych w błonach kanałków poprzecznych wynosi $1/3$ tej wartości. Poza tym wydaje się, że w cewkach poprzecznych kanałów sodowych i potasowych związanych z procesem pobudzenia jest dużo mniej niż w sarkolemmie, a mianowicie liczbę kanałów sodowych określa stosunek $1/20$, a potasowych $1/33$, co — jak wykazali Adrian i Peachy (według [43]) — może doprowadzić do przebudowy potencjału czynnościowego. Jak wykazano, mimo trwającej depolaryzacji, włókna mięśniowe nie mogą pozostawać w stanie skurczu i następuje relaksacja. Rozkurczone włókna nie mogą w sposób

bezpośredni reagować na następną depolaryzację. Ani zanik depolaryzacji, ani hiperpolaryzacja nie przywracają skurczu. Może on nastąpić dopiero po pewnym czasie. Właściwość tę zinterpretowali Hodgkin i Horowitz [65], tłumacząc ją jako wyczerpanie aktywatora, co stało się później podstawą do jednej z koncepcji działania sprzężenia elektromechanicznego.

Proces sprzężenia elektromechanicznego, rysując się jako ogniwo w pobudzeniu efektora, zawiera w sobie szereg wydarzeń, które ogólnie przedstawiono na ryc. 2 [4].

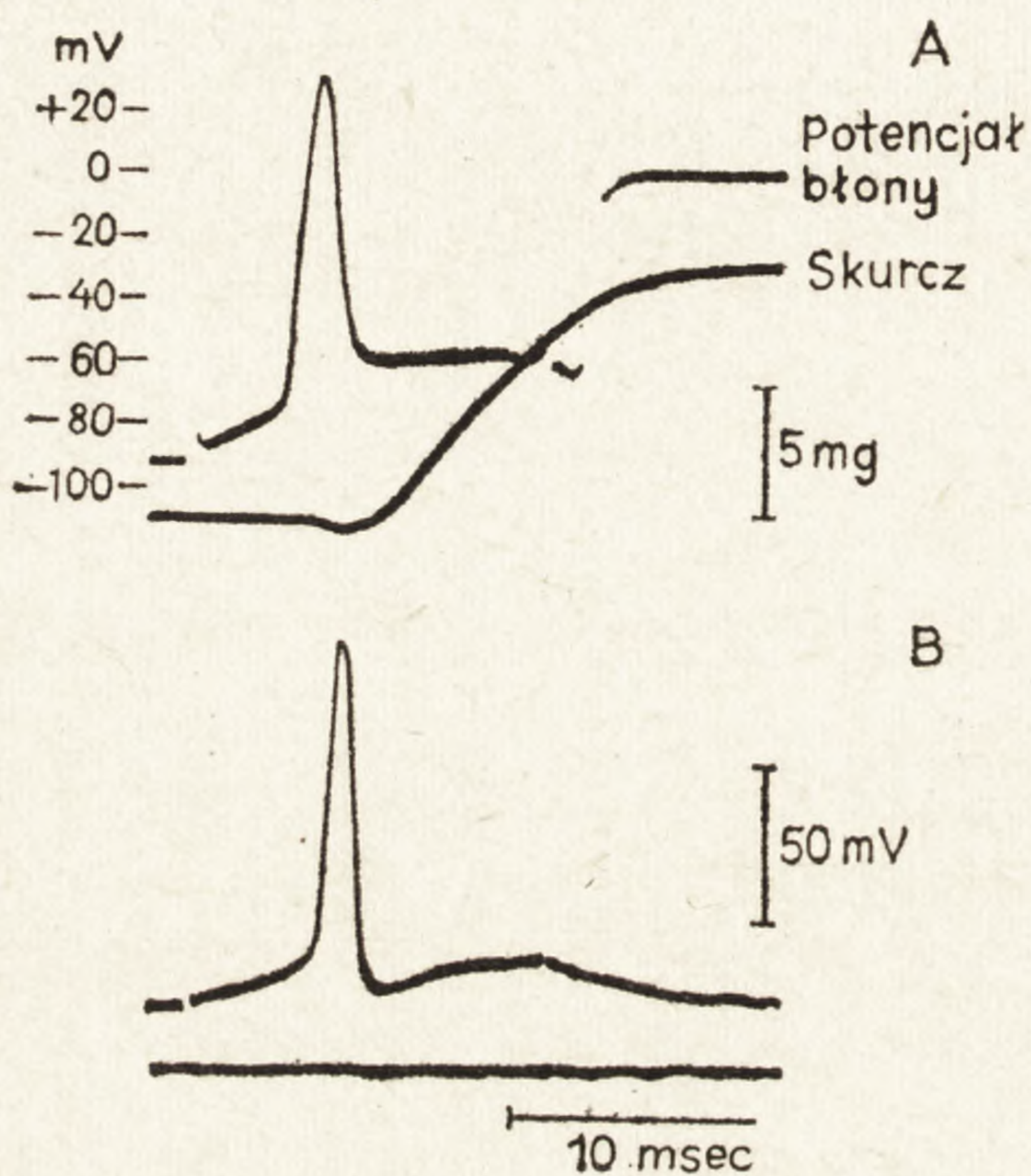


Ryc. 2. Schemat zjawisk wchodzących w skład sprzężenia elektromechanicznego [4]

DEPOLARYZACJA SARKOLEMMY

Kanaliki siateczki sarkoplazmatycznej biegną równolegle do osi włókien mięśniowych. Osobny system poprzecznych kanalików pochodzących z wpuklenia sarkolemmy tworzą cewki poprzeczne T. W miejscu zbliżenia się z cewkami kanalikami siateczki sarkoplazmatycznej rozszerzają się tworząc zbiorniki końcowe. Dwa zbiorniki końcowe należące do sąsiednich kanalików siateczki sarkoplazmatycznej i położona między nimi cewka poprzeczna T tworzą triady lub diady. Pomiedzy tymi dwoma systemami błon wewnątrzkomórkowych nie ma połączenia [137]. Ponieważ depolaryzacja sarkolemmy powoduje lokalnie skurcz sarkomerów w miejscu występowania cewek poprzecznych T, wysunięto przy-

puszczenie, że cewki te stanowią przekaźnik, poprzez który stan pobudzenia sarkolemmy ulega przeniesieniu do siateczki sarkoplazmatycznej, a dalej do układu kurczliwego [137]. Z jednoczesnej rejestracji potencjału czynnościowego pojedynczego włókna mięśniowego oraz odpowiedzi mechanicznej tego włókna wynika, że początek skurczu jest opóźniony o 3 ms w stosunku do początku odpowiedzi elektrycznej. Podczas tego opóźnienia dochodzi do aktywacji układów kurczliwych. W tym właśnie czasie opóźnienia zachodzi sprzężenie elektromechaniczne (ryc. 3) [53].

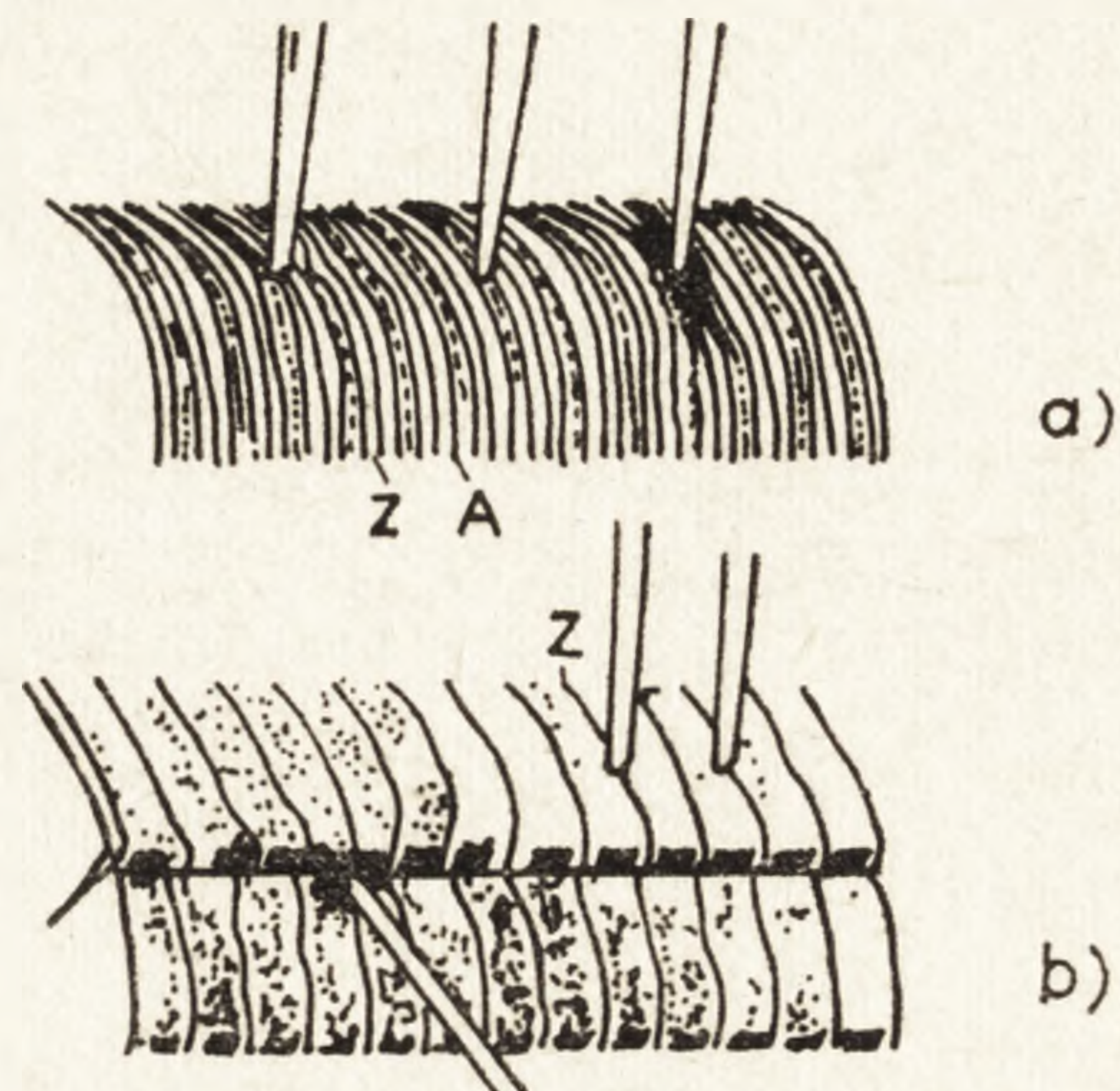
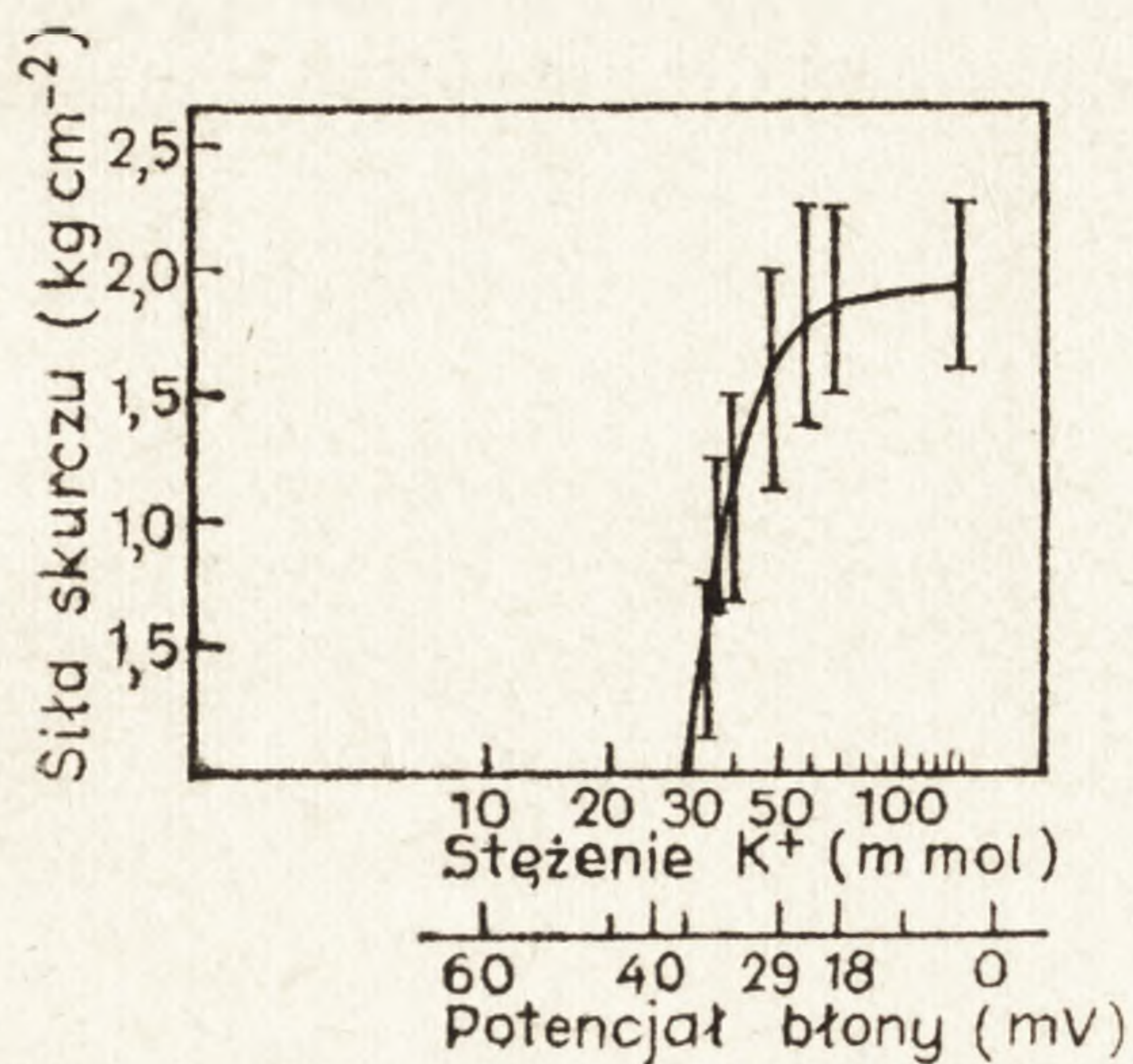


Ryc. 3. Rejestracja potencjału czynnościowego za pomocą mikroelektrody wewnątrzkomórkowej (górny zapis) i rejestracja skurczu za pomocą przetwornika typu RCA 5734 (dolny zapis) z pojedynczego włókna mięśniowego. A — w roztworze fizjologicznym, B — roztwór fizjologiczny z zawartością jonów sodu o zwiększonym stężeniu [18]

Depolaryzację błony komórki mięśniowej i skurcz tej komórki można wywołać eksperymentalnie (ryc. 4) stosując podwyższenie stężenia jonów potasowych na zewnątrz [20, 51, 52, 64, 65, 111, 168, 169]. Okazało się, że istnieje ścisła zależność między wielkością potencjału błonowego a napięciem mięśnia (według [4]). W mięśniu szarańczy skurcze pojawiają się przy stężeniu $[K^+]_o = 30$ mmol, kiedy to potencjał błony wynosi -34 mV, natomiast maksymalnie napięcie mięśnia otrzymuje się przy stężeniu potasu na zewnątrz komórki równym 70 mmol, kiedy to potencjał błonowy wynosi -18 mV. Hodgkin i Horowicz [65] przeprowadzili podobne doświadczenia na pojedynczych włóknach mięśniowych żaby i uzyskali skurcze przy stężeniu jonów potasu na zewnątrz równym 20 mmol i potencjale błony równym -56 mV, a napięcie maksymalne przy stężeniu 10 mmol tego pierwiastka. Te wartości progowe dla wystąpienia skurczu, jak i wartości, przy których występuje największe napięcie mięśnia żaby i owada, różnią się. Różnica ta jest spowodowana różnicą w potencjale spoczynkowym błony mięśniowej u tych

zwierząt. Potencjał ten u żaby wynosi około -95 mV, natomiast u szarańczy około -60 mV.

Czas trwania skurczów indukowanych jonami potasu o dużym stężeniu jest zmienny. W niektórych mięśniach skurcze te zanikają po kilku



Ryc. 4. Obraz wzrastającego napięcia mięśnia indukowanego zmianą $[\text{K}^+]_0$ w stosunku do potencjału błonowego [4]

Ryc. 5. Diagram doświadczenia z punktową stymulacją włókna mięśniowego; a — żaby, b — kraba [167]

milisekundach, w innych mięśniach nawet u tego samego zwierzęcia utrzymują się tak długo, jak długo trwa depolaryzacja. Można je więc określić jako „fazowe” i „toniczne”. Brak jednak wyjaśnienia dlaczego występują takie dwa typy odpowiedzi [4].

Depolaryzację prowadzącą do skurczu można też wywołać w mięśniach owadów [155] stosując perfuzję roztworem glutaminianu [76, 116, 154]. Podobne wyniki uzyskano na izolowanym włóknie mięśniowym raka [172]. Jak wiadomo, identyczną reakcję wywołuje zastosowanie acetylocholino na mięśnie szkieletowe u kręgowców, mięczaków i pierścienic [155].

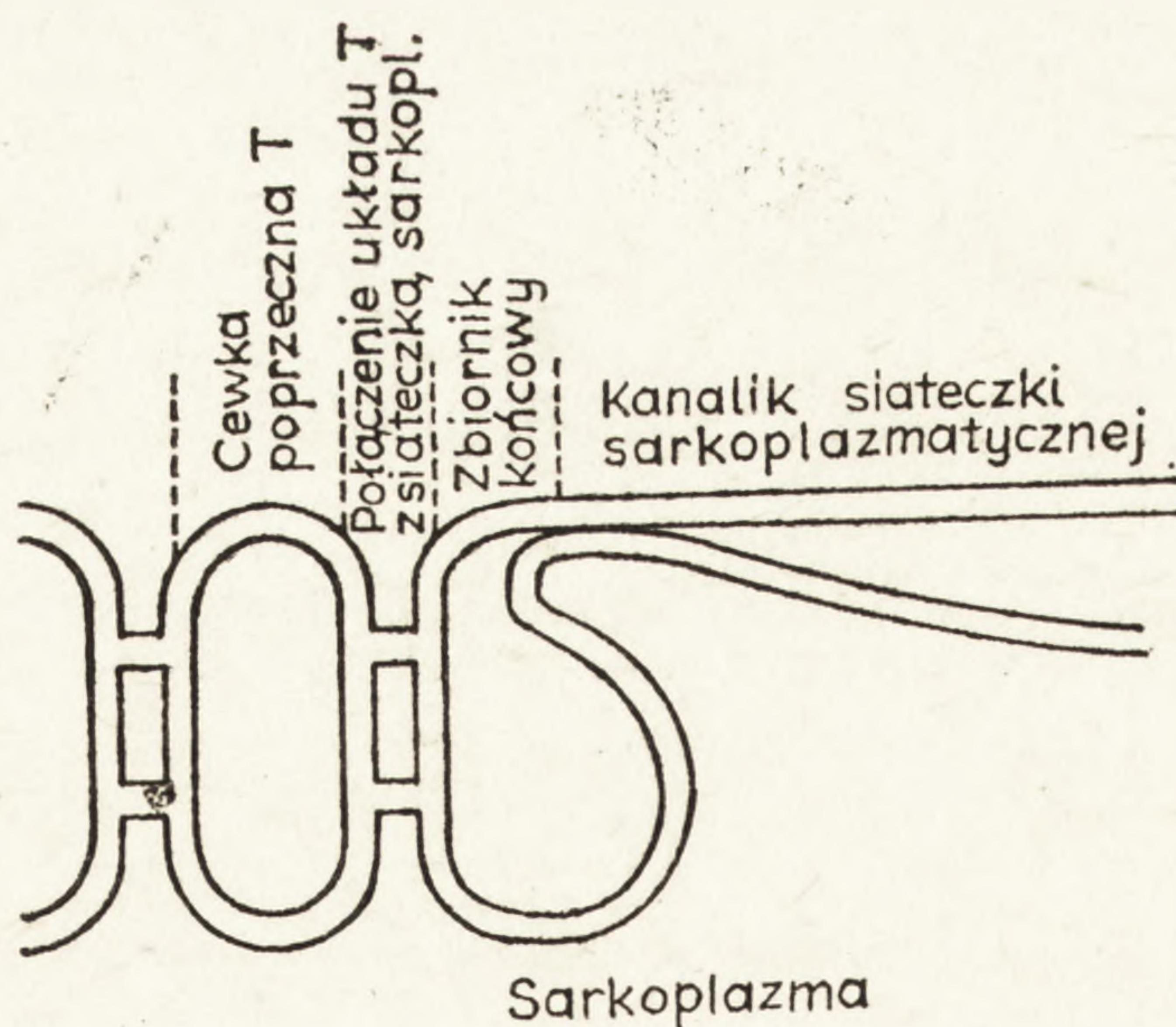
Czas trwania depolaryzacji ma ogromne znaczenie dla przebiegu odpowiedzi mechanicznej. Jak się okazało, czas trwania odpowiedzi mechanicznej wywołanej dzięki przedłużeniu depolaryzacji bardzo zależy od potencjału błonowego [23, 65]. Czas ten może być skrócony zależnie od depolaryzacji. Po krótkim impulsie depolaryzacyjnym odpowiedzi mechaniczne kończą się wraz z końcem impulsu i ulegają relaksacji, której stopień jest niezależny od amplitudy i czasu trwania impulsu.

ROZPRZESTRZENIANIE SIĘ DEPOLARYZACJI W GŁĄB CEWEK POPRZECZNYCH T

Przejście depolaryzacji w głąb cewki poprzecznej T po raz pierwszy ujawniły doświadczenia Huxleya i Taylora (według [4, 167]) oraz Hux-

leya i Strauba (według [4, 167]) na izolowanych włóknach mięśniowych żaby i kraba. Doświadczenia te polegały na punktowym stosowaniu stymulacji sarkolemmy (ryc. 5).

Pod wpływem tej stymulacji poszczególne sarkomery ulegają skurczeniu (ryc. 5); jeżeli prąd depolaryzacyjny przepływa przez jedną z dużych wpuklin błony. Kiedy mikroelektroda umieszczona jest naprzeciw pewnych aktywnych miejsc na błonie, stymulacja prądem depolaryzacyjnym wywołuje skurcz sarkomeru. Jak się okazało [49], miejsca te pod względem morfologicznym odpowiadają wpukleniom cewek poprzecznych T. Badania przestrzennego rozmieszczenia błon wewnątrzkomórkowych związanych z przekazywaniem pobudzenia do układu kurczliwego wykazały, że błony te są dość odległe pod względem anatomicznym. Jak już wspomiano, jedna z błon znajduje się w kontakcie z przestrzenią zewnątrzkomórkową, a druga tworzy wewnątrzkomórkowe przedziały w postaci siateczki sarkoplazmatycznej. Ponieważ błony te nie przechodzą w siebie nawzajem i są oddzielone, sygnał niosący informację o stanie pobudzenia musi być przeniesiony w miejscach połączeń, a więc w triadach, diadach czy złączach peryferycznych. W triadach, które występują głównie w szybkich mięśniach u kręgowców, dwa elementy siateczki sarkoplazmatycznej łączą się z cewką poprzeczną T. Diady i peryferyczne złącza występują w mięśni sercowym i w układach mięśni wolnych, jak również u zwierząt bezkręgowych. Diady są tak zbudowane, że jeden element siateczki sarkoplazmatycznej tworzy połączenie z jedyną cewką poprzeczną T lub z plazmolemą, tak jak to ma miejsce w złączach peryferycznych [49]. Wydaje się, że formy te, ponieważ wykazują podobną budowę, są analogiczne



Ryc 6. Schemat przedstawiający układ błon we włóknie mięśniowym [104] — rycina zmodyfikowana

pod względem funkcjonalnym. Proces przekazania informacji z jednego rodzaju błony na drugi ma miejsce w zbliżeniach się tych błon (ryc. 6). Jak uważają niektórzy autorzy [103, 107, 164], cewka poprzeczna T jest zasadniczą składową sprzężenia elektromechanicznego i w znacznym stopniu przyczynia się do większości elektrycznych właściwości włókna mięśniowego. W celu dokonania analizy tych właściwości konieczne jest stworzenie i zbadanie modelu cewki poprzecznej T. Cewka ta w mięśniach owadów jest zwykle dobrze rozwinięta i można przyjąć, że — podobnie jak u kręgowców i skorupiaków — służy przekazywaniu stanu pobudzenia w głąb włókna mięśniowego. Brak jednak bezpośredniego dowodu na poparcie tego założenia. Na marginesie można dodać, że owady stanowią dogodną grupę zwierząt laboratoryjnych, których mięśnie mogą posłużyć jako modele do wyjaśnienia wielu szczegółów w obrębie schematu sprzężenia elektromechanicznego [71, 114, 120].

Przedmiotem szczególnej uwagi badaczy sprzężenia elektromechanicznego stało się zagadnienie, w jaki sposób cewka poprzeczna T przekazuje informację — czy działa ona jak bierna sieć elektryczna [138], czy też potencjał czynnościowy rozprzestrzenia się czynnie do wnętrza włókna. Aidley [4] sugeruje, że ponieważ pobudzenie błony komórki mięśniowej u owadów ma charakter stopniowany, nie ma potrzeby tutaj aktywnego mechanizmu rozprzestrzeniania. Możliwe jest, że w czasie pobudzenia stan czynny o niskim poziomie nie dociera do centralnie zlokalizowanych włókienek kurczliwych, natomiast obejmuje te, które ułożone są bardziej na zewnątrz. Sugestia ta nie uzyskała jednak potwierdzenia eksperymentalnego.

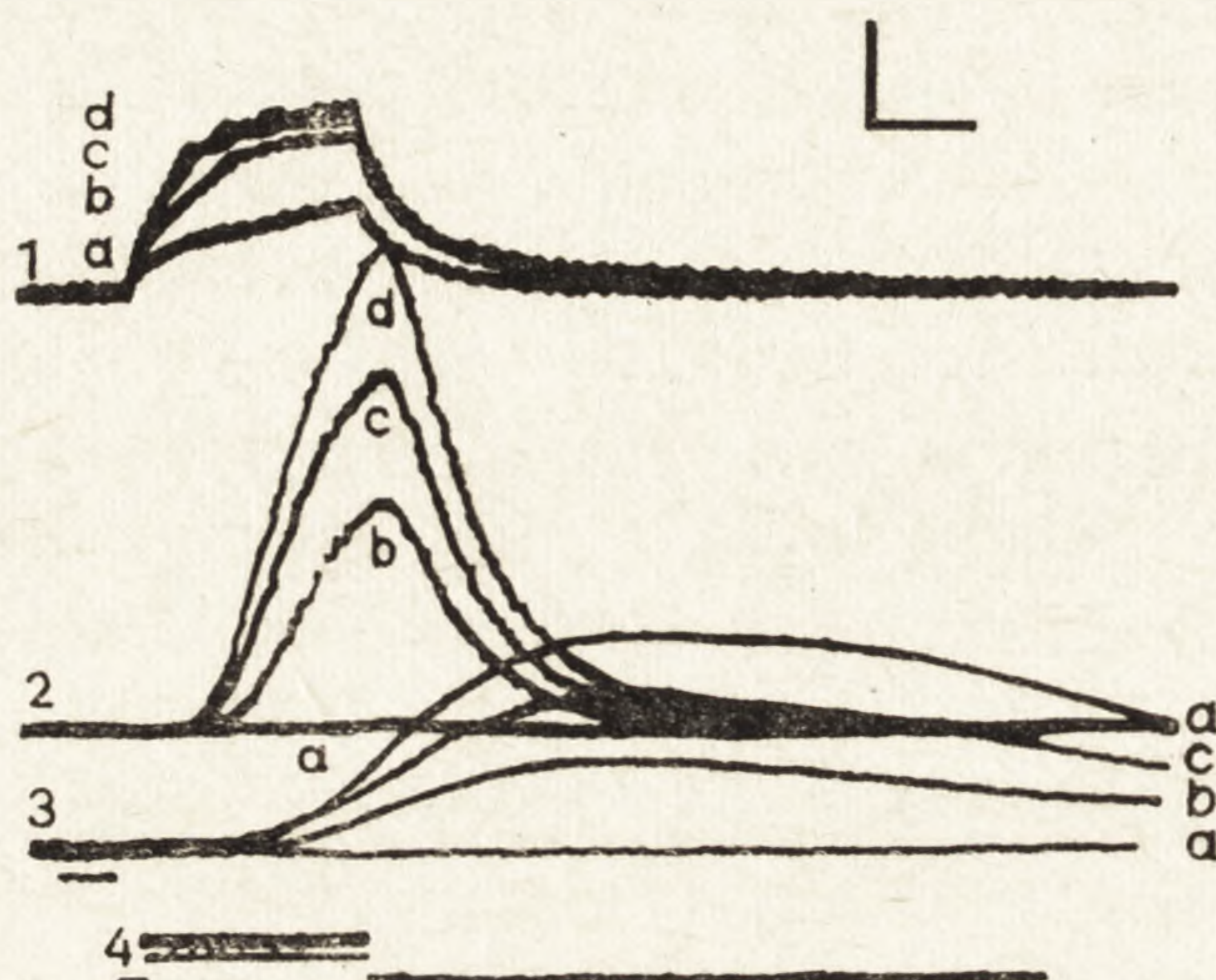
UWALNIANIE JONÓW WAPNIA Z SIATECZKI SARKOPLAZMATYCZNEJ

Jak się okazało na podstawie badań nad mięśniami zwierząt bezkręgowych, podwyższenie stężenia jonów potasowych na zewnątrz komórki mięśniowej w środowisku pozbawionym jonów wapniowych tłumy skurcze, które normalnie wystąpiłyby na skutek działania jonów potasowych. Wyniki takie uzyskano badając np. mięśnie szarańczy [4]. Kiedy zastosowano iniekcje jonów wapniowych do włókien mięśniowych kraba, uzyskano skurcz mięśni, natomiast iniekcje jonów potasowych, sodowych lub magnezowych, a nawet ATP nie wywoływały odpowiedzi mechanicznej (Caldwell i Wolster, według [4]). Jony wapniowe na zewnątrz komórki były nieodzowne u tych zwierząt do powstania odpowiedzi mechanicznej. Wyliczono też, że w mięśniach pąkla w czasie maksymalnej aktywacji stężenie wapnia wewnątrzkomórkowego wzrasta dziesięciokrotnie do wartości 10^{-6} mol (według [4]). Istnieje obecnie bezsporny dowód, że wapń bierze udział w procesie sprzężenia zwierząt

kręgowych [35–37, 56, 137], skorupiaków [166, 167], a także i owadów [4, 7, 119].

Konieczność obecności wapnia w płynie zewnątrzkomórkowym stała się przedmiotem badań wielu autorów [8, 27, 77, 86, 119, 171, 180].

W związku ze znaczeniem wapnia w regulacji procesów komórkowych [126], zastosowano z powodzeniem wiele metod do pomiaru wy-



Ryc. 7. Zmiany stężenia wapnia w mięśni Balanus zapisywane z zastosowaniem ekworyny. Kalibracja: 100 ms, 20 mV, 5 g (według [3])

1 — potencjał błony, 2 — zmiana stężenia wapnia, 3 — napięcie mięśnia, 4 — stymulacja

chwytu tego jonu przez układy błonowe [11, 25, 91, 99, 100, 165], między innymi metodę fluorescencyjną w celu rozdzielenia wapnia związanego od wapnia niezwiązanego (ryc. 7). Wyizolowana z organów świecenia medozy *Aequorea forskalea* ekworyna stanowi jeden z czujników wrażliwych na wapń (ryc. 7). Jeżeli to oczyszczone białko wstrzykuje się do włókien mięśniowych, zjonizowany wapń z siateczki sarkoplazmatycznej reaguje z nim i wraz ze zmianą stężenia tego jonu zmienia się intensywność świecenia [61]. Można więc pośrednio zorientować się o zmianie stężenia wolnego wapnia wewnątrz komórki.

Jeśli chodzi o ilość Ca^{2+} wewnątrz siateczki sarkoplazmatycznej, to Caputo wysuwa wniosek, że w mięśni szkieletowym żaby ma ona duży magazyn jonów wapnia [22]. Badania poziomu tego jonu w siateczce sarkoplazmatycznej i w mitochondriach świadczą o tym, że ilości tego jonu w tych strukturach w czasie zmęczenia są prawie bliskie ilościom w stanie normalnym [55].

Istnieje dowód na to, że normalna aktywacja włókien mięśniowych wynika ze wzrostu stężenia jonów wapnia w okolicy układu kurczliwego od 10^{-7} do 10^{-5} mol [78]. Brak dopływu wapnia o takim stężeniu z zewnątrz komórki nasunął przypuszczenie, że źródłem wapnia potrzebnego do aktywacji układu kurczliwego jest wapń zmagazynowany w siateczce sarkoplazmatycznej oraz że uwalnia się on stamtąd na skutek

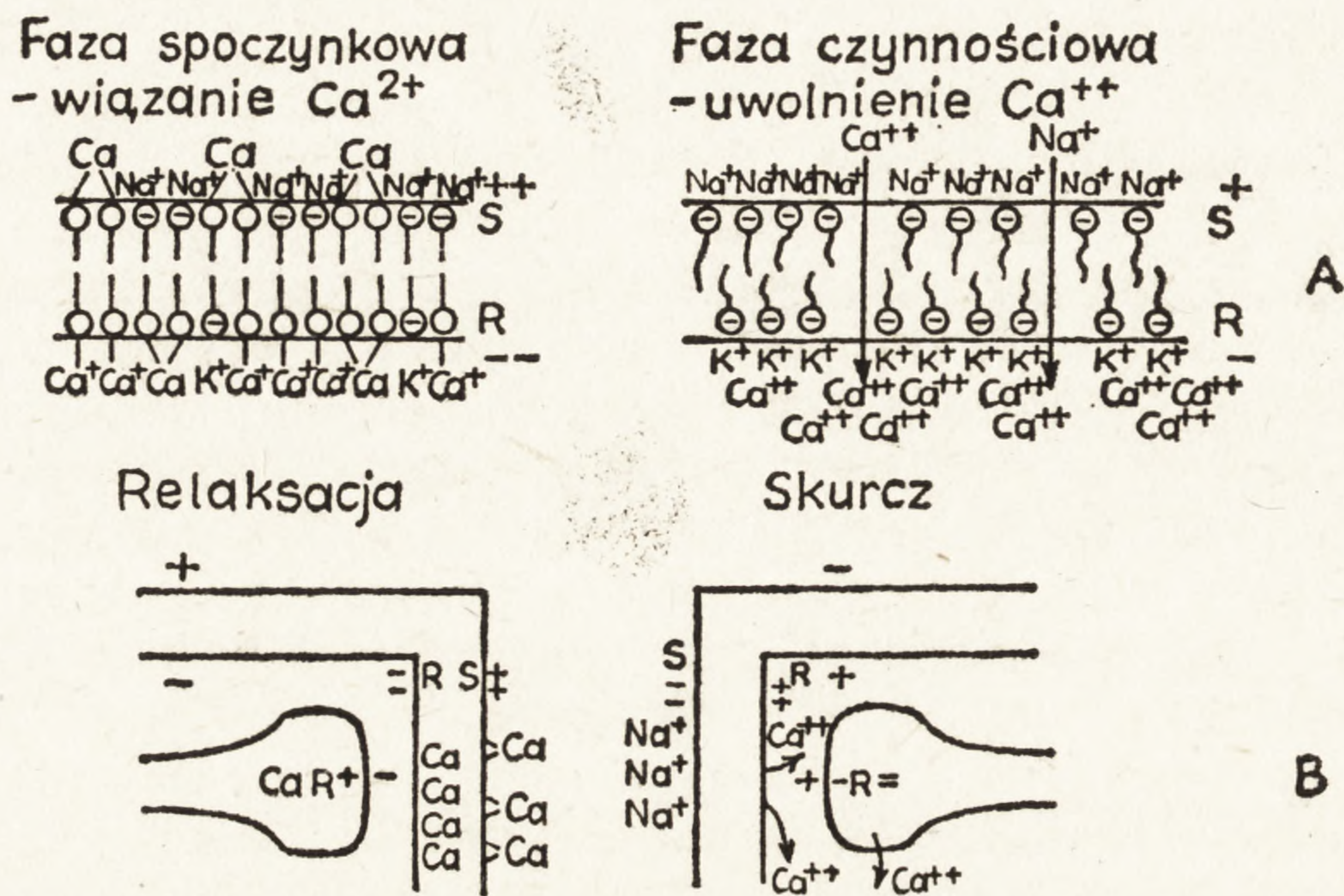
wzrostu przepuszczalności błony siateczki sarkoplazmatycznej dla tego jonu, co następuje w wyniku depolaryzacji cewki poprzecznej T.

Brak szczegółowych danych co do sposobu przekazywania informacji w obrębie połączenia cewki poprzecznej T z siateczką sarkoplazmatyczną stał się bodźcem do powstania wielu interesujących hipotez [89, 136, 157].

Jedną z możliwości jest taka, że błony cewki poprzecznej T i błony siateczki sarkoplazmatycznej mają niską oporność, tak więc prąd może z łatwością przez nie przepływać. W związku z tym powinno istnieć zabezpieczenie, aby potencjał błony siateczki sarkoplazmatycznej zmienił się pod wpływem potencjału błony cewki poprzecznej T, a ten z kolei podlegałby zmianom pod wpływem potencjału sarkolemy. Tak więc zakładając, że depolaryzacja błony siateczki sarkoplazmatycznej daje wzrost przepuszczalności dla jonów wapniowych, otrzymujemy model, w którym depolaryzacja sarkolemy powoduje uwolnienie wapnia z siateczki sarkoplazmatycznej [4, 104]. Drugą możliwość zasugerowali Ford i Podolsky (według [4, 104]). Wyniknęła ona z badań nad pozbawionymi błony włóknami mięśniowymi żaby. Traktowanie włókien [33] mięśniowych różnymi detergentami doprowadza do zniszczenia błony i tym samym usunięcia bariery dyfuzyjnej. Zastosowanie takich preparatów [163] pozwala na badanie efektu działania różnych typów jonów na cykl skurczowo-rozkurczowy w sytuacji odmiennej niż w stanie normalnego funkcjonowania tego układu. Okazało się, że podziaływanie wolnymi jonami wapniowymi na włókno mięśniowe tak spreparowane wywoływało natychmiastowy skurcz, ale tylko w tych włóknach, które uprzednio były „obciążone” wapniem, powodując wypływ jonów wapniowych z tego włókna. Autorzy tego doświadczenia wywnioskowali, że uwolnienie jonów Ca jest zjawiskiem regeneracyjnym i zasugerowali wyjaśnienie, że depolaryzacja błony cewki poprzecznej T powoduje uwolnienie małej ilości jonów wapniowych do przestrzeni otaczającej układ kurczliwy oraz że to następnie wywołuje uwolnienie większej ilości tego jonu z siateczki sarkoplazmatycznej [4, 104]. Obie koncepcje zawierają możliwość, że po rozwinięciu się progowego przepływu przez błony siateczki sarkoplazmatycznej, pojawia się wzrost przepuszczalności dla jonów wapniowych typu wszystko albo nic. Jednakże przeprowadzone w tym kierunku doświadczenia wykazały, że tego typu wzrost przepuszczalności nie jest konieczny dla wywołania wzrostu przepuszczalności w błonach siateczki sarkoplazmatycznej [31, 32].

Podobnie jak Ford i Podolski, Bianchi [12] zaproponował, że jony wapniowe same pozwalają na uwalnianie innych jonów wapniowych z siateczki sarkoplazmatycznej. Badacz ten przedstawił dwa układy (ryc. 8) sprzężenia, jakie istnieją w warunkach stabilnych przed pobu-

dzeniem i w warunkach labilnych w następstwie pobudzenia. Typ bezpośredni sprzężenia elektromechanicznego odnosi się do włókien mięśni gładkich, żołądków ssaków oraz włókien mięśniowych płazów. Przejście błony komórkowej ze stanu stabilnego w labilny powoduje uwol-



Ryc. 8. Schemat przejścia od warunków stabilnych do labilnych w błonie [12]
— rycina zmodyfikowana

A — błona bezpośrednio związana z uwalnianiem Ca^{2+} , B — błona pośrednio związana z uwalnianiem Ca^{2+}

nienie jonów wapniowych od jej wewnętrznej strony i bezpośrednią aktywację układu kurczliwego. Może to być także wywołane usunięciem wapnia z miejsc wiązania w warunkach stabilnych. Wtedy zachodzi konformacyjna zmiana w budowie błony i następuje wzrost przepuszczalności błony dla jonów wapniowych i sodowych. Usunięcie jonów wapniowych z powierzchni błony wolnych włókien mięśniowych płazów prowadzi do pojawienia się odpowiedzi mechanicznej, czego przyczyną jest uwolnienie się jonów wapniowych od strony wewnętrznej błony i wzrost stężenia tych jonów w okolicy układu kurczliwego. Typ pośredni sprzężenia elektromechanicznego polega na współzależności między sarkolemmą i cewką poprzeczną T a uwalnianiem wapnia aktywującego z miejsc uwalniania, które mogą istnieć od strony wewnętrznej błony, jak również w błonie siateczki sarkoplazmatycznej. Typ ten jest charakterystyczny dla mięśni szkieletowych.

Ogniwo łączące depolaryzację sarkolemmy i aktywację układu kurczliwego zawiera jeszcze wiele niejasności, w związku z czym istnieje szereg koncepcji jego funkcjonowania. Hipoteza aktywatora zdobyła sobie dużą uwagę. Między innymi Schneider i Chandler (według [104]) opisali

model prostego mechanicznego działania sprzężenia elektromechanicznego, który zakłada, że ruch naładowanych makrocząsteczek tkwiących w błonie cewki poprzecznej T wywołuje otwarcie kanału jonowego dla wapnia w siateczce sarkoplazmatycznej. Ruch makrocząsteczek spełnia rolę czujnika napięcia wrażliwego na zmiany napięcia na błonie cewki poprzecznej T. Zmiana konformacyjna, jakiej ulega makrocząsteczka, otwiera zarazem kanały jonowe dla wapnia w błonie siateczki sarkoplazmatycznej. Istnieją pewne dane o istnieniu struktur w postaci wyrostków łączących dwie błony cewki poprzecznej T i siateczki sarkoplazmatycznej, ale dane te nie stanowią zbyt pewnego dowodu na poparcie hipotezy istnienia mechanicznego ogniwa przenoszenia informacji z cewki do siateczki sarkoplazmatycznej [104].

Badania Franzini-Armstrong nad strukturalnym uwarunkowaniem między tymi dwoma typami błon przyczyniły się do włączenia odkrytych przez nią wyrostków zbiorników końcowych siateczki sarkoplazmatycznej jako odgrywających zasadniczą rolę w sprzężeniu między cewką poprzeczną T a siateczką sarkoplazmatyczną. Badania te, wykonane na mięśniach żaby i ryby [49], wykazały, że błona siateczki sarkoplazmatycznej jest ciągła i występuje wzdłuż całego sarkomeru. Wykazano również, że na powierzchniach błony siateczki sarkoplazmatycznej występują liczne wyrostki i to od strony połączenia. Na podstawie tych morfologicznych obserwacji Franzini-Armstrong odrzuca istnienie czysto elektrycznego sprzężenia tych dwu rodzajów błon podczas pobudzenia [49].

Mathias i wsp. [104] poddali szczegółowej analizie hipotezy Franzini-Armstrong. Wyszunęli oni pogląd, że przejściowy prąd jonowy mógłby służyć do przeniesienia sygnału z cewki poprzecznej T do siateczki sarkoplazmatycznej. Autorzy ci opisali model przepływu prądu w tym miejscu, wykorzystując szereg elektrycznych właściwości mięśnia szkieletowego. Opisują dwa rodzaje przepływu prądu występującego na błonie: jeden pojawiający się dzięki ruchowi jonów nazywany prądem jonowym, a drugi nazywany pojemnościowym lub wewnątrz błonowym, ponieważ jest on spowodowany dzięki akumulacji lub odpływowi ładunku na jednej stronie błony bez przeniesienia przez tę błonę [104]. Zgodnie z hipotezą czujnika napięciowego w błonie siateczki sarkoplazmatycznej ruch cząsteczki w obrębie błony powodowałoby powstanie prądu bramkującego (gating current) [89, 93, 104, 112]. Prąd bramkujący tym samym otwiera w błonie siateczki sarkoplazmatycznej kanały, przez które jony wapniowe mogą przedostać się w pobliże układu kurczliwego. Autorzy ci podkreślają, że połączenie cewka poprzeczna T — siateczka sarkoplazmatyczna jest specyficznym połączeniem, którego budowa i właściwości odbiegają od innych połączeń błonowych.

Grundfest [57] uważa, że czynnik wyzwalający uwalnianie jonu Ca z siateczki sarkoplazmatycznej ukryty jest w skomplikowanych właściwościach samej siateczki sarkoplazmatycznej, ponieważ ma ona zdolność do wychwycenia tych jonów, osiągając bardzo szybko stan nasycenia, w którym wychwyt jonów wapniowych jest zahamowany, co z kolei staje się podłożem dla jeszcze innej właściwości siateczki sarkoplazmatycznej — jej zdolności do uwalniania tych jonów też zresztą w nagły sposób. Uczestnictwo egzogenego wapnia w sprzężeniu elektromechanicznym jest jedną z wielu ról, jaką odgrywa Ca^{2+} w funkcjonowaniu komórki. Spośród najbardziej poznanych jest to zapoczątkowanie czynności sekrecyjnej pęcherzyków z komórek gruczołowych i z zakończeń nerwowych [57].

Można tu dokonać porównania roli wapnia w sprzężeniu elektromechanicznym z rolą wapnia na zakończeniu nerwowym. Istnieje ogólnie opinia, że depolaryzacja zakończenia nerwowego otwiera regulowany napięciem kanał dla jonów wapniowych oraz że jony te wchodzi do zakończenia zapoczątkowując kwantowe uwalnianie przekaźnika, które kończy się z chwilą, kiedy jony wapniowe zostają odizolowane lub wydalone z zakończenia [156]. Przenoszenie nerwowo-mięśniowe wymaga obecności jonów wapnia na zewnątrz komórki [77, 115, 156].

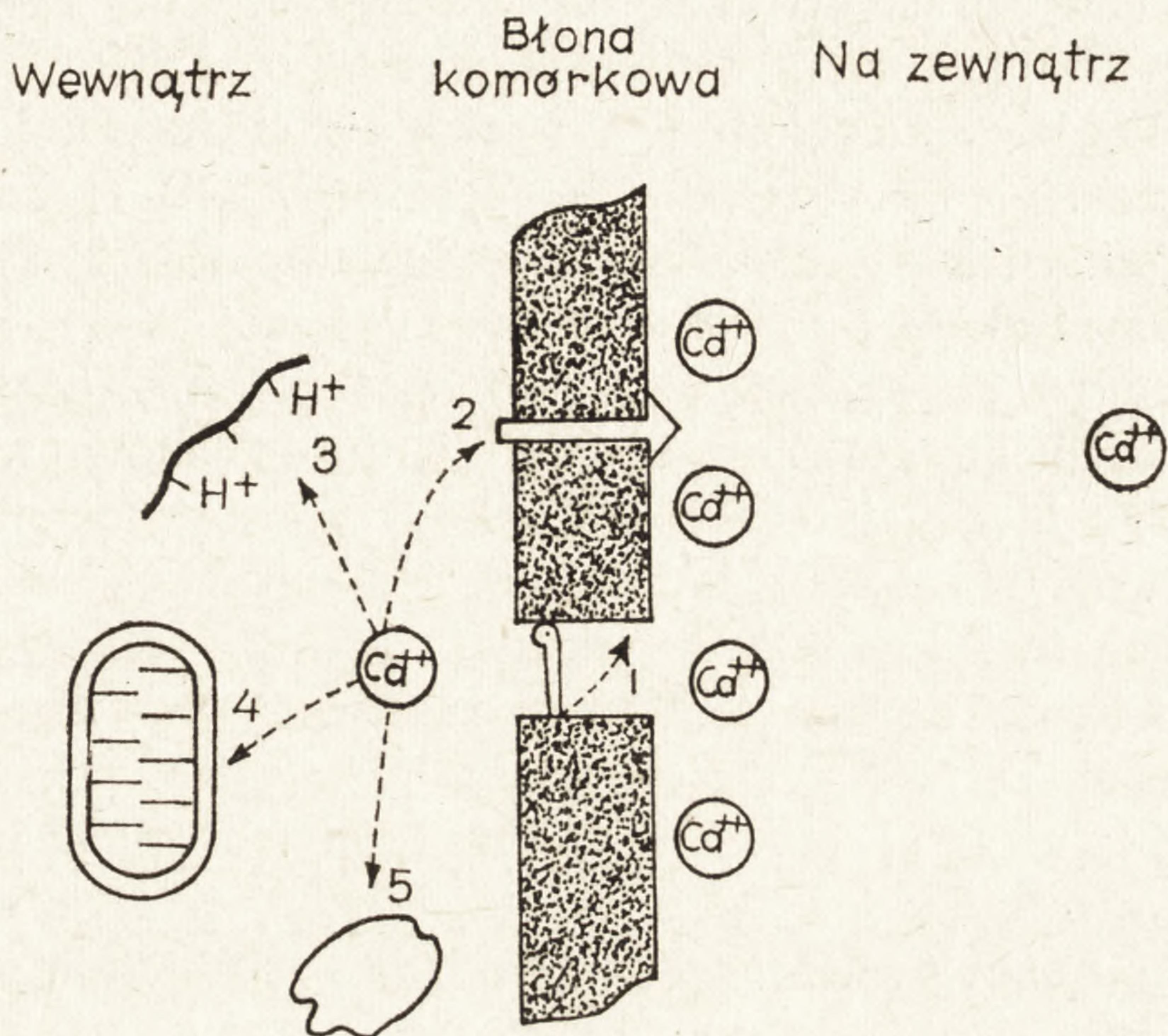
Niezwykle przekonujący wydaje się być udział prądów bramkujących w regulacji kanału jonowego. Według Van der Kloota udział tego typu prądu odgrywa zasadniczą rolę w przebiegu procesu przenoszenia nerwowo-mięśniowego i uwalniania acetylocholino. Wejście jonów wapniowych do zakończenia następuje drogą kanału, którego otwieranie reguluje napięcie (ryc. 9). Podwyższenie stężenia Ca^{2+} wewnątrz komórki wywołuje kwantowe uwalnianie przekaźnika. Jony wapniowe mogą wtedy zostać wychwycone i drogą transportu przez błonę komórkową wydość się na zewnątrz, mogą być związane z białkami wewnątrz komórki, mogą również być wychwycone przez mitochondria oraz przez inne niezidentyfikowane, lecz związane z błoną struktury [156, 157].

Potencjał błonowy E_m można wyrazić jako sumę potencjałów z obu stron błony ψ_{in} i ψ_{out} oraz spadek napięcia w obrębie błony V_m ,

$$E_m = -\psi_{in} + V_m + \psi_{out}.$$

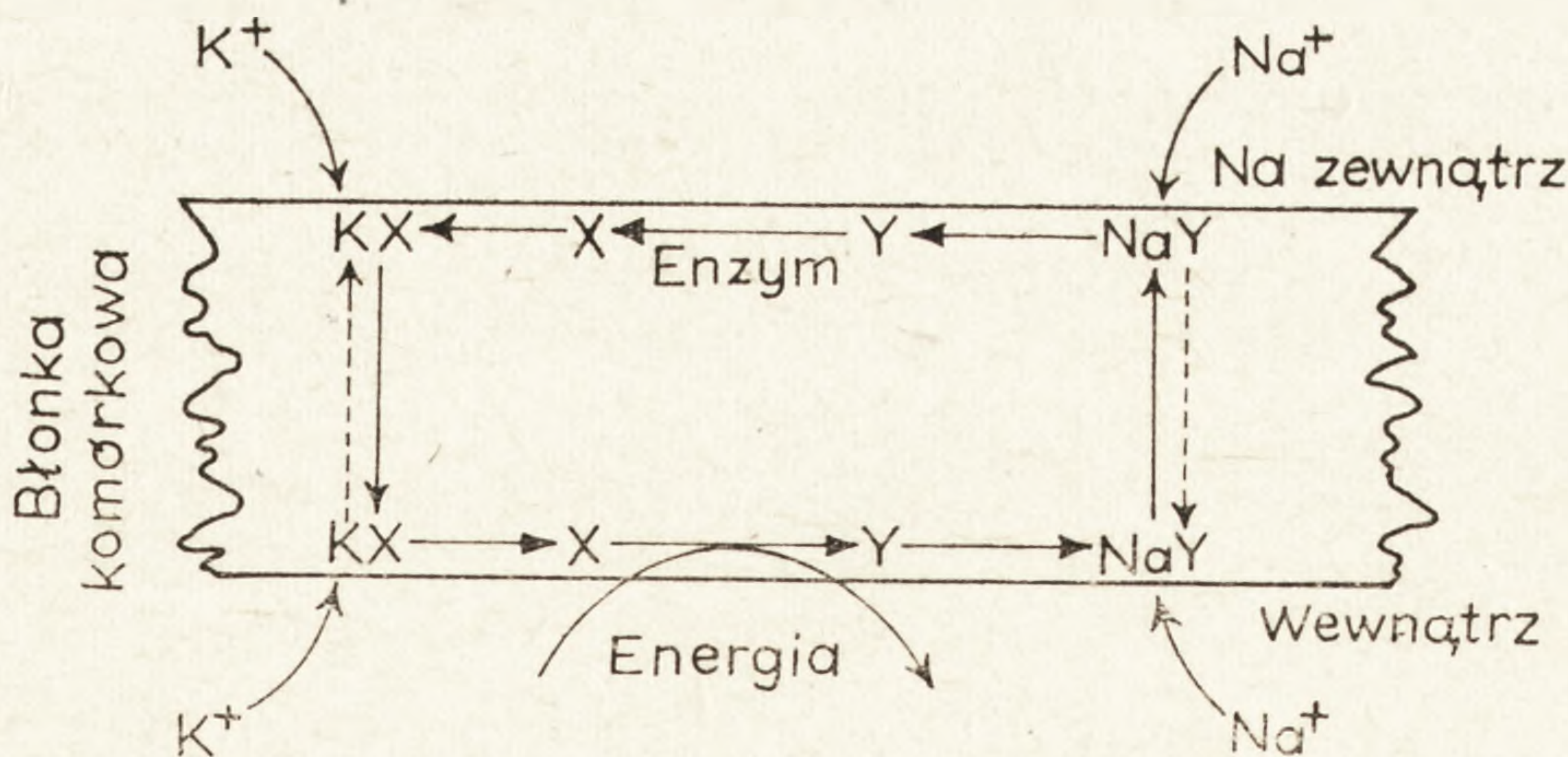
Zmiana potencjału z jednej strony błony w nieobecności jakiegokolwiek zmiany potencjału błonowego będzie równoznaczna z przesunięciem gradientu napięcia w obrębie błony. Przesunięcie to będzie wpływać na zachowanie się układów wrażliwych na zmiany napięcia w błonie, tak jak to ma miejsce w bramkowanych kanałach jonowych oraz w mechanizmie sprzężenia elektromechanicznego. Jeśli zwiększa się stężenie kationów na zewnątrz komórki i to takich kationów, które wiążą się

z grupami anionowymi na błonie, następuje spadek ładunku ujemnego ψ_{out} bez wpływu na E_m . Oczywiście należy zauważyć, że E_m ulegnie zmianie, jeżeli będą to kationy oddziaływające na przewodnictwo błony lub które otwierają i zamykają drogi dla przejścia jonów poprzez zasłanianie lub wiązanie odpowiednich ładunków w V_m .



Ryc. 9. Schemat przedstawiający rolę jonów Ca^{2+} w przenoszeniu nerwowo-mięśniowym [156]

Na marginesie można dodać, że istnieje kilka molekularnych modeli służących do wyjaśnienia aktywnego transportu kationów przez błony [15, 87]. Na uwagę zasługuje tu klasyczny model Show (według [146]) odnośnie do aktywnego transportu jonów sodowych i potasowych poprzez błonę komórkową (ryc. 10). Model ten sugeruje istnienie białka

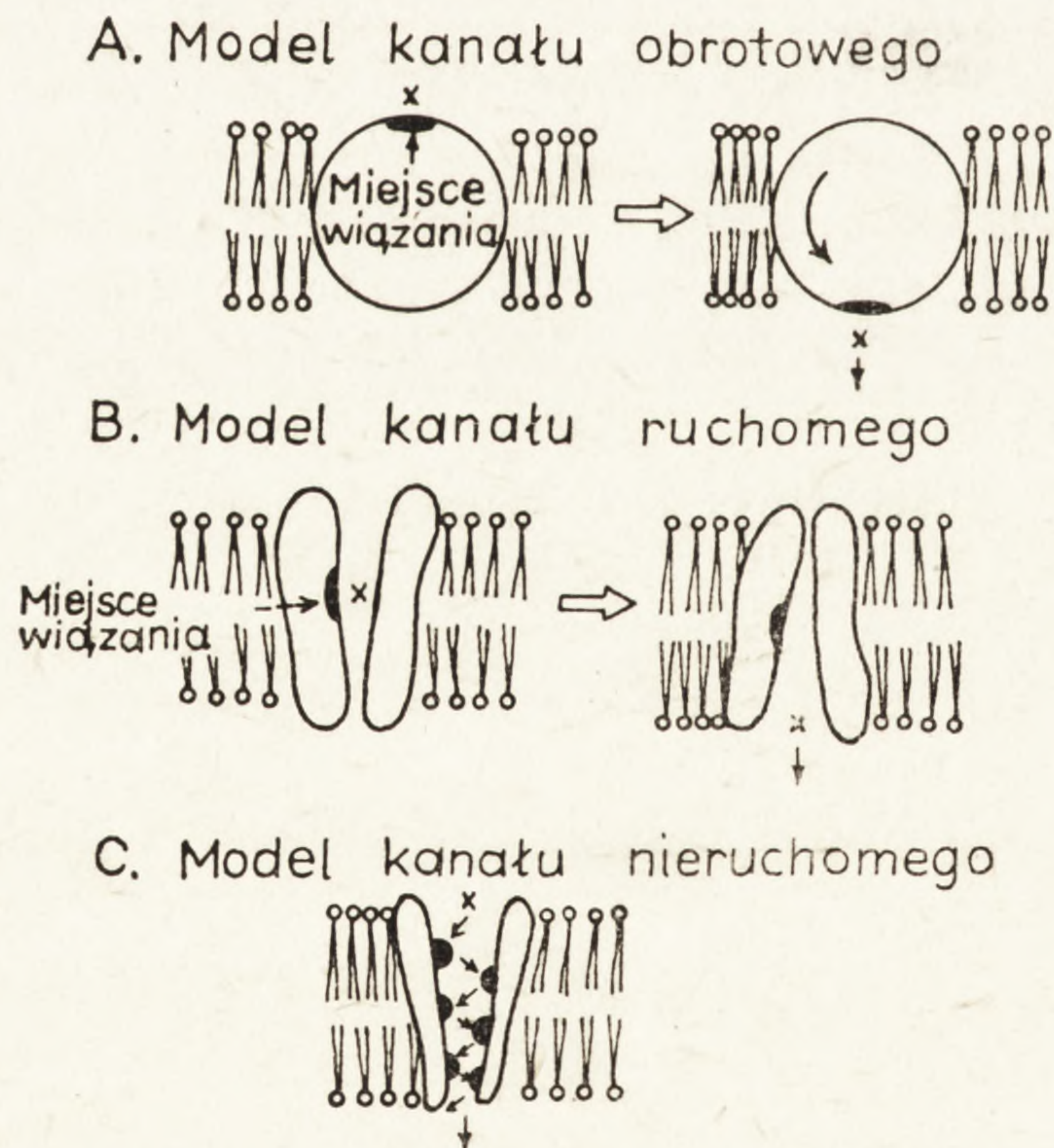


Ryc. 10. Klasyczny model Show aktywnego transportu jonów [131]

wiążącego się z kationem, działającego jako nośnik tego kationu. Jony K i Na mogą przechodzić poprzez błonę w formie związanej z nośnikami X i Y, przy czym nośnik X ma powinowactwo dla jonu potasowego, a Y — dla sodowego. X i Y są wzajemnie zamienne i pozostają w równowadze na zewnętrznej powierzchni błony. Na wewnętrznej powierzchni X zamienia się w Y z wydatkiem energii metabolicznej. Hipoteza ta znalazła szerokie poparcie i stała się prototypem wielu innych hipotez.

W sprzeczności z modelem Show znajdują się poczynione niedawno obserwacje, że Na^+ i K^+ działają kooperatywnie na formowanie i rozkład wzajemnie działającej ATPazy sodowo-potasowej (według [146]) oraz że transport aktywny Na^+ i K^+ ma miejsce jedynie wtedy, gdy zarówno Na^+ , jak i K^+ są związane z przenośnikiem. Model Show byłby zatem bardziej skomplikowany. W odniesieniu do jonów Ca^{2+} i ich przeniesienia przez błonę siateczki sarkoplazmatycznej model ten mógłby być zastosowany jedynie częściowo [146].

Inny model, uwzględniający koncepcję nośnika rotacyjnego, zakłada, że kationy związane z nośnikiem białkowym na jednej stronie błony lub na obu stronach zostają przeniesione na drugą stronę wtedy, gdy cząsteczka nośnika ulega obrotowi w obrębie błony. W zależności od zmiany powinowactwa nośnika jony Ca uwalniają się, a cząsteczka nośnika ulega odwrotnemu obrotowi. Model ten zakłada ruch białka, w którym hy-



Ryc. 11. Modele kanałów jonowych w błonie [146]

A — model kanału obrotowego, B — model kanału ruchomego, C — model kanału nieruchomego

drofilna grupa zdolna do wiązania kationów na powierzchni błony musi poruszać się przez region hydrofobowy warstw lipidowych (ryc. 11).

Następnym modelem jest model kanału ruchomego. Tutaj zmiany konformacyjne w obrębie kanału wyłożonego białkiem pomagają przemieszczeniu kationu przez błonę. Na skutek zmiany konformacyjnej kompleksu białkowego, indukowanej dzięki energii pochodzącej z hydrolizy ATP, kanały otwierają się ku wewnętrznej stronie błony i w tym samym czasie kationy wiążą się z białkami pozostającymi w stanie dysocjacji. Według wielu autorów podczas przeniesienia np. Ca^{2+} ten funkcjonalny ruch cząsteczki nośnika mógłby mieć miejsce, podczas gdy jego hydrofilna część pozostawałaby na zewnątrz błony.

Jeszcze inny model kanału nieruchomego został zaproponowany przez Skou dla ATPazy sodowo-potasowej. Tutaj także kanał wyłożony jest białkiem, ale zmiana konformacyjna nie jest konieczna. Kationy są transportowane dzięki zmianom w powinowactwie białek nośnych dla tych kationów. Kationy te są doprowadzane dzięki zmianom w rozkładzie elektronów w obrębie białka nośnego. Transport jonów przez błony lipidowe [24], jak również budowa białek transportujących Ca^{2+} [5] jest nadal przedmiotem badań wielu autorów.

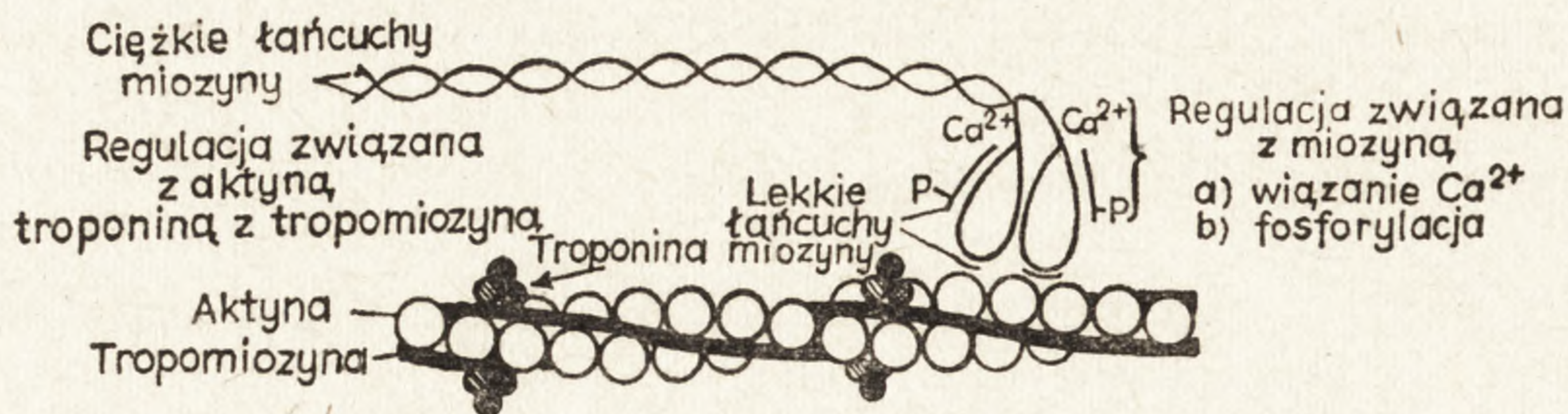
Dobrze znany jest sposób w jaki ATP dostarcza energii potrzebnej do transportu Ca^{2+} , ale nie wiadomo jeszcze dokładnie, w jaki sposób zachodzi przetworzenie energii chemicznej z ATP na energię osmotyczną gradientów Ca^{2+} [81, 100]. Można by tu nawet mówić o chemiczno-osmotycznym sprzężeniu [100, 146].

Wiadoma jest również rola nukleotydów cyklicznych np. cyklicznego AMP w regulacji metabolizmu komórkowego. Ostatnio wiele uwagi poświęca się roli Ca^{2+} i uważa się go za drugorzędny nośnik niezależnie od cyklicznego AMP i cyklicznego GMP oraz za regulatora nukleotydów cyklicznych i efektora pewnych wypadków kontrolowanych przez nukleotydy cykliczne [128].

Zakłada się ostatnio, że oscylacyjne zachowanie się licznych komórek wywodzi się z oscylacji poziomów kontroli wapnia i cyklicznego AMP [128].

Niezależnie od tego, w jaki sposób Ca^{2+} przedostaje się przez kanał wapniowy, dalsze losy tego jonu w procesie sprzężenia elektromechanicznego kierują go ku cząsteczce troponiny [44, 50, 127, 147], co — jak wiadomo — aktywuje układ kurczliwy komórki mięśniowej, regulując (ryc. 12) współdziałanie aktyny z miozyna [2, 46, 75] lub, jak to ma miejsce w mięśniach np. mięczaków, reaguje z miozyna [81]. W mięśniach mięczaków wapń działa bezpośrednio na cząsteczkę miozyny, w mięśniu królika zaś może działać na miozyna pośrednio poprzez aktywację specyficznej kinazy białkowej. Uważa się, że aktywność ATPazy

transportującej wapń podlega regulacji poprzez równowagę aktywności kinazy białkowej uzależnionej od wapnia oraz od aktywności fosforylasy białkowej [68]. Fosforylacja białka powoduje aktywację, a defosforylacja przez fosfatazę relaksację układu kurczliwego. Do tej klasy re-



Ryc. 12. Schemat mechanizmu układu kurczliwego [2]

gulacji zalicza się mięśnie gładkie kręgowców [148]. W mięśniach tych aktywacja układu kurczliwego zachodzi na skutek współdziałania wapnia z cząsteczką miozyny [140, 141]. Czas trwania potencjałów czynnościowych, jak i odpowiedzi mechanicznej zależą od stężenia jonów Ca na zewnątrz błony komórkowej [106], podobnie jak w mięśniu sercowym [96]. Badania morfologiczne układu kurczliwego mięśni gładkich były przedmiotem wielu badań [16, 45, 129, 139, 142]. Okazało się, że nie mają one siateczki sarkoplazmatycznej ani zbiorników końcowych, ani też cewki poprzecznej T. Sprzężenie w tych mięśniach jest bezpośrednie [152]. Należy przypuszczać, że farmakologiczne bodźce o charakterze działania aktywującym i hamującym zmieniają aktywność jonów wapniowych w sarkoplazmie [143].

Spontaniczna aktywność mięśni gładkich zachodzi w środowisku pozbawionym jonów sodowych. Autorzy przypuszczają [151], że wewnętrzna powierzchnia błony komórkowej powinna mieć miejsca ujemnie naładowane, w których Ca^{2+} może się wiązać. Niektóre doniesienia [74] udowadniają istnienie dwu rodzajów miejsc, gdzie jony wapniowe mogą się wiązać. Chodzi tu o przedział wolny i szybki w mięśniu gładkim.

Procesy sprzężenia elektromechanicznego w mięśniach szkieletowych i w sercu wykazują znaczne różnice. W mięśniu szkieletowym odpowiedź elektryczna wyzwała dużo wolniej przebiegającą odpowiedź mechaniczną. W komórkach serca potencjał czynnościowy jest przedłużony, a odpowiedź mechaniczna uzależniona jest od prądu niesionego przez jony wapniowe i sodowe [96, 97, 113].

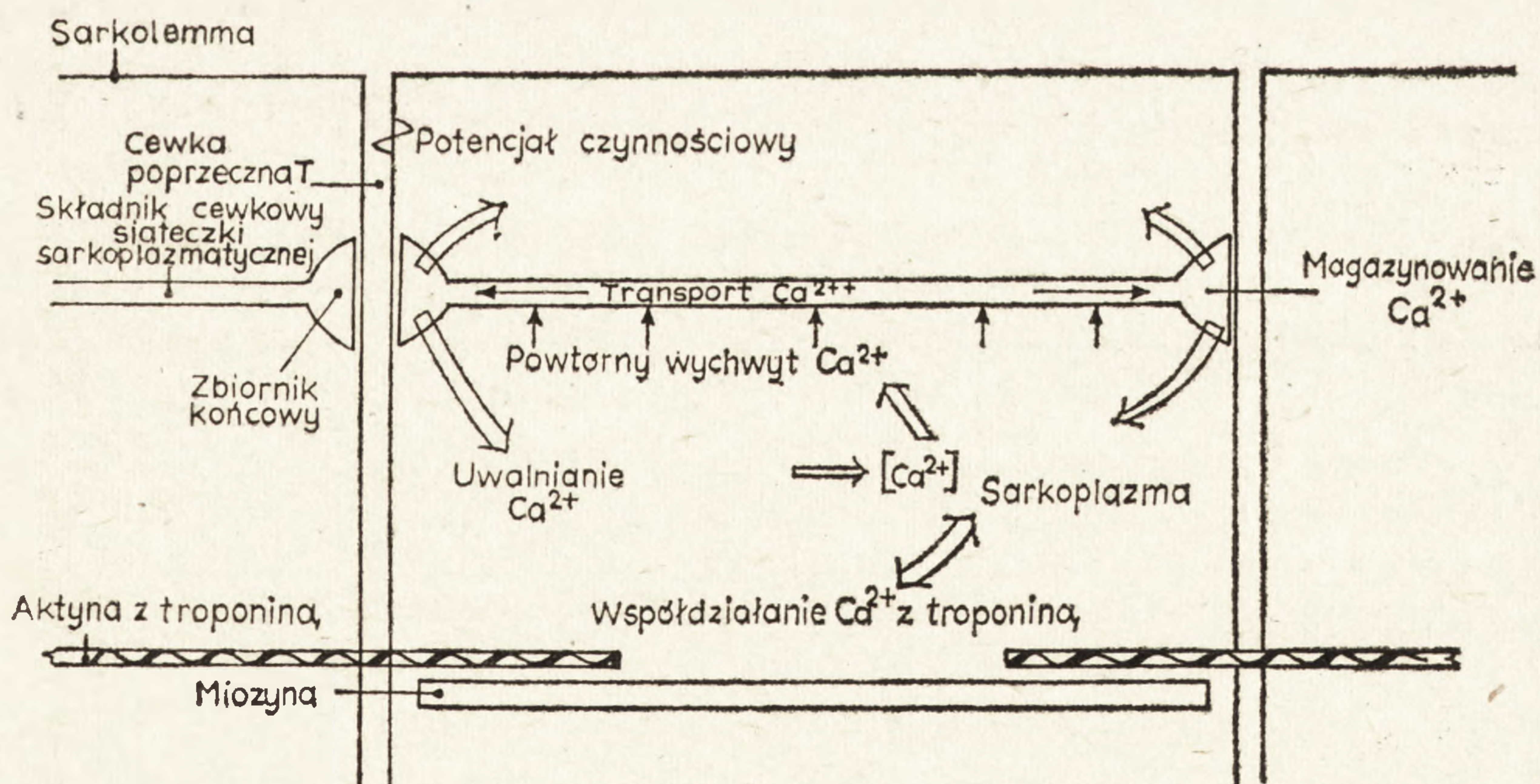
INAKTYWACJA UKŁADU KURCZLIWEGO

Mimo trwałej depolaryzacji mięsień nie może pozostać w stanie skurczu, po którym następuje okres relaksacji [108]. Następną aktywacja

układu kurczliwego może nastąpić dopiero po pewnym czasie. Właściwość tę [65] wytłumaczono jako wyczerpanie się aktywatora. Przez analogię do inaktywacji sodu w błonie komórkowej proces ten nazwano również inaktywacją. W związku z udowodnieniem istnienia aktywnego elektrycznego procesu w obrębie połączenia cewki poprzecznej T i siateczki sarkoplazmatycznej wydaje się prawdopodobne, że proces inaktywacji związany jest z cewką poprzeczną T. Relaksacja jest często procesem biernym. Oczywiście, jeżeli kolejne stymulacje pojawiają się szybko po sobie, jony Ca uwolnione jako wynik pierwszej stymulacji nie mają czasu na powrót do siateczki. Układ kurczliwy jest wtedy w permanentnym skurczu, zwanym skurczem tężcowym [109].

Zastanawiano się również czy funkcjonalne różnice między mięśniami szybkimi i wolnymi mają podłoże w odmiennym działaniu sprzężenia elektromechanicznego [54]. Okazało się, że w zasadzie różnice te mogą tkwić w odmiennym rozwoju błon siateczki sarkoplazmatycznej [111]. Szczegółowe omówienie działania układów skurczowo-rozkurczowych w komórkach mięśniowych znajdzie czytelnik w artykułach przeglądowych, dotyczących również miogenezy [38, 182], które ukazały się w ostatnich latach w polskim piśmiennictwie [10, 35–37, 56, 95, 137].

Jednym ze schematycznych powiązań cech anatomicznych i fizjologicznych jako podstawy działania sprzężenia elektromechanicznego jest model Wallinga-de Jonge [161] (ryc. 13).



Ryc. 13. Model sprzężenia elektromechanicznego Wallinga-de Jonge [161]

CZYNNIKI WPLYWAJĄCE NA SPRĘŻENIE ELEKTROMECHANICZNE

Sprężenie elektromechaniczne stanowi ciąg wzajemnie ze sobą związanych i po sobie następujących zjawisk [69]. Mogą one ulegać w warunkach eksperymentalnych przerwaniu lub modyfikacji pod wpływem rozmaitych zmian fizycznych i chemicznych działających na poszczególne elementy tego łańcucha wypadków.

Jednym z działań jest zastosowanie na włókno mięśniowe roztworów hipertonicznych. Tłumią one odpowiedzi mechaniczne bez zmiany potencjału błonowego [80]. Mechanizm tego działania jest jeszcze nie znany.

Od dawna natomiast znane jest antagonistyczne działanie anestetyków miejscowych, takich jak prokaina czy tetrakaina w stosunku do odpowiedzi mechanicznych prowokowanych przez działanie kofeiny [13, 47, 91, 153]. Okazało się, że skurcze po kofeinie rozwijają się bez znacznej zmiany depolaryzacji błony komórkowej [59] oraz że rozwijają się nawet w czasie nieobecności jonów wapniowych w środowisku zewnętrznym. Wykazano, że kofeina uwalnia Ca^{2+} [150] ze zbiorników wewnątrzkomórkowych obniżając próg odpowiedzi mechanicznej [47, 70]. Zdolność tę do aktywowania elementów kurczliwych znoszą miejscowe anestetyki. Znane alkaloidy, takie jak kofeina i chinina [72], wywołują skurcze u zwierząt kręgowych, jak również u stawonogów. Uważa się też, że kofeina ma zdolność hamowania normalnego wychwyty jonów wapniowych przez siateczkę sarkoplazmatyczną [73].

Lokalne anestetyki [43, 105, 173] wywierają wpływ na sprężenie elektromechaniczne poprzez oddziaływanie na kanały wapniowe [6] blokując je po przedostaniu się do wnętrza włókien. Prawdopodobnie hamują one zarówno uwalnianie Ca^{2+} , jak i wychwytywanie tego jonu przez siateczkę sarkoplazmatyczną. W mięśniach raka prokaina wywołuje odwrócenie lokalnych odpowiedzi stopniowanych w potencjały czynnościowe typu wszystko albo nic, przy czym znika napięcie mięśni [173], dając rozbitcie sprężenia elektromechanicznego. Odwracanie odpowiedzi stopniowanych jest zjawiskiem znanym, wywołują go także m. in. jony barowe i strontowe [154]. Jak wykazały badania, kofeina należy do grupy środków hamujących fosfodwuesterazę, enzym odpowiedzialny za degradację cyklicznego AMP [94]. Istnieje również przypuszczenie, że kofeina i chinina mogą indukować relaksację układu kurczliwego, tak jak to ma miejsce w mięśniach gładkich, dzięki działaniu na dwa różne komponenty wapniowe w sprężeniu elektromechanicznym [72].

Badania wykazały [98], że na przeponie szczura działanie kofeiny dotyczy komórkowej puli wapnia, a nie wymienialnej frakcji jego jonu. Kiedy spontaniczne skurcze mięśnia gładkiego [134] są stłumione na

skutek działania kofeiny, to nagłe ochłodzenie powoduje przywrócenie odpowiedzi mechanicznej. Wiadomo też, że kofeina relaksuje mięśnie gładkie, natomiast stymuluje mięśnie szkieletowe i mięsień serca [84]. Kofeina zachowuje się antagonistycznie w stosunku do inaktywacji układu kurczliwego [132]. Inne badania wykazały, że w mięśniach raka przejściowość odpowiedzi mechanicznych po zastosowaniu tego środka świadczy o istnieniu niewrażliwego na kofeinę transportu Ca^{2+} w tych mięśniach. Analiza zmian w czasie relaksacji skurczów uzyskanych po kofeinie i zmiana płynu doprowadziły do wniosku, że układ transportujący Ca^{2+} jest umiejscowiony w sarkolemmie, a proces wydalania jonów wapniowych łączy w sobie wiązanie kationów na zewnątrz komórki, w szczególności Na^+ [122]. Niektórzy autorzy [29], badający zjawiska postsynaptyczne, donoszą, że kofeina zwiększa też wzrost przepuszczalności błony postsynaptycznej na synapsie nerwowo-mięśniowej dla jonów Ca^{2+} .

Istnieją doniesienia, że kationy trójwartościowe wiążą się na błonie komórkowej w miejscach normalnie okupowanych przez Ca^{2+} [85], jak również na błonie wewnętrznej w siateczce sarkoplazmatycznej. Znana jest zależność między promieniem jonowym a stopniem hamowania kanału Ca^{2+} . Zależność ta przedstawia się różnie w tych dwu błonach. Wydaje się jednak, że są one w sposób wybiórczy uwrażliwione na Ca^{2+} i na jony trójwartościowe, które mają podobny promień jonowy [42]. Lantan wykazuje działanie blokujące także na skurcze mięśni mięczaków [110], nie pozostając również bez wpływu na przenoszenie nerwowo-mięśniowe u owadów, gdzie prawdopodobnie również blokuje kanał wapniowy [118]. Dalsze badania prowadzone przy użyciu tego trójwartościowego jonu wykazały, że działanie lantanu dotyczy sarkolemmy [94] w mięśni szkieletowym, jak również w mięśni gładkim. Jon ten wykazuje silnie hamujący wpływ na normalne wychwytywanie Ca^{2+} w mięśniach gładkich szczurów z płynu otaczającego preparat [72].

Doświadczenia Huddarta i Saacila [72] przeprowadzone na mięśniach gładkich szczurów świadczą o podobnym działaniu lantanu i chininy na ten preparat. Powodują one relaksację i stymulują wychwytywanie Ca^{2+} . Autorzy ci przypuszczają, że miejscem działania może być tu plazmolema oraz że chinina może oddziaływać na fosfodwuesterazę powodując wzrost poziomu cyklicznego AMP w komórce, który wtórnie uwalnia Ca^{2+} z miejsc wiązania w plazmolemie.

Jednym z działań ingerujących w sprzężenie elektromechaniczne jest modyfikacja potencjału czynnościowego lub przesunięcie poziomu odpowiedzi mechanicznej. Według Huddarta [69] próg odpowiedzi mechanicznej określa poziom potencjału błonowego, przy którym rozpoczyna się sprzężenie elektromechaniczne, tzn. wielkość depolaryzacji potrzeb-

nej do zapoczątkowania aktywacji układu kurczliwego. Znanym środkiem zmieniającym potencjał błony jest weratrydyna [9, 130], która zwiększa przewodnictwo dla jonów sodowych. Jest ona toksycznym alkaloidem i wchodzi w skład mieszaniny alkaloidów zwanej weratryną otrzymanej z nasion sabadyli (*Schoenocaulon officinale* — *Liliaceae*).

Podobny wpływ na potencjał błony mięśniowej wykazuje alkaloid weratryna [90, 160], ponieważ potencjał czynnościowy zależy przeważnie od ruchu jonów sodowych i potasowych przez błonę [40]. Dodanie weratryny do kąpieli wywołuje we włóknach mięśniowych żaby [19] znaczny wzrost amplitudy i czasu trwania potencjału czynnościowego. Działanie tego środka znosi tetrodotoksyna, która wybiórczo hamuje kanały sodowe w błonie [19, 67, 88]. Weratryna wydłuża czas skurczu we włóknach mięśniowych żaby [88]. Potencjał czynnościowy typu wszystko albo nic, jaki jest charakterystyczną odpowiedzią elektryczną komórek mięśniowych zwierząt kręgowych [177], może ulegać przekształceniu w odpowiedź stopniowaną na skutek zaburzenia mechanizmu transportującego jony przez błonę komórkową. Podobnie odpowiedzi stopniowane włókien mięśniowych zwierząt bezkręgowych mogą zmienić się w odpowiedzi typu wszystko albo nic pod wpływem niektórych jonów, np. barowych [124].

Znane są środki blokujące sprzężenia elektromechaniczne działające antagonistycznie w stosunku do jonów wapniowych. Należy tu verapamil (5[(3,4-dimethoxyphenethyl)-methylamino]-2-iso-propylvaleronitrile) [26], jego pochodna d-600 oraz prenylamina [14, 58, 158, 159]. Stosowano również spośród antybiotyków prymicynę blokującą kanały potasowe w stanie spoczynku, w przeciwieństwie do bromku czteroetyloamonowego (TEA), który atakuje kanał potasowy w czasie ujawniania się w błonie komórkowej właściwości prostowniczych [92]. Skutkiem działania prymicyny jest depolaryzacja wywołująca skurcze, a następnie relaksacja układu kurczliwego. Działanie to ogranicza się do sarkolemy włączając cewkę poprzeczną T, ponieważ kofeina podana w obecności tego antybiotyku może wywołać jeszcze skurcze wskazując na to, że siateczka sarkoplazmatyczna pozostała nie uszkodzona. W taki destrukcyjny sposób można by tłumaczyć działanie innych antybiotyków na błony komórek mięśniowych [117].

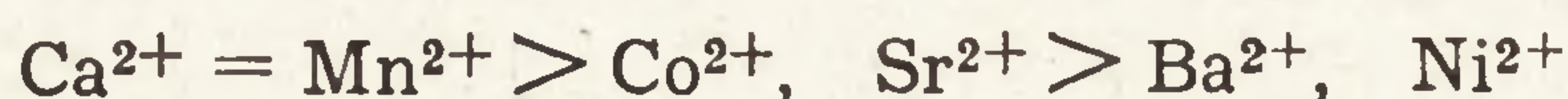
Również zmiany temperatury nie pozostają bez wpływu na sprzężenia elektromechaniczne [21]. Nagłe oziębienie mięśnia szkieletowego żaby, pozostającego w roztworze zawierającym kofeinę, wywołuje odpowiedź mechaniczną [133]. Skurcze mięśni żaby wywołane podwyższeniem stężenia jonów potasowych ulegają zmniejszeniu w temperaturze obniżonej do 3°C i czas odpowiedzi ulega wydłużeniu [21]. W odniesie-

niu do włókien mięśniowych raka parametry błonowe w zmiennej temperaturze szczegółowo badała Poledna i wsp. [125].

Jony manganowe wykazują działanie hamujące potencjały czynnościowe, u podstawy których leży wzrost przepuszczalności dla Ca^{2+} we włóknach mięśniowych raka i pąkla. Podobny skutek wywierają one na mięśni szkieletowym żaby. Jak sugeruje Oota i wsp. [121], jony te hamują sprzężenie elektromechaniczne działając na cewkę poprzeczną T i być może na zbiorniki końcowe siateczki sarkoplazmatycznej.

Kanały wapniowe, służące przenoszeniu prądu wapniowego, mogą być wykorzystane przez inne kationy, które co prawda w warunkach fizjologicznych występują w śladowych ilościach, to jednak w układach eksperymentalnych służą jako modele wyjaśniające szczegóły mechanizmu fizjologicznego [145].

Według Mahrla [101] jony Ca mogą być podstawione przez różne kationy dwuwartościowe w następującej kolejności:



Jak wykazały liczne badania, szereg kationów, takich jak: cynk, stront, kadm, bar, nikiel i miedź, wykazuje na ogół działanie wzmacniające napięcie mięśni szkieletowych [69, 79, 149, 170, 179, 181]. Aniony zaś, jak wiadomo, obniżają poziom progu odpowiedzi mechanicznej mięśnia [135], potęgując skurcze mięśni szkieletowych żaby. U myszy zaobserwowano silniejsze efekty działania anionów takich jak np. NO^- i SCN^- [17, 66, 79].

Nową metodę do badania sprzężenia elektromechanicznego przedstawił del Castillo i de Motta [39] polegającą na odwracalnym rozerwaniu tego sprzężenia przez amid kwasu mrówkowego. Związek ten nie wpływa na czynność nerwu ruchowego. Eksperymentalnie wprowadza się roztwory hipertoniczne tej substancji i uzyskuje efekt podobny do działania glicerolu.

Biorąc pod uwagę działanie estrogenów na mięśnie gładkie, polegające na hamowaniu wychwytu jonów wapniowych przez mitochondria, Khan [82] zbadał wpływ dwuetylostilboestrolu (DES) na regulację jonów wapniowych w mięśniach szkieletowych w czasie skurczu. Środek ten, jak się okazało, znacznie potęguje odpowiedzi mechaniczne pojedynczych włókien mięśniowych żaby. Działanie antagonistyczne w stosunku do DES wykazuje sól sodowa 1[[5-(p-nitrofenylo)-furfurylideno]-amino]-hydantoiny (DaNA), którą od niedawna coraz częściej stosuje się w badaniach nad sprzężeniem elektromechanicznym. DaNa wywołuje relaksację układu kurczliwego [28, 30, 43, 60, 63]. Działanie tego środka, chociaż niezbyt szczegółowo jeszcze wyjaśnione, polega prawdopodobnie na

zmianie ruchu jonów wapnia wewnątrz włókna mięśniowego, a mianowicie na obniżaniu poziomu nie związanego Ca^{2+} w obrębie komórki.

Jak wiadomo, sarkolemma i błony siateczki sarkoplazmatycznej spełniają zasadniczo różną funkcję w procesie sprzężenia elektromechanicznego. Podejrzewając istnienie korelacji między składem tych błon pod względem zawartości tłuszczów a ich molekularną organizacją, Marhla i Zachar zbadali porównawczo tego rodzaju błony w pojedynczych włóknach mięśnia szkieletowego królika i raka [102]. Jeżeli chodzi o sarkolemmę nie znaleźli oni większych różnic, jedynie błony siateczki sarkoplazmatycznej odbiegały od siebie. Błony komórkowe raka i królika generują zasadniczo odmienne pod względem typu potencjały czynnościowe, a mianowicie powstawanie ich u raka zależy od obecności jonów wapniowych, natomiast u królika od jonów sodowych. Ten sam skład tłuszczów w tych błonach, jak sądzą autorzy, sugeruje, że mechanizm odpowiedzi ma miejsce raczej w jakiejś innej części błony niż w warstwie tłuszczowej.

Modyfikacja sprzężenia elektromechanicznego następuje również przez zniekształcenie cewki poprzecznej T. Wykorzystanie tego rodzaju preparatów, jak również włókien mięśniowych z eksperymentalnie zniszczoną błoną komórkową [43], stwarzających obraz raczej niefizjologiczny, może — jak już wspomniano — ujawnić jak najbardziej fizjologiczne cechy tego procesu. Właśnie z tego powodu wielu autorów posługuje się tą metodą [1, 34, 43, 123, 164, 171, 174–176]. Polega ona na moczeniu włókien mięśniowych w 400 mmol roztworze glicerolu w płynie fizjologicznym. Następnie preparat umieszcza się w samym płynie fizjologicznym. Tak przygotowany mięsień nie daje odpowiedzi mechanicznej nawet wtedy, kiedy wykazuje potencjały czynnościowe. Jest to wynikiem zniszczenia cewki poprzecznej T.

Warto tu także wspomnieć o wykorzystaniu ligandów. Wykazują one bowiem aktywność tzw. jonoforów wapniowych w sztucznych błonach fosfolipidowych. Szereg syntetycznych ligandów ma zdolność do transportu wapnia przez błony erytrocytów i siateczki sarkoplazmatycznej [24].

Istnieje wiele związków chemicznych, głównie pochodzenia bakteryjnego lub grzybowego, które pozwalają na przejście różnych jonów przez błony. Jest to przejście wybiórcze w stosunku do danego rodzaju jonu lub może obejmować szerokie spektrum rodzajów. Związki te tworzą kompleksy z jonami i wiązaniu temu tworzący zmianę konformacyjną cząsteczki. Skutkiem działania tych związków jest torowanie transportu jednego lub większej liczby kationów, które w tych samych warunkach mogą doprowadzić do przesunięcia potencjału błonowego. Innymi słowy, tworzą one w błonie kanały jonowe [87]. Ostatnio zsyntety-

zowano szereg jonoforów należących do dwu różnych klas: jednych nie wytwarzających ładunku elektrycznego zdolnych do naładowania się przez wiązanie się z jonami oraz innych mających ładunek elektryczny, ale ulegających neutralizacji pod wpływem wiązania się z jonami. Wśród największej liczby wybiórczych jonoforów szczególne zainteresowanie zdobyły sobie antybiotyki X-537A i A23187, które wykazują preferencję dla Ca^{2+} i innych jonów dwuwartościowych [24, 41, 62]. Zastosowanie ich stało się narzędziem do badania przemieszczenia Ca^{2+} w błonach.

Inne podejście metodyczne polega na umieszczeniu mięśni języka żaby [48] w hipertonicznym roztworze mocznika wywołując zablokowanie skurczu bez uszkodzenia cewki poprzecznej T. Powtórne zanurzenie preparatu w roztworze fizjologicznym daje rozszerzenie połączenia w triadach, co zmniejsza ilość Ca^{2+} osiagających zbiorniki końcowe podczas potencjału czynnościowego i zachodzi hamowanie skurczu.

Lek 4-aminopirydyna (4-AP), stosowany przeciw paraliżowi wywołanemu przez kurarę, u żaby zwiększa amplitudę skurczu niezależnie od stężenia Ca^{2+} na zewnątrz. Uważa się, że spowodowane to jest wzrostem uwalniania wapnia aktywującego do przestrzeni otaczającej układ kurczliwy poprzez przedłużenie potencjału czynnościowego [83].

Metaboliczne zatrucie włókien mięśniowych żaby [162] również jest przyczyną zmiany przewodnictwa dla jonów, co odbija się na funkcjonowaniu sprzężenia elektromechanicznego.

Należy tutaj wspomnieć, że niektórzy autorzy sugerują istnienie swoistej bariery jonowej u wylotu cewek poprzecznych T w mięśniach owadów. Bariera ta może być przyczyną braku skuteczności wielu środków o działaniu przekaźników w przenoszeniu nerwowo-mięśniowym [76, 116, 124].

Różne są sposoby prowadzące do rozstrzygnięcia ogólnego schematu omawianego procesu. Między innymi zniszczenie budowy siateczki sarkoplazmatycznej służy do zaburzenia wychwytu jonów wapniowych przez błonę. Podobnie modyfikacja pompy wapniowej w siateczce sarkoplazmatycznej, dzięki zastosowaniu środków rozrywających wiązania Ca^{2+} w miejscach zaczepów lub środki, które wręcz konkurują z tymi jonami, jeśli chodzi o te wiązania, są dalszym krokiem do rozwinięcia zasadniczego schematu omawianego procesu.

Podsumowując można powiedzieć, że chociaż mechanizm, dzięki któremu dochodzi do aktywacji aparatu kurczliwego, nie jest jeszcze w pełni poznany, jest to zagadnienie będące przedmiotem dociekań wielu pracowni biofizycznych i biochemicznych i szczególnie ostatnio napływa coraz więcej informacji o jego charakterze. Nie ulega wątpliwości, że rolę przekaźnika w sprzężeniu elektromechanicznym spełnia jon wapniowy. I tutaj uwaga badaczy koncentruje się wokół sposobu przecho-

dzenia tego jonu drogą kanałów wapniowych w błonie, jak również strukturą układów białkowych odpowiedzialnych za funkcjonowanie kanałów jako drogi transportu i układów wiążących wolny wapń czy to w sarkolemmie, czy w błonach siateczki sarkoplazmatycznej. Z drugiej strony nie można pominąć roli, jaką w przenoszeniu informacji odgrywają przesunięcia ładunków elektrycznych i oddziaływanie ruchu ładunków na konformacyjne zmiany w układzie białek. Stanowią one zespół czynników uczestniczących w przetworzeniu energii elektrycznej na mechaniczną, być może z uwzględnieniem ogniwa chemicznego [144]. Z całą pewnością zespolone badania biofizyczno-biochemiczne na poziomie molekularnym ujawnią szczegóły mechanizmu przekształcania informacji w układach biologicznych i należy mieć nadzieję, że wyjaśnienie obejmie kluczowe ogniwa przetwarzania w połączeniach międzybłonowych między komórkami, jak również między błonami wewnątrzkomórkowymi.

Autorka składa serdeczne podziękowanie prof. drowi hab. L. Janiszewskiemu za uwagi przy opracowaniu tego artykułu.

LITERATURA

- [1] ABBOTT R. H., The effect of fibre length and calcium ion concentration on the dynamic response of glycerol extracted insect fibrillar muscle, *J. Physiol.*, **231**: 195–208, 1973.
- [2] ADELSTEIN R. S., EISENBERG F., Regulation and kinetics of the actin-myosin ATP interaction, *Ann. Rev. Biochem.*, **49**: 921–956, 1980.
- [3] AIDLEY D. J., The organization of muscle cells, [w:] *The Physiology of Excitable Cells*, Cambridge University Press 1971, 191–236.
- [4] AIDLEY D. J., Excitation-contraction coupling and mechanical properties, [w:] *Insect muscle*, red. P.N.R. Usherwood, Academic Press, London, New York, San Francisco 1975, 337–356.
- [5] ALLEN G., TRINNAMAN B. J., GREEN N. M., The primary structure of the calcium ion-transporting adenosine triphosphate protein of rabbit skeletal sarcoplasmic reticulum, *Biochem. J.*, **187**: 591–616, 1980.
- [6] ALMERS W., Local anesthetics and excitation-contraction coupling in skeletal muscle. Effects on a Ca^{++} -channel, *Biophys. J.*, **18**: 355–357, 1977.
- [7] ASHLEY C. C., MOISESCU D. G., Model for the action of calcium in muscle, *Nature New Biol.*, **237**: 208–211, 1972.
- [8] BARRETT J. N., BARRETT E. F., Excitation-contraction coupling in skeletal muscle: Blockade by high extracellular concentration of calcium buffers, *Science*, **200**: 1270–1272, 1978.
- [9] BARTELS E., ROSENBERRY T. L., Modification of electroplax excitability by veratridine, *Biochim. Biophys. Acta*, **298**: 973–985, 1973.
- [10] BARYŁKO B., Charakterystyka i znaczenie białek wiążących wapń, *Post. Biochem.*, **19**: 361–376.

- [11] BAYLOL S. M., OETLIKER H., Birefringence experiments on isolated skeletal muscle fibres suggest a possible signal from the sarcoplasmic reticulum, *Nature*, **253**: 97-101, 1975.
- [12] BIANCHI C. P., Pharmacology of excitation-contraction coupling in muscle, Introduction: statement of the problem, *Fed. Proceed*, **28**: 1624-1627, 1969.
- [13] BITTAR E. E., HIFT H., HUDDART H., TONG E., The effects of caffeine on sodium transport, membrane potential, mechanical tension and ultrastructure in barnacle muscle fibres, *J. Physiol.*, **242**: 1-34, 1974.
- [14] BONDI A., Effects of verapamil on excitation-contraction coupling in frog sartorius muscle, *J. Pharmacol. Exp. Therapeut.*, **205**: 49-57, 1978.
- [15] BORKOWSKA M. J., Geneza potencjału spoczynkowego w świetle struktury i czynności błony, *Postępy Biol. Kom.*, **4**: 185-220, 1977.
- [16] BOZLER E., Smooth muscle physiology, past and future, *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B*, **265**: 3-6, 1973.
- [17] BRUST M., Agents which affect excitation-contraction coupling in normal and dystrophic muscle, *Fed. Proceed.*, **28**: 1649-1656, 1969.
- [18] BUREŠ J., PETRÁŇ M., ZACHAR J., Electrophysiological methods in biological research, Academia Publishing House of the Czechoslovak Academy of Sci., Prague 1967, 385.
- [19] CAILLE J., ILDEFONSE M., ROUGIER C., Action of veratrine on the excitation-contraction coupling of frog twitch muscle fibre, *Proceed. Intern. Union Physiol. Sci.*, **28 Intern. Congress, Budapest 1980**, Abstract 1021, **14**: 346.
- [20] CAPUTO C., The time course of potassium contractures of single muscle fibres, *J. Physiol.*, **223**: 483-505, 1970.
- [21] CAPUTO C., The effect of low temperature on the excitation-contraction coupling phenomena of frog single muscle fibres, *J. Physiol.*, **223**: 461-482, 1972.
- [22] CAPUTO C., Ca^{++} replacement by Ni^{++} in excitation-contraction coupling, *Proceed. Intern. Union Physiol. Sci.*, **28 Intern. Congress Budapest 1980**, Abstract 1032, **14**: 347.
- [23] CAPUTO C., DE BOLANOS P. F., Membrane potential, contractile activation and relaxation rates in voltage clamped short muscle fibres of the frog. *J. Physiol.*, **289**: 175-189, 1979.
- [24] CARONI P., GAZZOTTI P., VUILLEUMIER P., SIMON W., CARAFOLI E., Ca^{2+} transport mediated by a synthetic neutral Ca^{2+} -ionophore in biological membrane, *Biochim. Biophys. Acta*, **470**: 437-445, 1977.
- [25] CARVALHO C. A. M., CARVALHO A. P., Fluorimetric monitoring of calcium binding to sarcoplasmic reticulum membranes, *Biochim. Biophys. Acta*, **468**: 21-30, 1977.
- [26] CHIARANDINI D. J., BENTLEY P. J., The effects of verapamil on metabolism and contractility of the toad skeletal muscle. *J. Pharmac. Exp. Therapeut.*, **186**: 52-59, 1973.
- [27] CHIARANDINI D. J., SANCHEZ J. A., STEFANI E., Effect of calcium withdrawal on mechanical threshold in skeletal muscle fibres of the frog., *J. Physiol.*, **303**: 153-163, 1980.
- [28] CHIPMAN M., KAUL S., LAMBIE M., Efficacy of dantrolene sodium in the treatment of spasticity, *Diseases of nervous system*, **35**: 427-431, 1974.
- [29] COCHRANE D. E., PARSONS R. L., The interaction between caffeine and

- calcium in the desensitization of muscle postjunctional membrane receptors, *J. gen. Physiol.*, **59**: 437-461, 1972.
- [30] COLTON C. A., COLTON J. S., The action of dantrolene sodium on the lobster neuromuscular junction, *Comp. Biochem. Physiol.*, **64 C**: 153-156, 1979.
- [31] COSTANTIN L. L., Electrical properties of the transverse tubular system, *Federat. Proceed.*, **34**: 1390-1394, 1975.
- [32] COSTANTIN L. L., TAYLOR S. R., Graded activation in frog muscle fibers, *J. gen. Physiol.*, **61**: 424-443, 1973.
- [33] CORNELIUS F., The regulation of tension in a chemically skinned molluscan smooth muscle. Effect of Mg^{2+} on the Ca^{2+} -activated tension generation, *J. gen. Physiol.*, **75**: 709-725, 1980.
- [34] DAVEY D. F., DULHUTNY A. F., FATKIN D., Glycerol treatment in mammalian skeletal muscle, *J. Membrane Biol.*, **53**: 223-233, 1980.
- [35] DĄBROWSKA R., Systemy regulujące cykl skurczowo-rozkurczowy mięśni, *Postępy Biochem.*, **22**: 467-481, 1976.
- [36] DĄBROWSKA R., DRABIKOWSKI W., Regulacja cyklu skurczowo-rozkurczowego mięśni szkieletowych, *Postępy Biochem.*, **16**: 405-420, 1970.
- [37] DĄBROWSKA R., DRABIKOWSKI W., Molekularne podstawy skurczu mięśni, *Postępy Biochem.*, **19**: 343-359, 1973.
- [38] DĄBROWSKA R., SOSIŃSKI J., Białka aparatu kurczliwego w różnicującym się mięśniu szkieletowym, *Postępy Biochem.*, **25**: 565-587, 1979.
- [39] DEL CASTILLO J., DE MOTTA G. E., A new method for excitation-contraction uncoupling in frog skeletal muscle, *J. Cell Biol.*, **78**: 782-784, 1978.
- [40] DESMEDT J. E., Electrical activity and intracellular sodium concentration in frog muscle, *J. Physiol.*, **121**: 191-205, 1953.
- [41] DEVORE D., NASTUK W. L., Effects of "calcium ionophore" X537A on frog skeletal muscle, *Nature*, **253**: 644-646, 1975.
- [42] DOS REMEDIOS C. G., Ionic radius selectivity of skeletal muscle membranes, *Nature*, **270**: 750-751, 1977.
- [43] EBASHI S., Excitation-contraction coupling, *Ann. Rev. Physiol.*, **38**: 293-313, 1976.
- [44] ENDO M., Calcium release from the sarcoplasmic reticulum, *Physiol. Rev.*, **57**: 71-108, 1977.
- [45] ELLIOTT G. F., LOWY J., Organization of actin in a mammalian smooth muscle, *Nature*, **219**: 156-157, 1968.
- [46] FABIAN F., MASON D. T., WIKMAN-COFFELT J., Calcium binding properties of cardiac and skeletal muscle myosin, *FEBS Letters*, **81**: 381-385, 1977.
- [47] FEINSTEIN M. B., PAIMRE M., Pharmacological action of local anesthetics on excitation-contraction coupling in striated and smooth muscle, *Fed. Proceed.*, **28**: 1643-1648, 1969.
- [48] FRANK G. B., TREFFERS R. C., Calcium antagonism of the block in excitation-contraction coupling produced by a urea exposure-removal treatment, *Jap. J. Physiol.*, **27**: 215-224, 1977.
- [49] FRANZINI-ARMSTRONG G., Membrane particles and transmission at the triad, *Fed. Proceed.*, **34**: 1382-1389, 1975.
- [50] FUCHS F., BRIGGS F. N., The site of calcium binding in relation to the activation of myofibrillar contraction, *J. gen. Physiol.*, **58**: 655-676, 1968.
- [51] FOULKS J. G., MILLER J. A. D., PERRY F. A., Restoration of the ability

- of frog skeletal muscle to develop potassium contractures in calcium-deficient media, *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, **51**: 335-343, 1973.
- [52] FOULKS J. G., MILLER J. A. D., PERRY F. A., Repolarization-induced reactivation of contracture tension in frog skeletal muscle, *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, **51**: 324-334, 1973.
- [53] GATEV V., IVANOV I., Excitation-contraction latency in human muscles, II Intern. Symp. on Motor Control, Varna, 3-7 X 1972, 7-10.
- [54] GILLY W. F., HUI C. S., Contractile activation in slow and twitch muscle fibres of the frog, *Nature*, **266**: 186-188, 1977.
- [55] GONZALEZ-SERRATOS H., GARCIA M. C., Changes of active state and tension development during muscle fatigue, Proc. Intern. Union Physiol. Sci., 28 Intern. Congress, Budapest 1980, Abstract 1584, **44**: 440.
- [56] GRABAREK Z., KUŹNICKI J., Homologiczne białka wiążące wapń, *Postępy Biochem.*, **26**: 209-224, 1980.
- [57] GRUNDFEST H., The role of calcium in excitation-contraction coupling, [w:] *Physiology of Smooth Muscle*, red. E. Bülbring i M. F. Shuba, Raven Press, New York 1976, 163-173.
- [58] HAEUSLER G., Differential effect of verapamil on excitation-contraction coupling in smooth muscle and excitation-secretion coupling in adrenergic nerve terminals, *J. Pharmacol. Exp. Therapeut.*, **180**: 672-682, 1972.
- [59] HAGIWARA S., HENKART M. P., KIDOKORO Y., Excitation-contraction coupling in amphioxus muscle cells, *J. Physiol.*, **219**: 233-251, 1971.
- [60] HAINAUT K., BRUNKO E., DESMEDT J. E., Effect of dantrolene sodium on skeletal muscle contraction, *Arch. Intern. Physiol. Biochim.*, **83**: 162-163, 1975.
- [61] HAINAUT K., BRUNKO B., KATS R., BOURGUET M., DESMEDT J. E., Aequorin and intracellular calcium movements in skeletal muscle fibres, *Arch. Intern. Physiol. Biochim.*, **83**: 15-18, 1975.
- [62] HAINAUT K., DESMEDT J. E., Calcium ionophore A23187 potentiates twitch and intracellular calcium release in single muscle fibres, *Nature*, **252**: 407-408, 1974.
- [63] HAINAUT K., DESMEDT J. E., Effect of dantrolene sodium on calcium movements in single muscle fibres, *Nature*, **252**: 728-730, 1974.
- [64] HODGKIN A. L., HOROWICZ P., The effect of sudden changes in ionic concentrations on the membrane potential of single muscle fibres, *J. Physiol.*, **153**: 370-385, 1960.
- [65] HODGKIN A. L., HOROWICZ P., Potassium contractures in single muscle fibres, *J. Physiol.*, **153**: 386-403, 1960.
- [66] HODGKIN A. L., HOROWICZ P., The effect of nitrate and other anions on the mechanical response of single muscle fibres, *J. Physiol.*, **153**: 404-412, 1960.
- [67] HORACKOVA M., VASSORT G., Excitation-contraction coupling in frog heart, *Pflügers Arch.*, **352**: 291-302, 1974.
- [68] HÖRL W. H., JENNISSEN H. P., HEILMEYER L. M. G., Jr., Evidence for the participation of a Ca²⁺-dependent protein kinase and a protein phosphatase in the regulation of the Ca²⁺ transport ATPase of the sarcoplasmic reticulum. 1. Effect of inhibitors of the Ca²⁺-dependent protein kinase and protein phosphatase, *Biochem.*, **17**: 759-766, 1978.
- [69] HUDDART H., Excitation-contraction coupling and relaxation, [w:] *The*

- Comparative Structure and Function of Muscle, Pergamon Press, Oxford, New York, Toronto, Sydney 1975, 319-343.
- [70] HUDDART H., ABRAM R. G., Modification of excitation-contraction coupling in locust skeletal muscle induced by caffeine, *J. Exp. Zool.*, **171**: 49-58, 1969.
- [71] HUDDART H., OATES K., Ultrastructure of stick insect and locust skeletal muscle in relation to excitation-contraction coupling, *J. Insect Physiol.*, **16**: 1467-1483, 1970.
- [72] HUDDART H., SAAD K. H. M., Quinine and lanthanum effect on contractility and calcium movements of rat ileal smooth muscle, *Gen. Pharmac.*, **8**: 341-347, 1977.
- [73] HUDDART H., WILLIAMS A. J., The effect of caffeine and quinine on calcium uptake by sarcoplasmic reticulum isolated from crustacean skeletal muscle in relation to the disruption of excitation-contraction coupling, *J. comp. Physiol.*, **94**: 331-338, 1974.
- [74] HURWITZ L., JOINER P. D., Excitation-contraction coupling in smooth muscle, *Fed. Proceed.*, **28**: 1629-1633, 1969.
- [75] HUXLEY H. E., The mechanism of muscular contraction, *Science*, **164**: 1356-1366, 1969.
- [76] JANISZEWSKI L., OLSZEWSKA E., BORKOWSKA J., Effect of glutamate and 5-hydroxytryptamine on neuromuscular transmission in *Acheta domesticus* and *Tenebrio molitor.*, *Bull. Acad. Pol. Sci.*, **26**: 561-565, 1978.
- [77] JANISZEWSKI L., OLSZEWSKA E., BORKOWSKA M., The effect of mono- and divalent cations on the electrophysiological characteristics of the insect muscle fibres, 28 Intern. Congress Physiol. Sci. Budapest 1980, Abstract 1894, 491.
- [78] JOSEPHSON R. K., Extensive and intensive factors determining the performance of striated muscle, *J. Exp. Zool.*, **194**: 135-153, 1975.
- [79] KANNO Y., MAETANI T., SHIBA Y., MUNEOKA Y., Effect of "twitch potentiators" on the responses of muscle skeletal muscle, *Proc. Intern. Union Physiol. Sci.*, 28 Intern. Congress Budapest 1980, Abstract 1956, **14**: 502.
- [80] KAWATA H., KAWAGOE K., TATEYAMA I., Effects of osmolarity change on the excitation-contraction coupling of bullfrog ventricle, *Jap. J. Physiol.*, **24**: 587-603, 1974.
- [81] KENDRICK-JONES J., Role of myosin light chains in calcium regulation, *Nature*, **249**: 631-634, 1974.
- [82] KHAN A. R., Effect of diethyl-stilboestrol on single fibres of frog skeletal muscle, *Acta Physiol. Scand.*, **106**: 69-73, 1979.
- [83] KHAN A. R., EDMAN K. A. P., Effect of 4-aminoparidine on the excitation-contraction coupling in frog and rat skeletal muscle, *Acta Physiol. Scand.*, **105**: 443-452, 1979.
- [84] KHANNA K. L., RAO G. S., CORNISH H. H., Metabolism of caffeine-³H in the rat, *Toxicology and App. Pharmacol.*, **23**: 720-730, 1972.
- [85] KIDOKORO Y., Sodium and calcium components of the action potential in a developing skeletal muscle cell line, *J. Physiol.*, **244**: 145-159, 1975.
- [86] KIRBY A. C., Frog tonic muscle fibers: extracellular calcium and excitation-contraction coupling, *Am. J. Physiol.*, **219**: 1446-1450, 1970.
- [87] KOTYK A., JANÁČEK K., Transport of ions, [w:] A. Kotyk, K. Janáček, Membrane transport, Academia Praha, 1977, **5**: 243-305.
- [88] KOVACS T., NAGY M., SZABO B., SZIRMAI L., Effect of veratrine on the

- mechanical and electrical reactions of fast and slow mammalian muscles, *Acta Physiol. Acad. Sci. Hung.*, **43**: 179-186, 1973.
- [89] KOVACS L., RIOS E., SCHNEIDER M. F., Calcium transients and intramembrane charge movement in skeletal muscle fibres, *Nature*, **279**: 391-396, 1979.
- [90] KOVACS T., SZABO B., VARGA E., Effect of veratrine on the ^{24}Na exchange of frog sartorius, *Acta Physiol. Acad. Sci. Hung.*, **43**: 167-178, 1973.
- [91] KOVACS L., SZÜCS G., Effect of caffeine on calcium transients in voltage-clamped skeletal muscle fibres, *Proc. Intern. Union Physiol. Sci.*, 28 Intern. Congress Budapest 1980, Abstract 2103, **14**: 526.
- [92] KÖVER A., GESZTELYI I., KONYA L., SZABOLCS M., The effect of primumycin on excitation-contraction coupling in frog skeletal muscle, *Acta Physiol. Acad. Sci. Hung.*, **54**: 405-414, 1979.
- [93] LAKSHMINARAYANAI AH N., BIANCHI C. P., Membranes, ions, and drugs, [w:] *Advances in General and Cellular Pharmacology*, 2, red. T. Narahashi i C. P. Bianchi, Plenum Press 1977, 1-70.
- [94] LANGER C. A., Heart: Excitation-contraction coupling, *Ann. Rev. Physiol.*, **35**: 55-86, 1973.
- [95] LEHNINGER A. L., *Bioenergetyka*, Warszawa 1978, PWN.
- [96] LEWARTOWSKI B., *Fizjologia serca*, [w:] *Fizjologia człowieka z elementami fizjologii klinicznej*, red. W. Traczyk, A. Trzebski, PZWL, Warszawa 1980, **17**: 450-501.
- [97] LEWARTOWSKI B., *Fizjologia mięśni poprzecznie prążkowanych*, [w:] *Fizjologia człowieka z elementami fizjologii klinicznej*, red. W. Traczyk, A. Trzebski, PZWL, Warszawa 1980, **4**: 51-76.
- [98] LÜLLMANN H., PREUNER J., SUNANO S., On the interaction of acetylcholine, coffeine and altered Ca-concentrations upon the excitation-contraction coupling in chronically denervated skeletal muscle, *Pflügers Arch.*, **352**: 279-290, 1974.
- [99] MADEIRA V. M. C., A rapid and ultrasensitive method to measure Ca^{2+} movements across biological membranes, *Biochem. Biophys. Res. Communications*, **64**: 870-876, 1975.
- [100] MADEIRA V. M. C., Proton gradient formation during transport of Ca^{2+} by sarcoplasmic reticulum, *Archives Biochem. Biophys.*, **185**: 316-325, 1978.
- [101] MAHRLA Z., Properties of Ca stimulated ATPase from the sarcotubular fraction of the crayfish muscle, *Physiol. bohemoslov.*, **24**: 452, 1975.
- [102] MAHRLA Z., ZACHAR J., Lipid composition of isolated external and internal skeletal muscle membranes, *Comp. Biochem. Physiol.*, **47 B**: 493-502, 1974.
- [103] MATHIAS R. T., EISENBERG R. S., VALDIOSERA R., Electrical properties of frog skeletal muscle fibers interpreted with a mesh model of the tubular system, *Biophys.*, **17**: 57-93, 1977.
- [104] MATHIAS R. T., LEVIS R. A., EISENBERG R. S., Electrical models of excitation-contraction coupling and charge movement in skeletal muscle, *J. gen. Physiol.*, **76**: 1-31, 1980.
- [105] MATSUMURA M., The rate of action of calcium on the electrical and mechanical responses of the crayfish muscle fibers, *Jap. J. Physiol.*, **28**: 75-87, 1978.
- [106] MEYERS R. S., BIDLACK J. M., Excitation-contraction coupling in frog conus arteriosus, *Comp. Biochem. Physiol.*, **56 A**: 295-298, 1977.

- [107] MOBLEY B. A., LEUNG J., EISENBERG R. S., Longitudinal impedance of single frog muscle fibers, *J. gen. Physiol.*, **65**: 97-113, 1975.
- [108] MOMMAERTS W. F. H. M., Excitation and response in muscular tissue, *Ann. N. York Acad. Sci.*, **185**: 425-432, 1971.
- [109] MOREL J. E., PINSET-HÄRSTRÖM J., Ultrastructure of the contractile system of striated skeletal muscle and the processes of muscular contraction. II. Releasing system and mechanisms of muscular contraction, *Biomed.*, **22**: 186-194, 1975.
- [110] MUNEOKA Y., TWAROG B., Lanthanum block of contraction and relaxation in response to serotonin and dopamine in molluscan catch muscle, *J. Pharmacol. Exp. Therapeut.*, **202**: 601-609, 1977.
- [111] NASLEDOV G. A., ZACHAR J., ZACHAROVA D., The ionic requirements for the development of contracture in isolated slow muscle fibres of the frog, *Physiol. bohemoslov.*, **15**: 293-306, 1966.
- [112] NEUMANN E., BERNHARDT J., Physical chemistry of excitable biomembranes, *Ann. Rev. Biochem.*, **46**: 117-141, 1977.
- [113] NOBLE D., Excitation-contraction coupling role of ionic currents and of ionic pumps, *J. de Physiol.*, **76**: 89-97, 1980.
- [114] OLSZEWSKA E., BORKOWSKA M. J., Preparat izolowanego mięśnia owada. *Przegląd Zool.*, **24**: 81-89, 1980.
- [115] OLSZEWSKA E., BORKOWSKA M., JANISZEWSKI L., The effect of Ca^{2+} and Mg^{2+} on the neuromuscular transmission in *Acheta domesticus* and *Tenebrio molitor*, *Bull. Acad. Pol. Sci.*, **24**: 771-775, 1977.
- [116] OLSZEWSKA E., JANISZEWSKI L., Studies on the mechanism of neuromuscular transmission in insect. The effect of glutamic acid, *Acta Physiol. Pol.*, **24**: 417-421, 1973.
- [117] OLSZEWSKA E., JANISZEWSKI L., Wpływ antybiotyków na czynność błony mięśniowej u owadów. Materiały II Ogólnopolskiego Sympozjum naukowo-szkoleniowego na temat błon biologicznych, Cedzyna k/Kielc 1980, 49.
- [118] OLSZEWSKA E., JANISZEWSKI L., BORKOWSKA M. J., Effect of $LaCl_3$ on neuromuscular transmission in *Tenebrio molitor*, 12 FEBS Meeting, Drezno 1978.
- [119] OLSZEWSKA E., STANKIEWICZ M., Wpływ jonów Ca na skurcz izolowanego mięśnia retractor unguis *Acheta domesticus* (w przygotowaniu do druku).
- [120] OLSZEWSKA E., TOMASZEWSKI R., Rejestracja skurczu izolowanego mięśnia owada, *Ann. Acad. Med. Lodz.*, **19**: 289, supl. 16, 1978.
- [121] OOTA I., TAKAUJI M., NAGAI T., Effect of manganese ions on excitation-contraction coupling in frog sartorius muscle, *Jap. J. Physiol.*, **22**: 379-392, 1972.
- [122] ORENTLICHER M., ORNSTEIN R. S., Influence of external cations on caffeine-induced tension: Calcium extrusion in crayfish muscle, *J. Membr. Biol.*, **5**: 319-333, 1971.
- [123] PEMRICK S. M., EDWARDS C., Differences in the charge distribution of glycerol-extracted muscle fibers in rigor, relaxation, and contraction, *J. gen. Physiol.*, **64**: 551-567, 1974.
- [124] PIEK T., Ionic and electrical properties, [w:] *Insect muscle*, red. P. N. R. Usherwood, Acad. Press, London, New York, San Francisco 1975, **5**: 281-336.
- [125] POLEDNA J., ZACHAROVA D., LIPSKAJA E., Temperature coefficients of membrane parameters in muscle fibres of the crayfish, *Proc. Intern.*

- Union Physiol. Sci., 28 Intern. Congress, Budapest 1980, Abstract 2808, 14: 644.
- [126] PORTZEHL H., ZAORALEK P., GAUDIN J., The activation by Ca^{2+} of the ATPase of extracted muscle fibrils with variation of ionic strength, pH and concentration of MgATP, *Biochim. Biophys. Acta*, **189**: 440-448, 1969.
- [127] POTTER J. D., GERGELY J., Troponin, tropomyosin, and actin interactions in the Ca^{2+} regulation of muscle contraction, *Biochem.*, **13**: 2697-2703, 1974.
- [128] RAPP P. E., BERRIDGE M. J., Oscillations in calcium-cyclic AMP control loops from the basis of pacemaker activity and other high frequency biological rhythms, *J. theor. Biol.*, **66**: 497-525, 1977.
- [129] RICE R., BRADY A., Biochemical and ultrastructural studies on vertebrate smooth muscle, *Cold Spring Harbor Symposium on Quantitative Biology*, **37**: 429-438, 1973.
- [130] RITCHIE J. M., ROGART R. B., The binding of saxitoxin and tetrodotoxin to excitable tissue, *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.*, **79**: 1-50, 1977.
- [131] RUCH T. C., PATTON H. D., WOODBURY J. W., *Neurophysiology*, W. B. Saunders Company, Philadelphia, London 1962.
- [132] RÜDEL R., TAYLOR S. R., Striated muscle fibers: Facilitation of contraction at short lengths by caffeine, *Science*, **172**: 387-388, 1971.
- [133] SAKAI T., On the controlling factors for activation of rapid cooling contracture (RCC), *Proc. Intern. Union Physiol. Sci.*, 28 Intern. Congress, Budapest 1980, Abstract 3010, 14: 677.
- [134] SAKAI T., IIZUKA T., The effect of caffeine and rapid cooling on smooth muscle, *Jap. J. Physiol.*, **22**: 135-145, 1972.
- [135] SANDOW A., Excitation-contraction coupling in skeletal muscle, *Pharmacol. Rev.*, **17**: 265-320, 1965.
- [136] SANDOW A., Skeletal muscle, *Ann. Rev. Physiol.*, **32**: 87-138, 1970.
- [137] SARZAŁA M. G., Struktura i funkcja błon sarkoplazmatycznego retikulum (mięśni szkieletowych), *Postępy Biochem.*, **20**: 403-424, 1974.
- [138] SCHNEIDER M. F., Linear electrical properties of the transverse tubules and surface membrane of skeletal muscle fibers, *J. gen. Physiol.*, **56**: 640-671, 1970.
- [139] SOBIESZEK A., Cross-bridges on self-assembled smooth muscle myosin filaments, *J. Mol. Biol.*, **70**: 741-744, 1972.
- [140] SOBIESZEK A., BREMEL R. D., Preparation and properties of vertebrate smooth-muscle myofibrils and actomyosin, *Eur. J. Biochem.*, **55**: 49-60, 1975.
- [141] SOBIESZEK A., SMALL J. V., Myosin-linked calcium regulation in vertebrate smooth muscle, *J. Mol. Biol.*, **102**: 75-92, 1976.
- [142] SOMLYO A. P., Excitation-contraction coupling in vertebrate smooth muscle: correlation of ultrastructure with function, *Physiologist*, **15**: 338-348, 1972.
- [143] SOMLYO A. P., SOMLYO A. V., Pharmacology of excitation-contraction coupling in vascular smooth muscle and in avian slow muscle, *Feder. Proceed.*, **28**: 1634-1642, 1969.
- [144] SOMMER J. R., WALLACE N. R., JUNKER J., The intermediate cisterna of the sarcoplasmic reticulum of skeletal muscle, *J. Ultrastruct. Rec.*, **71**: 126-142, 1980.
- [145] STANFIELD P. R., ASHCROFT F. M., Inactivation of calcium currents in muscle fibres of an insect. *Proc. Intern. Union Physiol. Sci.*, 28 Intern. Congress, Budapest 1980, Abstract 3241, 14: 716.

- [146] TADA M., YAMAMOTO T., TONOMURA Y., Molecular mechanism of active calcium transport by sarcoplasmic reticulum, *Physiol. Rev.*, **58**: 1-79, 1978.
- [147] TAWADA Y., TAWADA K., Co-operative regulation mechanism of muscle contraction: inter-tropomyosin co-operation model, *J. theor. Biol.*, **50**: 269-283, 1975.
- [148] TAYLOR E. W., Mechanism of actomyosin ATP-ase and the problem of muscle contraction, *CRC Critical Rev. in Biochem.*, 1979: 103-164.
- [149] TAYLOR S. R., PREISER H., SANDOW A., Action potential parameters affecting excitation-contraction coupling, *J. gen. Physiol.*, **59**: 421-436, 1972.
- [150] TONG E. Y., BITTAR E. E., CHEN S. S., DANIELSON B. G., The influence of caffeine on the sodium efflux in barnacle muscle fibers, *Experientia*, **28**: 1031-1033, 1972.
- [151] TOMITA T., WATANABE H., Factors controlling myogenic activity in smooth muscle, *Phil. Trans. R. Soc. Lond.*, **B 265**: 73-85, 1973.
- [152] TRZEBSKI A., Autonomiczny układ nerwowy i mięśnie gładkie, [w] *Fizjologia człowieka z elementami fizjologii klinicznej*, red. W. Traczyk, A. Trzeb-sik, PZWL, Warszawa 1980, **14**: 295-352.
- [153] UHRIK B., ZACHAROVA D., Ultrastructural changes in the internal membrane system of crustacean muscle fibres during caffeine contracture, *Physiol. bohemoslov.*, **17**: 496, 1968.
- [154] USHERWOOD P. N. R., Electrochemistry of insect muscle, [w:] *Advances in Insect Physiology*, red. J. W. L. Beament, J. E. Treherne, V. B. Wigglesworth, Acad. Press, New York 1969, **6**: 205-278.
- [155] USHERWOOD P. N. R., Amino acids as neurotransmitters, [w:] *Advances in comparative physiology and biochemistry*, Acad. Press. Inc., 1978, **7**: 227-309.
- [156] VAN DER KLOOT W., Calcium and neuromuscular transmission, [w:] *Calcium in drug action*, red. G. B. Weiss, Plenum Publ. Corporation 1978, 261-287.
- [157] VAN DER KLOOT W., Possible effects of fixed membrane surface charges in experiments on excitation-contraction coupling in frog muscle, *Comp. Biochem. Physiol.*, **61 A**: 371-375, 1978.
- [158] VAN DER KLOOT W., KITA H., The effect of the "calcium-antagonist" verapamil on muscle action potentials in the frog and crayfish and on neuromuscular transmission in the crayfish, *Comp. Biochem. Physiol.*, **50 C**: 121-125, 1975.
- [159] VAN DER KLOOT W., KITA H., KITA K., Action of the "calcium-antagonist", prenylamine, on skeletal muscle, the myoneural junction, and the adrenal of the frog, *Gen Pharmac.*, **6**: 63-67, 1975.
- [160] VARGA E., GESZTELYI I., DANKO M., Concentration dependence of the veratrine effect on inducing depolarization and membrane potential oscillation in skeletal muscle, *Acta Physiol. Acad. Sci. Hung.*, **47**: 117-125, 1976.
- [161] WALLINGA-DE JONGE W., Modeling of the calcium mediated activation of skeletal muscle, *Proc. Intern Union Physiol. Sci. Abstract* 2378, **13**: 799, 1977.
- [162] WETTWER E., HASE S., LÜTTGAU H. C., The increase in potassium conductance in metabolically poisoned skeletal muscle fibres, *Proc. Intern. Union Physiol. Sci.*, 28 Intern. Congress, Budapest 1980, Abstract 3653, **14**: 785.

- [163] WOOD D. S., ZOLLMAN J., REUBEN J. P., Human skeletal muscle: Properties of the "chemically skinned" fiber, *Science*, **187**: 1075-1076, 1975.
- [164] YAMAMOTO Y., HASEGAWA Y., HOTTA K., Depolarization and contraction of skeletal muscle induced by intracellular stimulation-role of T-tubules in electro-chemical coupling, *Jap. J. Physiol.*, **26**: 333-343, 1976.
- [165] YU P., DEMARTINIS F. D., MASORO E. J., Relation of lipid structure of sarcotubular vesicles to Ca^{++} transport activity, *J. Lipid Res.*, **9**: 492-500, 1968.
- [166] ZACHAR J., Activation and relaxation of contraction, [w:] *Electrogenesis and contractility in skeletal muscle cells*, University Park Press Baltimore and London, Publishing House of the Slovak Acad. Sci., Bratislava 1971, **8**: 471-539.
- [167] ZACHAR J., Excitation-contraction coupling, [w:] *Electrogenesis and contractility in skeletal muscle cells*, University Park Press Baltimore and London, Publishing House of Slovak Acad. Sci., Bratislava, 1971, **7**: 375-470.
- [168] ZACHAR J., ZACHAROVA D., The effect of calcium ions on potassium contractures in single fibres of the crayfish, 23 Intern. Congress Physiol. Sci., Tokyo 1965, Abstract 803.
- [169] ZACHAR J., ZACHAROVA D., Potassium contractures in single muscle fibres of the crayfish, *J. Physiol.*, **186**: 596-618, 1966.
- [170] ZACHAR J., ZACHAROVA D., Modification of the excitation-contraction link by divalent cations in crustacean muscle fibres, 24 Intern. Congress Physiol. Sci., Washington 1968, Abstract 1435.
- [171] ZACHAR J., ZACHAROVA D., ADRIAN R. H., Observations on "detubulated" muscle fibres, *Nature*, **239**: 153-155, 1972.
- [172] ZACHAR J., ZACHAROVA D., HENČEK M., Membrane potential of isolated muscle fibre of the crayfish (*Astacus fluviatilis*), *Physiologia bohemoslov.*, **13**: 117-128, 1964.
- [173] ZACHAROVA D., LIPSKAJA E., HENČEK M., The effect of procaine on ionic currents and excitation-contraction coupling in muscle fibres of the crayfish, *Proc. Intern. Union Physiol. Sci.*, 28 Intern. Congress, Budapest 1980, Abstract 3717, **14**: 796.
- [174] ZACHAROVA D., POLEDNA J., ZACHAR J., Changes in electrical properties of the T-system during detubulation and retubulation of muscle fibres induced by the glycerol procedure, *Physiol. bohemoslov.*, **27**: 287, 1978.
- [175] ZACHAROVA D., UHRIK B., Kinetics of functional and morphological changes during decoupling and recoupling induced by glycerol in isolated muscle fibres of the crayfish, *Cell Tiss. Res.*, **192**: 167-185, 1978.
- [176] ZACHAROVA D., UHRIK B., POLEDNA J., ZACHAR J., Kinetics of detubulation in striated muscle fibres of the crayfish, *Proceed. Intern. Union Physiol. Sci.*, 27 Congress, Paris 1977, Abstract 2475.
- [177] ZACHAROVA D., ZACHAR J., Contractions in single muscle fibres with graded electrogenesis, *Physiol. bohemoslov.*, **14**: 401-411, 1965.
- [178] ZACHAROVA D., ZACHAR J., The effect of external calcium ions on the excitation-contraction coupling in single muscle fibres of the crayfish, *Physiol. bohemoslov.*, **16**: 191-207, 1967.
- [179] ZACHAROVA D., ZACHAR J., Wlijanie niekotorych dwuchwatielnych kationow na elektromechaniczeskiju swjaz izolirovanyh myszecznych wołkon raka, *Sechenow Physiol. J. USSR*, **57**: 1331-1339, 1971.
- [180] ZACHAROVA D., ZACHAR J., UHRIK B., Localization of calcium source

- and calcium sink in crayfish muscle fibres, 24 Intern. Congress Physiol. Sci., Washington 1968, Abstract 1436.
- [181] ZAHRADNIK J., ZACHAR J., Calcium channel behaviour in the muscle membrane, Proc. Intern. Union Physiol. Sci., 28 Intern. Congress Budapest 1980, Abstract 3723, 14: 797.
- [182] ZUBRZYCKA E., Wybrane zagadnienia miogenezy, Postępy Biol. Kom., 6: 187-208, 1979.

Otrzymano: 20 stycznia 1981.

Przyjęto: 10 maja 1981.

Adres autorki: ul. Gagarina 9, 87-100 Toruń.

ASPEKTY ULTRASTRUKTURALNE PROCESÓW WYDZIELNICZYCH SZYSZYNKI SSAKÓW

ULTRASTRUCTURAL ASPECTS OF THE SECRETORY PROCESSES IN MAMMALIAN PINEAL GLAND

Michał KARASEK i Paul PEVET

Pracownia Mikroskopii Elektronowej, Zakład Anatomii Patologicznej,
Instytut Patologii, Akademia Medyczna w Łodzi
Holenderski Instytut Badania Mózgu w Amsterdamie, Zakład Anatomii
i Embriologii Uniwersytetu w Amsterdamie

Streszczenie. Zgodnie z aktualnymi danymi, szyszynka wytwarza liczne związki i jest gruczołem dokrewnym, którego produkty wydzielnicze wpływają na czynność układu płciowego. Jednakże natura chemiczna wielu substancji czynnych tego gruczołu jest nieznana. W niniejszym przeglądzie, opierając się na licznych badaniach własnych oraz innych autorów dokonano analizy ultrastrukturalnej struktur mogących mieć znaczenie w procesach wydzielniczych komórek szyszynki. Szczególną uwagę poświęcono dwóm procesom, związanym z syntezą i uwalnianiem związków białkowych, tj. wytwarzaniu pęcherzyków ziarnistych przez aparat Golgiego i specjalnej aktywności ziarnistej siateczki śródplazmatycznej (nazwanej ependymo podobnym procesem wydzielniczym). Dyskutowany jest także udział w mechanizmach wydzielniczych komórek szyszynki takich struktur jak: krople tłuszczu, prążki „synaptyczne”, ciała gęste, glikogen i systemy wakuolarne, błony koncentryczne, błony pierścieniowe, cysterny podpowierzchniowe i pęczki mikrotubul.

Summary. According to the present knowledge, the pineal gland synthesizes a number of compounds and is an endocrine gland whose secretory products influence the function of the reproductive system. However, the exact chemical nature of numerous active substances of this gland is unknown. In the present review, ultrastructural analysis of the structures might be of importance in secretory processes of pinealocytes was performed on the basis of own studies combined with the observations of various authors. Special attention was devoted to the two processes involved in the synthesis and release of proteinaceous compounds, i.e., the production of granular vesicles by the Golgi apparatus and the peculiar activity of the granular endoplasmic reticulum (termed an ependymal-like secretory process). Possible participation in the secretory mechanisms of pinealocytes the follow-

ing structures: lipid droplets, "synaptic" ribbons, dense bodies, glycogen and vacuolar systems, concentric lamellae, annulate lamellae, subsurface cisterns and microtubular sheaves is also discussed.

Wykaz skrótów

- CL — koncentrycznie ułożone błony
 DB — ciała gęste
 GER — ziarnista siateczka śródplazmatyczna
 GV — pęcherzyki ziarniste
 PS — prążki „synaptyczne”
 VFC — wakuole z kłaczkowatą zawartością

WSTĘP

Szyszynka wykazuje cechy morfologiczne, biochemiczne i fizjologiczne charakterystyczne dla narządów o dużej aktywności metabolicznej. Przy zastosowaniu używanych zwykle w endokrynologii kryteriów można bez żadnych wątpliwości włączyć szyszynkę do układu dokrewnego.

Dostępne obecnie dane potwierdzają hipotezę, że szyszynka chociaż nie jest absolutnie niezbędna do normalnego funkcjonowania organizmu, zajmuje pozycję narządu regulującego inne procesy kontrolujące, będąc „regulatorem regulatorów”. Termin ten, wprowadzony dla szyszynki przed kilkunastoma laty przez Reitera i Hestera [75], został ostatnio szczegółowo omówiony przez Reitera [73] w jednym z jego opracowań monograficznych. Przyjmuje się, że szyszynka powiadamia inne gruczoły dokrewne, prawdopodobnie poprzez oś neuroendokrynną, o stanie środowiska (głównie o warunkach oświetlenia) i odpowiednio reguluje system podwzgórzowo-przysadkowy.

Wykazano niezbicie, że u niektórych gatunków ssaków szyszynka jest odpowiedzialna za regulację rocznego cyklu reprodukcyjnego i powoduje, że młode przychodzą na świat w okresie najbardziej sprzyjającym dla ich przeżycia, tj. na wiosnę [73, 74]. Usunięcie szyszynki u chomików przebywających w naturalnych warunkach powodowało rozmnażanie niezależnie od pory roku (także w miesiącach zimowych) [72]. Według Reitera [73] przedłużenie braku synchronizacji między czasem porodu a porą roku mogłoby doprowadzić do zaniknięcia gatunku. Autor ten uważa, że choć szyszynka może nie mieć istotnego znaczenia dla przeżycia pojedynczych zwierząt, ma najwyższą wagę dla przeżycia gatunków.

Warunki oświetlenia są najważniejszym czynnikiem w kontroli aktywności wydzielniczej szyszynki ssaków [21, 93]. Informacja o oświe-

tleniu dociera do szyszynki od siatkówki oka skomplikowaną drogą nerwową [46]. Wewnątrz szyszynki bodźce nerwowe powodują wydzielanie odpowiednich ilości substancji hormonalnych. Należy jednakże podkreślić, że zarówno natura wszystkich związków hormonalnych szyszynki, jak i sposób wytwarzania i wydzielania tych substancji jest ciągle przedmiotem dyskusji.

Przedmiotem niniejszego przeglądu jest ocena ultrastrukturalna struktur pinealocytów, które mogą uczestniczyć w procesach wydzielniczych szyszynki.

PRAWDOPODOBNE HORMONY SZYSZYNKI

Związki indolowe i substancje polipeptydowe stanowią dwie podstawowe grupy, które mogą być uważane za hormony szyszynki.

Głównym przedstawicielem grupy związków indolowych jest melatonina, pierwszy związek czynny szyszynki, wyizolowany w 1958 r. przez Lerner'a i wsp. [37]. Jej też poświęcono dotychczas najwięcej uwagi w badaniach właściwości endokrynologicznych tego gruczołu.

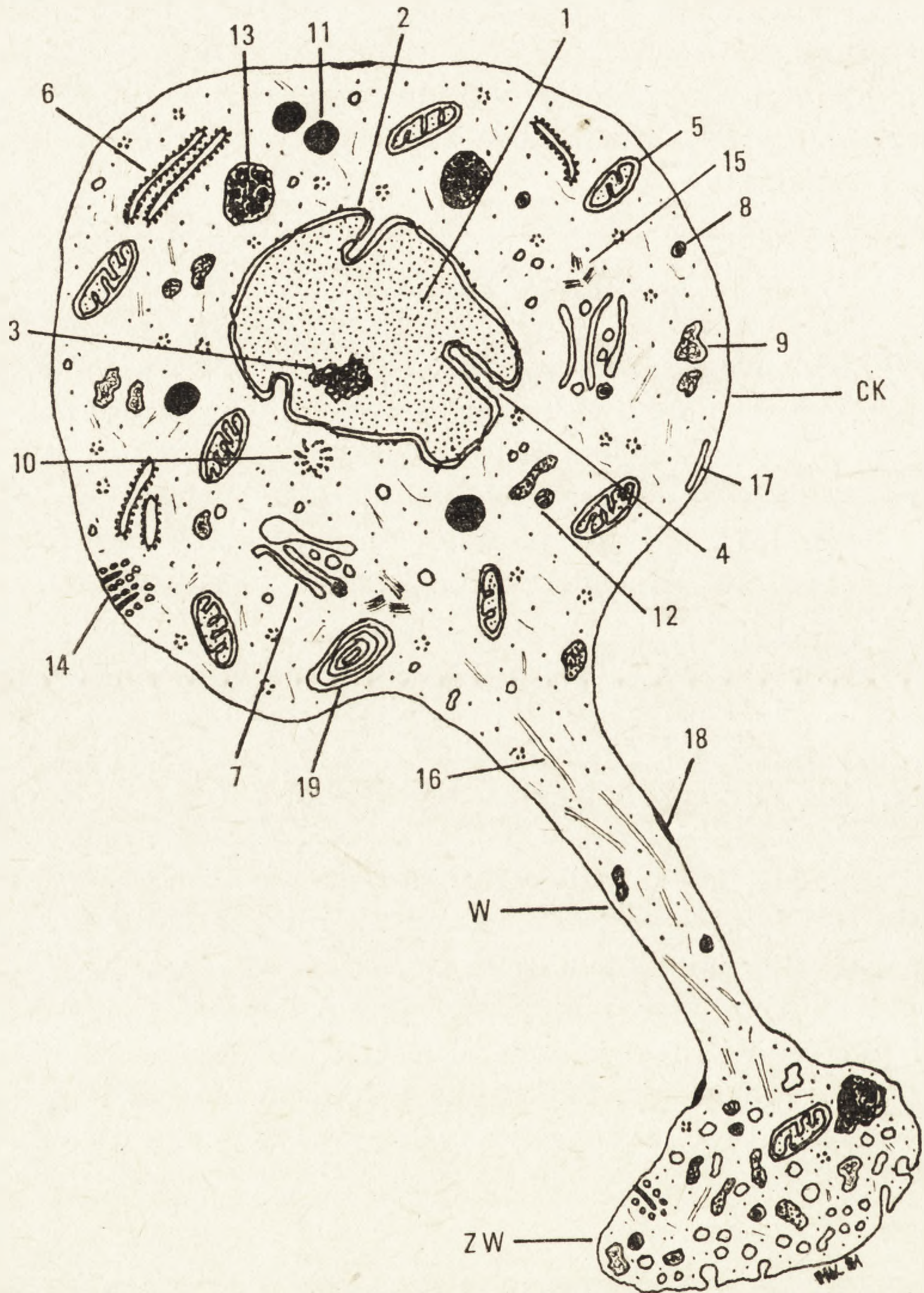
Do najczęściej badanych substancji polipeptydowych należy wykryta przez badaczy rumuńskich [54] wazotocyna-8-argininowa. Benson i Ebels [4, 5] uważają, że — przynajmniej częściowo — za wpływ szyszynki na układ płciowy mogą być odpowiedzialne mało poznane substancje polipeptydowe, jak antygonadotropina szyszynkowa (PAG) [7] oraz substancja hamująca gonadotropiny (GIS) [51, 52]. Należy także wspomnieć, że Orts i wsp. [49, 50] opisali ostatnio w szyszynce bydłowej obecność trójpeptydu (zawierającego treoninę, serynę i lizynę), który hamuje rozrost kompensacyjny jajników u myszy.

Z uwagi na charakter niniejszego przeglądu omówienie hormonów szyszynki przedstawiliśmy jedynie skrótowo, w celu wprowadzenia do dalszej części naszej pracy. Czytelnika zainteresowanego tym zagadnieniem odsyłamy do prac monograficznych poświęconych tym substancjom [4, 5, 13, 53, 93].

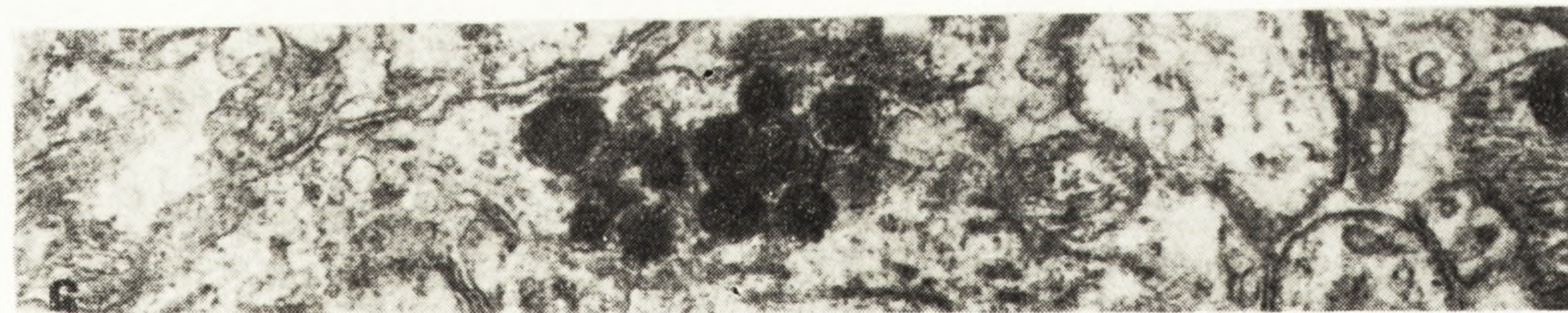
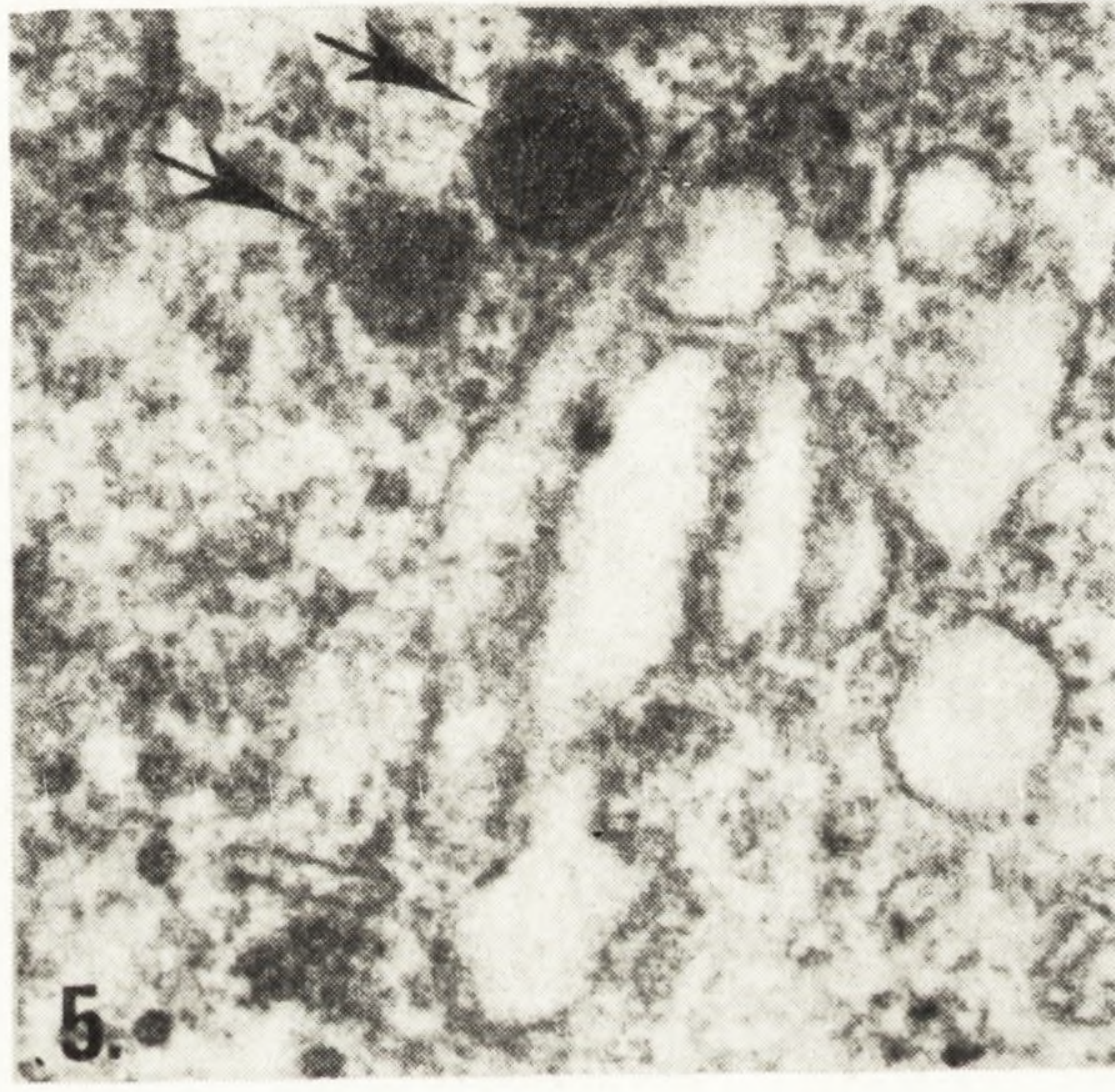
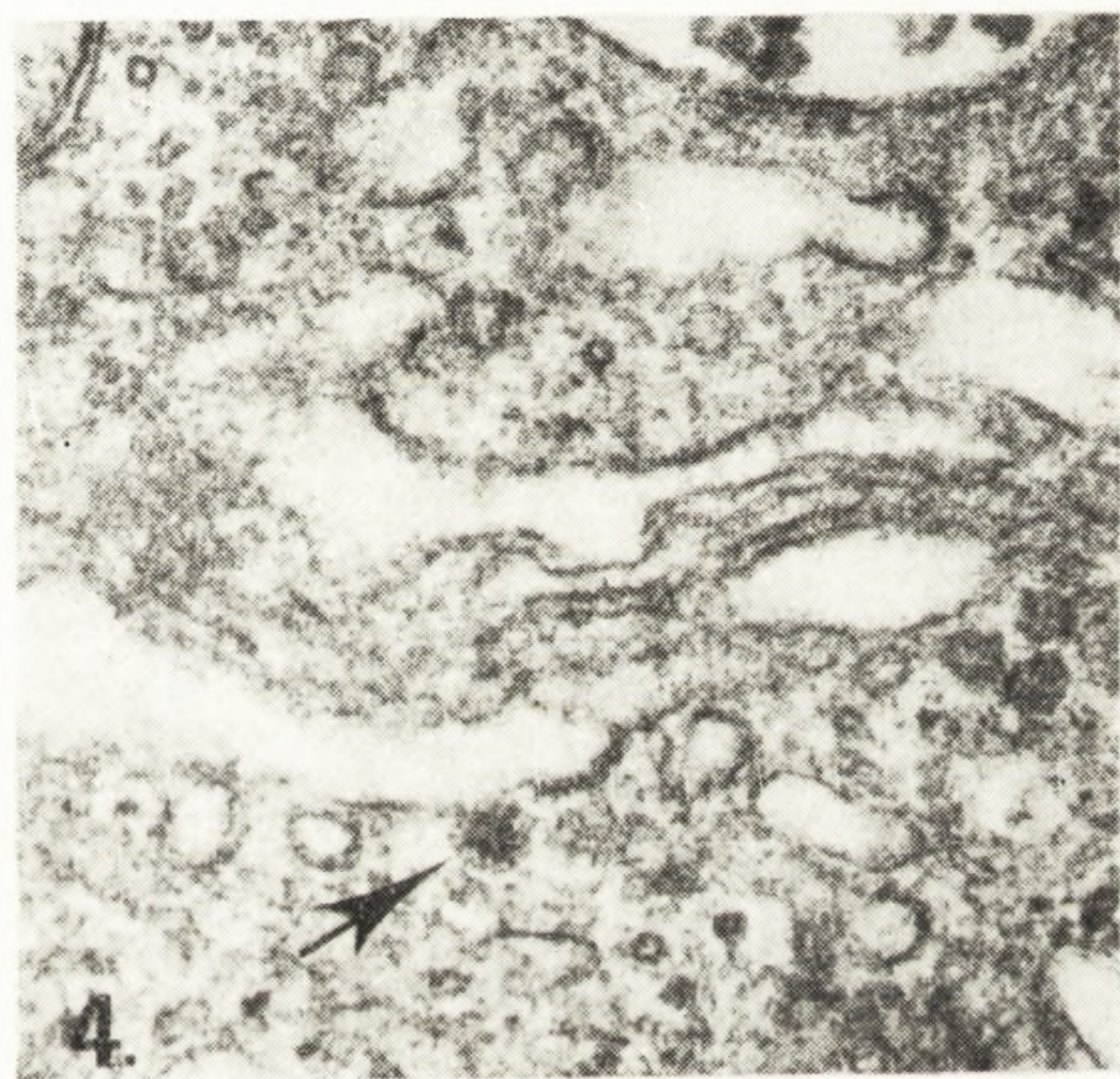
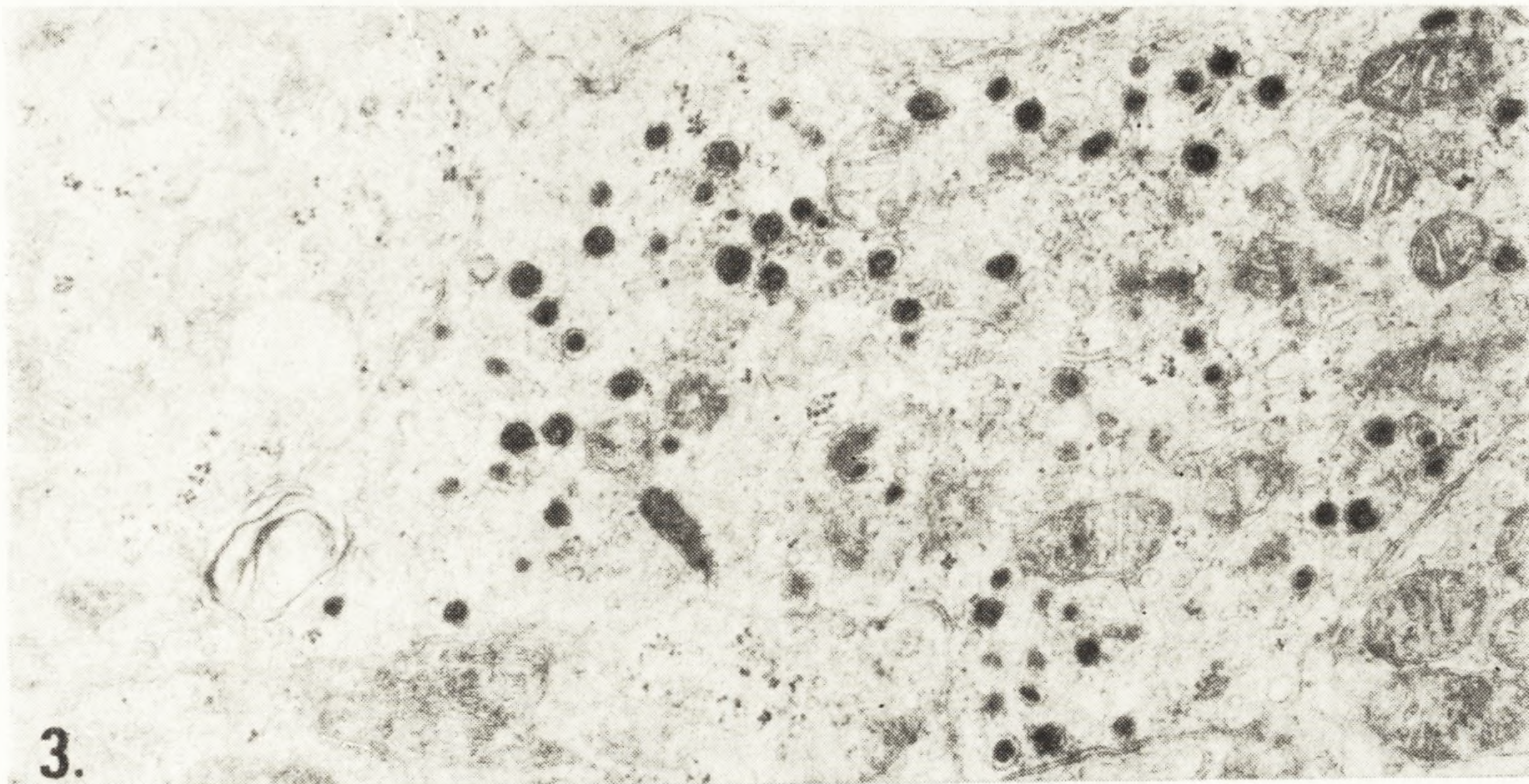
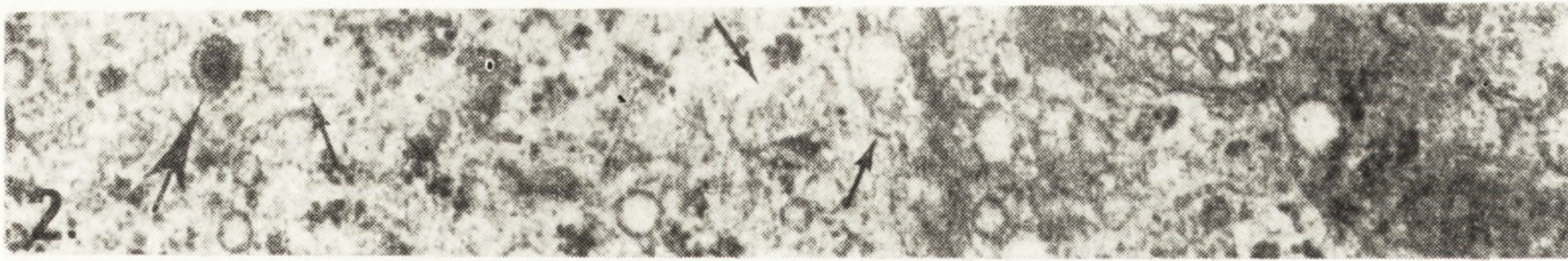
PROCESY WYDZIELNICZE W KOMÓRKACH SZYSZYNKI

Specyficznymi komórkami gruczołowymi szyszynki ssaków są pinealocyty, które stanowią ponad 90% wszystkich komórek tego gruczołu [19, 21]. Komórka ta przedstawiona jest schematycznie na ryc. 1. U większości ssaków (np. u szczura, psa, jeża, kreta, fretki, owcy, krowy, świni, kozy kameruńskiej) występuje jednorodna populacja pinealocytów, u niektórych natomiast (np. u nietoperza, ślepca, świnki morskiej,

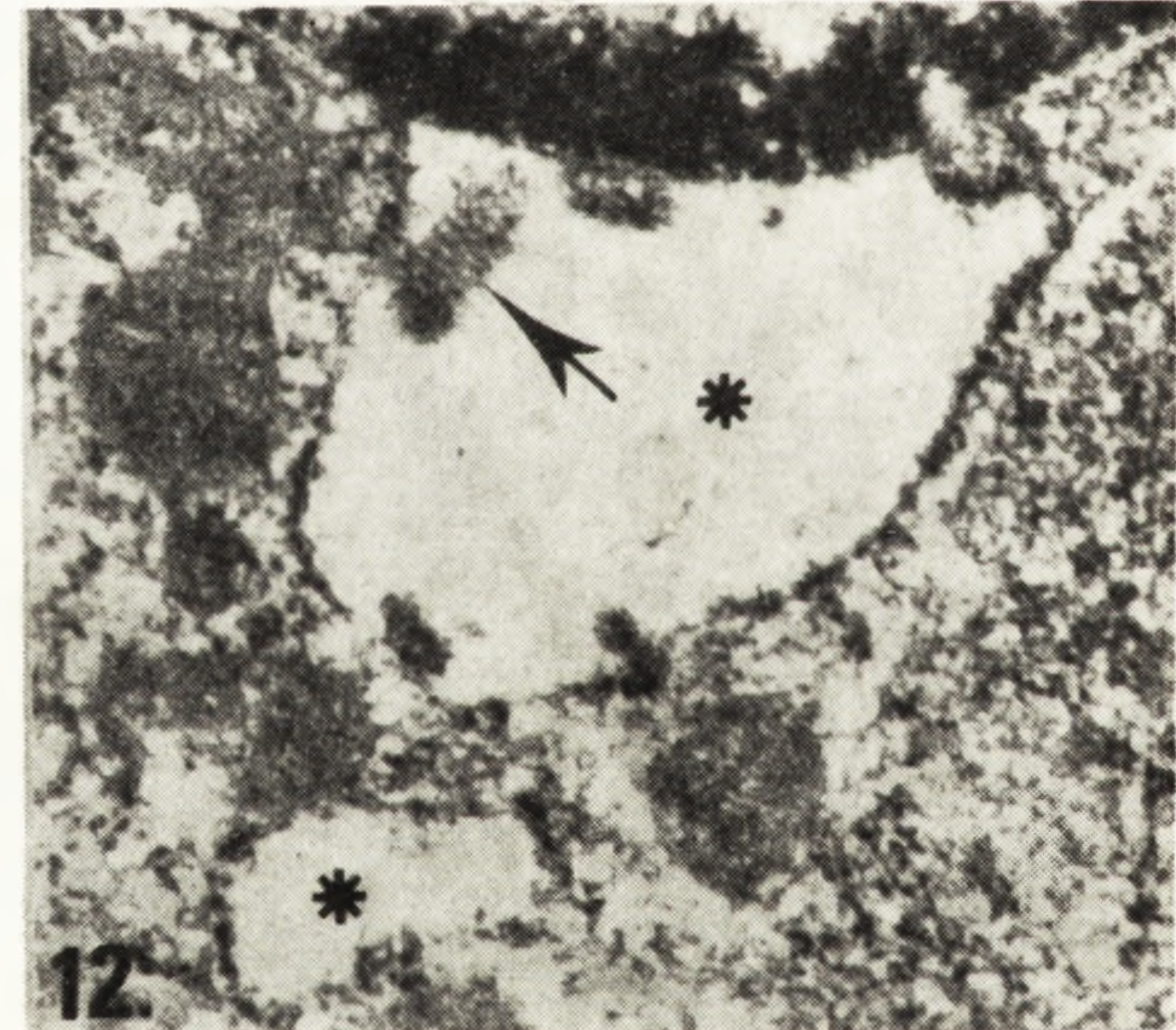
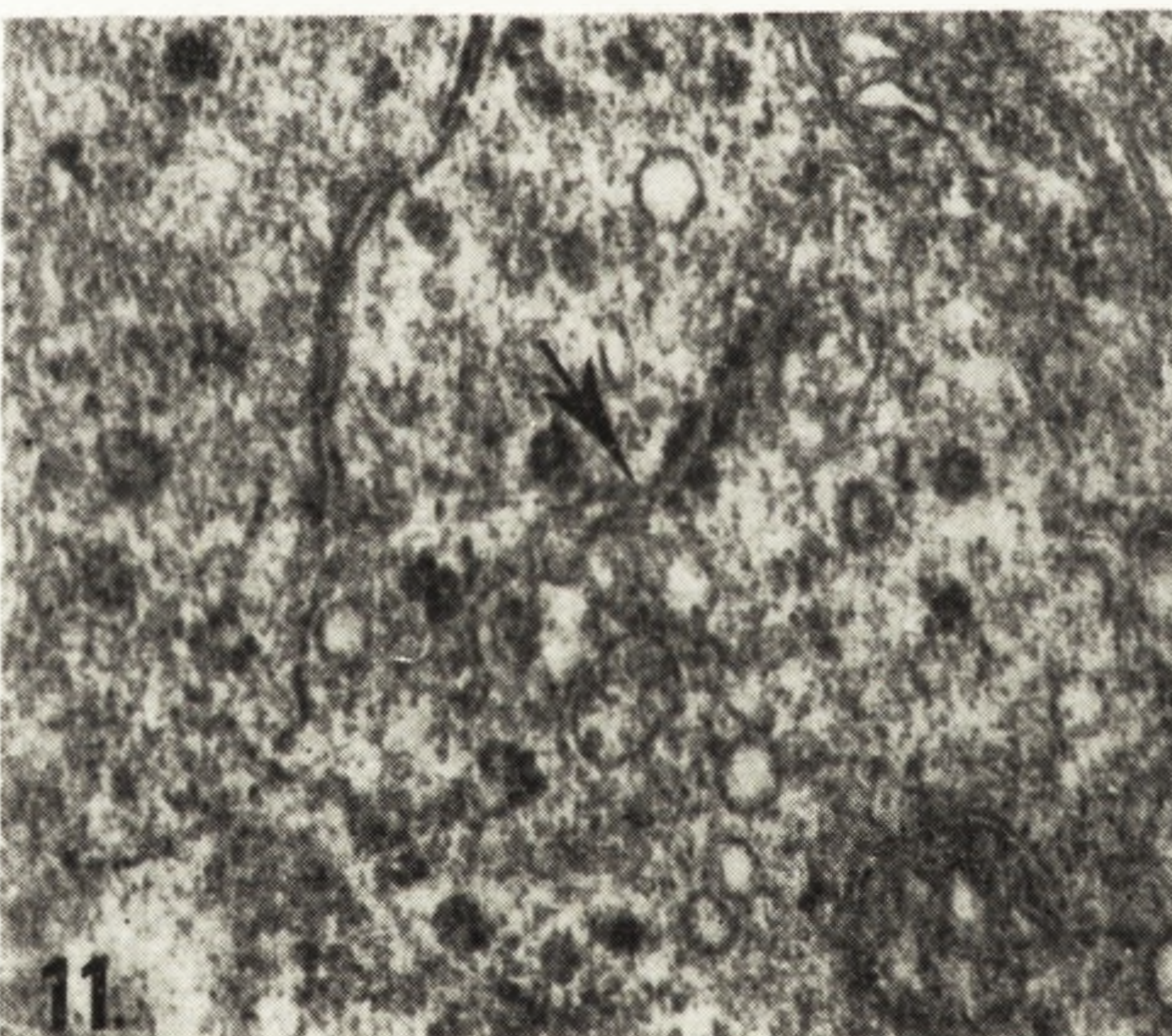
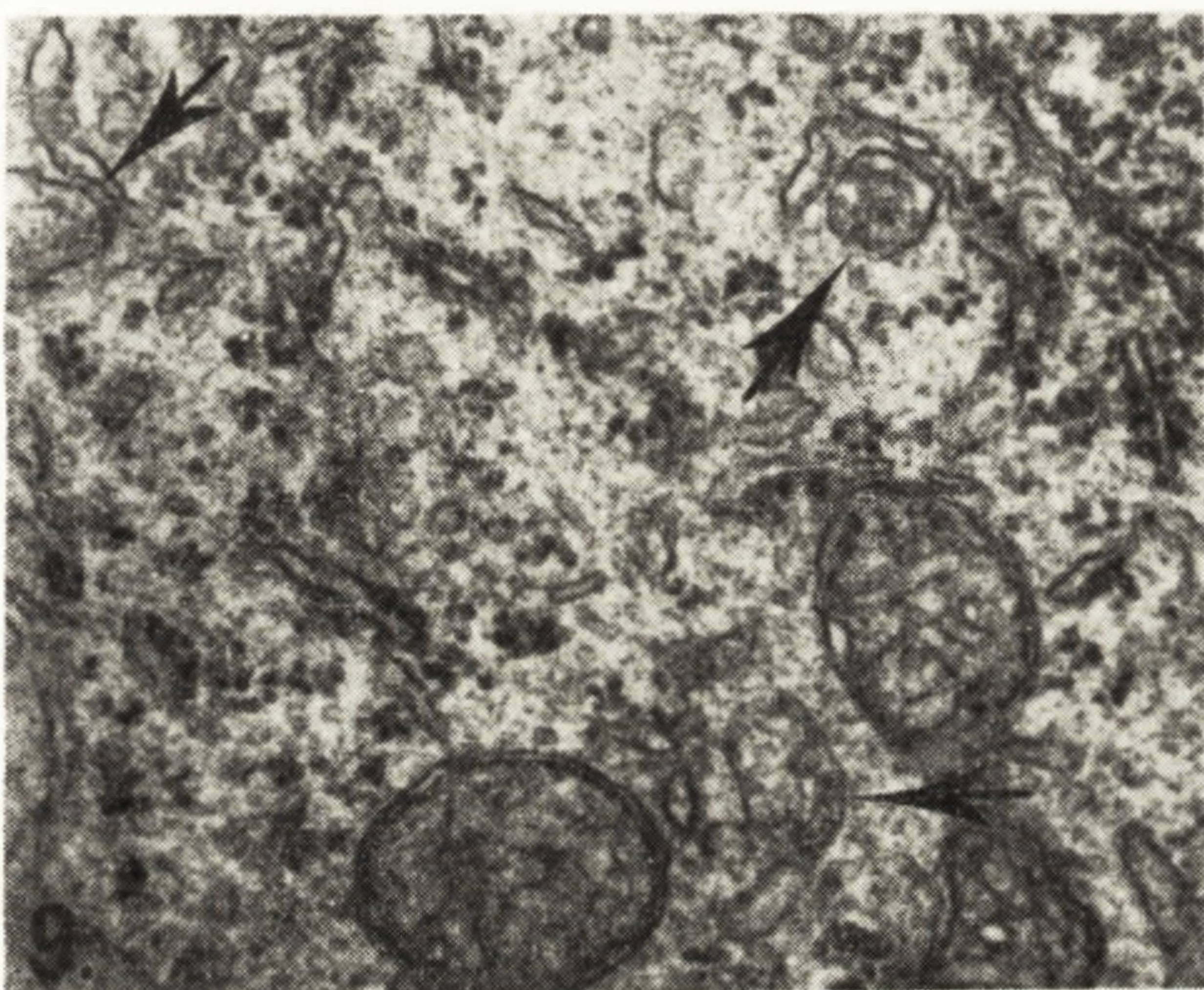
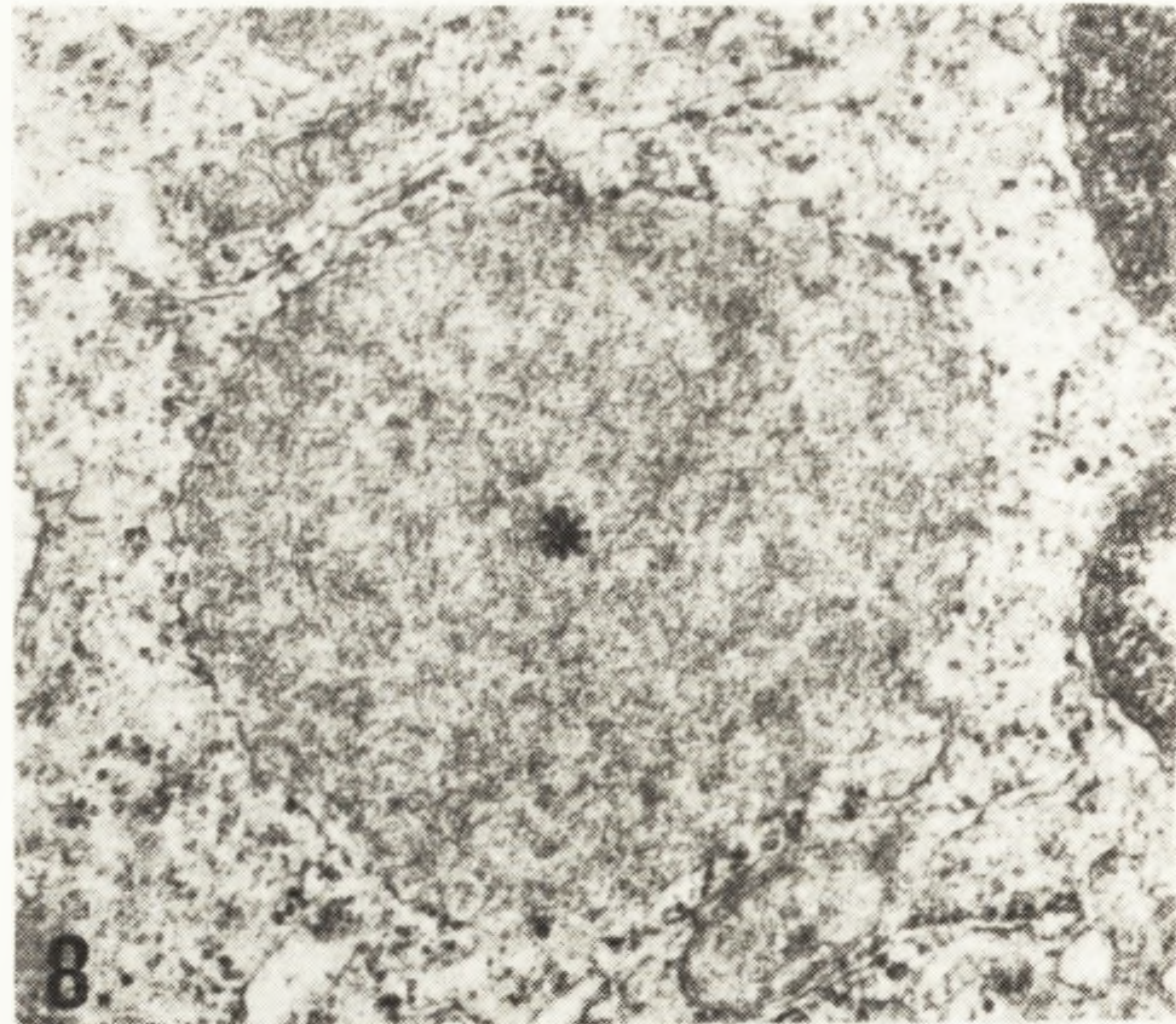
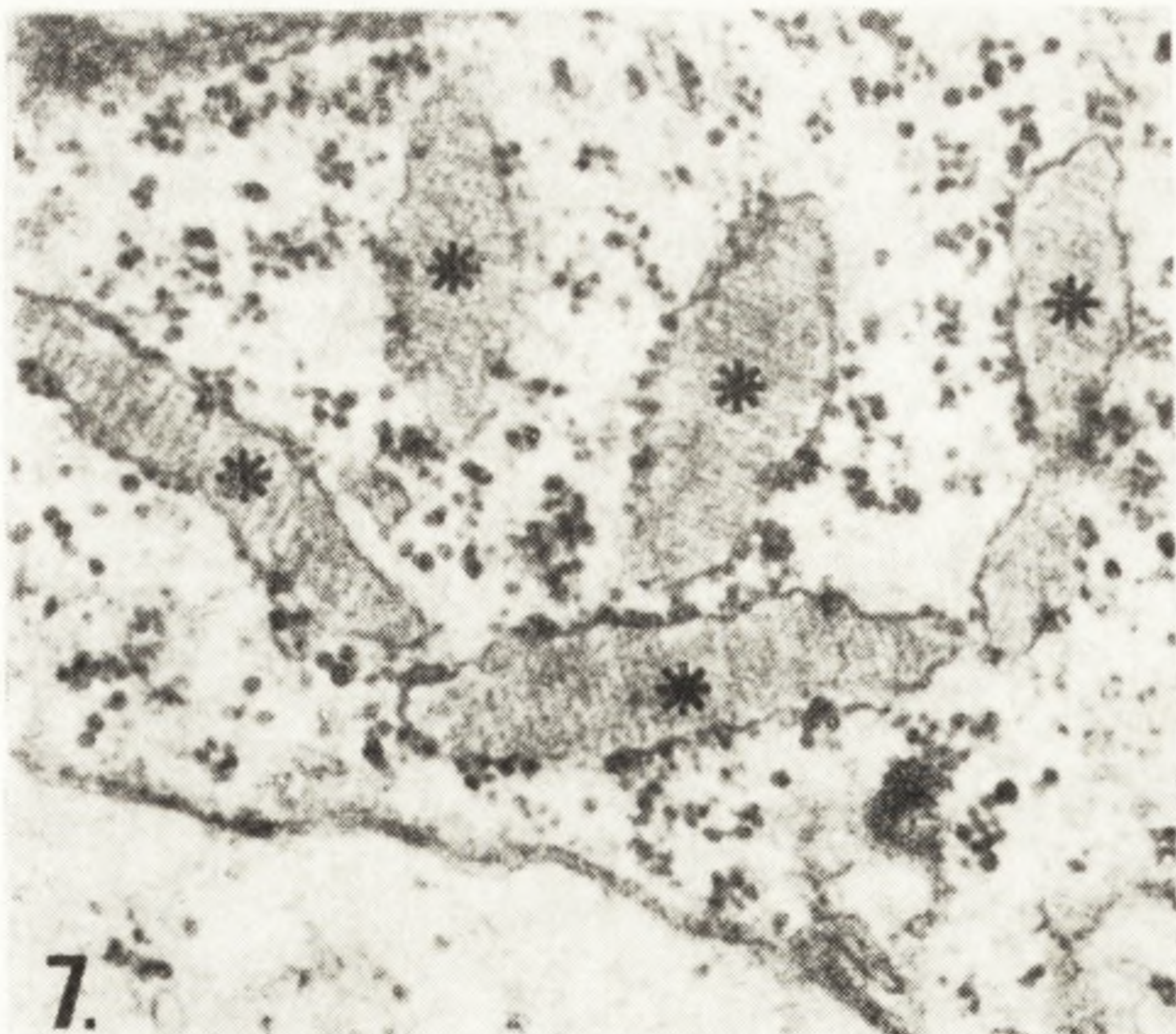
myszy, królika, susła, małpy) obserwuje się także komórki różniące się od pinealocytów sensu stricto, stanowiące inną populację tych komórek. Problem ten został szeroko omówiony przez Peveta [58, 61] i nie będzie przedmiotem rozważań.



Ryc. 1. Schemat budowy pinealocyta ssaków. CK — ciało komórki, W — wypustka, ZW — zakończenie wypustki: 1 — jądro, 2 — błony jądrowe, 3 — jąderko, 4 — wpuklenie cytoplazmy w głąb jądra, 5 — mitochondrium, 6 — ziarnista siateczka śródplazmatyczna, 7 — aparat Golgiego, 8 — pęcherzyk ziarnisty, 9 — wakuola o kłaczkowatej zawartości, 10 — centriola, 11 — kropla tłuszczu, 12 — ciało gęste, 13 — ciało otoczone błoną, 14 — prążki „synaptyczne”, 15 — pęczki mikrotubul, 16 — mikrotubule, 17 — cysterna podpowierzchniowa, 18 — połączenie międzykomórkowe, 19 — błony koncentryczne



- Ryc. 2. Szyszynka szczura. GV (duża strzałka) i VFC (małe strzałki) w cytoplazmie jednego pinealocyta. $\times 32\ 000$ (Karasek — zdjęcie nie publikowane).
- Ryc. 3. Szyszynka szczura malajskiego. Liczne GV w wypustce pinealocyta. $\times 25\ 000$ (Pevet i Yadav [70], za zgodą wydawcy).
- Ryc. 4. Szyszynka świni. Wytwarzanie GV w aparacie Golgiego (strzałka). $\times 44\ 000$ (Karasek i Wyrzykowski — zdjęcie nie publikowane).
- Ryc. 5. Szyszynka świni. GV (strzałki) w najbliższym sąsiedztwie aparatu Golgiego. $\times 41\ 000$ (Karasek i Wyrzykowski — zdjęcie nie publikowane).
- Ryc. 6. Szyszynka świni. GV w wypustce pinealocyta. $\times 28\ 000$ (Karasek i Wyrzykowski — zdjęcie nie publikowane).



Ryc. 7. Szyszynka kreta. Materiał o strukturze parakrystalicznej w rozszerzonych cysternach GER (gwiazdki). $\times 26\ 000$ (Pevet i Smith [69], za zgodą wydawcy).

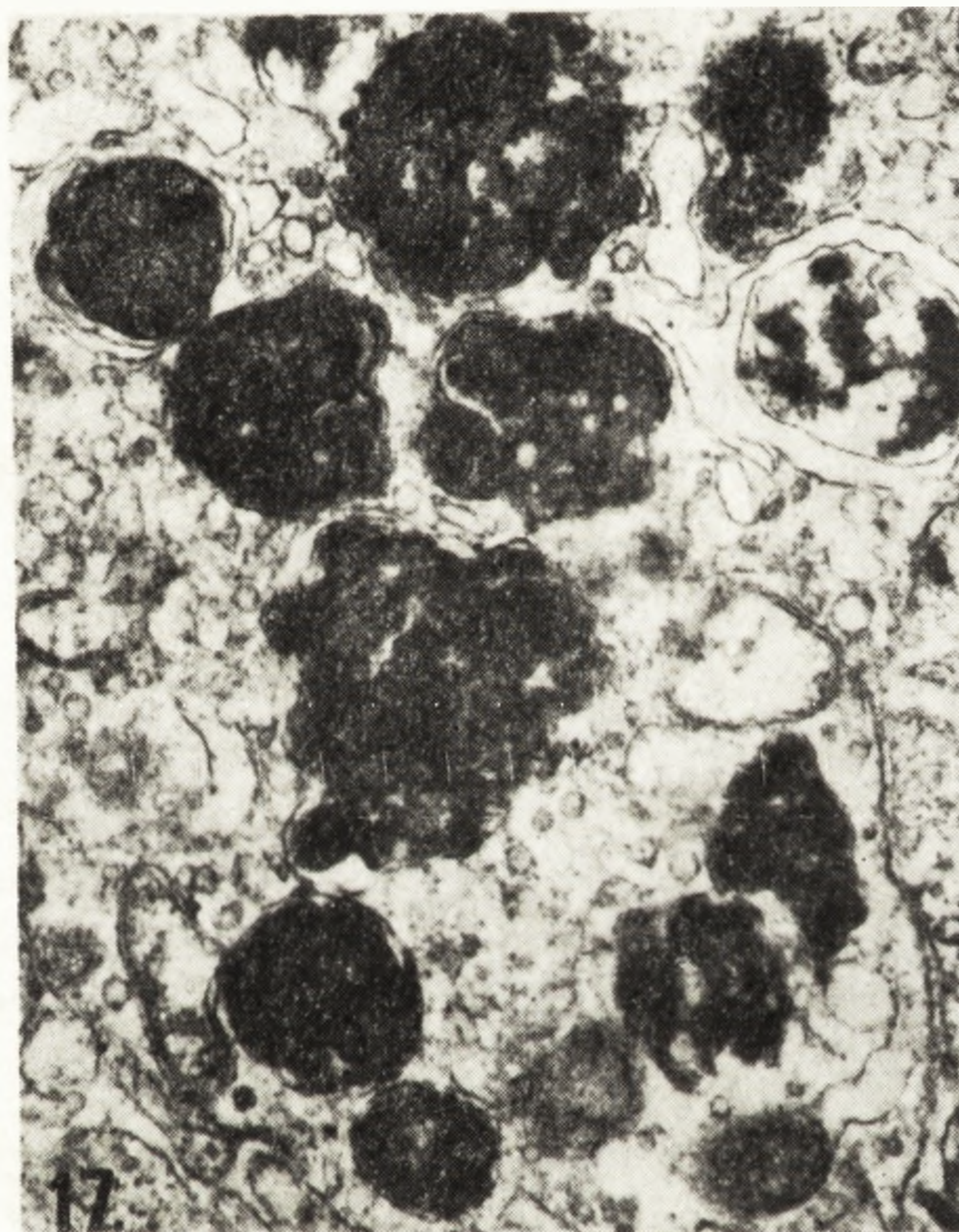
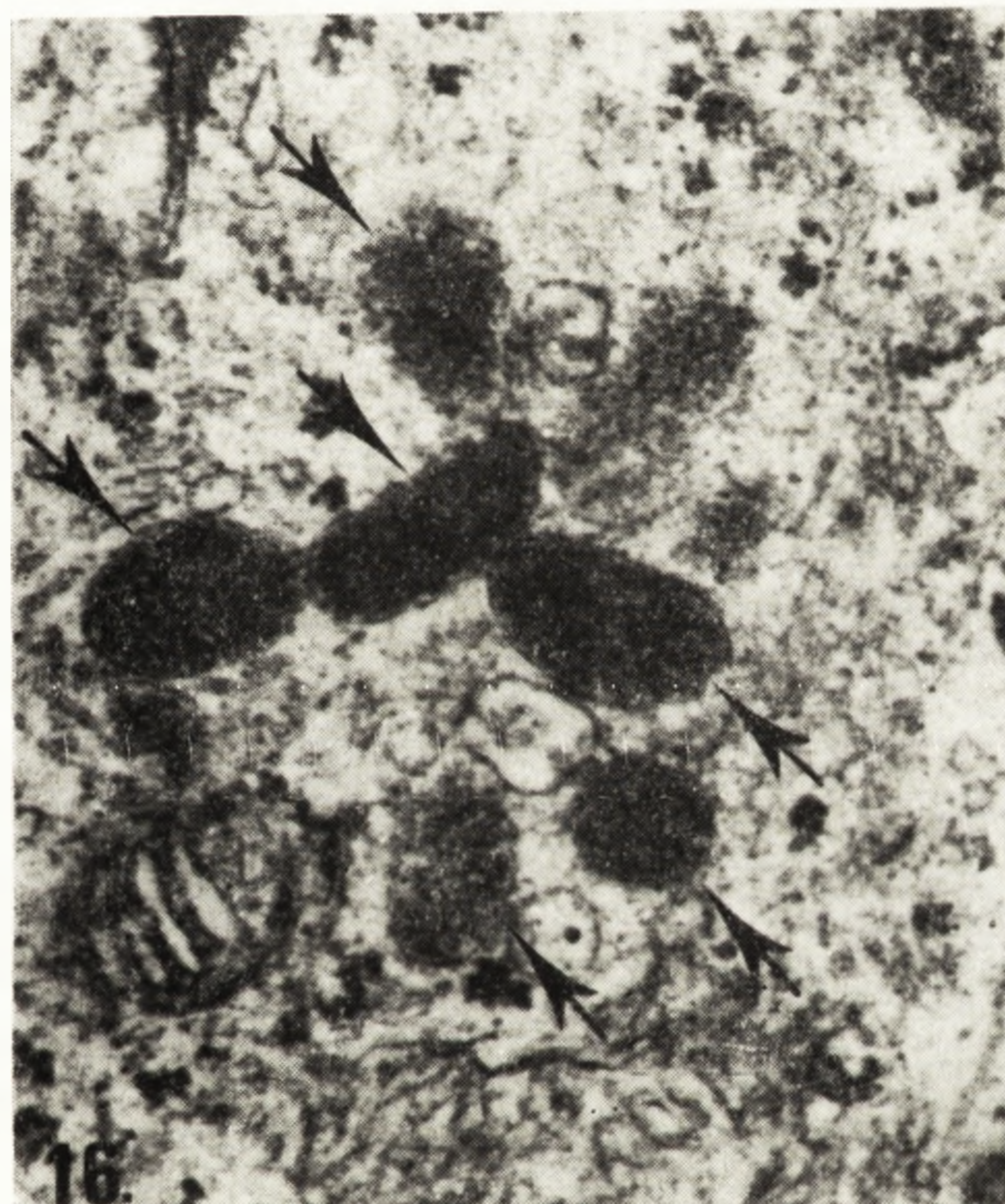
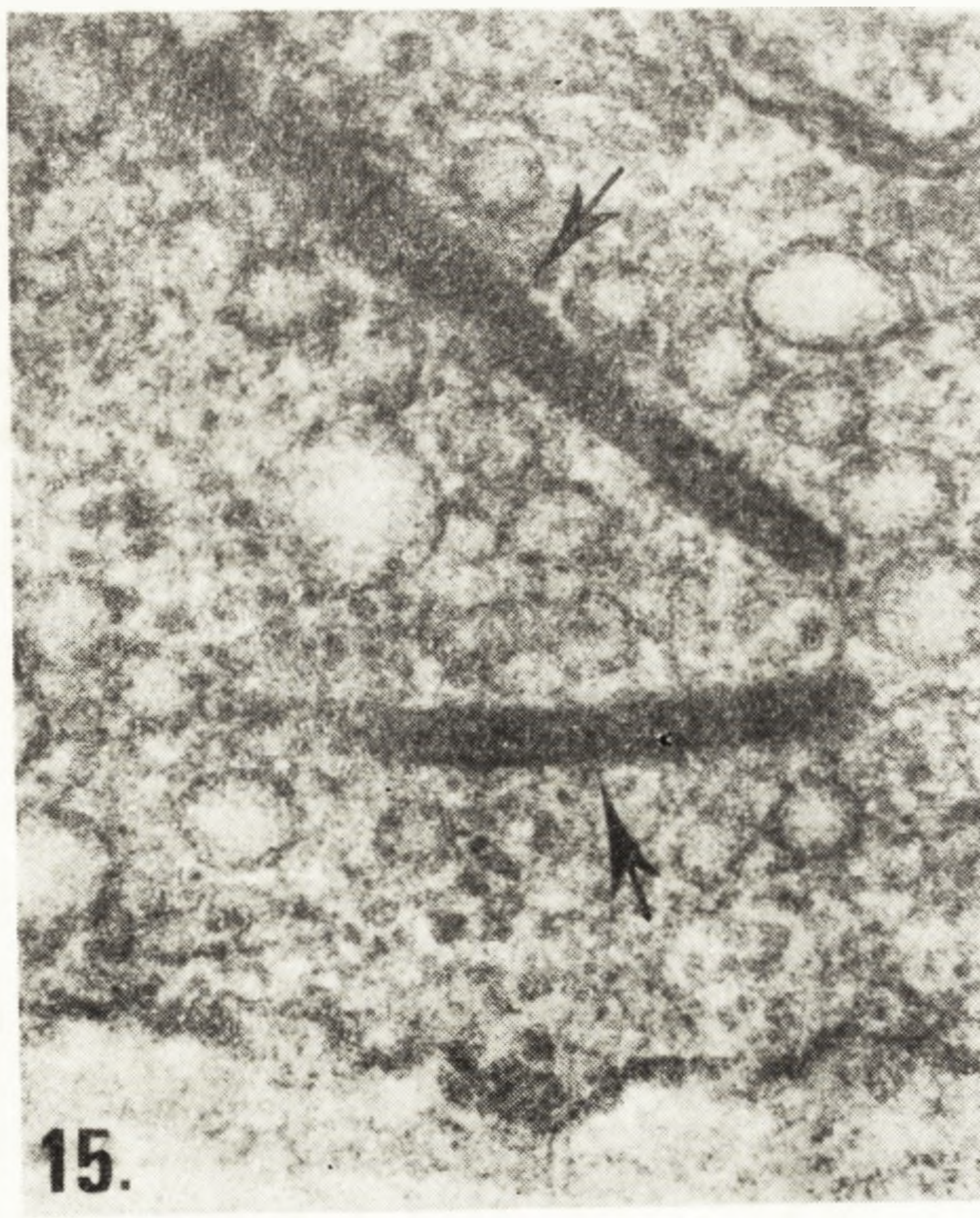
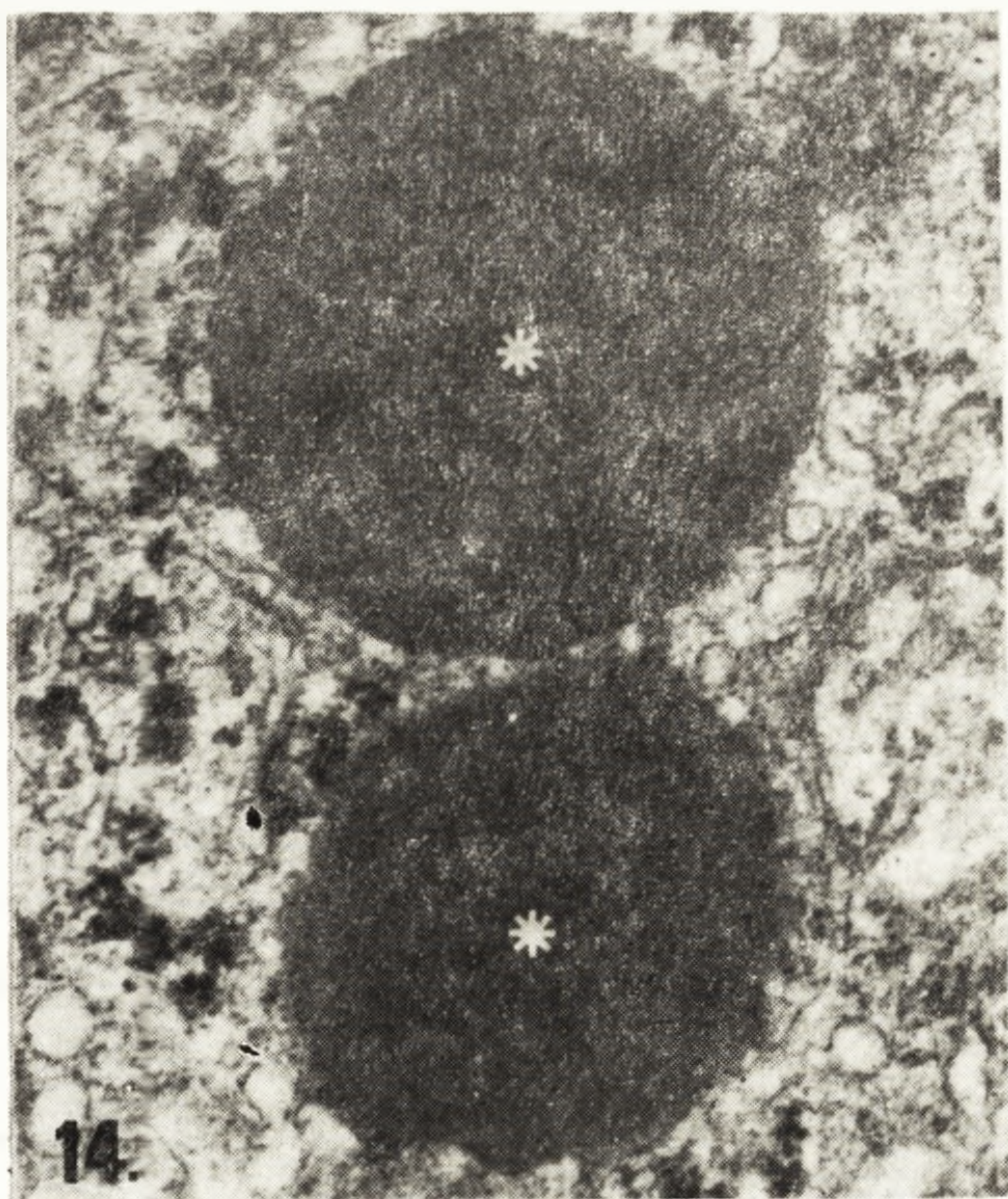
Ryc. 8. Szyszynka ślepeca. Nagromadzenie materiału w rozszerzonej cysternie GER (gwiazdka). $\times 29\ 500$ (Pevet i wsp. [63], za zgodą wydawcy).

Ryc. 9. Szyszynka szczura. Strzałki wskazują VFC. $\times 30\ 000$ (Karasek — zdjęcie nie publikowane).

Ryc. 10. Szyszynka szczura. Bardzo liczne VFC (strzałki) między cysternami GER. $\times 30\ 000$. (Karasek i Marek [26], za zgodą wydawcy).

Ryc. 11. Szyszynka szczura. Tworzenie VFC z rozszerzonej części cysterny GER (strzałka). $\times 35\ 000$ (Karasek — zdjęcie nie publikowane).

Ryc. 12. Szyszynka kreta. Dwa nagromadzenia materiału parakrystalicznego wytrawionego przez pronazę (gwiazdki). Strzałka wskazuje miejsce, gdzie wytrawienie jest niecałkowite. $\times 29\ 000$ (Pevet [59], za zgodą wydawcy).

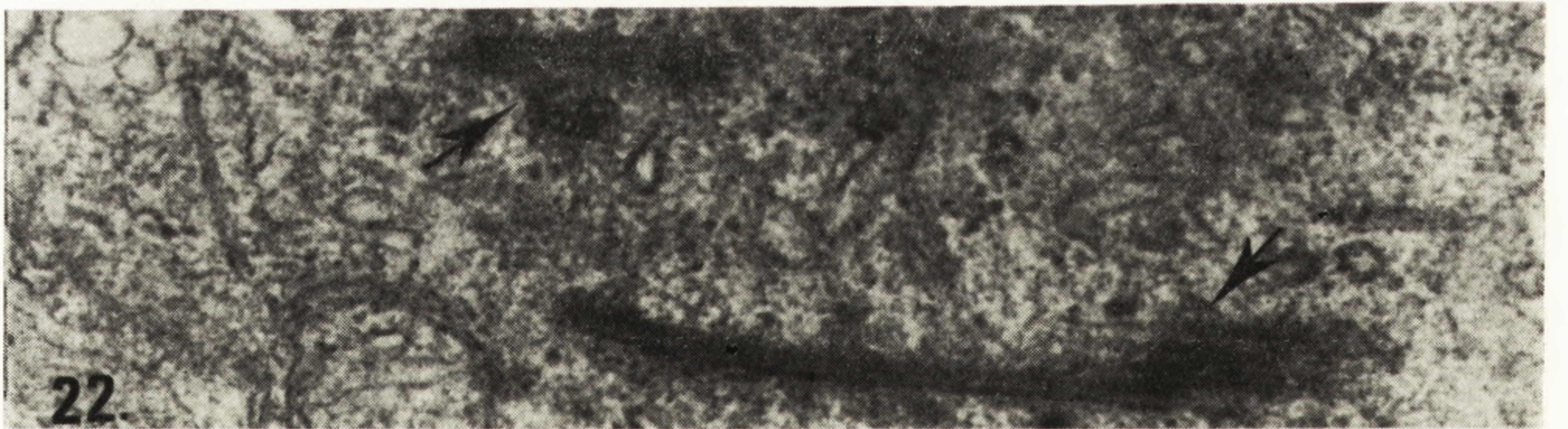
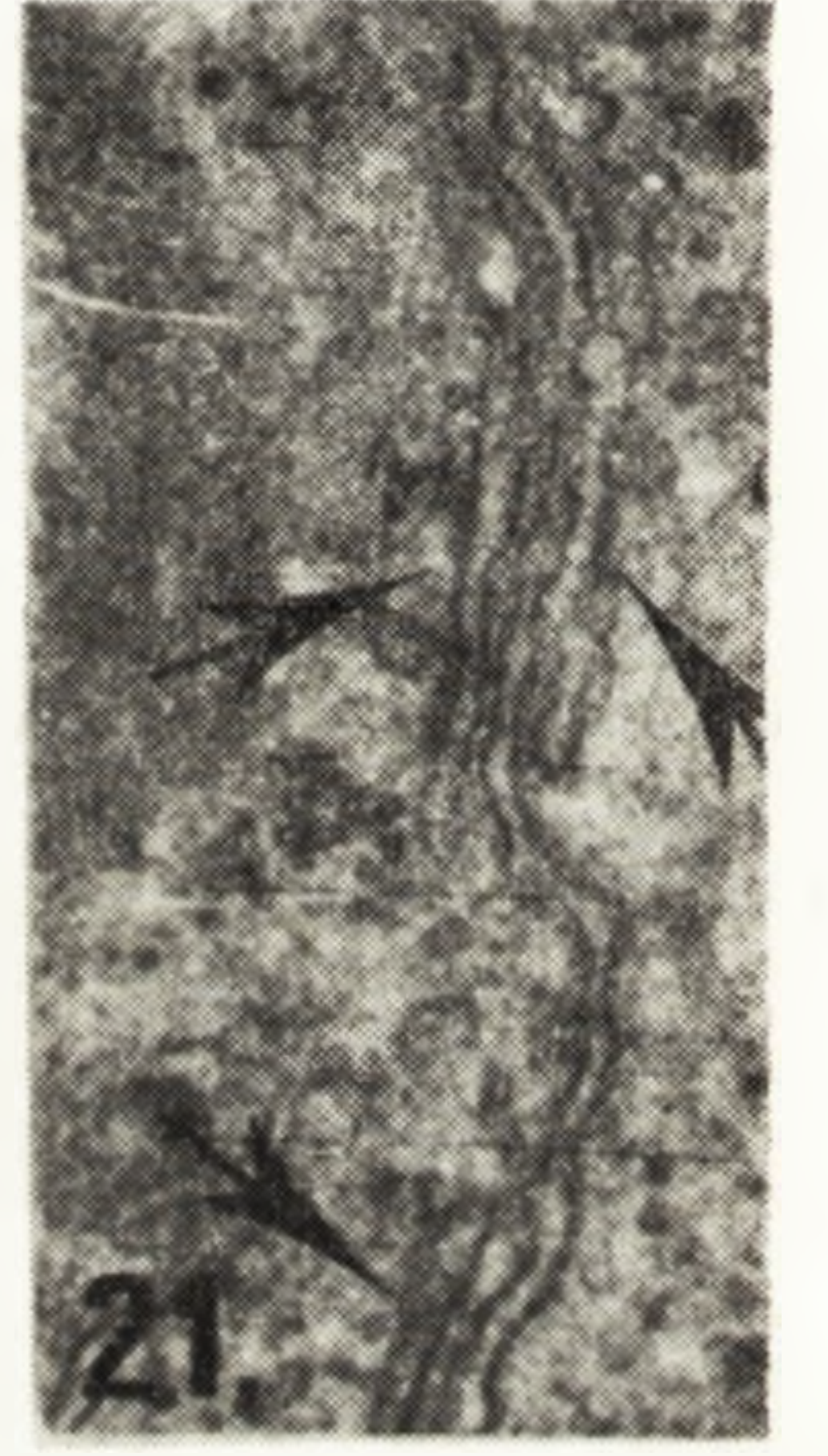
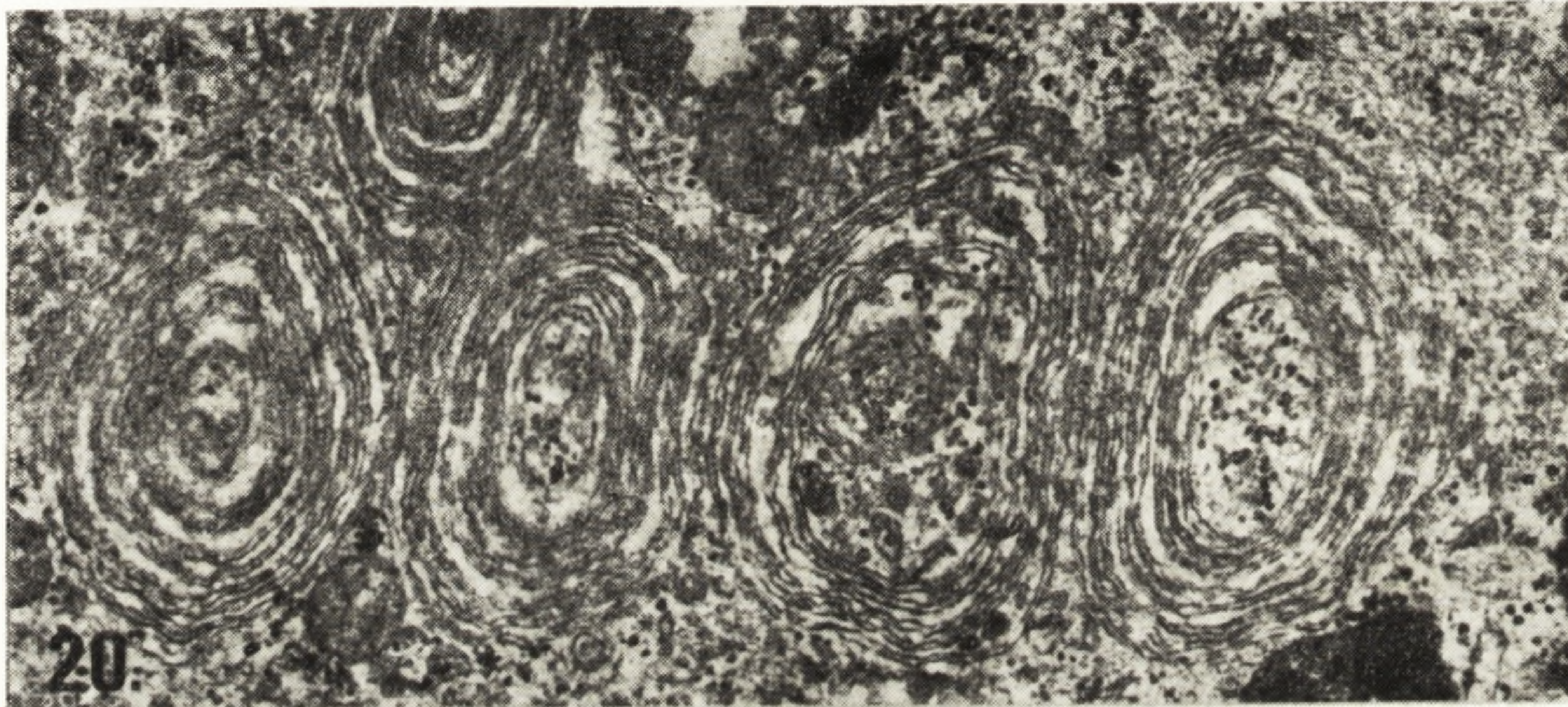
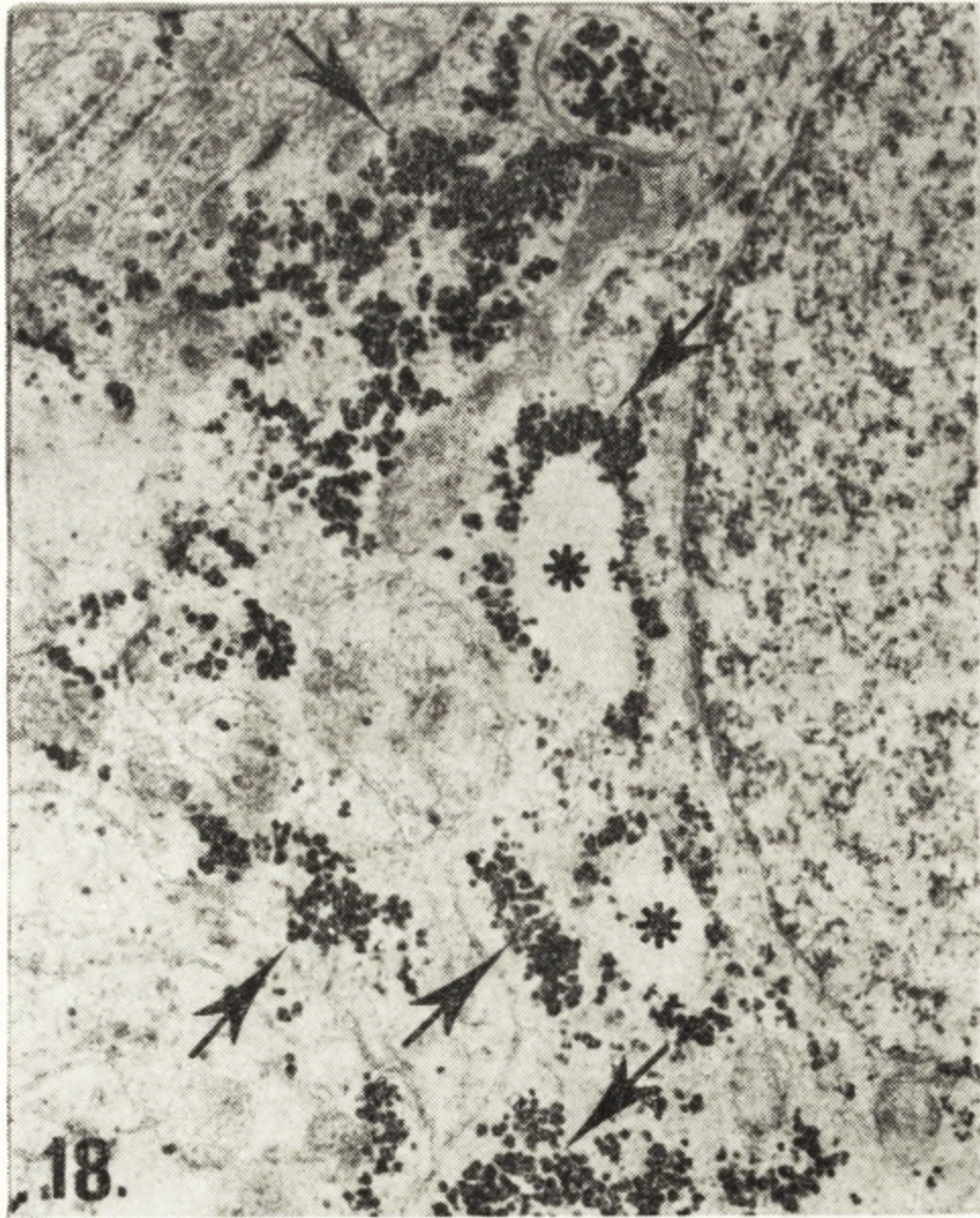


Ryc. 14. Szyszynka szczura. Krople tłuszczu (gwiazdki) w cytoplazmie pinealocyta. $\times 40\ 000$ (Karasek — zdjęcie nie publikowane).

Ryc. 15. Szyszynka szczura. Prążki „synaptyczne” (strzałki) w cytoplazmie pinealocyta. $\times 88\ 000$ (Karasek — zdjęcie nie publikowane).

Ryc. 16. Szyszynka szczura. Ciała gęste (strzałki) w cytoplazmie pinealocyta. $\times 38\ 000$ (Karasek — zdjęcie nie publikowane).

Ryc. 17. Szyszynka świni. Ciała gęste w wypustce pinealocyta. $\times 20\ 000$ (Karasek i Wyrzykowski — zdjęcie nie publikowane).



Ryc. 18. Szyszynka nietoperza. Liczne zgrupowania ziaren glikogenu (strzałki). Gwiazdką oznaczono wakuole. $\times 18\ 000$ (Pevet i wsp. [64], za zgodą wydawcy).

Ryc. 19. Szyszynka nietoperza. Skrawek barwiony metodą PATAg według Thierry'ego w celu ujawnienia glikogenu. Gwiazdką oznaczono wakuolę znajdującą się w centrum nagromadzenia glikogenu. $\times 21\ 000$ (Pevet i wsp. [64], za zgodą wydawcy).

Ryc. 20. Szyszynka ślepeca. Liczne błony koncentryczne w cytoplazmie pinealocyta. $\times 22\ 000$ (Pevet i wsp. [63], za zgodą wydawcy).

Ryc. 21. Szyszynka szczura. Cysterny powierzchniowe (strzałki) w dwóch sąsiednich komórkach. $\times 35\ 000$ (Karasek — zdjęcie nie publikowane).

Ryc. 22. Szyszynka szczura. Pęczki mikrotubul (strzałki) w cytoplazmie pinealocyta. $\times 40\ 000$ (Karasek — zdjęcie nie publikowane).

W badaniach nad lokalizacją syntezy amin indolowych najlepsze wyniki autoradiograficzne uzyskano używając znakowanej trytem 5-hydroksytryptaminy. Wykazano rozproszoną lokalizację tego związku w pinealocytach u szczura [2], myszy [15], królika [80] i małpy [41], co sugeruje, że synteza serotoniny i innych związków indolowych nie przebiega w otoczonych błoną organellach, lecz w obrębie cytosolu. Pamiętając o tym, a także o fakcie, że większość obserwacji ultrastrukturalnych dotyczy właśnie struktur błoniastych, należy stwierdzić, że jest prawdopodobnie iż dotychczasowe badania ultrastrukturalne szyszynki dotyczyły głównie procesów związanych z syntezą i wydzielaniem substancji polipeptydowych jako prawdopodobnych hormonów tego gruczołu. Oczywiście nie znaczy to, że można ignorować związki indolowe jako substancje czynne szyszynki, zwłaszcza że u niektórych gatunków niższych kręgowców wykazano współistnienie amin indolowych i związków o naturze białkowej w tych samych strukturach komórkowych [12].

W ostatnich latach koncentrowaliśmy nasze wysiłki badawcze na ultrastrukturalnej analizie procesów wydzielniczych w szyszynce ssaków. Analiza uzyskanych wyników, łącznie z danymi innych autorów pozwoliła nam stwierdzić, że w pinealocytach ssaków istnieją co najmniej dwa procesy wydzielnicze związane z syntezą i uwalnianiem substancji o naturze białkowej [58, 65]. Pierwszy z tych procesów, zaproponowany przez Viviena [88] u węża, a uogólniony następnie na inne owodniowce przez Collina [10–12] i Oksche i wsp. [48], charakteryzuje się wytwarzaniem pęcherzyków ziarnistych w obrębie aparatu Golgiego; drugi, zaproponowany ostatnio przez nas [26, 58, 65], polega na szczególnej aktywności ziarnistej siateczki śródplazmatycznej, w obrębie której następuje gromadzenie materiału w rozszerzonych cysternach lub wytwarzanie przez te cysterny wakuoli o kłaczkowatej zawartości. U tych gatunków, u których występują dwie populacje pinealocytów, każdy z procesów jest charakterystyczny dla jednej z nich [58], natomiast u tych gatunków, u których populacja pinealocytów jest jednorodna obydwie procesy obserwuje się w tej samej komórce [23, 24] (ryc. 2).

Poza omówieniem tych dwóch procesów wydzielniczych pragniemy zwrócić także uwagę na pewne struktury pinealocytów w aspekcie możliwości ich udziału w mechanizmach wydzielniczych.

APARAT GOLGIEGO I PĘCHERZYKI ZIARNISTE

Pęcherzyki ziarniste (GV) (ryc. 3) były obserwowane praktycznie u wszystkich badanych do chwili obecnej gatunków ssaków (patrz [60]). U takich gatunków jak: chomik [84], mysz [16] i złotokret [66] GV występują w bardzo dużych ilościach. Wytwarzane są one w aparacie Golgiego (ryc. 4 i 5) i znajdują się zarówno w ciele komórki (ryc. 5), jak

i w wypustkach (ryc. 3 i 6). Przyjmuje się, że GV są przemieszczane do wypustek i z nich są uwalniane do przestrzeni pozakomórkowych. Możliwe jest uwalnianie materiału magazynowego w GV przez dysocjację¹ ich zawartości lub drogą egzocytozy [24, 28, 61].

Znaczenie czynnościowe GV nie jest jasne. Stwierdzono jednakże, że ich liczba jest zmienna w różnych stanach fizjologicznych i w warunkach doświadczalnych. Wykazano rytm dobowy GV u myszy [6, 42] i u królika [79]. Zwiększenie liczby GV stwierdzono u szczura po podaniu hormonów gonadotropowych [26, 27], a także w hodowli narządowej szyszynki szczura [20] i królika [78] po dodaniu noradrenaliny. Lin i wsp. [40] zaobserwowali spadek liczby GV po usunięciu zwojów szyjnych górnych u chomika.

Uważa się powszechnie, że GV stanowią ziarna zawierające materiał wydzielniczy szyszynki. W tym kontekście interesujące jest ich morfologiczne podobieństwo do ziaren neurosekrecyjnych w zewnętrznej warstwie palisadowej wyniosłości pośrodkowej, gdzie wykazano obecność LH-RH [55]. Jednakże dopiero poznanie natury chemicznej substancji zawartej w GV pozwoli na ostateczne określenie ich właściwego znaczenia w mechanizmach wydzielniczych szyszynki.

U gadów i ptaków wykazano współistnienie komponenty białkowej i związków indolowych w GV (patrz [12]). Juillard [17], stwierdzając wytrawienie zawartości GV u myszy i chomika przez enzymy proteolityczne, potwierdziła naturę białkową zawartości GV także u ssaków. Według niej „białkowa komponenta GV może być: 1. nośnikiem dla serotoniny i jej pochodnych, lecz jest prawdopodobnie 2. specyficznym kompleksem neurohormon peptyderygiczny — nośnik, z którym może być związana mniej lub bardziej istotna część indoloaminergiczna”.

Część autorów umiejscawia w GV substancję antygonadotropową szyszynki [6, 85]. Trzeba jednak stwierdzić, że u większości zwierząt żyjących w warunkach naturalnych w strefie umiarkowanej i podbiegunowej liczba GV jest stosunkowo mała, natomiast u złotokreta [66] i szczura malajskiego [70], zwierząt żyjących w strefie równikowej, stwierdzono bardzo liczne GV. Należy przypomnieć, że szyszynka uczestniczy w kontroli reprodukcji będąc synchronizatorem endokrynnym między informacją o oświetleniu a stanem narządów płciowych [73, 74]. Pevet [60] na podstawie faktu występowania dużej liczby GV u zwierząt żyjących w strefie równikowej, gdzie wahania w długości dnia są bardzo małe, uważa za możliwe, że substancja (hormon?) magazynowana w GV jest

¹ „Dysocjacja zawartości” została użyta w znaczeniu przeniknięcia substancji do przestrzeni pozakomórkowych bez łączenia się błony ziarnistości z błoną komórkową.

związana z kontrolą wrażliwości narządów płciowych na inne hormony szyszynki.

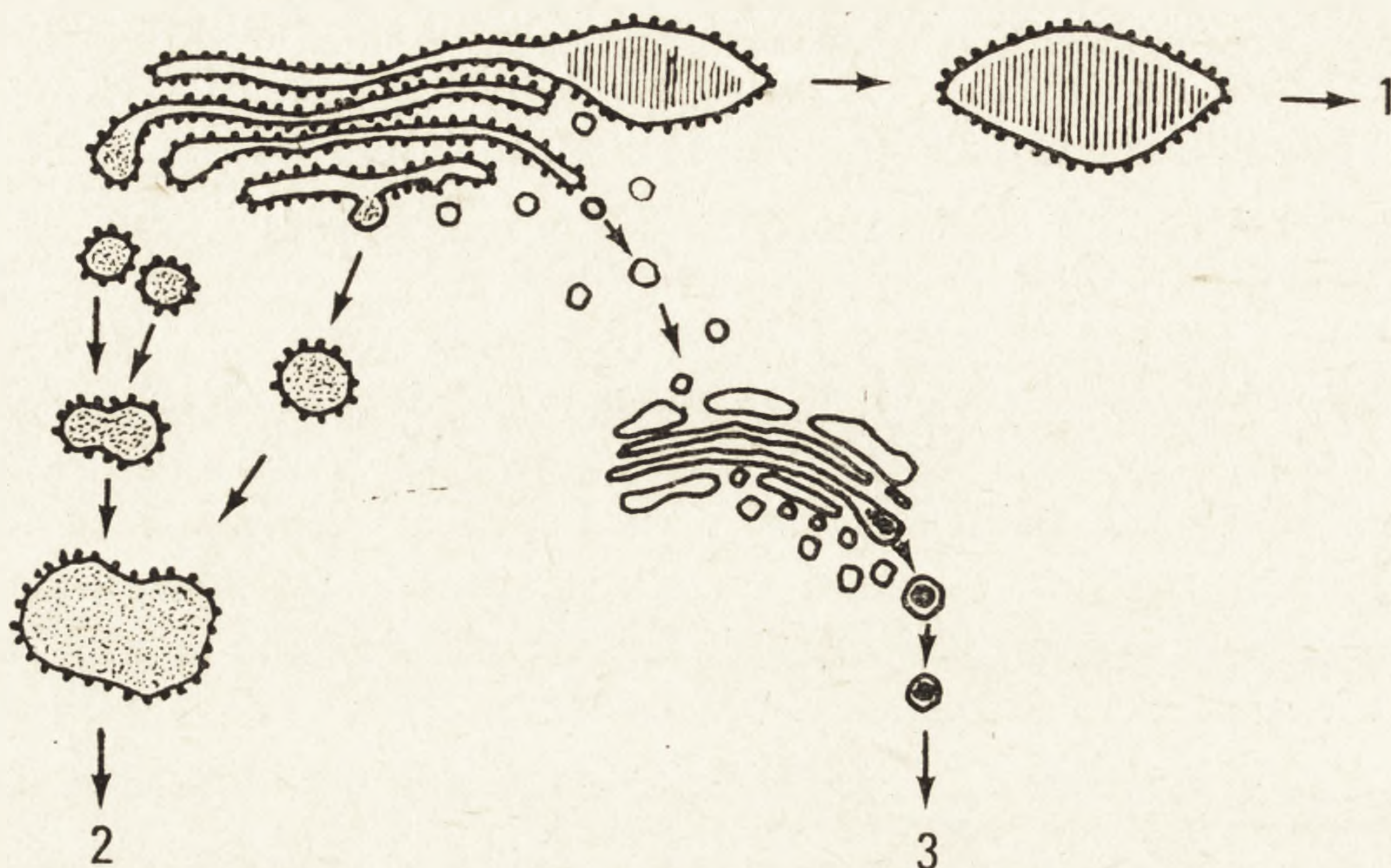
EPENDYMO PODOBNY PROCES WYDZIELNICZY

U wielu ssaków obserwuje się szczególną aktywność ziarnistej siateczki śródplazmatycznej (GER), polegającą na gromadzeniu materiału w jej cysternach (ryc. 7 i 8) lub na tworzeniu przez GER wakuoli z kłaczkowatą zawartością (ryc. 9–11). Materiał gromadzony w cysternach GER ulega wytrawieniu przez pronazę, co świadczy o jego białkowej naturze (ryc. 12).

Większość procesów wydzielniczych związanych z wytwarzaniem substancji białkowej przebiega według ogólnie przyjętego schematu, według którego synteza białka następuje w cysternach GER, a jej produkt jest następnie transportowany do aparatu Golgiego i tu otaczany błoną. Przyjmując ten schemat w odniesieniu do szyszynki, można by przypuszczać, że cysterny i wakuole GER obserwowane w pinealocytach są jedynie wyrazem transportu świeżo zsyntetyzowanego materiału do aparatu Golgiego. Takiej interpretacji przeczą jednak obserwowane przez nas [30] obrazy bezpośredniego uwalniania materiału zawartego w wakuolach do przestrzeni pozakomórkowej, a także fakt, że u nietoperza i ślepca wakuole takie występują w innej populacji komórkowej niż GV [63, 64] i z tego powodu nie mogą być bezpośrednio związane z tworzeniem tych pęcherzyków. Podobny mechanizm biosyntezy i uwalniania materiału białkowego z GER bez udziału aparatu Golgiego został opisany w narządzie podsklepieniowym przez Vigh i wsp. [86, 87] i nazwany przez tych autorów „ependymo sekrecją” lub „neurosekrecją ependymalną”. Z uwagi na podobieństwo morfologiczne sekrecji ependymalnej do opisanej szczególnej aktywności GER w pinealocytach niektórych ssaków Pevet [60] nazwał ten specyficzny proces wydzielniczy pinealocytów „procesem wydzielniczym ependymo podobnym”. Warto podkreślić, że Renold [76] w szczegółowych badaniach biochemicznych i ultrastrukturalnych nad biosyntezą insuliny wykazał, że świeżo wytworzony hormon może być uwalniany bezpośrednio z cystern GER z pominięciem aparatu Golgiego. Autor ten uważa, że proinsulina może być uwalniana tą drogą, podczas gdy wytwarzanie i uwalnianie insuliny odbywa się drogą klasyczną, obejmującą wytwarzanie ziaren wydzielniczych przez aparat Golgiego. Należy podkreślić, że Pevet [62] obserwował u płodów kreta, w tej samej komórce, tworzenie GV przez aparat Golgiego, tworzenie VFC i materiału parakrystalicznego przez cysterny GER (ryc. 13).

Gromadzenie materiału w cysternach GER obserwowane jest zwłaszcza u ryjących ślepych zwierząt, takich jak kret [56] czy ślepiec [63].

Wykazano korelację między wytwarzaniem tych struktur a stanem aktywności osi podwzgórzowo-przysadkowo-gonadowej [57]. U jeża wykazano zwiększenie liczby VFC na początku okresu spokoju płciowego [67] oraz na początku wywołanego doświadczalnie obniżenia aktywności



Ryc. 13. Schemat różnych procesów wydzielniczych w pinealocycie płodu kreta; 1 — wytwarzanie materiału parakrystalicznego przez cysterny GER, 2 — wytwarzanie wakuoli o kłaczkowatej zawartości przez cysterny GER, 3 — wytwarzanie pęcherzyków ziarnistych przez aparat Golgiego (Pevet [62], za zgodą wydawcy).

płciowej [57, 68]. Wykazano także wybitne zwiększenie liczby VFC u szczurów po kastracji oraz po podawaniu hormonów gonadotropowych [26, 27, 30].

Ependyma podobny proces wydzielniczy jest szczególnie silnie wyrażony u kreta i ślepca, zwierząt, których czynność szyszynki (prawdopodobnie antygonadotropowa) jest pobudzona przez ich życie pod ziemią. Przyjmując hipotezę Reitera [73, 74], że szyszynka kontroluje roczny cykl płciowy ssaków, możliwe wydaje się być wytłumaczenie specjalnego rozwoju cyklu płciowego tych zwierząt, charakteryzującego się bardzo długim okresem spokoju płciowego i krótkim, lecz intensywnym okresem aktywności płciowej [60].

Chociaż nie wiemy obecnie jaka substancja jest wytwarzana w ependyma podobnym procesie wydzielniczym, na podstawie przytoczonych danych wydaje się, że proces ten odgrywa istotną rolę w fizjologii szyszynki i może być związany z wytwarzaniem szyszynkowej substancji antygonadotropowej. Konieczne są jednakże dalsze badania, zwłaszcza immunocytochemiczne, dla rozwiązania tego problemu.

INNE STRUKTURY KOMÓRKOWE ZWIĄZANE Z AKTYWNOŚCIĄ PINEALOCYTÓW

Krople tłuszczu. Krople tłuszczu występują w różnej ilości w pinealocytach u wszystkich gatunków ssaków. Sprzeczne są poglądy na temat ich fizjologicznej roli w komórkach szyszynki. Wielu autorów uważa, że mają one pewne znaczenie w metabolizmie szyszynki. U szczura, u którego krople tłuszczu występują w dużej liczbie, wykazano wahania w różnych warunkach naturalnych i doświadczalnych (patrz [71]). W naszych badaniach stwierdziliśmy, że zwiększenie liczby kropli tłuszczu w pinealocytach szczura towarzyszyło zwiększonej aktywności tych komórek, np. po drażnieniu zwojów szyjnych górnych [28], po usunięciu gonad [30], po podawaniu hormonów gonadotropowych [26, 27], po oślepieniu [43] czy w ostatnim dniu ciąży [25], podczas gdy obrazom zmniejszonej aktywności komórek szyszynki towarzyszył spadek liczby kropli tłuszczu [18]. Jakkolwiek wydaje się, że lipidy mają przede wszystkim znaczenie w ogólnym metabolizmie szyszynki nie można odrzucić przypuszczenia, że są one związane także z procesami wydzielniczymi tego gruczołu.

Prążki „synaptyczne”. Prążki „synaptyczne” („synaptic” ribbons) lub pałeczki otoczone pęcherzykami (vesicle-crowned rodlets) występują często w ciele komórkowym lub w wypustkach pinealocytów ssaków [1, 22, 89, 91]. Struktury te są zbudowane z elektronowo gęstej pałeczki (z ciemniejszą linią w środku) otoczonej pojedynczym pokładem małych pęcherzyków (ryc. 15). Prążki „synaptyczne” (PS) leżą pojedynczo lub w grupach po kilka, często blisko błony komórkowej. Chociaż PS poświęcono w latach ostatnich wiele uwagi, ich rola nie jest znana. Często uważane są za relikty filogenetyczny, gdyż „prawdziwe” prążki synaptyczne, typowe dla połączeń synaptycznych, występują w komórkach fotoreceptorowych szyszynki u niższych kręgowców (patrz [11, 12]). Wykazano jednakże, że liczba PS może się zmieniać w zależności od różnych czynników naturalnych i doświadczalnych. Wykazano wahania w liczbie PS w pinealocytach ssaków w rytmie dobowym [31, 36, 89], po stosowaniu światła ciągłego [77, 90], w ciąży [42], po usunięciu zwojów szyjnych górnych [77], po kastracji [22] i w hodowli narządowej [22]. Wykazano także zniesienie rytmu dobowego PS w hodowli narządowej szyszynki szczura [31].

Wszystkie te spostrzeżenia potwierdzają wysuniętą uprzednio przez Vollratha [89] i przez nas [22, 59] hipotezę, że PS nie są reliktem filogenetycznym, lecz strukturą o istotnym, choć nie wyjaśnionym dotychczas, znaczeniu fizjologicznym. Nie wykazano w PS w szyszynce aktywności acetylocholinesterazy [1], pirofosfatazy tiaminowej ani znamiennych ilości jonów sodu i wapnia, [34], co wskazuje, że w szyszynce PS nie

są związane bezpośrednio z czynnością przewodzenia synaptycznego [60]. Z tego względu niektórzy autorzy proponują używanie nazwy pałeczki otoczone pęcherzykami [1, 60, 61].

Ciałka gęste. U niektórych gatunków ssaków w pinealocytach występują otoczone błoną ciała, których zawartość wykazuje różną gęstość elektronową. U szczura np. ciała gęste (DB) mogą być kuliste lub wydłużone, o średnicy 0,2–0,8 μm i z reguły mają drobnoziarnistą zawartość (ryc. 16) [21, 24]. U świni występuje duża różnorodność struktury wewnętrznej ciałek gęstych (ryc. 17) [32]. Niektórzy autorzy uważają te ciała za lizosomy. Wykazano jednak, że jedynie część DB wykazuje aktywność fosfatazy kwaśnej [1, 2, 19, 32]. Wolfe [91] uważa, że DB mogą być charakterystycznymi ziarnistościami wydzielniczymi komórek szyszynki. Chociaż hipoteza ta nie została powszechnie przyjęta, duża liczba DB w niektórych zakończeniach wypustek pinealocytów, a także wahania ich liczby w różnych stanach czynnościowych tych komórek [24] sugerują, że struktury te mogą odgrywać rolę w mechanizmach wydzielniczych szyszynki. Warto wspomnieć, że w komórkach przysadki lizosomy odgrywają rolę w regulacji procesów wydzielniczych [14]. Działają one jako dodatkowy mechanizm kontrolujący w przypadku nadprodukcji materiału wydzielniczego, którego nadmiar jest niszczoney właśnie przez enzymy lizosomy. Zjawisko to nosi nazwę krynofagii. Występowanie krynofagii postulowano także w komórkach szyszynki szczura [30] i świni [32]. Lizosomy odgrywają także istotną rolę w procesach wydzielniczych w tarczycy [35, 92].

Nie należy jednak całkowicie odrzucać możliwości, że niektóre z różnorodnych form DB stanowią miejsce magazynowania produktów wydzielniczych komórek szyszynki.

Glikogen i systemy wakuolarne. Chociaż badania nad obecnością glikogenu w pinealocytach ssaków wykonano u licznych gatunków (patrz [71]), stwierdzono jego występowanie w znamiennej ilości jedynie u niektórych ssaków (ryc. 18 i 19). Szczególnie dużo jest glikogenu w pinealocytach złotokreta [66], ślepeca [63] i nietoperza [64], a więc zwierząt o bardzo aktywnej szyszynce. U nietoperza [64] i złotokreta [66] glikogen wydaje się być związany z procesem tworzenia wakuoli cytoplazmatycznych, które powstają z rozszerzonych cystern GER. Rozszerzenie takie wydaje się być poprzedzone gromadzeniem się glikogenu w najbliższym sąsiedztwie cystern GER (ryc. 18 i 19). U niektórych innych gatunków ssaków, takich jak: jeż [57], kret [57] i koszatka [82], występują jednakże w pinealocytach wakuole, osiagające niekiedy znaczną wielkość, także będące wynikiem rozszerzenia cystern GER, których związku z glikogenem nie wykazano. Chociaż potrzebne są dalsze bada-

nia nad rolę wakuoli cytoplazmatycznych, Pevet [60] uważa, że mogą być miejscem magazynowania i/lub dojrzewania niektórych produktów wydzielniczych.

Błony koncentryczne. Koncentrycznie ułożone błony (concentric lamellae, membrane whorls) (CL) wykryto w pinealocytach u niektórych gatunków ssaków (ryc. 20) (krowa, chomik, jeź, ślepiec, nietoperze — patrz [60]). Podobne struktury obserwowano także w innych typach komórek, zwłaszcza gruczołów dokrewnych: komórkach luteinowych [8, 47], komórkach Leydiga [3, 29] i komórkach jądra łukowatego podwzgórze [33]. Duża liczba CL w pinealocytach takich zwierząt jak ślepiec i nietoperz sugeruje, że występują one w komórkach o dużej aktywności wydzielniczej. Obserwacje tworzenia CL u jeży w okresie postępującego obniżania aktywności płciowej [57], jak również zwiększenie ich liczby u kosałki w okresie spokoju płciowego [83] i u chomika po oślepieniu [9] potwierdzają tę hipotezę. Należy jednak podkreślić, że CL występują u stosunkowo nielicznych gatunków ssaków.

Błony pierścieniowe, cysterny podpowierzchniowe, pęczki mikrotubul. W komórkach szyszynki niektórych ssaków występują niekiedy struktury nazywane błonami pierścieniowymi (annulate lamellae, canaliculate lamellar body, cisternal grille, microtubuli, unusual organelle) (patrz [24, 60]), które według McNeila [45] mogą być związane z aktywnością wydzielniczą szyszynki. Jednakże dostępne obecnie dane nie pozwalają na zdefiniowanie znaczenia tych struktur.

W pinealocytach obserwuje się niekiedy występowanie opisanych także w innych komórkach [81] cystern podpowierzchniowych (subsurface cisterns) ułożonych tuż pod błoną komórkową, często w dwóch sąsiednich komórkach naprzeciw siebie (ryc. 21). Pevet [60] uważa, że mogą one stanowić drogę dla wymiany metabolitów lub jonów między sąsiednimi komórkami.

W niektórych komórkach szyszynki są także spotykane struktury opisane jako pęczki mikrotubul (microtubular sheaves, microtubular bouquet — patrz [24]) (ryc. 22). Sugerowano ich pochodzenie z przekształconych centrioli [38, 39, 91]. Na podstawie zwiększenia liczby pęczków mikrotubul w aktywnych pinealocytach sugerowaliśmy, że mogą one brać udział w transporcie substancji czynnych szyszynki [24]. Karasek [22] uważa także, że pęczki mikrotubul mogą odgrywać rolę w tworzeniu prążków „synaptycznych”.

PODSUMOWANIE

Przedstawione dane dowodzą istnienia przynajmniej dwóch procesów wydzielniczych w szyszynce ssaków: 1. tworzenie pęcherzyków ziarni-

stych w obrębie aparatu Golgiego, 2. akumulacja materiału w cysternach GER lub wytwarzanie specyficznych wakuoli przez te cysterny. Powstaje pytanie, czy procesy te są całkowicie odrębne, czy są ze sobą w jakiś sposób związane. Niestety badania ultrastrukturalne nie są w stanie dać jednoznacznej odpowiedzi na postawione pytanie. U nietoperza i ślepca każdy z opisanych procesów jest charakterystyczny dla dwóch odrębnych populacji komórek, co mogłoby sugerować, że są to procesy niezależne. U jeża i kreta natomiast procesy te obserwuje się w tej samej populacji komórek, a u szczura nawet w tej samej komórce.

Zmiany ilościowe takich struktur jak: krople tłuszczu, prążki „synaptyczne”, ciała gęste i błony koncentryczne, występujące zarówno w warunkach fizjologicznych, jak i eksperymentalnych mogą świadczyć, że struktury te biorą także udział w mechanizmach wydzielniczych komórek szyszynki.

Wydaje się oczywiste, że jedynie identyfikacja chemiczna i immunocytochemiczna różnych substancji wytwarzanych przez komórki szyszynki pozwoli na ściśle sprecyzowanie roli tego gruczołu. Możemy jednak obecnie uważać szyszynkę za endokrynną modulator systemów regulujących, z których pewne, jak np. system reprodukcyjny, są zależne od właściwej synchronizacji z warunkami środowiska zewnętrznego.

LITERATURA

- [1] ARSTILA A. U., Electron microscopic studies on the structure and function of the pineal gland of the rat, *Neuroendocrinol.*, 2, suppl. 1, 1-101, 1967.
- [2] ARSTILA A. U., KALIMO H. O., HYYPPÄ M., Secretory organelles of the rat pineal gland: electron microscopic and histochemical studies in vivo and in vitro, [w:] *The pineal gland*, red. G. E. W. Wolstenholme i J. Knight, Churchill Livingstone, Edinburgh 1971, 147-164.
- [3] BELT W. D., CAVAZOS L. P., Fine structure of the interstitial cells of Leydig in the boar, *Anat. Rec.*, 158: 333-350, 1967.
- [4] BENSON B., Current status of pineal peptides, *Neuroendocrinol.*, 24: 241-258, 1977.
- [5] BENSON B., EBELS I., Pineal peptides, *J. neural Transmiss.*, suppl. 13, 157-173, 1978.
- [6] BENSON B., KRASOVICH M., Circadian rhythm in the number of granulated vesicles in the pinealocytes of mice. Effect of sympathectomy and melatonin treatment, *Cell Tiss. Res.*, 184: 499-506, 1977.
- [7] BENSON B., MATTHEWS M. J., RODIN A. E., Studies on a non-melatonin pineal antigonadotropin, *Acta Endocrinol.*, 69: 257-266, 1972.
- [8] BLANCHETTE E. J., Ovarian steroid cells. II. The lutein cells, *J. Cell Biol.*, 31: 517-542, 1966.
- [9] CLABOUGH J. W., Ultrastructural features of the pineal gland in normal and light deprived golden hamsters, *Z. Zellforsch.*, 114: 151-164, 1971.
- [10] COLLIN J. P., Contribution á l'étude de l'organe pinéal. De l'épiphyse sen-

- sorielle á la glande pinéale: modalités de transformation et implication fonctionnelles, *Ann. Stat. Biol. Besse-en-Chandesse*, suppl. 1, 1-359, 1969.
- [11] COLLIN J. P., Differentiation and regression of the cells of the sensory line in the epiphysis cerebri, [w:] *The pineal gland*, red. G. E. W. Wolstenholme i J. Knight, Churchill Livingstone, Edinburgh, 1971, 79-125.
- [12] COLLIN J. P., Recent advances in pineal cytochemistry. Evidence of the production of indoleamines and proteinaceous substances by rudimentary photoreceptor cells and pinealocytes of amniota, *Progr. Brain Res.*, 52: 271-296, 1979.
- [13] EBELS I., BENSON B., A survey of the evidence that unidentified pineal substances affect the reproductive system in mammals, *Progr. reprod. Biol.*, 4: 51-89, 1978.
- [14] FARQUHAR M. G., SKUTELSKY E. M., HOPKINS C. R., Structure and function of the anterior pituitary and dispersed pituitary cells. In vitro studies, [w:] *The anterior pituitary*, red. A. Tixier-Vidal i M. G. Farquhar, Academic Press, New York 1975, 83-135.
- [15] GERSHON M. D., ROSS L. L., Localization of sites of 5-hydroxytryptamine storage and metabolism by autoradiography, *J. Physiol. (Lond.)*, 186: 477-492, 1966.
- [16] ITO T., MATSUSHIMA S., Electron microscopic observation on the mouse pineal with particular emphasis on its secretory nature, *Arch. histol. jap.*, 30: 1-15, 1968.
- [17] JUILLARD M. T., The proteinaceous content and possible physiological significance of dense-cored vesicles in hamster and mouse pinealocytes, *Ann. Biol. anim. Bioch. Biophys.*, 19: 413-428, 1979.
- [18] KARASEK M., Ultrastructure of the epiphysis in white rats under normal conditions and after hypophysectomy, *Pol. Endocr.*, 22: 13-26, 1971.
- [19] KARASEK M., Ultrastruktura szyszynki szczura białego w różnych warunkach doświadczalnych, *Praca habilitacyjna*, Łódź 1973.
- [20] KARASEK M., Ultrastructure of rat pineal gland in organ culture: influence of norepinephrine, dibutyryl cyclic adenosine 3',5'-monophosphate and adeno-hypophysis, *Endokrinologie*, 64: 106-114, 1974.
- [21] KARASEK M., *Szyszynka*, PZWL, Warszawa 1976.
- [22] KARASEK M., Quantitative changes in number of "synaptic" ribbons in rat pinealocytes after orchidectomy and in organ culture, *J. neural. Transmiss.*, 38: 149-157, 1976.
- [23] KARASEK M., Ultrastructural study of the pineal-adenohypophysial relationships in rats, *Progr. Brain Res.*, 52: 195-198, 1979.
- [24] KARASEK M., Some functional aspects of the ultrastructure of rat pinealocytes. *Endocr. Exp.*, w druku.
- [25] KARASEK M., LEWIŃSKA I., LEWIŃSKI A., dane niepublikowane.
- [26] KARASEK M., MAREK K., Influence of gonadotropic hormones on the ultrastructure of rat pinealocytes, *Cell Tiss. Res.*, 188: 134-141, 1978.
- [27] KARASEK M., MAREK K., KUNERT-RADEK J., Ultrastructure of rat pinealocytes in vitro: influence of gonadotropic hormones and LH-RH, *Cell Tiss. Res.*, 195: 547-556, 1978.
- [28] KARASEK M., MAREK K., ORŁOWSKA-MAJDAK M., Influence of pre-ganglionic stimulation of superior cervical ganglion on the ultrastructure of the pineal gland, *Folia Morph. (Warsz.)*, 38: 461-472, 1979.

- [29] KARASEK M., PAWLIKOWSKI M., The fine structure of Leydig cells in biopsy material from the human male gonad, *Pol. Endocr.*, **20**: 252-261, 1969.
- [30] KARASEK M., PAWLIKOWSKI M., ARIËNS KAPPERS J., STEPIEŃ H., Influence of castration followed by administration of LH-RH on the ultrastructure of rat pinealocytes, *Cell Tiss. Res.*, **167**: 325-339, 1976.
- [31] KARASEK M., VOLLRATH L., dane niepublikowane.
- [32] KARASEK M., WYRZYKOWSKI Z., The ultrastructure of pinealocytes in the pig, *Cell Tiss. Res.*, **211**: 151-161, 1980.
- [33] KING J. C., WILLIAMS T. H., GERALL A. A., Transformations of hypothalamic arcuate neurons. I. Changes associated with stages of estrous cycle, *Cell Tiss. Res.*, **153**: 497-515, 1975.
- [34] KRSTIC R., Ultracytochemistry of the synaptic ribbons in the rat pineal organ, *Cell Tiss. Res.*, **166**: 135-143, 1976.
- [35] KUROSUMI K., FUITA H., Functional morphology of endocrine glands, Georg Thieme, Stuttgart 1975.
- [36] KURUMADO K., WATARU M., A morphological study of the circadian cycle of the pineal gland of the rat, *Cell Tiss. Res.*, **182**: 565-568, 1977.
- [37] LERNER A. B., CASE J. D., TAKAHASHI Y., LEE H., MORI W., Isolation of melatonin, the pineal factor that lightens melanocytes, *J. Am. Chem. Soc.*, **80**: 2587, 1958.
- [38] LIN H. S., The fine structure and transformation of centrioles in the rat pinealocyte, *Cytobios*, **2**: 129-151, 1970.
- [39] LIN H. S., Transformation of centrioles in pinealocytes of adult guinea-pigs, *J. Neurocytol.*, **1**: 61-68, 1972.
- [40] LIN H. S., HWANG B. H., TSENG C. Y., Fine structural changes in the hamster pineal gland after blinding and superior cervical ganglionectomy, *Cell Tiss. Res.*, **158**: 285-299, 1975.
- [41] LOUIS C. J., KENNY G. C., ANDERSON R. McD., Autoradiographic localization of 5-hydroxytryptamine in monkey pineal gland, *Experientia (Basel)*, **26**: 756-757, 1970.
- [42] LUES G., Die Feinstruktur der Zirbeldrüse normaler, trächtiger und experimental beeinflusster Meerschweinchen, *Z. Zellforsch.*, **114**: 38-60, 1971.
- [43] MAREK K., KARASEK M., Ultrastructure of the pineal gland in blinded rats, *Acta Med. Pol.*, **20**: 407-408, 1979.
- [44] MATSUSHIMA S., KACHI T., MUKAI S., MORISAWA Y., Functional relationship between sympathetic nerves and pinealocytes in the mouse pineal: quantitative electron microscopic observations, *Arch. histol., jap.*, **40**: 279-291, 1977.
- [45] McNEILL M. E., An unusual organelle in the pineal gland of the rat, *Cell Tiss. Res.*, **184**: 133-137, 1977.
- [46] MOORE R. Y., The innervation of the mammalian pineal gland, *Progr. reprod. Biol.*, **4**: 3-30, 1978.
- [47] MOTTA P., Electron microscope study of the human lutein cell with special reference to the secretory activity. *Z. Zellforsch.*, **98**: 233-247, 1969.
- [48] OKSCHE A., UECK M., RÜDENBERG C., Comparative ultrastructural studies of sensory and secretory elements in pineal organs, *Mem. Soc. Endocrinol.*, **19**: 7-25, 1971.
- [49] ORTS R. J., BRUOT B., SARTIN J. L., Inhibitory properties of a bovine pineal tripeptide; threonylseryllysine, influence on serum follicle-stimulating hormone, *Neuroendocrinol.*, **31**: 92-95, 1980.

- [50] ORTS R. J., LIAO T. H., SARTIN J. L., BRUOT B., Purification of tripeptide with anti-reproductive properties isolated from bovine pineal gland, *The Physiologist*, **21**: 87, 1978.
- [51] OTA M., DRONKERT A., GATES A. H., The presence of a gonadotropin-inhibiting substance in human urine, *Fert. Steril.*, **19**: 100-109, 1968.
- [52] OTA M., HSIEH K. S., OBARA K., Presence of a gonadotropin-inhibiting substance in the urine of albino rats, *Endocrinol. jap.*, **17**: 333-337, 1970.
- [53] PAVEL S., Arginine vasotocin as a pineal hormone, *J. neural Transmiss.*, suppl. 13, 135-155, 1978.
- [54] PAVEL S., MILCU M., NEASCU C., Biological and chromatographic characterization of a polypeptide with pressor and oxytocic activities isolated from bovine pineal gland, *Endocrinol.*, **72**: 563-566, 1963.
- [55] PELLETIER G., LABRIE F., PUVIANI R., ARIMURA A., SCHALLY A. V., Immunohistochemical localization of luteinizing hormone-releasing hormone in the rat median eminence, *Endocrinol.*, **95**: 314-317, 1974.
- [56] PEVET P., The pineal gland of the mole (*Talpa europaea* L.). I. The fine structure of the pinealocytes, *Cell Tiss. Res.*, **153**: 277-292, 1974.
- [57] PEVET P., Correlations between pineal gland and sexual cycle, Thesis, Amsterdam 1976.
- [58] PEVET P., On the presence of different populations of pinealocytes in the mammalian pineal gland, *J. neural Transmiss.*, **40**: 289-304, 1977.
- [59] PEVET P., The pineal gland of the mole (*Talpa europaea* L.). IV. Effect of pronase on material present in cisternae of the granular endoplasmic reticulum of pinealocytes, *Cell Tiss. Res.*, **182**: 215-219, 1977.
- [60] PEVET P., Secretary processes in the mammalian pinealocytes under natural and experimental conditions, *Progr. Brain Res.*, **52**: 149-192, 1979.
- [61] PEVET P., Ultrastructure of the mammalian pinealocytes, [w:] *The pineal gland: anatomy and biochemistry*, red. R. J. Reiter, C. R. C. Press, Palm Beach, w druku.
- [62] PEVET P., The pineal gland of the mole (*Talpa europaea* L.). VI. Fine structure of fetal pinealocytes, *Cell Tiss. Res.*, **206**: 417-430, 1980.
- [63] PEVET P., ARIËNS KAPPERS J., NEVO E., The pineal gland of the mole-rat (*Spalax ehrenbergi*, Nehring). I. Fine structure of pinealocytes, *Cell Tiss. Res.*, **174**: 1-24, 1976.
- [64] PEVET P., ARIËNS KAPPERS J., VOUTÉ M., The pineal gland of nocturnal animals. I. The pinealocytes of the bat *Nyctalus noctula*, Schreber, *J. neural Transmiss.*, **40**: 47-68, 1977.
- [65] PEVET P., KARASEK M., Are the pineal compounds of mammals proteinaceous in nature? An ultrastructural contribution, *Acta Med. Pol.*, **18**: 351-353, 1977.
- [66] PEVET P., KUYPER M. A., The ultrastructure of pinealocytes in the golden mole (*Amblysomus hottentotus*) with special reference to the granular vesicles, *Cell Tiss. Res.*, **191**: 39-56, 1978.
- [67] PEVET P., SABOUREAU M., L'épiphyse du Hérisson (*Erinaceus europaeus* L.) male. I. Les pinéalocytes et leurs variations ultrastructurales considérées au cours du cycle sexuel, *Z. Zellforsch.*, **143**: 367-385, 1973.
- [68] PEVET P., SABOUREAU M., Effect of serotonin administration on the ultrastructure of pinealocytes during the period of maximal sexual activity of the male hedgehog (*Erinaceus europaeus* L.), *Experientia (Basel)*, **30**: 1069-1070, 1974.

- [69] PEVET P., SMITH A. R., The pineal gland of the mole (*Talpa europaea* L.). II. Ultrastructural variations observed in the pinealocytes during different parts of the sexual cycle, *J. neural Transmiss.*, **36**: 227-248, 1975.
- [70] PEVET P., YADAV M., The pineal gland of equatorial mammals. I. The pinealocytes of the malaysian rat (*Rattus sabanus*), *Cell Tiss. Res.*, **210**: 417-433, 1980.
- [71] QUAY W. B., Pineal chemistry, Ch. C. Thomas, Springfield Ill. 1974.
- [72] REITER R. J., Influence of pinealectomy on the breeding capacity of hamsters maintained under natural photoperiodic and temperature conditions, *Neuroendocrinol.*, **13**: 366-370, 1973/74.
- [73] REITER R. J., The pineal gland: a regulator of regulators, *Progr. Psychobiol. Physiol. Psychol.*, **9**: 323-356, 1980.
- [74] REITER R. J., The pineal and its hormones in the control of reproduction in mammals, *Endocrine Rev.*, **1**: 109-131, 1980.
- [75] REITER R. J., HESTER R. J., Neuroendocrinological interrelationship, [w:] Metabolic regulation of physiological activity, red. B. Sacktor, R. J. Reiter, J. E. Wilson, H. J. Smith, C. G. Tiekert, R. J. Hester, Research Laboratories US Army, Edgewood Arsenal, Md. 1966, 13-18.
- [76] RENOLD A., Insulin biosynthesis and secretion. A still unsettled topic, *New Engl. J. Med.*, **282**: 173-182, 1970.
- [77] ROMIJN H. J., The ultrastructure of the rabbit pineal gland after sympathectomy, parasympathectomy, continuous illumination and continuous darkness, *J. neural Transmiss.*, **36**: 183-194, 1975.
- [78] ROMIJN H. J., GELSEMA A. J., Electron microscopy of the rabbit pineal organ in vitro. Evidence of norepinephrine-stimulated secretory activity of the Golgi apparatus, *Cell Tiss. Res.*, **172**: 365-377, 1976.
- [79] ROMIJN H. J., MUD M. T., WOLTERS P. S., Diurnal variations in number of Golgi dense core vesicles in light pinealocytes of the rabbit, *J. neural Transmiss.*, **38**: 231-237, 1976.
- [80] ROMIJN H. J., MUD M. T., WOLTERS P. S., A pharmacological and autoradiographic study on the ultrastructural localization of indoleamine synthesis in the rabbit pineal gland, *Cell Tiss. Res.*, **185**: 199-214, 1977.
- [81] ROSENBLUTH I., Subsurface cisterns and their relationship to the neuronal plasma membrane, *J. Cell Biol.*, **13**: 405-421, 1962.
- [82] ROUX M., RICHOUX J. P., Etude ultrastructurale de l'épiphyse du Lérot (*Eliomys quercinus* L.), vivant dans des conditions normales et expérimentales, *J. Microsc. Biol. Cell.*, **22**: 33a-34a, 1975.
- [83] ROUX M., RICHOUX J. P., DUSSART G., Etude ultrastructurale de l'épiphyse du Lérot (*Eliomys quercinus* L.), *Bull. Ass. Anat.*, **58**: 1-12, 1974.
- [84] SHERIDAN M. N., REITER R. J., The fine structure of the hamster pineal gland, *Amer. J. Anat.*, **122**: 357-367, 1968.
- [85] UPSON R. H., BENSON B., Effects of blinding on the ultrastructure of mouse pinealocytes with particular emphasis on the dense-cored vesicles, *Cell Tiss. Res.*, **183**: 491-498, 1977.
- [86] VIGH B., Ependymosecretion (*Ependymal neurosecretion*). Comparative histological study of the Gomori-positive secretion of the ependymal cells, Library of the Medical University, Budapest 1964.
- [87] VIGH B., RÖHLICH P., TEICHMANN I., AROS B., Ependymosecretion (*Ependymal neurosecretion*). VI. Light and electron microscopic examination

- of the subcommisural organ of the guinea pig, *Acta biol. Acad. Sci. hung.*, **18**: 53-69, 1967.
- [88] VIVIEN J. H., Ultrastructure des constituants de l'épiphyse de *Tropidonotus natrix* L., *C. R. Soc. Biol. (Paris)*, **258**: 3370-3372, 1964.
- [89] VOLLRATH L., Synaptic ribbons of mammalian pineal gland circadian changes, *Z. Zellforsch.*, **145**: 171-183, 1973.
- [90] VOLLRATH L., HUSS H., The synaptic ribbons of the guinea pig pineal gland under normal and experimental conditions, *Z. Zellforsch.*, **139**: 417-429, 1973.
- [91] WOLFE D. E., The epiphysal cell: an electron-microscopic study of its intercellular relationships and intracellular morphology in the pineal body of the albino rat, *Progr. Brain Res.*, **10**: 332-376, 1965.
- [92] WOLLMAN S. H., Heterogeneity of the thyroid gland, [w:] *Current topics in thyroid research*, red. C. Cassano i M. Andreoli, Academic Press, New York 1965, 1-18.
- [93] WURTMAN R. J., AXELROD J., KELLY D., *The pineal gland*, Academic Press, New York 1968.

Otrzymano: 10 kwietnia 1981.

Przyjęto: 10 maja 1981.

Adres autorów: ul. Sterlinga 5, 91-425 Łódź.

BUDOWA PŁUC NIEKTÓRYCH PŁAZÓW

THE STRUCTURE OF THE LUNG OF SOME AMPHIBIANS

Lucyna GONIAKOWSKA-WITALIŃSKA

Instytut Zoologii Uniwersytetu Jagiellońskiego, Kraków

Streszczenie. Budowa płuc płazów jest bardzo różnorodna. Najbardziej skomplikowane struktury spotykamy u płazów bezogonowych. Wnętrze płuca wyścielają dwa typy nabłonka: nabłonek migawkowy, zlokalizowany wzdłuż większych naczyń krwionośnych, oraz bezwilkowy nabłonek oddechowy pokrywający całą pozostałą powierzchnię płuc. Pod nabłonkiem leży tkanka łączna, a od zewnątrz płuco okrywa nabłonek jednowarstwowy płaski. W nabłonku migawkowym znajdują się liczne komórki kubkowe produkujące śluz oraz sporadycznie występujące komórki endokrynowo podobne. Nabłonek oddechowy zbudowany jest z pneumocytów jednego typu, różniących się u poszczególnych gatunków rozmiarami. Zawierają one ciała lamelarne oraz elektronowo gęste. Oba typy ciałek są związane z tworzeniem się surfaktantu pokrywającego wewnętrzną powierzchnię płuc. W amorficznej wyściółce płuc płazów ogoniastych nie ma struktur tubularnych, jednakże na jej powierzchni obecna jest jednowarstwowa jednorodna błonka lipidowa. Struktury tubularne pojawiają się u płazów bezogonowych. Bariera powietrze—krew utworzona z nabłonka, przestrzeni interstycjalnej i śródbłonka nie różni się zasadniczo grubością u poszczególnych gatunków badanych płazów.

Summary. The morphology of amphibian lungs is quite variable. The most complicated pulmonary structures occur in *Anura*. The interior of the lung is lined with two cell types: a ciliated epithelium located along major blood vessels and a nonciliated respiratory epithelium covering the entire remaining internal surface of the lung. Epithelial cells lie on a layer of connective tissue, whereas the external lung surface is lined with a simple squamous epithelium. The ciliated epithelium contains numerous mucus-producing goblet cells and occasionally endocrine-like cells. The respiratory epithelium consists of a single type of pneumocytes, which in various species differ in respect to their size. They contain lamellar bodies and electron dense bodies. Both types of those bodies participate in the formation of surfactant that coats the internal surface of the lung. Tubular structures are absent in the extracellular lining layer of *Urodela*, its surface, however, is coated by the monolayer film. Tubular structure occur in *Anura*. The

air-blood barrier, composed of epithelium, interstitial space and endothelium does not differ significantly in thickness as far as the investigated amphibian species are concerned.

Płazy są zwierzętami żyjącymi zarówno w wodzie, jak i na lądzie. Zasiedlenie obu tych środowisk wymaga pewnych fizjologicznych i anatomicznych przystosowań. Jednym z nich jest wykształcenie odpowiednich narządów oddechowych. Płazy oprócz płuc mają silnie unaczynioną skórę, która zapewnia wydalanie dwutlenku węgla i w różnym stopniu zaspokaja zapotrzebowanie organizmu na tlen. Natomiast osobniki larwalne mają dodatkowo skrzela pozostające u pewnych gatunków płazów ogoniastych przez całe życie. W toku ontogenezy płazów, płuca pojawiają się już u larw, lecz początkowo nie biorą udziału w wymianie gazów, spełniając jedynie rolę narządów hydrostatycznych. Dopiero około połowy okresu larwalnego włączają się one do procesu oddechowego. Należy zwrócić uwagę iż płuca u płazów nie są nowym nabytkiem ewolucyjnym, gdyż występowały już u ryb dewońskich, a obecnie mają je ryby dwudyszne.

Ogólna anatomia płuc płazów bezogonowych została dość dobrze poznana. Pierwsze prace datują się z połowy XIX w. [1, 10], natomiast Kölliker [35], badając strukturę płuc płazów i ssaków, formułuje klasyczną koncepcję „nabłonka oddechowego”, stwierdzając istnienie ciągłej warstwy „nabłonka oddechowego wyścielającego wnętrze płuca i pokrywającego tkankę oddechową”. Wyniki badań z początku XX w. podsumowuje świetny artykuł przeglądowy Marcusa [39] z 1937 r. Nowsza literatura dotycząca budowy płuc płazów jest raczej skąpa [2, 7–9, 16–18, 28, 34, 40–42, 47]. Pomimo wykorzystania do badań mikroskopu elektronowego transmisyjnego i skaningowego, znajomość tego zagadnienia pozostaje w dalszym ciągu często fragmentaryczna. Wydaje się więc celowe podsumowanie dotychczasowych wiadomości dotyczących kilku wybranych zagadnień z budowy płuc płazów.

OGÓLNA BUDOWA PŁUC PŁAZÓW

Płuca są to różnokształtne, dobrze unaczynione, błoniaste worki o gładkiej lub pofalowanej powierzchni wewnętrznej. Ściana płuca jest stosunkowo cienka i zbudowana z 3 warstw. Zewnętrznej — cienkiego płaskiego nabłonka okrywającego płuco, środkowej — warstwy tkanki łącznej i wewnętrznej — nabłonka wyścielającego płuco. Ten ostatni dzielimy na bezwitkowy nabłonek oddechowy i nabłonek migawkowy. Warstwa tkanki łącznej zawiera liczne kapilary, komórki barwnikowe oraz włókna mięśni gładkich. Grubość ściany płuca poszczególnych ga-

tunków różni się dość znacznie. Warstwa mięśni gładkich w płucach większości gatunków jest stosunkowo cienka, podczas gdy u *Amphiuma* jest znacznej grubości 50–180 μm , a w przegrodach osiąga nawet 1000 μm [5]. Ściany płuca, a w szczególności jej wewnętrzna i środkowa warstwa, mogą dawać liczne blaszkowate uwypuklenia do światła płuca tworząc w ten sposób przegrody o różnej wysokości. Przegrody te są cienkie, jednak na szczytach często rozszerzone przez pasma przebiegających tam mięśni gładkich (drobne przegrody III rzędu), a także przez naczynia krwionośne (duże przegrody I i II rzędu). Przegroda z obu stron pokryta jest nabłonkiem oddechowym leżącym na luźnej tkance łącznej. Wyjątkowo u *Pipa pipa* przegrody są wewnątrz wzmocnione chrząstką [39].

Istnieje wyraźna różnica w budowie płuc płazów ogoniastych i bezogonowych. Większość płazów ogoniastych ma gładkie płuca o prostej budowie, ale zdarzają się gatunki odznaczające się płucami o pofalowanej powierzchni wewnętrznej. Natomiast wysoce skomplikowana struktura wewnętrzna płuc jest charakterystyczna dla płazów bezogonowych. Płazy ogoniaste w większości przypadków związane są bardziej ze środowiskiem wodnym niż lądowym. Krajowe traszki, odmieniec jaskiniowy żyjący w Jugosławii czy liczne gatunki ogoniastych płazów amerykańskich mają płuca bardzo długie, o gładkiej powierzchni wewnętrznej (ryc. 1), cienkościenne i słabo unaczynione [16, 17, 24, 26, 44, 45]. Mają one natomiast silnie unaczynioną skórę. Długość kapilar skórnych wyrażona w procentach całkowitej długości naczyń krwionośnych na powierzchniach oddechowych wynosi 50–80% [6]. Ponad 90% naczyń skórnych występuje jedynie u płazów bezpłucnych zaliczanych do rodziny *Plethodontidae* [6]. Duże płazy ogoniaste mające gładkie i słabo unaczynione płuca (np. *Cryptobranchus* [24, 39]), mają zmniejszony stosunek powierzchni do objętości, co powoduje redukcję skórnej wymiany gazowej przypadającej na gram masy ciała. W tej drastycznej dla organizmu sytuacji kapilary skórne wchodzą do nabłonka [50]. Wśród płazów ogoniastych *Salamandra salamandra* czy rodzaje amerykańskie jak *Amphiuma* i *Siren* posiadają płuca odgrywające główną rolę w procesie wymiany gazowej. Płuca te nie są już gładkie, lecz posiadają liczne choć niskie przegrody I, II i III rzędu [6, 7, 15, 24, 57]. Ilość naczyń skórnych tych gatunków jest znacznie ograniczona, a wymiana gazowa utrudniona przez pokaźną grubość nabłonka, wynoszącą 47–110 μm [6]. Tak zbudowane płuca są anatomicznie zbliżone do płuc ryb dwudysznych [29, 49].

Budowa płuc płazów bezogonowych nie jest tak różnorodna. Płuca są krótkie, o silnie rozwiniętej powierzchni wewnętrznej (ryc. 2) dzięki istnieniu przegród I, II i III-rzędowych, które wchodząc głęboko do światła płuca tworzą liczne komory [9, 23, 34, 40, 45, 48]. Unaczynienie skóry

u tych płazów odgrywa drugorzędną rolę. Długość kapilar skórnych stanowi zaledwie 30% długości wszystkich kapilar na powierzchniach oddechowych.

Nabłonek migawkowy zlokalizowany jest w płucach gładkich wzdłuż żyły i tętnicy płucnej [16, 17, 26], a w płucach o pofalowanej powierzchni wewnętrznej na szczytach przegród I i II rzędu [9, 45]. Natomiast w płucach o bardzo silnie rozwiniętej powierzchni wewnętrznej, np. u *Hyla* czy *Bufo*, nabłonek migawkowy jest znacznie zredukowany i występuje w postaci niewielkich i nieregularnych płatów na szczytach przegród [23, 48]. Pozostałą powierzchnię wewnętrzną płuc pokrywa nabłonek oddechowy. Zbudowany jest on z jednego typu komórek, w przeciwieństwie do nabłonka oddechowego pozostałych kręgowców gadów, ptaków i ssaków, u których występują trzy typy pneumocytów [55]. Pod warstwą pneumocytów leży sieć kapilar, które u płazów bezogonowych występują także pod nabłonkiem migawkowym [23, 48]. Komórki nabłonka migawkowego i oddechowego połączone są bardzo ściśle ze sobą przez liczne desmosomy i pofałdowania błony komórkowej.

NABLONEK MIGAWKOWY

Nabłonek migawkowy zbudowany jest z reguły z komórek cylindrycznych (tabela 1), które u płazów ogoniastych są zdecydowanie większe, a wysokość ich u *Triturus cristatus carnifex* dochodzi do 62 μm [16]. Komórki te odznaczają się dużym jądrem. Cytoplazma między jądrem a wolną powierzchnią komórki zawiera liczne mitochondria, dobrze rozwinięty aparat Golgiego, siateczkę śródplazmatyczną ziarnistą (ryc. 3), a także u płazów ogoniastych dość licznie występujące ciała lamelarne oraz ich prekursorzy — ciała elektronowo gęste [15–17, 53]. Powierzchnia komórek tworzy gęste, dość długie i często rozgałęzione mikrokosmki oraz wyrastające z pomiędzy nich witki. Korzenie odchodzące od ciałek podstawowych witek są liczne i sięgają daleko w głąb cytoplazmy (ryc. 3), co jest cechą charakterystyczną dla płazów.

Pomiędzy komórkami migawkowymi rozrzucone są liczne komórki śluzowe (ryc. 4). Tkwią one głęboko między komórkami migawkowymi i mają wąskie ujście albo też są wyraźnie uwypuklone do światła płuca. Powierzchnia komórek śluzowych jest przeważnie pokryta długimi maczugowatymi mikrokosmkami (ryc. 4), choć zdarza się, że jest ona gładka. Oprócz silnie rozwiniętego aparatu Golgiego i dużego jądra, komórki kubkowe są szczelnie wypełnione przez pęcherzyki o ziarnistej zawartości. Ziarnistą strukturę tych pęcherzyków można wykazać czerwienią rutenu (ryc. 5), która wnika z łatwością do uszkodzonych komórek. Inne obrazy tych pęcherzyków uzyskuje się po zastosowaniu kwasu tanino-

TABELA 1

Zakres wysokości (w liczniku) i szerokości (w mianowniku) pneumocytów, jak i komórek migawkowych oraz średnicy kapilar kilku badanych gatunków płazów (w μm)

Gatunek	Zakres wysokości i szerokości pneumocytów	Zakres wysokości i szerokości komórek migawkowych	Średnica kapilar	Autor
<i>Salamandra salamandra</i>	9,9–23,1	8,4–28,7	6,8–20,7	[15]
	10,4–19,7	7,1–21,3		
<i>Triturus cristatus carnifex</i>	16,7–23,4	38,6–61,7	5,0–21,0	[16]
	6,9–14,5	6,2–10,1		
<i>Triturus alpestris</i>	13,3–31,2	20,6–33,3	10,2–17,6	[17]
	5,6–15,9	7,8–10,6		
<i>Hyla arborea</i>	6,4–9,2	6,3–16,6	8,9–13,9	[23]
	3,9–6,5	6,2–13,3		
<i>Bufo bufo</i>	4,4–14,4	3,8–22,0	11,0–25,9	[48]
	6,1–23,6	6,4–24,3		

wego (ryc. 6). W cytoplazmie komórek kubkowych, szczególnie młodych, można spotkać także ciała lamelarne. Komórek śluzowych jak dotychczas nie znaleziono jedynie w płucach *Hyla arborea* [27], gdzie nabłonek migawkowy jest wyjątkowo skąpy.

KOMÓRKI ENDOKRYNOWO PODOBNE

Komórki endokrynowo podobne występują pojedynczo lub w skupieniach po kilka, w części bazalnej nabłonka migawkowego lub w jego sąsiedztwie. Opisano je zaledwie u czterech gatunków płazów [18, 21, 51, 54]. W płucach płazów ogoniastych występują pojedyncze komórki, natomiast u bezogonowych tworzą one skupienia. Komórki endokrynowo podobne charakteryzują się dużym jądrem i jasną cytoplazmą, w której leżą mikrofilamenty, silnie rozwinięty aparat Golgiego i liczne pęcherzyki o gęstym rdzeniu. Wnętrze tych pęcherzyków wypełnione jest mniej lub bardziej elektronowo gęstym materiałem otoczonym wyraźną jasną przestrzenią. Średnica tych pęcherzyków waha się w granicach 55–150 nm. Do komórek endokrynowo podobnych dochodzą liczne zakończenia nerwowe. Komórki endokrynowo podobne wykazują słabą fluorescencję po traktowaniu ich parami paraformaldehydu według metody Falcka i Owmana [11], co wskazuje na obecność dopaminy lub serotoniny. Wśród płazów ogoniastych obecność komórek endokrynowo podobnych stwierdzono wyłącznie u *Triturus alpestris* [18]. Leżą one pojedynczo i nie wykazują fluorescencji. Jak się przypuszcza, mogą one za-

wierać inne aminy biogenne, niewykrywalne w metodzie Falcka i Owmana. Komórki endokrynowo podobne występujące w grupach i posiadające liczne zakończenie nerwowe noszą nazwę ciałek nerwowo-nabłonkowych (neuroepithelial bodies). Występują one w bazalnej części nabłonka migawkowego płazów bezogonowych np. u *Rana nigromaculata* [54], natomiast u *Bufo marinus* [51] położone są bliżej światła płuca i oddzielone od niego jedynie cienkimi wypustkami nabłonka migawkowego. Ciała te u *Hyla arborea* mają nieco inną budowę [21] i przypominają raczej ciała występujące w oskrzelach ssaków (ryc. 2, 7). Są one bowiem umieszczone na szczytach przegród I i II rzędu i są silnie uwypuklone do światła płuca, a co najważniejsze otoczone i przykryte przez pneumocyty (ryc. 7). Ciałkom nerwowo-nabłonkowym towarzyszy przeważnie kapilara. Przypuszcza się, że ciała te w płucach ssaków są receptorami zawartości CO₂ i O₂ w powietrzu wdychanym przez zwierzęta [36–38]. Czy pełnią one tę samą rolę u płazów na razie nie wiadomo.

Omawiając komórki endokrynowo podobne należy wspomnieć o wyjątkowych komórkach wykazujących również fluorescencję po zastosowaniu metody Flacka i Owmana [11]. Komórki te zostały zaobserwowane jedynie w nabłonku oddechowym płuc traszki górskiej *Triturus alpestris* (ryc. 8) [19]. Są to pojedyncze komórki występujące między pneumocytami, odznaczające się jaśniejszą cytoplazmą oraz licznymi obłonionymi ziarnami okrągłymi lub pałeczkowatymi. Średnice ziarenek okrągłych wynoszą od 52 do 210 nm, ziarenka pałeczkowate zaś mają wymiary od 153/76 do 560/55 nm (długość/szerokość). Zgrupowane one są pod powierzchnią komórki (ryc. 8) kontaktującą się ze światłem płuca. Powierzchnia ta tworzy długie mikrokosmki, czym bardzo wyraźnie odróżnia się od powierzchni otaczających ją pneumocytów. Te wyjątkowe komórki różnią się od komórek endokrynowo podobnych dwiema cechami. Nie dochodzą do nich zakończenia nerwowe, a liczne obrazy ultrastrukturalne można interpretować jako dowody wydzielania ziarenek do światła płuca. Rola tych komórek nie jest dotąd wyjaśniona.

NABŁONEK ODDECHOWY

Nabłonek oddechowy płuc płazów zbudowany jest z komórek jednego typu. Jednakże ostatnie badania płuc ropuchy *Bufo bufo* (dane niepublikowane) wykazały w nich obecność komórek odpowiadających trzeciemu rodzajowi pneumocytów ssaków, a mianowicie komórek szczoteczkowych (brush cells). Pneumocyty różnych gatunków płazów, różnią się zarówno rozmiarami (tabela 1), jak i położeniem względem kapilar. Płazy bezogonowe mają znacznie mniejsze pneumocyty, podobnie zresztą

jak i inne komórki ciała [14, 43]. Pneumocyty silnie uwypuklone do światła płuca spotykamy u takich gatunków jak *Salamandra salamandra*, *Hyla arborea* czy *Bufo bufo*, podczas gdy *Triturus alpestris* czy traszka grzebieniasta *Triturus cristatus carnifex* mają pneumocyty głęboko zanurzone w tkance łącznej i tylko szczytowe partie komórek kontaktują się ze światłem płuca. Pneumocyty posiadają duże jądro, liczne mitochondria, dobrze rozwinięty aparat Golgiego i siateczkę śródplazmatyczną ziarnistą (ryc. 9). Wolna powierzchnia komórek tworzy liczne krótkie mikrokosmki, których wygląd jest zbliżony u poszczególnych gatunków. Mikrokosmki te mogą formować czasami listewki, jak to ma miejsce w płucach *T. alpestris* [17], a rola ich, jak się przypuszcza, ma polegać na rozprowadzaniu i utrzymywaniu śluzu na powierzchni [52]. Jest to szczególnie istotne właśnie w gładkich płucach traszek, gdzie ilość nabłonka migawkowego i komórek śluzowych jest niewielka. Na granicy między dwoma komórkami ich mikrokosmki są nieco wyższe i szersze, dzięki czemu tworzą się wyraźne granice międzykomórkowe (ryc. 10).

Bardzo ciekawym zagadnieniem jest proces tworzenia się oraz funkcja licznych ciałek lamelarnych, elektronowo gęstych oraz pęcherzyków występujących pod wolną powierzchnią pneumocytów. Ciałka lamelarne występują prawdopodobnie w pneumocytach wszystkich płazów [3, 7, 15–17, 40, 42, 47], jakkolwiek niektórzy badacze nie stwierdzili ich obecności w płucach traszek [41, 45]. Ciałka lamelarne (ryc. 11) są to okrągłe lub owalne twory (0,5–3,5 μm), utworzone z licznych równoległych do siebie ułożonych błon. Ułożenie tych błon jest bardzo różnorodne: koncentryczne, dzwonowate lub proste. Czasem w jednym ciałku znajduje się kilka układów koncentrycznych (ryc. 11). Z wyjątkiem traszek w pneumocytach płuc płazów spotyka się duże ciałka elektronowo gęste (0,42–2,0 μm) o bardzo gęstej elektronowo zawartości. Obserwacje pneumocytów larwy salamandry, gdzie ciałka te szczególnie licznie występują (ryc. 12), wykazały, że są to prekursorzy ciałek lamelarnych. Gęsta elektronowo substancja ulega stopniowemu rozrzedzeniu i pojawiają się ogniska, w których rozpoczyna się proces formowania błon z bezstrukturalnej macierzy [20].

Przy rozpatrywaniu budowy pneumocytów na uwagę zasługują pęcherzyki leżące pod wolną powierzchnią komórki. Są one szczególnie interesujące u płazów ogoniastych, gdyż swoim wyglądem przypominają pęcherzyki występujące w komórkach śluzowych (ryc. 5 i 6). Podobieństwo to ujawnia się szczególnie przy dodaniu do utrwalacza czerwieni rutenu lub kwasu taninowego (ryc. 13 i 14). Takie podobieństwo sugeruje, że pneumocyty płuc płazów ogoniastych mogą produkować i wydzielać także mukopolisacharydy. W płucach traszek, gdzie ilość nabłonka migawkowego i komórek śluzowych jest niewielka, ilość pęche-

rzyków w pneumocytach jest znacznie większa niż u innych gatunków np. salamandry. Nie wiadomo czy podobna korelacja w wyglądzie pęcherzyków występuje u płazów bezogonowych, gdyż obserwacji ultrastrukturalnych jest niewiele i nie przeprowadzono podobnych badań.

MATERIAŁ POWIERZCHNIOWO CZYNNY CZYLI SURFAKTANT

Wnętrze płuca pokryte jest cienką płynną substancją zwaną u ssaków amorficzną wyściółką pęcherzykową płuc (alveolar lining layer), rozprzestrzenioną na powierzchni wszystkich komórek stykających się z powietrzem. Pełni ona różne zadania: chroni komórki przed wysychaniem i toksycznym działaniem tlenu, a także zmniejsza napięcie powierzchniowe zabezpieczające ściany płuca przed sklejeniem się. Biochemiczna analiza tej wyściółki pęcherzykowej u ssaków wykazała występowanie różnych substancji: a) mukopolisacharydów [34], których obecność po raz pierwszy została udokumentowana techniką mikroskopii elektronowej przez Groniowskiego i Biczyskową [22], oraz b) substancji lipidowych pochodzących z ciałek lamelarnych z niewielkim udziałem białek nieznanego pochodzenia [33]. Wśród różnych substancji lipidowych dwupalmitylofosfatydylocholina ma szczególnie silne właściwości zmniejszania napięcia powierzchniowego na granicy między płynną wyściółką pęcherzykową a powietrzem i jest najważniejszym składnikiem surfaktantu.

Większość posiadanych przez nas wiadomości dotyczy surfaktantu z płuc ssaków (patrz artykuł przeglądowy Goerke [13]). Surfaktant tych zwierząt powstaje w ciałkach lamelarnych w postaci błon, które następnie są wydzielane z pneumocytów do płynnej warstwy pokrywającej komórki. Błony te rozwijają się i łączą ze sobą tworząc początkowo sieć tubularno-mielinową, przechodzącą później w jednorodną błonkę leżącą na powierzchni wyściółki pęcherzykowej. Obecność tej gęstej elektronowo, osmofilnej i jednorodnej błonki jest morfologicznym dowodem na istnienie surfaktantu. Bezpośrednich prac na temat surfaktantu z płuc płazów jest niewiele [4, 30, 46, 47], ale z nich wynika, że stwierdzono jego obecność, jakkolwiek w o wiele mniejszej ilości i innym składzie niż np. w płucach ssaków. Badania z ostatnich kilku lat wykazały, że wyznacznikiem biochemicznym surfaktantu płuc ssaków jest niespecyficzna esteraza związana z błonami ciałek lamelarnych, bez względu na to czy występują one w komórce czy pozakomórkowo. Hitchcock i Parsons [27] stwierdzili, że enzym ten jest także obecny w wyściółce pęcherzykowej płuc *Rana catesbeiana*. Obecność ciałek lamelarnych oraz występowanie jednorodnej błony na powierzchni amorficznej wyściółki w płu-

cach płazów bezogonowych i ogoniastych wykazali Dierichs [8], i Goniakowska-Witalińska [17, 20], (ryc. 14). W płucach larwy salamandry do światła płuca są wydzielane zarówno ciała lamelarne, jak i ich niedojrzałe formy, czyli ciała elektronowo gęste (ryc. 12). Od obu struktur oddzielają się podwójne, gładkie błony, które nie tworzą siatki tubularno-mielinowej (ryc. 12), ale pozostają w postaci wielokształtnych spłaszczonych woreczków na powierzchni komórek i z nich prawdopodobnie tworzy się jednowarstwowa jednorodna błonka lipidowa (monolayer film). Podobna sytuacja istnieje w płucach ryb dwudysznych, gdzie nie ma siatki tubularnej, lecz występuje wspomniana jednorodna błonka [31]. Natomiast w płucach płazów bezogonowych uwolnione z ciałek lamelarnych błony tworzą siatkę tubularną, którą zaobserwował po raz pierwszy Dierichs [8] u *Rana temporaria*. Siatka tubularna występująca w płucach *Bufo bufo* zbudowana jest także z podwójnych błon, ale na ich zewnętrznych powierzchniach są regularnie rozmieszczone cząstki (ryc. 15), szczególnie dobrze widoczne po zastosowaniu kwasu tanninowego (dane niepublikowane). Podobne struktury zostały stwierdzone na błonach siatki tubularnej w płucach szczura [25]. Wydaje się zatem, że morfologicznie i biochemicznie surfaktant płazów bezogonowych zbliżony jest do surfaktantu płuc ssaków. Surfaktant płazów ogoniastych natomiast różni się od wymienionych substancji, gdyż wykazuje brak tubularnej mieliny oraz cząstek na błonach, a także dużo lepsze niż u płazów bezogonowych czy ssaków zachowanie struktury ciałek lamelarnych przy utrwalaniu konwencjonalnymi metodami.

KAPILARY I BARIERA POWIETRZE—KREW

Pod nabłonkiem oddechowym płuc płazów leży sieć kapilarnych naczyń krwionośnych silnie uwypuklających się do światła płuca (ryc. 16). Płazy bezogonowe np. *Hyla* czy *Bufo* posiadają kapilary nawet pod nabłonkiem migawkowym [23, 48]. Średnica kapilar płucnych wynosi 5–25 μm i zakres ten nie wykazuje większych różnic gatunkowych (tabela 1). Dla efektywności wymiany gazowej najistotniejszymi są: rozwinięcie sieci kapilar płucnych oraz grubość bariery powietrze—krew. Badane gatunki płazów nie różnią się zasadniczo ilością kapilar przypadających na jednostkę powierzchni płuc okazów dorosłych. Na przykład w gładkich płucach *Triturus alpestris* liczba oczek kapilar przypadających na jednostkę powierzchni (mm^2) wynosi 569, natomiast w silnie rozwiniętych płucach *Hyla arborea* — jedynie 652 [6]. Zasadnicze różnice ujawniają się dopiero przy porównaniu długości kapilar płucnych przypadających na g masy ciała. Długość kapilar płucnych płazów ogoniastych jest niewielka, np. u *Salamandra salamandra* — 5,2 m/g,

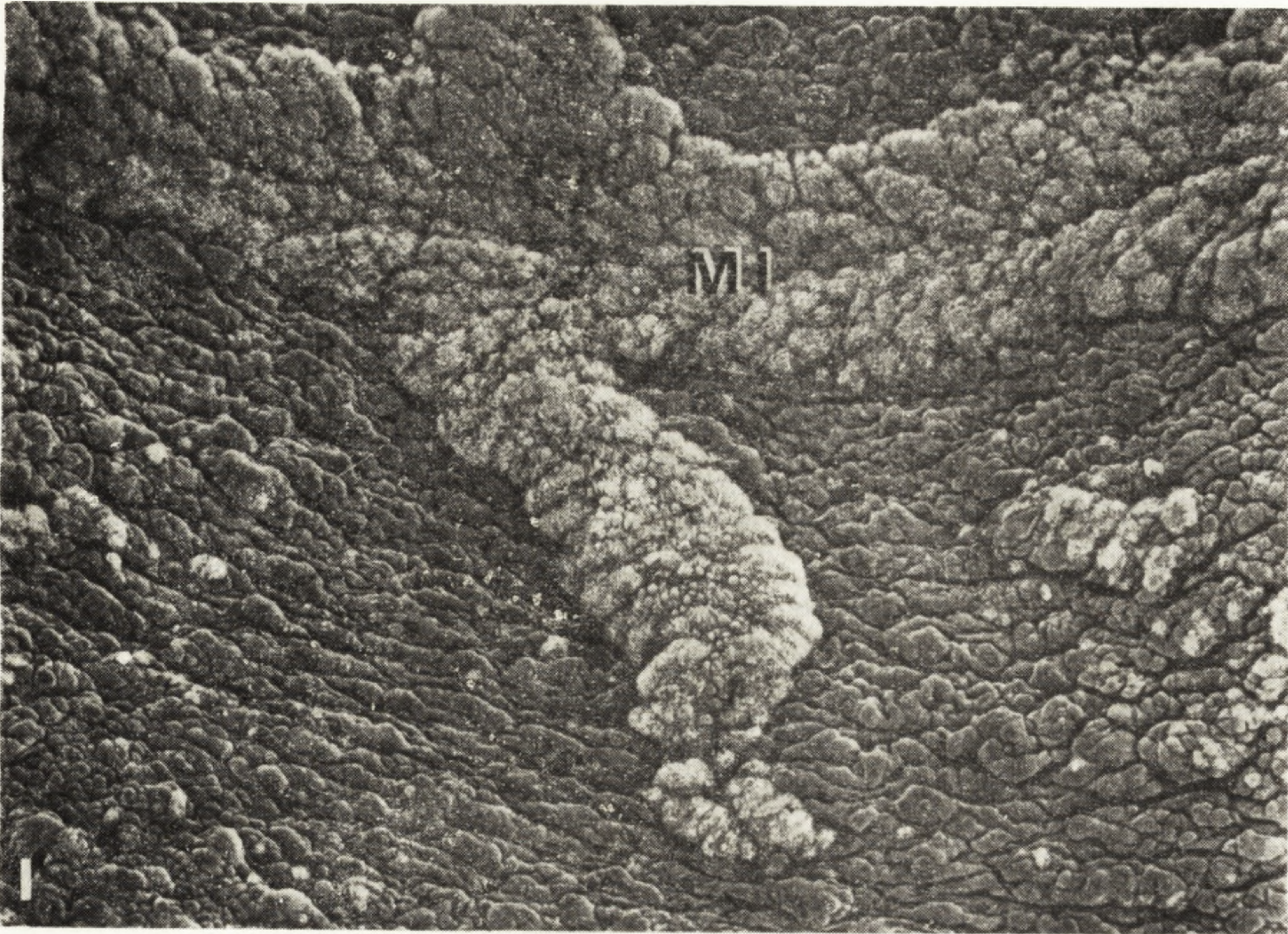
a u traszki (*Triturus alpestris* i *T. cristatus*) — 3,5 m/g [6]. Płazy bezogonowe mają tych naczyń znacznie więcej: 14,1 m/g *Bufo bufo* i 34,4 m/g *Hyla* [6]. Sprawność działania płuc w wymianie gazowej zależy nie tylko od ilości kapilar, ale, jak można przypuszczać, także od grubości bariery powietrze—krew. Bariera ta zbudowana jest z trzech warstw. Wewnętrzną warstwę stanowi śródbłonek, środkową — interstycjalna przestrzeń łącznotkankowa zawierająca liczne włókna kolagenowe, natomiast zewnętrzną warstwę bariery tworzą długie wypustki pneumocytów pokrywające kapilary (ryc. 16). Tabela 2 daje obraz grubości tej

TABELA 2

Średnia arytmetyczna \bar{x} oraz zakres grubości bariery powietrze—krew i poszczególnych jej składników (w μm)

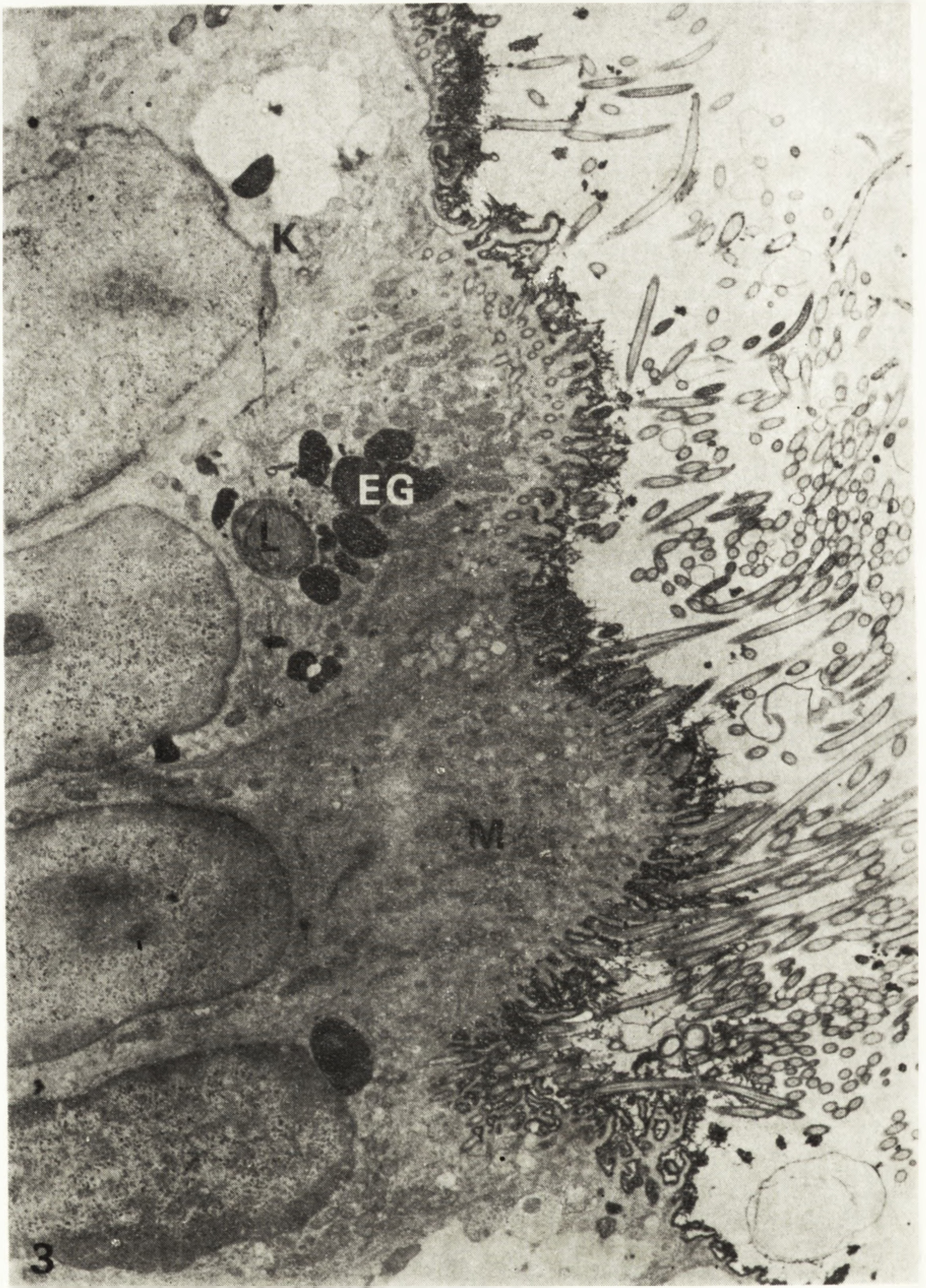
Gatunek	Grubość bariery powietrze—krew		Śródbłonek	Przestrzeń interstycjalna	Nabłonek	Autor
	\bar{x}	$\frac{\text{min}}{\text{max}}$				
<i>Salamandra salamandra</i>	2,05	$\frac{1,12}{3,8}$	0,752	0,859	0,439	[15]
<i>Triturus alpestris</i>	1,23	$\frac{0,80}{2,14}$	0,245	0,440	0,548	[17]
<i>Triturus cristatus carnifex</i>	0,85	$\frac{0,44}{1,33}$	0,152	0,308	0,389	[16]
<i>Hyla arborea</i>	1,28	$\frac{1,01}{1,57}$	—	—	—	[23]
<i>Bufo bufo</i>	1,23	$\frac{0,7}{1,66}$	—	—	—	[48]
<i>Triturus vulgaris</i>	1,0	—	—	—	—	[47]
<i>Proteus anguinus</i>	1,85	—	—	—	—	[28]

bariery u poszczególnych gatunków. Jak widzimy, mimo zasadniczych różnic w metabolizmie płazów bezogonowych i ogoniastych, płazy ogoniaste odznaczają się niższym metabolizmem, o czym świadczą dane pośrednie [6] i bezpośrednie [14, 58, 59], nie ma dużej różnicy w grubości bariery. Gatunki ssaków odznaczające się wysokim metabolizmem, np. mysz czy ryjówka, mają grubość bariery wynoszącą odpowiednio 1,25 i 0,8 μm [55]. Wydaje się zatem, że w ewolucyjnym procesie przystosowania płuc do coraz większej sprawności w wymianie gazowej pierwszorzędną rolę gra rozbudowa powierzchni wewnętrznej płuc, a co za tym idzie zwiększenie długości kapilar oddechowych przypadających na g masy ciała. Natomiast u ssaków, gdzie powierzchnia wewnętrzna jest już maksymalnie wykorzystana, zwiększenie metabolizmu wymaga z ko-

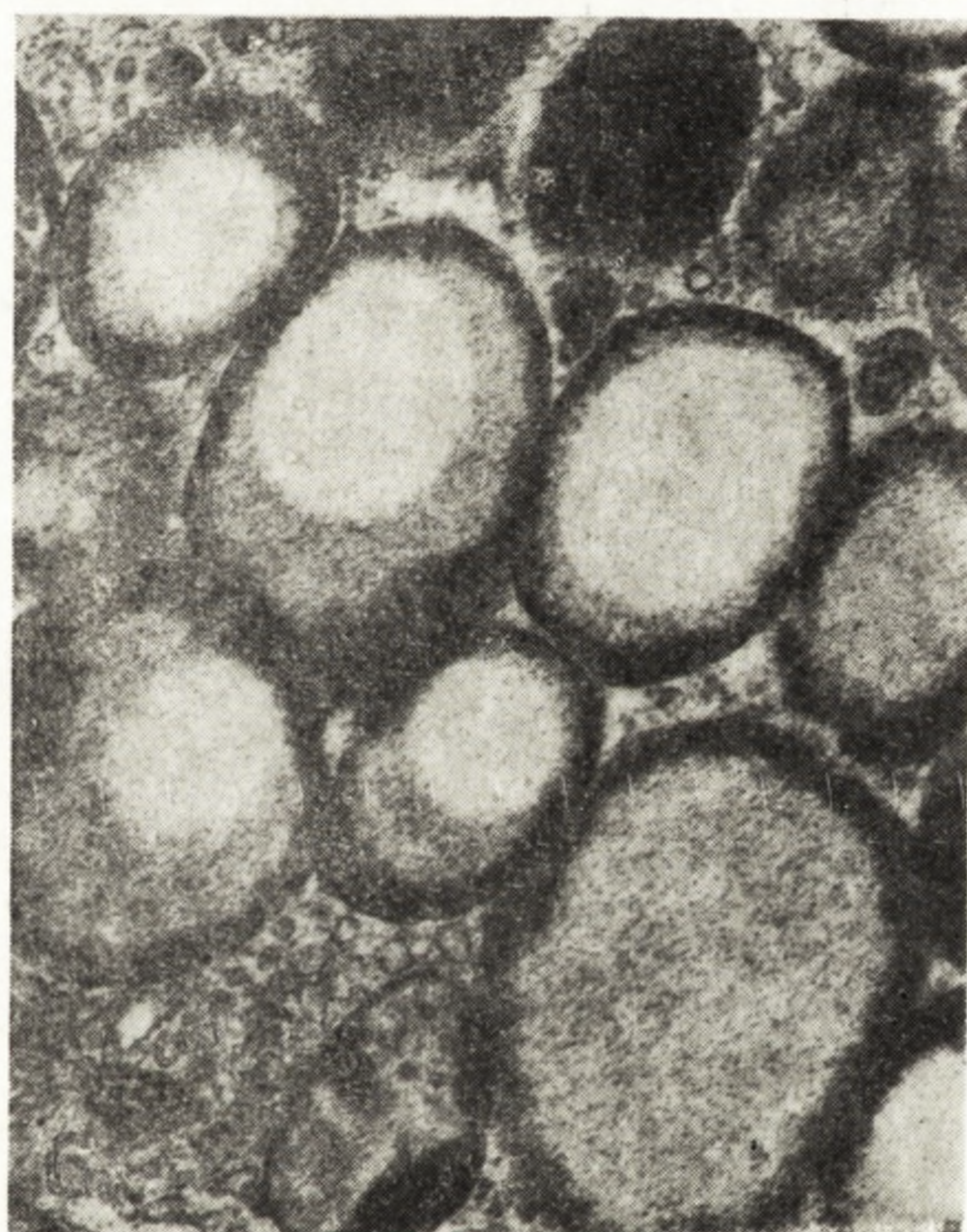
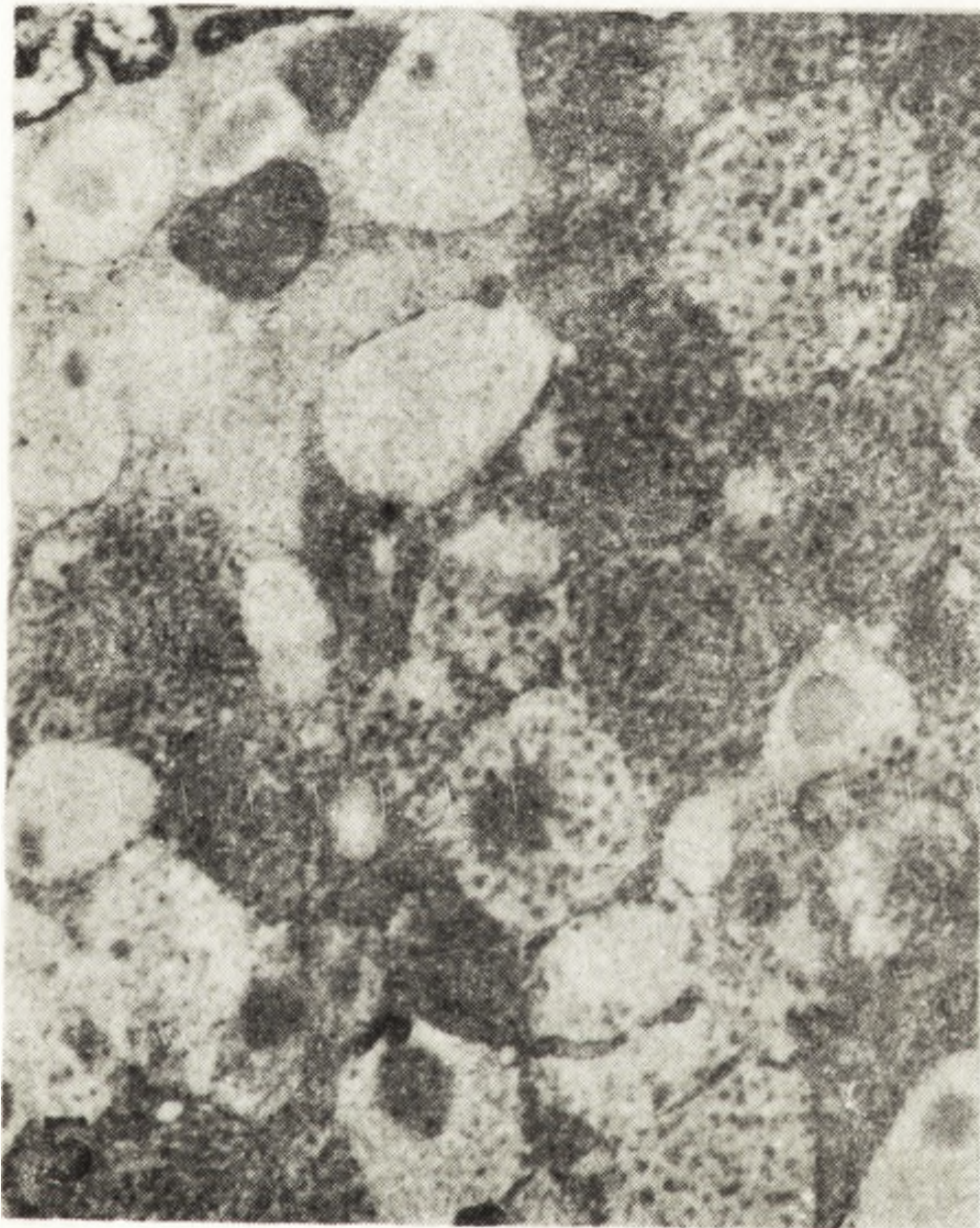


Ryc. 1. Mikroskop skaningowy. Gładka wewnętrzna powierzchnia płuc traszki *Triturus alpestris*. Nabłonek migawkowy (MI) zlokalizowany ponad żyłą płucną.
× 500

Ryc. 2. Wewnętrzna powierzchnia płuc rzekotki *Hyla arborea* tworząca liczne przegrody. Strzałki wskazują ciała nerwowo-nabłonkowe. × 800



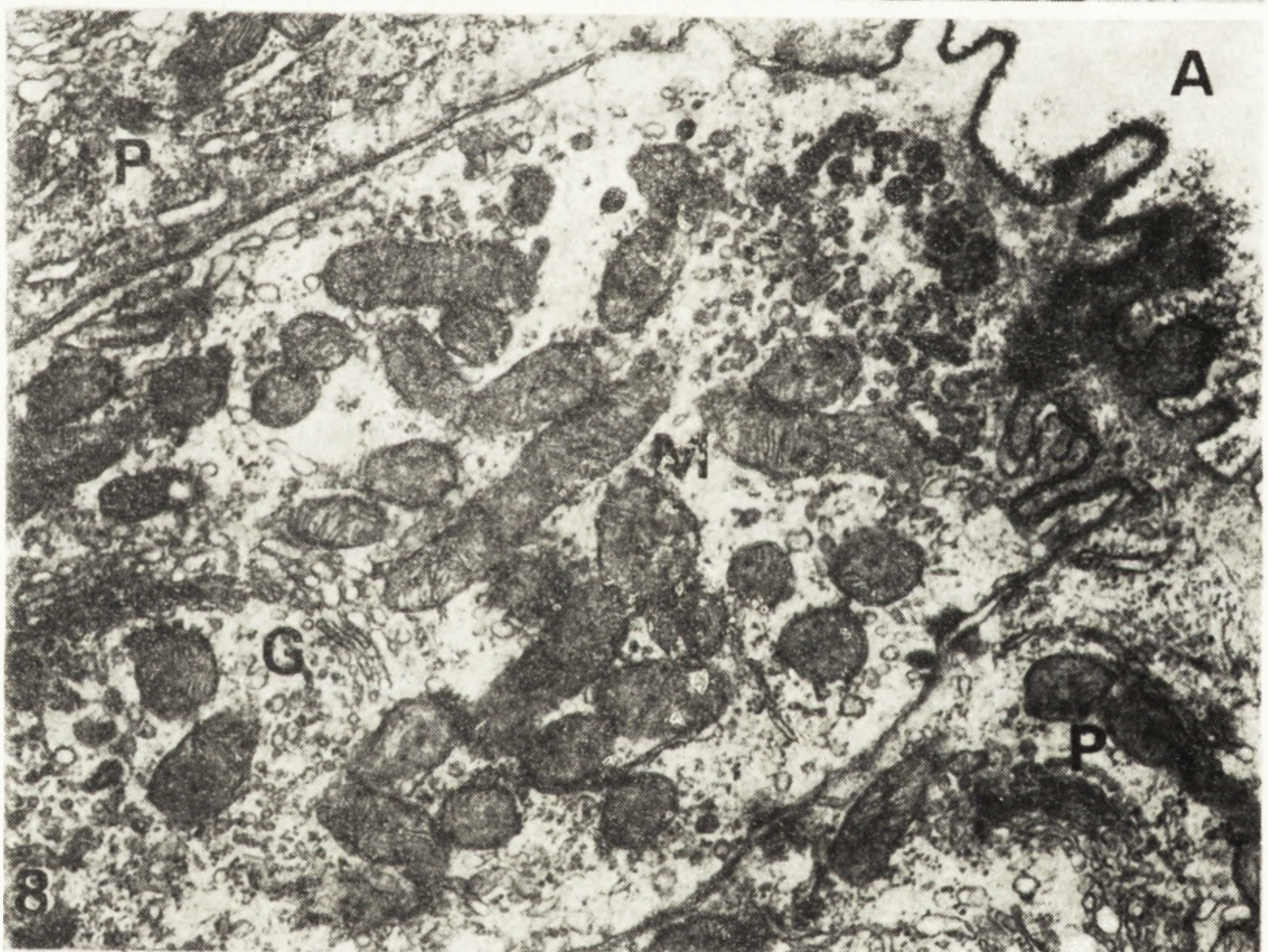
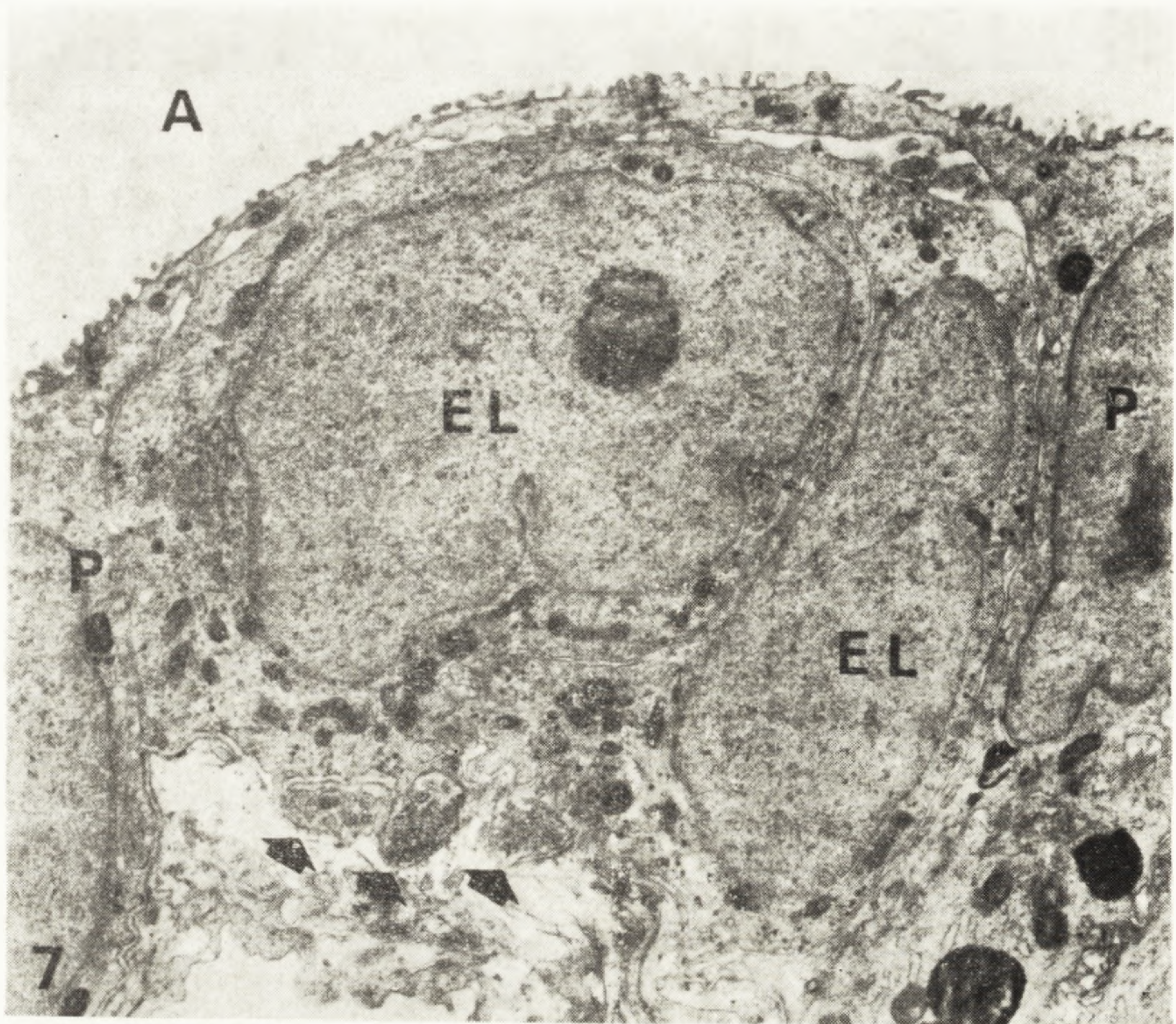
Ryc. 3. Nabłonek migawkowy płuc salamandry. Komórki zawierają liczne mitochondria (M), ciała lamelarne (L) i elektronowo gęste (EG). K — komórka kubkowa. Czerwień rutenu. $\times 7500$



Ryc. 4. Mikroskop skaningowy. Grupa komórek kubkowych wśród nabłonka migawkowego. $\times 3200$

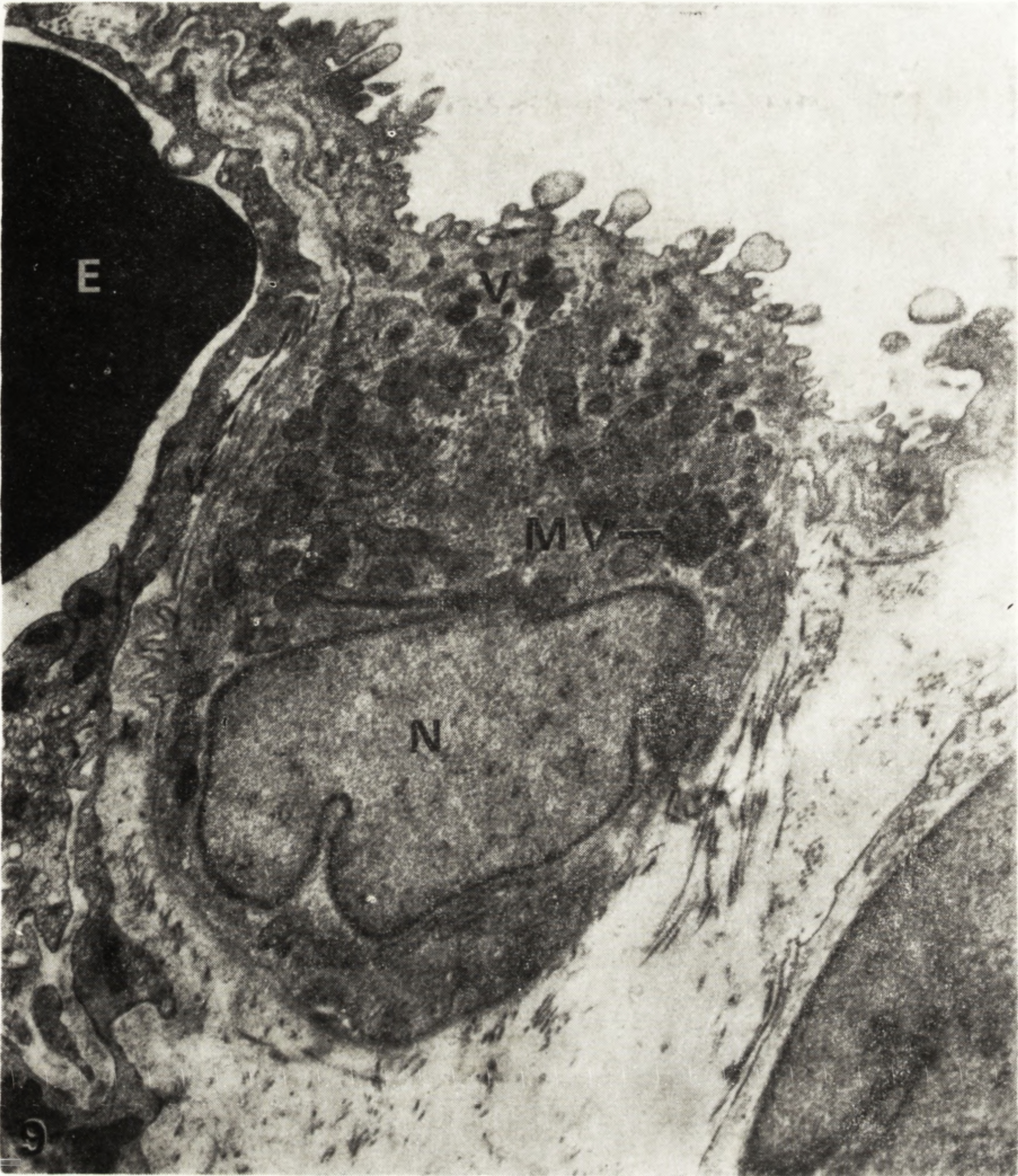
Ryc. 5. Pęcherzyki zawierające śluz w komórce kubkowej salamandry. Czerwień rutenu. $\times 15\ 000$

Ryc. 6. Fragment komórki kubkowej traszki. Kwas taninowy. $\times 22\ 000$

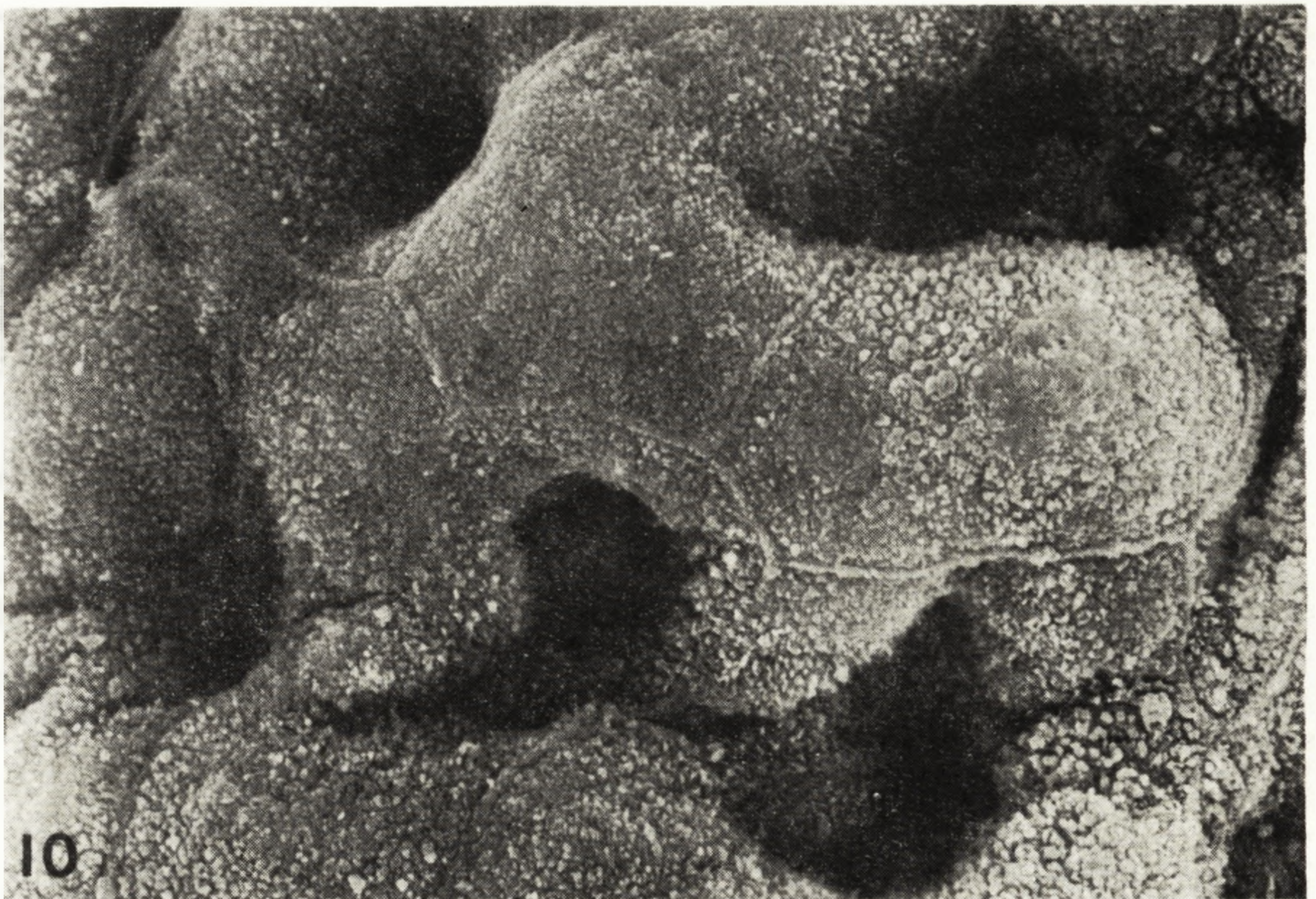


Ryc. 7. Ciało nerwowo-nabłonkowe *Hyla arborea*. Pneumocyty (P) otaczają i przykrywają komórki endokrynowo podobne (EL). A — światło płuca. Strzałki wskazują zakończenie nerwowe. $\times 9000$

Ryc. 8. Komórka sekrecyjna między pneumocytami (P) *Triturus alpestris*. Widoczne liczne mitochondria (M), aparat Golgiego (G) oraz ziarna sekrecyjne leżące w apikalnej części komórki. A — światło płuca. Kwas taninowy. $\times 24\,000$

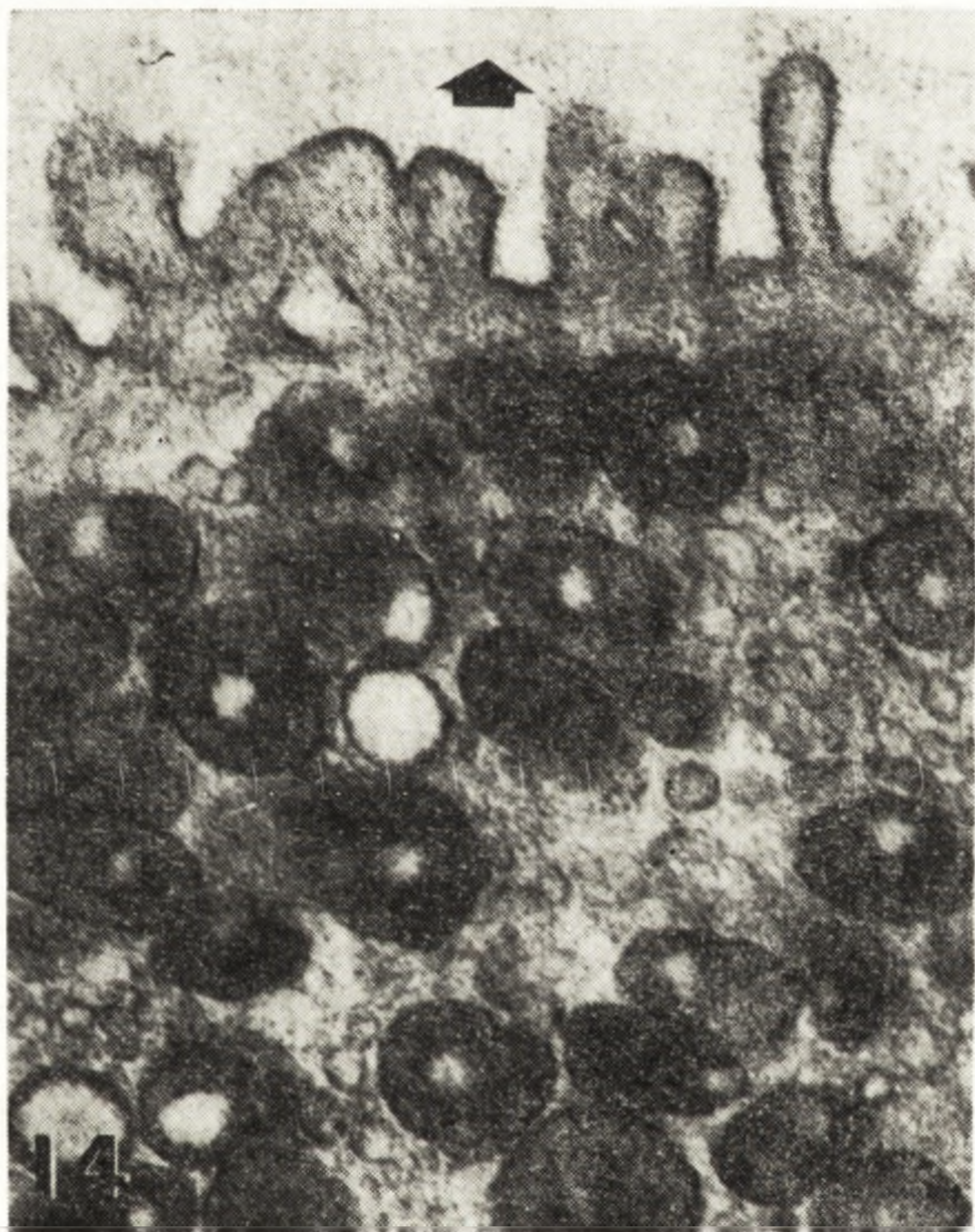
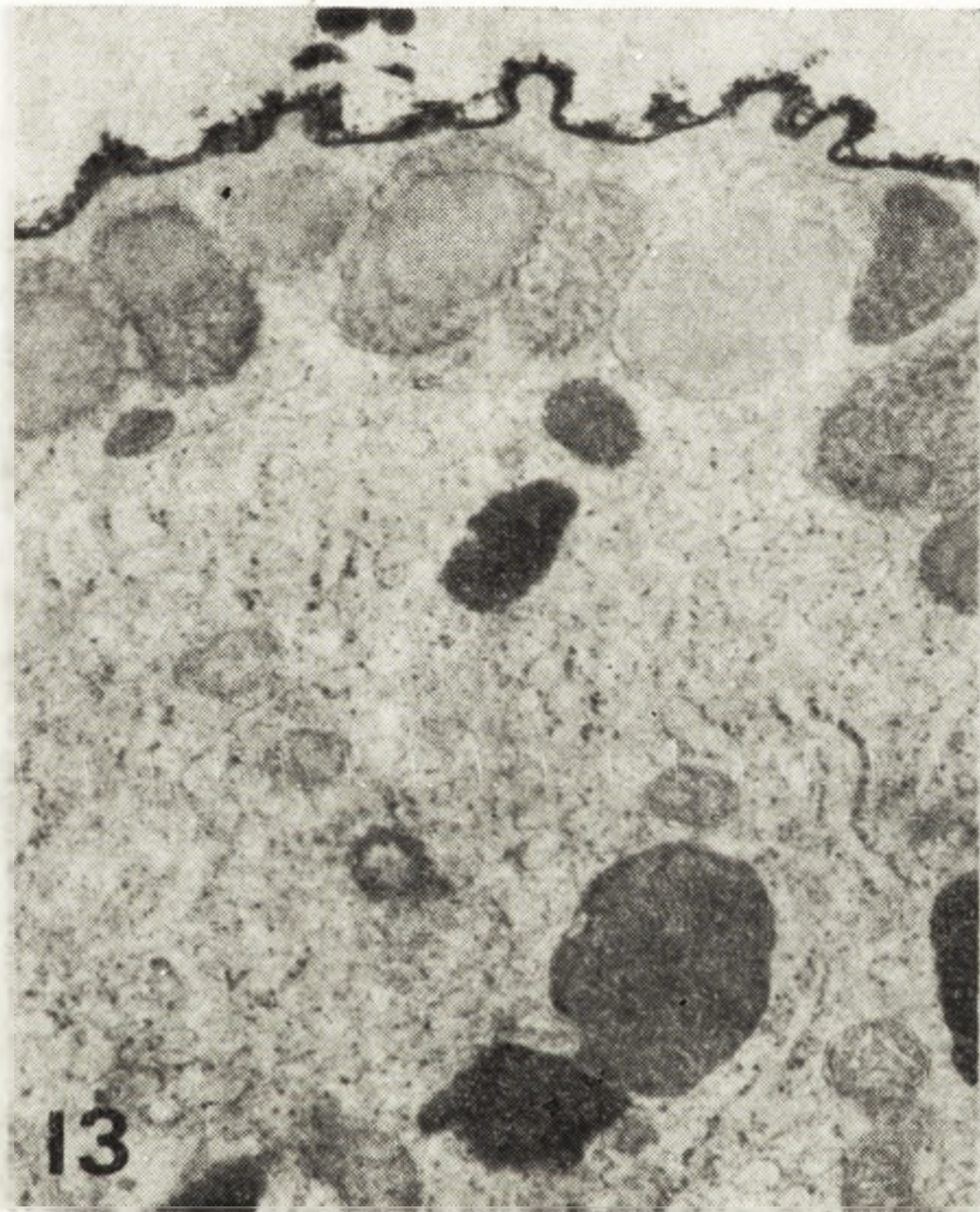


Ryc. 9. Pneumocyt traszki *Triturus cristatus carnifex*. E — erytrocyt w kapilarze, V — gęste elektronowo pęcherzyki, MV — ciało wielopęcherzykowe, N — jądro.
× 15 500



Ryc. 10. Mikroskop skaningowy. Powierzchnia nabłonka oddechowego traszki *T. c. carmfex*. W oczkach sieci kapilarnej znajdują się korpusy pneumocytów, a ich cienkie wypustki cytoplazmatyczne pokrywają kapilary. Widoczne są mikrokosmki i granice międzykomórkowe. $\times 3000$

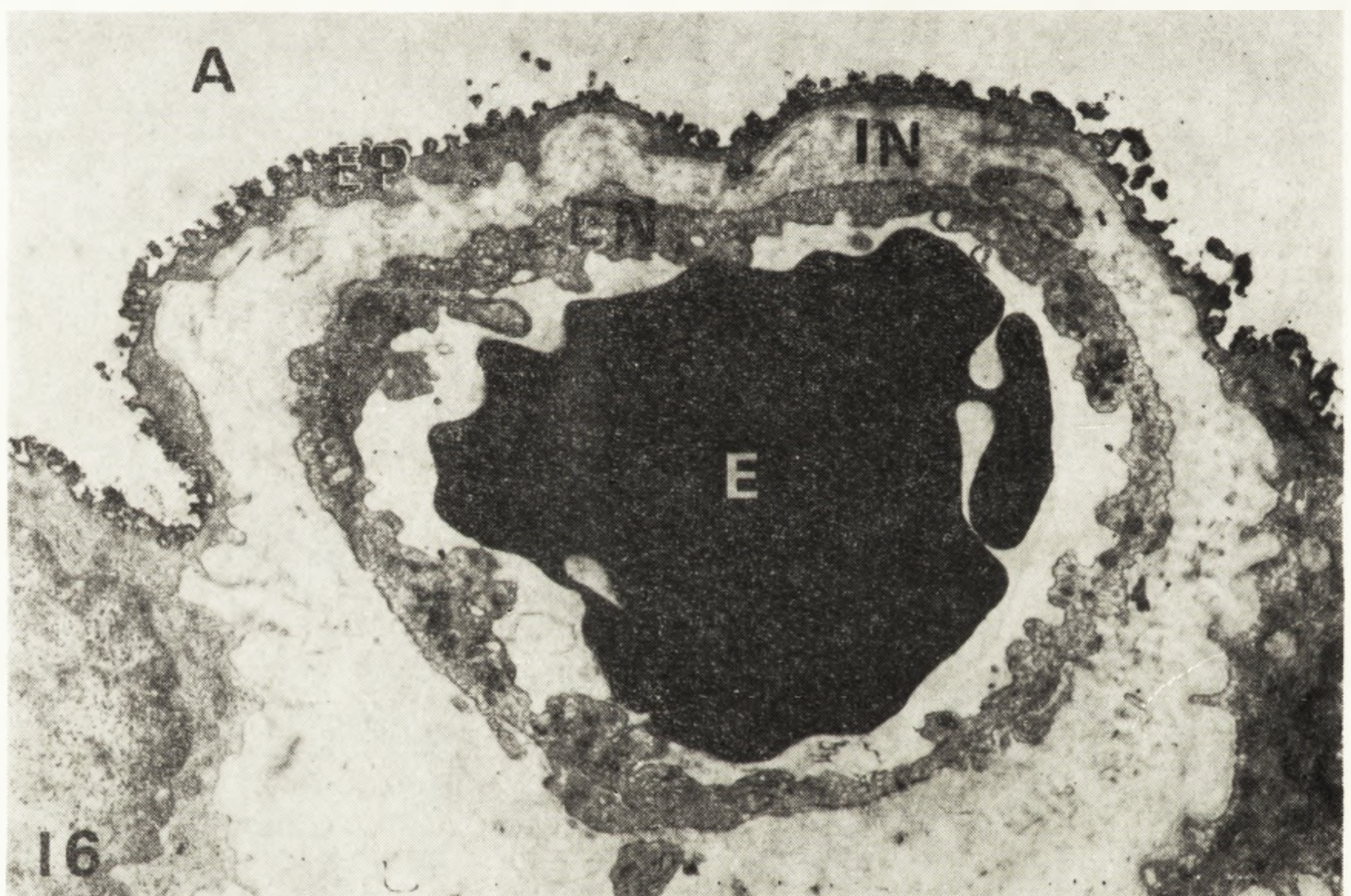
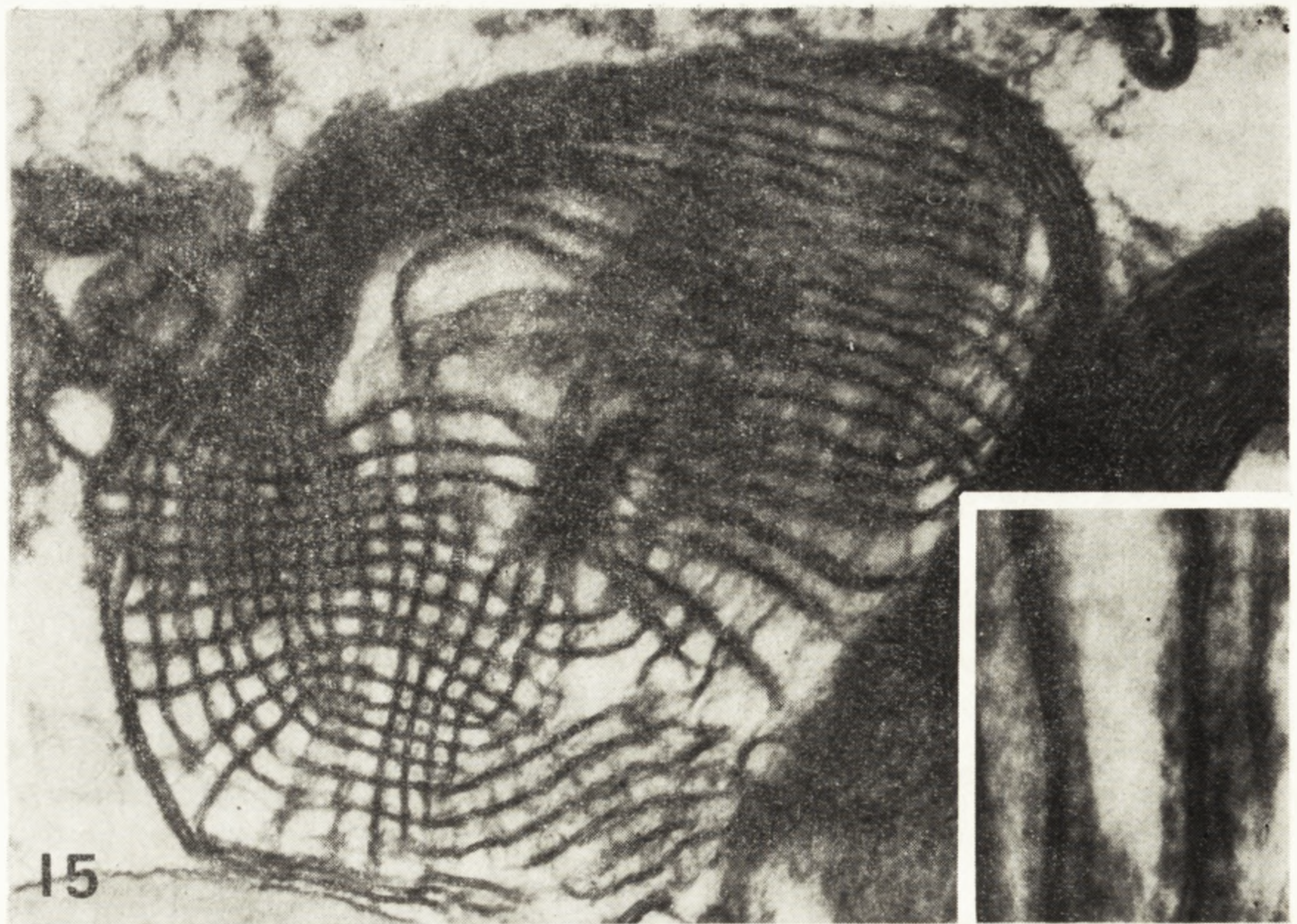
Ryc. 11. Pneumocyt larwy salamandry zawierający ciała lamelarne o różnym ułożeniu błon. $\times 11\ 000$



Ryc. 12. Ciałka elektronowo gęste i oddzielające się od nich błony w świetle płuca larwy salamandry. $\times 11\ 500$

Ryc. 13. Pęcherzyki pod powierzchnią pneumocytu salamandry. Czerwień rutenu. $\times 16\ 000$

Ryc. 14. Pęcherzyki pod powierzchnią pneumocytu traszki *T. alpestris*. Strzałka wskazuje warstewkę na powierzchni bezstrukturalnej wyściółki płuca. Kwas taniowy. $\times 33\ 000$



Ryc. 15. Struktury tubularno-mielinowe w wyściółce płuc ropuchy. $\times 81\ 000$.: Na zewnętrznych powierzchniach podwójnych błon widoczne są regularnie rozmieszczone cząsteczki. Kwas taninowy. $\times 180\ 000$

Ryc. 16. Bariera powietrze-krew płuc salamandry. A — światło płuca, E — erytrocyt, EP — nabłonek, IN — przestrzeń interstycjalna, EN — śródbłonek kapilary. Czerwień rutenu. $\times 6200$

nieczności włączenia drugiego mechanizmu, a mianowicie zmniejszenia grubości bariery powietrze—krew.

Śródbłonek kapilar skórnych jest stosunkowo ubogi w organelle komórkowe. Cytoplazma tych komórek zawiera liczne jasne pęcherzyki pinocytotyczne oraz gęste elektronowo pałeczkowate twory o długości 0,8–1,2 μm i średnicy 0,14–0,26 μm . Te ostatnie zostały zaobserwowane po raz pierwszy przez Weibela i Palade [56] w tętnicy płucnej szczura i w małym naczyniu skórnym larwy *Ambystoma*. Autorzy stwierdzili w nich obecność licznych mikrotubul, a badania histochemiczne [12] wykazały obecność histaminy. Ciałka Weibela i Palade były obserwowane u wielu gatunków płazów [15–17, 47], przy czym są one wyraźnie ciemniejsze elektronowo niż u ssaków i jak się wydaje nie posiadają mikrotubul. W śródbłonku płuc płazów nie ma okienek, podobnie zresztą jak i w kapilarach płucnych normalnych osobników ssaków [32, 55].

LITERATURA

- [1] ARNOLD J., Ueber das Lungenepithel, Arch. Pathol. Anat. Physiol. Virchow's, 27: 393–399, 1863.
- [2] BARGMANN W., KNOOP A., Vergleichende elektronmikroskopische Untersuchungen der Lungenkapillaren, Z. Zellforsch., 44: 263–279, 1956.
- [3] BROOKS R. E., Lung alveolar cytosomes: a consideration of their significance, Z. Zellforsch., 106: 484–497, 1970.
- [4] CLEMENTS J. A., NELLENBOGEN J., TRAHAN H. J., Pulmonary surfactant and the evolution of the lungs, Science, 169: 603–604, 1970.
- [5] CZOPEK J., Smooth muscles in the lungs of some urodeles, Nature, 193: 798, 1962.
- [6] CZOPEK J., Quantitative studies on the morphology of respiratory surfaces of amphibians, Acta anat., 62: 296–323, 1965.
- [7] De GROODT M., LAGASSE A., SEBRUYNS M., Elektronenmikroskopische Morphologie der Lungenalveolen des Protopterus und Amblystoma, Proc. Internat. Congress for Electron Microscopy, Berlin—Heidelberg—New York, Springer Verlag 1960, 418–421.
- [8] DIERICHS R., Elektronmikroskopische Untersuchungen an der Froschlunge. I. Darstellung der Alveolar Grenzsicht (Surfactant), Z. Zellforsch., 137: 353–361, 1973.
- [8] DIERICHS R., Elektronmikroskopische Untersuchungen an der Froschlunge. graphy of the inner surface by scanning and transmission electron microscopy, Cell Tissue Res., 160: 399–410, 1975.
- [10] EBERTH C. J., Der feinere Bau der Lunge, Z. wiss. Zool., 12: 31–42, 1863.
- [11] FALCK B., OWMAN Ch. A detailed methodological description of the fluorescence method for the cellular demonstration of biogenic amines. Acta Univ. Lund II, 7: 1–23, 1965.
- [12] FUJIMOTO S., YAMAMOTO K., TAKESHIGE Y., Histochemical and autoradiographic findings on specific granules of the endothelial cells, Proc. Internat. Congress on Electron Microscopy 2, Toronto, 1978, 466–467.

- [13] GOERKE J., Lung surfactant, *Biochim. Biophys. Acta*, 144: 241-261, 1974.
- [14] GONIAKOWSKA L., Metabolism, resistance to hypotonic solutions and ultrastructure of erythrocytes of five amphibian species, *Acta Biol. Cracov.*, 16: 113-134, 1973.
- [15] GONIAKOWSKA-WITALIŃSKA L., Ultrastructural and morphometric study of the lung of the *European salamander*, *Salamandra salamandra* L., *Cell Tissue Res.*, 191: 343-356, 1978.
- [16] GONIAKOWSKA-WITALIŃSKA L., Ultrastructural and morphometric changes in the lung of the newt, *Triturus cristatus carnifex* Laur. during ontogeny, *J. Anat.*, 130: 571-583, 1980.
- [17] GONIAKOWSKA-WITALIŃSKA L., Scanning and transmission electron microscopic study of the lung of the newt, *Triturus alpestris* Laur., *Cell Tissue Res.*, 205: 133-145, 1980.
- [18] GONIAKOWSKA-WITALIŃSKA L., Endocrine-like cells in the lungs of the newt, *Triturus alpestris* Laur., *Cell Tissue Res.*, 210: 521-524, 1980.
- [19] GONIAKOWSKA-WITALIŃSKA L., A new type of cell in the pulmonary epithelium of the newt *Triturus alpestris* Laur; a scanning and transmission electron microscopic study, *Cell Tissue Res.*, 210: 479-484, 1980.
- [20] GONIAKOWSKA-WITALIŃSKA L., A peculiar mode of the formation of surface lining layer in the larval lungs of *Salamandra salamandra*, *Tissue and Cell*, 12: 539-546, 1980.
- [21] GONIAKOWSKA-WITALIŃSKA L., Neuroepithelial bodies in the lung of the tree frog, *Hyla arborea* L. A scanning and transmission electron microscopic study, *Cell Tissue Res.*, 217: 435-441, 1981.
- [22] GRONIEWSKI J., BICZYKOWA W., Structure of the alveolar lining film of the lungs, *Nature*, 204: 745-747, 1964.
- [23] GÓRECKA W., Budowa i morfometria płuc rzekotki *Hyla arborea*, *Praca magisterska niepublikowana*.
- [24] GUIMOND R. W., HUTCHISON V. H., Gas exchange of giant salamanders of North America, [w:] *Respiration of Amphibious vertebrates*, red. G. M. Hughes, Academic Press, London, New York, San Francisco, 1976, 313-338.
- [25] HASSET R. E., ENGLEMAN W., KUHN Ch., Extramembranous particles in tubular myelin from rat lung, *J. Ultrastr. Res.*, 71: 60-67, 1980.
- [26] HIGHTOWER J. A., BURKE J. D., HAAR J. L., A light and electron microscopic study of the respiratory epithelium of the adult newt *Notophthalmus viridescens*, *Can. J. Zool.*, 53: 465-472, 1975.
- [27] HITCHCOCK K. R., PARSONS W. J., Separation and partial characterization of fractions derived from frog lung homogenates. A possible marker system for amphibian pulmonary surfactant, *J. Histochem. Cytochem.*, 25: 1363-1367, 1977.
- [28] HUGHES G. M., Ultrastructure of the air-breathing organs of some lower vertebrates. Proc. 7^b Congress Internat. Microscopic Electronique 3, Grenoble 1970, 599-600.
- [29] HUGHES G. M., WEIBEL E., Morphometry of fish lungs, [w:] *Respiration of Amphibious Vertebrates*, red. G. M. Hughes, Academic Press, London, New York, San Francisco 1976, 213-233.
- [30] HUGHES G. M., VERGARA G., Phospholipids in lung surfactant of *Rana pipiens*, *J. Physiol.*, 275: 48-49P, 1977.
- [31] HUGHES G. M., WEIBEL E., Visualization of the layers lining the lung of

- the South American Lungfish (*Lepidosiren paradoxa*) and a comparison with the frog and rat, *Tissue and Cell*, **10**: 343–353, 1978.
- [32] JASIŃSKI A., KILARSKI W., Ultrastruktura naczyń włosowatych kręgowców. Morfologiczne podstawy mikrokrażenia i przepuszczalności, *Postępy Biologii Komórki*, **3**: 393–503, 1976.
- [33] KING R. J., The surfactant system of the lung, *Feder., Procc.*, **33**: 2238–2247, 1974.
- [34] KLIKA E., The electron microscopy and histochemistry of the lung alveolus, *Acta Univ. Carolinae Med. Monografia XX*; 1–128, 1965.
- [35] KÖLLIKER R. A., Zur Kenntnis des Baus der Lunge des Menschen, *Verhandl. Phys. Med. Ges. Würzburg*, **16**: 1–24, 1881.
- [36] LAUWERYNS J. M., COKELAERE M., Hypoxia-sensitive neuroepithelial bodies intrapulmonary secretory neuroreceptors, modulated by the CNS, *Z. Zellforsch.*, **145**: 521–540, 1973.
- [37] LAUWERYNS J. M., COKELAERE M., DELEERSNYDER M., LIEBENS M., Intrapulmonary neuroepithelial bodies in newborn rabbits, *Cell Tissue Res.*, **182**: 425–440, 1977.
- [38] LAUWERYNS J. M., COKELAERE M., THENYNCK P., Cross-circulation studies on the influence of hypoxia on neuroepithelial bodies in young rabbits, *Cell Tissue Res.*, **193**: 373–386, 1978.
- [39] MARCUS H., LUNGEN, [w:] *Hanbuch der vergleichenden Anatomie der Wirbeltiere*, red. L. Bolk, E. Göppert, E. Kallius, W. Lubosch, Urban und Schwarzenberg, Berlin und Wien 1937, 909–989.
- [40] MEBAN C., The pneumonocytes in the lung of *Xenopus laevis*, *J. Anat.*, **114**: 235–244, 1973.
- [41] MEBAN C., Ultrastructure of the respiratory epithelium in the lungs of the newt *Triturus cristatus*, *Acta Zool. Stockholm*, **58**: 151–156, 1977.
- [42] MEBAN C., An electron microscope study of the respiratory epithelium in the lungs of the fire salamander (*Salamandra salamandra*), *J. Anat.*, **128**: 215–224, 1979.
- [43] MISIEK L., SZARSKI K., Dimensions of cells in some tissues of six amphibian species, *Acta Biol. Cracov.*, **21**: 127–132, 1978.
- [44] NOBLE G. K., The integumentary, pulmonary and cardiac modifications correlated with increased cutaneous respiration in amphibia, *J. Morphol.*, **40**: 341–416, 1925.
- [45] OKADA Y., ISHIKO S., DAIDO S., KIM J., IKEDA S., Comparative morphology of the lung with special reference to the alveolar epithelial cells. I. Lungs of Amphibia, *Acta Tuberc. Jap.*, **11**: 63–72, 1962.
- [46] PATTLE R. E., HOPKINSON D. A. W., Lung lining in bird, reptile and amphibian, *Nature*, **200**: 894–895, 1963.
- [47] PATTLE R. E., SCHOCK C., CREASEY J. M., HUGHES G. M., Surpellic films, lung surfactant, and their cellular origin in newt, caecilian and frog, *J. Zool. Lond.*, **182**: 125–136, 1977.
- [48] PENGAL M., Budowa i morfometria płuc ropuchy *Bufo bufo*, Praca magisterska niepublikowana.
- [49] POLL M., Etude sur la structure adulte et la formation des sacs pulmonaires des Protoptères, *Extrait Annal. Musée Royal Afrique Centrale, Sciences Zool.* ser. **8**: 131–171, 1962.
- [50] RABL H., Integument der Anamnier, [w:] *Handbuch der vergleichende Ana-*

- tomie der Wirbeltiere, red. L. Bolk, E. Göppert, E. Kallius, W. Lubosch, Urban und Schwarzenberg, Berlin, Wien 1931, 271-374.
- [51] ROGERS D. C., HALLER C. J., Innervation and cytochemistry of neuroepithelial bodies in the ciliated epithelium of the toad lung (*Bufo marinus*), *Cell Tissue Res.*, **195**: 395-410, 1978.
- [52] SPERRY D. G., WASSERSUG R. J., A proposed function for microridges on epithelial cells, *Anat. Rec.*, **185**: 253-258, 1978.
- [53] SOROKIN S. P., Histochemistry in embryonic lungs, [w:] Neonatal respiratory adaptation, red. T. K. Oliver, US Publ. Health Service, Publ. 1432, Washington 1963, 79-93.
- [54] WASANO K., YAMAMOTO T., Monoamine containing granulated cells in the frog lung. *Cell Tissue Res.*, **193**: 201-209, 1978.
- [55] WEIBEL E., Morphological basis of alveolar-capillary gas exchange, *Physiol. Res.*, **53**: 419-495, 1973.
- [56] WEIBEL E., PALADE G. E., New cytoplasmic components in arterial endothelia, *J. Cell Biol.*, **23**: 101-112, 1964.
- [57] WILLNOW I., Die lunge von *Amphiuma means means*. I. Mitteilung: Morphologie, *Zool. Beiträge*, **10**: 29-85, 1964.
- [58] WHITFORD W. G., HUTCHISON V. H., Gas exchange in salamanders, *Physiol. Zool.*, **33**: 228-242, 1965.
- [59] WHITFORD W. G., HUTCHISON V. H., Body size and metabolic rate in salamanders, *Physiol. Zool.*, **40**: 127-133, 1967.

Otrzymano: 18 kwietnia 1981.

Przyjęto: 22 maja 1981.

Adres autorki: ul. Karasia 6, 30-060 Kraków.

EWOLUCJA ROZMIARÓW KOMÓREK KRĘGOWCÓW

A FUNCTIONAL INTERPRETATION OF CELL AND GENOME SIZE
IN VERTEBRATES

Henryk SZARSKI

Zakład Anatomii Porównawczej, Instytut Zoologii,
Uniwersytet Jagielloński, Kraków

Streszczenie. Artykuł jest kolejnym przeglądem tytułowego zagadnienia. Dane faktyczne opublikowane w ostatnich latach nie obalają hipotez sformułowanych przez autora w 1974 r. [83]. Pojawiły się jednak nowe wiadomości i koncepcje pozwalające na snucie dalej idących wniosków. Małe rozmiary komórek umożliwiają intensywną przemianę materii i szybki rozwój ontogenetyczny. Zbudowanie organizmu z dużych komórek jest jednak oszczędniejsze, ponadto „egoistyczna” natura DNA wywołuje automatyczne powiększanie się genomu, a więc także komórek. Tendencję tę może ograniczać dobór naturalny. Presja na przyspieszenie rozwoju ontogenetycznego spowodowała zmniejszenie komórek u ryb kostnoszkieletowych i gadów. Powiększenie komórek ryb dwudysznych i niektórych płazów jest związane z ich szczególnymi mechanizmami oddechowymi, nie pozwalającymi na intensywne utlenowanie krwi. Zmusza to do niskiego metabolizmu komórek, sprzyja więc oszczędnej strategii ewolucyjnej prowadzącej do powiększenia organizmu i komórki.

Summary. Examination of the cell size in one kind of tissue provides reliable information on the genome size of the species in vertebrates. There are two principal advantages in the reduction of genome size: 1. The smaller the genome, the more rapid is the cell cycle, and the shorter the embryonal development, 2. A high level of metabolism is incompatible with large cells containing a big genome. The first factor is responsible for the small genome size of teleosts and reptiles, the first and second for the small genome of birds, the second for the genome size in mammals. There are several causes which promote the increase of genome and cell size, the most important are the “selfish” nature of DNA and the economy of maintenance costs of an organism built of large cells. The latter factor is decisive in animals faced often with oxygen deficit and is responsible for the enormous cells of dipnoans and some aquatic amphibians.

W 1974 r. na łamach *Postępów Biologii Komórki* ukazał się artykuł przeglądowy poświęcony tytułowemu zagadnieniu [83]. Po upływie paru lat nagromadziły się nowe dane, pojawiły się też nowe koncepcje usprawiedliwiające kolejny referat. Wspomniany artykuł zamykały wnioski, których nie obaliły świeże publikacje. Zaczniemy od przypomnienia tych wniosków.

Trzy wielkości, a mianowicie, rozmiary komórek, rozmiary jąder komórkowych i zawartość DNA w jądrach komórkowych są z sobą związane. Znajomość wymienionych korelacji jest jednak ograniczona. Wielkość komórek pierwotnych kręgowców była bliska tej, jaka występuje obecnie u niektórych ryb spodustych i ssaków. W liniach prowadzących do *Teleostei*, gadów i ptaków komórki uległy pomniejszeniu, powiększyły się natomiast u dwudysznych i u niektórych płazów.

ILOŚĆ DNA W JĄDRZE I JEJ ZWIĄZKI Z NIEKTÓRYMI CECHAMI KOMÓREK I ORGANIZMÓW

Istotną cechą pomiarów komórek jest częste uzyskiwanie wyników o dużym rozrzucie, nawet wówczas gdy się rozpatruje wartości średnie dla osobnika lub tkanki. Tak np. średnie objętości komórek kanalików nefronów u dwu osobników ropuchy (*Bufo bufo*), mających prawie identyczne rozmiary, wynosiły $819,2 \mu\text{m}^3$ i $1512,8 \mu\text{m}^3$ [52]. Objętości hepatocytów u kilku równowiekowych osobników szczura sięgały od 3279 do $6165 \mu\text{m}^3$ [44]. Powierzchnia neuronów należących do tego samego jądra w mózgu kota ma wymiary $3273 \mu\text{m}^2 \pm 2964$ [6]. Tego rodzaju rozbieżności skłaniają niektórych do lekceważenia zagadnienia rozmiarów komórki i proporcji jej składników. Zapewne część rezultatów jest obciążona błędami wynikającymi z niedoskonałej metodyki. Wiemy też, że rozmiary komórek i ich składników zmieniają się pod wpływem stanu czynnościowego narządów, czasem np. w rytmie 24-godzinnym [98]. Można też sądzić, że nawet istotne i trwałe różnice w rozmiarach komórek, dzielące poszczególne osobniki gatunku są znaczne. Dobór naturalny jest widocznie tolerancyjny w tym zakresie i nie jest w stanie usunąć okazów, których rozmiary komórek dość wyraźnie odbiegają od wartości średniej dla gatunku. Nie oznacza to jednak, aby jego tolerancja była nieograniczona. Przeciwnie, stosunek objętości największych komórek danej tkanki do najmniejszych u poszczególnych osobników w obrębie gatunku rzadko zbliża się lub przekracza relację 1:2.

Rozbieżności w wartościach średnich mogą czasem być wynikiem występowania w tkankach pewnej liczby komórek aneuploidalnych, poliploidalnych lub wielojądrowych. Niestety informacje co do zasięgu tego zjawiska są skąpe i rozproszone. Pomijając z reguły wielojądrowe ko-

mórki mięśni prążkowanych, wiadomo od dawna, że nierzadkie są wielojądrowe hepatocyty, opisywano też dość częste występowanie rozmaitych odchyłeń od diploidalności wśród białych ciałek krwi [80]. Wysoką poliploidalność dostrzeżono również w jądrach syncytium pokrywającego woreczek żółtkowy ryb [93].

Wyciąganie wniosków odnoszących się do rozmiarów i proporcji komórek jest bardzo utrudnione przez ogromną różnorodność stosowanej metodyki, a także sposobów przedstawienia wyników. Dlatego niektórych obszernych zestawień nie można należycie wykorzystać (np. [13]). W prawie każdym przypadku pojawia się konieczność sięgnięcia do oryginalnej publikacji, gdy się zaś to uczyni spotyka się zwykle z rozczarowaniem, gdyż rzadko da się i wówczas porównywać dane.

Mimo tych kłopotów wzrasta ilość doniesień świadczących o istnieniu korelacji między rozmiarami komórek i ich zawartością jądrowego DNA. Tak np. dowiodło jej porównanie komórek 26 gatunków płazów [65]. Doniesiono w 1965 r. [88], że niewielki płaz ogoniasty, *Rhyacotriton olympicus* (*Ambystomatidae*) ma wyjątkowo duże hepatocyty. Dwanaście lat później [96] przekonano się, że gatunek ten ma bardzo wiele DNA w komórkach (ponad 60 pg, w komórce haploidalnej), podczas gdy *Cryptobranchidae* nie przekraczają 56 pg [54, 56]. Podobne wyniki dało zbadanie rozmiarów komórek dwu węgorzy pacyficznych (tabela 1 [69]). Niestety w pracy tej użyto jednostki arbitralne. Korelację między rozmiarami jąder i rozmiarami komórek stwierdza się również u przed-

TABELA 1

Porównanie ilości DNA z rozmiarami jąder komórkowych i krwinek (jednostki umowne) według [69]

Gatunek	DNA	Jądro erytrocytu	Erytrocyt
<i>Anguilla japonica</i>	304	190	818
<i>Astroconger myriaster</i>	426	280	1170

TABELA 2

Porównanie ilości jądrowego DNA (w pg), objętości komórek (w μm^3) według [44] i [87]

Gatunek	DNA	Komórka nefronu	Komórka wątroby
<i>Cyprinus carpio</i>	1,7	692	682
<i>Carassius carassius</i>	2,0	886	280
<i>Rattus rattus</i>	7,0		3279–6545

stawicieli *Cyprinidae* (tabela 2). Wedle Hinegardnera i Rosena [40] haploidalna zawartość DNA w jądrze komórkowym *Teleostei* wynosi u znacznej większości gatunków około 1 pg. W tabeli 2 zwracają uwagę rozmiary hepatocytów karasia, trzeba więc przypomnieć, że komórki wątroby gromadzą u różnych gatunków rozmaite ilości materiałów zapasowych, co powoduje znaczne zróżnicowanie rozmiarów.

Zarówno karp, jak i karaś pochodzą, zdaniem wielu autorów, od formy tetraploidalnej [77]. Za takim pochodzeniem świadczy obraz elektroforetyczny białek, wykazujący u karpia wyraźny nadmiar izoenzymów — około połowy loci jest polimorficznych [24, 25]. Stanowi to wyraźny kontrast z innymi przedstawicielami ryb karpiowatych. Na przykład *Notropis stramineus* wykazuje bardzo ograniczony polimorfizm. Stwierdzono, że wśród ryb karpiowatych podejrzanych o pochodzenie poliploidalne zawartość DNA w jądrze jest nieco wyższa niż u diploidów, do których zaliczono *Tinca tinca*, *Abramis brama* i *Rutilus rutilus* [78]. Jednak rozmiary erytrocytów u wszystkich karpiowatych są niewielkie i wzajemnie zbliżone. Wobec tego stosunek plazmojądrowy w erytrocytach karpia i karasia jest w porównaniu z innymi *Cyprinidae* nieco przesunięty na korzyść jądra.

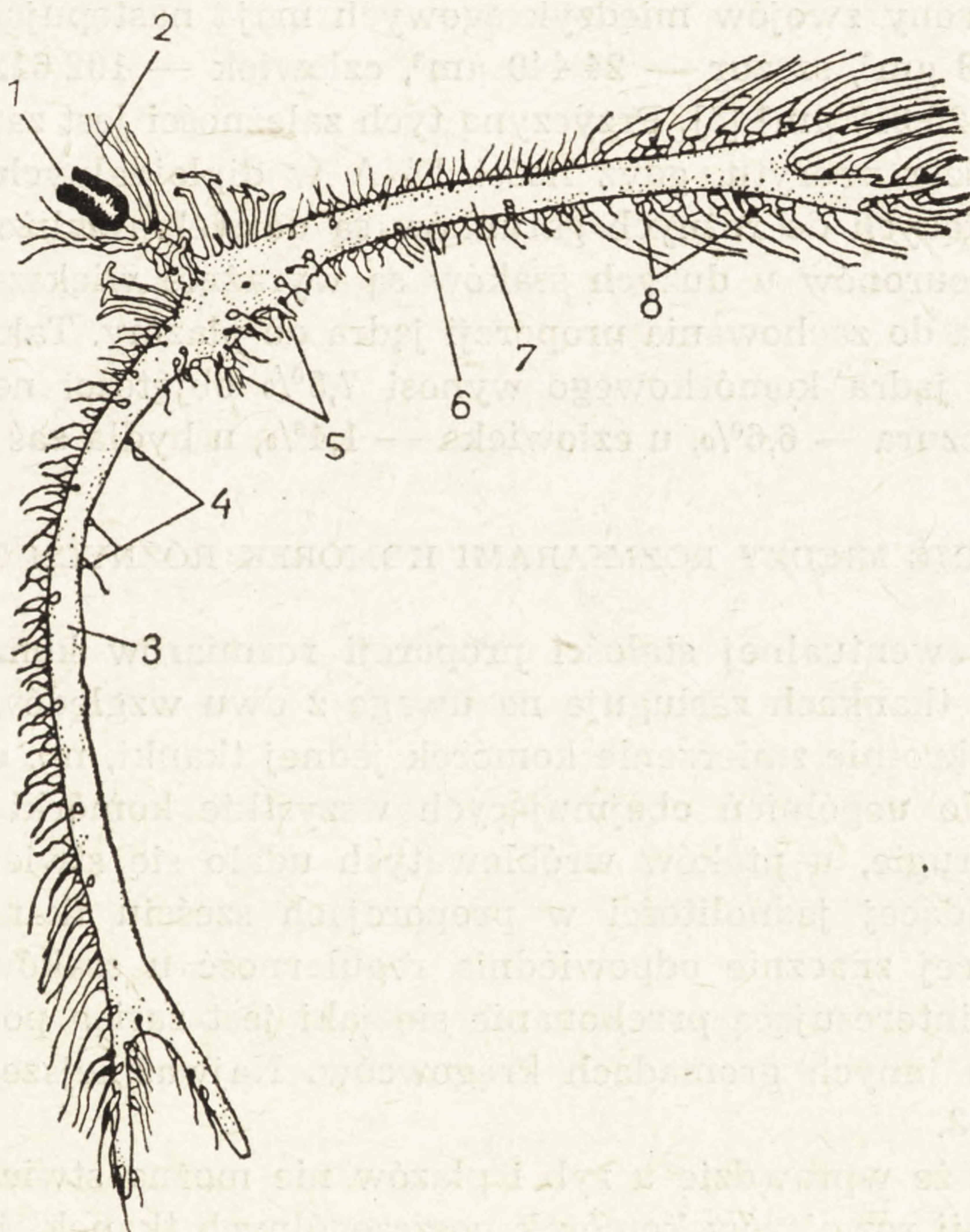
W literaturze znajdują się różne interesujące dane o proporcjach komórek przypuszczalnie poliploidalnych. Niektórzy [75] przypuszczają, że pewne gatunki spośród *Salmonidae* i *Clupeidae* pochodzą od tetraploidalnych przodków. Diploidami ich zdaniem są *Osmerus eperlanus*, *Clupea sprattus* i *C. harengus*, natomiast *Salmo trutta*, *S. irideus*, *Coregonus fera* i *Salvelinus fontinalis* to tetraploidy. W erytrocytach form tetraploidalnych stosunek plazmojądrowy jest przesunięty na korzyść jądra, gdyż poliploidyzacja powiększyła rozmiary jąder, lecz rozmiary komórek nie zmieniły się odpowiednio. Wymienieni autorzy sądzą [75], że tendencja do powrotu do pierwotnych rozmiarów komórek jest słabsza u *Salmonidae* i *Clupeidae*, od tej jaką wykazują *Cyprinidae*.

Trzeba przypomnieć, że po eksperymentalnej poliploidyzacji zarówno rozmiary komórek, jak i jąder ulegają odpowiedniemu powiększeniu. Stwierdził to dawno Fankhauser [23], później potwierdzono to kilkakrotnie (np. [15]). Porównano też komórki diploidalnej *Hyla chrysoscelis* z komórkami tetraploidalnej *H. versicolor* [1]. Mimo że ten ostatni gatunek ma dwa razy więcej chromosomów, ilość DNA w jądrach komórkowych wynosi u niego 190% ilości obecnej u diploida. Pozostałe składniki jądra komórkowego tetraploida są jeszcze odleglejsze od dwukrotnej zawartości jądra diploidalnego: zawartość histonów wynosi 170%, jądrowego RNA — 163%, białka — 146%. W efekcie objętość jądra komórkowego tetraploida wynosi tylko 142% tej objętości u diploida. Autorzy [1] widzą w tym wynik działania mechanizmów regulacyjnych

czynnych po poliploidyzacji. Innego przykładu działania takich mechanizmów dostarczyło zbadanie tetraploidalnego płaza *Odontophrynus americanus* [76], mającego podwójną ilość DNA w jądrze, lecz zawartość komórkowego RNA, dehydrogenazy mleczanowej i rozmiary erytrocytów są u niego takie same jak u pokrewnego diploida. Przykładów takich jest więcej [25, 78].

Można przypuszczać, że wystąpienie poliploidyzacji zmienia rozmiary i proporcje komórki, które najpierw pod wpływem regulacji wewnętrznej organizmu, a później pod wpływem działania zmienności i doboru naturalnego powoli powracają do stosunków występujących u formy rodzicielskiej.

Należy w tym miejscu z naciskiem przypomnieć, że korelacje między rozmiarami komórki, rozmiarami jądra i ilości DNA u różnych gatunków stwierdzamy tylko przy porównywaniu komórek homologicznych.



Ryc. 1. Komórka Mauthnera karasia, według Furukawy i Fuhrspana z Jasińskiego (Anatomia Porównawcza Kręgowców, PWN, 1976)

1 — akson, 2 — pęczek włókien spiralnych, 3 — dendryt brzuszny, 4 — małe zakończenia kolbkowate, 5 — małe dendryty, 6 — duże zakończenia kolbkowate, 7 — dendryt boczny, 8 — zakończenia maczugowate

Stwarza to trudności, np. przy porównywaniu neuronów, które mają w tym samym organizmie bardzo różne rozmiary. Niektóre duże komórki nerwowe są poliploidami [68], inne są diploidami. Przykładem szczególnym są dwie gigantyczne komórki obecne w rdzeniu przedłużonym wielu kręgowców wodnych, zwane komórkami Mauthnera. Niestety trudno podać ich objętość wobec bardzo szczególnego kształtu. Korpus komórki Mauthnera wydłuża się w dwa bardzo grube „dendryty”, których objętość należałoby chyba uwzględnić (ryc. 1). Gdyby je zaliczyć do korpusu komórki miałby on u karasia około 1000 μm długości, przy 10 μm średnicy [19]. Średnica neurytu komórki Mauthnera u ryby dwudysznej *Protopterus* przekracza 200 μm . Pomimo tych ogromnych rozmiarów komórki te są diploidalne. Ich duże, bardzo słabo barwiące się, jądra zawierają diploidalną ilość DNA [4].

Rozmiary neuronów mogą też zależeć od rozmiarów ciała gatunku. Tak np. neurony zwojów międzykręgowych mają następujące objętości: mysz — 4908 μm^3 , szczur — 24 440 μm^3 , człowiek — 102 612 μm^3 , bydło domowe — 125 317 μm^3 [5]. Przyczyną tych zależności jest zapewne związek z długością neurytu, gdyż ilości DNA w diploidalnych komórkach ssaków należących do różnych gatunków są do siebie zbliżone. Pomimo tego jądra neuronów u dużych ssaków są wyraźnie większe, co jednak nie wystarcza do zachowania proporcji jądra do plazmy. Tak więc u myszy objętość jądra komórkowego wynosi 7,5% objętości neuronu zwojowego, u szczura — 6,6%, u człowieka — 1,4%, u bydła zaś — 1,9% [5].

KORELACJE MIĘDZY ROZMIARAMI KOMÓREK RÓŻNYCH TKANEK

Problem ewentualnej stałości proporcji rozmiarów komórek w poszczególnych tkankach zasługuje na uwagę z dwu względów. Po pierwsze, niejednokrotnie zmierzenie komórek jednej tkanki, np. erytrocytów, prowadziło do uogólnień obejmujących wszystkie komórki danego gatunku. Po drugie, u ptaków wróblowatych udało się stwierdzić istnienie daleko idącej jednolitości w proporcjach sześciu tkanek [61, 62], przekraczającej znacznie odpowiednią regularność u ssaków [83]. Było więc rzeczą interesującą przekonanie się jaki jest zasięg podobnych regularności w innych gromadach kręgowców. Najważniejsze wyniki zawiera tabela 3.

Widzimy, że wprawdzie u ryb i płazów nie można stwierdzić jednolitej hierarchii rozmiarów komórek poszczególnych tkanek, jednakże odstępstwa od niej nie są znaczne. Na przykład komórki warstwy twórczej naskórka są najmniejsze z badanych, do dużych natomiast należą komórki kubkowe, hepatocyty i komórki kanalików nerkowych. Jedynie u *Bufo bufo* te ostatnie komórki są mniejsze od komórek naskórka.

TABELA 3

Objętości komórek kilku gatunków ryb i płazów w μm^3 oraz wymiary erytrocytów w μm^2

Gatunek	Nefron	Wątroba	Nabłonek jelita	Naskórek	Komórka kubkowa	Erytrocyt oś długa* oś krótka
<i>Cyprinus carpio</i>	692	682	458	141	—	69,8
<i>Carassius carassius</i>	789	280	506	160	—	—
<i>C. auratus gibelio</i>	—	—	526	177	—	od 57,0 do 93,8
<i>Batrachophrynus brachydactylus</i>	—	1864	739	128	—	66,0
<i>B. macrostomus</i>	—	3313	1132	130	—	—
<i>Gastrotheca riobambae</i>	—	2938	1045	232	—	—
<i>Hyla arborea</i>	1489	—	1269	704	1528	311,0
<i>Rana esculenta</i>	1677	—	1370	784	3372	375,2
<i>Bufo bufo</i>	1059	—	1656	1376	2110	—
<i>Bombina bombina</i>	3077	—	2240	1749	3866	536,5
<i>Triturus alpestris</i>	4102	—	3925	2117	3734	823,4
<i>T. vulgaris</i>	4936	—	7178	2167	2183	—
<i>Rhyacotriton olympicus</i>	19287	28571	—	—	—	—
<i>Amphiuma means</i>	20720	16715	—	—	—	—

Źródła: [30, 31, 52, 79, 85, 86, 87, 88].

U czterech gatunków płazów maksymalne rozmiary miały komórki kubkowe. Komórki nabłonka jelitowego są znacznie większe od komórek naskórka, jednak u większości z badanych gatunków ustępują rozmiarami komórkom pozostałym, są natomiast wyjątkowo duże u *Triturus vulgaris*. François-Krassowska [27] opisała korelację rozmiarów między komórkami tarczycy i erytrocytami u pięciu gatunków Anura, przy czym u *Hyla arborea* stwierdziła komórki najmniejsze, a największe u *Bombina bombina*. Dane te są zgodne z hierarchią danych znajdujących się w tabeli 3. Pengal (w maszynopisie) podaje, że do tej samej hierarchii stosują się rozmiary pneumocytów płazów. Niestety włączenie danych zawartych w ostatnich dwu pracach do tabeli 3 byłoby mylące wobec odmienności metodyki pomiarów i przedstawienia wyników. Możemy jednak stwierdzić, że przytoczone dane dowodzą, że zmierzenie komórek w jednej lub dwu tkankach usprawiedliwia wygłoszenie sądu o rozmiarach komórek danego gatunku, również u ryb i płazów. Tak np. gdybyśmy znali tylko rozmiary komórek nabłonka jelitowego, nie popełnilibyśmy błędu twierdząc, że karp i karaś mają komórki mniejsze od

TABELA 4

Porównanie wymiarów jamek kostnych wedle Thomson i Muraszko [92] w jednostkach umownych z haploidalną ilością DNA w jądrze komórkowym

Gatunek	Wiek	Jamka kostna	DNA pg	Źródło informacji o DNA
<i>Sterropterygion</i> , Osteolepiformes	dolny dewon	0,07	—	
<i>Megalichthys</i> , Osteolepiformes	dolny karbon	0,29	—	
<i>Glyptolepis</i> , Holoptychiformes	środ. dewon	0,39	—	
<i>Latimeria</i> , Actinistia	współczesna	0,09	6,6	[91]
<i>Eryops</i> , Labyrinthodontia	perm	0,17	—	
<i>Zatrachys</i> , Labyrinthodontia	perm	0,44	—	
<i>Cacops</i> , Labyrinthodontia	perm	0,09	—	
<i>Rana clamitans</i> , Anura	współczesna	0,06	5,4	[64]
<i>Bufo americanus</i> , Anura	współczesna	0,07	6,3	[64]
<i>Necturus maculosus</i> , Urodela	współczesny	0,22	95,0	[64]
Różne gatunki Dipnoi	dolny karbon	od 0,71 do 2,38		
Różne gatunki Dipnoi	współczesne	od 2,37 do 5,7	od 80,0 do 142	[90]

płazów bezogonowych. Podobnie, na podstawie rozmiarów tylko jednej kategorii komórek moglibyśmy stwierdzić, że *Bartrachophrynus brachydactylus* ma najmniejsze komórki spośród badanych Anura. Tak więc wnioski Thomsona [90, 92] (tabela 4) odnośnie ewolucji rozmiarów ko-

mórek i ilości jądrowego DNA w przeszłości kręgowców są godne zaufania, mimo że tylko rozmiary osteocytów można mierzyć na materiale kopalnym, a więc tylko na nich oparto całe rozumowanie.

UWAGI O SKŁADZIE JĄDROWEGO DNA

Wiadomo, że DNA zawiera zapis informacji genetycznej. Skoro więc rozmiary komórki korelują z rozmiarami jądra i z ilością jądrowego DNA nasuwa się wniosek, iż organizmy zbudowane z dużych komórek zawierają więcej informacji od tych, które mają komórki drobne. Sądzono więc, że kręgowce o komórkach dużych, czyli zawierających wiele DNA, mają szczególnie bogate perspektywy dalszej ewolucji [39, 63]. Wniosków tych nie potwierdzają obserwacje, gdyż najsilniej zróżnicowane gromady kręgowców: ptaki i ryby kostnoszkieletowe mają najmniejsze komórki, największe DNA zaś stwierdza się u grup ubogich w gatunki i wysoce konserwatywnych — Dipnoi i Urodela [56, 82, 84].

Ilość DNA w jądrze eukariotów wydaje się też wielokrotnie większa od minimum potrzebnego do zapisu sekwencji wszystkich RNA i białek. Fakt ten podkreślają wielkie różnice w ilości DNA dzielące bliskie sobie gatunki. W rodzaju *Plethodon* (Urodela) najmniej DNA stwierdzono u *P. shenandoah* — 18,2 pg, najwięcej zaś u *P. vandykei* — 69,3 pg [53]. W jednej z grup w obrębie rodzaju *Lathyrus* (Leguminosae) stwierdzono wartości sięgające od 9,18 pg (*L. unguatus*) do 20,37 pg (*L. hirsutus*) [59]. W komórce *Xenopus tropicalis* zawartość DNA wynosi 3,55 pg, u *X. ruwenzorensis* zaś 16,25 pg [89]. *X. ruwenzorensis* jest heksaploidem, lecz np. wszystkie badane gatunki rodzaju *Plethodon* mają taką samą liczbę chromosomów. Bardzo znaczne różnice w ilości jądrowego DNA występują u bliskich sobie gatunków w rodzajach *Allium*, *Trillium* i *Frittilaria* [12].

Liczni badacze podkreślają, że zwiększenie zawartości DNA wynika głównie ze zwielokrotnienia powtarzalnych frakcji DNA. Tak np. dwa gatunki spośród Anura, *Xenopus laevis* (3,5 pg) i *Bufo bufo* (7 pg) mają prawie tę samą ilość unikalnego DNA, natomiast *B. bufo* ma około 3–4 razy więcej powtarzalnego DNA. Identyczne stosunki dostrzeżono porównując dwa gatunki Urodela — *Triturus cristatus* (23 pg) z *Necturus maculosus* (52 pg). Jeśli jednak porównać ilość unikalnego DNA płazów ogoniastych z płazami bezogonowymi okazuje się, że Urodela mają około 5 razy tyle tej frakcji co Anura [3]. Cytowani autorzy sądzą więc, że istnieją dwa odmienne sposoby zwielokrotniania DNA — jeden dotyczy tylko DNA powtarzalny, drugi obejmuje całość zapisu.

Cavalier-Smith [10] sądzi, że można wyróżnić dwa główne składniki DNA: G-DNA, zawierający zapis białek i RNA, oraz S-DNA, którego

rolą jest jedynie wypełnianie jądra komórkowego. Od jego ilości zależy, czy dany gatunek ma komórki małe, czy duże. Mniej ważne składniki to np. K-DNA kinetochorów i T-DNA zawarty w telomerach. Podział ten zdaniem Cavalier-Smitha nie pokrywa się z podziałem DNA na unikalny i powtarzalny, choć jest do niego zbliżony.

Porównując wysoce powtarzalny DNA blisko spokrewnionych gatunków za pomocą pomiarów wyporności i szybkości hybrydyzacji badacze stwierdzali nieraz jego daleko idącą odmiennność, nawet przy identyczności zapisu genów (np. u dwu gatunków *Xenopus* [97]). Fakt ten wyjaśnił się dopiero po dokładniejszym zbadaniu wysoce powtarzalnego DNA. Okazało się, że składa się on z bardzo krótkich sekwencji, zawierających np. u *Drosophila* tylko 7 par nukleotydów. Zmiana jednej pary w takiej sekwencji, np. jej opuszczenie, powtórzenie lub zastąpienie inną, wywołuje daleko idące różnice w wyporności DNA i jego własności hybrydyzacyjnych [8], tak że wyda się on badaczowi tych cech bardzo różny od pierwotnego, mimo że odmiennność jest zapewne wynikiem pojedynczej mutacji punktowej.

Od niedawna wiadomo, że zapis poszczególnych genów eukariotów jest często — może zawsze — nieciągły. Między odcinki będące nosicielami informacji genetycznej (ekzony) włączone są odcinki nieprzekładalne (introny). Na przykład stwierdzono, że zapis owotransferyny wytwarzanej przez jajowód kury składa się co najmniej z 17 ekzonów, rozdzielonych przez 16 intronów [11]. O ile ekzony są częścią G-DNA, o tyle umieszczenie intronów w podziale Cavalier-Smitha jest problematyczne, gdyż nie wiemy jaką rolę pełnią te odcinki i jaka jest ich dopuszczalna zmienność.

OKOLICZNOŚCI WPLYWAJĄCE NA ROZMIARY KOMÓREK

Przytoczone fakty pozwalają na stwierdzenie, że zawartość DNA w jądrze komórkowym łatwo ulega zmianom pod wpływem doboru naturalnego. Znamy co najmniej dwa typy zwiększenia zawartości DNA: poliploidyzację całego genomu i powtórzenie (reduplikację) poszczególnych odcinków. Znaczna zmiana ilości DNA wywołuje automatyczne, proporcjonalne i natychmiastowe zmiany w rozmiarach jądra komórkowego i komórki. Pod działaniem doboru następują potem powolne zmiany proporcji, przy czym najpierw zmniejsza się komórka, potem następuje redukcja rozmiarów jądra komórkowego. Wydaje się, że najpóźniej zmniejsza się liczba chromosomów i ilość DNA. W niektórych okolicznościach duże komórki są preferowane, co powoduje utrwalenie ich rozmiarów przez dobór naturalny.

Jakie siły mogą wywoływać wymienione zjawiska? Początkowe zwiększenie ilości DNA bądź też jej pomniejszenie można uznać za wydarzenie losowe. Utrata części DNA zapewne zwykle jest szkodliwa, jednak niekiedy dobór ją toleruje, skoro zmniejszenie rozmiarów genomu powtarzało się wielokrotnie w ewolucji. Zwiększenie ilości DNA jest zapewne często niedostrzegane przez dobór. Z wielu badań wynika, że szczególnie korzystnym wydarzeniem może być poliploidyzacja występująca u mieszańca międzygatunkowego wykazującego heterozję [81]. Może ona pozwolić mieszańcowi na produkcję gamet, przez co może skokowo powstać nowy gatunek.

Związek rozmiarów komórek z rozmiarami ciała stwierdzano wielokrotnie, chociaż nie jest to związek silny, np. komórki wszystkich ssaków mają rozmiary dość podobne do siebie. Tym niemniej do prac [83, 84] warto dodać dalsze obserwacje. Po 15 pokoleniach doboru na zmianę rozmiarów ciała u *Drosophila* otrzymano zwiększenie lub zmniejszenie liczby komórek, jak również równoległe zmiany ich pomiarów [73]. Takie same wyniki uzyskano u myszy [9, 22], przy czym przekonano się, że zmiany w rozmiarach płuc i śledziony były w 70% wynikiem odmiennej liczby komórek, w 30% zaś były konsekwencją rozmiarów komórek. Natomiast zmiany w rozmiarach wątroby i nerki w równym stopniu wynikały z obu tych czynników.

Możemy więc przypuszczać, że działanie doboru, preferujące zwiększenie rozmiarów ciała, jest częściowo odpowiedzialne za to, że szczególnie duże komórki występują wśród ssaków u słonia [99], u lwa morskigo i morsa [100] oraz u największego z mrówkojadów, *Myrmecophaga tridactyla* [7]. Korelację rozmiarów krwinek z rozmiarami pancerza stwierdzono też u żółwi [28].

Mnożą się prace potwierdzające związek rozmiarów komórki z długością cyklu komórkowego. Zarówno okres S interfazy, jak i trwania faz mitozy są tym dłuższe, im więcej DNA zawiera jądro komórkowe [34, 35]. Im większe są komórki pierwotniaków, tym wolniej się rozmnażają [26]. Mazin [49] i Ignatiewa [41, 42] potwierdzili na obszerniejszym materiale dawniejsze obserwacje [18, 29] dowodzące, że im więcej DNA zawierają jądra komórkowe niższych kręgowców, tym wolniej biegnie ich rozwój zarodkowy. Z regułą tą harmonizuje bardzo mała zawartość DNA ($2n = 1,9$ pg) w komórkach pustynnego płaza *Limnodynastes ornatus* [55]. Płazy żyjące w suchych środowiskach, składające jaja do wysychających stawków, muszą się rozwijać bardzo szybko. Najniższą ilość DNA w obrębie płazów znaleziono u amerykańskiego rodzaju *Scaphiopus* ($2n = 1,6$ pg) [29]. Bardzo bliska systematycznie do *Scaphiopus* jest nasza grzebiuszka (*Pelobates*), której kijanki żyją w stałych zbiornikach wodnych i osiągają bardzo duże rozmiary, ma ona też znacznie większy

genom ($2n = 8,2$ pg [57]). Porównanie tych dwu gatunków uzmysławia, jak nacisk doboru wymusił w suchym środowisku redukcję DNA na poziom wiele niższy od typowego dla Anura. Cavalier-Smith [10] porównał długość trwania cyklu komórkowego u wielu roślin z zawartością DNA w jądrze i doszedł do wniosku, że można go przedstawić w postaci wyrażenia $kC^{1/3}$, gdzie C oznacza haploidalną ilość DNA. Współczynnik k wynosi u dwuliściennych 6,4, u jednoliściennych — 5,4.

Wskazanie sił doboru redukujących rozmiary genomu i komórki wydaje się więc zadaniem łatwym. Wystarczy dodać, że według obliczeń MacArthura i Wilsona [47] skrócenie rozwoju zarodkowego o około 10% jest równe podwojeniu płodności gatunku. Trudniejsze natomiast jest wskazanie czynników sprzyjających zwiększaniu ilości DNA. W poprzednich artykułach cytowałem liczne obserwacje dowodzące, że wzrost rozmiarów genomu nie zapewnia większej odporności zapisu na zaburzenia, jak niektórzy przypuszczali, lecz przeciwnie zwiększa jego wrażliwość na działanie promieniowania jonizującego zgodnie z teorią trafień. Ostatnio wykazano [36], że wrażliwość na promieniowanie jest w ten sam sposób związana z rozmiarami genomu, jak wrażliwość na promieniowanie. Dobór naturalny działający na rozmiary ciała może zmieniać rozmiary komórek, jednak wielkie różnice tych ostatnich u płazów, nie korelujące z rozmiarami ciała dowodzą, że rola tego czynnika nie jest ani jedyna, ani najważniejsza.

Dawniej zwracałem uwagę [82, 83], że zbudowanie organizmu o określonych rozmiarach z mniejszej liczby komórek stanowi oszczędność energetyczną i materiałową w stosunku do takiego samego organizmu zbudowanego z komórek mniejszych. Skład płynów wewnątrzkomórkowych jest zawsze odmienny od płynów międzykomórkowych. Utrzymanie tej różnicy wbrew siłom osmozy i dyfuzji wymaga stałego wkładu energii, którego wielkość zależy od łącznej powierzchni wszystkich komórek organizmu. Zmniejszenie ich liczby ograniczy więc wydatki na potrzeby bytowe. Zapewne dzięki tej oszczędności dobór naturalny może w określonych okolicznościach premiować wzrost rozmiarów komórek.

Być może, pewien wpływ — jeśli nie na powiększenie, to na utrzymanie rozmiarów genomu — ma przypuszczalna funkcja heterochromatyny w mejozie. Zdaniem wielu cytologów duża ilość heterochromatyny utrudnia crossing-over i sprzyja tworzeniu się bloków sprzężonych. Tak np. Merkle i inni [51] podejrzewają, że ten czynnik jest odpowiedzialny za bardzo niski polimorfizm u *Cryptobranchus alleganiensis*, płaza o ogromnym genomie. Różnice w budowie powtarzalnego DNA mogą obniżać płodność mieszańców międzypopulacyjnych, a przez to inicjować procesy specjacji.

Bardzo interesujący przykład powiększenia odcinka DNA będącego

zapisem białka opisuje Schimke [74]. Jeśli hodowlę komórek ssaka zatrzyma się wielokrotnie subletalnymi dawkami leku antymitocytotycznego (methotrexate), blokującego enzym, reduktazę dwuhydrofolianu, uzyskuje się szczep komórek o znacznie podwyższonej tolerancji. Komórki takie zawierają wielokrotnie więcej enzymu od komórek kontrolnych. Stwierdzono, że chromosom, za którym znajduje się zapis reduktazy jest w komórkach uodpornionych powiększony, zawiera bowiem odcinek z zapisem enzymu powtórzony około 150 razy. Jest to dobrze widoczne w preparatach chromosomów, lecz nie doprowadza do wykrywalnego metodami histochemicznymi powiększenia ilości DNA. Można to tłumaczyć w sposób następujący. Liczbę białek zapisanych w genomie ssaka ocenia się na dziesiątki tysięcy. Mimo tego zapis białek nie zajmuje nawet połowy DNA zawartego w jądrze. A więc pomnożenie zapisu jednego białka nawet 150 razy nie może zwiększyć w sposób istotny całkowitej ilości DNA zawartego w komórce. Mimo że w opisanym doświadczeniu nie dobierano osobników, lecz komórki w hodowli, przykład ten można uznać za wskazówkę, że jest rzeczą mało prawdopodobną, aby dobór działający na powiększenie liczby zapisów białka mógł zwiększyć długość łańcucha DNA w tak ogromny sposób jak się to stało np. u ryb dwudysznych.

Niedawno pojawiła się nowa hipoteza wiążąca działanie doboru z rozmiarami komórki [10] sformułowana przez Cavalier-Smitha. Autor ten zgadza się z wysuniętym w 1970 r. twierdzeniem [82], że dobór naturalny działa przede wszystkim na rozmiary komórek, a przez to wtórnie modyfikuje ilość DNA w genomie. Jego hipoteza wykorzystuje pojęcia selekcji r i selekcji K , wprowadzone przez MacArthura i Wilsona [47] zakładając, że selekcja r wywołuje zmniejszenie genomu, a selekcja K wywiera wpływ przeciwny. Przypomnę, że selekcja r sprzyja produkcji dużej liczby potomstwa, co jest związane z małym wkładem w wyposażenie poszczególnego osobnika następnego pokolenia. Selekcja K , przeciwnie, maksymalizuje wkład rodziców w każdego z potomków, co zmusza do ograniczenia płodności. Dla naszych rozważań jest istotne, że selekcja r popiera szybkość rozwoju ontogenetycznego, gdyż liczne i drobne młode osobniki masowo giną, a tylko te przeżywają, które zdołają się rozwinąć szybciej od pozostałych, a wiemy, że szybkość rozwoju zależy od rozmiarów komórki. Można się więc zgodzić, że strategia r sprzyja redukcji ilości DNA.

Mniej oczywisty jest związek między selekcją K i zwiększaniem rozmiarów komórek. Cavalier-Smith podkreśla przede wszystkim korelację między rozmiarami komórek a położeniem organizmu na osi $r - K$. Ponadto sądzi on, że jest rzeczą korzystną produkowanie możliwie dużych komórek jajowych. Cytoplazma dużej komórki wymaga obfitego zaopa-

trzenia w RNA, na to zaś potrzeba dużej powierzchni osłonki jądrowej. Jądro jest kulistawe, a zwiększanie jego promienia dochodzi do skutku przez pomnożenie zawartości DNA. Równocześnie wzrasta ilość białka związanego z DNA, zapewne powiększa się też ilość powstającego RNA nie przekazywanego do cytoplazmy. Na tym poglądzie opiera Cavalier-Smith wspomniany podział na geniczny G-DNA i jądrowoszkieletowy S-DNA. Nie zastanawia się on nad zgodnością tego obrazu z wielkimi rozbieżnościami w rozmiarach diploidalnych jąder neuronów tego samego organizmu. Fakt ten nie musi jednak obalać jego hipotezy. Wystarczy pamiętać, że duże wypustki wielkiego neuronu wymagają ciągłego i obfitego dopływu cytoplazmy. Jądro musi więc bardzo aktywnie wytwarzać różne kategorie RNA, które przed dostaniem się do cytoplazmy powodują powiększenie jego średnicy.

Hipoteza Cavalier-Smitha wyjaśnia znaczenie takich zjawisk jak redukcja ilości chromatyny dostającej się do komórek somatycznych, występująca u nicieni i u niektórych skorupiaków, a wśród owadów u muchówek. Tłumaczy również zaopatrywanie oocyty w RNA przez komórki odżywcze — zjawisko szeroko rozpowszechnione, oraz obecność aż ośmiu jąder w oocycie płaza *Ascaphus* [48]. Byłyby to wszystkie sposoby rozwiązania sprzeczności zachodzącej między korzyścią przyniesioną przez dużą komórkę jajową i zyskami wynikającymi z małych komórek somatycznych.

Nagl zwrócił uwagę, że mogą też istnieć takie okoliczności, w których komórki pewnych tkanek, np. gruczołów, powinny mieć jądro możliwie duże [58]. Tłumaczy on dlaczego im genom danego gatunku jest mniejszy, tym częściej w niektórych jego narządach występują komórki poliploidalne.

Na związki między ilością DNA i typem metabolizmu zwraca uwagę Nikolsky [60]. Stwierdził on, że wśród ryb, gatunki żyjące bliżej biegunów mają więcej DNA od pokrewnych gatunków tropikalnych. Ten sam fakt występuje u wielu grup roślin [46], a także u Anura [50].

W 1980 r. ukazały się równocześnie dwa artykuły [20, 66], sugerujące, że zwiększenie się zawartości DNA w jądrze komórkowym jest zjawiskiem automatycznym wynikającym z „egoistycznej” istoty tego związku [14]. W największym skrócie myśl autorów można by przedstawić w sposób następujący. Zawartość DNA w jądrze ulega zmianom losowym wynikającym z nieregularności podziałów komórkowych. Eliminowanie fragmentów genomu może wywołać uszkodzenie gamet, lecz niewielki nadmiar DNA może zostać niedostrzegalny dla doboru i zostanie przekazany następnemu pokoleniu. Dobór przeciwdziałałby temu procesowi, gdyby zawartość DNA była tak duża, że przedłużyłaby w sposób istotny ontogenezę. Cytowane artykuły wywołały żywą dyskusję,

której nie można tutaj streszczać. Można stwierdzić, że pomimo zastrzeżeń np. odnośnie terminologii, myśli zasadniczej nie zakwestionowano. Przykładem łatwości z jaką może się zmieniać ilość DNA są obserwacje hodowców, którzy otrzymywali rośliny o dziedzicznie zmodyfikowanej ilości genomu pod wpływem zmian w nawożeniu [21, 37, 71].

Nasuwa się jeszcze wniosek następujący. Czynniki działające tylko na jedno stadium życiowe lub na jedną tkankę będą wywoływały pośrednio presję na zmianę lub na utrzymanie rozmiarów wszystkich komórek organizmu, gdyż w ontogenezie działają mechanizmy zachowujące proporcje między komórkami różnych tkanek. Nacisk taki może się zmniejszyć lub zniknąć, jeśli pojawi się mutacja ograniczająca lub zmniejszająca wspomniane mechanizmy. Tak np. można przypuszczać, że bardzo małe rozmiary genomu ptaków wynikają z konieczności posiadania bardzo drobnych erytrocytów, umożliwiających wysoki metabolizm. U przodków ssaków pojawiły się krwinki bezjądrowe, mniejsze od komórek pozostałych. Dzięki temu ssaki, pomimo endotermii, mogły zachować większe rozmiary komórek, gospodarują przeto oszczędniej od ptaków. Innymi przykładami podobnych rozwiązań mogą być rozmaite sposoby rozzerwania związku między rozmiarami komórek jajowych i rozmiarami komórek pozostałych.

HISTORIA ROZMIARÓW KOMÓREK KRĘGOWCÓW

Streszczone na wstępie wnioski poprzednich artykułów [83, 84] wymagają obecnie stosunkowo niewielkich uzupełnień. Hinegardner [38] zbadał zawartość DNA w komórkach wielu gatunków ryb spodoustych. Zakres wartości okazał się dość znaczny. Najmniej DNA posiada przedstawiciele *Holocephali* — *Hydrolagus collieri* ($1n = 1,6$ pg), pośród żarłaczy minimum wykazują *Raja trachura* i *Pristis pectinatus* (po 2,8 pg, a więc nieco mniej od ssaków). Najwięcej DNA znaleziono w komórkach *Squatina squatina* ($1n = 9,8$ pg).

Thomson i Muraszko [92] zbadali rozmiary jamek kostnych u około 30 współczesnych i wymarłych gatunków ryb i płazów. Wyniki przedstawili w postaci „wskaźników”; ich przeliczenie na zawartość DNA byłoby ryzykowne (tabela 4). Nie ulega jednak wątpliwości, że wśród *Rhipidistia*, *Dipnoi* i *Amphibia* już w paleozoikum były gatunki o bardzo różnych rozmiarach komórek. Dewońskie ryby *Glyptolepis* i *Holoptychius*, a także permski płaz, *Zatrachys*, miały komórki chyba ze dwa razy większe niż współczesny płaz ogoniasty, *Necturus*, którego haploidalna ilość DNA wynosi 52 pg. Jednak większość zbadanych paleozoicznych kręgowców miała komórki niewielkie. Osteocyty dewońskiej ryby *Sterropterygion* i współczesnego z nią płaza *Ichthyostega* były prawie

takie same jak osteocyty współczesnych płazów bezogonowych z rodzajów *Rana* i *Bufo*.

W pozostałych grupach kręgowców, jak wiadomo, zawartość jądrowego DNA jest znacznie bardziej jednolita niż wśród ryb i płazów. Haploidalna ilość wynosi u *Teleostei* zwykle niewiele ponad 0,5 pg, u niektórych gatunków przypuszczalnie poliploidalnego pochodzenia osiąga 3,5 pg. U gadów waha się od 1,5 do 3,5 pg. U ptaków wynosi od 1,7 do 2,3 pg, a u ssaków od około 3,0 do 5,8 pg [10].

Jak interpretować te fakty w świetle poprzednich rozważań? Haploidalna ilość DNA najstarszych kręgowców mieściła się zapewne gdzieś między 1 a 5 pg. Zróżnicowane warunki życia i odmienne strategie ewolucyjne wpływały na różnokierunkowe modyfikacje. Redukcja poszła najdalej u ryb kostnoszkieletowych, zbliżając się do 0,5 pg [40], co stanowi przypuszczalnie minimum, poniżej którego zbudowanie i działanie organizmu kręgowca jest niemożliwe. W tym przypadku nie można upatrywać przyczyn redukcji w szybkości przemiany materii, która u *Teleostei* jest niewiele intensywniejsza niż u płazów [43] lub też taka sama [67]. Według Randalla i in. [72] zużycie tlenu przez tkanki pstrąga wynosi 0,04 ml/g/h, podczas gdy np. tkanki ludzkie zużywają 0,32 ml/g/h, a więc 8 razy więcej. Tymczasem komórki ssaka zawierają około 2 razy więcej DNA. Małe komórki *Teleostei* nie wynikają więc z wysokiego metabolizmu lecz z szybkiego rozwoju zarodkowego.

Zwróćmy uwagę na pewne cechy ryb kostnoszkieletowych. Jako jedyna grupa wśród *Gnathostomata*, *Teleostei* nie mają przewodów Müllera i wyrzucają liczne i drobne jaja bezpośrednio z jajnika na zewnątrz. Stało się to możliwe dzięki wytwarzaniu osłonek jajowych w pęcherzykach jajnikowych, co pozwoliło na rezygnację z okrywania jaj wydzielinami jajowodów. Bardzo liczne plemniki omijają mesonephros i przewody Wolffa. Ułatwia to równocześnie zapładnianie wielkich ilości ikry. W żółtku wielu ryb pierwotnych zawarte są krystaliczne płytki białka (np. u *Latimeria*, *Holostei*, *Chondrostei*), natomiast wydaje się, że u większości *Teleostei* brak płytek żółtka, podobnie jak u ptaków. Płytki te są szczególnie duże w jajach rozwijających się powoli [32, 33, 45]. Nawet bardzo małe jaja *Teleostei* nie bruzdkują całościowo, lecz tworzą tarczkę zarodkową na biegunie animalnym, co znacznie przyspiesza rozwój. Zwracano uwagę, że wśród *Teleostei* istnieje tendencja do zmniejszania w toku ewolucji znaczenia kości zastępczych na rzecz kości okrywających. Tendencję tę tłumaczy przyspieszenie rozwoju, gdyż wzrost kości zastępczych jest procesem prostszym i szybszym. Przyspieszenie ontogenezy wymaga równoczesnych zmian wielu elementów ze sobą sprzężonych, co nie zawsze jest możliwe, ten kierunek ewolucyjny może też ulegać odwróceniu. Wśród *Teleostei* wielokrotnie dochodziło do

wtórnego ograniczenia płodności, pojawiania się opieki nad potomstwem i żyworodności. Nie powinno to dziwić, tak jak nie dziwią niezdolne do lotu ptaki.

Drobne komórki ptaków i ssaków wyjaśnia wystarczająco wysoki metabolizm tych endotermicznych kręgowców. Szybkość przemiany materii ptaków jest większa niż ssaków. Pomimo tego krwinki ptaków zachowują jądra komórkowe, których brak u ssaków pozwala na zmniejszenie rozmiarów erytrocytów. Fakty te harmonizują z rozmiarami genomu, u ptaków zwykle o połowę mniejszym od genomu ssaków.

Najtrudniej wyjaśnić niewielkie i na ogół jednolite rozmiary genomu gadów, wśród których występują gatunki o niskim metabolizmie i małej płodności. Tak np. wiele jaszczurek składa tylko dwa jaja, jest to więc strategia K . Fakt ten przeczy więc hipotezie Cavalier-Smitha [10] o decydującym znaczeniu położenia gatunku na osi $r - K$ dla rozmiarów genomu i komórki. Najniższy metabolizm wśród gadów ma zapewne tuatara, *Sphenodon punctatus*, mająca bardzo nieliczne i największe wśród gadów erytrocyty ($24 \times 14 \mu\text{m}$ [16, 17]), mniej więcej równe krwinkom Anura. Nie znam ilości DNA w komórkach tuatary, ale sądząc po rozmiarach krwinek ilość haploidalna nie przekracza około 4 pg.

Proponuję następujące wyjaśnienie rozmiarów komórek gadów. Jaja gadów są bardzo duże, zużycie całego zapasu żółtka musi trwać dość długo. Podczas rozwoju zarodki są szczególnie narażone, toteż dobór naturalny tak jak u *Teleostei* premiuje jego przyspieszenie. Szybkość mitozy zależy od temperatury, ta zaś w jajach gadów jest niższa niż w wygrzewanych jajach ptaków, zwiększa to nacisk na zmniejszenie genomu. Propozycja ta jest sprzeczna z hipotezą Cavalier-Smitha [10], która nadmiernie podkreśla jeden zespół czynników, podczas gdy przyczyn należy upatrywać w rozmaitych elementach, które starałem się wymieni.

Gdyby chciało się wskazać najważniejszy zespół warunków determinujących rozmiary komórek, należałoby raczej wprowadzić podział strategii ewolucyjnych na rozrzutne i oszczędne. Strategia rozrzutna opiera się na szybkim rozwoju ontogenetycznym i intensywnym metabolizmie, jest możliwa tylko jeśli organizm zawiera małe komórki. Dlatego kręgowce stałocieplne nie mogą być zbudowane z dużych komórek. Strategia oszczędna polega na niskiej przemianie materii i na zdolności do obywatnia się skąpym pokarmem. Sprzyja ona budowaniu organizmu z dużych komórek.

Zwróćmy uwagę, że współczesne zwierzęta o wysokiej zawartości jądrowego DNA — ryby dwudyszne i niektóre płazy ogoniaste żyją w podobnych warunkach, w wodach słodkich, w których często występuje niedobór tlenu. Zwierzęta te uzupełniają wówczas zużycie tlenu oddychaniem płucnym, jednak CO_2 wydalają głównie za pośrednictwem

skrzeli lub skóry, mają bowiem niewielkie możliwości wydalenia go do płuc. Mechanizm ten grozi utratą tlenu do otaczającej wody, zwykle niedostatecznie wysyczonej tym gazem. Przeciwdziała temu zmniejszenie powierzchni skrzeli, a także utrzymywanie zawartości tlenu we krwi na niskim poziomie [72]. Komórki muszą więc mieć ograniczony poziom metabolizmu. Są to okoliczności sprzyjające strategii oszczędnej. Można więc sądzić, że te paleozoiczne gatunki ryb i płazów, u których stwierdzono bardzo duże osteocyty [92], żyły w środowiskach podobnych do tych w jakich bytują współczesne ryby dwudyszne i takie płazy jak *Amphiuma*, *Necturus* i *Cryptobranchus*.

Proces powiększania się genomu ryb dwudysznych nie uległ, wydaje się, zatrzymaniu. Vervoort [95] doniósł, że *Protopterus annectens* i *P. aethiopicus* mają po 34 chromosomy i 80 pg DNA w jądrze komórkowym. Natomiast *P. dolloi* jest tetraploidem o 68 chromosomach i 163 pg DNA w jądrze. Dokładne podwojenie obu wartości u tetraploida sugeruje, że poliploidyzacja zaszła niezbyt dawno, a procesy regulacyjne nie zdążyły zmienić proporcji. Istnienie gatunku o tak olbrzymiej ilości DNA w komórce dowodzi, że w specyficznym środowisku życia taka organizacja jest co najmniej tolerowana, być może nawet popierana przez dobór naturalny.

LITERATURA

- [1] BACHMANN K., BOGART J. P., Comparative cytochemical measurements in the diploid-tetraploid species pair of hylid frogs *Hyla chrysoscelis* and *H. versicolor*, *Cytogen. Cell Genet.*, 15: 186–194, 1975.
- [2] BACHOP W. E., SCHWARTZ F. J., Quantitative nucleic acid histochemistry of the yolk sac syncytium of oviparous teleosts: implications for hypotheses of yolk utilization. [w:] Blaxter I. H. S. (red.), *The early life history of fish*, 1974, 345–353.
- [3] BALDARI C. T., AMALDI F., DNA reassociation kinetics in relation to genome size in four amphibian species, *Chromosoma*, 59: 13–22, 1976.
- [4] BILLINGS S. M., SCHWARTZ F. J., DNA content of Mauthner cell nuclei in *Xenopus laevis*: a spectrophotometric study, *Z. Anat. Entwickl.-Gesch.*, 129: 14–23, 1969.
- [5] BLINKOV S. M., GLEZER J. J., *Das Zentralnervensystem in Zahlen und Tabellen*, VEB G. Fischer, Jena 1968.
- [6] BOWSER D., WESTMAN J., The gigantocellular reticular region and its spinal afferents: a light and electron microscope study in the cat, *J. Anat.*, 106: 23–36, 1970.
- [7] BROWN I. R. F., WHITE P. T., Elephant blood haematology and chemistry, *Comp. Biochem. Physiol.*, 65 B: 1–12, 1980.
- [8] BRUTLAG D. L., Molecular arrangement and evolution of heterochromatic DNA, *Ann. Rev. Genet.*, 14: 121–144, 1980.
- [9] BYRNE I., HOOPER J. C., McCARTHY J. C., Effects of selection for body

- size on the weight and cellular structure of seven mouse muscles, *Anim. Production*, **17**: 187-196, 1973.
- [10] CAVALIER-SMITH T., Nuclear volume control by nucleoskeletal DNA, selection for cell volume and cell growth rate, and the solution of the DNA C-value paradox. *J. Cell Sci.*, **34**: 247-278, 1978.
- [11] COCHET M., GANNON F., HEN R., MAROTEAUX L., PERRIN F., CHAMBON P., Organisation and sequence studies of the 17-piece chicken conalbumin gene, *Nature*, **282**: 567-574, 1979.
- [12] DARLINGTON C. D., A diagram of evolution, *Nature*, **276**: 447-452, 1978.
- [13] DAVID H., Quantitative ultrastructural data of animal and human cells, VEB G. Thieme, Leipzig 1977.
- [14] DAWKINS R., *The selfish gene*, Oxford Un. Press, Oxford 1977.
- [15] DEPARIS P., BEETSCHEN J.-C., JAYLET A., Red blood cells and hemoglobin concentration in normal, diploid and several types of polyploid salamanders, *Comp. Biochem. Physiol.*, **50 A**: 263-266, 1975.
- [16] DESSER S. S., Morphological, cytochemical, and biochemical observations on the blood of the tuatara, *Sphenodon punctatus*, *New Zealand J. Zool.*, **5**: 503-508, 1978.
- [17] DESSER S. S., Haematological observations on a hibernating tuatara, *New Zealand J. Zool.*, **6**: 77-78, 1979.
- [18] DETTLAFF T. A., Cell divisions, duration of interkinetic stages and differentiation in early stages of embryonic development, *Adv. Morphog.*, **3**: 323-363, 1964.
- [19] DIAMOND J., The Mauthner cell, [w:] Hoar W. S., Randall D. J. (red.), *Fish Physiology*, **5**: 265-346, 1971.
- [20] DOOLITTLE W. F., SAPIENZA C., Selfish genes, the phenotype paradigm and genome evolution, *Nature*, **284**: 601-603, 1980.
- [21] EVANS G. M., REES H., SNELL C. L., SUN S., Associated nuclear changes in the induction of flax genotrophs, *Nature*, **212**: 697-699, 1966.
- [22] FALCONER D. S., GAULD I. K., ROBERTS R. C., Cell numbers and cell sizes in organs of mice selected for large and small body size, *Genet. Res. Cambridge*, **31**: 287-301, 1978.
- [23] FANKHAUSER G., The role of nucleus and cytoplasm, [w:] Willier B., Weiss P. A., Hamburger V. (red.), *Analysis of development*, Saunders, Philadelphia 1955.
- [24] FERRIS S. D., WHITT G. S., The evolution of duplicate gene expression in the carp (*Cyprinus carpio*), *Experientia*, **33**: 1299-1301, 1977a.
- [25] FERRIS S. D., WHITT G. S., Loss of duplicate gene expression after polyploidisation, *Nature*, **265**: 258-260, 1977b.
- [26] FINLAY B. J., The dependence of reproductive rate on cell size and temperature in freshwater ciliated Protozoa, *Oecologia*, **30**: 75-81, 1977.
- [27] FRANÇOIS-KRASSOWSKA A., The structure of the thyroid gland in ontogenic development of certain anurans, *Acta Biol. Cracov. S. Zool.*, **21**: 1-44, 1978.
- [28] FRAIR W., Sea turtle red blood cell parameters correlated with carapace length, *Comp. Biochem. Physiol.*, **56 A**: 467-472, 1977.
- [29] GOIN O. B., GOIN C. J., BACHMANN K., DNA and amphibian life history, *Copeia*, **1968**: 532-540, 1968.
- [30] GONIAKOWSKA L., Metabolism, resistance to hypotonic solutions, and ultra-

- structure of erythrocytes of five amphibian species, *Acta Biol. Cracov. S. Zool.*, **16**: 113-134, 1973.
- [31] GONIAKOWSKA-WITALIŃSKA L., WITALIŃSKI W., Evidence for a correlation between the number of marginal microtubules and the size of vertebrate erythrocytes, *J. Cell Sci.*, **22**: 397-401, 1976.
- [32] GRODZIŃSKI Z., Żółtko niższych kręgowców, *Przegląd Zool.*, **17**: 159-171, 1973.
- [33] GRODZIŃSKI Z., The yolk of the tuatara *Sphenodon punctatus* Gray (Reptilia), *Acta Biol. Cracov. S. Zool.*, **22**: 65-71, 1980.
- [34] GROSSET L., ODARTCHENKO N., Relationships between cell cycle duration, S-period and nuclear DNA-content in erythroblasts in four vertebrate species, *Cell Tissue Kinet.*, **8**: 81-90, 1975a.
- [35] GROSSET L., ODARTCHENKO N., Duration of mitosis and separate mitotic phases compared to nuclear DNA content in erythroblasts of four vertebrates, *Cell Tissue Kinet.*, **8**: 91-96, 1975b.
- [36] HEDDLE J. A., ATHANASIOU K., Mutation rate, genome size and their relation to the rec concept, *Nature*, **258**: 359-361, 1975.
- [37] HILL J., The environmental induction of heritable changes in *Nicotiana rustica* parental and selection lines, *Genetics*, **55**: 735-754, 1976.
- [38] HINEGARDNER R., The cellular DNA content of sharks, rays and some other fishes, *Comp. Biochem. Physiol.*, **55 B**: 367-370, 1976a.
- [39] HINEGARDNER R., Evolution of genome size, [w:] Ayala F. J., (red.), *Molecular evolution*, 179-199, 1976b.
- [40] HINEGARDNER R., ROSEN D. E., Cellular DNA content and the evolution of teleostean fishes, *Amer. Nat.*, **106**: 621-644, 1972.
- [41] IGNATIEVA G. M., Regularities of early embryogenesis in teleosts as revealed by studies of the temporal pattern of development. I. The duration of mitotic cycle and its phases during synchronous cleavage divisions, *Roux's Arch.*, **179**: 301-312, 1976a.
- [42] IGNATIEVA G. M., Regularities of early embryogenesis in teleosts as revealed by studies of the temporal pattern of development. II. Relative duration of corresponding periods of development in different species, *Roux's Arch.*, **179**: 313-325, 1976b.
- [43] KREPS E. M., WIERŻBINSKAIA N. A., Obmien mozga w ewolucii pozwo-
nocznich, *Izw. AN SSSR Biol.*, **6**: 855-864; 1959.
- [44] KUCIAS J., Über für die Zellbiologie heuristischen Wert des relativen Strukturinformati-
onsgehalts, der Negentropie und der negativen Entropie der Zelle. II. Die Bestimmung der Generationszeit, Anzahl und Grösse der Leberzellen bei Ratten verschiedenen Alters und Gewichte, *Biol. Zentrbl.*, **99**: 53-54, 1980.
- [45] LANGE R. H., Lipoprotein crystals in the yolk platelet of a teleost, *Pelvicachromis pulcher* (Cichlidae), *Cell Tissue Res.*, **209**: 511-513, 1980.
- [46] LEVIN D. A., FUNDENBURG S. W., Genome size in agiosperms: temperature versus tropical species, *Amer. Nat.*, **114**: 784-795, 1979.
- [47] MacARTHUR R., WILSON E. O., *Island biogeography*, Princeton Un. Press, Princeton 1967.
- [48] MACGREGOR H. C., KEZER J., Gene amplification in oocytes with eight germinal vesicles from the tailed frog *Ascaphus truei* Stejneger, *Chromosoma*, **29**: 189-206, 1970.

- [49] MAZIN A. L., Skorost razwitija u amfibii s razlicznoj wieliczinoj genoma, Woprosy gerpetologii, Leningrad 1977, 140.
- [50] MAZIN A. L., Amounts of nuclear DNA in anurans of the USSR, *Experientia*, **36**: 190–191, 1980.
- [51] MERKLE D. A., GUTTMAN S. I., NICKERSON M. A., Genetic uniformity throughout the range of the hellbender, *Cryptobranchus alleganiensis*, *Copeia* 1977, 549–553.
- [52] MISIEK L., SZARSKI H., Dimension of cells in some tissues of six amphibian species, *Acta Biol. Cracov. Zool.*, **21**: 127–132, 1978.
- [53] MIZUNO S., MACGREGOR H. C., Chromosomes, DNA sequences, and evolution in the salamanders of the genus *Plethodon*, *Chromosoma*, **48**: 239–296, 1974.
- [54] MORESCALCHI A., New development in vertebrate cytotaxonomy. I. Cytotaxotaxonomy of the amphibians, *Genetica*, **50**: 179–193, 1979.
- [55] MORESCALCHI A., INGRAM G. J., Cytotaxonomy of the myobatrachid frogs of the genus *Limnodynastes*, *Experientia*, **34**: 584–585, 1978.
- [56] MORESCALCHI A., ODIERNA G., OLMO E., Karyological relationships between cryptobranchid salamanders, *Experientia*, **33**: 1579–1581, 1977.
- [57] MORESCALCHI A., OLMO E., STINGO V., Trends of karyological evolution in pelobatid frogs, *Experientia*, **33**: 1577–1578, 1977.
- [58] NAGL W., DNA reduplication and polyteny understood as evolutionary strategies, *Nature*, **261**: 614–615, 1976.
- [59] NARAYAN R. K. J., REES H., Nuclear DNA divergence among *Latyhrus* species, *Chromosoma*, **63**: 101–107, 1977.
- [60] NIKOLSKY G., The interrelations between variability of characters, effectiveness of energy utilisation, and karyotype structure in fishes, *Evolution*, **30**: 180–185, 1976.
- [61] NITECKI C., Correlation between the dimensions of cells of several organs in six species of passerine birds, *Bull. Ac. Polon. Sci. Biol.*, **20**: 241–248, 1972.
- [62] NITECKI C., Rozmiary komórek kilku narządów u wybranych gatunków z rzędu *Passeriformes*, *Studia Soc. Sci. Torun. Zool.*, **9**: 133–230, 1973.
- [63] OHNO S., *Evolution by gene duplication*, Springer, New York 1970.
- [64] OLMO E., Quantitative variations in the nuclear DNA and the phylogenesis of the Amphibia, *Caryologia*, **26**: 43–68, 1973.
- [65] OLMO E., MORESCALCHI A., Genome and cell sizes in frogs: a comparison with salamanders, *Experientia*, **34**: 44–46, 1978.
- [66] ORGEL L. E., CRICK F. H. C., Selfish DNA: the ultimate parasite, *Nature*, **284**: 604–607, 1980.
- [67] PACKARD G. C., Devonian amphibians: did they excrete carbon dioxide via skin, gills, or lungs? *Evolution*, **30**: 270–280, 1976.
- [68] PALOMBI F., PIROZZI C., ROSSI A., High nuclear DNA content in nervus terminalis ganglion cells of *Scorpaena porcus*, *Experientia*, **29**: 295–331, 1973.
- [69] PARK E. H., KANG Y. S., Karyotype conservation and difference in DNA amount in anguilloid fishes, *Science*, **193**: 64–66, 1976.
- [70] PENGAL M., Budowa i morfometria płuc ropuchy *Bufo bufo* (L.), *Maszynopis*, Zakład Anatomii Porównawczej UJ, 1980.
- [71] PIERCE W. P., The effect of phosphorus on chromosome and nuclear volume in a violet species, *Bull. Torrey Bot. Club*, **64**: 345–356, 1937.
- [72] RANDALL D. J., BURGGREN W. W., FARREL A. P., HASWELL M. S.,

- The evolution of air breathing in vertebrates, Cambridge Un. Press, Cambridge 1981.
- [73] ROBERTSON F. W., Studies in quantitative inheritance. XII. Cell size and number in relation to genetic and environmental variation of body size in *Drosophila*, *Genetics*, **44**: 869–896, 1959.
- [74] SCHIMKE R. T., Gene amplification and drug resistance, *Scient. Amer.*, **243** (3): 50–59, 1980.
- [75] SCHMIDTKE J., ATKIN N. B., ENGEL W., Gene action in fish of tetraploid origin. II. Cellular and biochemical parameters in clupeoid and salmonoid fish, *Biochem. Genet.*, **13**: 301–309, 1975.
- [76] SCHMIDTKE J., BEÇAK W., ENGEL W., The reduction of genic activity in the tetraploid amphibian *Odontophrynus americanus* is not due to loss of ribosomal DNA, *Experientia*, **32**: 27–28, 1976.
- [77] SCHMIDTKE J., ENGEL W., Gene action in fish of tetraploid origin. I. Cellular and biochemical parameters in cyprinid fish, *Biochem. Genet.*, **13**: 45–51, 1975.
- [78] SCHMIDTKE J., ZENZES M. T., DITTES H., ENGEL W., Regulation of cell size in fish of tetraploid origin, *Nature*, **254**: 426–427, 1975.
- [79] SIANKOWA L., SZARSKI H., The dimensions of kidney tubule cells of some amphibians, *Bull. Acad. Polon. Sci. Biol.*, **23**: 41–43, 1975.
- [80] SINHA A. K., KAKATI S., PATHAK S., Extent of ploidy in mammalian marrow and peripheral blood cells, *Caryologia*, **26**: 333–346, 1973.
- [81] STEBBINS C. L., Chromosomes, DNA and plant evolution, *Evolutionary Biology*, **9**: 1–34, 1976.
- [82] SZARSKI H., Changes in the amount of DNA in cell nuclei during vertebrate evolution, *Nature*, **226**: 651–652, 1970.
- [83] SZARSKI H., Zagadnienie rozmiarów komórek zwierząt kręgowych, *Postępy Biol. Komórki*, **1**: 311–344, 1974.
- [84] SZARSKI H., Cell size and nuclear DNA amount in vertebrates, *Intern. Rev. Cytol.*, **44**: 93–111, 1976.
- [85] SZARSKI H., Cell dimensions in the tissues of two species of *Batrachophrynus* (Amphibia, Anura, Leptodactylidae), *Bull. Ac. Polon. Sci. Biol.*, **27**: 277–280, 1979.
- [86] SZARSKI H., Cell dimensions in the tissues of *Gastrotheca riobambae* (Amphibia, Anura, Hylidae), *Bull. Acad. Polon. Sci. Biol.*, **28**: 171–172.
- [87] SZARSKI H., Cell volume in the tissues of some cyprinid fishes, *Bull. Acad. Polon. Sci. Biol.*, **1981**, 543–547, 1981.
- [88] SZARSKI H., CZOPEK J., Liver cell size in some species of *Amphibia*, *Zool. Polon.*, **15**: 51–64, 1965.
- [89] THIÉBAUD C. H., FISCHBERG M., DNA content in the genus *Xenopus*, *Chromosoma*, **59**: 253–257, 1977.
- [90] THOMSON K. S., An attempt to reconstruct evolutionary changes in the cellular DNA content of lungfish, *J. exp. Zool.*, **180**: 363–372, 1972.
- [91] THOMSON K. S., GALL J. G., COGGINS L. W., Nuclear DNA content in coelacanth erythrocytes, *Nature*, **241**: 126, 1973.
- [92] THOMSON K. S., MURASZKO K., Estimation of cell size and DNA content in fossil fishes and amphibians, *J. exp. Zool.*, **205**: 315–320, 1978.
- [93] TWELVES E. L., BACHOP W. E., Giant nuclei in the yolk sac syncytium of the Antarctic teleost *Notothenia corriceps neglecta*, *Copeia*, **909–911**, 1980.
- [94] UMMINGER B. L., Relations of whole blood sugar concentrations in verte-

- brates to standard metabolic rate, *Comp. Biochem. Physiol.*, **56 A**: 457-460, 1977.
- [95] VERVOORT A., Tetraploidy in *Protopterus* (Dipnoi), *Experientia*, **36**: 294-296, 1980.
- [96] VLAD M., Quantitative studies of r-DNA in amphibians, *J. Cell. Sci.*, **24**: 109-118, 1977.
- [97] WELLAUER P. K., REEDER R. H., A comparison of the structural organization of amplified DNA from *Xenopus mulleri* and *X. laevis*, *J. Mol. Biol.*, **94**: 151-161, 1975.
- [98] WELSH M. G., CAMERON I. L., REITER R. J., The pineal gland of the gerbil, *Meriones unguiculatus*. II. Morphometric analysis over a 24-hour period, *Cell Tissue Res.*, **204**: 95-109, 1979.
- [99] WHITE P. T., BROWN I. R. F., 1978 — Haematological studies on wild African elephants (*Loxodonta africana*), *J. Zool. (Lond.)*, **185**: 491-503, 1978.
- [100] WOŁK E., KOSYGIN G. M., A hematological study of the walrus, *Odobenus rosmarus*, *Acta Theriol.*, **24**: 99-107, 1979.

Otrzymano: 10 czerwca 1981.

Przyjęto: 15 czerwca 1981.

Adres autora: ul. Karasia 6, 30-060 Kraków.

ENZYMATYCZNE PODSTAWY DZIAŁANIA POMPY SODOWEJ

ENZYMATIC BASIS FOR THE SODIUM PUMP ACTION

Jan Krzysztof TELLER

Zakład Fizjologii Zwierząt, Instytut Biologii, Uniwersytet im. A. Mickiewicza

Streszczenie. W 1957 r. J. Chr. Skou opisał ATPazę stymulowaną jonami sodu i potasu. Wysunął też przypuszczenie, że enzym jest związany z pompą sodową. Zidentyfikowanie Na,K-ATPazy z pompą sodową zostało dobrze udokumentowane. Tempo pracy pompy jest skorelowane z aktywnością enzymu; pompa i enzym są zlokalizowane w błonie; ATP jest źródłem energii dla obu układów; orientacja sodu i potasu wobec pompy i enzymu jest taka sama: inhibitory Na,K-ATPazy są inhibitorami pompy z przeciwciałami włącznie; możliwe jest odwrócenie kierunku działania pompy i wykazanie aktywnego transportu w pęcherzykach fosfolipidowych zawierających enzym.

W artykule omawia się wzajemne związki między Na,K-ATPazą a aktywnym transportem jonów sodowych i potasowych przez błony komórek zwierzęcych.

Summary. In 1957 J. Chr. Skou described an ATPase preparation that was stimulated by sodium and potassium ions. He proposed that this enzyme was associated with the sodium pump. The identification of the Na,K-ATPase with the sodium pump has been well established. The pump turnover rates in cells are similar to the enzyme activity; pump and enzyme are localized in membrane; ATP is an energy donor for both systems; sidedness of sodium and potassium are the same for pump and enzyme; Na,K-ATPase inhibitors are the pump inhibitors (including antibodies); it is possible to make the pump run backwards and to demonstrate the active transport in phospholipid vesicles containing the enzyme.

This review examines the relationship between Na,K-ATPase and active transport of sodium and potassium ions across animal cell membranes.

WSTĘP

Blisko ćwierć wieku temu duński biochemik Jens Chr. Skou opisał po raz pierwszy specyficzną adenozynotrójfosfatazę magnezową stymulowaną jonami sodowymi i potasowymi — Na,K-ATPazę, której aktywność stwierdził w homogenacie nerwów kraba [74]. Wysunął jednocze-

śnie przypuszczenie, że właśnie Na,K-ATPaza jest enzymem odpowiedzialnym za aktywny transport sodu i potasu w komórkach. Innymi słowy, jest głównym składnikiem znanej już wcześniej pompy sodowej. Intensywne badania prowadzone nad układem aktywnego transportu uwzględniające jego enzymatyczny charakter dostarczały z roku na rok coraz więcej informacji potwierdzających hipotezę Skou. O ogromie tych badań świadczy ilość publikacji ukazujących się corocznie na temat Na,K-ATPazy, których liczba od 1973 r. przekracza pół tysiąca [71].

W badaniach różnorodnych aspektów transportu jonów obrano dwie podstawowe strategie stanowiące dwa odmienne metodycznie i teoretycznie sposoby analizy działania pompy sodowej. Pierwsza strategia to określanie fizycznych i chemicznych własności enzymu (Na,K-ATPazy) i błon powierzchniowych różnych komórek hydrolizujących ATP w specyficzny sposób. Celem takich badań jest uzyskanie czystych i niezdenaturowanych składników układu transportującego jony. Druga strategia obejmuje próby opisu ruchu jonów sodowych i potasowych przez wyspecjalizowane błony komórkowe, np. błony erytrocytów [30]. Obydwie strategie dostarczyły przekonujących dowodów na to, że pompa sodowa in situ jest Na,K-ATPazą [42, 44, 74, 75].

1. TKANKI TRANSPORTUJĄCE SÓD I POTAS ZAWIERAJĄ AKTYWNA Na,K-ATPazę

Wszystkie tkanki zdolne do intensywnego transportu aktywnego zawierają duże ilości Na,K-ATPazy [42]. Przy tym aktywność enzymu odpowiada w przybliżeniu szybkości transportu kationów: sodowego i potasowego [20]. Nic więc dziwnego, że Na,K-ATPazę odkryto w preparacie tkanki nerwowej [74], a pierwszych izolacji dokonano z nerek ssaków [42], z narządu elektrycznego węgorza elektrycznego [63] czy z gruczołów solnych (rektalnych) rekina [21]. W Na,K-ATPazę obfitują także skrzela zwierząt wodnych: ryb [18], mięczaków [54] i skorupiaków [66]. Modelowymi systemami w badaniach transportu jonów są erytrocyty [30] i skóra żaby [57, 58]. Oprócz nabłonków i tkanki nerwowej duże ilości enzymu zawierają tkanki mięśniowe [28].

2. AKTYWNOŚĆ Na,K-ATPazy JEST ŚCIŚLE SKORELOWANA Z SZYBKOŚCIĄ TRANSPORTU SODU I POTASU

Na,K-ATPaza pracuje na koszt energii metabolicznej [12, 13] katalizując reakcję hydrolizy ATP do ADP i fosforanu nieorganicznego. Enzym ma miejsca wiążące dla jonów sodowych i potasowych. Charakterystyki powinowactwa tych miejsc są identyczne z charakterystykami

transportu kationów [64]. Miejsca wiążące można także traktować jako miejsca, poprzez które dochodzi do translokacji jonów [76]. Jednoczesne badanie aktywności Na,K-ATPazy oraz transportu pozwala na ustalenie stechiometrii między hydrolizą ATP a przemieszczaniem jonów. Na każdą cząsteczkę hydrolizowanego ATP przypada, w standardowych warunkach, wyrzucenie trzech jonów sodowych z jednoczesnym wejściem dwóch jonów potasowych do wnętrza komórki. Znajduje to odbicie w eksperymentalnie określonym stosunku przetransportowanych kationów na jedną cząsteczkę ATP, który wynosi $2,6 \pm 0,19$ [52].

3. POMPA SODOWA I Na,K-ATPaza SĄ ZLOKALIZOWANE W BŁONIE

Homogenaty tkankowe zawierają wiele enzymów hydrolizujących ATP i aktywowanych jonami metali [16]. Po rozfrakcjonowaniu homogenatów tkanek, w których wykryto obecność Na,K-ATPazy okazało się, że jej aktywność związana jest przede wszystkim z błonami plazmatycznymi [44]. Był to rezultat łatwy do przewidzenia — układ transportujący musi być wbudowany w błonę. Z faktu tego wynika pewna trudność metodyczna. W czasie preparacji błon tworzą się zamykające się pęcherzyki blokujące dostęp substratu i efektorów do miejsc katalitycznych enzymu błonowego [34]. Pomiar aktywności takiego enzymu w homogenacie tkankowym nie jest więc reprezentatywny, podobnie jak ma to miejsce przy pomiarze aktywności enzymów zamkniętych w błonach naturalnych struktur komórkowych, np. mitochondriach [80]. Tę latentność [34] można znieść inkubując preparat z detergentami jonowymi [39, 41, 46] lub niejonowymi [36, 53, 61], okresowo zamrażając go [60, 62] lub stosując inne czynniki niszczące strukturę błony [42]. Dodatkową komplikacją jest to, że najczęściej stosowane do tych celów detergenty mają dwufazowy wpływ na enzymy błonowe. W stężeniach poniżej krytycznego stężenia micellarnego — tj. stężenia, przy którym detergent występuje w roztworze jeszcze w formie monomerycznej, a nie micellarnej — „aktywują” enzymy, powyżej niego zaś hamują ich aktywność [34, 44, 64]. Taka właśnie inhibicja (obniżenie aktywności molarnej) występująca przy rozpuszczeniu Na,K-ATPazy wysokimi stężeniami detergentów jest największym problemem przy izolowaniu enzymu [42]. Kompromisowym rozwiązaniem jest izolacja Na,K-ATPazy w formie błonowej. Czystość takiego preparatu ocenia się na 50 - 70% [41, 45]. Oczyszczenie enzymu rekina do formy rozpuszczalnej i porównanie z preparatem błonowym wykazało jednak, że podstawowe charakterystyki kinetyczne obu form są bardzo podobne [67]. Z drugiej strony enzym całkowicie delipidyzowany detergentami nie katalizuje reakcji pośred-

nich, zależnych od sodu i potasu [70]. Przywrócenie pełnej aktywności izolowanego białka enzymatycznego możliwe jest po dodaniu do środowiska ujemnie naładowanych lipidów normalnie wchodzących w skład błon [15, 49, 78, 79].

Chemiosmotyczne sprzężenie zużycia ATP i transportu jonów, stanowiące pierwotny proces aktywnego transportu, możliwe jest więc dzięki specyficznej organizacji strukturalnej i funkcjonalnej Na,K-ATPazy w błonie komórkowej [44]. Na szczegółowe badania konformacji enzymu w błonie pozwoliło rozwinięcie i udoskonalenie technik immunologicznych. Przygotowanie przeciwciał przeciwko enzymowi umożliwia określenie przestrzennej orientacji cząsteczki w błonie plazmatycznej, a także topograficzną lokalizację pompy sodowej w złożonych tkankach [55].

Enzym zależny jest od struktury błonowej, ponieważ wymaga obecności jonów potasowych po jednej stronie (zewnątrznej w komórce), a jonów sodowych i magnezowych oraz ATP po drugiej (wewnętrznej w komórce), zgodnie z gradientami jonowymi występującymi *in vivo* [26]. Taka asymetria uwarunkowana jest najprawdopodobniej nie tylko heterogennością białek enzymatycznych, ale także, a może przede wszystkim, różnicami w składzie lipidowym między wewnętrzną a zewnętrzną stroną błony [81]. Asymetryczne rozmieszczenie Na,K-ATPazy stwierdza się nie tylko w samej błonie komórkowej. Na przykładzie nabłonka jelitowego, kosmków jelitowych i jelita w całości widać, że jest ono wzajemnie uwarunkowane własnościami biochemicznymi układu z jednej strony, a funkcją całego organu z drugiej [8-10, 32, 65, 77].

4. ATP JEST ŹRÓDŁEM ENERGII DLA POMPY I ENZYMU

Katalityczną funkcją Na,K-ATPazy jest hydrolityczne rozszczepienie ATP. Do przeprowadzenia tej reakcji konieczna jest obecność jonów magnezowych, ponieważ właściwym substratem jest kompleks ATP z magnezem. Wolny ATP może, co prawda, wiązać się z enzymem, ale hamuje wtedy reakcję ATPazową. Badania kinetyczne wskazują, że Na,K-ATPaza ma miejsca o wysokim i niskim powinowactwie do substratu [68].

ATP jako substrat może być zastępowany innymi nukleotydami, ale z mniejszą efektywnością [52, 76]: ATP(100): dezoksyATP(49): CTP(2,3): ITP(24): GTP(0,6): UTP(0,6) — w nawiasach podano aktywność enzymu w procentach w stosunku do ATP [52].

Wyniki badań enzymatycznych pokrywają się z wynikami badań transportu jonów w erytrocytach i innych układach modelowych, z tym,

że o ile wymaganie ATP przez oba układy nie ulega wątpliwości, to ustalenie ścisłej stechiometrii aktywnego transportu jest dodatkowo skomplikowane przez działanie innych mechanizmów transportu [68].

5. ORIENTACJA SODU I POTASU WOBEC ENZYMU I POMPY JEST TAKA SAMA

Istnienie jakiegokolwiek mechanizmu transportu związane jest z istnieniem gradientów stężeń substancji transportowanych. W naturalnych układach, tj. komórkach, występują przeciwstawne gradienty stężeń jonów sodowych i potasowych. Zadaniem pompy sodowej jest utrzymanie homeostazy jonowej w postaci ściśle określonych ilości tych jonów po obu stronach błony komórkowej. Budowa Na,K-ATPazy jest przystosowana do pełnienia tej funkcji. Częsteczka enzymu posiada miejsca aktywowane przez jony sodowe od strony wewnętrznej — miejsca „i” (od — inside) oraz miejsca aktywowane przez jony potasowe od strony zewnętrznej — miejsca „o” (od — outside). Specyficzność miejsca „i” jest absolutna dla sodu, stąd nazwa — pompa „sodowa”, a nie „sodowo-potasowa” [30]. Kilka jonów może natomiast zastępować jon potasowy w następującym szeregu efektywności: $Tl^+ > K^+ > Rb^+ > NH_4^+ > Cs^+ > Li^+$ [52, 75]. Stosunek stałych Michaelisa dla sodu i potasu wynosi przeciętnie 10 — K_m dla sodu ok. 10 mM i K_m dla potasu ok. 1 mM [52]. Na,K-ATPaza, podobnie jak większość ATPaz, jest aktywowana jonami magnezowymi, które biorą udział w samej reakcji hydrolizy ATP [55, 76]. Jony magnezu mogą być zastąpione jonami manganu lub kobaltu, ale z mniejszą wydajnością [52].

6. INHIBITORY Na,K-ATPazy SĄ INHIBITORAMI POMPY

Jeszcze przed odkryciem Na,K-ATPazy znane było inhibitorowe działanie glikozydów nasercowych na pompę sodową [72]. Najszerze zastosowanie spośród nich znalazła ouabaina — strofantyna g — glikozyd pochodzenia roślinnego mający w strukturze swojej cząsteczki pierścień sterydowy. Wysoka specyficzność ouabainy pozwala na określanie aktywności enzymu w nieoczyszczonych preparatach zawierających inne ATPazy i fosfatazy. Aktywność Na,K-ATPazy stanowi różnica między wynikiem uzyskanym dla próby bez inhibitora a wynikiem próby z ouabainą [71, 73]. Ponieważ ouabaina wiąże się z enzymem od strony zewnętrznej [38] — w stosunku 1:1 — służy często jako marker tej strony w preparatach z rozbitymi strukturami. Sposób działania tego inhibitora pozwala także na wykorzystanie go do badań nad sekwencją i mechanizmem reakcji enzymatycznej [68]. Glikozydy nasercowe mogą

działać przez inhibicję defosforylacji fosfoenzymu lub fosforylacji defosfoenzymu [29], gdyż hamują enzym na poziomie fosforylowanego intermediatu [33]. Stopień i zakres wiązania ouabainy do tej formy jest ściśle zależny od składu medium [40]. Na przykład wysokie stężenie jonów potasowych może znosić inhibicję przez obniżenie stopnia wiązania inhibitora do enzymu [48]. Wiązanie to ma charakter nieodwracalny [83]. Brak inhibicji w pewnych przypadkach może być spowodowany takim rozmieszczeniem się cząsteczek Na,K-ATPazy w pęcherzykach błonowych preparatu, że niedostępne staje się miejsce wiązania ouabainy dla egzogenego inhibitora [44].

Wrażliwość Na,K-ATPazy na glikozydy nasercowe jest różna zależnie od pochodzenia gatunkowego enzymu. Enzymy z nerwu kraba i nerki szczura są, na przykład, względnie niewrażliwe na te inhibitory [40].

Niedawno zaobserwowano, że handlowy preparat ATP uzyskany z mięśni końskich — tzw. „Sigma grade” ATP — zawiera inhibitor Na,K-ATPazy [11]. Okazało się, że jest nim ortowanadan — VO_3^- [5, 47]. Dalsze badania wyjaśniły częściowo mechanizm jego działania [2, 37]. Inhibicja występuje w obecności wanadanu i jonów magnezowych po stronie wewnątrzkomórkowej. Jony potasowe obecne po stronie przeciwnej wzmagają hamowanie i mają prawdopodobnie odrębne miejsca wiążące. Natomiast fosforany przeciwdziałają inhibicji [68]. Ponieważ wanadan hamuje Na,K-ATPazę i transport jonów w stężeniach bliskich fizjologicznym, sądzi się, że działa on jako naturalny regulator aktywności pompy sodowej [19, 44].

Odwracalnym inhibitorem Na,K-ATPazy jest N-etylomaleimid (NEM) hamujący hydrolizę ATP i mający bardzo zróżnicowany wpływ na poszczególne etapy reakcji. Ta różnorodność działania wynika z alkilowania przez NEM różnych grup enzymu w różnych jego stanach [29].

Hamujące działanie na aktywność Na,K-ATPazy i pompy sodowej mają także: oligomycyna [68], fluorki, dwucykloheksylokarbodwuimid [29], serotonina [23, 24], kwas etakrynowy [17], a także jony żelaza, wapnia, strontu, baru, berylu, cynku i miedzi [52].

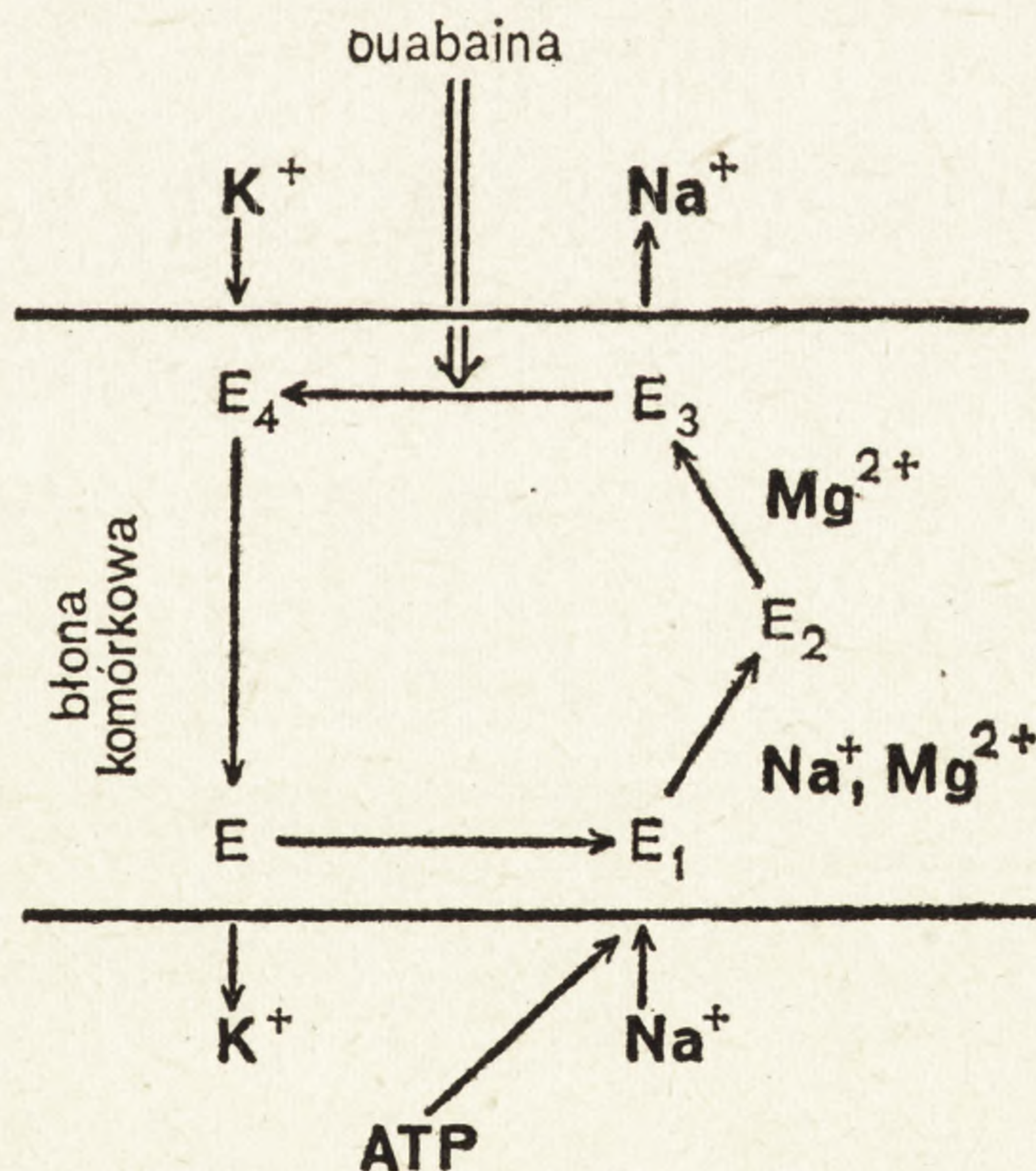
Podkreślenia wymaga też fakt, że przez inhibicję enzymu przeciwciałami można określać różne stany konformacyjne indukowane jonami sodowymi i potasowymi, które prawdopodobnie reprezentują stany funkcjonalne układu w czasie transportu [50, 51].

7. TRANSPORT JONÓW SPRZĘŻONY JEST Z HYDROLIZĄ ATP

Dokładne poznanie budowy Na,K-ATPazy jest koniecznym warunkiem wyjaśnienia zasad, według których działa mechanizm pierwotnego transportu aktywnego. Badania P. L. Jørgensena nad nerkową Na,K-

-ATPazą wykazały, że białko enzymatyczne składa się z dwóch polipeptydów występujących w proporcji molarnej 1:1. Podjednostka α o ciężarze cząsteczkowym 104 000 stanowi 66–72% całości białka. Podjednostka β jest sialoglikoproteidem o ciężarze cząsteczkowym 40 000 plus 17 000 przypadające na część węglowodanową. Jednostką funkcjonalną jest dimer $\alpha_2\beta_2$. Ogólny jego ciężar wynosi 314 000, z czego 280 000 przypada na część białkową, a 34 000 na resztę węglowodanową. Prawdopodobnie jest to najmniejsza jednostka mogąca już katalizować sprzężony transport sodu i potasu [44].

Kinetyka reakcji ATPazowej jest zgodna z modelem opracowanym dla enzymów histeretycznych, których aktywność zmienia się w czasie na skutek zmian konformacyjnych indukowanych przez substrat [31]. Szczegółowa analiza zachowania się enzymu pod wpływem różnych stężeń magnezu pozwoliła na odróżnienie reakcji ATPazowej od reakcji katalizowanej przez fosfatazę potasową [22, 43]. I tak, ATPaza wymaga niskiego stężenia, przy wyższych pojawia się inhibicja. Fosfataza natomiast wymaga wysokiego stężenia magnezu do aktywacji. Jeśli jest ono wyższe od stężenia ATP, magnez hamuje ATPazę i jednocześnie stymuluje aktywność fosfatazową. Flatman i Lew [22] sugerują, że zwiększenie stężenia magnezu powoduje bezpośrednią zmianę konformacji enzy-



Ryc. 1. Transport kationów przez pompę sodową — reakcje pośrednie. Wg [55, 56] — zmienione. Objasnienia w tekście.

mu z faworyzującej aktywność ATPazową na faworyzującą aktywność fosfatazową.

Schemat reakcji katalizowanej przez Na,K-ATPazę z zaznaczeniem reakcji pośrednich i transportu jonów przez błonę przedstawia ryc. 1.

Pierwszym etapem jest powstanie kompleksu enzymu z ATP (E_1) po wewnętrznej stronie błony [4]. W obecności jonów magnezowych i sodowych enzym zostaje ufosforylowany. Hydroliza ATP powoduje przesunięcie fosforanu nieorganicznego na grupę lub grupy enzymu przed ich ostatecznym przeniesieniem na cząsteczkę wody [29]. Utworzony zostaje jednocześnie kompleks z ADP i jonami sodowymi (E_2) [35]. Potwierdzeniem istnienia intermediatu w postaci fosfoenzymu są wyniki eksperymentów z użyciem techniki szybkiego mieszania (rapid-mixing), która umożliwia pomiar stopnia fosforylacji i defosforylacji oraz z badań nad stopniem hydrolizy i poziomem fosforylacji w stanie stacjonarnym w różnych warunkach [29].

Po przejściu jonów sodowych na zewnątrz enzym jest defosforylowany tworząc intermediat (E_3) wrażliwy na ouabainę i inne glikozydy nasyrcowe. Jony potasowe konkurują z ouabainą o miejsce na enzymie [76]. Przyłączenie tych jonów do miejsc „o” (E_4) prowadzi do przetransportowania ich do wnętrza komórki i wejścia enzymu do następnego cyklu. W warunkach normalnych bilans jednego obrotu to hydroliza jednej cząsteczki ATP, wyrzucenie trzech jonów sodowych z komórki i wejście do niej dwóch jonów potasowych [52].

8. CZTERY SPOSOBY DZIAŁANIA POMPY I ENZYMU

Z badań nad erytrocytami i cieniami erytrocytów jako układami modelowymi transportu kationów wynika, że pompa sodowa może działać na kilka sposobów [29, 30].

I. Klasyczny model działania pompy sodowej przedstawia ryc. 2a.

Najczęściej obserwuje się wymianę jonu sodowego z potasowym (Na : K). Proces zachodzi na koszt energii powstającej z hydrolizy ATP. Pompa może działać w tym przypadku elektrogenie, czyli powodować bezpośrednio ruch ładunków elektrycznych przez błonę. Praca pompy jest tu uwarunkowana gradientami stężeń obu jonów.

II. Wymiana „sód za sód” (Na : Na) obserwowana jest w mediach pozbawionych jonów potasowych z zachowaniem wysokich stężeń sodu (ryc. 2b). Stechiometria wymiany wynosi 1 : 1, ale występuje silna asymetria w powinowactwie do jonów sodowych po obu stronach błony. Nasylenie od wewnątrz uzyskuje się już przy stężeniu 10–15 mM, od zewnątrz zaś do nasycenia potrzebne jest stężenie około dziesięć razy wyższe. Jon potasowy wprowadzony do środowiska zewnętrznego ha-

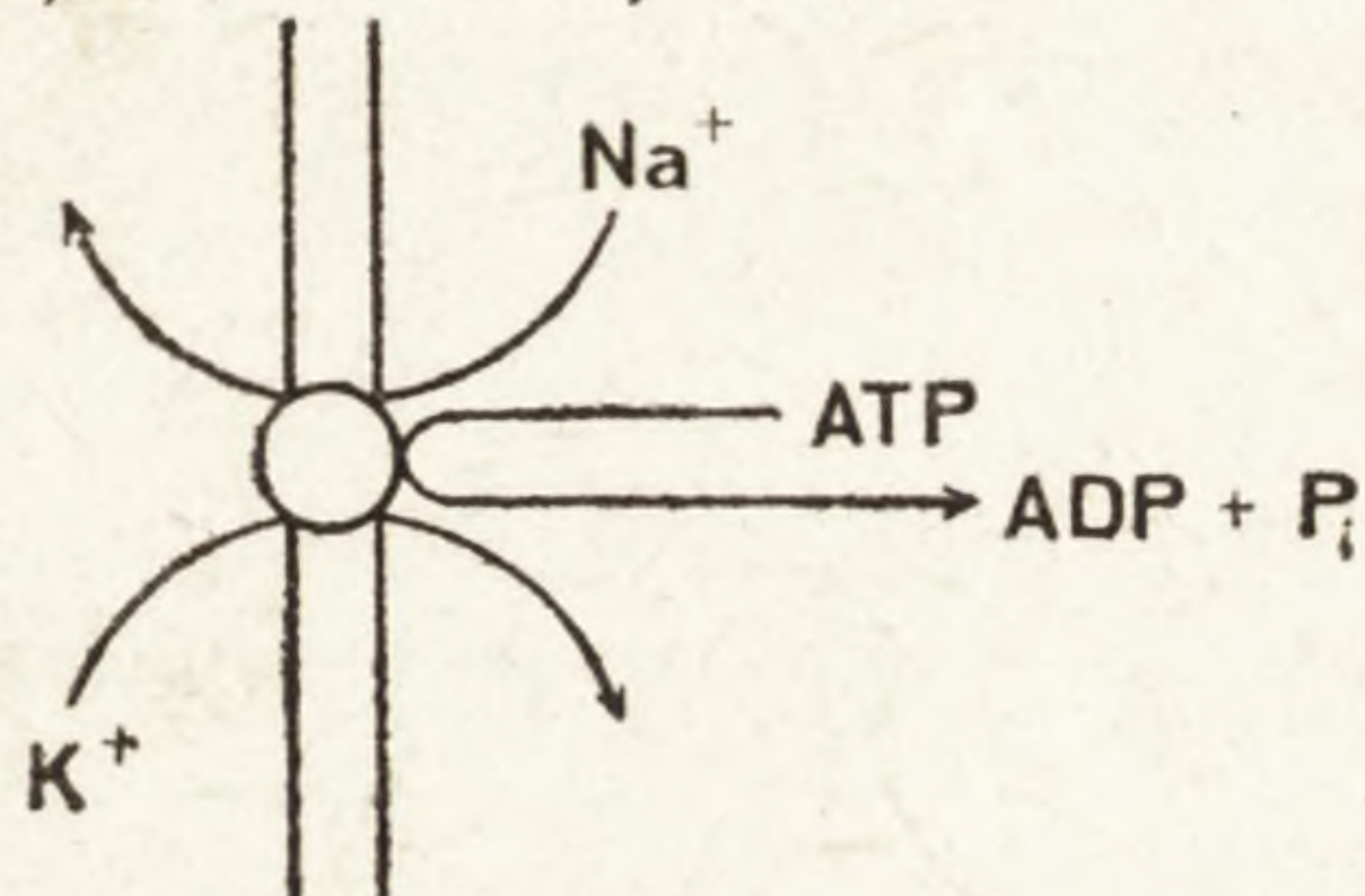
muje tę wymianę i umożliwia transport Na : K. Natomiast jon potasowy zawarty wewnątrz układu ułatwia wymianę Na : Na. Hydroliza ATP jest niewielka lub jej brak. Wymagana jest obecność ADP, co sugeruje, że wejście jonu sodowego połączone musi być bezpośrednio lub pośrednio z refosforylacją ADP przez ufosforylowane białko pompy.

III. Transport „potasu za potas” (K : K) (ryc. 2c) występuje w cieniach erytrocytów, gdy brak w środowisku jonów sodowych, ale spo-

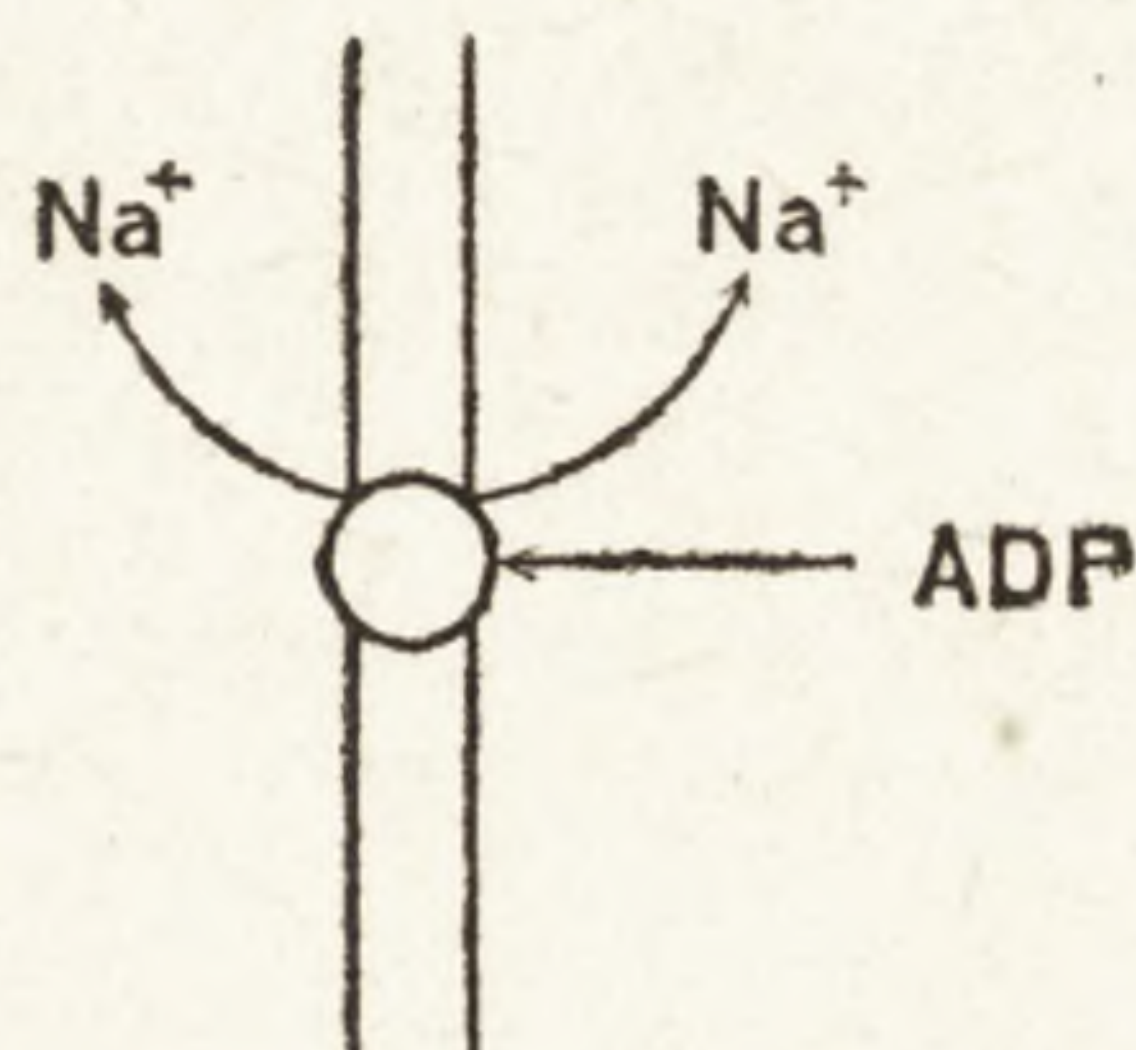
Ryc. 2b

Ryc. 2a

strona
zewnętrzna wewnętrzna



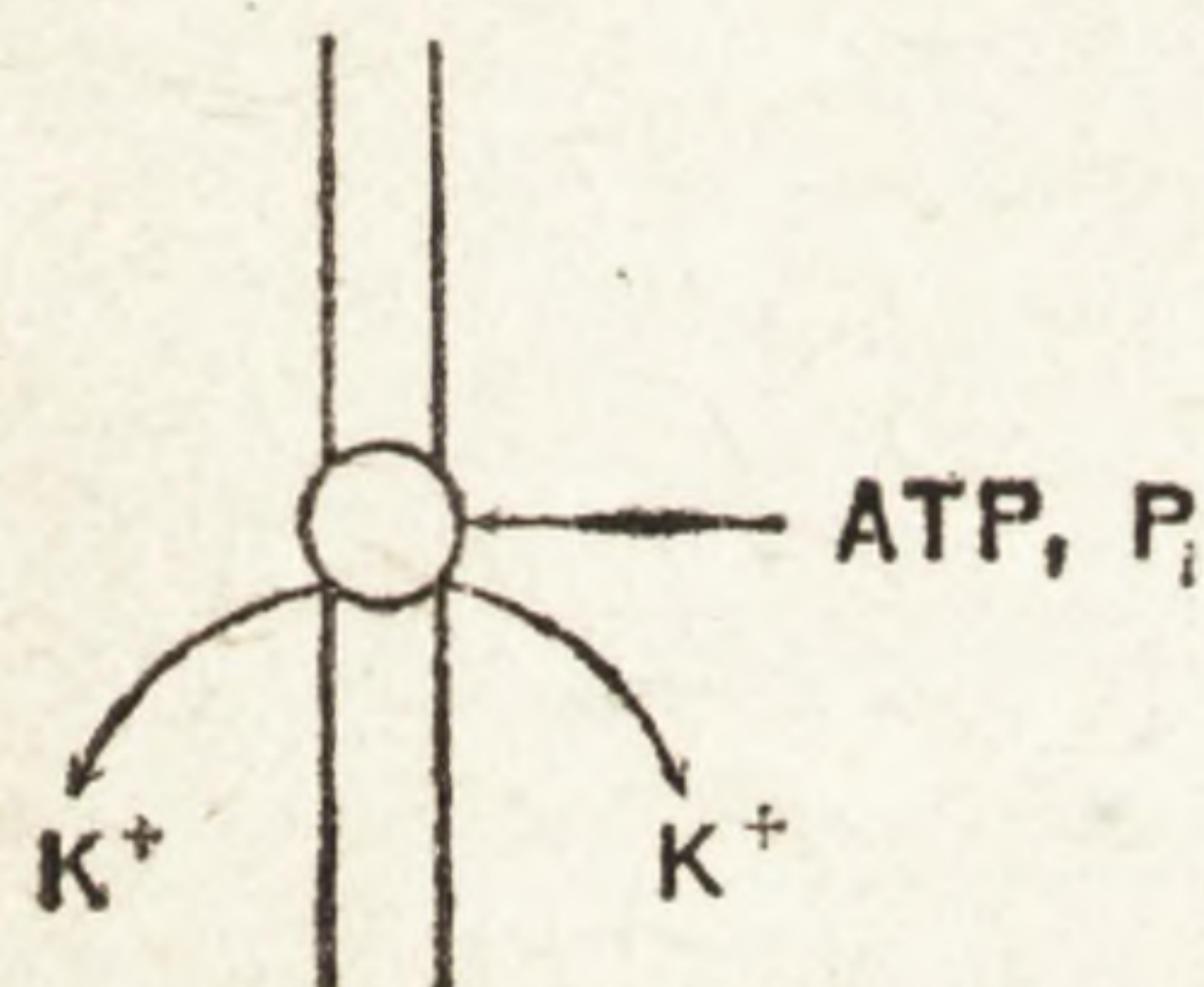
$Na_w = 5$
 $Na_z = 140$
 $K_w = 140$
 $K_z = 5$



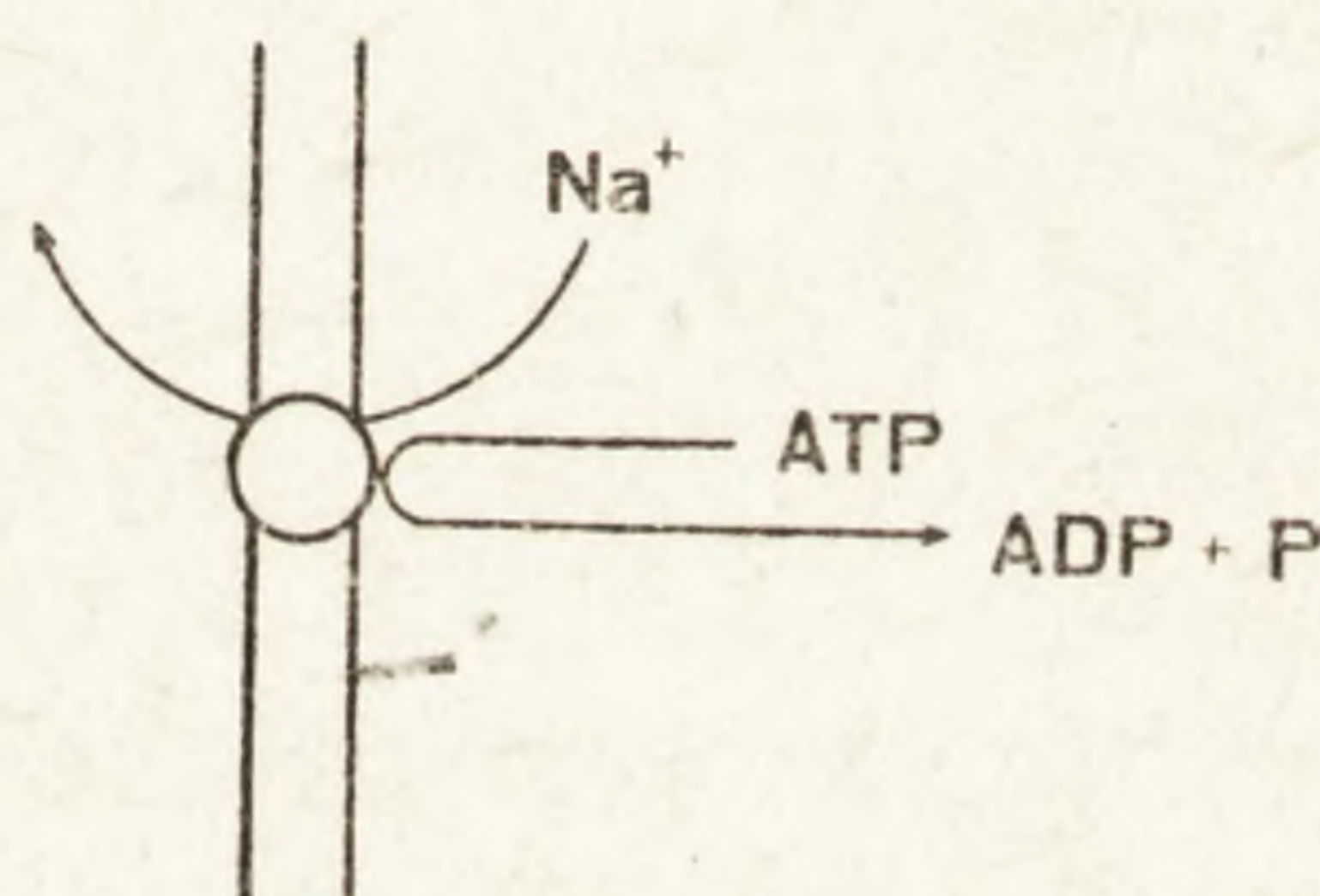
$Na_w = 140$
 $Na_z = 140$
 $K_w = 0$
 $K_z = 0$

Ryc. 2c

Ryc. 2d

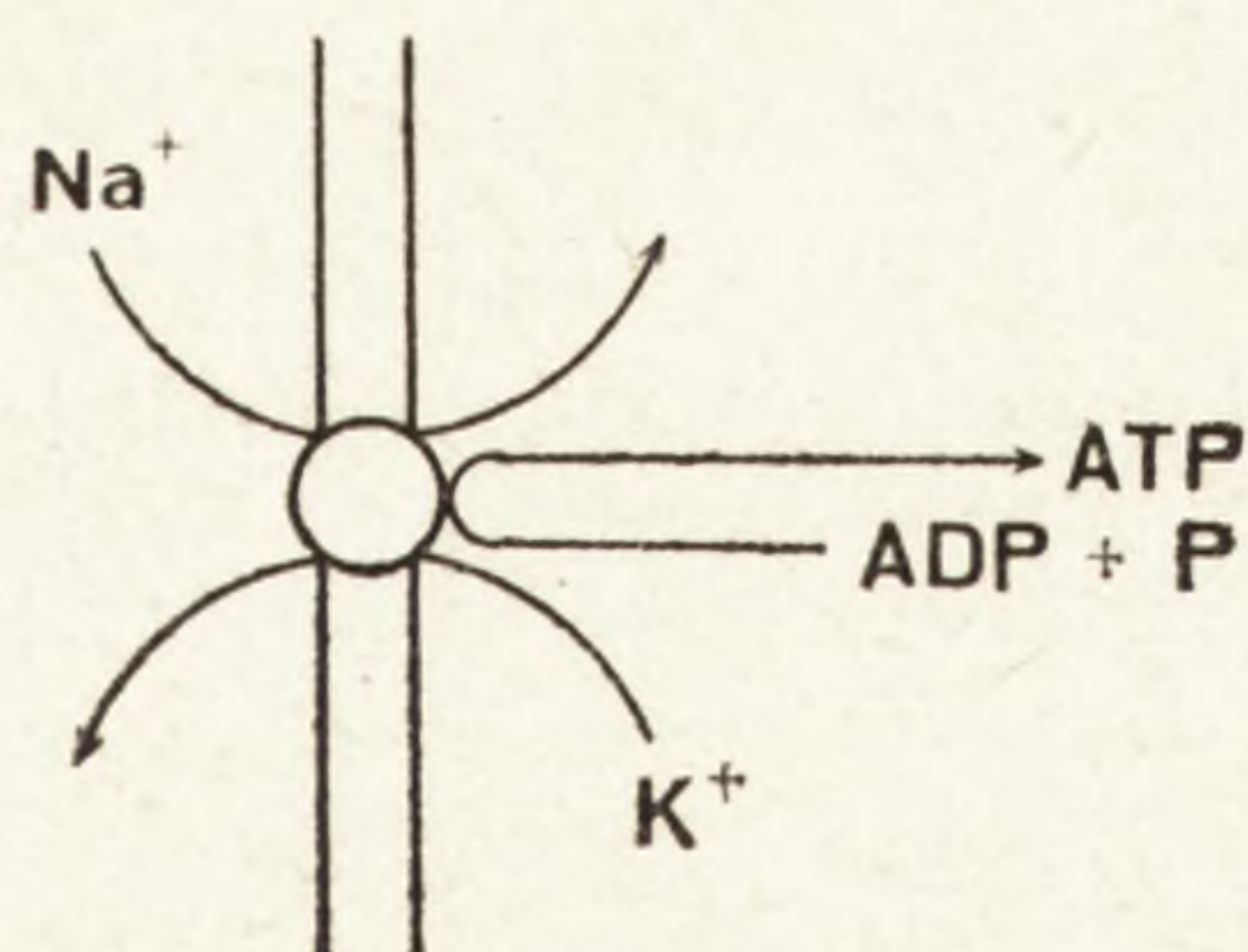


$Na_w = 0$
 $Na_z = 0$
 $K_w = 140$
 $K_z = 140$



$Na_w = 140$
 $Na_z = 0$
 $K_w = 0$
 $K_z = 0$

Ryc. 2e



$Na_w = 0$
 $Na_z = 140$
 $K_w = 147$
 $K_z = 0$

Ryc. 2. Transport kationów przez pompę sodową: a — wymiana Na : K; b — wymiana Na : Na; c — wymiana K : K; d — niesprężony wyrzut sodu; e — odwrócenie reakcji i kierunków transportu. Wg [30] — zmienione. Na_w , K_w — stężenia jonów wewnątrz komórki (mM); (Na_z , K_z — stężenia jonów zewnątrz komórki (mM). Dalsze objaśnienia w tekście).

tykany jest także w warunkach fizjologicznych (wymiana Na : K) : jeden z pięciu „zewnętrznych” jonów potasowych wymieniany jest na jeden „wewnętrzny” w miejsce jonu sodowego. Podobnie jak w modelu II silna jest asymetria powinowactwa do jonów potasowych po obu stronach błony — odwrotna w porównaniu z wymianą Na : Na, co sugeruje zaangażowanie w obu przypadkach tych samych miejsc wiążących. Zużycie ATP jest małe i raczej nie związane bezpośrednio z transportem. Wymiana K : K nie występuje jeśli wewnątrz komórki znajdują się fosforany. Obecność ADP nie jest wymagana. Ciekawą cechą tej formy transportu jest to, że występuje ona tylko w obecności nukleotydu, niekoniecznie ATP. Świadczy to o odmiennej roli jaką pełnią tu nukleotydy, ponieważ nie polega ona na fosforylacji.

IV. Niesprężony wyrzut jonów sodu (ryc. 2d) charakterystyczny jest dla erytrocytów lub ich cieni inkubowanych w środowiskach z choliną lub jonami magnezowymi. Zaobserwowano go także w innych komórkach — nerwowych i mięśniowych. Połączony jest z hydrolizą ATP tak, że na jedną cząsteczkę ATP przypadają trzy jony sodowe opuszczające komórkę. Przepływ taki może być związany z aktywnością ATPazową stwierdzoną w rozbitych komórkach przy niskim stężeniu ATP, gdy obecne są jony sodowe, a brak jonów potasowych. Malejący wtedy rząd powinowactwa do wiązania nukleotydu (ATP) znajduje odbicie w malejącym stosunku wymiany Na : K do niesprężonego wyrzutu Na.

9. PIĄTY SPOSÓB — ODWRACALNOŚĆ DZIAŁANIA POMPY

Odwrócenie reakcji można uzyskać przez spotęgowanie różnicy między stężeniami jonów sodowych i potasowych w porównaniu z modelem I („zaostwienie” gradientów) oraz takie ustalenie stężeń ATP, ADP i fosforanu nieorganicznego, że pompa syntetyzuje ATP — obniżenie stosunku $[ATP] : [ADP] \cdot [P_i]$ (ryc. 2e). Odwrócenie nie jest możliwe przy normalnie występujących składach środowiska, a hamowane jest od strony zewnętrznej przez jon potasowy.

Demonstracja odwracalności reakcji enzymatycznej i jednoczesnego transportu jonów jest bardzo ważna, gdyż wskazuje niezbicie, że pompa sodowa jest enzymem, a nie działa na zasadzie „koła zębatego” [25, 27].

10. SÓD I POTAS SĄ TRANSPORTOWANE PRZEZ LIPOSOMY ZAWIERAJĄCE Na,K-ATPazę

Zasadniczym celem, po wydzieleniu podstawowych i niezbędnych składników układu biologicznego, staje się próba jego rekonstrukcji *in vitro*. Rekonstrukcja zakończona powodzeniem, tj. przywróceniem peł-

nej aktywności układu, dowodzi prawidłowej izolacji elementów (dobre metody) i słusznego teoretycznego modelu działania całości (dobra teoria).

Możemy przyjąć, że funkcjonalną jednostką Na,K-ATPazy jest dimer o ciężarze cząsteczkowym 280 000, co wiemy ze szczegółowych badań nad izolowanym enzymem [44]. Za strukturą dimeryczną przemawia obecność dwóch miejsc fosforylacji, dwóch w określonych warunkach miejsc wiążących ATP i dwóch miejsc wiążących ouabainę [29]. Nie wiemy jednak jak usytuowana jest cząsteczka enzymu w błonie komórkowej: czy ma w niej taką samą strukturę jak oczyszczona Na,K-ATPaza? Rekonstrukcja *in vitro* odbywa się przez dodanie do wyizolowanego białka enzymatycznego nadmiaru lipidów i uformowanie liposomów. Średnica wbudowanej w ten sposób do liposomu Na,K-ATPazy zmierzona na podstawie zdjęć elektronomikroskopowych wynosi około 9 nm, czyli jest taka sama jak w preparacie czystej, błonowej Na,K-ATPazy [14], gdzie część błonowa jest natywna. Sugeruje to, że jednostka $\alpha_2\beta_2$ może rzeczywiście katalizować sprzężony transport sodu i potasu, co potwierdzają inne badania [44]. Istnieje bowiem liniowa zależność między stopniem aktywnego transportu a ilością cząsteczek zawartych w liposomie w przedziale 0,2–16 cząsteczek na pęcherzyk o średnicy 90 nm [44]. Jednak tempo pracy pompy w liposomach jest wolniejsze niż w nienaruszonych komórkach. Wynika to z pewnością z inaktywacji Na,K-ATPazy detergentami w czasie izolacji. Jest też możliwe, że większa ilość oligomerów jest niezbędna do katalizowania transportu w stopniu zbliżonym do naturalnego. Dodatkowym źródłem rozbieżności może być losowe rozmieszczenie asymetrycznych cząsteczek białkowych w liposomie. Mimo to rekonstruowany preparat może pracować na pięć podanych sposobów transportu, jakimi cechują się pompy sodowe erytrocytów [44].

ZAKOŃCZENIE

Z analizy danych dostarczanych przez biochemię, biofizykę i nauki pokrewne z badań nad mniej lub bardziej oczyszczonymi składnikami układu transportującego jony wynika, że pompa sodowa jest enzymem — Na,K-ATPazą. Wydaje się to być udowodnione przekonywająco. Jak zwykle jednak pojawiają się pewne wątpliwości.

Stosowanie ouabainy w badaniach fizjologicznych i farmakologicznych przyniosło niespodzianki. Infuzja glikozydu w wysokich stężeniach do tętnic nerkowych całych zwierząt lub do izolowanych nerek nie powoduje spodziewanego zahamowania reabsorpcji sodu. Co najmniej 50% filtrowanego sodu może być wchłaniane przez mechanizm (mechanizmy?) niezależne od pompy sodowej [3, 69, 82]. Potwierdzono już fakt istnienia niewrażliwego na ouabainę, niedyfuzyjnego transportu sodu [1], jed-

nak problem leży chyba w tym, że wynik doświadczenia zależy od użytego materiału. Króliki mają komórki kanalików nerkowych bardzo wrażliwe na ouabainę, natomiast komórki szczurów, jak już wspomniano, są dość odporne na ten inhibitor. Rozwiązaniem tego paradoksu może stać się wykonanie perfuzji nerki zwierząt wrażliwych na glikozyd lub nerki szczurów, u których stężenie jonów potasowych będzie zredukowane do zera w obecności ouabainy [30]. Wynik tych doświadczeń powinien mieścić się w ramach modelu działania pompy sodowej (ryc. 2).

Innym źródłem wątpliwości jest zakwestionowanie przez niektórych autorów powszechności występowania Na,K-ATPazy [48, 59]. Brak enzymu w erytrocytach psów [6, 7], a także w tkankach nabłonkowych niektórych owadów [48] jest dowiedziony i uzasadniony.

Występowanie innych mechanizmów transportu kationów nie podważa modelu opartego na pracy Na,K-ATPazy, który pozostaje wciąż najbardziej uniwersalnym i najlepiej przystającym do danych eksperymentalnych [29, 68].

LITERATURA

- [1] AMBARCUMJAN T. G., ADAMJAN S. J., MARIKJAN C. G., Zawisimost neczuwstwitelnych k uabainu raznostnych potokow natrija ot koncentracji natrija w roztwore, *Biofizika*, **25**: 1037-1040, 1980.
- [2] BEAUGE L., GLYNN I. M., A modifier of Na,K-ATPase in commercial ATP, *Nature*, **268**: 355-356, 1977.
- [3] BESARAB A., SILVA P., EPSTEIN F. H., Multiple pumps for sodium reabsorption by the perfused kidney, *Kidney Int.*, **10**: 147-153, 1976.
- [4] BLOSTEIN R., Na-ATPase of the mammalian erythrocyte membrane, *J. biol. Chem.*, **250**: 6118-6124, 1975.
- [5] CANTLEY L. C., JOSEPHSON L., WARNER R., YANAGISAWA M., LECHENE C., GUIDOTTI G., Vanadate is a potent Na,K-ATPase inhibitor found in ATP derived from muscle, *J. biol. Chem.*, **252**: 7421-7423, 1977.
- [6] CASTRANOVA V., HOFFMAN J. F., Heterogeneity in dog red blood cells: sodium and potassium transport, *J. Gen. Physiol.*, **73**: 61-71, 1979.
- [7] CHAN P. C., CALABRESE V., THIEL L. S., Species differences in the effect of sodium and potassium ions on the ATPase of erythrocyte membranes, *Biochim. biophys. Acta*, **79**: 424-426, 1964.
- [8] CHARNEY A. N., DONOWITZ M., Functional significance of intestinal Na,K-ATPase: in vivo ouabain inhibition, *Am. J. Physiol.*, **234**: E629-E636, 1978.
- [9] CHARNEY A. N., GOTS R. E., GIANNELLA R. A., Na,K-stimulated ATPase in isolated intestinal villus tip and crypt cells, *Biochim. biophys. Acta*, **367**: 265-270, 1974.
- [10] CHARNEY A. N., KINSEY M. D., MYERS L., GIANNELLA R. A., GOTS R. E., Na,K-activated ATPase and intestinal electrolyte transport. Effect of adrenal steroids, *J. Clin. Invest.*, **56**: 653-660, 1975.

- [11] CHARNEY A. N., SILVA P., EPSTEIN F. H., An in vitro inhibitor of Na, K-ATPase present in an ATP preparation, *J. Appl. Physiol.*, **39**: 156-158, 1975.
- [12] CIVAN M. M., Intracellular activities of sodium and potassium, *Am. J. Physiol.*, **234**: F261-F269, 1978.
- [13] DAVIS R. P., Biochemiczne i metaboliczne aspekty transportu, [w] *Błony biologiczne*, red. R. M. Dowben, PZWL, Warszawa 1973, 96-97.
- [14] DEGUCHI N., JØRGENSEN P. L., MAUNSBACH A. B., Ultrastructure of the sodium pump. Comparison of thin sectioning, negative staining and freeze fracture of purified, membrane-bound Na,K-ATPase, *J. Cell. Biol.*, **75**: 619-634, 1977.
- [15] DELEERS M., CASPERS J., RUYSSCHAERT J. M., Interfacial properties of an Na,K-activated ATPase: A monolayer approach, *J. Colloid Interface Sci.*, **61**: 428-434, 1977.
- [16] DOWBEN R. M., Budowa i skład chemiczny błon, [w:] *Błony biologiczne*, red. R. M. Dowben, PZWL, Warszawa 1973, 13-15.
- [17] DUGGAN D. E., NOLL R. M., Effects of ethacrynic acid and cardiac glycosides upon a membrane ATPase of renal cortex, *Arch. Biochem. Biophys.*, **109**: 388-396, 1965.
- [18] EPSTEIN F. H., KATZ A. I., PICKFORD G. E., Na,K-activated ATPase of gills: role in adaptation of teleosts to salt water, *Science*, **156**: 1245-1247, 1967.
- [19] ERDMANN E., KRAWIETZ W., PHILIPP G., HACKBARTH I., SCHMITZ W., SCHOLZ H., Stimulatory effect of vanadate on Na,K-ATPase activity and on ³H-ouabain-binding in a cat heart cell membrane preparation, *Nature*, **278**: 459-461, 1979.
- [20] ERNST S. A., MILLS J. W., Autoradiographic localization of tritiated ouabain-sensitive sodium pump sites in ion transporting epithelia, *J. Histochem. Cytochem.*, **28**: 72-77, 1980.
- [21] ESMANN M., SKOU J. C., CHRISTIANSEN C., Solubilization and molecular weight determinations of the Na,K-ATPase from rectal glands of *Squalus acanthias*, *Biochim. biophys. Acta*, **567**: 410-420, 1979.
- [22] FLATMAN P. W., LEW V. L., Excess magnesium converts red cell Na,K-ATPase to the potassium phosphatase, *J. Physiol.*, **307**: 1-8, 1980.
- [23] GARCIA-CASTIÑEIRAS S., WHITE J. I., RODRIGUEZ L. D., TORO-GOYCO E., Na,K-ATPase inhibition by *Palythoa* extracts — Chemical nature of the inhibitor and kinetics of inhibition, *Biochem. Pharmacol.*, **26**: 589-594, 1977.
- [24] GARCIA-CASTIÑEIRAS S., WHITE J. I., TORO-GOYCO E., Inhibition of Na,K-dependent ATPase by serotonin, *Mol. Pharmacol.*, **13**: 181-184, 1977.
- [25] GARRAHAN P. J., GLYNN I. M., Driving the sodium pump backwards to form adenosine triphosphate, *Nature*, **211**: 1414-1415, 1966.
- [26] GARRAHAN P. J., GLYNN I. M., The stoichiometry of the sodium pump, *J. Physiol.*, **192**: 217-235, 1967.
- [27] GARRAHAN P. J., GLYNN I. M., The incorporation of inorganic phosphate into ATPase by reversal of the sodium pump, *J. Physiol.*, **192**: 237-256, 1967.
- [28] GLITSCH H. G., Characteristics of active Na transport in intact cardiac cells, *Am. J. Physiol.*, **236**: H189-H199, 1979.
- [29] GLYNN I. M., KARLISH S. J. D., The sodium pump, *Ann. Rev. Physiol.*, **37**: 13-55, 1975.
- [30] GRANTHAM J. J., The renal sodium pump and vanadate, *Am. J. Physiol.*, **239**: F97-F106, 1980.
- [31] GRISAR T., FRERE J. M., GRISAR-CHARLIER J., FRANCK G., SCHOF-

- FENIELS E., Synaptosomal Na,K-ATPase in an hysteretic enzyme, *FEBS Lett.*, **89**: 173-176, 1978.
- [32] HAFKENSCHIED J. C. M., Occurrence and properties of a Na,K-activated ATPase in the mucosa of the rat intestine, *Pflügers Arch.*, **338**: 289-294, 1973.
- [33] HANSEN O., The effect of sodium on inorganic phosphate and p-nitrophenyl-phosphate facilitated ouabain binding to Na,K-ATPase, *Biochim. biophys. Acta*, **511**: 10-22, 1978.
- [34] HELENIUS A., SIMONS K., Solubilization of membranes by detergents, *Biochim. biophys. Acta*, **415**: 29-79, 1975.
- [35] HOKIN L. E., DAHL J. L., The Na,K-ATPase, [w:] *Metabolic Pathways*, vol. VI, red. L. E. Hokin, Academic Press, New York 1972, 269-315.
- [36] HOKIN L. E., DAHL J. L., DEUPREE J. D., DIXON J. F., HACKNEY J. F., PERDUE F., Studies on the characterization of Na,K-ATPase. X. Purification of the enzyme from the rectal gland of *Squalus acanthias*, *J. biol. Chem.*, **248**: 2593-2605, 1973.
- [37] HUDGINS P. M., BOND G. H., Mg,K-dependent inhibition of Na,K-ATPase due to a contaminant in equine muscle ATP, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **77**: 1024-1029, 1977.
- [38] JOINER C. H., LAUF P. K., The correlation between ouabain and potassium pump inhibition in human and sheep erythrocytes, *J. Physiol.*, **283**: 155-175, 1978.
- [39] JØRGENSEN P. L., Regulation of the Na,ATPase in rat kidney. II. The effect of aldosterone on the activity in kidneys of adrenalectomized rats, *Biochim. biophys. Acta*, **192**: 326-334, 1969.
- [40] JØRGENSEN P. L., Techniques for the study of steroid effects on membranous Na,K-ATPase, *Methods Enzymol.*, **36 A**: 434-439, 1974.
- [41] JØRGENSEN P. L., Purification and characterization of Na,K-ATPase. III. Purification from the outer medulla of mammalian kidney after selective removal of membrane components by sodium dodecyl sulphate, *Biochim. biophys. Acta*, **356**: 36-52, 1974.
- [42] JØRGENSEN P. L., Isolation and characterization of the components of the sodium pump, *Q. Rev. Biophys.*, **7**: 239-274, 1975.
- [43] JØRGENSEN P. L., Purification and characterization of Na,K-ATPase. VI. Differential tryptic modification of catalytic functions of the purified enzyme in the presence of NaCl and KCl, *Biochim. biophys. Acta*, **466**: 97-108, 1977.
- [44] JØRGENSEN P. L., Sodium and potassium ion pump in kidney tubules, *Physiol. Rev.*, **60**: 864-917, 1980.
- [45] JØRGENSEN P. L., SKOU J. C., Preparation of highly active Na,K-ATPase from the outer medulla of rabbit kidney, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **37**: 39-46, 1969.
- [46] JØRGENSEN P. L., SKOU J. C., Purification and characterization of Na, K-ATPase. I. The influence of detergents on the activity of Na,K-ATPase in preparations from the outer medulla of rabbit kidney, *Biochim. biophys. Acta*, **233**: 366-380, 1971.
- [47] JOSEPHSON L., CANTLEY L. C., Isolation of a potent Na,K-ATPase inhibition from striated muscle, *Biochemistry*, **16**: 4572-4578, 1977.
- [48] JUNGREIS A. M., Comparative aspects of invertebrate epithelial transport, [w:] *Water relations in membrane transport in plants and animals*, red. A. M. Jungreis, T. K. Hodges, A. Kleinzeller, S. G. Schultz, Academic Press, New York 1977, 89-96.

- [49] KIMELBERG H. K., PAPAHAJOPOLOUS D., Phospholipid requirements for Na,K-ATPase activity: head group specificity and fatty acid fluidity, *Biochim. biophys. Acta*, **282**: 277-292, 1972.
- [50] KOEPESELL H., Characteristics of antibody inhibition of rat kidney Na,K-ATPase, *J. Memb. Biol.*, **44**: 85-102, 1978.
- [51] KOEPESELL H., Conformational changes of membrane-bound Na, K-ATPase as revealed by antibody inhibition, *J. Memb. Biol.*, **45**: 1-20, 1979.
- [52] KOTYK A., JANACEK K., *Membrane transport*, Academia, Praha 1977.
- [53] KYTE J., Purification of the Na,K-dependent ATPase from canine renal medulla, *J. biol. Chem.*, **246**: 4157-4165, 1971.
- [54] LAGERSPETZ K. Y. H., SENIUS K. E. O., ATPase stimulated by Na and K in gills of the freshwater mussel *Anodonta*, *Comp. Biochem. Physiol.*, **62 B**: 291-293, 1979.
- [55] LAUF P. K., *Membrane immunology and permeability functions*, [w:] *Physiology of membrane disorders*, red. T. E. Andreoli, J. F. Hoffman, D. D. Fanestil, Plenum Publ. Corp., New York 1978, 369-398.
- [56] McMURRAY W. C., *Essentials of human metabolism*, Harper and Row, New York 1977.
- [57] MILLS J. W., DiBONA D. R., On the distribution of Na-pump sites in the frog skin, *J. Cell Biol.*, **75**: 968-973, 1977.
- [58] MILLS J. W., ERNST S. A., DiBONA D. R., Localization of Na-pump sites in frog skin, *J. Cell Biol.*, **73**: 88-110, 1977.
- [59] MOFFETT D. F., Voltage-current relation and K transport in tobacco hornworm (*Manduca sexta*) midgut, *J. Memb. Biol.*, **54**: 213-219, 1980.
- [60] MØLLER O. J., Activation by freezing of Na, K-ATPase in a microsomal fraction from ox kidney cortex, *Exptl. Cell Res.*, **68**: 347-355, 1971.
- [61] NAKAO T., NAKAO M., MIZUNO N., KOMATSU Y., FUJITA M., Purification and some properties of Na,K-ATPase. I. Solubilization and stability of Lubrol extracts, *J. Biochem. Tokyo*, **73**: 609-619, 1973.
- [62] NAKAO T., TASHIMA Y., NAGANO K., NAKAO M., Highly specific Na, K-activated ATPase from various tissues rabbit, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **19**: 755-758, 1965.
- [63] PERRONE J. R., HACKNEY J. F., DIXON J. F., HOKIN L. E., Molecular properties of purified Na,K-ATPase and their subunits from the rectal gland of *Squalus acanthias* and the electric organ of *Electrophorus electricus*, *J. biol. Chem.*, **250**: 4178-4184, 1975.
- [64] POST R. L., MERRIT C. R., KINSOLVING C. R., ALBRIGHT C. D., Membrane ATPase as a participant in the active transport of sodium and potassium in the human erythrocyte, *J. biol. Chem.*, **235**: 1796-1802, 1960.
- [65] QUIGLEY J. P., GOTTERER G. S., Distribution of Na,K-stimulated ATPase activity in rat intestinal mucosa, *Biochim. biophys. Acta*, **173**: 456-468, 1969.
- [66] QUINN D. J., LANE C. E., Ionic regulation and Na,K-stimulated ATPase activity in the land crab, *Cardiosoma guanhum*, *Comp. Biochem. Physiol.*, **19**: 533-543, 1966.
- [67] RATANABANANGKON K., DIXON J. F., HOKIN L. E., Studies on the characterization of the Na, K transport ATPase. XI. Comparison of kinetic properties of the purified with the impure membrane bound enzyme from *Squalus acanthias*, *Archs. Biochem. Biophys.*, **156**: 342-349, 1973.
- [68] ROBINSON J. D., FLASHNER M. S., The Na,K-activated ATPase, *Biochim. biophys. Acta*, **549**: 145-176, 1979.

- [69] ROBINSON J. W. L., MIRKOVITCH V., SEPULVEDA F. V., A comparison of the effects of ouabain and ethacrynic acid on the dog kidney in vivo and in vitro, *Pflügers Arch.*, **371**: 9-18, 1977.
- [70] ROELOFSON B., van DEENEN L. L. M., Lipid requirement of membrane-bound ATPase. Studies on human erythrocyte ghosts, *Eur. J. Biochem.*, **40**: 245-257, 1973.
- [71] SCHARSCHMIDT B. F., KEEFFE E. B., BLANKENSHIP N. M., OCKNEER R. K., Validation of a recording spectrophotometric method for measurement of membrane-associated Mg- and Na,K-ATPase activity, *J. Lab. Clin. Med.*, **93**: 790-799, 1979.
- [72] SCHATZMANN H. J., Herzglycoside als Hemmstoff für den aktiven Kalium und Natrium-transport durch die Erythrocyten Membran, *Helv. physiol. pharmac. Acta*, **11**: 346-354, 1953.
- [73] SCHONER W., von ILBERG C., KRAMER R., SEUBERT W., On the mechanism of Na- and K-stimulated hydrolysis of adenosine triphosphate. 1. Purification and properties of a Na, K-activated ATPase from ox brain, *Eur. J. Biochem.*, **1**: 334-343, 1967.
- [74] SKOU J. C., The influence of some cations on an ATPase from peripheral nerves, *Biochim. biophys. Acta*, **23**: 394-401, 1957.
- [75] SKOU J. C., Enzymatic basis for active transport of Na and K across cell membrane, *Physiol. Rev.*, **45**: 596-617, 1965.
- [76] SKOU J. C., The Na, K-activated enzyme system and its relationship to transport of sodium and potassium, *Q. Rev. Biophys.*, **7**: 401-434, 1975.
- [77] STIRLING C. E., Radioautographic localization of sodium pump sites in rabbit intestine, *J. Cell Biol.*, **53**: 704-714, 1972.
- [78] TANAKA R., SAKAMOTO T., SAKAMOTO Y., Mechanism of lipid activation of Na, K, Mg-activated ATPase and K, Mg-activated phosphatase of bovine cerebral cortex, *J. Memb. Biol.*, **4**: 42-51, 1971.
- [79] TANAKA R., STRICKLAND K. P., Role of phospholipid in the activation of Na,K-activated ATPase of beef brain, *Arch. Biochem. Biophys.*, **111**: 583-592, 1965.
- [80] TELLER J. K., ZIEMNICKI K., OBUCHOWICZ L., The effect of Triton X-100 on cytochrome oxidase activity in carp, frog, and rat liver mitochondria, *Comp. Biochem. Physiol.*, **65B**: 747-750, 1980.
- [81] VERKLEIJ A. J., ZWAAL F. A., ROELOFSON B., COMFURIUS P., KASTELIJN D., van DEENEN L. L. M., The asymmetric distribution of phospholipids in the human red cell membrane, *Biochim. biophys. Acta*, **323**: 178-193, 1973.
- [82] WHITTEMBURY G., PROVERBIO F., Two modes of Na extrusion in cells from guinea pig kidney cortex slices, *Pflügers Arch.*, **316**: 1-25, 1970.
- [83] YODA A., HOKIN L. E., On the reversibility of binding of cardiotonic steroids to a partially purified Na,K-activated ATPase from beef brain, *Biochim. Biophys. Res. Commun.*, **40**: 880-886, 1970.

Otrzymano: 25 maja 1981.

Przyjęto: 16 czerwca 1981.

Adres autora: ul. Fredry 10, 61-701 Poznań.

RECENZJE

D. M. Weir, editor. Handbook of Experimental Immunology.

Blackwell Scientific Publications, Oxford, London, Edinburgh, Melbourne 1979, wydanie 3.

Immunologiczne metody laboratoryjne, początkowo głównie wykorzystywane przez lekarzy dla celów diagnostycznych, coraz częściej są stosowane również w analizie biochemicznej i innych badaniach podstawowych. Zakres i możliwości wykorzystania tych technik zwiększa się przez wprowadzenie coraz to nowych pomysłów. Mimo to techniki te są proste w wykonaniu i najczęściej nie wymagają aparatury specjalistycznej. Trochę cierpliwości i pracy oraz dostęp do zwierząt, u których można produkować przeciwciała, stwarzają niezbędne minimum dla prac metodami immunologicznymi. W ostatnich latach metody te znacznie zyskały na precyzji dzięki opracowaniu metody otrzymywania przeciwciał monoklonalnych. W tej metodzie uczulone antygenem limfocyty hybridyzuje się z komórkami białaczkowymi (szpiczaka), izoluje otrzymane hybrydy i wyprowadza z nich klony w hodowli *in vitro*. Klon komórek zachowujący zdolność do wzrostu u zwierzęcia i wydzielania przeciwciał może w ciągu kilku dni wyprodukować olbrzymią ilość identycznych cząsteczek przeciwciała. Takie monoklonalne przeciwciała umożliwiają, na przykład, precyzyjne określenie subpopulacji różnych komórek (np. limfocytów), określenie podtypów wirusów, dokładne odróżnienie i ilościowe określenie różnych białek w mieszaninie pobranej z próbki płynu tkankowego czy wyciągu z tkanek lub narządu. Znacznie rozszerza to możliwości badawcze i diagnostyczne.

Czasem trudno zorientować się w coraz bardziej rozbudowanych metodach immunologicznych. Podręcznik immunologii doświadczalnej systematyzujący te zagadnienia może stanowić dobry przewodnik. Zadanie to spełnia recenzowany podręcznik pod redakcją D. M. Weira, wykładowcy immunologii Uniwersytetu w Edynburgu. Podręcznik ukazał się w 3 tomach zatytułowanych: immunochemia, odporność komórkowa oraz

zastosowania metod immunologicznych. Jest to dzieło zbiorowe opracowane przez najlepszych specjalistów tematu.

Tom pierwszy jest poświęcony opisom sposobów przygotowania pewnych antygenów, dopełniacza oraz immunoglobulin. Opisano tam również zagadnienia z zakresu immunogenetyki, szczególnie dotyczące badań immunoglobulin człowieka oraz allotypów mysich immunoglobulin. Sporo miejsca zajmuje omówienie metod, w których wykorzystuje się oddziaływanie antygeny z przeciwciałem. Uwzględniono metody radioimmunologiczne, immunofluorescencyjne i metody badania powinowactwa oraz kinetyki oddziaływania antygeny z przeciwciałem, metody immunodyfuzji i immunoelektroforezy. Tom drugi zawiera opis metod izolowania i znakowania limfocytów, rozdzielania subpopulacji tych komórek, sposoby pomiaru stężenia limfokin i reakcji przeszczepu przeciw gospodarzowi. Opisano tam również krótko metodę otrzymywania przeciwciał monoklonalnych. Uwzględniono ponadto metody badania komórek fagocytujących oraz metody immunohistochemiczne, w tym również w zastosowaniu do mikroskopu elektronowego. Tom trzeci zawiera opisy wykorzystania metod immunologicznych w bakteriologii, wirusologii, mykologii, protozoologii oraz helmintologii. Książka zawiera szczegółowy indeks.

Całość jest opracowana bardzo zwięźle. Szereg wyników doświadczeń przedstawiono w formie tabel, wykresów i rycin, dobrze ilustrujących omawiane techniki. Podręcznik wydaje się bardzo pożytecznym dziełem w pracowniach, zakładach i klinikach, a o jego powodzeniu może świadczyć ukazanie się trzech wydań (poprzednie w 1967 i 1973 roku), ostatniego w dwu nakładach.

Jerzy Kawiak

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. Obowiązuje terminologia zgodna z polskim mianownictwem histologicznym, anatomicznym i embriologicznym.

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 maszynopisu. Maszynopis powinien być pisany jednostronnie, z podwójną interlinią, marginesem około 4 cm po lewej stronie oraz ponumerowany. W tekście nie należy robić żadnych podkreśleń na maszynie ani atramentem.

Na pierwszej stronie, przed tekstem, należy podać tytuł pracy w języku polskim i angielskim, pod nim imiona (w pełnym brzmieniu) i nazwiska autorów oraz nazwę zakładu naukowego, w którym autorzy pracują, następnie krótkie streszczenie (ok. 1/2 strony) — również w języku polskim i angielskim. 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, ryc. 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] 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.
- [2] Sachsenmayer W., Remy U., Plattner R., Initiation of synchronous mitosis in *Physarum polycephalum*, Exptl. Cell Res., 73: 41 - 48, 1972.

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 ryciny powinny być dołączone na oddzielnej kartce. Przy załącznikach powinno być podane ich pochodzenie.

Redakcja zastrzega sobie prawo dokonywania skrótów.

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

Artykuły honorowane są według ustalonych stawek, autorzy otrzymują 25 nadbitek 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 I półrocze roku następnego i na cały rok następny,
- do dnia 10 czerwca na II półrocze roku bieżącego.

Jednostki gospodarki uspołecznionej, instytucje, organizacje i wszelkiego rodzaju zakłady pracy zamawiają prenumeratę w miejscowych Oddziałach RSW „Prasa-Książka-Ruch”, w miejscowościach zaś, w których nie ma Oddziałów RSW — w urzędach pocztowych.

Czytelnicy indywidualni opłacają prenumeratę wyłącznie w urzędach pocztowych i u doręczycieli.

Prenumeratę za zleceniem wysyłki za granicę przyjmuje RSW „Prasa-Książka-Ruch”, Centrala Kolportażu Prasy i Wydawnictw, ul. Towarowa 28, 00-958 Warszawa; konto NBP XV, Oddział w Warszawie, Nr 1153-201045-139-11, w terminach podanych dla prenumeraty krajowej.

Prenumerata ze zleceniem wysyłki za granicę jest droższa od prenumeraty krajowej o 50% dla zleceniodawców indywidualnych i o 100% dla instytucji i zakładów pracy.

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, 00-068 Warszawa, 7 Krakowskie Przedmieście, P. O. Box 1001, POLAND.

Payments are to be sent to the account of Ars Polona in Bank Handlowy S. A., 7 Traugutt Street, 00-067 Warszawa, POLAND.

SPIS TREŚCI

A. RATAJSKA i H. MOLAK-OLCZAKOWA, Aparat kurczliwy i cytoszkieletowy komórek mięśni gładkich kręgowców	227
D. KOSK-KOSICKA, Charakterystyka błony komórkowej mięśni szkieletowych	259
E. OLSZEWSKA, Sprzężenie elektromechaniczne w komórce mięśniowej	277
M. KARASEK i P. PEVET, Aspekty ultrastrukturalne procesów wydzielniczych szyszynki ssaków	311
L. GONIAKOWSKA-WITALIŃSKA, Budowa płuc niektórych płazów	329
H. SZARSKI, Ewolucja rozmiarów komórek kręgowców	343
J. K. TELLER, Enzymatyczne podstawy działania pompy sodowej	367
Recenzje	383