

PL ISSN 0324 - 833X

**POLSKIE
TOWARZYSTWO
ANATOMICZNE**

**TOM 10 - NR 3
1983 (157 - 288)**

Postępy Biologii Komórki

PWN - WARSZAWA

<http://rcin.org.pl>

Kwartalnik

Polskiego Towarzystwa Anatomicznego
wydawany z pomocą finansową
Polskiej Akademii Nauk

Redaguje Kolegium

Jerzy KAWIAK, Wincenty KILARSKI, Jan MICHEJDA, Maria OLSZEWSKA

Komitet Redakcyjny

Jadwiga ACKERMAN, Leszek CIECIURA, Antoni HORST, Jerzy KAWIAK,
Wincenty KILARSKI, Jan MICHEJDA, Maria OLSZEWSKA,
Stanisław ZAWISTOWSKI

Adres Redakcji

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

Państwowe Wydawnictwo Naukowe — Oddział we Wrocławiu

Nakład 536 : 94 egz. Ark. wyd. 10,5. Ark. druk. 8,25. Papier druk. sat. III kl. 80 g, 70 × 100 cm.
Oddano do składania 29 IV 1983 r. Podpisano do druku w sierpniu 1983 r. Druk ukończono
w sierpniu 1983 r. Zam. 2186/83. Cena zł 80,—

Wrocławska Drukarnia Naukowa, Wrocław, ul. Lelewela 4

IN SITU HYBRIDIZATION OF DNA SEQUENCES IN HUMAN
METAPHASE CHROMOSOMES VISUALIZED BY FLUORESCENCE
MICROSCOPIC PROCEDURES *

HYBRYDYZACJA IN SITU SEKWENCJI DNA
W CHROMOSOMACH METAFAZOWYCH CZŁOWIEKA
UWIDOCZNIONA METODĄ FLUORESCENCYJNĄ

M. VAN DER PLOEG, P. VAN DULJN, J. G. BAUMAN,
A. C. VAN PROOIJEN-KNEGT

Department of Histochemistry and Cytochemistry, Sylvius Laboratories, Leiden

Summary. A short summary is given of cytochemical procedures which are available now to detect and determine DNA and RNA in cell nuclei and cytoplasm, or in chromosomes. Several of these methods are being used not only for molecular biology research, but also have found recognition as cytodagnostic tools. *Mycosis fungoides* and cutaneous reticulosis for instance can be recognized about 9 to 10 months earlier by cytophotometry of the DNA content of cell nuclei in skin imprint preparations after Feulgen-staining [26].

Special attention is paid to the recently developed hybridocytochemical methods which use fluorochromes instead of radio-isotopes as markers. The results of the in situ hybridization reaction can be observed immediately after the procedure is finished which makes it useful for rapid diagnoses. The high resolving power obtainable by fluorescence microscopy is advantageous and allows a high topological resolution. Reliable quantification of the reaction results is more easily obtainable in this way.

The methods can also be applied in flow cytometry for the detection of specific nucleic acids (e.g. infecting virus or chromosome specific probes) by hybridization in individual cells.

* Streszczenie referatu wygłoszonego na XII Konferencji szkoleniowej zorganizowanej przez Polskie Towarzystwo Anatomiczne, Polskie Towarzystwo Histochemików i Cytochemików, Komisję Hodowli Komórek i Tkanek PAN oraz Redakcję Postępów Biologii Komórki w Warszawie, 11 listopada 1982 r.

Streszczenie. Przedstawiono skrótkowo procedurę cytochemiczną umożliwiającą wykrywanie i bliższą charakterystykę DNA i RNA w jądrach komórkowych i cytoplazmie lub w chromosomach. Niektóre z tych metod mają zastosowanie nie tylko w badaniach z zakresu biologii molekularnej, ale także są wykorzystywane w cytodiaagnostyce. Ziarniniak grzybiasty *Mycosis fungoides* może być np. rozpoznany około 9-10 miesięcy wcześniej przez cytofotometryczne pomiary zawartości DNA w jądrach komórkowych w preparatach odciskowych zabarwionych metodą Feulgena [26].

Szczególną uwagę zwrócono na rozwijane ostatnio cytochemiczne metody hybrydyzacji, w których stosuje się jako markery zamiast radioizotopów — fluorochromy. Wyniki reakcji hybrydyzacji *in situ* mogą być obserwowane bezpośrednio po zakończeniu procedury, co umożliwia szybką diagnozę użyteczną klinicznie. Wysoka zdolność rozdzielcza mikroskopii fluorescencyjnej stanowi dodatkową zaletę tych metod, ponieważ pozwala na dokładną lokalizację. Ponadto metody fluorescencyjne ułatwiają uzyskanie wiarygodnej oceny ilościowej wyników reakcji.

Metody te mogą być również stosowane w cytofotometrii przepływowej do wykrywania specyficznych kwasów nukleinowych (np. infekcji wirusowej albo chromosomów o określonych cechach) drogą hybrydyzacji w pojedynczych komórkach.

INTRODUCTION

Many cytochemical investigations have been devoted to the localization and quantification of nucleic acids. The Feulgen-pararosaniline (SO₂) procedure [9] and the gallocyanin-chrome alum method [20] after much modification and standardization have been of great importance for the process of understanding the role of the cell nucleus. When cytometric equipment became available these reactions have served a. o. to establish the DNA constancy hypothesis [15, 17].

As an example of the accuracy obtainable in this field can be mentioned the research concerning the breaking point in chromosome 22 in cases of chronic myeloid leukemia (CML). More than 90% of the cases of CML are characterized by the presence of a so-called Philadelphia chromosome which is the product of a translocation between chromosomes 22 and 9. Visual examination of the chromosome complements of six patients gave the impression that small differences in the position of the breaking point in chromosome 22 might exist between patients. Measurements of the DNA contents of the chromosomes involved, showed that this translocation involved the same amount of DNA (about 0.04 pg) in the patients measured [12]: an amount which approximates that determined by Mayall et al. [16] for Philadelphia chromosomes of 3 american CML patients.

The introduction of fluorochromes as substitutes for pararosaniline facilitated the measurement of very small amount of DNA in e.g. bacte-

ria or chromosomes, and enabled flow cytometric analysis [24]. Apart from the molecular biological role, the determination of DNA and RNA [7, 18] is used in, for instance, tumour research [4, 34]. Van Vloten et al. [26] used the quantitation of DNA in individual nuclei in imprint preparations of skin biopsy material as a diagnostic tool in cases suspect of cutaneous skin reticuloses. Early stages of mycosis fungoides can be detected by the presence of hypertetraploid nuclei.

Evaluation of response to therapy and prognostic parameters can be obtained by flow cytometry of blood and bone marrow cells of leukemia patients [13].

The cytochemical staining procedures mentioned so far are specific for DNA, but do not distinguish between different types of DNA. The chromosome banding procedure with quinacrine mustard, developed by Caspersson et al. [5], gives an idea about the distribution of guanine-cytosine-rich and adenine-thymine-rich areas. Human metaphase chromosomes, stained under the proper conditions show characteristic fluorescent segments of various degree of brightness. This method — and several others developed shortly afterwards — enabled the unambiguous recognition of each individual type of human metaphase chromosome. It is clear and well-known that these methods have been of paramount importance for the development of cytogenetics.

Modification of Giemsa banding procedures, varying pretreatment or pH of the staining media, produced procedures that allow e.g. detection of human chromosomes in somatic cell hybrids metaphases.

Other cytochemical staining procedures will visualise which segments of chromosomes have incorporated BrdU when this compound was present in the culture medium [14].

IN SITU HYBRIDIZATION

As a main interest of this communication, attention is focussed on the detection of specific DNA or RNA sequences in situ. The only method developed so far to detect specific nucleotide sequences in microscopical preparations is the in situ hybridization or hybridocytochemistry.

This method originally developed by Gall and Pardue [10], uses the property that under standardized conditions nucleotide sequences will more readily hybridize to sequences which are complementary than to other sequences. So far, most experimental work has been performed using radioactively labelled probes [21] which can be obtained using the purified DNA, ^3H nucleotide, triphosphates and DNA dependent polymerase from *E. coli* [11]. After denaturation of the DNA in the mi-

microscopic preparation, tritiated or 125 I iodinated cDNA or cRNA is layered over the preparation at a temperature which is favourable for the hybridization reaction, and after the hybridization procedure, autoradiography will visualize the localization of the specific hybrids.

The procedure has the advantage that it can be used with a high sensitivity. The topological resolution, however, due to the relative thickness of the photographic emulsion, is not always optimal; working with radio-isotopes has its disadvantages, and the visualisation in most cases asks for several days to weeks.

A few years ago, a method was developed in which a fluorochrome molecule is covalently linked to the 3' terminus of the cRNA molecule, after this has been oxidised with NaIO_4 [1]. To determine the optimal ratio of nucleotide length per fluorochrome molecule, Sepharose beads to which DNA was bound were applied as a cytochemical model system. The cRNA in this development stage of the method was also labelled with ^3H to allow fluorometry as well as scintillation counting after the hybridization procedure. Such beads have diameters of 70–120 μm and thus come close to cellular dimensions. They can be hybridised in suspension, spun down on microscopic slides and have the fluorescence emission measured individually together with the diameter of each bead.

The experiments showed that rhodamine-labelled cRNA hybridized only to the homologous DNA—Sepharose, and also that the amount of cRNA bound was linearly related with the amount of DNA bound to the beads. The unmodified Sepharose, added as a carrier, showed no fluorescence at all [2]. With this method (using cRNA of an average length of 50 nucleotides) it proved possible to localise kinetoplast DNA of the hemoflagellate *Crithidia luciliae*; and to detect the presence of adenovirus type 5 in Ad-5 infected KB cells. Rhodamine labelled 5S RNA isolated from *Drosophila hydei* tissue culture cells was found to react with the DNA in band 23B of *D. hydei* polytene chromosomes, as well as with the DNA in band 56F of *D. melanogaster* [3] where the 5S rRNA genes are located [27]. Recently, Van Prooijen et al. [25] were able to modify and optimize a method earlier described by Rudkin and Stollar [19] for the detection of 5S rRNA genes in *Drosophila polytene* chromosomes. Visualisation of the hybrids is achieved by an immunocytochemical procedure using an antiserum specific against RNA-DNA hybrids.

Such antisera can be raised in rabbits by injecting complexes of poly(rA)—poly(dT) and methylated bovine serum albumin. The specificity of the sera obtained was checked using the model system of Sephadex beads to which various nucleic acids had been coupled. The

feasibility of the combination of modified and improved hybridization and immunocytochemical methods, was demonstrated to visualise the 18S and 28S ribosomal cistrons in human metaphase chromosomes. The sensitivity of the cytochemical hybridization procedure with an anti-hybrid serum and rhodamine-labelled goat-anti-rabbit antiserum at the moment seems to be so, that — as about 250 rhodamine molecules per $0.25 \mu\text{m}^2$ are enough to be visualised in the fluorescence microscope — about 2.5×10^3 nucleotides have to be hybridised in that area to allow unambiguous detection.

The procedures using fluorochromes as markers have a higher topological resolution and a lower background than most autoradiographic procedures. This is of special advantage when specific nucleic sequences are to be detected in interphase nuclei. Another advantage of this method is the relative ease with which the amount of RNA hybridized can be quantified by microfluorometry or quantitative photography followed by scanning-densitometry. Differences in the number of 18S genes on the satellites of different chromosomes [8] were for instance easily recognizable in our preparations. The method of Van Prooijen-Knegt, when used for the detection of 18S and 28S ribosomal cistrons, shows a higher sensitivity than those described earlier [2, 3, 19, 23].

The introduction of the relatively simple methods will open new perspectives for a more general use in cell biology and cytodagnosis, similar to the now wide-spread use of immunocytochemical methods for antigens [6]. Especially for the detection of small amounts of virus in cells even under conditions where this is not genetically active and may be without a protein coat, this method seems to offer possibilities, hitherto not routinely applicable.

LITERATURE

- [1] BAUMAN J. G. J., WIEGANT J., BORST P., VAN DUIJN P., A new method for fluorescence microscopical localization of specific DNA sequences by in situ hybridization of fluorochrome-labelled RNA, *Exp. Cell Res.*, **128**: 485–490, 1980.
- [2] BAUMAN J. G. J., WIEGANT J., VAN DUIJN P., Cytochemical hybridization with fluorochrome-labelled RNA. I. Development of a method using nucleic acids bound to agarose beads as a model. *J. Histochem. Cytochem.*, **29**: 227–237, 1981.
- [3] BAUMAN J. C. J., WIEGANT J., VAN DUIJN P., LUBSEB N. H., SONDERMEIJER P. J. A., HENNIG W., KÜBLI E., Rapid and high resolution detection of in situ hybridization to polytene chromosomes using fluorochrome-labelled RNA, *Chromosoma (Berl.)*, **84**: 1–18, 1981.

- [4] BÖHM N., SANDRITTER W., DNA in human tumours: a cytophotometric study, *Curr. Top. Pathol.*, **60**: 151, 1970.
- [5] CASPERSSON T., FARBER S., FOLEY G. E., KUDYNOWSKI I., MODEST E.J., SIMONSSON E., WAGH U., ZECH L., Chemical differentiation along metaphase chromosomes, *Exp. Cell Res.*, **49**: 219–222, 1968.
- [6] COONS A. H., CREECH H. J., JONES R. N., Immunological properties of an antibody containing a fluorescent group, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **47**: 200–202, 1941.
- [7] DARZYNKIEWICZ Z., Acridine orange as a molecular probe in studies of nucleic acids in situ, [In] *Flow Cytometry and Sorting*, eds. M. R. Melamed, P. F. Mullaney, M. L. Mendelsohn, Wiley 1979, 285–316.
- [8] EVANS H. J., BUCKLAND R. A., PARDUE M. L., Location of the genes coding for 18S and 28S ribosomal RNA in the human genome, *Chromosoma*, **48**: 405–426, 1974.
- [9] FEULGEN R., ROSENBECK A., Mikroskopisch-chemischer Nachweis einer Nucleinsäure vom Typus der Thymonucleinsäure und die darauf beruhende Selektive Färbung von Zellkernen in mikroskopischen Präparaten, *Hoppe-Seylers Z.*, **135**: 303–348, 1924.
- [10] GALL J. G., PARDUE M. L., Formation and detection of RNA-DNA hybrid molecules in cytological preparations, *Proc. Natl. Acad. Sci. US*, **63**: 378–383, 1969.
- [11] GALL J. G., PARDUE M. I., Nucleic acid hybridization in cytological preparations, [In] *Methods in Enzymology*, eds. K. Moldave and L. Grossman, Vol. 21, Academic Press, New York 1971, 470–480.
- [12] GERAEDTS J. P. M., VAN DER PLOEG M., DNA measurements of chromosomes 9 and 22 of six patients with t (9; 22) and chronic myeloid leukemia, *Cytometry*, **1**: 152–155, 1980.
- [13] HAANEN C., Limitations and achievements of DNA-flow cytometry in monitoring human leukemias, [In] *Flow Cytometry*, eds. O. D. Laerum, T. Lindmö, E. Thorud, Universitetsforlaget, Bergen—Oslo—Trondheim 1980, 492–498.
- [14] LATT S. A., GEORGE Y. S., GARY J. W., Flow cytometric analysis of bromodeoxyuridine-substituted cells stained with 33528 Hoechst, *J. Histochem. Cytochem.*, **24**: 927, 1977.
- [15] LEUCHTENBERGER C., VENDRELY R., VENDRELY C., A comparison of the content of desoxy ribose nucleic acid (DNA) in isolated animal nuclei by cytochemical and chemical methods, *Proc. Natl. Acad. Sci. US*, **37**: 33, 1951.
- [16] MAYALL B. H., CARRANO A. V., MOORE D. H., ROWLEY J. D., Quantification by DNA-based cytophotometry of the 9q+/22q- chromosomal translocation associated with chronic myelogenous leukemia, *Cancer Res.*, **37**: 3590, 1977.
- [17] PATAU K., SWIFT H., The DNA content (Feulgen) of nuclei during mitosis in a root tip of onion, *Chromosoma (Berl.)*, **6**: 149, 1953.
- [18] RIGLER R., KILLANDER D., BOLUND L., RINGERTZ N. R., Cytochemical characterization of deoxyribonucleoprotein in individual cell nuclei, *Exp. Cell Res.*, **55**: 215–224, 1969.
- [19] RUDKIN G. T., STOLLAR B. D., High resolution detection of DNA.RNA hybrids in situ by indirect immunofluorescence, *Nature*, **265**: 472–473, 1977.
- [20] SANDRITTER W., KIEFER G., Galloxyanin chrome alum, [In] *Introduction to Quantitative Cytochemistry*, ed. G. L. Wied, Academic Press, New York 1966, 295–326.

- [21] STEFFENSON D. M., Human gene localization by RNA:DNA hybridization in situ, [In] *Molecular Structure of Human Chromosomes*, ed. J. J. Yunis, Academic Press, 1977, 59-88.
- [22] STEFFENSON D. M., PRENSKY W., MUTTON D., HAMERTON J. L., Mapping the human 5S RNA genes on chromosome I using translocations, *Cytogenet. Cell Genet.*, **14**: 434-438, 1975.
- [23] STUART W. D., PORTER D. L., An improved in situ hybridization method, *Exp. Cell Res.*, **113**: 219-222, 1978.
- [24] TANKE H. J., VAN INGEN E. M., PLOEM J. S., Acriflavine-Feulgen stilbene staining: a procedure for automated cervical cytology with a television based system (LEYTAS), *J. Histochem. Cytochem.*, **27**: 84-86, 1979.
- [25] VAN PROOIJEN-KNEGT A. C., VAN HOEK J. F. M., BAUMAN J. C. J., VAN DUIJN P., WOOL I. G., VAN DER PLOEG M., In situ hybridization of DNA sequences in human metaphase chromosomes visualized by an indirect fluorescent immunocytochemical procedure, *Exp. Cell Res.*, **141**: 397-407, 1982.
- [26] VAN VLOTEN W. A., SCHABERG A., VAN DER PLOEG M., Cytophotometric studies on mycosis fungoides and other cutaneous reticuloses, *Bull. de Cancer*, **64**: 249-258, 1977.
- [27] WIMBER D. E., STEFFENSON D. M., Localization of 5S RNA genes in *Drosophila* chromosomes by RNA:DNA hybridization, *Science*, N. Y., **170**: 639-641, 1970.

Otrzymano: 20 January 1983.

Przyjęto: 15 February 1983.

*Authors' address: Sylvius Laboratories,
72 Wassenaarsweg, 2333 AL,
Leiden, Holandia.*

GENEZA POTENCJAŁÓW CZYNNOŚCIOWYCH
I ICH PODŁOŻE JONOWE

I. OGÓLNA CHARAKTERYSTYKA POTENCJAŁÓW
CZYNNOŚCIOWYCH W ŚWIETLE BADAŃ PORÓWNAWCZYCH *

ACTION POTENTIALS GENESIS AND THEIR IONIC BASIS
I. GENERAL CHARACTERISTICS OF ACTION POTENTIALS —
A COMPARATIVE STUDY

Maria Jolanta BORKOWSKA

Zakład Fizjologii Zwierząt Instytutu Biologii UMK w Toruniu

Streszczenie. Potencjały czynnościowe w szerokim znaczeniu, tzn. rozumiane jako zjawiska o charakterze depolaryzacyjnym, powstające w błonach elektrycznie pobudliwych i obejmujące tak odpowiedzi iglicowe o charakterze wszystko albo nic, jak i odpowiedzi o charakterze stopniowanym, są powszechnym i istotnym życiowo zjawiskiem fizjologicznym występującym u wszystkich organizmów żywych. Kształt tych potencjałów, jak i udział poszczególnych jonów w ich genezie są bardzo zróżnicowane w zależności od rodzaju tkanki i zwierzęcia czy rośliny poddanych analizie pod tym kątem. Najbardziej rozpowszechnionym i najlepiej poznany mechanizm jonowym, leżącym u podstaw genezy potencjału czynnościowego, jest mechanizm sodowy.

Summary. Action potentials in wide comprehension, i.e. treated as some bioelectric phenomena arising in electrically excitable membrane and including both all or none spike responses and graded ones, seem to be a common and essential for life physiological phenomena occurring in all living organisms. Their shape and ionic basis show great variety depending on kind of tissue and animal or plant taken into consideration. The most widespread and the best known ionic mechanism of action potential genesis is the sodium-dependent one.

WYKAZ SKROTÓW I SYMBOLI

a.m.r.	— aktywna odpowiedź błony (active membrane response)
AP, APs	— potencjał(y) czynnościowy(e) (action potential(s))
4AP	— 4-aminopirydyna

* Praca wykonana w ramach Problemu Międzyresortowego MR/II.

E_m , MP	— potencjał błonowy (membrane potential)
E_K	— potencjał równowagi dla jonów potasowych
g_K	— przewodność błony dla jonów potasowych
P_{Na} , P_K , P_{Ca}	— współczynnik przepuszczalności = stała przenikania, używane również w znaczeniu — przepuszczalność błony, odpowiednio dla jonów sodowych, potasowych i wapniowych
p.s.p.(s.)	— potencjał(y) postsynaptyczny(e) (postsynaptic potential(s))
RP	— potencjał spoczynkowy (resting potential)
TEA	— jon czteroetyloamoniowy

Wiadomo, że podstawowym zjawiskiem elektrycznym występującym we wszystkich komórkach organizmów żywych jest potencjał błonowy, czyli różnica potencjałów, jaka istnieje między środowiskiem wewnątrzkomórkowym a środowiskiem zewnątrzkomórkowym. W ramach zjawiska określanego mianem potencjału błonowego można wyodrębnić potencjał spoczynkowy i czynnościowy w najszerszym znaczeniu [146]. Celem niniejszego artykułu nie będzie omawianie podstaw genezy potencjału spoczynkowego, co można znaleźć w wielu pracach doświadczalnych (m.in. [93, 143, 168]) oraz artykule przeglądowym [24] i pracy doktorskiej autorki [25], lecz próba wyjaśnienia mechanizmu powstawania potencjału czynnościowego w rozmaitych komórkach zwierząt stojących na różnym szczeblu rozwoju ewolucyjnego. Istnienie spoczynkowej różnicy potencjałów, utrzymującej komórki w stanie spolaryzowania, jest oczywiście warunkiem nieodzownym do powstawania czynnościowych zjawisk bioelektrycznych w komórkach pobudliwych [95]. U podstaw powstawania tych zjawisk leży zmiana stanu spolaryzowania komórki. Wiadomo, że pod wpływem różnych czynników MP podlega pewnym wahaniom, a jego bezwzględne wartości mogą wzrastać, zwiększając stan spolaryzowania błony (hiperpolaryzacja) lub zmniejszać (depolaryzacja) [95, 146].

Powszechnie znaną, wspólną cechą fizjologiczną komórek i tkanek każdego żywego organizmu — tak roślinnego [2, 28, 123, 147], jak i zwierzęcego [48, 103, 111, 169] — jest zdolność reagowania na zmiany otoczenia, a więc działanie różnego rodzaju bodźców, czyli pobudliwość, która najsilniej jest rozwinięta u zwierząt, u których specjalne, zróżnicowane komórki tkanki nerwowej są zdolne do szybkiego i specyficznego reagowania na bodźce, czyli sygnały o zmianach środowiska zewnętrznego lub wewnętrznego [49]. Aktywność różnych rodzajów komórek ustroju wygląda bardzo różnie, szczególnie w zmiennych warunkach. Pobudliwość jest jedną z najważniejszych funkcji życiowych organizmów żywych. Przedmiotem tego artykułu będą jednakże czynnościowe właściwości tylko tych komórek, w których przechodzenie ze stanu spoczynku do stanu pobudzenia odbywa się w sposób gwałtowny, niejako wy-

buchowy (określenie to jest jednak nieprecyzyjne, jeśli chodzi o niektóre komórki pobudliwe bezkręgowców). Komórki takie wchodzą w skład tych narządów (przede wszystkim układu nerwowego i mięśni szkieletowych), od których zależą szybkie i ważne życiowo reakcje organizmu na zaistniałe zmiany tak wewnętrznego, jak i zewnętrznego środowiska [111].

Podstawową, pierwotną reakcją komórki na bodziec jest przejście jej w stan pobudzenia. Zjawisko pobudzenia jest ściśle związane z modyfikacją potencjału bioelektrycznego, jego podłożem morfologicznym jest zatem błona komórkowa i ewentualnie system błon wewnątrzkomórkowych [111]. W organizmach złożonych informacja o bodźcu, tj. takiej zmianie środowiska, która może wywołać pobudzenie komórki, jest przenoszona za pośrednictwem zróżnicowanych i wyspecjalizowanych komórek pobudliwych, które są zdolne do generowania, magazynowania i uwalniania energii elektrycznej — neuronów [41, 169]. Wiadomo jednak, że nawet organizmy jednokomórkowe reagują na stymulację lokalną i dają odpowiedzi, które nie są konieczne ograniczone do punktu stymulacji [41, 44, 53, 103, 169]. U tych zwierząt prawdopodobnie cała powierzchnia błony jest wrażliwa na różnego rodzaju bodźce, chociaż pewne określone części błony u niektórych pierwotniaków mogą wykazywać zwiększoną pobudliwość na specyficzne bodźce [53]. W ostatnich latach wykazano, że podstawy fizykochemiczne recepcji i przenoszenia informacji u tych zwierząt są identyczne, jak u zwierząt wielokomórkowych [53, 169]. Podobnie zresztą wygląda sytuacja u roślin [147]. Rozprzestrzenianie się pobudzenia może być zatem uznane za powszechną cechę żywych tkanek [41]. Informacja, której podłożem są zjawiska bioelektryczne, rozchodzi się dzięki gwałtownym, krótkotrwałym zmianom polaryzacji powierzchniowej błony komórkowej. Zmiana ta, czyli stan czynny (pobudzenie), zapoczątkowuje falę pobudzenia, która dzięki przewodności błony komórkowej przesuwa się wzdłuż powierzchni komórki nerwowej czy mięśniowej. Ta przesuwaną się falę pobudzenia nosi nazwę impulsu, który powstaje pod wpływem działania określonych bodźców [49, 111]. Depolaryzacyjny AP jest zjawiskiem elektrycznym o zasadniczym znaczeniu w procesie pobudzania elementów komórkowych i przenoszenia informacji w obrębie układu nerwowego.

Proces pobudzenia zachodzący w błonie komórkowej prowadzi dopiero wtórnie do uruchomienia czynności swoistej dla danej komórki, np. w zakończeniach nerwowych do wydzielania specyficznych substancji czynnych, a w komórkach mięśniowych do skurczu [111]. Typy reakcji na bodźce są bardzo różnorodne, w zależności od rodzaju tkanek, zwanych efektorami, w których te reakcje powstają [49].

Jak i dlaczego błona pobudliwa, jaką posiada np. akson, reaguje na bodźce, intrygowało badaczy przez ostatnie 150 lat lub dłużej. Bardzo wcześnie stwierdzono, że akt czynnościowy komórek ma charakter elektryczny [111], ale szczegółowe jego badanie i względnie nie zniekształcone zapisywanie AP stało się możliwe dopiero po określeniu wewnątrzkomórkowych stężeń jonów (według [99]) i wykonaniu wewnątrzkomórkowych elektrod o wysokiej impedancji oraz odpowiedniej aparatury, co było konieczne, głównie ze względu na nieznaczne zmiany potencjałów (mV) i krótkotrwałość występujących zjawisk (ms) [4z, 77, 131].

Stwierdzono, że w momencie pobudzenia komórki następuje przejściowe i gwałtowne odwrócenie potencjału błonowego (polaryzacji) z ujemnego na dodatni (ryc. 1) [60, 77, 111]. Zmiany elektryczne związane z pobudzeniem komórki nazwano prądami lub potencjałami czynnościowymi [111]. Praktycznie wszystkie różnice potencjałów elektrycznych w komórkach pobudliwych są związane z istnieniem gradientów stężeń jonowych, a tam gdzie występują te gradienty, będą występowały ruchy jonów [4, 88, 169]. Różnice potencjałów są rozładowywane, gdy jony poruszają się zgodnie z ich gradientem stężeń. Zostają one ponownie przywrócone przez pompę jonową, której zadaniem jest utrzymanie gradientu stężeń dla jonów [169]. Przesunięcia jonowe, tj. prądy jonowe niosące ze sobą ładunki elektryczne, powstają w czasie pobudzenia na skutek zmian (zależnej od wartości MP, ale i od czasu) przewodności błony dla poszczególnych jonów [112]. Tak więc prądy elektryczne w komórkach pobudliwych są prądami jonowymi. Sytuacja ta jest przeciwieństwem przewodnictwa elektrycznego w jakimś obwodzie elektronicznym połączonym z baterią, gdzie potencjał baterii indukuje przepływ elektronów, a nie całych jonów [88, 112, 169]. Ostatnio okazało się jednak, że gradient jonowy przez błonę nie jest konieczny, aby uzyskać AP, gdyż Terakawa [159, 160] stwierdził obecność APs (przypisywanych aktywności kanałów potasowych lub kanałów jonów dwuwartościowych wrażliwych na 4AP [160]) w postaci odpowiedzi oscylacyjnych w aksonach kałamarnicy, których wewnątrz- i zewnątrzkomórkowe środowisko składało się z 12% glicerolu i soli tylko jednego, takiego samego kationu (Co, Mn, Ni lub Ba) i to w takich samych stężeniach po obu stronach błony. Używał on soli kationów dwuwartościowych, gdyż ich obecność w środowisku zewnątrzkomórkowym niezbędna jest dla utrzymania pobudliwości [35, 99, 157]. Podobne wyniki uzyskiwano w przypadku badań niektórych sztucznych błon modelowych (proponowanych jako model błony neuronu) umieszczanych również pomiędzy roztworami zawierającymi tylko jeden rodzaj soli (według [159, 160]). Takie skrajne uproszczenie warunków doświadczalnych pomaga w pełniejszym zrozumieniu fizykochemicznych aspektów aktywności podob-

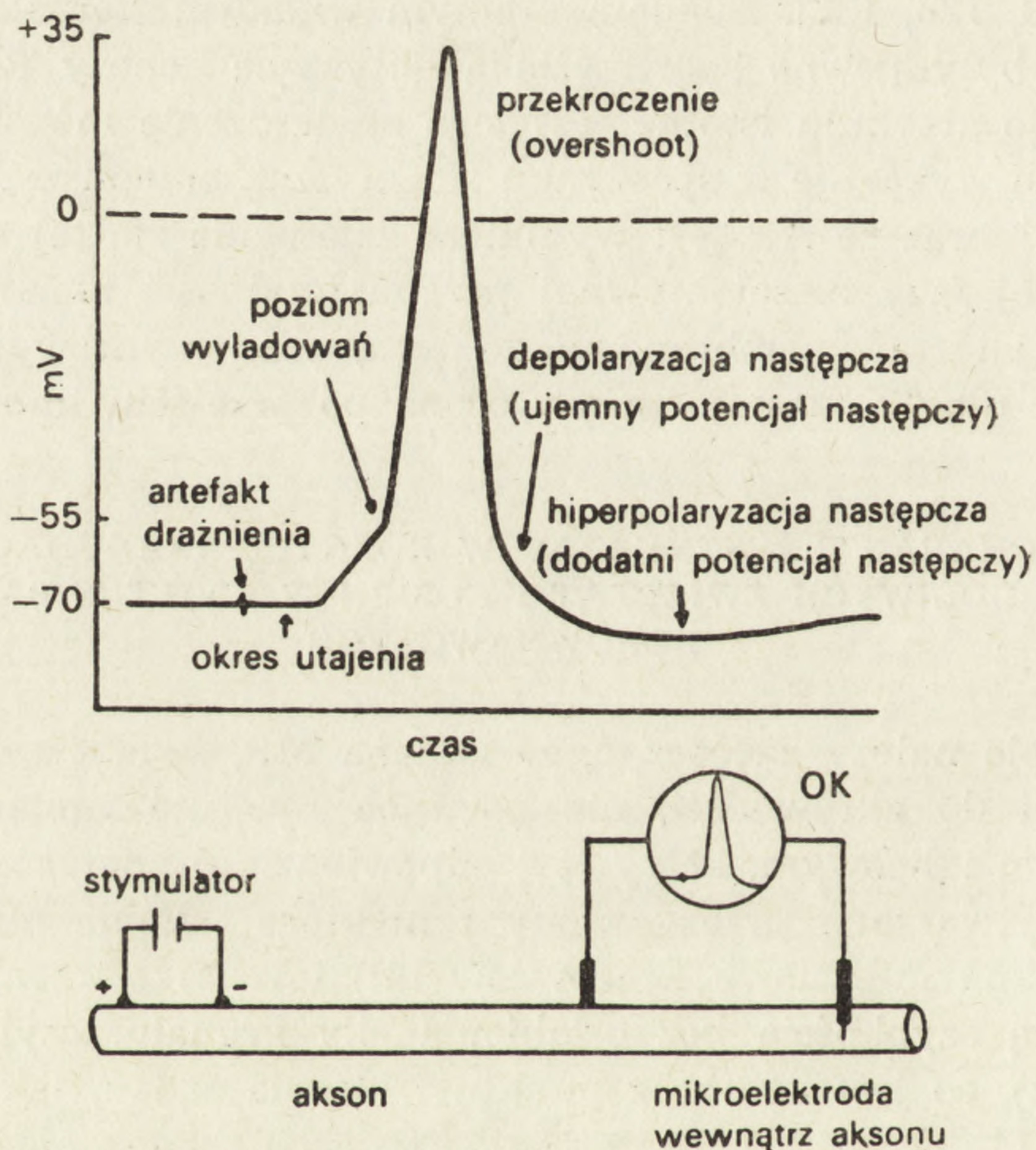
nej do nerwowej, ale jednocześnie zaciemnia znaczenie takiej błony jako modelu pobudliwych błon biologicznych. Dlatego też przedstawione próby badawcze Terakawy [159, 160] spełniają rolę wypełniającą prawdopodobnie lukę pomiędzy badaniami sztucznych błon i badaniami błon biologicznych funkcjonujących w normalnych warunkach jonowych.

W pierwszym 10-leciu tego wieku, dzięki serii pionierskich badań, ustalono ponad wszelką wątpliwość, że rozmieszczenie jonów było włączone w generowanie aktywności elektrycznej w komórkach pobudliwych [22, 23, 128, 132]. Fundamentalnym wkładem Bernsteina do elektrofizjologii były pewne spostrzeżenia dotyczące genezy RP. Z punktu widzenia tego artykułu istotne jest jego stwierdzenie mówiące, że błona plazmatyczna wykazuje w spoczynku selektywną przepuszczalność w stosunku do K^+ oraz że AP jest wynikiem załamania się tej selektywności i przejściowej fazy nieselektywnej przepuszczalności błonowej, redukującej potencjał transmembranowy do zera, przy czym wyjściowa przepuszczalność dla K^+ zostaje przywrócona po przejściu impulsu [22, 23].

1. OGÓLNA CHARAKTERYSTYKA AP W RÓŻNYCH RODZAJACH KOMÓREK POBUDLIWYCH ZWIERZĄT I ROŚLIN W ŚWIETLE BADAŃ PORÓWNAWCZYCH

Na wstępie należy zaznaczyć, że zmiana MP, świadcząca o pobudzeniu komórki do aktywności, nie powinna być utożsamiana wyłącznie z potencjałem iglicowym, który jest odpowiedzią o charakterze wszystko albo nic, wytwarzaną przez aksony i niektóre włókna mięśniowe (np. szybkie włókna mięśniowe kręgowców [4]) i rozprzestrzeniającą się na ogół ze stałą szybkością bez osłabienia siły sygnału, czyli bez dekrementu (strat), co jest istotne z punktu widzenia zadań, jakie ten potencjał spełnia [4, 95, 101, 111, 146, 168]. APs tych tkanek mogą obejmować potencjały następcze, jak również iglice (ryc. 1). Zwykle szybki wzrost i spadek potencjału, ze względu na kształt rejestrowanych zmian określa się potencjałem iglicowym, a z kolei wolniejszy spadek depolaryzacją następczą lub ujemnym potencjałem następczym, trwającym średnio około 4 ms w przypadku neuronu. Jeśli po osiągnięciu wyjściowego poziomu spoczynkowego linia zapisu potencjału przekracza go nieco w kierunku hiperpolaryzacji, dając niewielką (zwykle 1–2 mV), lecz o przedłużonym czasie trwania (około 35–40 ms) hiperpolaryzację, nazywa się ją hiperpolaryzacją następczą lub dodatnim potencjałem następczym. Całość opisywanych zmian potencjału określa się mianem potencjału czynnościowego o bardzo różnym czasie trwania w różnych rodzajach komórek, bo od 0,4 do 200 i więcej ms [60, 65, 88, 99, 111, 112, 146]. Powodem paradoksalnej tradycyjnej nomenklatury potencjałów następ-

czych (tj. dodatnie i ujemne) jest fakt, że po raz pierwszy były one zarejestrowane za pomocą elektrod zewnątrzkomórkowych, które mierzyły potencjał na zewnątrz błony aksonu, a nie wewnątrz, tak że kierunki wszystkich zmian tego potencjału były odwrócone (według [4]). Potencjały następne mogą ulegać zmianom bez równoczesnych zmian w pozostałych częściach AP. Wydaje się więc, że potencjały te są raczej przejawem procesu odnowy, np. neuronu, a nie są odpowiedzialne za iglicową część AP [60].



Ryc. 1. Iglicowy potencjał czynnościowy rejestrowany elektrodą wewnątrzkomórkową (według [60])

W wielu typach włókien mięśniowych bezkręgowców, głównie owadów, wywołany stymulacją elektryczną AP jest odpowiedzią stopniowaną, a więc zwiększa on swą amplitudę wraz ze wzrostem bodźca i nie posiada zdolności rozprzestrzeniania się bez strat [65, 88, 93, 130, 168]. Aktywność tych włókien mięśniowych wywołana stymulacją pośrednią może być pewną kombinacją p.s.p. błony niepobudliwej na bodźce elektryczne i odpowiedzi stopniowanej błony elektrycznie pobudliwej. Ta kombinacja często daje w wyniku potencjał, który przypomina kształtem typowy potencjał iglicowy [37, 65]. Pewne wyjaśnienie odpowiedzi stopniowanych elektrycznie pobudliwej błony włókien mięśniowych owa-

dów zostało zaproponowane przez Wermana i wsp. [178]. Sugerowali oni, że jeśli przepuszczalność dla K^+ w spoczynku była dostatecznie wysoka lub jeśli wzrost P_K wywołany stymulacją elektryczną występował dość wcześnie, dając w wyniku niekompletne wyrażenie się aktywacji sodowej, to odradzająca się odpowiedź depolaryzacyjna, inicjowana przez dokomórkowy ruch Na^+ lub jakiegokolwiek innego jonu, wytwarzałyby tylko silnie stłumioną odpowiedź. Szczyt depolaryzacyjnych odpowiedzi stopniowanych niekoniecznie odpowiada potencjałowi równowagi dla jonu czy jonów, odpowiedzialnych za depolaryzującą elektrogenezę. Nazwa potencjału czynnościowego nie jest precyzyjna i budzi dyskusje. Przyjmujemy definicję, która dopuszcza tak odpowiedzi stopniowane, jak i podlegające prawu wszystko albo nic, czyli takie, które w danej komórce występują zawsze w nie zmienionej postaci, jeśli bodziec przekracza poziom progowy (poziom depolaryzacji krytycznej) [60, 99, 111]. Jest to więc definicja AP znacznie zawężona w stosunku do proponowanej w klasyfikacji elementarnych zjawisk bioelektrycznych przez Bullocka [32], który do APs zalicza wszelkie zjawiska będące „wyjściem” ze stanu spoczynkowego, a bardziej pokrywa się z tym, co Grundfest [65, 66] w swojej klasyfikacji ujął pod pojęciem zjawisk bioelektrycznych zachodzących w obszarze błony elektrycznie pobudliwej i to zjawisk głównie o charakterze depolaryzacyjnym.

Według definicji AP jest nagłym, krótkotrwałym (bo trwającym zwykle zaledwie kilka ms) zaburzeniem porządku jonowego panującego w komórce, będącej dotychczas w stanie spoczynku. Zaburzenie to powstaje jako skutek działania adekwatnego bodźca i zwykle rozprzestrzenia się wzdłuż błony mięśniowej czy też nerwowej [41, 165]. Podczas trwania AP polaryzacja błony zostaje zniesiona, a nawet na krótko odwrócona [7, 8, 54, 60, 77, 111].

AP jest obecnie dobrze znanym wyrażeniem aktywności nerwowej czy mięśniowej powstającej w wyniku przepływów jonów przez błonę komórkową. Najpierw, w czasie depolaryzacji, występuje przejściowy, szybki i wysoce selektywny wzrost przewodności dla Na^+ (określany jako aktywacja sodowa, trwająca około 0,5 ms), prowadzący do napływu jonów Na do wnętrza komórki zgodnie z ich gradientem elektrochemicznym, po którym, w czasie repolaryzacji, następuje szybkie obniżenie P_{Na} i zanik prądu sodowego (inaktywacja sodowa) oraz stosunkowo wolny, opóźniony wzrost P_K (aktywacja potasowa) [76, 78, 95, 112, 168, 169]. Jeśli błona w spoczynku jest czystą elektrodą potasową, wówczas repolaryzacja związana z aktywacją potasową przywraca MP do jego poziomu spoczynkowego, ale jeśli w niektórych komórkach E_m jest mniej ujemny niż E_K , wówczas może wystąpić faza hiperpolaryzacji następującej, zanim stan spoczynkowy ustali się na nowo [78]. Przypuszcza się

też, że wzmożona aktywność pompy jonowej usuwającej Na^+ może odpowiadać za ten potencjał [60, 111]. Proces inaktywacji sodowej wraz z procesem aktywacji potasowej odpowiadają za okres niepobudliwości błony (tj. niezdolności do odpowiadania przez pewien czas na bodźce potencjałem iglicowym) [78]. Przepływy jonowe są kierowane przez gradienty stężeń, utrzymywane przez energię metaboliczną. Powstaje jednak problem, jak to źródło energii potencjału nagle staje się efektywne i jaki jest mechanizm molekularny leżący u podstaw obserwowanych zmian przepuszczalności.

Wcześniejsze spekulacje na temat AP znalazły, jak wspomniano, potwierdzenie dzięki zapisom wewnątrzkomórkowym z różnych komórek pobudliwych i dzięki nim zyskujemy coraz więcej danych na ten temat. Pierwsze badania za pomocą mikroelektrod wykonano używając aksonów głowonogów [77, 79]. W ślad za tym poszły badania innych tkanek — pierwsze badania pojedynczych włókien mięśniowych [113, 127], motoneuronów ssaków [29], ropuchy [6], komórek zwojowych bezkręgowców [158], rdzennych włókien nerwowych [89] oraz wielu innych preparatów. Ostatnie badania mikroelektrofizjologiczne wielu rodzajów komórek wykazały m.in., że odpowiedzi błon elektrycznie pobudliwych wykazują dużą zmienność. Kinetyka różnych procesów biorących udział w elektrogeniezie może także się różnić, tak że niektóre komórki wytwarzają krótkie iglice, w innych iglice są przedłużone, podczas gdy w jeszcze innych komórkach odpowiedzi są raczej stopniowane niż typu wszystko albo nic [65]. Odpowiedź stopniowana może być przekształcana w pewnych warunkach w aktywność wszystko albo nic [136, 166, 168, 173, 178, 183] na skutek zmniejszenia lub bloku aktywacji potasowej, zmniejszenia lub bloku inaktywacji sodowej, czy zwiększenia aktywacji sodowej lub też różnych kombinacji tych zmian, a potencjały iglicowe mogą z kolei być przekształcane w czynnościowe odpowiedzi stopniowane (według [65]). Czas trwania i kształt potencjałów iglicowych może ulegać modyfikacji na skutek działania wielu rozmaitych czynników, a w niektórych komórkach zmiany te mogą występować spontanicznie. Ponadto istnieją potencjały iglicowe, które mogą powstawać bez udziału Na^+ ([10, 11, 105, 159, 160, 185] i według [65, 88, 99]).

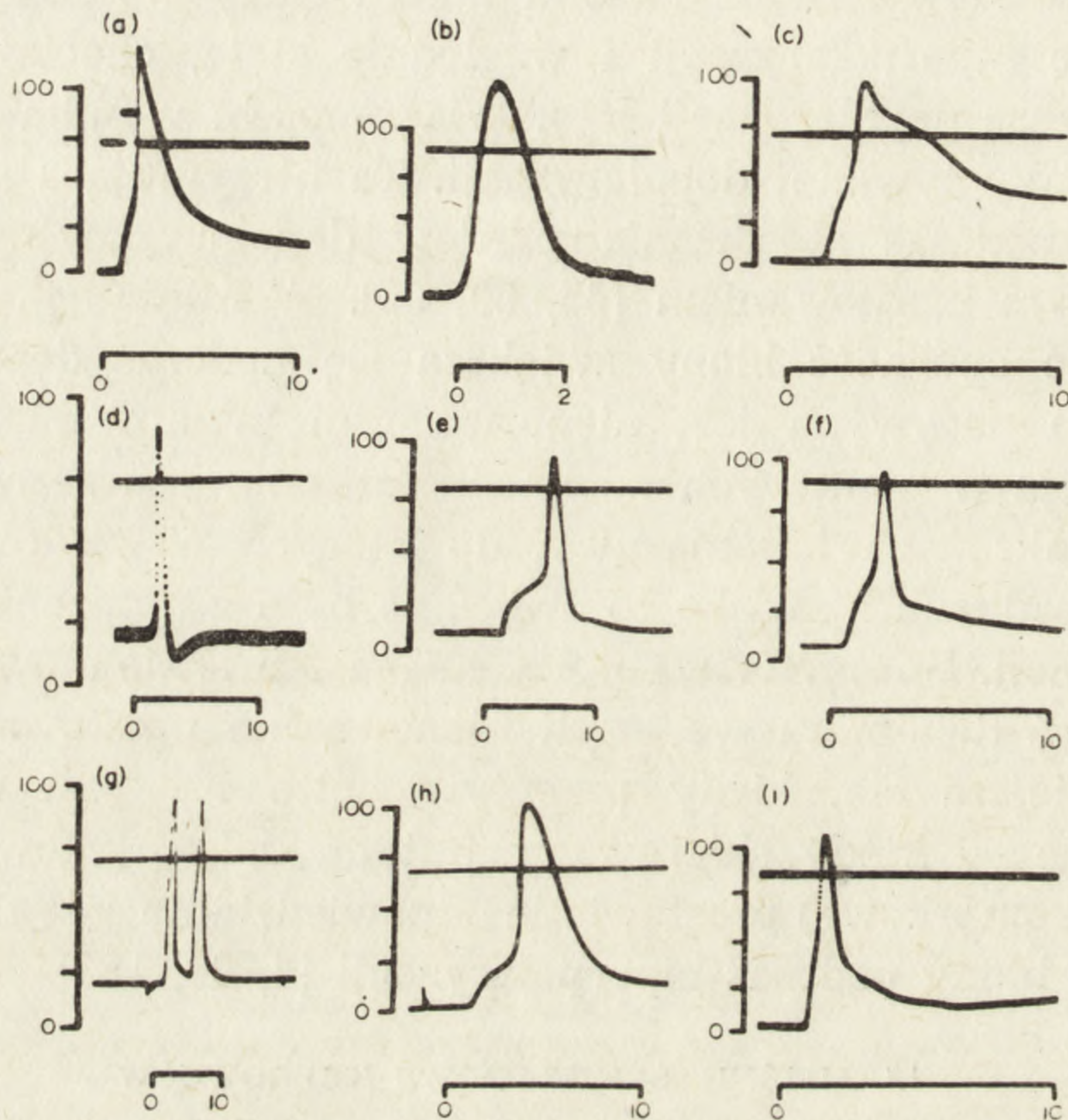
Prawie wszystkie komórki pobudliwe wykazują pewien rodzaj prostowania w określonych przedziałach MP. Terminem prostownicze właściwości błony lub po prostu prostowaniem określamy reakcje błony, które powodują odchylenia od liniowej zależności pomiędzy zastosowanym prądem a MP. Mogą one w efekcie powodować elektrogenezę o jakimkolwiek znaku lub nie powodować jej wcale. W błonach elektrycznie pobudliwych prostowanie może objawiać się tak przez zmniejszenie przewodności, jak i jej zwiększenie, a oba te zjawiska mogą być powo-

dowane tak przez prądy hiperpolaryzacyjne, jak i depolaryzacyjne. W błonach elektrycznie niepobudliwych nie obserwuje się prostowania czy nieliniowości innych typów [65, 99]. W większości komórek pobudliwych oporność nie jest stała, lecz raczej zmienia się wraz ze zmianą MP. Przykładowo, błona aksonu kałamarnicy wykazuje stałą oporność w czasie hiperpolaryzacji i względnie stałą, chociaż dużo niższą, oporność podczas depolaryzacji [80]. Wiadomo, że wynika to ze wzrostu g_K podczas utrzymywanej depolaryzacji. Ta utrzymująca się zwiększona przewodność podczas stosowania prądów depolaryzacyjnych określana jest opóźnionym prostowaniem [65, 80, 99]. W mięśniach szkieletowych żaby jednakże oporność błony zwiększa się podczas depolaryzacji [3]. Właściwość ta nazywana jest nienormalnym prostowaniem i obserwowana jest także w niektórych włóknach mięśniowych serca (według [88, 99]) oraz w aksonach kałamarnicy, do których wstrzyknięto TEA [9]. W tych przypadkach zjawisko to związane było z obniżeniem g_K w czasie depolaryzacji. Spoczynkowa g_K w mięśniach szkieletowych żaby wykazuje również dokomórkowe, czyli nienormalne prostowanie. Przewodność ta zmniejsza się, kiedy przepływ netto K^+ jest odkomórkowy, a zwiększa się — kiedy skierowany jest on dokomórkowo [3, 4]. Nienormalne (dokomórkowe) prostowanie odpowiedzialne jest także za wzrost przewodności błony podczas hiperpolaryzacji [3, 65, 155].

1.1. MIĘŚNIE SZKIELETOWE KRĘGOWCÓW

Zapisy pokazane na rycinie 2 są reprezentacyjnym przykładem APs z rozmaitych preparatów włókien mięśniowych różnych kręgowców, które były badane w ostatnich latach. APs tych włókien mięśniowych są dość jednolite, jeśli chodzi o kształt i ogólną charakterystykę, wykazując niewielką zmienność w obrębie poszczególnych włókien jednego mięśnia czy pomiędzy gatunkami. W znacznej większości szybkich mięśni szkieletowych kręgowców wielkość AP o charakterze wszystko albo nic przewyższa wielkość RP, dając wyraźne dodatnie przewyższenie (overshoot) [4, 47, 56, 59, 68, 69, 88]. Stwierdzono jednak występowanie pewnych istotnych różnic w rozmiarach tego przewyższenia między gatunkami, których nie ma już pomiędzy indywidualnymi włóknami tego samego mięśnia. Przykładowo, we włóknach szybkich mięśni szkieletowych żaby wielkość przewyższenia zmienia się od 30 do 50 mV, co może stanowić do 40% wielkości AP [59, 110], podczas gdy u ryb kostnoszkieletowych wielkość średniego AP włókien mięśni szkieletowych zwykle nie przekracza wielkości średniego RP, chociaż przypadkowo może w jakimś włóknie pojawiać się AP z małym przewyższeniem, do około 10 mV [47, 69]. Podobne APs, wielkości około 150 mV, rejestrowane były również w płytkach elektrycznych, które są zmodyfikowanymi ko-

mórkami mięśniowymi [4, 102]. Znaczne różnice są też widoczne w szybkości narastania AP włókien mięśniowych kręgowców, przy czym waha się ona od poniżej 100 V/s w niektórych mięśniach ryb [69] nawet do powyżej 700 V/s w mięśniach żaby [110] i świnki morskiej [56]. Czas



Ryc. 2. Typowe potencjały czynnościowe rejestrowane z rozmaitych włókien mięśni szkieletowych różnych kręgowców (według [88]); (a) żaba, (b) świnka morska, (c) żółw, (d) gołąb, (e) ryba chrząstnoszkieletowa *Taeniura*, (f) węgorz elektryczny, (g) lancetnik, (h) jaszczurka, (i) sum. Górna linia pozioma odpowiada potencjałowi 0, dolna linia odpowiada potencjałowi spoczynkowemu. Kalibracja jest wyrażona w mV i ms

trwania AP jest raczej krótki i waha się na ogół od około 1 do 5 ms [56, 69, 88, 111], z wyjątkiem miotomów lancetnika, gdzie AP trwa aż 10 ms [68]. Toniczne włókna mięśniowe są zazwyczaj elektrycznie niepodobne, np. u płazów, i charakteryzują się multiterminalnym unerwieniem [106, 107]. U ptaków również występują dwa typy włókien mięśniowych, odpowiednio, z uniterminalnym i multiterminalnym unerwieniem, ale te posiadające unerwienie multiterminalne są elektrycznie pobudliwe i mogą wytwarzać rozprzestrzeniające się APs [4, 62].

1.2. MIĘŚNIE SZKIELETOWE ZWIERZĄT BEZKRĘGOWYCH

Jeśli chodzi o badania dotyczące bezkręgowców, to całe typy zwierząt (np. robaki płaskie, półstrunowce) nie były badane, podczas gdy mnóstwo jest danych dotyczących stawonogów, a szczególnie skorupia-

ków i owadów. Ogólnie jednak wiadomo, że elektrochemia komórek mięśniowych i nerwowych bezkręgowców jest bardziej zróżnicowana w porównaniu ze względną jednorodnością obserwowaną u kręgowców [88, 168].

Jednym ze stojących najniżej w ewolucji zwierząt, u których zarejestrowano AP, jest *Cestum*, jamochłon z gromady żebroplawów. APs wielkości 20–30 mV były obserwowane w jego komórkach mięśniowych, jako zjawisko poprzedzające każde uderzenie rzęskowe [81].

Prawie wszystkie komórki mięśniowe nicieni charakteryzuje spontaniczna, rytmiczna aktywność [42, 96, 176], na którą składają się fale wolne, obejmujące 2 lub 3 oddzielne fale (wielkości 5–20 mV, o czasie trwania aż do 1000 ms i będące prawdopodobnie normalnymi p.s.p.s.), na które nałożona może być szybka odpowiedź iglicowa, generowana oczywiście przez te wolne fale po przekroczeniu przez nie krytycznego progu wyładowań [42]. Weisblat i wsp. [176] stwierdzili istnienie, poza dwoma wymienionymi rodzajami aktywności spontanicznej, trzeciego typu aktywności — długo trwających (3–20 s) modulacji wyładowań (cykliczne zmiany poziomu aktywności). Nie stwierdzono ponadto żadnej korelacji pomiędzy amplitudą potencjałów spontanicznych a wartością RP komórki [42]. Potencjały iglicowe obserwowane u nicieni różnią się jednak znacznie od tradycyjnie pojmowanych potencjałów iglicowych typu wszystko albo nic w mięśniach kręgowców, ponieważ ich amplituda i czas trwania są bardzo zmienne, tak w różnych komórkach, jak i w przypadku kolejnych odpowiedzi uzyskanych z tej samej komórki, a poza tym potencjały te bardzo rzadko przewyższają poziom 0 mV o około 5–10 mV maksimum [42, 176]. U glisty, *Ascaris*, iglicopodobne odpowiedzi przypominają bardziej odpowiedzi stopniowane wielu włókien mięśniowych skorupiaków [13] niż szybkie iglice typu wszystko albo nic w większości ekstrafuzalnych włókien mięśni szkieletowych kręgowców [75]. Ponadto szybkość narastania iglicy jest zwykle wolniejsza niż szybkość opadania, co jest raczej zaskakujące [42]. Dodatkowym czynnikiem komplikującym jest tutaj fakt, że wysokość iglicy i jej czas trwania mogą zmieniać się w zależności od położenia komórki w ciele i pozycji elektrody, np. większe i szybsze iglice są rejestrowane ze środkowej części komórki (według [88]). Spontaniczne potencjały komórek mięśniowych *Ascaris* wydają się neurogeniczne, związane ze spontaniczną, rytmiczną aktywnością w pniu nerwowym [42, 88].

Bardzo mało wiadomo o elektrogenizie AP w mięśniach nicieni i ponieważ wydaje się, że żadne doświadczenia z zastępowaniem Na^+ nie zostały wykonane, trudno jest nawet spekulować co do natury p.s.p.s. (fale wolne) czy iglic. Potencjały hamulcowe mogą być prawdopodobnie zależne od jonów Cl [46, 88].

U niektórych innych bezkręgowców, do grupy których należą pierścienice (skąposzczety i pijawki), we włóknach mięśniowych występują spontaniczne potencjały iglicowe złożonego kształtu (o średniej częstotliwości 2–3/s), bez fal wolnych, o amplitudzie około 30–50 mV, co jest związane z niskim RP, ze słabiej lub silniej zaznaczonym przewyższeniem (3–18 mV) i bardzo dużym, przedłużonym hiperpolaryzacyjnym potencjałem następczym (12–25 mV) [38, 72, 175], co przedłuża czas trwania AP czasami aż do około 30 ms [72, 175]. Potencjały te charakteryzują się dodatkowo obecnością większego lub mniejszego wolnego potencjału poprzedzającego (5–15 mV) [38, 175], podobnego do potencjału generatorowego czy rozrusznikowego w niektórych komórkach mięśniowych, np. serca motyli [117] czy patyczaka [122] oraz mięśniach gładkich kręgowców [26]. Czasami obserwuje się też pomnożenie iglic [175]. Spontaniczne wyładowania w mięśniach pierścienic na ogół są pod czysto miogeniczną kontrolą [88].

Największą chyba zmienność APs obserwuje się u stawonogów, co związane jest z tym, że większość mięśni tych zwierząt ma polineuralne i multiterminalne unerwienie [61, 88, 135, 140, 141, 170, 179], w rezultacie czego następuje sumowanie się w tych mięśniach pobudzenia dostarczanego przez poszczególne nerwy [61, 141]. W wielu mięśniach stawonogów błona komórkowa jest pobudliwa elektrycznie, tak że odpowiedzi na stymulację nerwową mogą wyglądać bardzo podobnie do odpowiedzi rejestrowanych przy połączeniu nerwowo-mięśniowym szybkich włókien kręgowców (ryc. 3a) [4, 167]. Po dokładniejszych badaniach stwierdzono jednak, że te elektrycznie pobudzone odpowiedzi nie są żadnymi rozprzestrzeniającymi się APs typu wszystko albo nic, ale odpowiedziami stopniowanymi, których wielkość jest z grubsza proporcjonalna do początkowej depolaryzacji [4, 73, 137, 167, 168, 182]. Pod tym względem odpowiedzi te są podobne do podprogowych, lokalnych odpowiedzi aksonów nerwowych i być może w związku z ich stopniowaną naturą, potencjały te rozprzestrzeniają się z dekrementem [45].

U pajęczaków i staroraków, w przypadku osiągnięcia przez p.s.p. poziomu depolaryzacji krytycznej generowana jest a.m.r. (potencjał iglicowy), czasami osiagająca lub nawet nieco przewyższająca poziom 0 mV [61, 135, 141]. Nie zawsze jednak stymulacja aksonu daje potencjały iglicowe [135]. Amplituda mięśniowego AP u różnych szczękoczułkowców jest bardzo zróżnicowana i waha się pomiędzy 2 a 75 mV [61, 135, 141], a szybkość narastania jest na ogół dość duża, około 40 V/s [61], tylko u kraba podkowiastego, *Limulus*, bardzo mała — 2 V/s [58, 135]. Potencjał iglicowy nie jest u większości szczękoczułkowców [58, 61, 135] czy skorupiaków [4, 12, 50], a także niektórych mięczaków [74] wymogiem dla generowania skurczu, ponieważ nawet najmniejszy p.s.p. może

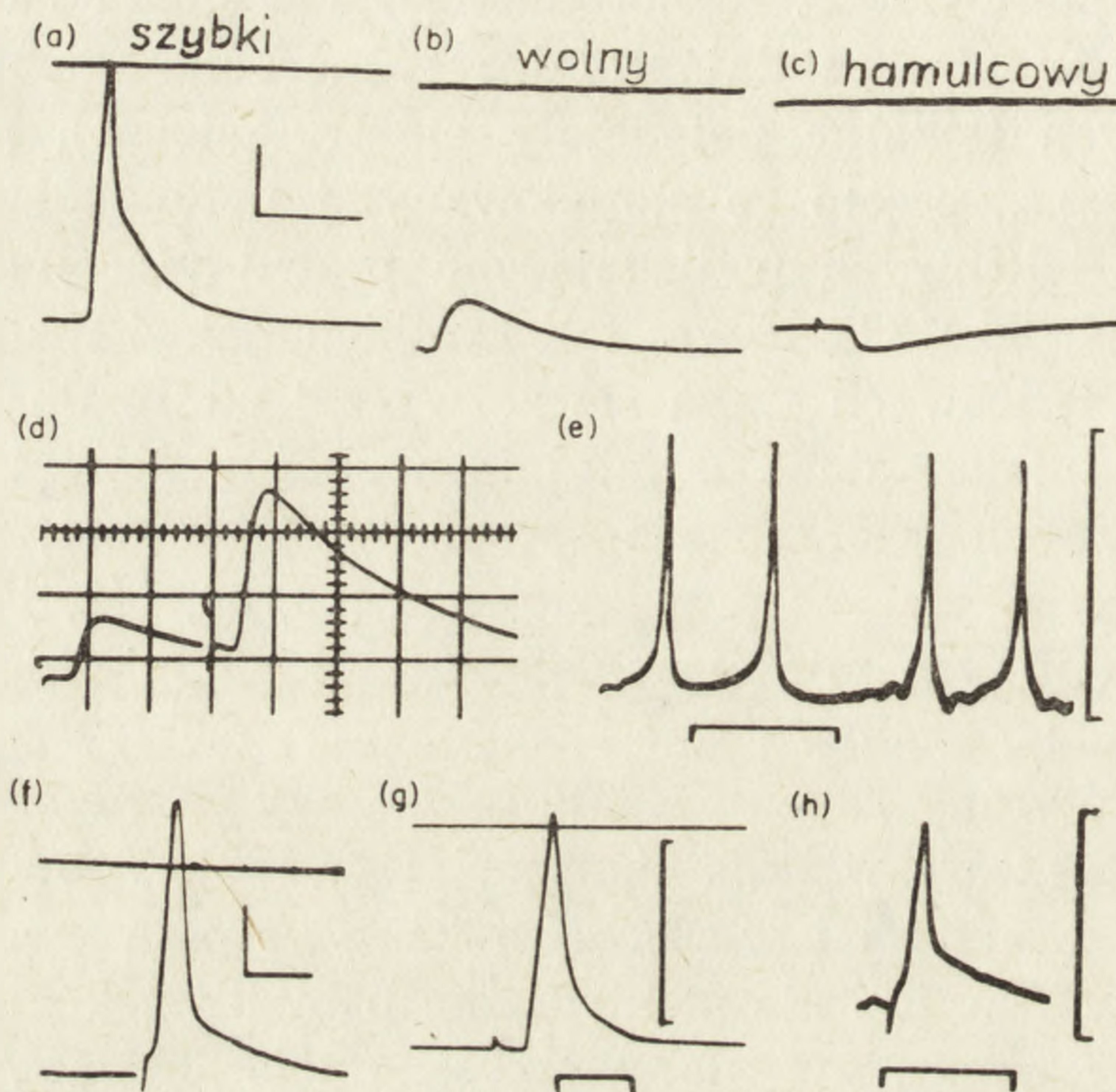
indukować odpowiedź mechaniczną [12, 50, 61, 84, 135]. Wydaje się zatem, że u szczękoczułkowców próg mechaniczny często znajduje się bardzo blisko poziomu normalnego potencjału błonowego [135], co jest cechą niektórych mięśni skorupiaków [179].

Mięśnie skorupiaków charakteryzuje największa ze spotykanych w jakiegokolwiek grupie zwierząt różnorodność. Ze względu na polineuronalne unerwienie, mięśnie te dają bardzo różnorodne odpowiedzi, począwszy od biernych (lokalne potencjały elektrotoniczne), poprzez różnie stopniowane p.s.p.s., często ze stopniowanymi potencjałami iglicowymi, do potencjałów iglicowych podlegających prawu wszystko albo nic [1, 12, 14, 50, 83, 84, 88, 133], nawet tak krótkich, jak 4 ms [50]. Amplituda potencjałów iglicowych waha się zazwyczaj od 10 do 45 mV [1, 14, 50, 133]. Dokładniejsze dane o mięśniach skorupiaków i ich mechanizmach elektrycznych, których nie sposób tutaj omówić, można znaleźć w specjalistycznych pracach przeglądowych [13, 88, 142, 179].

Jak w wielu innych mięśniach, błona włókien mięśniowych owadów zawiera dwie funkcjonalnie różne komponenty, elektrycznie niepobudliwy obszar synaptyczny i elektrycznie pobudliwy przedział niesynaptyczny (wyjąwszy niektóre włókna toniczne) [88, 168]. Pobudzające p.s.p.s., zależnie od ich wielkości i właściwości kablowego przewodzenia w błonie, mogą aktywować lub nie elektrycznie pobudliwą komponentę błony, dając w efekcie a.m.r., zwykle wielkości około 30 mV, która zazwyczaj osiąga, a czasami nawet przekracza zerowy poziom potencjału (do +10 mV) [15, 20, 82, 86, 88, 115, 119, 137, 168, 180–182]. Najbardziej szybkie pobudzeniowe p.s.p.s. aktywują elektrycznie pobudliwy przedział błony, wywołując szybkie odpowiedzi iglicowe, podczas gdy niektóre wolne pobudzeniowe p.s.p.s. pobudzając tę komponentę błony wywołują różnie stopniowane odpowiedzi elektryczne. Jednakże najbardziej wolne p.s.p.s. nie pobudzają elektrycznie pobudliwej komponenty błony i szybko wygasają [88]. Rycina 3 przedstawia typowe szybkie, wolne i hamulcowe odpowiedzi mięśniowe wraz z typowymi APs u niektórych reprezentatywnych owadów.

Uważa się, że odpowiedzi typu wszystko albo nic normalnie nie występują w mięśniach owadów, chociaż były i takie sugestie [15, 90, 118], zawsze jednak okazywało się, że są to niestety najprawdopodobniej odpowiedzi stopniowane [168]. Jednakże ostatnio Deitmer [43] jako pierwszy stwierdził, że obserwowane w 10% komórek mięśni szkieletowych larw *Ephestia* odpowiedzi należy uważać za odpowiedzi o charakterze wszystko albo nic, charakteryzujące się amplitudą osiągającą 45–60 mV z przewyższeniem rzędu 5–20 mV i rozprzestrzeniające się bez dekrementu wzdłuż włókna. Odpowiedzi stopniowane występujące w mięśniach owadów różnią się znacznie tak pod względem kształtu, jak i cza-

su trwania odpowiedzi, nawet jeśli są rejestrowane z tego samego mięśnia tylko z różnych włókien [114]. Ogólnie można wyodrębnić odpowiedzi mające charakter oscylacyjny lub iglicopodobny. Procentowa liczba poszczególnych rodzajów potencjałów ulega zmianie, szczególnie w trakcie rozwoju larwalnego [130].



Ryc. 3. Aktywność elektryczna rejestrowana w pewnych typowych mięśniach szkieletowych owadów (według [88]); (a, b, c) zapisy z mięśnia prostownika goleni szarańczy przedstawiające potencjały postsynaptyczne uzyskane w wyniku stymulacji szybkiego, wolnego i hamulcowego aksonu (kalibracja: 10 mV, 20 ms), (d) mięsień zginacz goleni *Aeschna*, potencjały postsynaptyczne w wyniku stymulacji wolnego i szybkiego aksonu (kwadraty siatki — 10 mV, 5 ms), (e) potencjały czynnościowe z mięśnia *Philosamia* (kalibracja: 50 mV, 100 ms), (f) potencjał czynnościowy podłużnego, grzbietowego mięśnia lotu *Sarcophaga* (kalibracja: 10 mV, 20 ms), (g) potencjał czynnościowy z włókna mięśnia biodrowego karaczana (kalibracja: 50 mV, 10 ms), (h) potencjał czynnościowy mięśnia zginacza goleni patyczaka (kalibracja: 50 mV, 50 ms)

Wielkość AP we włóknach mięśniowych owadów waha się w dość szerokich granicach, bo od około 20 do 80 mV [15, 43, 88, 93, 115, 130, 172, 173, 182] i czasami potencjały te przewyższają poziom 0 mV [15, 82, 119, 168]. Mają one złożony kształt, zazwyczaj obserwuje się wygięcie na ramieniu wstępującym potencjału, wskazujące, że składa się on z pobudzeniowego p.s.p. i a.m.r., a faza repolaryzacji jest przedłużona przez ujemny potencjał następczy [86]. Czas trwania całego AP jest bardzo różny [88, 93, 130, 168], a przykładowo u motyli wynosi 25–35 ms [86]. Ponadto obserwuje się prawie liniową zależność pomiędzy wielkością AP i RP [85, 87, 110, 180]. Stymulacja elektrycznie po-

budliwej błony długim bodźcem prądu depolaryzacyjnego wywołuje szereg odpowiedzi, których częstotliwość wzrasta w miarę zwiększania bodźca [37]. Siła zastosowanego impulsu determinuje zarówno wielkość AP, jak i odległość pokonywaną przez wywołaną odpowiedź błonową, ponieważ przewodnictwo odbywa się z dekrementem.

Elektrycznie pobudliwa część błony we włóknach mięśni szkieletowych owadów odpowiada na adekwatny bodziec elektryczny w sposób stopniowany [167, 168, 172, 182], co jest prawdopodobnie wynikiem nienormalnie szybkiego wzrostu przewodności błony dla K^+ , którego stłumienie, np. przez zastosowanie TEA^+ , Ba^{2+} , Sr^{2+} czy alkaloidu ryano-diny, pozwala na generowanie odpowiedzi typu wszystko albo nic [18, 20, 43, 55, 136, 166, 173, 177, 178, 183], albo niezbyt dużego w stosunku do K^+ wzrostu P_{Na} ($P_{Na} \simeq 1,5 P_K$) [172]. Naturalnym bodźcem dla elektrycznie pobudliwego obszaru błony jest p.s.p., który w pewnych warunkach inicjuje odpowiedź w sąsiednich częściach błony. Ta z kolei może inicjować odpowiedzi w przyległych do niej odcinkach błony, wywołując w ten sposób rozprzestrzenianą się z dekrementem elektrogenezę. Drugim typem bodźca jest bodziec sztuczny w postaci zastosowanego impulsu prądowego przez błonę, dającego w rezultacie potencjał elektrotoniczny. Sztucznie pobudzoną odpowiedź zarejestrowali po raz pierwszy we włóknach mięśniowych owadów Del Castillo i wsp. [45], którzy wprowadzili też termin a.m.r., aby odróżnić ją od p.s.p. W świeżych preparatach odpowiedzi te składają się z oscylacji nałożonych na potencjał elektrotoniczny. Nawiasem mówiąc, według Grundfesta [65–67] nie tylko elektrycznie pobudzone odpowiedzi stopniowane czy odpowiedzi typu wszystko albo nic, ale także opóźnione i nienormalne prostowanie muszą być rozważane jako aktywne odpowiedzi elektrycznie pobudliwych błon. Występowanie opóźnionego prostowania zostało wykazane w mięśniach licznych owadów należących do *Orthoptera*, *Lepidoptera* i *Coleoptera* [17, 19, 20, 37, 168, 178].

We włóknach mięśniowych owadów istnieje bardzo duża różnorodność APs, a także duża zmienność składu jonowego hemolimfy [25, 52], a więc i bardzo różne są gradienty stężeń przez błonę, co pozostaje nie bez wpływu na kształt i charakter jonowy AP (według [88, 168]).

W mięśniach mięczaków, o budowie dość zresztą odmienną (mięśnie paramiozynowe) od budowy typowych mięśni prążkowanych, również notowano dosyć duże zróżnicowanie APs [4, 88]. U *Busycon* obserwowano mały AP (10–15 mV) z dużym hiperpolaryzacyjnym potencjałem następczym (35–40 mV), wystarczający jednak, aby zdepolaryzować włókno mięśniowe poza próg mechaniczny dla skurczu [74], podczas gdy u *Mytilus* zwykle pojawiał się potencjał iglicowy o amplitudzie 50–55 mV, który depolaryzował błonę włókna mięśniowego prawie do poziomu

0 mV [164], a w niektórych włóknach mięśniowych *Heliosoma trivolvis* stwierdzono obecność nawet APs z przewyższeniem, skorelowanych ze skurczem mięśnia, jako wynik stymulacji zewnątrzkomórkowej lub podrażnienia zwierzęcia [70].

1.3. MIĘŚNIE SERCA KRĘGOWCÓW I BEZKRĘGOWCÓW

Po raz pierwszy wewnątrzkomórkowe zapisy z włókien mięśnia sercowego zostały wykonane przez Drapera i Weidmanna [51]. Badając zwierzęta, stojące na różnym szczeblu rozwoju, stwierdzono, że są dwa podstawowe typy serc — miogeniczne (unerwione lub nie, przy czym unerwienie ma tutaj funkcję regulacyjną), posiadające własne komórki rozrusznikowe i neurogeniczne, w których wewnętrzny element nerwowy działa jako rozrusznik [88]. APs rejestrowane z serc miogenicznych charakteryzują się obecnością przedpotencjału (powolna spontaniczna depolaryzacja), czyli potencjału rozrusznikowego, który inicjuje potencjał iglicowy [60, 88]. W sercach neurogenicznych obserwowano potencjały o złożonym charakterze, z dość niespotykanym zespołem iglic i fal wolnych [88].

Oślonice posiadają najprostsze miogeniczne nieunerwione serca, których APs, dość zróżnicowane, zwykle osiągają lub są tylko nieco poniżej poziomu zerowego potencjału. Obserwowano proste i złożone APs, z przedpotencjałami i potencjałami następczymi, zwykle mniejsze niż poprzednie, a także małe, podobne do fali, depolaryzacje (5–10 mV), które mogą występować wraz z potencjałami iglicowymi lub same. Są one prawdopodobnie potencjałami rozrusznikowymi [5]. AP komórek serca oślonic jest zjawiskiem znacznie przedłużonym, o czasie trwania od 0,75 do 1,25 s ([5] i według [88]). Przedłużenie AP jest prawie uniwersalną cechą komórek mięśnia sercowego i spowodowane jest ono głównie przez fazę plateau repolaryzacji, co jest związane z raczej przedwczesnym zredukowaniem przewodności dla K^+ [4, 88, 100, 129, 139, 150].

Ten sam typ serca posiada wiele niższych skorupiaków i niektóre owady, np. motyle [88, 148]. Potencjały iglicowe rejestrowane w komórkach mięśniowych serca jednego z motyli mogą osiągać amplitudę około 65 mV i przewyższać RP o około 3–12 mV [116, 117]. Cały AP ma postać złożonej fali, obejmującej rozrusznikowy przedpotencjał i iglicę na ramieniu wstępującym, a po początkowej gwałtownej repolaryzacji następuje plateau w fazie prostowania (opóźnione prostowanie). Całe zjawisko AP może trwać od 0,8 do 1 s [116, 117]. Należy zaznaczyć, że APs rejestrowane w różnych częściach serca mają różny kształt [117] i na pierwszy rzut oka mają one charakter wszystko albo nic [168].

W unerwionych miogenicznych sercach owadów (patyczak, szarań-

cza, karaczan i mucha ścierwica) [30, 88, 97, 121] na typowy spontaniczny AP składają się jak poprzednio 3 fazy, chociaż nieco odmienne, faza generatorowego (rozrusznikowego) przedpotencjału, przesuwanego MP do poziomu progu wyładowań dla iglic, szybka iglica i dość szybka faza repolaryzacji [30, 122]. Nigdy nie obserwowano plateau opóźnionego prostowania, ale można je spowodować zastępując Ca^{2+} w kąpieli Sr^{2+} [122]. Amplituda APs w komórkach tego typu serc waha się mniej więcej od 25 do 45 mV, raczej rzadko osiągając poziom 0 mV [30, 122]. Jedynie u muchy ścierwicy AP charakteryzuje się wyraźnym plateau i ponad dwukrotnie dłuższym czasem trwania (530 ms). Niekiedy obserwowano nawet obecność iglicopodobnych oscylacji nałożonych na plateau repolaryzacji [30], co jest raczej cechą charakterystyczną AP serc neurogenicznych.

Unerwione miogeniczne serca posiadają także mięczaki i kręgowce [88]. APs rejestrowane w mięśniach serca kręgowców charakteryzują się bardziej lub mniej zaznaczonym poprzedzającym potencjałem generatorowym, w zależności od umiejscowienia elektrody rejestrującej, i silniej lub słabiej zaznaczonym plateau, pomiędzy fazą wstępnej repolaryzacji tuż za szczytem iglicy a fazą repolaryzacji końcowej [4, 60, 88, 112]. Amplituda tych potencjałów waha się w przybliżeniu od 65 do 120 mV i zwykle cechuje je wyraźne przewyższenie (5–38 mV). Bardzo zróżnicowany jest czas ich trwania (43–800 ms) i szybkość narastania (20–200 V/s) [60, 88, 100, 112, 129, 138, 139, 150, 152], przy czym jest ona szczególnie niska w przypadku serc ryb (około 9–10 V/s) [139, 150]. Poszczególne części serca mogą się różnić ponadto wysokością progu wyładowań [88]. Ciekawe jest, że APs wywołane stymulacją bezpośrednią nie posiadają przedpotencjałów generatorowych [129].

Serca neurogeniczne po raz pierwszy pojawiają się u pierścienic (np. [144]), mają je też szczękoczułkowce i skorupiaki [88, 151, 171], są one jednak dość słabo zbadane. APs ich komórek są raczej złożonego kształtu i według dostępnych danych raczej rzadko przekraczają poziom 0 mV (właściwie tylko u skorupiaków), a ich amplituda waha się pomiędzy około 20 a 70 mV, przy czym wyraźnie wyższa jest w komórkach mięśniowych serca skorupiaków [145, 151, 171]. Amplituda potencjałów iglicowych zmienia się zasadniczo w zależności od preparatu i pory roku [171]. Czas trwania tych potencjałów jest też bardzo różny, od 150 do 1500 ms [88, 145, 151, 171]. Nieregularny, ząbkowany charakter plateau jest powszechnym zjawiskiem w APs serc skorupiaków i często potencjał iglicowy może nie być pierwszą częścią odpowiedzi o kształcie złożonej fali generowanej przez poszczególne neurony [88, 171]. Pojedynczy AP komórek mięśniowych serc pajęczaków i staroraków składa się z szybkiej, iglicopodobnej depolaryzacji, zwykle

dalekiej od poziomu 0 mV, po której następują mniejsze utrzymujące się depolaryzacje oscylacyjne w liczbie do około 15, wskutek czego znacznie przedłużona jest faza zstępująca potencjału, szczególnie u kraba podkowiastego. Czas trwania całego wyładowania jest około 450 ms, a szybkość narastania może być tak mała, jak np. 1 V/s w sercu *Limulus* [88, 134, 145, 151]. Ogólnie należy stwierdzić, że w porównawczych badaniach serca istnieją duże luki.

1.4. MIĘŚNIE WISCERALNE KRĘGOWCÓW I BEZKRĘGOWCÓW

Na wstępie należy zaznaczyć, że w tym rozdziale omówione będą nie tylko typowe mięśnie gładkie, ale i wisceralne mięśnie bezkręgowców, z których wiele strukturalnie należy do grupy mięśni prążkowych z unerwieniem polineuronalem [125, 184]. Pomimo niewiarygodnej wprost różnorodności mięśni wisceralnych, Bozler [27] podzielił je na 2 grupy: mięśnie typu wielojednostkowego, na ogół nierytmiczne (nie wykazujące aktywności spontanicznej) i mięśnie jednojednostkowe — są one zwykle rytmicznie aktywne. Należy jednak pamiętać, że podział ten nie może być traktowany jako sztywny.

Wykładniczy charakter fazy narastania AP sugeruje, że rozprzestrzenianie się potencjału iglicowego, podobnie jak w mięśniu sercowym, jest zależne od kablowej charakterystyki błony [4, 31, 88, 161]. Pobudzenie rozprzestrzenia się w tych komórkach na drodze elektrotonicznej z dekrementem [163]. Mięśnie gładkie charakteryzują się na ogół niestabilnością potencjału błonowego [60]. W wielu mięśniach bardzo trudno jest wywołać potencjał iglicowy poprzez stymulację wewnątrzkomórkową [108, 109] i w szeregu preparatów w odpowiedzi nawet na bardzo duże depolaryzacje uzyskano jedynie odpowiedzi stopniowane [92, 104], z tym że we włóknach mięśni wisceralnych owadów, odwrotnie, dopiero ostatnio stwierdzono po raz pierwszy obecność odpowiedzi stopniowanych w odpowiedzi na stymulację bezpośrednią [184]. W pierwszych preparatach liniowość zależności pomiędzy zastosowanym bodźcem a przemieszczeniem potencjału błonowego jest prawie idealna i ujawnia całkowity brak odradzających się zmian przewodności błony, prowadzących do powstania iglicy. W wielu innych preparatach jednak można wywołać potencjał iglicowy z większą lub mniejszą łatwością [91, 108, 125, 162, 184]. Doświadczalne dowody wskazują więc, że depolaryzacja licznych włókien mięśni wisceralnych poza pewną wartość krytyczną prowadzi do odradzającego się wchodzenia jonów i powstania potencjału iglicowego, podczas gdy w niektórych mięśniach (głównie jednojednostkowych) odpowiedzi są stopniowane, a wolna fala generująca potencjał iglicowy (w preparatach, w których potencjały iglicowe występują) nie może być zastąpiona czy symulowana przez miej-

scowe zastosowania prądu [92, 104, 108, 153, 162). Sugeruje się też, że mechanizm elektrogeniczny dla potencjału iglicowego, w przeciwieństwie do mechanizmu dla fali wolnej, jest zależny od poziomu polaryzacji błony [88, 108], a więc zakłada się istnienie odrębnych mechanizmów elektrogenicznych dla tych zjawisk elektrycznych [88].

APs w mięśniach wisceralnych są niewiarygodnie zróżnicowane i trudno jest scharakteryzować wszystkie tzw. typy AP (bardziej szczegółowe dane — zob. [34, 88, 184]). Zwykle iglicopodobne depolaryzacje potencjału błonowego, będące częścią czasami bardzo złożonego w swym przebiegu AP, są niezbędne do wywołania skurczu włókien mięśniowych, ale często i wolna fala, o kształcie podobnym do sinusoidy, jest zupełnie wystarczająca do tego celu, a więc potencjał iglicowy nie jest niezbędnie wymagany, aby zaistniał skurcz. Istotny wydaje się raczej czas trwania zjawiska AP [88, 156].

Na podstawie doświadczalnie uzyskanych zapisów, APs z reprezentatywnych typów mięśni zostały podzielone na „spontaniczne” i „nie-spontaniczne” (czyli pobudzeniowe potencjały połączeniowe), chociaż w niektórych preparatach występują tak jedne, jak i drugie APs [88, 124–126, 184]. Uogólniając można powiedzieć, że w preparatach nie-spontanicznych RP jest zwykle większy i APs mają większą tendencję do przekraczania poziomu 0 mV [88], z pewnymi jednak wyjątkami, bo i w niektórych preparatach spontanicznych obserwowano APs z przewyższeniem [35, 91, 184]. Jednakże z pewnością prawdą jest, że w wielu mięśniach jelitowych potencjał iglicowy jest znacznie poniżej potencjału 0 [33, 88, 156]. APs różnych preparatów są znacznie zróżnicowane, ich amplituda waha się w granicach 10–80 mV, a czas trwania od 0,1 do 3 s [33, 36, 88, 91, 92, 104, 126, 156].

Odpowiedzi czynnościowe rejestrowane w mięśniach wisceralnych można, ze względu na kształt, podzielić na odpowiedzi typu plateau — podobnego (czas trwania 2–15 s [120, 126, 184]) i iglicopodobnego (40 ms) [21, 36, 174, 184]. Obserwuje się jednak dużą różnorodność iglicopodobnych APs. Mogą one pojawiać się spontanicznie [91, 184], albo w odpowiedzi na określone bodźce [16, 21, 184]. Niektóre potencjały iglicowe powstają w sposób wszystko albo nic [125, 184], podczas gdy inne mogą być stopniowane [88, 184]. W niektórych przypadkach stopniowany charakter potencjału iglicowego może być związany z ilością iglic w pojedynczym wyładowaniu lub z aktualną wartością RP komórki (np. [174]). W wielu komórkach, przykładowo moczowodu świnki morskiej, te APs (seria iglic) mogą znacznie przekraczać poziom 0 mV, co prawie zawsze skorelowane jest z wysoką wartością komórkowego RP. W komórkach z mniejszym RP, ani pojedyncze iglice, ani nawet wielokrotne potencjały iglicowe, prawie nigdy nie przekraczają poziomu

zerowego [174]. W niektórych preparatach obserwuje się tylko krótkie potencjały iglicowe [21, 36, 156]. Inną cechą iglicopodobnych APs jest obecność lub brak fal wolnych. W niektórych przypadkach potencjał iglicowy powstaje bezpośrednio z poziomu spoczynkowego [174, 184], ale w wielu mięśniach wisceralnych (głównie naczyń krwionośnych) potencjał iglicowy bywa nałożony w rozmaitych punktach na podobną do fali, powolną, spontaniczną depolaryzację o zmiennej amplitudzie (około 4–15 mV) [31, 63, 92, 104, 156]. W normalnych warunkach jednak odpowiedź iglicowa znajduje się na szczycie wolnej fali, co sugeruje, że fala ta jest pewną formą potencjału generatorowego, którego funkcją jest przesunięcie MP do poziomu progów wyładowań iglicowych. W niektórych preparatach każda pojedyncza, wolna fala depolaryzacji niezmiennie generuje tylko jeden potencjał iglicowy na swoim szczycie [104], podczas gdy w innych preparatach liczba potencjałów iglicowych nałożonych na wolną falę może zmieniać się od 1 do 8 [63, 156]. Okazuje się, że zwykle wolno depolaryzujące się fale generują mniej potencjałów iglicowych niż szybko depolaryzujące się fale, brak natomiast korelacji z czasem trwania fali [88].

Inną modyfikację kształtu AP obserwowano w mięśniach przewodu pokarmowego mola woskowego [184], odbytnicy karaczana [124–126] oraz tętnicy krezkowej szczura [154]. Wolna fala przybiera w tych preparatach kształt długiego, podobnego do rozrusznikowego, przedpotencjału, bardziej typowego dla mięśnia sercowego i zupełnie niepodobnego do sinusoidalnych fal wolnych większości spontanicznie aktywnych mięśni jelitowych. W przypadku wolnej fali typu sinusoidalnego potencjał iglicowy jest po prostu nałożony na falę, a w przypadku fal wolnych typu generatorowego zstępująca faza AP osiąga bezpośrednio punkt maksimum polaryzacji, a więc tutaj fala spełnia tylko funkcję depolaryzującą. Ten typ tworzenia potencjału błonowego jest czasami nazywany „typem oscylacyjnej relaksacji (według [88]).

1.5. KOMÓRKI NERWOWE

APs rejestrowane z komórek nerwowych mają charakter wszystko albo nic i ogólną charakterystykę takiego AP przedstawiono na początku rozdziału 1. W wielu neuronach APs mogą powstawać spontanicznie, w innych są wywoływane przez pobudzeniowe p.s.p.s. dostatecznej wielkości [4]. Potencjały te rejestrowane z komórek nerwowych różnych zwierząt są bardziej jednorodne w swoim kształcie niż potencjały innych tkanek. Ich amplituda waha się na ogół w wąskich granicach, bo od 100 do 120 mV, z przewyższeniem wielkości 40–50 mV [60, 76, 111]. Są one zazwyczaj bardzo krótkie, około 0,4–1,5 ms [71, 76, 99, 111, 146], przy czym ten czas trwania zwiększa się 2–3 razy przy obniżeniu temperatury o każde 10°C [76].

W komórkach nerwowych mamy do czynienia z przewodzeniem bez dekrementu, a więc ze względu na stałe procesy jonowej odnowy (wzdłuż całego włókna przy przewodzeniu ciągłym, a w cieśniach węzłów przy przewodzeniu skokowym) amplituda AP nie zmienia się w miarę jego przesuwania się wzdłuż włókna nerwowego [4, 95]. Prędkość przewodzenia impulsów zależy od średnicy włókien nerwowych oraz od sposobu przewodzenia (oczywiście prędkość przewodzenia skokowego we włóknach rdzennych jest znacznie większa) [4, 57, 76, 95, 169]. Nerwy charakteryzują się ponadto stosunkowo niskim w porównaniu z innymi tkankami progiem pobudliwości, przy czym jest on najniższy w segmencie początkowym aksonu, który jest miejscem inicjacji impulsu (przy pobudzeniu ortodromowym) [4, 39, 94, 95].

Kształt AP w motoneuronach, rejestrowanego w pewnej odległości od miejsca, w którym został on zainicjowany, jest bardziej skomplikowany niż kształt potencjału aksonalnego. AP rejestrowany w ciele neuronu składa się z 3 komponent: (1) iglica M, reprezentująca aktywność w rdzennym obszarze aksonu i rejestrowana jako mała depolaryzacja, wielkości 1–3 mV; (2) iglica IS, czyli potencjał początkowy, reprezentująca aktywność w pozbawionym osłonki mielinowej początkowym odcinku aksonu i zapisywana w ciele neuronu jako depolaryzacja rzędu 30–40 mV, i (3) wyładowanie właściwe — iglica SD, reprezentująca aktywność w ciele komórki i dendrytach, i dlatego rejestrowana jako AP pełnej wielkości, 80–100 mV [4, 39, 94, 95, 146].

W czuciowych komórkach nerwowych można z kolei wyodrębnić stopniowane potencjały generatorowe, niosące informacje w postaci kodu amplitudy, który jest przekształcany na kod częstości APs i potencjały iglicowe o charakterze wszystko albo nic [4, 95].

1.6. ORGANIZMY JEDNOKOMÓRKOWE

U jednokomórkowych mikroorganizmów, pierwotniaków, około 20 lat temu stwierdzono również istnienie wywołanych APs [103], które mimo iż ich ogólny kształt jest podobny do kształtu odpowiedzi rejestrowanych we włóknach nerwowych, ze względu na stosunkowo długi czas trwania iglicy i rytmiczność odpowiedzi, przypominają raczej długo trwające APs komórek mięśniowych serca [88, 100] lub komórek mięśni gładkich jelit [36]. Amplituda AP u pierwotniaków jest stopniowana, prawdopodobnie wskutek ilościowych zależności pomiędzy P_{Ca} i P_K . Zależności te mogą być zmienione przez dodanie Ba^{2+} (obniża P_K i zastępuje Ca w niesieniu prądu depolaryzacyjnego) do środowiska, co daje w efekcie odpowiedź typu wszystko albo nic [53, 103] oraz wywołuje wyładowania spontaniczne u *Paramecium*.

APs u pierwotniaków mają niezbyt wysoką amplitudę, około 25–40 mV [44, 48, 103] z przewyższeniem, np. u *Paramecium* rzędu 12 mV i hiperpolaryzacją następczą wielkości 7 mV [103]. Czas trwania iglicy wynosi około 350 ms, a hiperpolaryzacji następczej — 1000 ms [103]. Należy zaznaczyć, że nieco inny jest charakter odpowiedzi wywołanych bodźcami mechanicznymi i odpowiedzi uzyskanych wskutek depolaryzacji błony [48]. Obserwuje się także odradzające się odpowiedzi hiperpolaryzacyjne, powstające wskutek stymulacji tylnego obszaru komórki i określane jako iglice potasowe, gdyż są one związane z wypływem K^+ z komórki [149]. Amplituda tych odpowiedzi wydaje się znacznie wahać w zależności od rodzaju badanego organizmu, w przedziale od 30 do 90 mV (czas trwania — około 1 s) [44, 149].

1.7. ORGANIZMY ROŚLINNE

APs są uniwersalnym zjawiskiem w błonach biologicznych, gdyż nawet w komórkach wielu roślin zanotowano takie potencjały [2, 64, 123, 147]. Charakteryzują się one amplitudą wahającą się niewiele poniżej lub powyżej 100 mV, ale czas ich trwania jest dłuższy niż w komórkach zwierzęcych, bo rzędu kilku sekund, a nawet minut. Często składają się one z szybko narastającej iglicy i różnie długo trwającego plateau [2, 64]. Inna jest też zależność jonowa roślinnych APs, gdyż główną rolę odgrywają tu prawdopodobnie Cl^- i K^+ . Podczas depolaryzacji następuje wypływ Cl^- przez plazmolemmę, a podczas repolaryzacji — wypływ K^+ , przy czym główna część prądu repolaryzacji jest związana z Cl^- (elektrogeniczne przenikanie Cl^- do komórki) [64, 123].

U glonu *Acetabularia* APs nie powstają prawdopodobnie na skutek zmian przepuszczalności kanałów biernej dyfuzji, lecz elektrogeniczna pompa jest faktycznym źródłem tych potencjałów (metaboliczny typ AP). APs powstają w sposób uprzywilejowany w apikalnym końcu komórek *Acetabularia* i rozprzestrzeniają się od szczytu do podstawy z prędkością 0,8–1,36 mm/s w zależności od rodzaju bodźca [64]. Prędkość rozprzestrzeniania się AP w komórkach mimosy jest większa, bo 20–41 mm/s w zależności od rodzaju komórki [98]. W niektórych komórkach mimosy obserwowano jednak APs, które nie posiadały zdolności rozprzestrzeniania się [147]. Bardzo różnorodne, w zależności od rodzaju rośliny, bodźce (chemiczne, termiczne, mechaniczne, elektryczne, świetlne itp.) mogą wywoływać odpowiedź komórki w postaci AP [2, 64, 147]. Na przykład u *Acetabularia*, obserwowano pojawianie się w wyniku wyłączenia impulsu świetlnego depolaryzacji komórki, a także stwierdzono obecność pojedynczych lub powtarzających się spontanicznych APs, czerpiących energię z endogennych źródeł energii [64]. Speł-

niają one prawdopodobnie istotną rolę w utrzymaniu równowagi jonów K u tego glonu, gdyż komórki *Acetabularia* oraz prawdopodobnie innych roślin mają w spoczynku tendencję do akumulacji K^+ [123].

LITERATURA

- [1] ABBOTT B. C., PARNAS I., Electrical and mechanical responses in deep abdominal extensor muscles in crayfish and lobster, *J. Gen. Physiol.*, **48**: 919–931, 1965.
- [2] ABE T., ODA K., Resting and action potentials of excitable cells in the main pulvinus of *Mimosa pudica*, *Plant Cell Physiol.*, **17**: 1343–1346, 1976.
- [3] ADRIAN R. H., FREYGANG W. H., Potassium and chloride permeability of frog muscle membrane, *J. Physiol.*, **163**: 61–103, 1962.
- [4] AIDLEY D. J., *The Physiology of Excitable Cells*, Cambridge University Press, Cambridge 1971.
- [5] ANDERSON M., Electrophysiological studies on initiation and reversal of the heartbeat in *Ciona intestinalis*, *J. Exp. Biol.*, **49**: 363–385, 1968.
- [6] ARAKI T., OTANI T., FURUKAWA T., The electrical activities of single motoneurons in toad's spinal cord, recorded with intracellular electrodes, *Japan. J. Physiol.*, **3**: 254–267, 1953.
- [7] ARMSTRONG C. M., Potassium pores of nerve and muscle membranes, [w:] *Membranes — A Series of Advances*, vol. 3. *Dynamic Properties of Lipid Bilayers and Biological Membranes*, red. G. Eisenman, Marcel Dekker, Inc., New York 1975, 325–358.
- [8] ARMSTRONG C. M., Evidence for ionic pores in excitable membranes, *Biophys. J.*, **15**: 932–933, 1975.
- [9] ARMSTRONG C. M., BINSTOCK L., Anomalous rectification in the squid giant axon injected with tetraethylammonium chloride, *J. Gen. Physiol.*, **48**: 859–872, 1965.
- [10] ASHCROFT F. M., Calcium action potentials in the skeletal muscle fibres of the stick insect *Carausius morosus*, *J. Exp. Biol.*, **93**: 257–267, 1981.
- [11] ASHCROFT F. M., STANFIELD P. R., Calcium and potassium currents in muscle fibres of an insect (*Carausius morosus*), *J. Physiol.*, **323**: 93–115, 1982.
- [12] ATWOOD H. L., Excitation and inhibition in crab muscle fibres, *Comp. Biochem. Physiol.*, **16**: 409–426, 1965.
- [13] ATWOOD H. L., Crustacean neuromuscular mechanisms, *Am. Zool.*, **7**: 527–551, 1967.
- [14] ATWOOD H. L., HOYLE G., SMYTH T., Mechanical and electrical responses of single innervated crab muscle fibres, *J. Physiol.*, **180**: 449–482, 1965.
- [15] BECHT G., HOYLE G., USHERWOOD P. N. R., Neuromuscular transmission in the coxal muscles of the cockroach, *J. Insect Physiol.*, **4**: 191–201, 1960.
- [16] BELL C., Transmission from vasoconstrictor and vasodilator nerves to single smooth muscle cells of the guinea-pig uterine artery, *J. Physiol.*, **205**: 708, 1969.
- [17] BELTON P., Innervation and neural excitation of ventral muscle fibres of the larva of the wax moth, *Galleria mellonella* L., *J. Insect Physiol.*, **15**: 731–741, 1969.

- [18] BELTON P., GRUNDFEST H., Comparative effects of drugs on graded responses of insect muscle fibers, *Fed. Proc. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.*, **20**: 339, 1961.
- [19] BELTON P., GRUNDFEST H., The K permeability of the muscle fiber membrane of the mealworm (*Tenebrio molitor*) larva, *J. Gen. Physiol.*, **45**: 590A, 1962.
- [20] BELTON P., GRUNDFEST H., Potassium activation and K-spikes in muscle fibers of the mealworm larva (*Tenebrio molitor*), *Am. J. Physiol.*, **203**: 588-594, 1962.
- [21] BENNETT M. R., The effect of cations on the electrical properties of the smooth muscle cells of the guinea-pig vas deferens, *J. Physiol.*, **190**: 465-476, 1967.
- [22] BERNSTEIN J., Untersuchungen zur Thermodynamik der bioelektrischen Ströme, *Pflügers Arch. Ges. Physiol.*, **92**: 521-562, 1902.
- [23] BERNSTEIN J., *Elektrobiologie*, Fr. Vieweg, Braunschweig 1912.
- [24] BORKOWSKA M. J., Geneza potencjału spoczynkowego w świetle struktury i czynności błony, *Post. Biol. Kom.*, **4**: 185-220, 1977.
- [25] BORKOWSKA M. J., Wstępna charakterystyka zjawisk bioelektrycznych w mięśniach pośrednich lotu stonki ziemniaczanej *Leptinotarsa decemlineata* (Say), Praca doktorska, Toruń 1978.
- [26] BOZLER E., Pacemaker activity in mammalian ureter, *Am. J. Physiol.*, **136**: 543-552, 1942.
- [27] BOZLER E., Conduction, automaticity and tonus of mammalian visceral muscles, *Experientia*, **4**: 213-218, 1948.
- [28] BRISMAR T., Effects of ionic concentration on permeability properties of nodal membrane in myelinated nerve fibres of *Xenopus laevis*; potential clamp experiments, *Acta Physiol. Scand.*, **87**: 474-484, 1973.
- [29] BROCK L. G., COOMBS J. S., ECCLES J. C., The recording of potentials from motoneurons with an intracellular electrode, *J. Physiol.*, **117**: 431-460, 1952.
- [30] BRUEN J. P., BALLARD R. C., An intracellular study of the myocardial cells of the flesh-fly, *Sarcophaga bullata*, *Comp. Biochem. Physiol.*, **32**: 227-236, 1970.
- [31] BÜLBRING E., BURNSTOCK G., HOLMAN M., Excitation and conduction in the smooth muscle of the isolated taenia coli of the guinea-pig, *J. Physiol.*, **142**: 420-437, 1958.
- [32] BULLOCK T. H., Neuron doctrine and electrophysiology, *Science*, **129**: 997-1002, 1959.
- [33] BURNSTOCK G., PROSSER C. L., Conduction in smooth muscles: comparative electrical properties, *Am. J. Physiol.*, **199**: 553-559, 1960.
- [34] BURNSTOCK G., HOLMAN M. E., PROSSER C. L., Electrophysiology of smooth muscle, *Physiol. Rev.*, **43**: 482-527, 1963.
- [35] CARNAY L. D., TASAKI I., Ion exchange properties and excitability of the squid giant axon, [w:] *Biophysics and Physiology of Excitable Membranes*, red. W. J. Jr. Adelman, Van Nostrand Reinhold Comp., New York, Cincinnati, Toronto, London, Melbourne 1971, 379-422.
- [36] CASTEELS R., KURIYAMA H., Membrane potential and ion content in the smooth muscle of the guinea-pig's taenia coli at different external potassium concentrations, *J. Physiol.*, **184**: 120-130, 1966.

- [37] CERF J. A., GRUNDFEST H., HOYLE G., McCANN F. V., The mechanism of dual responsiveness in muscle fibers of the grasshopper *Romalea microptera*, *J. Gen. Physiol.*, **43**: 377–395, 1959.
- [38] CHANG Y. C., Membrane potential of muscle cells from the earthworm *Pheretima hawayana*, *Am. J. Physiol.*, **216**: 1258–1265, 1969.
- [39] COOMBS J. S., CURTIS D. R., ECCLES J. C., The generation of impulses in motoneurons, *J. Physiol.*, **139**: 232–249, 1957.
- [40] CURTIS H. J., COLE K. S., Membrane action potentials from the squid giant axon, *J. Cell. Comp. Physiol.*, **15**: 147–157, 1940.
- [41] DAVSON H., Characteristics of excitable tissue, [w:] *A Text-book of General Physiology*, vol. 2, J. and A. Churchill, London 1970, 1031–1346.
- [42] De BELL J. T., Del CASTILLO J., SANCHEZ V., Electrophysiology of the somatic muscle cells of *Ascaris lumbricoides*, *J. Cell. Comp. Physiol.*, **62**: 159–178, 1963.
- [43] DEITMER J. W., Electrical properties of skeletal muscle fibres of the flour moth larva *Ephesia kuehniella*, *J. Insect Physiol.*, **23**: 33–38, 1977.
- [44] DEITMER J. W., The effects of tetraethylammonium and other agents on the potassium mechanoreceptor current in the ciliate *Stylonychia*, *J. Exp. Biol.*, **96**: 239–249, 1982.
- [45] Del CASTILLO J., HOYLE G., MACHNE X., Neuromuscular transmission in a locust, *J. Physiol.*, **121**: 539–547, 1953.
- [46] Del CASTILLO J., De MELLO W. C., MORALES T., The initiation of action potentials in the somatic musculature of *Ascaris lumbricoides*, *J. Exp. Biol.*, **46**: 263–279, 1967.
- [47] De MELLO W. C., CHANG Y. C., Neuromuscular transmission in *Electrophorus electricus* (L.), *Experientia*, **22**: 680–681, 1966.
- [48] De PEYER J. E., DEITMER J. W., Divalent cations as charge carriers during two functionally different membrane currents in the ciliate *Stylonychia*, *J. Exp. Biol.*, **88**: 73–89, 1980.
- [49] De ROBERTIS E. D. P., NOWIŃSKI W. W., SAEZ F. A., Komórkowe podłoże przewodzenia nerwowego i przekaźnictwa synaptycznego, [w:] *Biologia komórki*, PWN, Warszawa 1974, 564–592.
- [50] DORAI RAJ B. S., Diversity of crab muscle fibres innervated by a single motor axon, *J. Cell. Comp. Physiol.*, **64**: 41–54, 1964.
- [51] DRAPER M. H., WEIDMANN S., Cardiac resting and action potentials recorded with an intracellular electrode, *J. Physiol.*, **115**: 74–94, 1951.
- [52] DUCHÂTEAU G., FLORKIN M., LECLERCQ J., Concentrations des bases fixes et types de composition de la base totale de l'hémolymphe des insectes, *Archs int. Physiol. Biochim.*, **61**: 518–549, 1953.
- [53] ECKERT R., NAITOH Y., MACHEMER H., Calcium in the bioelectric and motor functions of *Paramecium*, [w:] *Calcium in Biological Systems*, red. C. J. Duncan, Cambridge Univ. Press, London, New York, Melbourne 1976, 233–255.
- [54] EHRENSTEIN G., LECAR H., The mechanism of signal transmission in nerve axons, *Ann. Rev. Biophys. Bioeng.*, **1**: 347–368, 1972.
- [55] FATT P., KATZ B., The electrical properties of crustacean muscle fibres, *J. Physiol.*, **120**: 171–204, 1953.
- [56] FERRONI A., BLANCHI D., Maximum rate of depolarization of single mus-

- cle fibres in normal and low sodium solutions, *J. Gen. Physiol.*, **49**: 17-23, 1965.
- [57] FLOREY E., Bioelectricity, [w:] An Introduction to General and Comparative Animal Physiology, W. B. Saunders Comp., Philadelphia, London 1966, 375-419.
- [58] FOURTNER C. R., PAX R. A., Chelicerate neuromuscular systems: the distal flexor of the mero-carpopodite of *Limulus polyphemus* (L), *Comp. Biochem. Physiol.*, **41**: 617-627, 1972.
- [59] FRANKENHAEUSER B., LINDLEY B. D., SMITH R. E., Potentiometric measurement of membrane action potentials in frog muscle fibres, *J. Physiol.*, **183**: 152-166, 1966.
- [60] GANONG W. F., Physiology of nerve and muscle cells, [w:] Review of Medical Physiology, Lange Medical Publications, Maruzen Asia (Pte.) Ltd., Singapore 1979, 21-70.
- [61] GILAI A., PARNAS I., Neuromuscular physiology of the closer muscles in the pedipalp of the scorpion *Leiurus quinquestriatus*, *J. Exp. Biol.*, **52**: 325-344, 1970.
- [62] GINSBORG B. L., Some properties of avian skeletal muscle fibres with multiple neuromuscular junctions, *J. Physiol.*, **154**: 581-598, 1960.
- [63] GONELLA J., Variation de l'activité électrique spontanée du duodenum du lapin avec le bien denervation, *C. R. Soc. Biol. Paris*, **260**: 5362-5365, 1965.
- [64] GRADMANN D., "Metabolic" action potentials in *Acetabularia*, *J. Membrane Biol.*, **29**: 23-45, 1976.
- [65] GRUNDFEST H., Ionic mechanisms in electrogenesis, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **94**: 405-457, 1961.
- [66] GRUNDFEST H., Bioelectrogenesis, [w:] The Encyclopedia of Electrochemistry, red. C. A. Hampel, Reinhold Publishing Corporation, New York 1964, 107-113.
- [67] GRUNDFEST H., Comparative electrophysiology of excitable membranes, [w:] Advances in Comparative Physiology and Biochemistry, vol. 2, red. O. C. Lowenstein, Academic Press, New York 1966, 1-116.
- [68] GUTHRIE D. M., BANKS J. R., Observations on the electrical and mechanical properties of the myostomes of the lancelet (*Branchiostoma lanceolatum*), *J. Exp. Biol.*, **52**: 401-417, 1970.
- [69] HAGIWARA S., TAKAHASHI K., Resting and spike potentials of skeletal muscle fibers of salt-water elasmobranch and teleost fish, *J. Physiol.*, **190**: 499-518, 1967.
- [70] HEYER C. B., KATER S. B., KARLSSON U. L., Neuromuscular systems in molluscs, *Am. Zool.*, **13**: 247-270, 1973.
- [71] HEYER E. J., MACDONALD R. L., Calcium- and sodium-dependent action potentials of mouse spinal cord and dorsal root ganglion neurons in cell culture, *J. Neurophysiol.*, **47**: 641-655, 1982.
- [72] HIDAKA T., ITO Y., KURIYAMA H., Membrane properties of the somatic muscle (obliquely striated muscle) of the earthworm, *J. Exp. Biol.*, **50**: 387-403, 1969.
- [73] HILL R. B., USHERWOOD P. N. R., The action of 5-hydroxytryptamine and related compounds on neuromuscular transmission in the locust *Schistocerca gregaria*, *J. Physiol.*, **157**: 393-401, 1961.
- [74] HILL R. B., GREENBERG M. J., IRISAWA H., NOMURA H., Electromechanical coupling in a molluscan muscle, the radula protractor of *Busycon canaliculatum*, *J. Exp. Zool.*, **174**: 331-348, 1970.

- [75] HODGKIN A. L., The ionic basis of electrical activity in nerve and muscle, *Biol. Rev.*, **26**: 339-409, 1951.
- [76] HODGKIN A. L., *The Conduction of Nervous Impulse*, Liverpool University Press, Liverpool 1967, 1-108.
- [77] HODGKIN A. L., HUXLEY A. F., Action potentials recorded from inside a nerve fiber, *Nature*, **140**: 710, 1939.
- [78] HODGKIN A. L., HUXLEY A. F., A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve, *J. Physiol.*, **117**: 500-544, 1952.
- [79] HODGKIN A. L., KATZ B., The effect of sodium ions on the electrical activity of the giant axon of the squid, *J. Physiol.*, **108**: 37-77, 1949.
- [80] HODGKIN A. L., HUXLEY A. F., KATZ B., Measurement of current-voltage relations in the membrane of giant axon of *Loligo*, *J. Physiol.*, **116**: 424-448, 1952.
- [81] HORRIDGE G. A., Relations between nerves and cilia in ctenophores, *Am. Zool.*, **5**: 357-375, 1965.
- [82] HOYLE G., The anatomy and innervation of locust skeletal muscle, *Proc. R. Soc., B*, **143**: 281-292, 1955.
- [83] HOYLE G., Correlated physiological and ultrastructural studies on specialized muscles. 1A. Neuromuscular physiology of the levator of the eyestalk of *Podophthalmus vigil* (Weber), *J. Exp. Zool.*, **167**: 471-486, 1968.
- [84] HOYLE G., SMYTH T., Neuromuscular physiology of giant muscle fibres of a barnacle, *Balanus nubilus* Darwin, *Comp. Biochem. Physiol.*, **10**: 291-314, 1963.
- [85] HUDDART H., The effect of potassium ions on resting and action potentials in lepidopteran muscle, *Comp. Biochem. Physiol.*, **18**: 131-140, 1966.
- [86] HUDDART H., Electrical and mechanical responses recorded from lepidopterous skeletal muscle, *J. Insect Physiol.*, **12**: 537-545, 1966.
- [87] HUDDART H., *Contraction of insect muscle*, [w:] *Experiments in Physiology and Biochemistry*, red. G. A. Kerkut, Academic Press, New York 1971.
- [88] HUDDART H., *The electrical activity of muscle*, [w:] *The Comparative Structure and Function of Muscle*, red. G. A. Kerkut, Pergamon Press, Oxford, New York, Toronto, Sydney 1975, 109-291.
- [89] HUXLEY A. F., STÄMPFLI R., Effect of potassium and sodium on resting and action potentials of single myelinated nerve fibres, *J. Physiol.*, **112**: 496-508, 1951.
- [90] IKEDA K., BOETTIGER E. G., Studies on the flight mechanism of insects. III. The innervation and electrical activity of the basalar fibrillar flight muscle of the beetle, *Oryctes rhinoceros*, *J. Insect Physiol.*, **11**: 791-802, 1965.
- [91] ITO Y., KURIYAMA H., Membrane properties of the smooth muscle fibres of the guinea-pig portal vein, *J. Physiol.*, **214**: 427-441, 1971.
- [92] ITO Y., KURIYAMA H., Nervous control of the motility of the alimentary canal of the silver carp, *J. Exp. Biol.*, **55**: 469-487, 1971.
- [93] JANISZEWSKI L., Porównawcza analiza elementarnych zjawisk bioelektrycznych u niektórych bezkręgowców, Wydawnictwa UMK, Toruń 1965, 1-44.
- [94] JANISZEWSKI L., Elektrofizjologia neuronu, *Acta Physiol. Pol., Suppl.*, **5**: 941-953, 1972.
- [95] JANISZEWSKI L., Czynność komórki nerwowej, [w:] *Fizjologia człowieka*

- z elementami fizjologii klinicznej, red. W. Traczyk, A. Trzebski, PZWL, Warszawa 1980, 30–50.
- [96] JARMAN M., Electrical activity in the muscle cells of *Ascaris lumbricoides*, *Nature*, **184**: 1244, 1959.
- [97] JOHNSON B., Fine structure of the lateral cardiac nerves of the cockroach, *Periplaneta americana* (L.), *J. Insect Physiol.*, **12**: 645–653, 1966.
- [98] JONAS H., Oscillations and movements of *Mimosa* leaves due to electric shock, *J. Interdiscipl. Cycle Res.*, **1**: 335–348, 1970.
- [99] JUNGE D., *Nerve and Muscle Excitation*, Sinauer Associates, Inc., Sunderland, Massachusetts 1976.
- [100] KANNO T., MATSUDA K., The effects of external sodium and potassium concentrations on the membrane potential of atrio-ventricular fibres of the toad, *J. Gen. Physiol.*, **50**: 243–253, 1966.
- [101] KATZ B., *Nerve, Muscle and Synapse*, McGraw-Hill Book Comp., New York, St. Louis, San Francisco, Toronto, London, Sydney 1966.
- [102] KEYNES R. D., MARTINS-FERREIRA H., Membrane potentials in the electroplates of the electric cell, *J. Physiol.*, **119**: 315–351, 1953.
- [103] KINOSITA H., DRYL S., NAITOH Y., Spontaneous change in membrane potential of *Paramecium caudatum* induced by barium and calcium ions, *Bull. Acad. Pol. Sci.*, **12**: 459–461, 1964.
- [104] KOBAYASHI M., PROSSER C. L., NAGAI T., Electrical properties of intestinal muscle as measured intracellularly and extracellularly, *Am. J. Physiol.*, **213**: 275–286, 1967.
- [105] KOSTYUK P. G., Calcium ionic channels in electrically excitable membranes, *Neuroscience*, **5**: 945–959, 1980.
- [106] KUFFLER S. W., VAUGHAN WILLIAMS E. M., Small-nerve junctional potentials. The distribution of small motor nerves to frog skeletal muscle, and the membrane characteristics of the fibres they innervate, *J. Physiol.*, **121**: 289–317, 1953.
- [107] KUFFLER S. W., VAUGHAN WILLIAMS E. M., Properties of the “slow” skeletal muscle fibres of the frog, *J. Physiol.*, **121**: 318–340, 1953.
- [108] KURIYAMA H., TOMITA T., The responses of single smooth muscle cells of guinea-pig taenia coli to intracellularly applied currents, and their effect on the spontaneous electrical activity, *J. Physiol.*, **178**: 270–289, 1965.
- [109] KURIYAMA H., OSA T., TOIDA N., Membrane properties of the smooth muscle of the guinea-pig ureter, *J. Physiol.*, **191**: 225–238, 1967.
- [110] LEVINE L., The effects of modified Ringer’s solutions on the membrane potentials of innervated and denervated frog sartorius muscle fibres, *J. Cell Physiol.*, **67**: 107–124, 1966.
- [111] LEWARTOWSKI B., Pobudliwość i pobudzenie. Elektrofizjologia komórkowa, Fizjologia mięśni, Fizjologia nerwów obwodowych, [w:] Fizjologia człowieka, red. J. Walawski, PZWL, Warszawa 1971, 25–104.
- [112] LEWARTOWSKI B., Fizjologia mięśni poprzecznie prążkowanych, Fizjologia serca, [w:] Fizjologia człowieka z elementami fizjologii klinicznej, red. W. Traczyk, A. Trzebski, PZWL, Warszawa 1980, 51–76, 450–501.
- [113] LING G., GERARD R. W., The normal membrane potential of frog sartorius fibers, *J. Cell. Comp. Physiol.*, **34**: 383–396, 1949.
- [114] MALPUS C. M., Electrical and mechanical responses of the skeletal muscle of a primitive insect, *Nature*, **215**: 991–992, 1967.
- [115] MALPUS C. M., Electrical responses of muscle fibres of dragonfly larvae in

- relation to those of other insects and crustaceans, *J. Insect Physiol.*, **14**: 1285–1301, 1968.
- [116] McCANN F. V., Electrophysiology of an insect heart, *J. Gen. Physiol.*, **46**: 803–821, 1963.
- [117] McCANN F. V., Unique properties of the moth myocardium, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **127**: 84–99, 1965.
- [118] McCANN F. V., BOETTIGER E. G., Studies of the flight mechanism of insects. I. The electrophysiology of fibrillar flight muscle, *J. Gen. Physiol.*, **45**: 125–142, 1961.
- [119] McCANN F. V., REECE R. W., Neuromuscular transmission in insects: effect of injected chemical agents, *Comp. Biochem. Physiol.*, **21**: 115–124, 1967.
- [120] MEKATA F., Electrophysiological studies of the smooth muscle cell membrane of the rabbit common carotid artery, *J. Gen. Physiol.*, **57**: 738–751, 1971.
- [121] MILLER T., Role of cardiac neurons in the cockroach heartbeat, *J. Insect Physiol.*, **14**: 1265–1275, 1968.
- [122] MILLER T., Intracellular potential characteristics of some orthopteroid insect hearts, *Comp. Biochem. Physiol.*, **40A**: 761–769, 1971.
- [123] MUMMERT H., GRADMANN D., Voltage dependent potassium fluxes and the significance of action potentials in *Acetabularia*, *Biochim. Biophys. Acta*, **443**: 443–450, 1976.
- [124] NAGAI T., Insect visceral muscle. Ionic dependence of electrical potentials in the proctodeal muscle fibres, *J. Insect Physiol.*, **18**: 2299–2318, 1972.
- [125] NAGAI T., Insect visceral muscle. Excitation and conduction in the proctodeal muscles, *J. Insect Physiol.*, **19**: 1753–1764, 1973.
- [126] NAGAI T., BROWN B. E., Insect visceral muscle. Electrical potentials and contraction in fibres of the cockroach proctodeum, *J. Insect Physiol.*, **15**: 2151–2167, 1969.
- [127] NASTUK W. L., HODGKIN A. L., The electrical activity of single muscle fibres, *J. Cell. Comp. Physiol.*, **35**: 39–73, 1950.
- [128] NERNST W., *Pflügers Arch.*, **122**: 275–314, 1908; wg [88].
- [129] NIEDEGERKE R., ORKAND R. K., The dependence of the action potential of the frog's heart on the external and intracellular sodium concentration, *J. Physiol.*, **184**: 312–334, 1966.
- [130] OLSZEWSKA E., Charakterystyka mięśniowych zjawisk elektrycznych w rozwoju larwalnym mącznika młynarka (*Tenebrio molitor* L.), *Stud. Soc. Sci. Torunensis, Sectio G (Physiologia)*, **3–4**: 1–31, 1972.
- [131] OSTERHOUT W. J. V., Physiological studies of single plant cells, *Biol. Rev.*, **31**: 369–411, 1931.
- [132] OVERTON E., *Pflügers Arch.*, **92**: 346–386, 1902; wg [88].
- [133] PARNAS I., DAGAN D., Electrical and mechanical properties of abdominal extensor muscles of the prawn *Palaemon elegans*, *Comp. Biochem. Physiol.*, **28**: 359–369, 1969.
- [134] PARNAS I., ABBOTT B. C., LANG F., Electrophysiological properties of *Limulus* heart and the effect of drugs, *Am. J. Physiol.*, **217**: 1814–1822, 1969.
- [135] PARNAS I., ABBOTT B. C., SHAPIRO B., LANG F., Neuromuscular system of *Limulus* leg closer muscle, *Comp. Biochem. Physiol.*, **26**: 467–478, 1968.
- [136] PATLAK J. B., The ionic basis for the action potential in the flight muscle of the fly, *Sarcophaga bullata*, *J. Comp. Physiol.*, **107**: 1–11, 1976.

- [137] PIEK T., Ionic and electrical properties, [w:] *Insect Muscle*, red. P. N. R. Usherwood, Academic Press, London, New York, San Francisco 1975, 281–336.
- [138] PRASAD K., MacLEOD D. P., Influence of glucose on the transmembrane action potential of guinea-pig papillary muscle, *Circulation Res.*, **24**: 939–950, 1969.
- [139] RANDALL D. J., Functional morphology of the heart in fishes, *Am. Zool.*, **8**: 179–189, 1968.
- [140] RATHMAYER W., Polyneuronal Innervation bei Spinnen, *Naturwissenschaften* **52**: 144, 1965.
- [141] RATHMAYER W., Neuromuscular transmission in a spider and the effect of calcium, *Comp. Biochem. Physiol.*, **14**: 673–687, 1965.
- [142] REUBEN J. P., BRANDT P. W., GARCIA H., GRUNDFEST H., Excitation-contraction coupling in crayfish, *Am. Zool.*, **7**: 623–645, 1967.
- [143] RHEUBEN M. B., The resting potential of moth muscle fibre, *J. Physiol.*, **225**: 529–554, 1972.
- [144] ROZSA K. S., Pharmacological properties of the heart of *Lumbricus terrestris*, *Ann. Inst. Biol. (Tihany) Hung. Acad. Sci.*, **37**: 85–97, 1970.
- [145] RULON R., HERMSMEYER K., SPERELAKIS N., Regenerative action potentials induced in the neurogenic heart of *Limulus polyphemus*, *Comp. Biochem. Physiol.*, **39A**: 333–355, 1971.
- [146] SADOWSKI B., Fizjologia komórki nerwowej i przekaźnictwo synaptyczne, [w:] *Fizjologiczne mechanizmy zachowania*, PWN, Warszawa 1973, 122–152.
- [147] SANBERG P. R., "Neural capacity" in *Mimosa pudica*: a review, *Behavior. Biol.*, **17**: 435–452, 1976.
- [148] SANGER J. W., McCANN F. V., Ultrastructure of the myocardium of the moth *Hyalophora cecropia*, *J. Insect Physiol.*, **14**: 1105–1111, 1968.
- [149] SATOW Y., KUNG C., A regenerative hyperpolarization in *Paramecium*, *J. Comp. Physiol.*, **119**: 99–110, 1977.
- [150] SEYAMA I., IRISAWA H., The effect of high sodium concentration on the action potential of the skate heart, *J. Gen. Physiol.*, **50**: 505–517, 1967.
- [151] SHERMAN R. G., PAX R. A., Electrical activity in single muscle cells of a spider heart, *Comp. Biochem. Physiol.*, **28**: 487–489, 1969.
- [152] SHIBATA S., HOLLANDER P. B., WEBB J. L., The effect of nicotine on the transmembrane potential and contractility of isolated rat atria, *Experientia*, **24**: 236–237, 1968.
- [153] SOMLYO A. P., SOMLYO A. V., Electromechanical and pharmacomechanical coupling in vascular smooth muscle, *J. Pharmac. Exp. Ther.*, **159**: 129–145, 1968.
- [154] STEEDMAN W. M., Microelectrode studies on mammalian vascular muscle, *J. Physiol.*, **186**: 382–400, 1966.
- [155] STEFANI E., CHIARANDINI D. J., Ionic channels in skeletal muscle, *Ann. Rev. Physiol.*, **44**: 357–372, 1982.
- [156] SYSON A. J., HUDDART H., Contracture tension in rat vas deferens and ileal smooth muscle and its modification by external calcium and the tonicity of the medium, *Comp. Biochem. Physiol.*, **45A**: 345–362, 1973.
- [157] TASAKI I., WATANABE A., LERMAN L., A study of the role of divalent cations in excitation of squid giant axons, *Am. J. Physiol.*, **213**: 1465–1474, 1967.
- [158] TAUC L., Réponse de la cellule nerveuse du ganglion abdominal de *Aplysia depilans* à la stimulation directe intracellulaire, *C. R. Acad. Sci., Paris*, **339**: 1537–1539, 1954.

- [159] TERAKAWA S., Excitability of squid axon membrane in the absence of ion-concentration gradient across the membrane, *Uppsala J. Med. Sci.*, **85**: 217-224, 1980.
- [160] TERAKAWA S., Periodic responses in squid axon membrane exposed intracellularly and extracellularly to solutions containing a single species of salt, *J. Membrane Biol.*, **63**: 51-59, 1981.
- [161] TOMITA T., Membrane capacity and resistance of mammalian smooth muscle, *J. Theoret. Biol.*, **12**: 216-227, 1966.
- [162] TOMITA T., Current spread in the smooth muscle of the guinea-pig vas deferens, *J. Physiol.*, **189**: 163-176, 1967.
- [163] TRZEBSKI A., Fizjologia mięśni gładkich, [w:] *Fizjologia człowieka z elementami fizjologii klinicznej*, red. W. Traczyk, A. Trzebski, PZWL, Warszawa 1980, 342-352.
- [164] TWAROG B. M., Excitation of *Mytilus* smooth muscle, *J. Physiol.*, **192**: 857-868, 1967.
- [165] ULBRICHT W., Ionic channels and gating currents in excitable membranes, *Ann. Rev. Biophys. Bioeng.*, **6**: 7-31, 1977.
- [166] USHERWOOD P. N. R., The action of the alkaloid ryanodine on insect skeletal muscle, *Comp. Biochem. Physiol.*, **6**: 181-199, 1962.
- [167] USHERWOOD P. N. R., Insect neuromuscular mechanisms, *Am. Zool.*, **7**: 553-582, 1967.
- [168] USHERWOOD P. N. R., Electrochemistry of insect muscle, [w:] *Advances in Insect Physiology 6*, red. J. W. L. Beament, J. E. Treherne, V. B. Wigglesworth, Academic Press, New York 1969, 205-278.
- [169] USHERWOOD P. N. R., *Układ nerwowy*, PWN, Warszawa 1976.
- [170] USHERWOOD P. N. R., GRUNDFEST H., Peripheral inhibition in skeletal muscle of insects, *J. Neurophysiol.*, **28**: 497-518, 1965.
- [171] Van der KLOOT W. G., The electrophysiology of muscle fibres in the hearts of decapod crustaceans, *J. Exp. Zool.*, **174**: 367-380, 1970.
- [172] WAREHAM A. C., DUNCAN C. J., BOWLER K., Electrogenesis in cockroach muscle, *Comp. Biochem. Physiol.*, **48A**: 799-813, 1974.
- [173] WASHIO H., The ionic requirements for the initiation of action potentials in insect muscle fibers, *J. Gen. Physiol.*, **59**: 121-134, 1972.
- [174] WASHIZU Y., Grouped discharges in ureter muscle, *Comp. Biochem. Physiol.*, **19**: 713-728, 1966.
- [175] WASHIZU Y., Electrical properties of leech dorsal muscle, *Comp. Biochem. Physiol.*, **20**: 641-646, 1967.
- [176] WEISBLAT D. A., BYERLY L., RUSSELL R. L., Ionic mechanisms of electrical activity in somatic muscle of the nematode *Ascaris lumbricoides*, *J. Comp. Physiol.*, **111**: 93-113, 1976.
- [177] WERMAN R., GRUNDFEST H., Graded and all-or-none electrogenesis in arthropod muscle. II. The effects of alkali-earth and onium ions on lobster muscle fibers, *J. Gen. Physiol.*, **44**: 997-1027, 1961.
- [178] WERMAN R., McCANN F. V., GRUNDFEST H., Graded and all-or-none electrogenesis in arthropod muscle. I. The effects of alkali-earth cations on the neuromuscular system of *Romalea microptera*, *J. Gen. Physiol.*, **44**: 979-995, 1961.
- [179] WIERSMA C. A. G., The neuromuscular system, [w:] *The Physiology of Crustaceae*, vol. 2, red. T. H. Waterman, Academic Press, New York 1961.
- [180] WOOD D. W., The effect of ions upon neuromuscular transmission in a herbivorous insect, *J. Physiol.*, **138**: 119-139, 1957.

- [181] WOOD D. W., The sodium and potassium composition of some insect skeletal muscle fibres in relation to their membrane potentials, *Comp. Biochem. Physiol.*, **9**: 151-159, 1963.
- [182] YAMAGUCHI H., LOCKSHIN R. A., WOODWARD D. J., The intersegmental muscles of silkmoths. Ionic components of activity, *J. Insect Physiol.*, **18**: 243-258, 1972.
- [183] YAMAMOTO D., FUKAMI J., Ionic requirements for non-synaptic electrogenesis in the muscle fibres of a lepidopterous insect, *J. Exp. Biol.*, **70**: 41-47, 1977.
- [184] YAMAMOTO D., FUKAMI J., Neuromuscular mechanisms in the insect foregut, *J. Exp. Zool.*, **211**: 71-85, 1980.
- [185] YAMAMOTO D., FUKAMI J., WASHIO H., Voltage clamp studies on insect skeletal muscle. I. The inward current, *J. Exp. Biol.*, **92**: 1-12, 1981.

Nadesłano: 10 grudnia 1982.

Przyjęto: 25 marca 1983.

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

GENEZA POTENCJAŁÓW CZYNNOŚCIOWYCH
I ICH PODŁOŻE JONOWE
II. HIPOTEZA SODOWA I JEJ SPRAWDZANIE*

ACTION POTENTIALS GENESIS AND THEIR IONIC BASIS
II. THE SODIUM HYPOTHESIS AND TESTING OF IT

Maria Jolanta BORKOWSKA

Zakład Fizjologii Zwierząt Instytutu Biologii UMK w Toruniu

Streszczenie. Mechanizm sodowy jest rozpowszechnionym i najlepiej dotychczas poznanym mechanizmem jonowym leżącym u podstaw genezy potencjału czynnościowego. Został on bezspornie wykazany i sprawdzony w wielu rodzajach komórek za pośrednictwem bardziej lub mniej skomplikowanych technik badawczych (głównie metody VC i zastosowania inhibitorów transportu jonów sodowych i potasowych, co pozwoliło na przełomową analizę ruchów jonowych biorących udział w genezie potencjału czynnościowego). Hipoteza sodowa nie jest jednak uniwersalna i w wielu tkankach i komórkach inne jony, np. Ca^{2+} , K^+ czy Cl^- , mogą mieć częściowy lub całkowity udział w genezie potencjałów czynnościowych. Mechanizmy molekularne leżące u podstaw obserwowanych zmian przepuszczalności błony dla poszczególnych jonów i procesów bramkujących (odpowiedzialnych za aktywację i inaktywację kanałów jonowych) wciąż jeszcze nie zostały dokładnie poznane, chociaż i te problemy są coraz bliższe rozwiązaniu dzięki rozwojowi najnowszych technik badawczych.

Summary. The sodium-dependent mechanism is the most widespread and the best known ionic mechanism of action potential genesis. It has been undeniably demonstrated and tested by means of more or less complicated techniques (esp. voltage clamp method and the use of sodium and potassium transport inhibitors what enables a critical analysis of the ionic movements involved in action potential generation) in many kinds of cells. However the sodium hypothesis is not universal, and other ions, esp. Ca^{2+} , K^+ or Cl^- , can participate in action potential genesis, in many tissues and cells. Molecular mechanisms underlying the observed membrane permeability changes to individual ions and gating mecha-

* Praca wykonana w ramach Problemu Międzyresortowego MR/II.

nisms (responsible for activation and inactivation of ionic channels) still await solution, but even these problems become more and more close to the goal thanks to the development of the newest methods of studies.

WYKAZ SKRÓTÓW I SYMBOLI

ACh	— acetylocholina
AP, APs	— potencjał(y) czynnościowy(e) (action potential(s))
DDT	— 1,1,1-trójchloro-2,2-bis(p-chlorofenylo)etan, insektycyd
DNP	— 2,4-dwunitrofenol
E_m , MP	— potencjał błonowy (membrane potential)
E_{Na} , E_K	— potencjał równowagi, odpowiednio, dla jonów sodowych i potasowych
g_{Na} , g_K	— przewodność błony, odpowiednio, dla jonów sodowych i potasowych
I_{Na} , I_K	— prąd, odpowiednio, sodowy i potasowy
P_{Na} , P_K , P_{Cl}	— współczynnik przepuszczalności = stała przenikania, używane również w znaczeniu przepuszczalność błony, odpowiednio, dla jonów sodowych, potasowych i chlorkowych
RP	— potencjał spoczynkowy (resting potential)
STX	— saksitoksyna
TEA	— jon czteroetyloamoniowy
TMA	— jon czterometyloamoniowy
TTX	— tetrodotoksyna
VC	— stabilizacja napięcia (voltage clamp)

1. HIPOTEZA SODOWA

W części I artykułu [28] wspomniano o koncepcji Bernsteina [23, 24], stanowiącej próbę wyjaśnienia AP na drodze prostego załamania się spoczynkowej selektywnej przepuszczalności dla jonów K^+ (dającego falę depolaryzacji), po którym następuje, po przejściu impulsu, przywrócenie przepuszczalności spoczynkowej. Koncepcja ta nie mogła być jednak dłużej akceptowana, gdyż nie daje ona wyjaśnienia, stwierdzonego później, odwrócenia polaryzacji błony w okolicy szczytu iglicy AP ani nie wyjaśnia przepływów jonów Na^+ i K^+ przez błonę, obserwowanych podczas zmiany potencjału błonowego. Pogląd Bernsteina został zastąpiony przez teorię, którą nazywamy obecnie „hipotezą sodową” [87, 88, 91–94, 96], w której zmiana potencjału błonowego podczas AP jest wyjaśniana poprzez gwałtowny, specyficzny i bardzo duży, ale przejściowy, wzrost przepuszczalności błony dla Na^+ , taki że g_{Na} staje się przejściowo znacznie większa niż g_K , tak że E_m przesuwa się w kierunku E_{Na} i w rezultacie na szczycie AP błona komórkowa staje się elektrodą sodową, w której

$$E_m = E_{Na} = \frac{RT}{zF} \ln \frac{[Na]_o}{[Na]_i}, \quad (1)$$

gdzie R oznacza stałą gazową, T — temperaturę bezwzględną, z — wartościowość jonu, F — stałą Faradaya, $[Na]_o$, $[Na]_i$ — stężenia jonów Na, odpowiednio, zewnątrz- i wewnątrzkomórkowe.

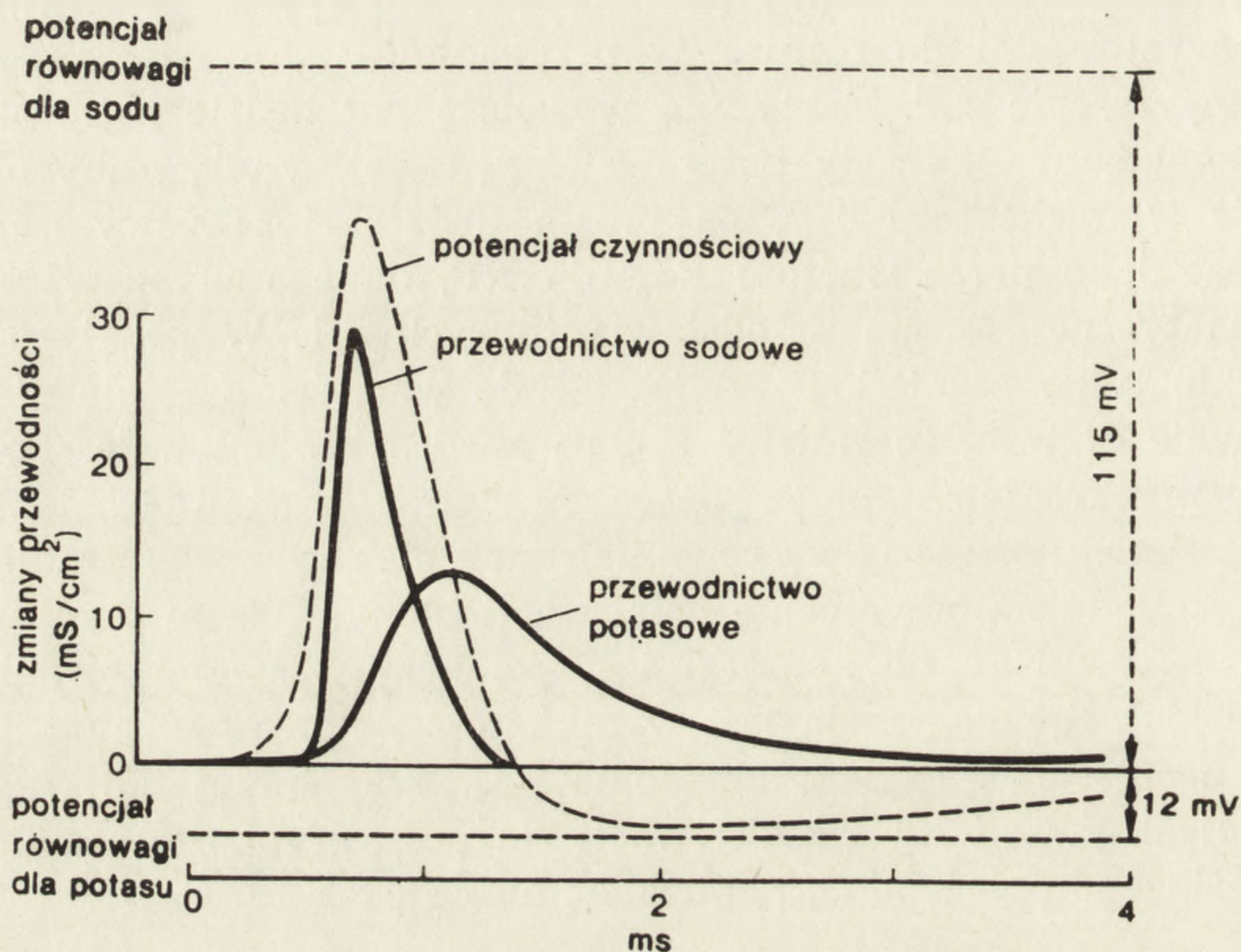
Równanie to daje różnicę potencjałów, która jest przeciwnie skierowana w stosunku do różnicy w przypadku RP, a więc przedstawia ono przewyższenie AP. Faktyczna wysokość AP będzie różnicą pomiędzy potencjałami elektrody potasowej i sodowej, a więc, aby otrzymać wysokość wierzchołka iglicy, po prostu dodaje się przewyższenie AP, które jest dane przez wartość E_{Na} , do RP, danego przez wartość E_K . W schematycznej formie przedstawia to rycina 1. W praktyce jednak E_m zwykle tylko przejściowo zbliża się do wartości E_{Na} , ale nie osiąga jej, głównie dlatego, że zmiany P_{Na} są bardzo krótkotrwałe. Poza tym, podczas przekroczenia przez potencjał iglicowy linii izoelektrycznej (przewyższenie) zostaje odwrócony kierunek elektrycznego gradientu dla Na^+ ze względu na odwrócenie polaryzacji błony. Oba te czynniki ograniczają napływ Na^+ do komórki i wspomagają zapoczątkowanie repolaryzacji [64]. Repolaryzacja jest wynikiem częściowo opóźnionego wzrostu P_K , a częściowo nagłego obniżenia P_{Na} . Przy mniej lub więcej jednoczesnej aktywacji K^+ i inaktywacji Na^+ , E_m szybko wraca do poziomu określonego przez E_K (E_m zbliża się do E_K), tak że

$$E_m = E_K = \frac{RT}{zF} \ln \frac{[K]_o}{[K]_i}; \quad (2)$$

$[K]_o$, $[K]_i$ — stężenia jonów K, odpowiednio, zewnątrz- i wewnątrzkomórkowe. Jeśli E_K nie pokrywa się dokładnie z RP, wówczas przez krótki czas (kilka ms) bezpośrednio po AP, E_m będzie nieco bardziej dodatni lub ujemny niż RP. Te przemijające zjawiska noszą nazwę, jak wspomniano, potencjałów następczych [106, 200, 201]. Wzrost P_K jest dość wolny i osiąga swoje maksimum w momencie, gdy P_{Na} powróciła niemal do wartości wyjściowych (ryc. 1) [201].

Hodgkin i Katz [96] stwierdzili, że zmiana MP, wynikająca ze zmian zewnątrzkomórkowego stężenia K^+ , mogłaby być wyjaśniona, jeśli przyjmując, że stosunek biernych przepuszczalności błony wynosi: $P_K : P_{Na} : P_{Cl} = 1 : 0,04 : 0,45$. Ponadto potrafili oni wyjaśnić ilościowo wewnątrzkomórkowy dodatni AP, przyjmując 500-krotny wzrost P_{Na} w stanie aktywnym, tak aby uzyskać stosunek $P_K : P_{Na} : P_{Cl} = 1 : 20 : 0,45$. Był to pierwszy dowód, że hipoteza sodowa, czyli idea selektywnego wzrostu P_{Na} , może wyjaśniać odwrócenie transmembranowego potencjału podczas impulsu nerwowego. W mięśniach owadów (przynajmniej niektórych), które generują odpowiedzi stopniowane, stosunek P_K do P_{Na} jest dużo mniejszy i wynosi $1 : 1,5$ [206]. Boyle i Conway [32] z kolei wykazali, że wewnątrz-

komórkowe stężenie Na^+ we włóknach mięśniowych żaby stanowi około $1/8$ stężenia tych jonów w płynie pozakomórkowym; a więc wzrost P_{Na} mógłby dawać w efekcie powstanie AP.



Ryc. 1. Obliczone zmiany potencjału błonowego oraz przewodności błony dla Na^+ i K^+ podczas rozprzestrzeniającego się AP w aksonie olbrzymim kałamarnicy. Temperatura $18,5^\circ\text{C}$ (według [94])

Proponowana wzajemna zależność E_m i E_{Na} może być poddana z różnych stron analizie doświadczalnej. Po pierwsze, możliwe jest sprawdzenie czy zarejestrowany E_m jest równy potencjałowi elektrody sodowej poprzez zmierzenie $[\text{Na}]_i$ i obliczenie E_{Na} . Po drugie, ponieważ hipoteza sodowa proponuje, że przewyższenie AP jest proporcjonalne do logarytmu $[\text{Na}]_o$, więc doświadczalnie mierzony AP powinien zmieniać się wraz ze zmianą $[\text{Na}]_o$ w sposób dający się dokładnie przewidzieć. Po trzecie, jeśli gradient elektrochemiczny dla Na^+ zostaje zmieniony, szybkość narastania AP powinna zmieniać się w sposób możliwy do przewidzenia. Po czwarte, badania metodą VC, obejmujące użycie inhibitorów transportu Na^+ , powinny ujawnić blok prądu sodowego w błonie wraz z równoległym blokiem elektrogenyzy iglicy.

Przed przejściem do rozważań nad rozprzestrzenianiem się AP, co jest bardzo istotne ze względu na zadania, jakie on spełnia, i aktywacją włókna, niezbędne jest systematyczne rozpatrzenie dowodów wymienionych linii badań, w celu określenia dokładnego charakteru zjawiska AP i procesów rządzących jego elektrogenezą.

2. SPRAWDZANIE HIPOTEZY SODOWEJ

2.1. OBLICZANIE POTENCJAŁU RÓWNOWAGI DLA JONÓW SODOWYCH

Znając transmembranowy gradient Na^+ można obliczyć wielkość E_{Na} i przez dodanie jej do odpowiadającej wartości E_{K} , można określić przewidywany AP. Stwierdzono, że potencjał ten rzadko dokładnie pokrywa się z rzeczywistym AP, zarejestrowanym za pomocą elektrod wewnątrzkomórkowych. Ta rozbieżność częściowo wynika z faktu, że E_{K} może być niewiele, albo nawet do 10 lub 15 mV, większy niż rejestrowany RP, a w dodatku E_{Na} jest zawsze większy niż mierzone przewyższenie. W niektórych przypadkach E_{Na} może przekraczać faktyczne przewyższenie o 20–30 mV. Mogłoby to budzić pewne wątpliwości co do słuszności hipotezy sodowej. Dzięki nowoczesnym technikom badawczym wykazano jednak bezspornie, że tylko część sodu we włóknie mięśniowym jest w stanie wolnym i zdolna jest brać udział w procesach elektrogenicznych (według [102]). Niemożliwe jest naprawdę dokładne obliczenie transmembranowego gradientu sodowego, a więc trudno się spodziewać, aby wzajemna zależność pomiędzy przewidywanym E_{Na} a zarejestrowanym przewyższeniem mogła być dokładna, ani zarejestrowany AP nie musi być koniecznie zbliżony do przewidzianego na podstawie sumy E_{K} i E_{Na} . Nawet jeśli przytoczone dane wydają się kwestionować twierdzenie o dokładnej zależności pomiędzy E_{Na} a przewyższeniem AP, nie pomniejsza to w żaden sposób przytłaczającej masy dowodów, że rozwój AP jest związany, po pierwsze, z wejściem netto Na^+ do włókna podczas wstępującej fazy potencjału i utratą netto K^+ podczas fazy repolaryzacji, jak zaproponowano w hipotezie sodowej [89, 102, 210].

2.2. DOWODY RUCHÓW JONOWYCH PODCZAS AKTYWNOŚCI

Dalszej weryfikacji teorii jonowej dostarczyły pomiary rzeczywistych ruchów jonowych, przy użyciu radioizotopów [89, 109, 119, 120, 183, 184]. Bezpośrednie pomiary tych ruchów za pomocą izotopów jako znaczników i różnorodnych czułych metod analizy chemicznej, takich jak fotometria płomieniowa czy analiza aktywacji, mają oczywiście olbrzymie znaczenie dla sprawy badań natury AP. Ilości jonów są zwykle podawane w pikomolach (pmol) na cm^2 błony; 1 pmol równa się liczbie $6,02 \times 10^{11}$ jonów [88]. Większość tego rodzaju badań została wykonana w ostatnich latach, ale rozważymy pokrótce tylko niektóre doświadczenia. Ilość K^+ , którą akson traci podczas jednego impulsu, została po raz pierwszy wyliczona przez Hodgkina i Huxleya [90] na około 1 pmol/ cm^2 , co odpowiada zaledwie około 1/1000000 całej ilości K^+ we włóknie. Jest to więc bardzo mała utrata K^+ , podobnie jak podwyższenie wewnątrz-

komórkowego stężenia Na^+ . Pomimo że ilości jonów przenikających przez błonę podczas impulsu są małe, musi istnieć jakiś mechanizm, który usuwałby jony Na^+ z komórki i ponownie wcielał utracone jony K^+ do fazy wewnątrzkomórkowej tak, aby ponownie naładować baterie sodową i potasową, gdyż w przeciwnym wypadku wielkość AP mogłaby zmniejszać się z każdym kolejnym bodźcem. Zaistniałe zaburzenia stosunków jonowych w komórce są jednak bardzo szybko niwelowane i baterie są ponownie ładowane dzięki aktywności pompy jonowej [88, 200]. Nic jednak dziwnego, że ze względu na bardzo małe ilości jonów przechodzących przez błonę, nawet jeśli aktywność pompy zostanie zahamowana, akson mątwy zdolny jest generować kilkaset tysięcy impulsów korzystając po prostu ze swego zapasu nagromadzonych jonów bez ponownego naładowywania go [88, 97, 116, 200].

Za pomocą izotopów ^{24}Na i ^{42}K Rothenberg [184] potwierdził wpływ K^+ podczas stymulacji ($2,6\text{--}6,5 \text{ pmol/cm}^2$); poza tym Na^+ przenikał w tym samym czasie do komórki. Zostało to potwierdzone również przez badania Keynesa i Lewisa [119, 120] oraz Rojasa i Canessa-Fischera [183] nad ruchem radioaktywnych jonów Na i K przez błonę aksonów olbrzymich kilku gatunków głowonogów. Wykazano, że w aksonach *Sepia* pojedynczy impuls powoduje wejście netto $3,7 \text{ pmol/cm}^2$ Na^+ i wyjście netto $4,3 \text{ pmol/cm}^2$ K^+ [119], w aksonach *Loligo* te ilości były, odpowiednio, $3,5\text{--}3,8 \text{ pmol/cm}^2$ i $3\text{--}4 \text{ pmol/cm}^2$ [120]. Niewiele też odbiega wynik uzyskany w przypadku aksonu *Dosidicus gigas*, jeśli chodzi o jony Na — 5 pmol/cm^2 [183]. Przejście impulsu powoduje też przejściowy wzrost wejścia jonów Ca do aksonu mątwy. To dodatkowe wejście Ca^{2+} wynosi mniej niż $0,05 \text{ pmol/cm}^2$ na impuls [198]. Wydaje się prawdopodobne, że wejściu tych jonów towarzyszy raczej wysoka przepuszczalność dla Na^+ niż dla K^+ , gdyż utrzymywana — w wyniku zwiększonego zewnątrzkomórkowego stężenia K^+ — depolaryzacja daje dużo mniejszy efekt [98]. Późniejsze badania ilości jonów K wypływających podczas AP z aksonów kałamarnicy mówią o ilości 9 pmol/cm^2 [88], co miałyby odpowiadać wartości około 100 dla przepływu kationów w każdym indywidualnym kanale w czasie jednego impulsu [181]. Znając przebieg w czasie prądów jonowych podczas AP można również opracować pośrednią metodę obliczania, jak wiele Na^+ czy K^+ powinno przejść przez błonę podczas jednego impulsu [91]. Obliczenia dla rozprzestrzeniającego się AP wykonane zgodnie z modelem matematycznym Hodgkina-Huxleya [94], o którym będzie mowa w części III artykułu [29], pozwoliły sugerować wejście netto Na^+ w ilości $4,33 \text{ pmol/cm}^2$ i utratę K^+ wielkości $4,26 \text{ pmol/cm}^2$; takie też wartości podają FitzHugh i Cole [56] z niewielkimi tylko różnicami na drugim miejscu po przecinku. Przewidziane wartości są więc bardzo bliskie wartościom otrzy-

manym doświadczalnie z pomiarów radioizotopowych wykonanych na głowonogach [119, 120, 183]. Zupełnie niedawno Cohen i Landowne [40] wykazali, że całkowite wnikanie Na^+ w czasie depolaryzacji, określone przepływem znaczników, jest około 10^{-11} mol/cm², niezależnie od temperatury; jest to chyba jedyna wartość tak bardzo odbiegająca od innych danych. Ogólnie można zakładać, że podczas pobudzenia przepływ Na^+ jest w przybliżeniu równy przepływowi K^+ [36].

Wiadomo, że wejście Na^+ będzie powodowało rozbudowywanie dodatniego ładunku po wewnętrznej stronie błony aksonu, czyniąc E_m bardziej dodatnim, a wyjście K^+ będzie likwidowało ten efekt. Dlatego można słusznie sugerować, na podstawie wyników badań Keynesa [119], że faza narastania AP powstaje w wyniku dokomórkowego ruchu Na^+ , a faza opadania — w wyniku odkomórkowego ruchu K^+ . Jeśli sugestia ta jest prawidłowa, możliwe powinno być wykazanie, że ilość jonów Na wchodzących do aksonu jest dostateczna, aby spowodować obserwowane zmiany E_m . Ładunek Q (mierzony w kulombach) przy pewnej pojemności C (mierzonej w faradach) jest równy

$$Q = CV,$$

gdzie V jest napięciem przy danej pojemności. Jeśli ten ładunek jest kreowany przez jon jednowartościowy, liczba moli jonów n , przechodzących z jednej strony błony na drugą, wynosi:

$$n = CV/F.$$

W przypadku aksonu C równe jest $1 \mu\text{F}/\text{cm}^2$, a V (amplituda AP) — około 110 mV. Zatem mamy

$$n = \frac{10^{-6} \times 0,11}{10^5} \text{ mol/cm}^2 = 1,1 \text{ pmol/cm}^2,$$

co stanowi zaledwie około 1/3 obserwowanego wejścia Na^+ . Wynika z tego, że przepływ netto Na^+ jest więcej niż wystarczający, aby spowodować zmianę MP podczas AP [5, 88]. Otrzymaną doświadczalnie większą ilość sodu wchodzącego do komórki można łatwo wyjaśnić. Poza ładowaniem pojemności błony w czasie trwania wstępującej fazy AP, dużo wchodzących jonów Na ulega natychmiast wymianie z K^+ , szczególnie podczas wczesnej części fazy zstępującej, kiedy przepuszczalność dla obydwu jonów jest wysoka. Obniżenie temperatury, które zwiększa czas trwania AP, powinno zwiększać ilości jonów przechodzących przez błonę w czasie impulsu, a to zostało właśnie doświadczalnie wykazane (według [88]).

Jeśli chodzi o bezrdzenne włókna nerwowe ssaków, to Keynes i Ritchie [121] stwierdzili, że utrata K^+ podczas jednego impulsu wynosi w nich $1 \text{ pmol}/\text{cm}^2$, a więc jest mniejsza niż w jakimkolwiek innym

badanym nerwie. Ilości Na^+ i K^+ , które przechodzą przez powierzchnię aksonu z osłonką mielinową, są dużo mniejsze niż te ilości w aksonie podobnej wielkości, ale bez osłonki. Można się było tego spodziewać, ponieważ prądy jonowe koncentrują się w przewężeniu, a pojemność elektryczna osłonki mielinowej jest dużo mniejsza ($0,005 \mu\text{F}/\text{cm}^2$) niż pojemność błony pojedynczej komórki ($3-7 \mu\text{F}/\text{cm}^2$) [57, 88]. Jednakże, jak wykazał Shanes [186], zależność pomiędzy liczbą poruszających się jonów a całkowitą pojemnością na jednostkę długości jest podobna do zależności w aksonie bez osłonki. Opierając się na badaniach Asano i Hurlbuta [13] nad zyskiem Na^+ i utratą K^+ w rdzennym nerwie kulzowym żaby, można obliczyć, że ilość Na^+ , która wchodzi do odcinka włókna długości 1 cm w czasie jednego impulsu, jest około 5×10^{-5} pmol, a ilość wychodzącego K^+ jest $3,6 \times 10^{-5}$ pmol, przy teoretycznym minimum — $1,6 \times 10^{-5}$ pmol; te dwie ilości są zatem w mniej więcej tym samym stosunku, co w olbrzymich aksonach. Interesujące jest porównanie gęstości ruchu jonowego w aksonie bez osłonki i przewężeniu. W aksonie bezrdzennym około 20 000 jonów Na przechodzi przez $1 \mu\text{m}^2$ powierzchni w czasie jednego impulsu, a w przewężeniu liczba ta wynosi 300 000, co zgadza się z obserwacją, że gęstości prądów jonowych są około 10-krotnie większe w przewężeniu niż w olbrzymich aksonach. Przypuszczano więc, że miejsca, w których jony przechodzą przez błonę, są bardziej zagęszczone w przewężeniu niż w błonie bezrdzennego aksonu [88]. Potwierdziły to wyniki najnowszych badań przedstawione w części IV pracy [30].

Badania pojedynczych włókien mięśniowych żaby wykazały, że komórki te, mające niezwykle dużą pojemność błonową, charakteryzują się również większymi ruchami jonów niż nerw [88]. Hodgkin i Horowicz [89] wykazali, że przejście pojedynczego AP powoduje we włóknach mięśnia półbłoniastego żaby wejście netto Na^+ w ilości $15 \text{ pmol}/\text{cm}^2$ powierzchni błony i utratę netto K^+ w ilości $10 \text{ pmol}/\text{cm}^2$ i nawet jeśli pojemność błony jest tak wysoka jak $5-10 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ [52], ilości Na^+ i K^+ przekraczających tę powierzchnię są wciąż więcej niż dostateczne, aby generować zmianę elektryczną [88]. W tych ważnych badaniach tak Keynes [119], jak i Hodgkin i Horowicz [89] badali również obrót ^{42}K i ^{24}Na , odpowiednio, we włóknie nerwowym i mięśniowym tak w spoczynku, jak i po stymulacji i ich wyniki stanowią główny dowód podtrzymujący sodową hipotezę generowania AP w tych komórkach. Ich technika doświadczalna polegała na nasyceniu pojedynczych włókien ^{24}Na przez umieszczenie żywych włókien w roztworze soli z radioaktywnym izotopem przez określony czas. Ilość izotopu wchłoniętego przez włókno w spoczynku i podczas stymulacji była mierzona licznikiem. W tych samych warunkach badane było również wyjście ^{42}K z po-

jedynczych włókien „obciążonych” dodatkowo tym izotopem. Doświadczenia te wykazały bezspornie, że jony Na wchodzą podczas AP do włókna, a jony K wychodzą. W późniejszych badaniach stwierdzono, że podczas jednego impulsu jony Na wchodzą w ilości 27,4 pmol/cm² powierzchni włókna mięśniowego, u jednego gatunku żaby [202], czy — 19,4 pmol/cm² — u innego gatunku żaby, gdzie ilość wychodzących jonów K była 11,4 pmol/cm² [89] — co według Ritchie i wsp. [181] odpowiadałoby przejściu około 180 kationów przez pojedynczy kanał włókna mięśniowego żaby. Uważają oni, że przepływ kationów przez pojedynczy kanał jest względnie stały, w każdym razie w rdzennych włóknach nerwowych, a różne ilości jonów przepływających przez powierzchnię 1 cm² błony wiążą się z różną gęstością kanałów w różnych preparatach.

Doświadczenia izotopowe stanowią bardzo dobry miernik całkowitej wymiany jonów występującej podczas stymulacji, nie pozwalają one jednak na analizę zależności w czasie pomiędzy przemieszczaniem się Na⁺ i K⁺ a różnymi fazami AP. Wpływ zmieniającego się zewnątrzkomórkowego stężenia Na⁺ na kształt i czas narastania AP wskazuje, że jony Na wchodzą do komórki podczas wstępującej fazy AP, ale tylko jedne badania (wyplywu radioaktywnego izotopu — wykonane przez Wilde [210] na sercu żółwia) niedwuznacznie wykazały, że w czasie fazy zstępującej AP opuszczają włókno jony K — co doskonale zgadza się z wyjaśnieniem repolaryzacji błony podanym w hipotezie sodowej. Bardziej szczegółowy obraz ruchów jonowych podczas aktywności można uzyskać jedynie za pomocą metod elektrycznych (VC), które zostaną omówione w rozdziale 2.5.

Najbardziej przekonującego przedstawienia wnikania Na⁺ podczas aktywności dostarczył Atwater i wsp. [16], którzy mierzyli je w doświadczeniach wykonanych metodą VC na wewnątrznie perfundowanych aksonach jednego z głowonogów. Byli oni w stanie wykazać, że mierzone w czasie impulsu wejście Na⁺ stanowiło przynajmniej 0,92 obliczonego przepływu jonowego i że potencjał, przy którym mierzony przepływ jonowy zniknął, był taki sam jak potencjał odwrócenia dla wczesnego prądu dokomórkowego. Tak więc rozwój techniki VC i badań nad preparatem aksonu kałamarnicy pozwolił na jeszcze dokładniejszą weryfikację hipotez dotyczących ruchów jonowych podczas AP.

2.3. WPŁYW ZEWNĄTRZKOMÓRKOWEGO STĘŻENIA JONÓW SODOWYCH NA AP

Drugim testem na sprawdzenie hipotezy sodowej jest zmiana zawartości Na⁺ w środowisku kąpieli i obserwacja wpływu tej zmiany na AP badanych komórek. Hodgkin i Katz [96], w celu sprawdzenia sodowej teorii AP, mierzyli wysokość potencjału w aksonach olbrzymich

kałamarnicy, umieszczanych w roztworach zawierających różne stężenia Na^+ . Stwierdzili oni, że brak tych jonów w środowisku znosi APs. Wykazano też, że obniżona zawartość tych jonów, a więc zmniejszony E_{Na} , redukuje wysokość AP, podczas gdy w przypadku podwyższenia stężenia Na^+ w roztworze wysokość AP ulegała zwiększeniu. Ponadto wykazano, że nachylenie krzywej obrazującej zależność wysokości AP od $\log_{10} [\text{Na}]_o$ jest bliskie wartości 58 mV na jednostkę, z wyjątkiem bardzo niskich stężeń Na^+ , gdzie brak przewodności był immanentny, a więc aktywna błona wyraźnie zachowywała się jak elektroda sodowa, zgodnie z sodową wersją równania Nernsta (równanie (1)), zakładając, że $[\text{Na}]_i$ jest utrzymywane na względnie stałym poziomie. Wykazano też, że przewyższenie AP w mięśniach szkieletowych świnki morskiej zmniejsza się w miarę zmniejszania się zawartości Na^+ w środowisku kąpieli, czyli redukcji E_{Na} , a kiedy ta zawartość została dostatecznie obniżona, AP przestał osiągać poziom 0 mV. W miarę stopniowej dalszej redukcji $[\text{Na}]_o$ błona włókna mięśniowego stawała się niezdolna do generowania potencjału iglicowego, a jedyną odpowiedzią błony na stymulację, która pozostała, był potencjał lokalny [54]. Podobne wyniki uzyskano w różnych innych elektrycznie pobudliwych komórkach, włączając rdzenne aksony żaby [103], aksony [154] i mięśnie [105] owadów, włókna szybkich mięśni szkieletowych żaby [165], włókna mięśnia sercowego ssaków [47]. Desmedt [46] wykazał w swoich badaniach robionych na mięśniach żaby, że przewyższenie AP zależy od stosunku $[\text{Na}]_i/[\text{Na}]_o$ przez błonę, niezależnie od tego czy $[\text{Na}]_o$ było zmieniane, czy też $[\text{Na}]_i$. Przewyższenie AP zmieniało się odwrotnie proporcjonalnie do $[\text{Na}]_i$, czego należało się spodziewać. Metoda perfuzji wewnątrzkomórkowej dała możliwość redukcji E_{Na} metodą alternatywną, przez zwiększanie wewnątrzkomórkowego stężenia Na^+ . Kiedy zostało to wykonane, stwierdzono, że przewyższenie AP ulega redukcji, tak jak spodziewano się [5, 17, 196]. W wielu laboratoriach rozpoczęto doświadczenia metodą VC przy użyciu perfundowanych aksonów [2, 3, 11, 144, 197] i wszystkie one potwierdziły ruchy sodowo-potasowe podczas pobudzenia, oryginalnie postulowane przez Hodgkina i Huxleya [91–93]. Inne z kolei badania, wykonane tą metodą, pozwoliły na wykazanie możliwości wytwarzania dwujonowych APs przez aksony głowonogów, perfundowane rozcieńczonym roztworem zawierającym jeden z następujących jednowartościowych kationów: Na, Cs, Li, cholina, guanidyna, TMA, podczas gdy środowisko zewnątrzkomórkowe zawierało tylko sole kationów dwuwartościowych (Ca, Sr) (według [36]). Technika perfuzji wewnątrzkomórkowej dała w wyniku lepsze zrozumienie jonowych wymagań dla pobudzenia i przyniosła postęp w wyjaśnieniach molekularnego mechanizmu procesu pobudzenia [1, 36].

Badania aksonów metodą wewnątrzkomórkowej perfuzji wykazały również, że aniony wewnątrzkomórkowe wywierają pewien wpływ na tę część błony, która jest związana z przewodnością błony [22]. Badania wpływu różnych kationów wewnątrzkomórkowych na początkowy, przejściowy prąd sodowy i opóźnione prądy błonowe wykazały, że niektóre z nich hamują lub zakłócają błonową przepuszczalność [1, 36].

Dowody uzyskane ze wszystkich tych badań wyraźnie wskazują, że iglicowy AP jest zjawiskiem związanym z Na^+ i jego wielkość określana jest wyłącznie przez transmembranowy gradient sodowy, a przejściowa zmiana błonowej przepuszczalności dla Na^+ odgrywa główną rolę w inicjacji potencjału iglicowego. Teoria sodowa wydaje się zatem mieć dobre ogólne zastosowanie, chociaż pewne komórki, np. włókien mięśniowych niektórych stawonogów [14, 15, 53, 74, 105, 200, 213, 214], niektórych mięśni wisceralnych kręgowców [100] czy rozwijających się mięśni szczura [123], stanowią wyjątek. Jest wiele pobudliwych tkanek i komórek (tj. włókna mięśniowe stawonogów [53], owadów [209, 214], zwoje rdzenia kręgowego żaby [128] czy międzywęzła glonu *Nitella* [171]), które utrzymują zdolność wytwarzania AP w środowisku zawierającym tylko sole kationów dwuwartościowych.

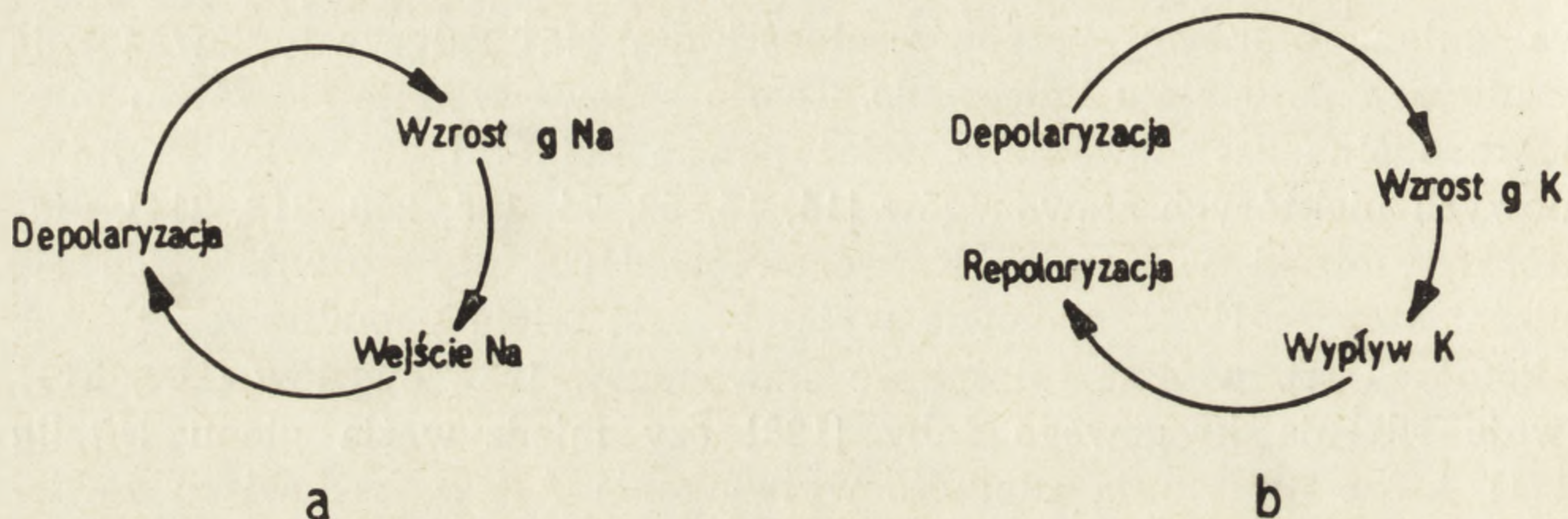
2.4. SZYBKOŚĆ NARASTANIA AP

Wnioskując dalej z hipotezy sodowej należy sądzić, że jeśli jony Na są czynnikami elektrogenicznymi odpowiedzialnymi za niesienie prądu dokomórkowego podczas wstępującej fazy AP, to zmiana elektrochemicznego gradientu dla Na^+ powinna mieć wpływ na szybkość rozwoju AP. Jeżeli błona komórkowa staje się chwilowo elektrodą sodową podczas wstępującej fazy AP, wówczas redukcja $[\text{Na}]_o$ będzie redukowałą potencjał baterii sodowej kierującej jony Na do włókna zgodnie z ich gradientem elektrochemicznym i w ten sposób będzie zmniejszała szybkość rozwoju iglicy. Zagadnienie to było niedawno badane w mięśniach szkieletowych żaby [104, 136] i ssaków [54] oraz wcześniej — w komórkach nerwowych [96], a wyniki tych badań potwierdzają w całej rozciągłości hipotezę sodową. Można z całą pewnością wnioskować, że iglica AP badanych przez wymienionych autorów komórek jest zjawiskiem, które zawdzięcza swą genezę dokomórkowemu prądowi niesionemu przez jony Na zgodnie z ich gradientem elektrochemicznym. Szybkość opadania AP jest z grubsza proporcjonalna do wewnątrzkomórkowego stężenia K^+ [46].

2.5. BADANIA AP METODĄ STABILIZACJI NAPIĘCIA

2.5.1. Pomiary prądów błonowych. Hipoteza sodowa proponuje imponujący, olbrzymi wzrost P_{Na} podczas wstępującej fazy AP, po którym

następuje wzrost P_K podczas fazy repolaryzacji (prostowania). Te ruchy jonowe przez błonę są przedstawiane jako prądy jonowe i pomiar tych prądów przy różnych poziomach E_m stanowi przełomowy sprawdzian hipotezy sodowej. Jeśli hipoteza ta jest słuszna, to początkowa depolaryzacja, dzięki której powstaje AP, musi dawać w wyniku wzrost g_{Na} , a z kolei ten wzrost przewodności będzie sam przez się powodował dalszą depolaryzację. W ten sposób mamy do czynienia z układem sprzężenia zwrotnego dodatniego (ryc. 2), bardzo trudnym do analizy. Na



Ryc. 2. Wpływ depolaryzacji na przewodność jonową dla Na^+ i K^+ w błonie aksonu (według [5]). a. sód — pętla sprzężenia zwrotnego dodatniego, b. potas — pętla sprzężenia zwrotnego ujemnego

szczęście trudności te zostały przezwyciężone dzięki rozwinięciu w czasie ostatnich 30 lat specjalnej techniki (znanej jako metoda voltage clamp) kontroli napięcia czy stabilizacji napięcia, w której wpływ g_{Na} na E_m jest eliminowany przez prąd przechodzący przez błonę, tak aby utrzymać stały E_m na każdym żądanym poziomie [91–94, 99]; tak więc metoda ta, umożliwiającą czasowe i przestrzenne ustalenie potencjału błonowego, pozwala na pomiar prądów błonowych w odpowiedzi na z góry ustalone depolaryzacje, podczas gdy potencjał błonowy jest sztucznie utrzymywany na określonym, z góry wybranym poziomie.

Prąd płynący w normalnych warunkach przez błonę aksonu przypuszczalnie składa się z dwóch komponent, pewnego prądu pojemnościowego (tj. zmiany w gęstości ładunku przy wewnętrznej i zewnętrznej powierzchni błony) i pewnego prądu jonowego (tj. przejścia jonów przez błonę). Zatem całkowity prąd

$$I = C_m \frac{dE}{dt} + I_i, \quad (3)$$

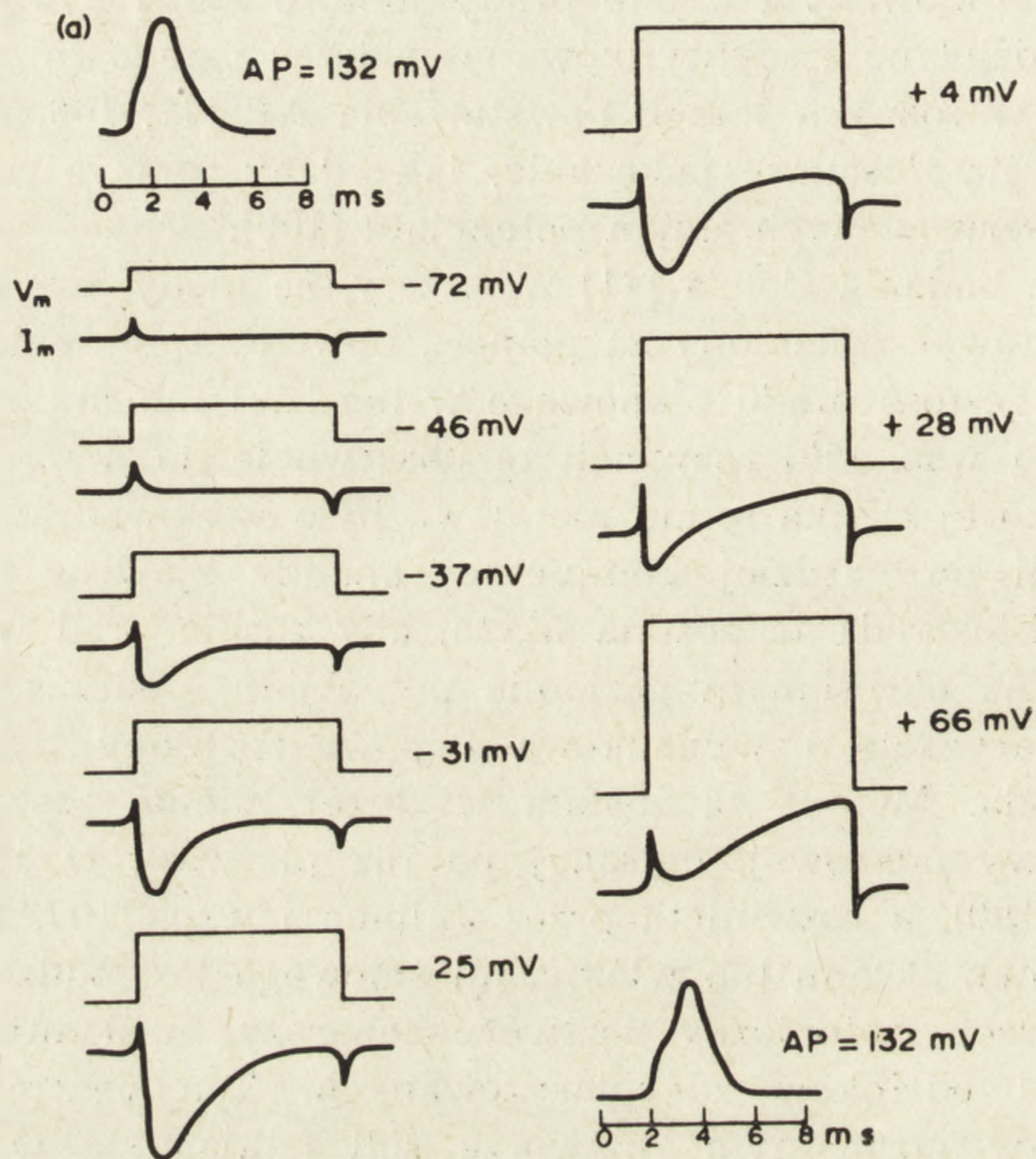
gdzie C_m jest pojemnością błony, E — potencjałem błonowym, I_i zaś prądem jonowym. Zatem kiedy utrzymane jest stałe (stabilizowane) na-

pięcie, $dE/dt = 0$, a więc zapis przepływu prądu daje bezpośredni pomiar całkowitego przepływu jonowego [5]. W ten sposób przy utrzymanym stałym potencjale prąd pojemnościowy, który normalnie rośnie proporcjonalnie do wielkości zmiany E_m i maskuje jonową część prądu, jest eliminowany i czyste prądy jonowe mogą być bezpośrednio mierzone, rozdzielane i identyfikowane podczas całego impulsu nerwowego, a więc w różnych fazach powstawania AP [41, 106, 109]. Metoda VC pozwoliła na ilościowe pokazanie, jak ruchy jonowe powodują powstawanie obserwowanych zmian potencjału [109].

Pionierskie badania Cole'a [41] wykazały, że kiedy MP aksonów kałamarnicy zostawał zmieniony za pomocą obwodu sprzężenia zwrotnego, zmieniała się gęstość prądu błonowego w bardziej lub mniej ciągły sposób. Hodgkin i wsp. [99] rozwinęli tę obserwację do nowoczesnej techniki VC, w której cienka sonda metalowa była wprowadzana do aksonu i doprowadzili do bardziej kompletnej analizy zjawisk zachodzących podczas AP. Elektroda ta została użyta, aby zasilić prąd w celu stabilizacji błony na określonym poziomie potencjału, podczas gdy kontrolowane depolaryzacje i wypadkowa odpowiedź błony były mierzone drugą elektrodą. Metoda ta została w dużej mierze zastąpiona przez metodę przerwy cukrowej, opisaną po raz pierwszy w 1954 r. przez Stämpfliego [190], a rozwinięta przez Juliana i wsp. [107, 108], w której mały odcinek aksonu lub włókna mięśniowego jest oddzielony z każdej strony przez izotoniczny roztwór sacharozy, naśladującej osłonkę mielinową, od odcinków zdepolaryzowanych. Ten centralny odcinek znajduje się w normalnym roztworze soli (stając się w ten sposób „sztucznym węzłem”), podczas gdy odcinki boczne są zanurzone w izotonicznym roztworze KCl w celu zredukowania ich potencjału błonowego do zera. Różnica potencjałów centralnego „węzła” jest mierzona między jedną komorą zawierającą KCl a komorą z normalnym roztworem soli, a prąd płynący przez błonę „węzła” mierzony jest w komorze środkowej przez jej połączenie ze wzmacniaczem, którego wyjściowe napięcie jest proporcjonalne do prądu błonowego. Impulsy prądowe wprowadzane są przez drugą komorę z KCl. Prawdopodobnie prąd podawany jest równy (przy odwrotnym kierunku) prądowi generowanemu przez aktywną błonę. Metoda przerwy cukrowej okazała się szczególnie użyteczna w przypadku aksonów, które są zbyt małe, aby wprowadzać do ich wnętrza elektrody. Szczegółowy opis tej techniki można znaleźć w wielu oryginalnych i przeglądowych pracach (m. in. [107, 141, 142, 190]).

Aksony, głównie duże, ze względu na swoją wielkość i cylindryczną geometrię, były szczególnie atrakcyjnym materiałem dla większości badań metodą VC. Zapisy przedstawione na rycinie 3 są typowymi za-

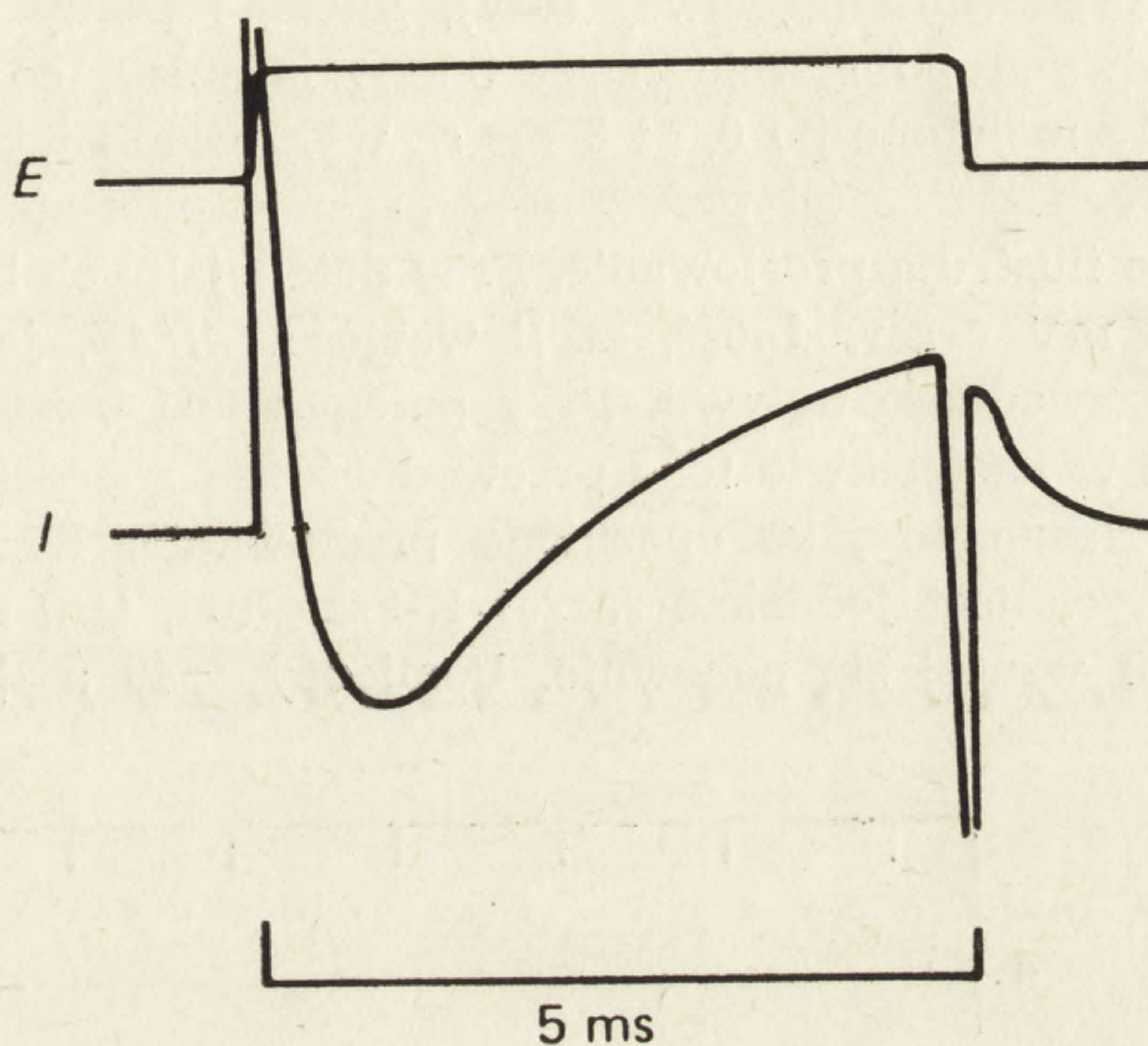
pisami wybranymi spośród uzyskanych w doświadczeniach na aksonach olbrzymich homara [108]. Doświadczenia te rozpoczynały się i kończyły rejestracją AP w warunkach bez stabilizacji, co pozwoliło na wykazanie, iż stabilizacja potencjału komórkowego nie ma żadnego szkodli-



Ryc. 3. Typowa seria prądów błonowych rejestrowanych w aksonie homara w warunkach stabilizacji napięcia ([102] według [108]). Do około -25 mV początkowy prąd dokomórkowy stopniowo zwiększa się, podczas gdy powyżej $+4$ mV opóźniony prąd odkomórkowy zwiększa się. Szczegółowe objaśnienia w tekście. V_m — impuls depolaryzacyjny, z boku jest podany poziom uzyskanej depolaryzacji, I_m — rejestrowany prąd

wego wpływu na przepuszczalność błonową. W miarę jak błona jest stopniowo depolaryzowana, wyraźna staje się faza przepływu prądu dokomórkowego. Przy depolaryzacji błony do około -45 mV zaczyna płynąć mający jakies znaczenie prąd, osiągając maksimum przy około -25 mV. Jeśli polaryzacja błony jest przesuwana dalej w kierunku dodatnim, ten początkowy prąd dokomórkowy zaczyna zanikać i zastępowany jest przez wyraźny wzrost przepływu późnego, dodatniego prądu odkomórkowego. Przepływ początkowego prądu dokomórkowego zanika przy około $+45$ mV i pozostaje tylko prąd odkomórkowy. Jest to interesujący punkt potwierdzający, że impuls potencjału, potrzebny, aby przenieść błonę z poziomu normalnego RP do poziomu, na którym prąd

dokomórkowy wygasa (tj. od -88 mV do poziomu doświadczalnego impulsu, $+45$ mV), jest taki sam jak wysokość normalnego błonowego AP w warunkach niestabilizowanych. Stało się więc oczywiste, że reżimy doświadczalne stabilizacji nie zniekształcają przepływu prądu i że w rzeczywistości stabilizacja jedynie naśladuje zjawiska AP w warunkach niestabilizowanych [102, 107, 108].



Ryc. 4. Schematyczny obraz typowego zapisu uzyskiwanego w warunkach stabilizacji napięcia (zmodyfikowane według [109]). E — potencjał błonowy, I — rejestrowany prąd

Zapis prądu w warunkach VC rozkłada się w sekwencji czasowej na 4 odrębne komponenty prądowe (ryc. 4):

1. Pierwszy szczyt to szybki, przejściowy prąd przez pojemność błonową, wymagany, aby szybko naładować tę pojemność i stworzyć kąt prosty widoczny na początku zapisu potencjału;

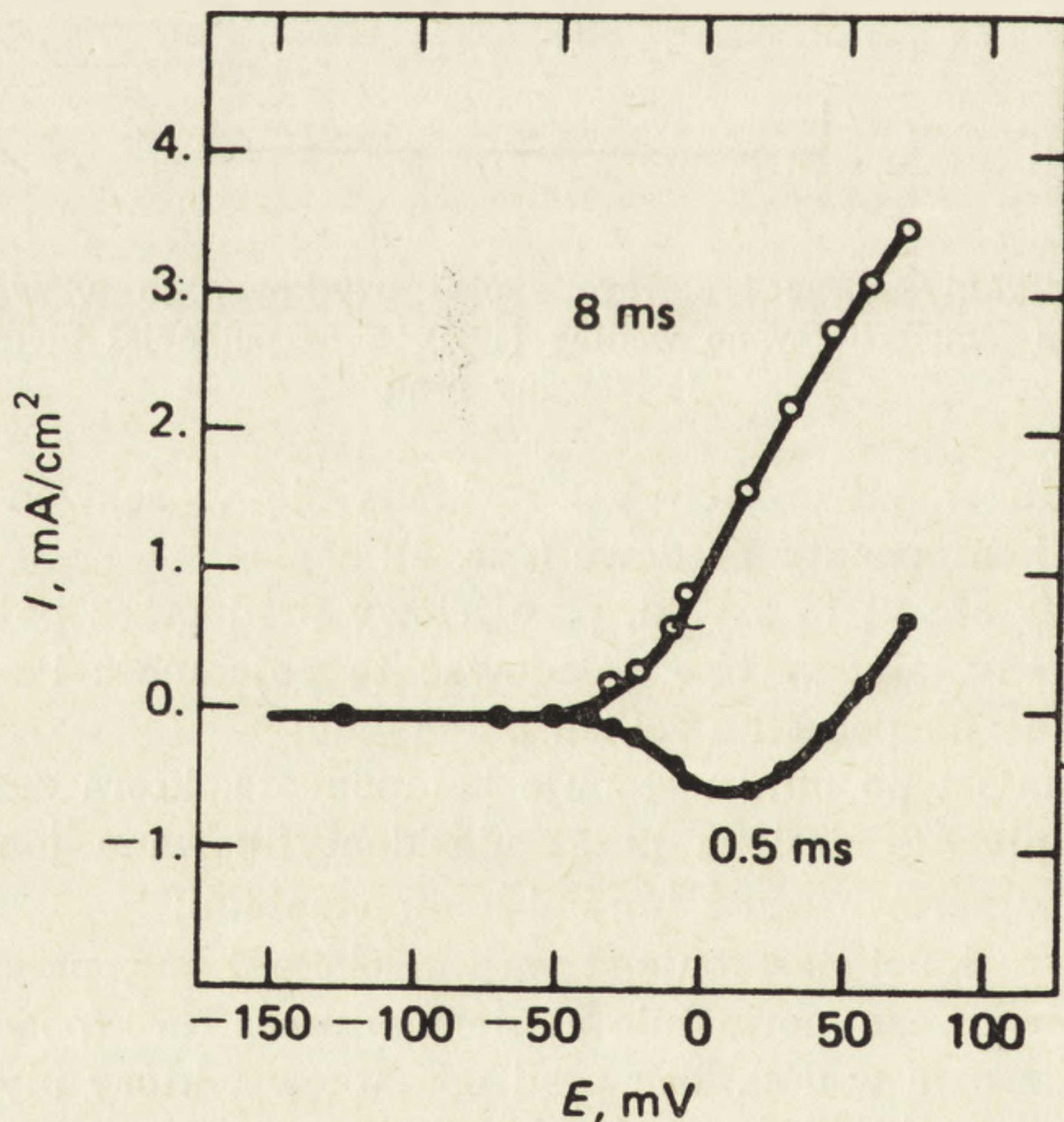
2. Natychmiast po nim następuje komponenta, która została nazwana prądem upływu, niesiona przez niezidentyfikowane jony. Jest ona zwykle mała w porównaniu z innymi komponentami;

3. Po niej z kolei następuje, trwająca około 1 ms, przejściowa faza prądu dokomórkowego, normalnie niesionego przez Na^+ (pokazana w kierunku prowadzącym w dół). Ten prąd początkowy, który płynie do wnętrza (do włókna w kierunku dodatnim), osiągając szczyt w czasie około 1 ms, zmienia kierunek przy, lub blisko, E_{Na} ;

4. Po nim z kolei następuje przepływ odkomórkowego prądu potasowego, który rozwija się wolno do stałego poziomu, który jest utrzy-

mywany dopóki trwa stabilizacja. Wielkość tego prądu jest związana z fazą repolaryzacji AP i dlatego jego wartość jest tym większa, im bardziej dodatni staje się potencjał błonowy, osiągając swój szczyt tuż za wierzchołkiem iglicy AP w normalnych warunkach. Na końcu narzuczonego impulsu widoczne jest przejście prowadzące w dół, kiedy pojemność błonowa jest nagle rozładowywana [5, 92, 102, 109, 116, 141, 199].

Wyniki tego typu doświadczeń łatwo jest przedstawić w graficznej formie mapy prądowo-napięciowej (I-V), mierząc prądy w ustalonych punktach czasowych po starcie narzuczonego impulsu, co pokazano na rycinie 5. Prądy mierzone po 0,5 i 8 ms są wykreślone jako funkcje poziomu, do którego E_m został przesunięty przez impuls sterujący. Prądy późne wyraźnie ilustrują prostowanie. Przy potencjałach bardziej ujemnych niż -40 mV przewodność, czyli wartości $\Delta I/\Delta E$, jest bardzo niska; jest to przewodność upływu. Przy potencjałach bardziej dodatnich prądy późne, a w następstwie tego przewodność, są znacznie zwiększone. Zjawisko to jest znane jako opóźnione prostowanie. Krzywa I-V dla prądów wczesnych jest jednakże raczej N-kształtna, tzn. że wznosi się, opada, a potem wznosi się ponownie. Pomiedzy -40 a $+20$ mV prąd



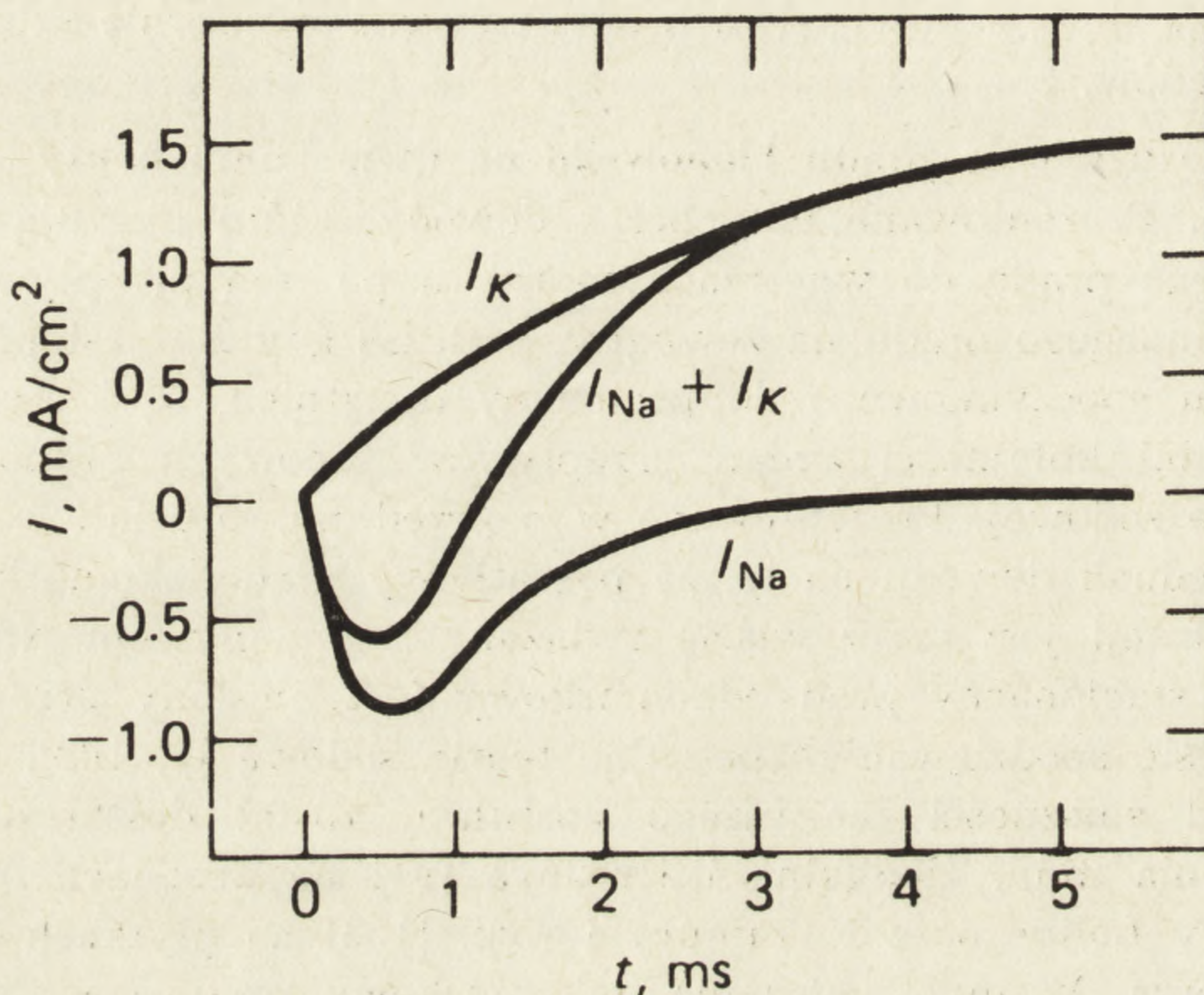
Ryc. 5. Wykres zależności prądowo-napięciowej stwierdzonej w doświadczeniach wykonanych metodą VC na aksonie kałamarnicy ([109] według [99]). Objasnienia w tekście

rzeczywiście zmniejsza się, podczas gdy potencjał błonowy zwiększa się. Ta właściwość znana jest jako ujemna oporność, a wskazuje ona obszar niestabilności [99, 109].

Poza początkowymi badaniami robionymi na aksonach, doświadczeniami tego typu objęto również włókna mięśniowe, np. płytki elektryczne węgorza [152], które pod wieloma względami zachowują się podobnie jak omawiane aksony homara [108] czy aksony kałamarnicy [99], charakteryzując się obecnością dwóch odmiennych, przeciwnie skierowanych ruchów prądów.

2.5.2. Rozdzielenie prądu błonowego na dwie komponenty — sodową i potasową. Prezentowane dotychczas dowody, które ukazują przepływ początkowego prądu do wnętrza komórki, a po nim przepływ opóźnionego stacjonarnego prądu na zewnątrz, podczas gdy E_m jest przesuwany od poziomu spoczynkowego do poziomów dodatnich, są kuszącymi odpowiednikami kolejności zmian przepływów jonowych proponowanych w hipotezie sodowej. Prezentowane w poprzednim rozdziale badania nie stanowią jednak dowodu na to, że początkowy prąd dokomórkowy podczas stabilizacji jest rzeczywiście związany z przepływem Na^+ , ani że późniejszy stacjonarny prąd odkomórkowy jest niesiony przez K^+ , jak można by się spodziewać rozpatrując teorię sodową [5, 102]. Na szczęście dowód słuszności pierwszego postulatu został dostarczony przez doświadczenia m.in. Hodgkina i Huxleya [91] na aksonach olbrzymich kałamarnicy *Loligo* oraz Nakamury i wsp. [152] na płytkach elektrycznych węgorza. W myśl założenia dokomórkowy prąd powinien zniknąć, gdy preparat zostanie umieszczony w roztworze pozbawionym Na^+ , a tym samym powinno to umożliwić oddzielenie potasowej komponenty prądu od sodowej. Autorzy rzeczywiście stwierdzili, zastępując 90% sodu w roztworze kąpieli równomolarnym chlorkiem choliny, że początkowy przejściowy prąd dokomórkowy był całkowicie eliminowany, a pozostawał tylko późny stacjonarny prąd odkomórkowy, co stanowi przekonujący dowód, że prąd dokomórkowy jest niesiony przez Na^+ , a zatem prąd ten może być oznaczony jako I_{Na} . Pozostanie prądu odkomórkowego przy potencjałach powyżej $+10$ mV, nawet większego niż normalnie, niesionego przez jony K i poruszające się na zewnątrz jony Na jest również zrozumiałe, jeśli założymy, że depolaryzacja powoduje krótki wzrost g_{Na} , a ponieważ w omawianych doświadczeniach wewnątrzkomórkowe stężenie Na^+ było o wiele wyższe niż stężenie na zewnątrz, dlatego można spodziewać się przepływu Na^+ na zewnątrz. Przy potencjałach mniej dodatnich wypływ Na^+ jest bardzo mały i skierowane na zewnątrz prądy są równe prądowi potasowemu I_{K} plus niewielka stała komponenta prądu upływu I_i . Aby otrzymać zmianę I_{Na} w czasie, należy odjąć prądy uzyskane w roztworze pozbawionym Na^+ od prądów

rejestranych w roztworze fizjologicznym na każdym poziomie depolaryzacji. Jest to pokazane na rycinie 6 dla prądów przy depolaryzacji -4 mV. Ten typ doświadczeń umożliwił Hodgkinowi i Huxleyowi identyfikowanie całego wczesnego prądu dokomórkowego z ruchem Na^+ . Ponieważ krzywe $I_{\text{Na}} + I_{\text{K}}$ i I_{Na} były nałożone przy późnych czasach, późny prąd odkomórkowy był utożsamiany z K^+ [5, 91, 109].

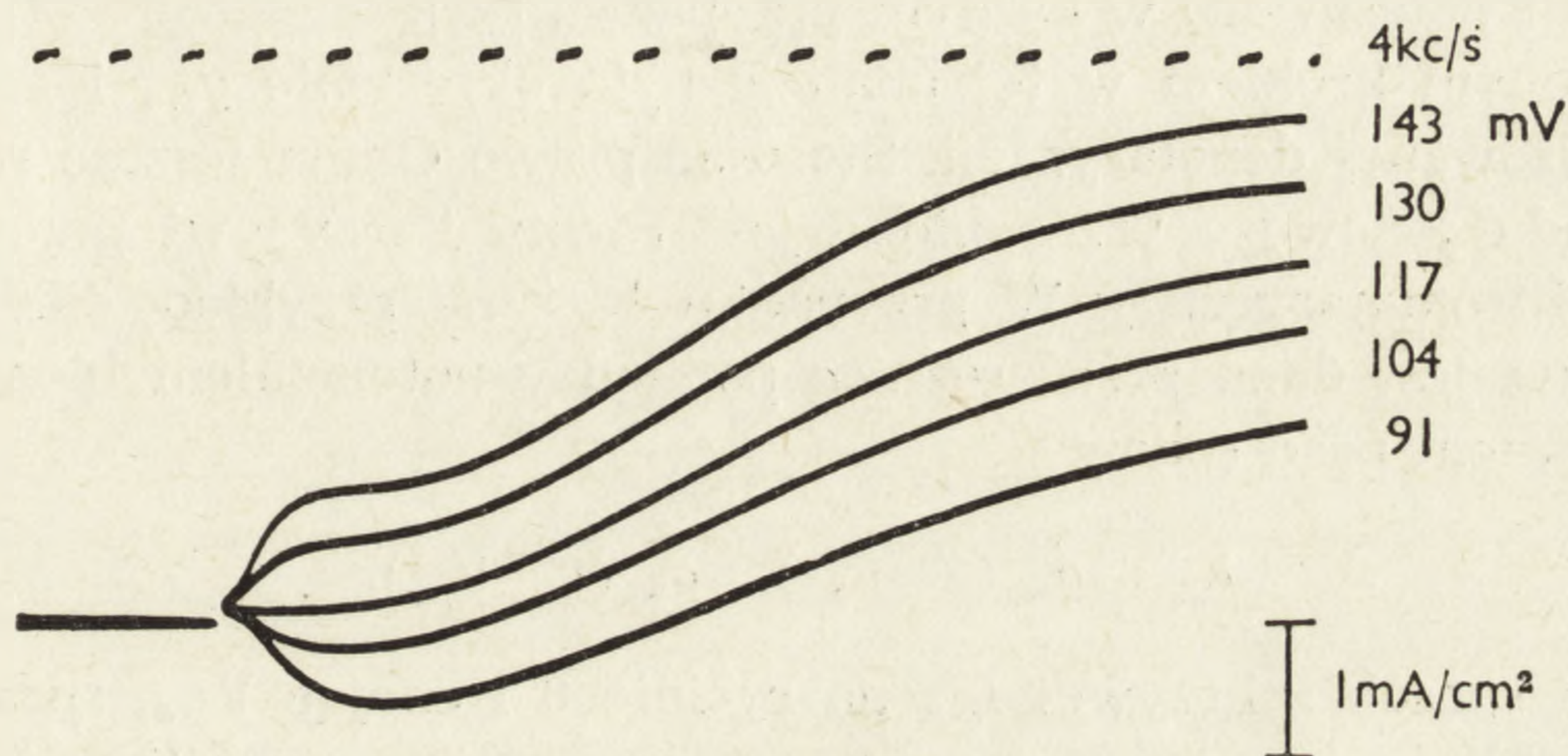


Ryc. 6. Rozdzielenie prądu błonowego na komponenty niesione przez jony Na i K (zmodyfikowane z [109] według [91]). Prądy w warunkach stabilizacji napięcia mierzone w aksonie kałamarnicy w roztworze normalnym ($I_{\text{Na}} + I_{\text{K}}$) i roztworze pozbawionym jonów Na (I_{K}). I_{Na} , obliczony jako różnica pomiędzy dwoma powyższymi krzywymi (pionowa odległość pomiędzy tymi krzywymi). Temperatura $8,5^{\circ}\text{C}$

Kierunek przepływu Na^+ musi być zależny tak od potencjału błonowego, jak i od gradientu stężeń. Kiedy E_m jest równy E_{Na} (równanie (1)), nie będzie żadnego przepływu netto Na^+ , a zatem jeśli potencjał błony jest stabilizowany na poziomie E_{Na} (należy pamiętać, że mierzone napięcie V odpowiada różnicy pomiędzy RP (E_r) i stabilizowanym potencjałem błonowym (E)), wytworzonego przez depolaryzację V_{Na} , gdzie $V_{\text{Na}} = E_{\text{Na}} - E_r$, nie powinno być żadnego prądu sodowego, a tylko opóźniony prąd potasowy. Jeśli depolaryzacja nie osiąga V_{Na} , prąd sodowy będzie skierowany do wnętrza komórki, a jeśli jest ona większa niż V_{Na} , będzie skierowany na zewnątrz komórki. Jest to pokazane na rycinie 7, z której widać, że przy takiej interpretacji V_{Na} jest około 117 mV [99]. Alternatywnym sposobem eliminacji prądu sodowego jest

zmiana zewnątrzkomórkowego stężenia Na^+ , a przez to zmiana E_{Na} ; wykres I_K na rycinie 6 został uzyskany w ten sposób [91].

Wyniki te bardzo wyraźnie świadczą o tym, że przepływ prądu początkowego w warunkach VC jest powodowany przez ruch Na^+ . W celu



Ryc. 7. Prądy błonowe podczas dużych depolaryzacji, w temperaturze $3,5^\circ\text{C}$ (z [88] według [99]). Wartości potencjału są podane z prawej strony każdego zapisu. Zapis prądu przy 117 mV jest bardzo bliski potencjałowi równowagi dla Na^+ , kiedy to prąd niesiony przez te jony jest równy zero

przesądzenia sprawy konieczne staje się wykazanie, że potencjał, przy którym prąd początkowy zmienia kierunek, jest rzeczywiście E_{Na} . Nie mogło to być zrobione bezpośrednio w początkowych doświadczeniach, ponieważ wewnątrzkomórkowe stężenie Na^+ nie było dokładnie znane, a także z powodu niepewności związanych z przekształcaniem potencjałów mierzonych (V) do potencjałów błonowych (E). Jednakże możliwe było sprawdzenie tej hipotezy przez mierzenie zmian E_{Na} (mierzonego jako zmiany w V_{Na} plus mała poprawka dla jakiegokolwiek zmiany RP), które występowały, kiedy zewnątrzkomórkowe stężenie Na^+ było zmieniane. Obserwowane zmiany nigdy nie różniły się więcej niż o 3% od spodziewanych zmian [5].

Wolno rosnący, utrzymywany prąd odkomórkowy był tylko bardzo nieznacznie zmieniany przez zmiany zewnątrzkomórkowego stężenia Na^+ i dlatego musi on być powodowany przez ruch jakiegoś innego jonu, prawdopodobnie (tak zakładano) K^+ . Bezpośredni dowód na to dostarczony został przez doświadczenia, w których mierzono wypływ ^{42}K z obszaru błony aksonu pod katodą [95]. Wzrost wypływu K^+ był, jak się okazało, liniowo proporcjonalny do gęstości prądu, przy nachyleniu krzywej zapisu równym stałej Faradaya, a zatem ten prąd był niesiony przez K^+ .

Możliwe stało się więc rozłożenie prądu jonowego, powstałego w wyniku depolaryzacji, na dwie komponenty, zależne od przepływu jonów Na i K (zob. ryc. 6). Problem rozdzielenia prądów sodowego i potasowe-

go staje się bardziej skomplikowany, kiedy stabilizowana depolaryzacja w roztworze z niską zawartością Na^+ nie jest równa V_{Na} , ale zakładając, że prąd sodowy w tym przypadku jest zawsze pewną stałą frakcją prądu w przypadku wysokiego $[\text{Na}]_o$, możliwe staje się obliczenie prądów sodowego i potasowego w każdym przypadku [91].

Następnym krokiem w tej analizie było określenie g_{Na} i g_{K} w czasie stabilizowanej depolaryzacji. Stosując prawo Ohma jeszcze raz, przepływ prądu jonowego przez błonę jest równy iloczynowi przewodności i siły elektromotorycznej. W przypadku Na^+ na przykład, siła elektromotoryczna jest dana przez różnicę pomiędzy potencjałem błonowym E a E_{Na} , a zatem prąd sodowy

$$I_{\text{Na}} = g_{\text{Na}}(E - E_{\text{Na}}) = g_{\text{Na}}(V - V_{\text{Na}}).$$

W ten sposób z krzywej I_{Na} na rycinie 6 i znając V_{Na} , sprawą prostą jest obliczanie g_{Na} przez cały czas przebiegu stabilizacji, według wzoru:

$$g_{\text{Na}} = \frac{I_{\text{Na}}}{V - V_{\text{Na}}}. \quad (4)$$

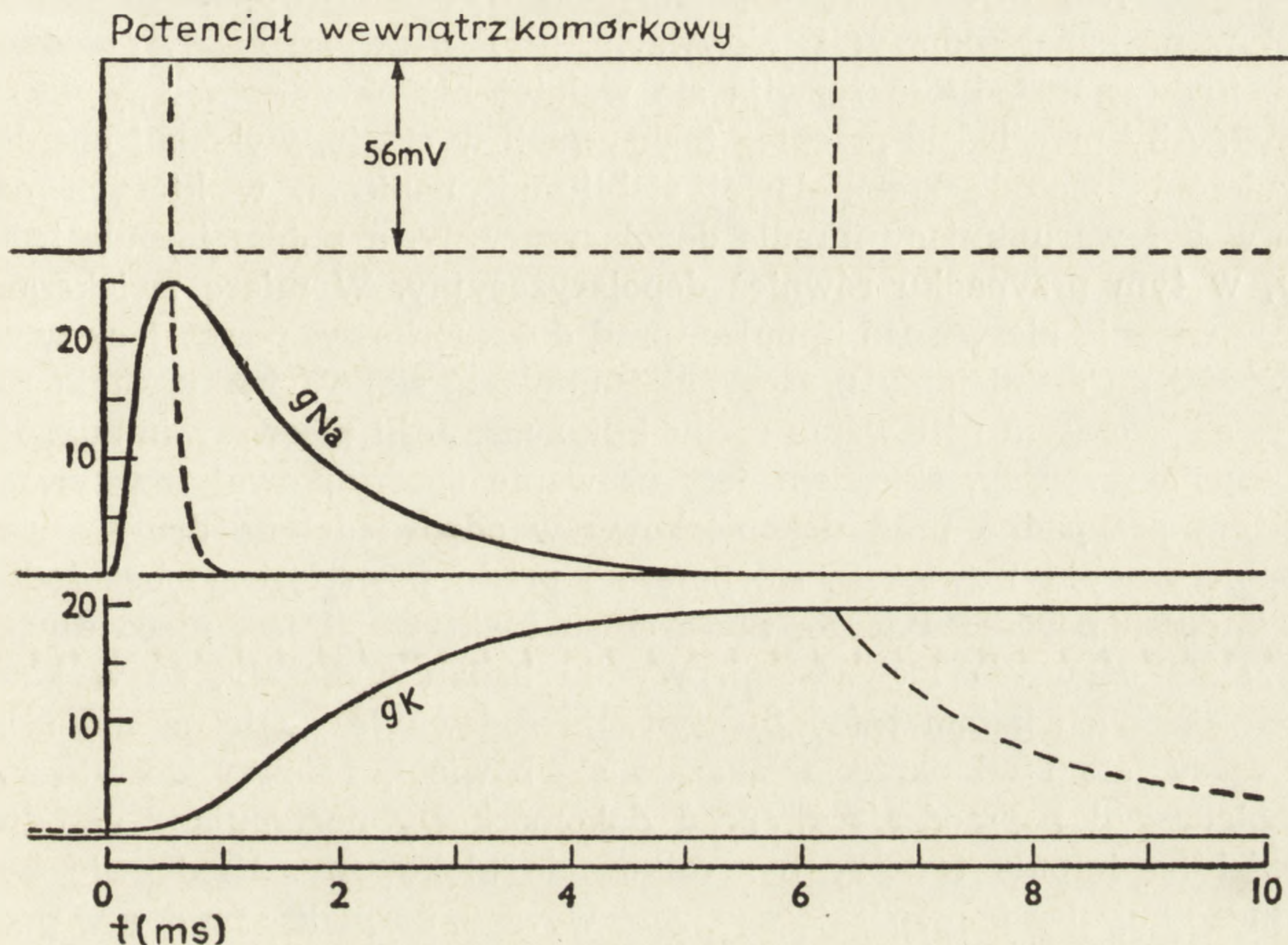
Podobnie można obliczyć g_{K} na podstawie krzywej I_{K} i zależności o postaci

$$I_{\text{K}} = g_{\text{K}}(V - V_{\text{K}}), \quad \text{skąd} \quad g_{\text{K}} = \frac{I_{\text{K}}}{V - V_{\text{K}}}. \quad (5)$$

Wyniki tych obliczeń pokazane na rycinie 8 [91, 92].

Wyniki badań można na tym etapie podsumować następująco. Zmiany g_{Na} i g_{K} w czasie są podobne do zmian I_{Na} i I_{K} . Depolaryzacja wywołuje: 1. szybki wzrost g_{Na} — aktywacja (a więc kanał sodowy staje się przewodny najpierw), po którym następuje 2. wolne obniżenie g_{Na} (znane jako proces inaktywacji sodowej) i 3. wolny, nieco opóźniony wzrost g_{K} — aktywacja potasowa (czyli z kolei kanał potasowy staje się przewodny) i przewodność ta utrzymuje się tak długo, jak błona jest zdepolaryzowana. Uważano, że prądy te powstają w wyniku biernego przepływu jonów zgodnie z ich odnośnymi gradientami elektrochemicznymi [109, 199]. Powyższa analiza sugeruje, że błona zachowuje się zgodnie z prawem Ohma i że zmiana prądu błonowego powinna być proporcjonalna do zmiany potencjału. Hodgkin i Huxley [92] potwierdzili to założenie liniowości (tj. zgodność z prawem Ohma), wykonując pomiary, których rodzaj określa się mianem natychmiastowej zależności I-V.

Rozmiar obserwowanych zmian przewodności zwiększa się wraz z postępującą depolaryzacją. Jeśli E_m nagle wraca do jego poziomu spoczynkowego, zmiany te ulegają odwróceniu (jak pokazuje linia przerywana na ryc. 8).



Ryc. 8. Przebieg w czasie zmian przewodności błony dla Na^+ i K^+ podczas stabilizowanej depolaryzacji, uzyskanych z zapisów prądów pokazanych na ryc. 6 (według [88] na podstawie [91] i [92]). Pionowa skala w mS/cm^2 , pozioma w ms. Linie przerywane pokazują wpływ repolaryzacji po 0,6 i 6,3 ms. Temperatura $8,5^\circ C$

Sugerowano od dawna, że ruchy jonowe, mające miejsce podczas AP, odbywają się przez odrębne miejsca w błonie, a obecnie istnieją poważne dowody na to, że miejsca te są podobnymi do porów strukturami, tzw. kanałami jonowymi [8, 9, 49, 85]. Uważa się też, że drogi dla Na^+ i K^+ są odrębne [86, 94, 180, 193, 199]. Wiadomo, że podczas hiperpolaryzacji obserwowany jest stacjonarny prąd dokomórkowy, tzw. prąd upływu; w błonie aksonu istnieje więc jeszcze trzeci rodzaj kanałów, kanały upływu, które są stale otwarte. Wskutek tego upływ tworzy także pewien mały prąd podczas depolaryzacji. Kanały upływu charakteryzują się małą selektywnością w stosunku do jednowartościowych kationów [86].

2.5.3. Aktywacja i inaktywacja. Jak przedstawiono na rycinie 6, prąd sodowy następujący w wyniku impulsu depolaryzacyjnego ma początkowy, w tym przypadku również depolaryzacyjny. W miarę zwiększania potasowy, który rozwija się wzdłuż krzywej monotonicznej. Hodgkin i Huxley [93] uważali, że depolaryzacja wywiera dwojakiego rodzaju wpływ na kanał sodowy: 1. aktywacja, czyli podwyższona przewodność i 2. inaktywacja, która rozwija się wolniej niż aktywacja i „wyłącza” kanał. Aby prześledzić przebieg inaktywacji w czasie, wykonali oni doświadczenia metodą 2-stopniowej stabilizacji napięcia, w których najpierw był warunkujący impuls depolaryzacyjny, a potem impuls testowy, w tym przypadku również depolaryzacyjny. W miarę zwiększania czasu trwania pierwszego impulsu, prąd dokomórkowy, powstający w odpowiedzi na drugi impuls, zaczynał zmniejszać się. Ta inaktywacja rozwija się z czasem półtrwania rzędu kilku ms. Jeśli pierwszy impuls jest hiperpolaryzacyjny, skutkiem jest usuwanie spoczynkowej inaktywacji. W tym przypadku prąd dokomórkowy w odpowiedzi na drugi impuls (depolaryzacyjny) zwiększa się powyżej prądu powstającego bez żadnego impulsu poprzedzającego. Stała czasu inaktywacji jest nieco dłuższa niż stała usuwania inaktywacji. Wyniki badań wykazały, że w badanych aksonach kałamarnicy inaktywacja sodowa jest zależna nie tylko od czasu, ale i od napięcia, okazało się bowiem, że przy dostatecznej depolaryzacji poprzedzającej, prąd dokomórkowy następujący w odpowiedzi na impuls testowy był całkowicie blokowany. Kiedy nie było żadnego impulsu poprzedzającego, obserwowano normalny prąd, a w przypadku hiperpolaryzacji poprzedzającej, prąd dokomórkowy zwiększał się w odpowiedzi na impuls testowy [93].

Aby opisać tę zależną od potencjału inaktywację, Hodgkin i Huxley użyli równania o postaci

$$h = \frac{1}{1 + \exp[(V - V_h)\gamma]}$$

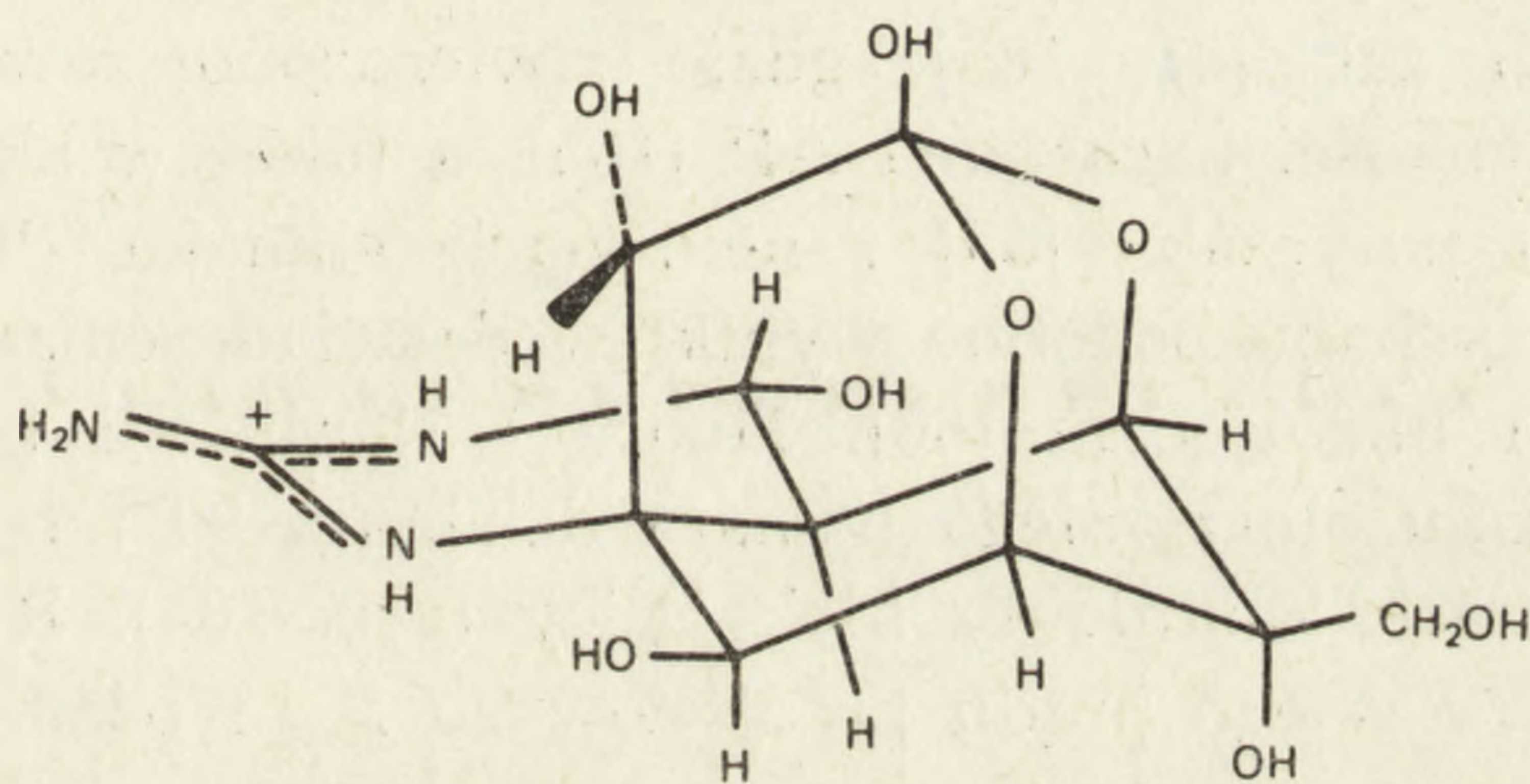
gdzie h oznacza pewien parametr, który jest proporcjonalny do dokomórkowego prądu sodowego, V — depolaryzację impulsu poprzedzającego, mierzoną od poziomu RP, V_h — wartość V , przy której $h = 1/2$.

W tej pracy wielkość h pojawiła się po raz pierwszy w powiązaniu z inaktywacją sodową. Odgrywa ona główną rolę w teorii pobudzenia nerwowego, co będzie omawiane w rozdziale 1 części III [29] i w części IV tego artykułu [30]. Inaktywacja, czyli spontaniczne zamykanie się przewodzących kanałów po ich otwarciu przez zmianę napięcia, jest szczególnie ważnym zjawiskiem bramkującym, gdyż kanały sodowe otwierają się, jak wiadomo, tylko przejściowo [50]. Nadal jednak niezbyt dobrze zrozumiałe są mechanizmy molekularne odpowiedzialne za

selektywne zmiany przepuszczalności błony podczas AP, tzn. jak to się dzieje, że kanał zmienia swoją dostępność dla przejścia jonu w odpowiedzi na zmianę E_m (jest to proces bramkowania [70]).

2.5.4. Użycie inhibitorów transportu jonów sodowych i potasowych.

W ostatnim 20-leciu odkryto następne wspaniałe narzędzie analityczne, pozwalające na wykonanie przełomowej analizy ruchów jonowych biorących udział w generowaniu AP. Tym narzędziem jest tetrodotoksyna — aktywny czynnik chemiczny w neuroaktywnej toksynie ekstrahowanej pierwotnie z jajników i wątroby ryb nadymających się z rodziny *Tetraodontidae* [102, 111, 156, 157], a później znalezionej również w jajach traszki *Taricha* [146, 156] oraz u niektórych gatunków ośmiornic [187], ryb babek (*Gobius*) [169] i żab [125] (ryc. 9) — a także saksii-

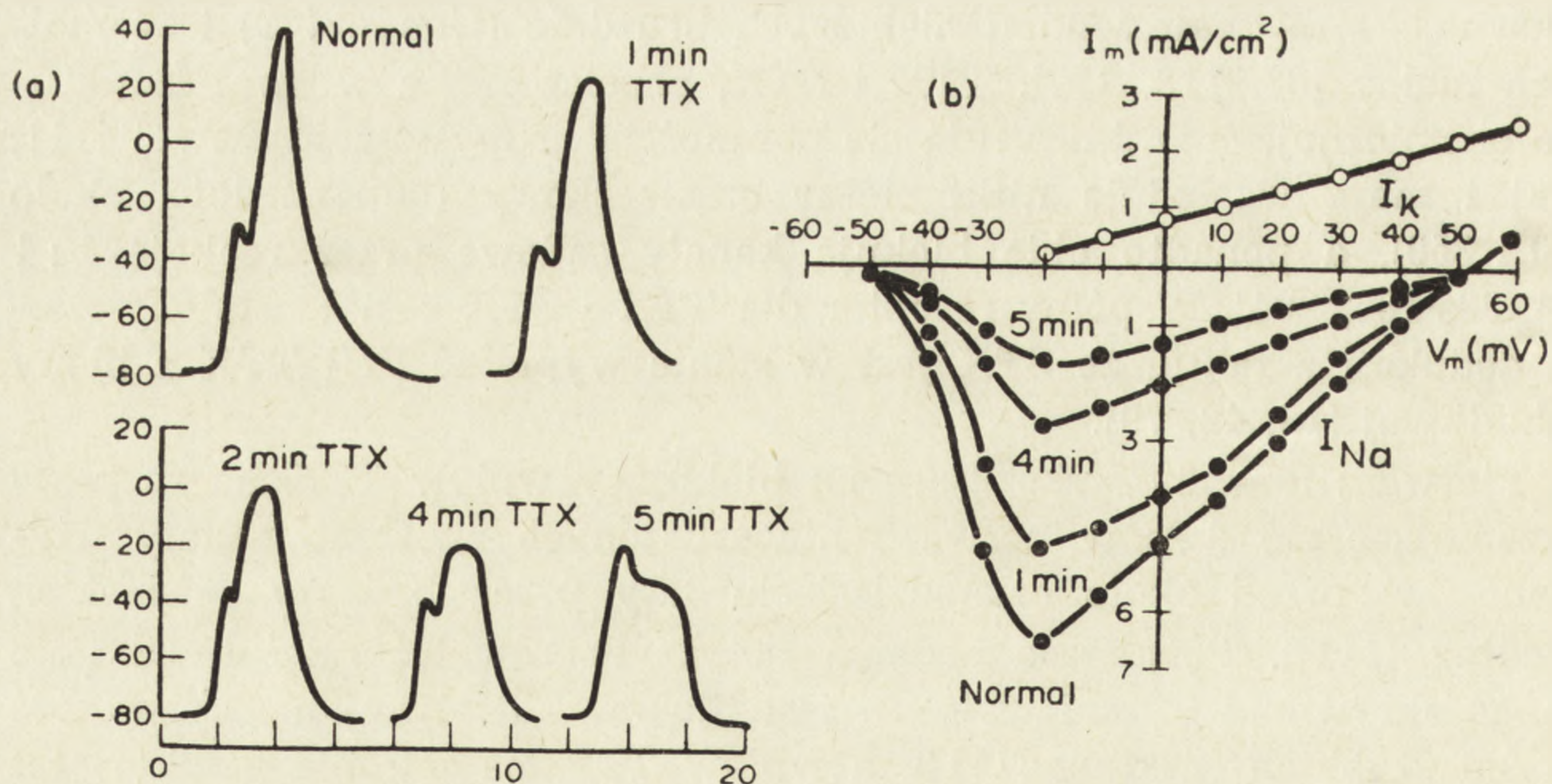


Ryc. 9. Struktura cząsteczki TTX (według [109])

toksyna, którą znaleziono u niektórych bruzdnic (*Gonyaulax*) i rozmaitych małży [37, 113, 157]. TTX i STX, chociaż różne w swej strukturze chemicznej, charakteryzują się obecnością grupy guanidynowej [111, 112] i mają względnie niski ciężar cząsteczkowy (odpowiednio, około 320 i 350), a ponadto obie blokują kanały sadowe przez reakcję 1:1 [44, 83, 185, 204]. Wspólny receptor dla TTX i STX został ustalony drogą dedukcji z faktu, że STX jest w stanie wypierać [³H] TTX z błony pobudliwej [18, 42, 79].

Pierwsze dowody wskazujące na blokujący wpływ TTX na rozprzestrzeniające się APs w nerwach nienaruszonych zwierząt zostały uzyskane już przed około osiemdziesięciu laty przez badaczy japońskich (według [111]). Późniejsze badania dotyczyły również mięśni. Okazało się, że aktywność mięśni wolnych jest blokowana łatwiej niż aktywność mięśni szybkich (według [111]), a wpływ TTX na mięśnie gładkie jest bardzo różny [31, 111, 112, 157]. Furukawa i wsp. [62] oraz wielu innych badaczy wykazało, że toksyna ta blokuje generowanie AP w mięśniach szkieletowych płazów, nie zmieniając depolaryzacji obszaru płytki koń-

cowej indukowanej przez ACh, co sugeruje, że działanie TTX musi być skierowane na proces biorący udział w genezie potencjału iglicowego. Miejsca, w których TTX blokuje przewodnictwo nerwowo-mięśniowe, znajdują się na błonie aksonu i mięśnia, a nie na chemowrażliwych receptorach płytki końcowej [111]. Wykazano też, że chociaż TTX blokuje w neuronach rdzenia kręgowego kota generowanie iglic, to depolaryzujące działanie glutaminianu utrzymuje się, a więc i tu ta toksyna nie interferuje z chemicznie pobudliwymi kanałami sodowymi, które są wrażliwe na glutaminian [216]. Z kolei Narahashi i wsp. [163] oraz Nakajima i wsp. [151] wykazali, że TTX blokuje wzrost wczesnej przejściowej przepuszczalności we włóknach mięśniowych żaby. Ten mechanizm działania został potem potwierdzony w doświadczeniach na płytkach elektrycznych węgorza [152] oraz aksonach olbrzymich kałamarnicy [145, 153] i homara [161, 194], w badaniach dotyczących rdzennych włókien nerwowych żab [81, 185], gdzie stwierdzono również redukcję maksymalnej szybkości narastania AP [185], a także w aksonie receptora rozciągowego patyczaka [55] i neuronach ślimaka *Planorbis* [170], gdzie również uzyskano podobne wyniki w doświadczeniach z uretanem jako czynnikiem blokującym [66]. Moore i Narahashi [142] wykazali, że poddanie aksonu olbrzymiego homara działaniu 90 nmol TTX powoduje po 5 minutach kompletny blok iglicy (ryc. 10a). Rycina 10b pokazuje wykres wczesnego prądu przejściowego I_{Na} i późnego prądu stacjonarnego I_K w różnym czasie po zastosowaniu TTX w warunkach VC. Pomiar prądu sodowego i późniejszego prądu odkomórkowego w tych



Ryc. 10. Wpływ TTX (90 nmol) na potencjał czynnościowy (a) i prądy błonowe (b) w aksonie homara (według [102] na podstawie danych [142]). Objasnienia w tekście

warunkach prawie dokładnie odpowiadają zmianom napięcia podczas AP, obserwowanym w warunkach niestabilizowanych i wykazały one niezbicie, że TTX blokuje tylko prąd sodowy, a nie prąd stacjonarny (potasowy) czy przewodność upływu. Kiedy prąd sodowy ulega zmniejszeniu o około połowę, iglica AP jest blokowana [44, 142, 145, 161, 194].

Dzięki zastosowaniu TTX wykazano, że również w aksonach olbrzymich osiadłej pierścienicy morskiej *Myxicola* [25], raka [162] i karaczana [175] przejściowy prąd AP niesiony jest przez Na^+ . APs w komórkach zwojowych rdzenia kręgowego i mięśniach szkieletowych żaby blokowane są przez TTX nawet wtedy, kiedy Na^+ w kąpielii zostaje zastąpiony przez hydrazynę, TEA^+ czy Ba^{2+} [127]. Taki blok kanałów Na obserwowano też w aksonach olbrzymich kałamarnicy, gdy Na^+ był zastępowany przez Li^+ [83, 145] lub K^+ [182]. Uważa się, że TTX może blokować kanał przejściowy niezależnie od jonu będącego nośnikiem prądu i niezależnie od kierunku, w którym prąd płynie [38, 83, 145, 155, 182, 197]. Innymi słowy, blokuje ona bierne ruchy Na^+ tak skierowane do wnętrza komórki, jak i na zewnątrz, chociaż w różnym stopniu w różnych preparatach, jak wykazały badania robione metodą VC [111, 143, 145, 194]. TTX jest więc świetnym narzędziem pozwalającym na oddzielenie prądu potasowego od sodowego i badanie tego pierwszego. Ponadto przedłużony prąd sodowy i stacjonarny prąd potasowy były w aksonach olbrzymich kałamarnicy, raka i homara oraz przewężeniach Ranviera oddzielane również przy użyciu DDT [158], toksyny *Condylactis* [148, 162] czy jadu skorpiona [130, 131, 164].

Badania metodą VC przy użyciu TTX były wykonywane również na mięśniach i Nakamura i wsp. [152] potwierdzili, że potencjał iglicowy płytki elektrycznej jest blokowany przez tę toksynę. Te badania rozszerzono później na włókna mięśni szkieletowych niektórych ryb kostnoszkieletowych [76] i rdzenne włókna nerwowe żaby *Xenopus* [185], gdzie TTX również blokowała początkowy prąd dokomórkowy. W rzeczywistości wpływ TTX na prądy błonowe jest taki sam, jak wpływ usunięcia Na^+ w warunkach VC, co stanowi kolejny dowód na to, że iglica AP badanych komórek jest generowana wyłącznie przez przepływ prądu sodowego w kierunku wnętrza komórki.

TTX, a także środki blokujące kanały wapniowe, są również ważnym narzędziem, dzięki któremu możliwe jest wyodrębnienie w potencjałach dwujonowych komponenty niesionej przez Na^+ czy Ca^{2+} , co pozwala na ilościową ocenę każdej z nich i odrębne ich badanie [80, 188, 214].

Dalsze poszukiwania doprowadziły do rozszerzenia badań metodą VC na aksony kałamarnicy poddane tak wewnętrznej, jak i zewnętrznej perfuzji solą zawierającą TTX czy inne środki. Badania te dostar-

czyły kolejnego ważnego dowodu doświadczalnego popierającego postulat hipotezy sodowej, dotyczące ruchów jonowych. Narahashi i wsp. [160] wykazali, że podczas gdy zewnątrzkomórkowe zastosowanie TTX w bardzo niskich stężeniach (100 nmol) całkowicie usuwa dokomórkowy prąd sodowy, to wewnętrzna perfuzja TTX w stężeniu tak wysokim jak 1 μmol nie ma żadnego wpływu na prąd dokomórkowy. Ponieważ TTX nie może przejść przez błonę, autorzy ci [159, 160] wykazali, że miejsce jej działania ograniczone jest do zewnętrznej powierzchni błony. Huddart [102] uważa, że ta lokalizacja dokładnego miejsca działania TTX również dokładnie lokalizuje miejsce inicjacji aktywacji dokomórkowego prądu sodowego. Innymi słowy, bramki ograniczające dla wczesnego przejściowego kanału sodowego byłyby ograniczone do zewnętrznej powierzchni błony, co wydaje się jednak niezbyt prawidłowym stwierdzeniem.

TTX wywiera wysoce specyficzny wpływ na kanał sodowy w prawie wszystkich błonach pobudliwych, gdzie była ona stosowana. Może to być związane z interakcją grupy guanidynowej (najbardziej ekspozowana grupa po lewej stronie ryc. 9) z kanałem sodowym [109, 115]. Cząsteczka TTX może wiązać się do Na-selektywnego nośnika, ale jest zbyt duża, aby przejść przez błonę [109].

STX ma właściwie pod wszystkimi względami działanie podobne do TTX [115]. Pewne różnice pomiędzy nimi w działaniu na poziomie komórkowym stwierdzono podczas badań wykonywanych na nerwach traszki *Taricha* i ryby nadymającej się *Spheroides* [114, 146]. Pozbawione osłonki nerwy *Taricha* i *Spheroides* były, odpowiednio, 30 000 i 1000 razy bardziej odporne na działanie TTX niż nerw żaby, chociaż były one bardzo wrażliwe na działanie STX i wymagały obecności Na^+ dla wytwarzania AP. Mechanizm tej oporności na TTX pozostaje niezbadany (według [156]). Mięśnie ryb nadymających się są podobnie jak nerwy odporne na działanie TTX, ale również i STX, co bardzo trudno jest wyjaśnić [76, 124].

W wielu układach przewodzących, obok systemu zależnego od Na^+ istnieje odrębny system przewodzący, funkcjonujący dzięki Ca^{2+} , a czasami i Cl^- (np. w mięśniu sercowym, czy niektórych neuronach lub rozwijających się komórkach mięśniowych); TTX jest wówczas dobrym narzędziem do eliminacji pierwszego, co pozwala na lepsze badanie drugiego [60, 110, 122, 157, 179, 214]. Mięśnie gładkie są na ogół mało wrażliwe na działanie TTX [31, 65, 69, 78, 111, 112, 135, 156, 157, 178], nawet jeśli ich AP jest zależny od Na^+ , tak u zwierząt wyższych [31, 117], jak i np. u owadów [149]. Komórki mięśnia sercowego są również dość odporne na działanie TTX. Wrażliwość tkanek serca na tę toksynę zmienia się w zależności od typu tkanki i rodzaju zwierzęcia. Na

ogół są one jednak mniej wrażliwe na TTX niż włókna nerwowe [48, 73, 74, 111, 156, 189, 212]. W mięśniach pąkli oraz szeregu owadów, w których AP jest związany z Ca^{2+} , przejściowy prąd wapniowy nie poddaje się wpływowi TTX [72, 74, 111, 156, 157, 214]. Liczne czuciowe komórki receptorowe są również mało wrażliwe na działanie TTX [111, 137, 150, 156, 172], podobnie jak wiele neuronów mięczaków, generujących potencjały iglicowe zależne tak od Na^+ , jak i Ca^{2+} , w których nawet prądy sodowe nie są wrażliwe na TTX [43, 134] czy neuryty wczesnych stadiów rozwojowych komórek nerwowych żaby *Xenopus* [211]. APs w komórkach roślinnych, np. *Nitella* i *Chara*, w których mechanizm generujący je wydaje się związany z wypływem wewnątrzkomórkowych jonów Cl [63, 126], również nie są blokowane przez TTX (według [111]). Dość ciekawą rzeczą jest oporność na działanie TTX nadal zależnego od Na^+ AP w rozwijających się komórkach mięśniowych szczura [122] czy odnerwionych mięśniach szkieletowych [6, 77, 177], przy czym w ostatnim przypadku ta niewrażliwość rozwija się równoległe z rozwojem wysokiej, pozapołączeniowej wrażliwości na ACh [6, 77]. Różna jest też wrażliwość na TTX odnerwionych czy też embryonalnych komórek serca, w zależności od fazy ich rozwoju [101, 139]. Niektóre toksyny ujawniają jednak obecność, normalnie cichych, wrażliwych na działanie TTX kanałów sodowych w komórkach zwykle opornych na działanie tej toksyny (według [101]).

Wald [205] i Standen [191] stwierdzili, że, odpowiednio, w neuronach H ślimaka *Cryptomphallus* i neuronach A *Helix aspersa* somatyczny AP jest zależny w dużej mierze od Ca^{2+} , podczas gdy aksonalny AP generowany jest głównie przez Na^+ i wydaje się, odmiennie niż w wielu innych komórkach, niewrażliwy na TTX, albowiem tak aksonalne, jak i złożone APs nerwów nie były modyfikowane przez tę toksynę, chociaż szybko reagowały na zmiany zewnątrzkomórkowego stężenia Na^+ . W neuronach *Helix aspersa* somatyczny AP okazał się niewrażliwy na TTX, chociaż jego sodowa komponenta jest prawdopodobnie w pewnym stopniu wrażliwa na działanie TTX, lecz wskutek wysokiego stężenia jonów dwuwartościowych w roztworze i kompetycji pomiędzy Ca^{2+} i TTX, jej działanie jest nieskuteczne i niemożliwe do zaobserwowania [191].

Jak wspomniano, miejscem działania TTX jest zewnętrzna powierzchnia błony. Na odwrót, jony Cs i TEA, selektywnie blokujące późny prąd stacjonarny, działają tylko na wewnętrzną błonę aksonów głownogów [4, 7, 11, 38, 176, 195]. Hagiwara i Saito [75] stosując metodę VC badali wpływ TEA na neurony *Onchidium*, stwierdzając znaczną redukcję prądu odkomórkowego, a tylko mały wpływ na wczesny prąd dokomórkowy. Dalsze badania metodą VC zostały wykonane przez in-

nych badaczy na rdzennych włóknach nerwowych żab [12, 82, 129, 132, 147, 203], aksonach olbrzymich karaczana [174], neuronach ślimaka *Helix pomatia* [166] oraz włóknach mięśni szkieletowych żab [192] i owadów [15]. W badaniach Hille'a [82], wykonanych na rdzennych włóknach nerwowych żaby, późny, stacjonarny prąd potasowy został poddany bardziej szczegółowemu rozpatrzeniu. Hille [82] jasno wykazał, że jony TEA selektywnie hamują ten prąd, oznaczany I_K , przedłużając znacznie AP przez opóźnienie i hamowanie aktywnej repolaryzacji, pozostając bez wpływu na I_{Na} . Jest to dowód, że błonowe kanały przepuszczalności dla Na^+ i K^+ są zupełnie oddzielne. Huddart [102] uważa, że fakt, iż tylko wewnętrzna blokada zmniejsza I_K , jest jawnym dowodem na to, że kanały sodowe i potasowe w błonie nie są zupełnie niezależne, są one fizycznie odrębne, tak że miejsca aktywacji dla inicjacji I_K są ograniczone do wewnętrznej powierzchni błony. Szczegółowy opis mechanizmu działania TEA można znaleźć w kilku pracach przeglądowych [85, 157], wielu pracach eksperymentalnych oraz niniejszym artykule (część IV) [30].

Dostępne informacje dotyczące przepływu prądu jonowego we włóknach mięśni szkieletowych sugerują, że procesy przepływu prądu sodowego i potasowego są w zasadzie podobne do opisanych dla błon aksonalnych i według Huddarta [102] nie ma powodu, aby przypuszczać, że dowody wskazujące na zewnętrzne miejsca aktywacji prądu sodowego i wewnątrz błonowe miejsca aktywacji prądu potasowego nie miały zastosowania również w przypadku błon włókien mięśniowych.

Dane przedstawione w zarysie w tym rozdziale stanowią najbardziej doskonałe potwierdzenie wszystkich głównych założeń hipotezy sodowej, której prawdziwość, sprawdzona z tak wielu różnych stron, musi być teraz uważana za bezsprzeczną, chociaż tylko w odniesieniu do niektórych tkanek.

Metoda VC w połączeniu ze stosowaniem substancji działających wybiórczo na przepuszczalność błony dla poszczególnych jonów pozwoliła również na wykazanie innych niż sodowo-potasowy mechanizmów powstawania AP. Prowadzone w ostatnich latach na szeroką skalę porównawcze badania elektrofizjologiczne wykazały, że model genezy AP, zaproponowany przez Hodgkina i Huxleya, oparty na tzw. hipotezie sodowej, słuszny jest wprawdzie najczęściej, ale nie jest uniwersalny. Wykazano bezspornie, że APs, głównie w komórkach mięśniowych szeregu bezkręgowców [14, 15, 20, 21, 51, 53, 60, 61, 72, 173, 207, 213, 214], ale i w komórkach mięśnia sercowego [138, 167, 168] czy licznych mięśniach gładkich [31, 34, 208], a nawet i w niektórych komórkach nerwowych [35, 80, 118, 133, 191, 205, 211] oraz płytkach elektrycznych płaszczki [71] i komórkach mięśni szkieletowych, np. kurczęcia, rozwijających

się w kulturze hodowlanej [60] mogą powstawać na skutek wzrostu przepuszczalności błony dla jonów innych niż Na, m.in. Ca^{2+} , Mg^{2+} , K^+ , Cl^- .

2.5.5. Wpływ Ca^{2+} i innych czynników na zmiany przepuszczalności błony. Wpływ Ca^{2+} na błony nerwowe był po raz pierwszy badany w warunkach VC przez Frankenhaeusera i Hodgkina [58] na aksonach kałamarnicy. Stwierdzili oni, że redukcja zewnątrzkomórkowego stężenia Ca^{2+} powodowała znaczne zwiększenie prądu dokomórkowego wywoływanego przez dany stopień zmiany potencjału. Wyniki przedstawione w formie wykresu ukazują wyraźnie, że pięciokrotne zmniejszenie $[\text{Ca}]_o$ powoduje przesunięcie krzywej przewodność—napięcie o około 10–15 mV w kierunku potencjałów bardziej ujemnych tak dla prądu dokomórkowego, jak i odkomórkowego. Autorzy podsumowali swoje wyniki wnioskiem, że pięciokrotne zmniejszenie $[\text{Ca}]_o$ ma w przybliżeniu taki sam wpływ jak depolaryzacja błony o 10–15 mV, tzn. mniejsze zmiany potencjału są wtedy wymagane, aby aktywować zarówno prąd dokomórkowy, jak i odkomórkowy, czyli następuje obniżenie progu depolaryzacji dla inicjacji AP. W niektórych przypadkach obserwowano nawet spontaniczne wyładowania w neuronach umieszczanych w roztworze pozbawionym Ca^{2+} [5, 109]. Przedłużone stosowanie takich roztworów prowadzi jednak do nieodwracalnego uszkodzenia błony i utraty zdolności generowania APs [109]. Podobne wyniki uzyskano też w badaniach aksonów homara [26], rdzennych włókien żaby [84] oraz aksonów *Myxicola* [19], chociaż Hille [84] uważa, że kanały potasowe są znacznie mniej wrażliwe na zmiany $[\text{Ca}]_o$ niż kanały sodowe, podobnie zresztą, jak nieco różny jest stopień ich wrażliwości na zmiany pH. W związku z tym Hille sugeruje, że ładunki w pobliżu kanałów sodowych różnią się od tych w pobliżu potasowych.

Frankenhaeuser i Hodgkin [58] sugerowali, że jony Ca mogą działać przez wiązanie się do miejsc ujemnych albo nośników w błonie i wywieranie wpływu stabilizującego, czyli zapobiegającego spontanicznym wyładowaniom, w związku z małymi fluktuacjami MP i utrzymaniem nienaruszalności błony. Prądy odkomórkowe (depolaryzujące) „wymywałyby” za pośrednictwem narzuconego pola elektrycznego Ca^{2+} z tych miejsc i w ten sposób pozwalały Na^+ wejść. Im większe $[\text{Ca}]_o$, tym trudniej byłoby usunąć Ca^{2+} z błony i tym większy byłby prąd progowy, czyli depolaryzacja potrzebna do pobudzenia. Te sugestie zgodne są z obserwacjami doświadczalnymi, lecz dokładny mechanizm trudny jest do udowodnienia czy obalenia.

Gilbert i Ehrenstein [67], McLaughlin [140], D'Arrigo [45], Bismar [33] i inni badacze sugerowali, że jony Ca działają przez tworzenie rozproszonej podwójnej warstwy na zewnątrz błony nerwowej, która może

zmieniać transmembranowe pole elektryczne. Zwiększone $[Ca]_o$, przez utworzenie blisko błony warstwy przyciąganych przez ujemne ładunki na powierzchni jonów Ca, zwiększałoby siłę transmembranowego pola bez wpływu na E_m i dlatego większa niż normalnie depolaryzacja jest wymagana, aby zredukować pole w błonie do poziomu krytycznego. Ten typ modelu, mimo że nieco spekulatywny, jest użyteczny dla połączenia wielu obserwacji dotyczących działania Ca^{2+} na błony nerwowe, takich jak brak jego wpływu na RP, a silne działanie na próg [109].

Nieco inna jest hipoteza Armstronga [10], który proponuje, że ładunek ujemny jest eksponowany przy zewnętrznej powierzchni, kiedy podjednostka kanału znajduje się w pozycji spoczynkowej i przyciąga z zewnątrzkomórkowego roztworu kation, jako swój przeciwnoładunek, a więc przy podwyższeniu zewnątrzkomórkowego stężenia dwuwartościowych kationów byłby on utrzymywany w pozycji spoczynkowej. Natomiast gdy podjednostka znajdzie się w pozycji aktywowanej, ładunek ujemny jest eksponowany przy powierzchni wewnętrznej. Obniżenie siły jonowej środowiska wewnątrzkomórkowego, z którego ta grupa musi przyciągać swój przeciwnoładunek, destabilizowałoby tę konformację na korzyść konformacji spoczynkowej. Obniżenie wewnątrzkomórkowej siły jonowej rzeczywiście obniża pobudliwość. Klasyczne wyjaśnienie tego zjawiska jest następujące: stałe ładunki ujemne przy wewnętrznej powierzchni błony tracą swój przeciwnoładunek przy rozcieńczeniu środowiska wewnątrzkomórkowego [39].

Ponadto Ca^{2+} może również zastępować Na^+ jako nośnik prądu dokomórkowego w różnych komórkach nerwowych i mięśniowych [36, 80, 109], wchodząc przez kanały sodowe lub odrębne własne kanały, ale problem ten bardziej szczegółowo będzie rozważany w części V artykułu. Wiadomo też, że obecność jonów dwuwartościowych w środowisku zewnątrzkomórkowym jest konieczna dla utrzymania pobudliwości komórek, co niezbitnie wykazano np. w przypadku aksonów głowonogów [36, 198].

Ważnym krokiem w zrozumieniu roli Ca^{2+} będzie oczywiście odkrycie ich wszystkich wewnątrzkomórkowych funkcji w perfundowanych aksonach [109]. Niedawno stwierdzono, że jony Ca mogłyby hamować podczas fazy repolaryzacji AP pompę sodową i w ten sposób kontrolować pobudliwość komórek [68], w każdym razie w mięśniu sercowym, gdzie, jak wiadomo, widoczny jest w postaci plateau AP wolny dokomórkowy prąd wapniowy, czyli Ca^{2+} z pewnością wchodzi do tych komórek.

Wiedziano też od dawna, że prędkość przewodzenia w aksonie wzrasta wraz ze wzrostem temperatury. Dzieje się tak, gdyż przebieg zmian elektrycznych składających się na AP jest dużo szybszy przy wyższych

temperaturach, a te zmiany elektryczne są oczywiście same w sobie zależne od przebiegu w czasie zmian przewodności wywołanych przez depolaryzację [5]. Hodgkin i Katz [96] obserwowali w związku z tym zmniejszenie się amplitudy AP w miarę wzrostu temperatury. Według równań Hodgkina-Huxleya, stałe szybkości dla zmian przewodności wzrastają około 3-krotnie na każde 10° wzrostu temperatury, co zostało potwierdzone przez Frankenhaeusera i Moore'a [59].

Środki, które wpływają bezpośrednio na zmiany przepuszczalności błony aksonu można podzielić na 2 typy, „stabilizery” i „labilizery” [186]. Środki stabilizujące, takie jak prokaina i inne lokalne anestetyki, powodują zmniejszenie rozmiarów zmian przewodności wywoływanych przez depolaryzację, tak że błona nerwowa staje się niepobudliwa. Środki labilizujące, takie jak weratrydyna, mają tendencję do podwyższenia g_{Na} , prowadząc do depolaryzacji. Wywołuje to początkowy wzrost pobudliwości, ale przedłużona depolaryzacja może uczynić błonę niepobudliwą, prawdopodobnie na skutek procesu inaktywacji sodowej [5, 101, 157, 215].

Mniej bezpośrednio skutki wywoływane są przez środki, które zakłócają komórkowe procesy podtrzymywania tak, że gradienty jonowe przez błonę ulegają zmianie. Glikozydy nasercowe, takie jak ouabaina, bezpośrednio uniemożliwiają wyrzut Na^+ , inhibitory metaboliczne czynią to przez pozbawienie tego procesu dopływu energii [5, 27, 157]. Jak można było się spodziewać na podstawie teorii jonowego przewodnictwa nerwowego, zatrucie systemu wyrzutu sodu nie zmienia natychmiast właściwości elektrycznych aksonu. Doświadczenia Hodgkina i Keynesa [97] wykazały, że można było wywołać ponad 200 000 impulsów w aksonie mątwy *Sepia*, który był zatruty DNP.

LITERATURA

- [1] ADELMAN W. J. Jr., Electrical studies of internally perfused squid axons, [w:] Biophysics and Physiology of Excitable Membranes, red. W. J. Jr. Adelman, Van Nostrand Reinhold Comp., New York, Cincinnati, Toronto, London, Melbourne 1971, 274–319.
- [2] ADELMAN W. J. Jr., GILBERT D. L., Internally perfused squid axons studied under voltage clamp conditions, *J. Cell. Comp. Physiol.*, **64**: 423–428, 1964.
- [3] ADELMAN W. J. Jr., DYRO F. M., SENFT J., Long duration responses obtained from internally perfused axons, *J. Gen. Physiol.*, **48**: 1–9, 1965.
- [4] ADELMAN W. J., CUERVO L. A., DYRO F. M., SENFT J. P., Ionic conductances in internally perfused squid axons, *Fed. Proc.*, **25**: 570–580, 1966.
- [5] AIDLEY D. J., *The Physiology of Excitable Cells*, Cambridge University Press, Cambridge 1971.

- [6] ALBUQUERQUE E. X., WARNICK J. E., The pharmacology of batrachotoxin. IV. Interaction with tetrodotoxin on innervated and chronically denervated rat skeletal muscle, *J. Pharmacol. Exp. Therap.*, **180**: 683-697, 1972.
- [7] ARMSTRONG C. M., Time course of TEA⁺ — induced anomalous rectification in squid giant axons, *J. Gen. Physiol.*, **50**: 491-503, 1966.
- [8] ARMSTRONG C. M., Potassium pores of nerve and muscle membranes, [w:] *Membranes — A Series of Advances*, vol. 3. *Dynamic Properties of Lipid Bilayers and Biological Membranes*, ed. G. Eisenman, Marcel Dekker, Inc., New York 1975, 325-358.
- [9] ARMSTRONG C. M., Evidence for ionic pores in excitable membranes, *Biophys. J.*, **15**: 932-933, 1975.
- [10] ARMSTRONG C. M., Sodium channels and gating currents, *Physiol. Rev.*, **61**: 644-683, 1981.
- [11] ARMSTRONG C. M., BINSTOCK L., Anomalous rectification in the squid giant axon injected with tetraethylammonium chloride, *J. Gen. Physiol.*, **48**: 859-872, 1965.
- [12] ARMSTRONG C. M., HILLE B., The inner quaternary ammonium ion receptor in potassium channels of the node of Ranvier, *J. Gen. Physiol.*, **59**: 388-400, 1972.
- [13] ASANO T., HURLBUT W. P., Effects of potassium, sodium and azide on the ionic movements that accompany activity in frog nerves, *J. Gen. Physiol.*, **41**: 1187, 1958.
- [14] ASHCROFT F. M., Calcium action potentials in the skeletal muscle fibres of the stick insect *Carausius morosus*, *J. Exp. Biol.*, **93**: 257-267, 1981.
- [15] ASHCROFT F. M., STANFIELD P. R., Calcium and potassium currents in muscle fibres of an insect (*Carausius morosus*), *J. Physiol.*, **323**: 93-115, 1982.
- [16] ATWATER I., BEZANILLA F., ROJAS E., Sodium influxes in internally perfused squid giant axon during voltage clamp, *J. Physiol.*, **201**: 657-664, 1969.
- [17] BAKER P. F., HODGKIN A. L., SHAW T. I., Replacement of the axoplasm of giant nerve fibres with artificial solutions, *J. Physiol.*, **164**: 330-354, 1962.
- [18] BARNOLA F. V., VILLEGAS R., CAMEJO G., Tetrodotoxin receptors in plasma membranes isolated from lobster nerve fibers, *Biochim. Biophys. Acta*, **298**: 84-94, 1973.
- [19] BEGENISICH T., Magnitude and location of surface charges on *Myxicola giant* axons, *J. Gen. Physiol.*, **66**: 47-65, 1975.
- [20] BELTON P., GRUNDFEST H., The K permeability of the muscle fiber membrane of the mealworm (*Tenebrio molitor*) larva, *J. Gen. Physiol.*, **45**: 590A, 1962.
- [21] BELTON P., GRUNDFEST H., Potassium activation and K-spikes in muscle fibers of the mealworm larva (*Tenebrio molitor*), *Am. J. Physiol.*, **203**: 588-594, 1962.
- [22] BENNETT M. R., The effect of cations on the electrical properties of the smooth muscle cells of the guinea-pig vas deferens, *J. Physiol.*, **190**: 465-476, 1967.
- [23] BERNSTEIN J., Untersuchungen zur Thermodynamik der bioelektrischen Ströme, *Pflügers Arch. Ges. Physiol.*, **92**: 521-562, 1902.
- [24] BERNSTEIN J., *Elektrobiologie*, Fr. Vieweg, Braunschweig 1912.
- [25] BINSTOCK L., GOLDMAN L., Current- and voltage-clamped studies on *Myxicola giant* axons, Effect of tetrodotoxin, *J. Gen. Physiol.*, **54**: 730-740, 1969.

- [26] BLAUSTEIN M. P., GOLDMAN D. E., Competitive action of calcium and procaine on lobster axon, *J. Gen. Physiol.*, **49**: 1043–1063, 1966.
- [27] BORKOWSKA M. J., Wstępna charakterystyka zjawisk bioelektrycznych w mięśniach pośrednich lotu stonki ziemniaczanej *Leptinotarsa decemlineata* (Say), Praca doktorska, Toruń 1978.
- [28] BORKOWSKA M. J., Geneza potencjałów czynnościowych i ich podłoże jonowe. I. Ogólna charakterystyka potencjałów czynnościowych w świetle badań porównawczych, *Post. Biol. Kom.*, **10**: 165–196, 1983.
- [29] BORKOWSKA M. J., Geneza potencjałów czynnościowych i ich podłoże jonowe. III. Główne teorie pobudzenia. Elektryczne właściwości błony, *Post. Biol. Kom.*, **10**: 239–258, 1983.
- [30] BORKOWSKA M. J., Geneza potencjałów czynnościowych i ich podłoże jonowe. IV. Niezależność oraz bramkowanie kanałów sodowych i potasowych, w przygotowaniu.
- [31] BOUVIER M., GONELLA J., Electrical activity from smooth muscle of the anal sphincteric area of the cat., *J. Physiol.*, **310**: 445–456, 1981.
- [32] BOYLE P. J., CONWAY E. J., Potassium accumulation in muscle and associated changes, *J. Physiol.*, **100**: 1–63, 1941.
- [33] BRISMAR T., Effects of ionic concentration on permeability properties of nodal membrane in myelinated nerve fibres of *Xenopus laevis*; potential clamp experiments, *Acta Physiol. Scand.*, **87**: 474–484, 1973.
- [34] BÜLBRING E., KURIYAMA H., Effects of changes in the external sodium and calcium concentrations on spontaneous electrical activity in smooth muscle of guinea-pig taenia coli, *J. Physiol.*, **166**: 29–58, 1963.
- [35] BYERLY L., HAGIWARA S., Calcium currents in internally perfused nerve cell bodies of *Limnea stagnalis*, *J. Physiol.*, **322**: 503–528, 1982.
- [36] CARNAY L. D., TASAKI I., Ion exchange properties and excitability of the squid giant axon, [w:] *Biophysics and Physiology of Excitable Membranes*, red. W. J. Jr. Adelman, Van Nostrand Reinhold Comp., New York, Cincinnati, Toronto, London, Melbourne 1971, 379–422.
- [37] CATTERALL W. A., Neurotoxins that act on voltage-sensitive sodium channels in excitable membranes, *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **20**: 15–43, 1980.
- [38] CHANDLER W. K., MEVES H., Voltage clamp experiments on internally perfused giant axons, *J. Physiol.*, **180**: 788–800, 1965.
- [39] CHANDLER W. K., HODGKIN A. L., MEVES H., The effect of changing the internal solution on sodium inactivation and related phenomena in giant axons, *J. Physiol.*, **180**: 821–836, 1965.
- [40] COHEN L. B., LANDOWNE D., *J. Physiol.*, **236**: 95–111, 1974; wg Offner F. F., Temperature-independence of total sodium flow: implications for theory of the active membrane, *J. Physiol.*, **252**: 69P, 1975.
- [41] COLE K. S., Dynamic electrical characteristics of the squid axon membrane, *Arch. Sci. Physiol.*, **3**: 253–258, 1949.
- [42] COLQUHOUN D., HENDERSON R., RITCHIE J. M., The binding of labelled tetrodotoxin to non-myelinated nerve fibres, *J. Physiol.*, **227**: 95–126, 1972.
- [43] CONNOR J. A., Calcium current in molluscan neurones: Measurement under conditions which maximize its visibility, *J. Physiol.*, **286**: 41–60, 1979.
- [44] CUERVO L. A., ADELMAN W. J. Jr., Equilibrium and kinetic properties of the interaction between tetrodotoxin and the excitable membrane of the squid giant axon, *J. Gen. Physiol.*, **55**: 309–335, 1970.

- [45] D'ARRIGO J. S., Possible screening of surface charges on crayfish axons by polyvalent metal ions, *J. Physiol.*, **231**: 117-128, 1973.
- [46] DESMEDT J. E., Electrical activity and intracellular sodium concentration in frog muscle, *J. Physiol.*, **121**: 191-205, 1953.
- [47] DRAPER M. H., WEIDMANN S., Cardiac resting and action potentials recorded with an intracellular electrode, *J. Physiol.*, **115**: 74-94, 1951.
- [48] DUDEL J., PEPPER K., RUDEL R., TRAUTWEIN W., The effect of tetrodotoxin on the membrane current in cardiac muscle (*Purkinje fibers*), *Arch. Ges. Physiol.*, **295**: 213-226, 1967.
- [49] EHRENSTEIN G., LECAR H., The mechanism of signal transmission in nerve axons, *Ann. Rev. Biophys. Bioeng.*, **1**: 347-368, 1972.
- [50] EHRENSTEIN G., LECAR H., Electrically gated ionic channels in lipid bilayers, *Quart. Rev. Biophys.*, **10**: 1-34, 1977.
- [51] FATT P., GINSBORG B. L., The ionic requirements for the production of action potentials in crustacean muscle fibres, *J. Physiol.*, **142**: 516-543, 1958.
- [52] FATT P., KATZ B., An analysis of the end-plate potential recorded with an intracellular electrode, *J. Physiol.*, **115**: 320-370, 1951.
- [53] FATT P., KATZ B., The electrical properties of crustacean muscle fibres, *J. Physiol.*, **120**: 171-204, 1953.
- [54] FERRONI A., BLANCHI D., Maximum rate of depolarization of single muscle fibres in normal and low sodium solutions, *J. Gen. Physiol.*, **49**: 17-23, 1965.
- [55] FINLAYSON L. H., ORCHARD I., The ionic regulation of action potentials in the axon of a stretch receptor neuron of the stick insect (*Carausius morosus*), *J. Comp. Physiol.*, **122**: 45-52, 1977.
- [56] FITZHUGH R., COLE K. S., Theoretical potassium loss from squid axons as a function of temperature, *Biophys. J.*, **4**: 257-265, 1964.
- [57] FLOREY E., Bioelectricity, [w:] An Introduction to General and Comparative Animal Physiology, W. B. Saunders Comp., Philadelphia, London 1966, 375-419.
- [58] FRANKENHAEUSER B., HODGKIN A. L., The action of calcium on the electrical properties of squid axons, *J. Physiol.*, **137**: 218-244, 1957.
- [59] FRANKENHAEUSER B., MOORE L. E., The effect of temperature on the sodium and potassium permeability changes in myelinated nerve fibres of *Xenopus laevis*, *J. Physiol.*, **169**: 431, 1963.
- [60] FUKUDA J., Chloride spike: a third type of action potential in tissue-cultured skeletal muscle cells from the chick, *Science*, **185**: 76-78, 1974.
- [61] FUKUDA J., FURUYAMA S., KAWA K., Calcium dependent action potentials in skeletal muscle fibres of a beetle larva, *Xylotrupes dichotomus*, *J. Insect Physiol.*, **23**: 367-374, 1977.
- [62] FURUKAWA T., SASAOKA T., HOSOYA Y., Effects of tetrodotoxin on the neuromuscular junction, *Jap. J. Physiol.*, **9**: 143-153, 1959.
- [63] GAFFEY C. T., MULLINS L. T., Ion fluxes during action potential in *Chara*, *J. Physiol.*, **144**: 505-524, 1958.
- [64] GANONG W. F., Physiology of nerve and muscle cells, [w:] Review of Medical Physiology, Lange Medical Publications, Maruzen Asia (Pte.) Ltd., Singapore 1979, 21-70.
- [65] GERSHON M. D., Effects of tetrodotoxin on innervated smooth muscle preparations, *Brit. J. Pharmacol. Chemotherap.*, **29**: 259-279, 1967.
- [66] GIERASIMOV V., JANISZEWSKI L., The effect of urethane on some electrical properties of molluscan giant neurons, *Experientia*, **23**: 1-3, 1967.

- [67] GILBERT D. L., EHRENSTEIN G., Effect of divalent cations on potassium conductance of squid axons: determination of surface charge, *Biophys. J.*, **9**: 447-463, 1969.
- [68] GODFRAIND T., De POVER A., VERBEKE N., Influence of pH and sodium on the inhibition of guinea-pig heart ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$)—AT Pasa by calcium, *Biochim. Biophys. Acta*, **481**: 202-211, 1977.
- [69] GOLDENBERG M. M., Resistance to tetrodotoxin in the isolated ileum of the rat, *J. Pharm. Pharmacol.*, **23**: 621-622, 1971.
- [70] GOLDMAN L., Kinetics of channel gating in excitable membranes, *Quart. Rev. Biophys.*, **9**: 491-526, 1976.
- [71] GRUNDFEST H., ALJURE E., JANISZEWSKI L., The ionic nature of conductances increases induced in Rajid electroplaques by depolarizing and hyperpolarizing currents, *J. Gen. Physiol.*, **45**: 598, 1962.
- [72] HAGIWARA S., NAKA K., The initiation of spike potential in barnacle muscle fibres under low intracellular Ca^{++} , *J. Gen. Physiol.*, **48**: 141-162, 1964.
- [73] HAGIWARA S., NAKAJIMA S., Tetrodotoxin and manganese ion: effects on action potential of the frog heart, *Science*, **149**: 1254-1255, 1965.
- [74] HAGIWARA S., NAKAJIMA S., Differences in Na and Ca spikes as examined by application of tetrodotoxin, procaine, and manganese ions, *J. Gen. Physiol.*, **49**: 793-806, 1966.
- [75] HAGIWARA S., SAITO N., Voltage-current relations in nerve cell membrane of *Onchidium verruculatum*, *J. Physiol.*, **148**: 161-179, 1959.
- [76] HAGIWARA S., TAKAHASHI K., Resting and spike potentials of skeletal muscle fibers of salt-water elasmobranch and teleost fish, *J. Physiol.*, **190**: 499-518, 1967.
- [77] HARRIS J. B., THESLEFF S., Studies on tetrodotoxin resistant action potentials in denervated skeletal muscle, *Acta Physiol. Scand.*, **83**: 382-388, 1971.
- [78] HASHIMOTO Y., HOLMAN M. E., McLEAN A. J., Effect of tetrodotoxin on the electrical activity of the smooth muscle of the vas deferens, *Nature*, **215**: 430-432, 1967.
- [79] HENDERSON R., WANG J. H., Solubilization of a specific tetrodotoxin-binding component from garfish olfactory nerve membrane, *Biochemistry*, **11**: 4565-4569, 1972.
- [80] HEYER E. J., MACDONALD R. L., Calcium- and sodium-dependent action potentials of mouse spinal cord and dorsal root ganglion neurons in cell culture, *J. Neurophysiol.*, **47**: 641-655, 1982.
- [81] HILLE B., The common mode of action of three agents that decrease the transient change in sodium permeability in nerves, *Nature*, **210**: 1220-1222, 1966.
- [82] HILLE B., The selective inhibition of delayed potassium currents in nerve by tetraethylammonium ion, *J. Gen. Physiol.*, **50**: 1287-1302, 1967.
- [83] HILLE B., Pharmacological modifications of the sodium channels of frog nerve, *J. Gen. Physiol.*, **51**: 199-219, 1968.
- [84] HILLE B., Charges and potentials at the nerve surface. Divalent ions and pH, *J. Gen. Physiol.*, **51**: 221-236, 1968.
- [85] HILLE B., Ionic channels in nerve membranes, *Prog. Biophys. Molec. Biol.*, **21**: 1-32, 1970.
- [86] HILLE B., Potassium channels in myelinated nerve. Selective permeability to small cations, *J. Gen. Physiol.*, **61**: 669-686, 1973.

- [87] HODGKIN A. L., The ionic basis of electrical activity in nerve and muscle, *Biol. Rev.*, **26**: 339-409, 1951.
- [88] HODGKIN A. L., *The Conduction of Nervous Impulse*, Liverpool University Press, Liverpool 1967, 1-108.
- [89] HODGKIN A. L., HOROWICZ P., Movements of Na and K in single muscle fibres, *J. Physiol.*, **145**: 405-432, 1959.
- [90] HODGKIN A. L., HUXLEY A. F., Potassium leakage from an active nerve fibre, *J. Physiol.*, **106**: 341, 1947.
- [91] HODGKIN A. L., HUXLEY A. F., Current carried by sodium and potassium ions through the membrane of the giant axon of *Loligo*, *J. Physiol.*, **116**: 449-472, 1952.
- [92] HODGKIN A. L., HUXLEY A. F., The components of membrane conductance of the giant axon of *Loligo*, *J. Physiol.*, **116**: 473-496, 1952.
- [93] HODGKIN A. L., HUXLEY A. F., The dual effect of membrane potential on sodium conductance in the giant axon of *Loligo*, *J. Physiol.*, **116**: 497-506, 1952.
- [94] HODGKIN A. L., HUXLEY A. F., A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve, *J. Physiol.*, **117**: 500-544, 1952.
- [95] HODGKIN A. L., HUXLEY A. F., Movements of radioactive potassium and membrane current in a giant axon, *J. Physiol.*, **121**: 403-414, 1953.
- [96] HODGKIN A. L., KATZ B., The effect of sodium ions on the electrical activity of the giant axon of the squid, *J. Physiol.*, **108**: 37-77, 1949.
- [97] HODGKIN A. L., KEYNES R. D., Active transport of cations in giant axons from *Sepia* and *Loligo*, *J. Physiol.*, **128**: 28-60, 1955.
- [98] HODGKIN A. L., KEYNES R. D., Movements of labelled calcium in squid giant axons, *J. Physiol.*, **138**: 253-281, 1957.
- [99] HODGKIN A. L., HUXLEY A. F., KATZ B., Measurement of current-voltage relations in the membrane of giant axon of *Loligo*, *J. Physiol.*, **116**: 424-448, 1952.
- [100] HOLMAN M. E., An introduction to the electrophysiology of smooth muscle, [w:] *Handbook of Physiology*, sect. 6, vol. 4, Am. Physiol. Soc., Washington 1968.
- [101] HONERJÄGER P., Cardioactive substances that prolong the open state of sodium channels, *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.*, **92**: 1-74, 1982.
- [102] HUDDART H., The electrical activity of muscle, [w:] *The Comparative Structure and Function of Muscle*, red. G. A. Kerkut, Pergamon Press, Oxford, New York, Toronto, Sydney 1975, 109-291.
- [103] HUXLEY A. F., STÄMPFLI R., Effect of potassium and sodium on resting and action potentials of single myelinated nerve fibres, *J. Physiol.*, **112**: 496-508, 1951.
- [104] INOUE F., FRANK G. B., Effects of ethyl alcohol on excitability and on neuromuscular transmission in frog skeletal muscle, *Brit. J. Pharmacol.*, **30**: 186-193, 1967.
- [105] JANISZEWSKI L., Porównawcza analiza elementarnych zjawisk bioelektrycznych u niektórych bezkręgowców, Wydawnictwa UMK, Toruń 1965, 1-44.
- [106] JANISZEWSKI L., Czynność komórki nerwowej, [w:] *Fizjologia człowieka z elementami fizjologii klinicznej*, red. W. Traczyk, A. Trzebski, PZWL, Warszawa 1980, 30-50.
- [107] JULIAN F. J., MOORE J. W., GOLDMAN D. E., Membrane potentials of

- the lobster giant axon obtained by use of the sucrose gap technique, *J. Gen. Physiol.*, **45**: 1195-1216, 1962.
- [108] JULIAN F. J., MOORE J. W., GOLDMAN D. E., Current-voltage relations in the lobster giant axon membrane under voltage clamp conditions, *J. Gen. Physiol.*, **45**: 1217-1238, 1962.
- [109] JUNGE D., *Nerve and Muscle Excitation*, Sinauer Associates, Inc., Sunderland, Massachusetts 1981.
- [110] KANO M., SHIMADA Y., ISHIKAWA K., Electrogenesis of embryonic chick skeletal muscle cells differentiated in vitro, *J. Cell. Physiol.*, **79**: 363-366, 1972.
- [111] KAO C. Y., Tetrodotoxin, saxitoxin and their significance in the study of excitation phenomena, *Pharmacol. Rev.*, **18**: 997-1049, 1966.
- [112] KAO C. Y., Pharmacology of tetrodotoxin and saxitoxin, *Fed. Proc.*, **31**: 1117-1123, 1972.
- [113] KAO C. Y., New perspectives on the tetrodotoxin and saxitoxin receptors, [w:] *Molecular Basis of Drug Action*, red. Singer, Ondarza, Elsevier North, Holland, 1981, 283-297.
- [114] KAO C. Y., FUHRMAN F. A., Differentiation of the actions of tetrodotoxin and saxitoxin, *Toxicon*, **5**: 25-34, 1967.
- [115] KAO C. Y., NISHIYAMA A., Actions of saxitoxin on peripheral neuromuscular systems, *J. Physiol.*, **180**: 50-66, 1965.
- [116] KATZ B., *Nerve, Muscle and Synapse*, McGraw-Hill Book Company, New York, St Louis, San Francisco, Toronto, London, Sydney 1966.
- [117] KEATINGE W. R., Ionic requirements for arterial action potential, *J. Physiol.*, **194**: 168-182, 1968.
- [118] KERKUT G. A., GARDNER D. R., The role of calcium ions in the action potentials of *Helix aspersa* neurones, *Comp. Biochem. Physiol.*, **20**: 147-162, 1967.
- [119] KEYNES R. D., The ionic movements during nervous activity, *J. Physiol.*, **114**: 119, 1951.
- [120] KEYNES R. D., LEWIS P. R., The sodium and potassium content of cephalopod nerve fibres, *J. Physiol.*, **114**: 151-182, 1951.
- [121] KEYNES R. D., RITCHIE J. M., The movements of labelled ions in mammalian non-myelinated nerve fibres, *J. Physiol.*, **179**: 333-367, 1965.
- [122] KIDOKORO Y., Development of action potentials in a clonal rat skeletal muscle cell line, *Nature New Biol.*, **241**: 158-159, 1973.
- [123] KIDOKORO Y., Sodium and calcium components of the action potential in a developing skeletal muscle cell line, *J. Physiol.*, **244**: 145-159, 1975.
- [124] KIDOKORO Y., GRINNELL A. D., EATON D. C., Tetrodotoxin sensitivity of muscle action potentials in pufferfishes and related fishes, *J. Comp. Physiol.*, **89**: 50-72, 1974.
- [125] KIM Y. H., BROWN G. B., MOSHER H. S., FUHRMAN F. A., Tetrodotoxin: occurrence in atelopid frogs of Costa Rica, *Science*, **184**: 151-152, 1975.
- [126] KISHIMOTO U., Voltage clamp and internal perfusion studies of *Nitella* internodes, *J. Cell. Comp. Physiol.*, **66**: 43-54, 1965.
- [127] KOKETSU K., NISHI S., Effects of tetrodotoxin on the action potential in Na-free media, *Life Sci.*, **5**: 2341-2346, 1966.
- [128] KOKETSU K., CERF J. A., NISHI S., Effects of quaternary ammonium ions on electrical activity of spinal ganglion cells in frogs, *J. Neurophysiol.*, **22**: 177-194, 1959.
- [129] KOPPENHÖFER E., Die Wirkung von Tetraäthylammoniumchlorid auf die

- Membranströme Ranvierscher Schnürringe von *Xenopus laevis*, Pflügers Arch. ges. Physiol., 293: 34–55, 1967.
- [130] KOPPENHÖFER E., SCHMIDT H., Die Wirkung von Skorpiongift auf die Ionenströme des Ranvierschen Schnürrings. I. Die Permeabilitäten P_{Na} und P_K , Pflügers Arch. ges. Physiol., 303: 133–149, 1968.
- [131] KOPPENHÖFER E., SCHMIDT H., Die Wirkung von Skorpiongift auf die Ionenströme des Ranvierschen Schnürrings. II. Unvollständige Natrium-Inaktivierung, Pflügers Arch. ges. Physiol., 303: 150–161, 1968.
- [132] KOPPENHÖFER E., VOGEL W., Wirkung von Tetrodotoxin und Tetraäthylammoniumchlorid an der Innenseite der Schnürringsmembran von *Xenopus laevis*, Pflügers Arch. ges. Physiol., 313: 361–380, 1969.
- [133] KOSTYUK P. G., Calcium ionic channels in electrically excitable membranes, Neuroscience, 5: 945–959, 1980.
- [134] KOSTYUK P. G., KRISHTAL O. A., Separation of sodium and calcium currents in the somatic membrane of mollusc neurones, J. Physiol., 270: 545–568, 1977.
- [135] KURIYAMA H., OSA T., TOIDA N., Effect of tetrodotoxin on smooth muscle cells of the guinea-pig taenia coli, Brit. J. Pharmacol. Chemotherap., 27: 366–376, 1966.
- [136] LEVINE L., The effects of modified Ringer's solutions on the membrane potentials of innervated and denervated frog sartorius muscle fibres, J. Cell Physiol., 67: 107–124, 1966.
- [137] LOWENSTEIN W. R., TERZUOLO C. A., WASHIZU Y., Separation of transducer and impulse generating processes in sensory receptors, Science, 142: 1180–1181, 1963.
- [138] McCANN F. V., Calcium action potentials in insect myocardial fibers, Comp. Biochem. Physiol., 40A: 353–357, 1971.
- [139] McDONALD T. F., SACHS H. G., DeHAAN R. L., Tetrodotoxin desensitization in aggregates of embryonic chick heart cells, J. Gen. Physiol., 62: 286–302, 1973.
- [140] McLAUGHLIN S. G. A., SZABO G., EISENMAN G., Divalent ions and the surface potential of charged phospholipid membranes, J. Gen. Physiol., 58: 667–687, 1971.
- [141] MOORE J. W., Voltage clamp methods, [w:] Biophysics and Physiology of Excitable Membranes, red. W. J. Jr. Adelman, Van Nostrand Reinhold Comp., New York, Cincinnati, Toronto, London, Melbourne 1971, 143–167.
- [142] MOORE J. W., NARAHASHI T., Tetrodotoxin's highly selective blockage of an ionic channel, Fed. Proc., 26: 1655–1663, 1967.
- [143] MOORE J. W., ANDERSON N., NARAHASHI T., Tetrodotoxin blocking: early conductance channel or sodium?, Fed. Proc., 25: 569, 1966.
- [144] MOORE J. W., NARAHASHI T., ULBRICHT W., Sodium conductance shift in an axon internally perfused with a low K solution, Fed. Proc., 22: 174, 1963.
- [145] MOORE J. W., BLAUSTEIN M. P., ANDERSON N. C., NARAHASHI T., Basis of tetrodotoxin's selectivity in blockage of squid axons, J. Gen. Physiol., 50: 1401–1411, 1967.
- [146] MOSHER H. S., FUHRMAN F. A., BUCHWALD H. D., FISCHER H. G., Tarichatoxin-tetrodotoxin, a potent neurotoxin, Science, 144: 1100–1110, 1964.
- [147] MOZHAYEVA G. N., NAUMOV A. P., Tetraethylammonium ion inhibition of potassium conductance of the nodal membrane, Biochim. Biophys. Acta, 290: 248–255, 1972.

- [148] MURAYAMA K., ABBOTT N. J., NARAHASHI T., SHAPIRO B. I., Effects of allethrin and *Condylactis* toxin on the kinetics of sodium conductance of crayfish axon membranes, *Comp. Gen. Pharmacol.*, **3**: 391-400, 1972.
- [149] NAGAI T., Insect visceral muscle. Ionic dependence of electrical potentials in the proctodeal muscle fibres, *J. Insect Physiol.*, **18**: 2299-2318, 1972.
- [150] NAKAJIMA S., Adaptation in stretch receptor neurons of crayfish, *Science*, **146**: 1168-1170, 1964.
- [151] NAKAJIMA S., IWASAKI S., OBATA K., Delayed rectification and anomalous rectification in frog's skeletal muscle membrane, *J. Gen. Physiol.*, **46**: 97-115, 1962.
- [152] NAKAMURA Y., NAKAJIMA S., GRUNDFEST H., Analysis of spike electrogenesis and depolarizing K inactivation in electroplaques of *Electrophorus electricus*, *J. Gen. Physiol.*, **49**: 321-349, 1965.
- [153] NAKAMURA Y., NAKAJIMA S., GRUNDFEST H., The action on tetrodotoxin of electrogenic components of squid giant axons, *J. Gen. Physiol.*, **48**: 985-996, 1965.
- [154] NARAHASHI T., The properties of insect axons, *Adv. Insect Physiol.*, **1**: 176-256, 1963.
- [155] NARAHASHI T., Neurophysiological basis for drug action: ionic mechanism, site of action and active form in nerve fibers, [w:] *Biophysics and Physiology of Excitable Membranes*, red. W. J. Jr. Adelman, Van Nostrand Reinhold Comp., New York, Cincinnati, Toronto, London, Melbourne 1971, 423-462.
- [156] NARAHASHI T., Mechanism of action of tetrodotoxin and saxitoxin on excitable membranes, *Fed. Proc.*, **31**: 1124-1132, 1972.
- [157] NARAHASHI T., Chemicals as tools in the study of excitable membranes, *Physiol. Rev.*, **54**: 813-889, 1974.
- [158] NARAHASHI T., HAAS H. G., Interaction of DDT with the components of lobster nerve membrane conductance, *J. Gen. Physiol.*, **51**: 177-198, 1968.
- [159] NARAHASHI T., ANDERSON N. C., MOORE J. W., Tetrodotoxin does not block excitation from inside the nerve membrane, *Science*, **153**: 765-767, 1966.
- [160] NARAHASHI T., ANDERSON N. C., MOORE J. W., Comparison of tetrodotoxin and procaine in internally perfused giant axons, *J. Gen. Physiol.*, **50**: 1413-1428, 1967.
- [161] NARAHASHI T., MOORE J. W., SCOTT W. R., Tetrodotoxin blockage of sodium conductance increase in lobster giant axons, *J. Gen. Physiol.*, **47**: 965-978, 1964.
- [162] NARAHASHI T., MOORE J. W., SHAPIRO B. I., *Condylactis* toxin: interaction with nerve membrane ionic conductances, *Science*, **163**: 680-681, 1969.
- [163] NARAHASHI T., DEGUCHI T., URAKAWA N., OHKUBO Y., Stabilization and rectification of muscle fibre membrane by tetrodotoxin, *Am. J. Physiol.*, **198**: 934-940, 1960.
- [164] NARAHASHI T., SHAPIRO B. I., DEGUCHI T., SCUKA M., WANG C. M., Effects of scorpion venom on squid axon membranes, *Am. J. Physiol.*, **222**: 850-857, 1972.
- [165] NASTUK W. L., HODGKIN A. L., The electrical activity of single muscle fibres, *J. Cell. Comp. Physiol.*, **35**: 39-73, 1950.
- [166] NEHER E., LUX H. D., Differential action of TEA⁺ on two K⁺ — current components of a molluscan neurone, *Arch. European J. Physiol.*, **336**: 87-100, 1972.

- [167] NIEDEGERKE R., ORKAND R. K., The dependence of the action potential of the frog's heart on the external and intracellular sodium concentration, *J. Physiol.*, **184**: 312-334, 1966.
- [168] NIEDEGERKE R., ORKAND R. K., The dual effect of calcium on the action potential of the frog's heart, *J. Physiol.*, **184**: 219-311, 1966.
- [169] NOGUCHI T., HASHIMOTO Y., Isolation of tetrodotoxin from a goby, *Gobius criniger*, *Toxicon*, **11**: 305-307, 1973.
- [170] OLSZEWSKA E., JANISZEWSKI L., GOJ H., The influence of tetrodotoxin (TTX) on the action potentials in the neurons of *Planorbis corneus* L., *Bull. Acad. Pol. Sci.*, **22**: 523-525, 1974.
- [171] OSTERHOUT W. J. V., HILL S. E., *J. Gen. Physiol.*, **17**: 87-98, 1933; wg [36].
- [172] OZEKI M., SATO M., Changes in the membrane potential and the membrane conductance associated with a sustained compression of the non-myelinated nerve terminal in Pacinian corpuscles, *J. Physiol.*, **180**: 186-208, 1965.
- [173] PATLAK J. B., The ionic basis for the action potential in the flight muscle of the fly, *Sarcophaga bullata*, *J. Comp. Physiol.*, **107**: 1-11, 1976.
- [174] PICHON Y., Effets des ions tétraéthylammonium (TEA⁺) sur la membrane de l'axone géant d'insecte, *Comp. Rend. Soc. Biol.*, **163**: 952-958, 1969.
- [175] PICHON Y., Effets de la tétrodotoxine (T.T.X.) sur les caractéristiques de perméabilité membranaire de la fibre nerveuse isolée d'insecte, *Compt. Rend.*, **268**: 1095-1097, 1969.
- [176] PICKARD W. F., LETTVIN J. Y., MOORE J. W., TAKATA M., POOLER J., BERNSTEIN T., Cesium ions do not pass the membrane of the giant axon, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **52**: 1177-1187, 1964.
- [177] REDFERN P., LUNDH H., THESLEFF S., Tetrodotoxin resistant action potentials in denervated rat skeletal muscle, *European J. Pharmacol.*, **11**: 263-265, 1970.
- [178] REUTER H., Divalent cations as charge carriers in excitable membranes, *Prog. Biophys. Mol. Biol.*, **26**: 1-43, 1973.
- [179] RITCHIE J. M., Tetrodotoxin and saxitoxin, and the sodium channels of excitable tissue, *Trends Pharmacol. Sci.*, 275-279, 1980.
- [180] RITCHIE J. M., CHIU S. Y., Distribution of sodium and potassium channels in mammalian myelinated nerve, [w:] *Demyelinating Disease: Basic and Clinical Electrophysiology*, red. S. G. Waxman, J. M. Ritchie, Raven Press, New York 1981, 329-342.
- [181] RITCHIE J. M., ROGART R. B., STRICHARTZ G. R., A new method for labelling saxitoxin and its binding to non-myelinated fibres of the rabbit vagus, lobster walking leg, and garfish olfactory nerves, *J. Physiol.*, **261**: 477-494, 1976.
- [182] ROJAS E., ATWATER I., Effect of tetrodotoxin on the early outward currents in perfused giant axons, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **57**: 1350-1355, 1967.
- [183] ROJAS E., CANESSA-FISCHER M., Sodium movements in perfused squid giant axons. Passive fluxes, *J. Gen. Physiol.*, **52**: 240-257, 1968.
- [184] ROTHENBERG M. A., Ionic movements across axonal membranes, *Biochim. Biophys. Acta*, **4**: 96, 1950.
- [185] SCHWARZ J. R., ULBRICHT W., WAGNER H.-H., The rate of action of tetrodotoxin on myelinated nerve fibres of *Xenopus laevis* and *Rana esculenta*, *J. Physiol.*, **233**: 167-194, 1973.
- [186] SHANES A. M., Electrochemical aspects of physiological and pharmacological action in excitable cells, *Pharmacol. Rev.*, **10**: 59, 1958.

- [187] SHEUMACK D. D., HOWDEN M. E. H., SPENCE I., QUINN R. J., Maculotoxin: a neurotoxin from the venom glands of the octopus *Hapalochlaena maculosa* identified as tetrodotoxin, *Science*, **199**: 188–189, 1978.
- [188] SPECTOR I., KIMHI Y., NELSON P. G., Tetrodotoxin and cobalt blockade of neuroblastoma action potentials, *Nature New Biol.*, **246**: 124–126, 1973.
- [189] SPERELAKIS N., LEHMKUHL D., Insensitivity of cultured chick heart cells to autonomic agents and tetrodotoxin, *Am. J. Physiol.*, **209**: 693–698, 1965.
- [190] STÄMPFLI R., A new method for measuring membrane potentials with external electrodes, *Experientia*, **10**: 508–509, 1954.
- [191] STANDEN N. B., Calcium and sodium ions as charge carriers in the action potential of an identified snail neurone, *J. Physiol.*, **249**: 241–252, 1975.
- [192] STANFIELD P. R., The effect of the tetraethylammonium ion on the delayed currents of frog skeletal muscle, *J. Physiol.*, **209**: 209–229, 1970.
- [193] STEFANI E., CHIARANDINI D. J., Ionic channels in skeletal muscle, *Ann. Rev. Physiol.*, **44**: 357–372, 1982.
- [194] TAKATA M., MOORE J. W., KAO C. Y., FUHRMAN F. A., Blockage of sodium conductance increase in lobster giant axon by tarichatoxin (tetrodotoxin), *J. Gen. Physiol.*, **49**: 977–988, 1966.
- [195] TASAKI I., HAGIWARA S., Demonstration of two stable potential states in the squid giant axon under tetraethyl ammonium chloride, *J. Gen. Physiol.*, **40**: 859–872, 1957.
- [196] TASAKI I., SHIMAMURA M., Further observations on resting and action potential of intracellularly perfused squid giant axon, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **48**: 1571–1577, 1962.
- [197] TASAKI I., SINGER I., Membrane macromolecules and nerve excitability: a physico-chemical interpretation of excitation in squid giant axons, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **137**: 792–806, 1966.
- [198] TASAKI I., WATANABE A., LERMAN L., A study of the role of divalent cations in excitation of squid giant axons, *Am. J. Physiol.*, **213**: 1465–1474, 1967.
- [199] ULBRICHT W., Ionic channels and gating currents in excitable membranes, *Ann. Rev. Biophys. Bioeng.*, **6**: 7–31, 1977.
- [200] USHERWOOD P. N. R., Electrochemistry of insect muscle, [w:] *Advances in Insect Physiology* 6, red. J. W. L. Beament, J. E. Treherne, V. B. Wigglesworth, Academic Press, New York 1969, 205–278.
- [201] USHERWOOD P. N. R., *Układ nerwowy*, PWN, Warszawa 1976.
- [202] VENOSA R. A., Inward movement of sodium ions in resting and stimulated frog's sartorius muscle, *J. Physiol.*, **241**: 155–173, 1974.
- [203] VIERHAUS J., ULBRICHT W., Rate of action of tetraethylammonium ions on the duration of action potentials in single Ranvier nodes, *Pflügers Arch. ges. Physiol.*, **326**: 88–100, 1971.
- [204] WAGNER H.-H., ULBRICHT W., The rates of saxitoxin action and of saxitoxin-tetrodotoxin interaction at the node of Ranvier, *Pflügers Arch.*, **359**: 297–315, 1975.
- [205] WALD F., Ionic differences between somatic and axonal action potentials in snail giant neurones, *J. Physiol.*, **220**: 267–281, 1972.
- [206] WAREHAM A. C., DUNCAN C. J., BOWLER K., Electrogenesis in cockroach muscle, *Comp. Biochem. Physiol.*, **48A**: 799–813, 1974.
- [207] WASHIO H., The ionic requirements for the initiation of action potentials in insect muscle fibers, *J. Gen. Physiol.*, **59**: 121–134, 1972.

- [208] WEISBLAT D. A., BYERLY L., RUSSELL R. L., Ionic mechanisms of electrical activity in somatic muscle of the nematode *Ascaris lumbricoides*, *J. Comp. Physiol.*, **111**: 93-113, 1976.
- [209] WERMAN R., McCANN F. V., GRUNDFEST H., Graded and all-or-none electrogenesis in arthropod muscle. I. The effects of alkali-earth cations on the neuromuscular system of *Romalea microptera*, *J. Gen. Physiol.*, **44**: 979-995, 1961.
- [210] WILDE W. S., Ionic transfer in muscle and nerve, [w:] *Metabolic Aspects of Transport across Cell Membranes*, red. G. R. Murphey, University of Wisconsin Press, Madison 1957.
- [211] WILLARD A. L., Electrical excitability of outgrowing neurites of embryonic neurones in cultures of dissociated neural plate of *Xenopus laevis*, *J. Physiol.*, **301**: 115-128, 1980.
- [212] YAMAGISHI S., SANO T., Effect of tetrodotoxin on the pacemaker action potential of the sinus node, *Proc. Japan Acad.*, **42**: 1194-1196, 1966.
- [213] YAMAMOTO D., FUKAMI J., Ionic requirements for non-synaptic electrogenesis in the muscle fibres of a lepidopterous insect, *J. Exp. Biol.*, **70**: 41-47, 1977.
- [214] YAMAMOTO D., FUKAMI J., WASHIO H., Voltage clamp studies on insect skeletal muscle. I. The inward current, *J. Exp. Biol.*, **92**: 1-12, 1981.
- [215] YEH J. Z., Blockage of sodium channels by stereoisomers of local anesthetics, [w:] *Molecular Mechanisms of Anesthesia. Progress in Anesthesiology*, vol. 2, red. B. Raymond Fink, Raven Press, New York 1980, 35-44.
- [216] ZIEGLGÄNSBERGER W., PUIL E. A., Tetrodotoxin interference of CNS excitation by glutamic acid, *Nature New Biol.*, **239**: 204-205, 1972.

Nadestano: 10 grudnia 1982.

Przyjęto: 30 marca 1983.

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

GENEZA POTENCJAŁÓW CZYNNOSCIOWYCH I ICH PODŁOŻE
JONOWE

III. GŁÓWNE TEORIE POBUDZENIA. ELEKTRYCZNE
WŁAŚCIWOŚCI BŁONY *

ACTION POTENTIALS GENESIS AND THEIR IONIC BASIS
III. CARDINAL THEORIES OF EXCITATION. THE ELECTRICAL PROPERTIES
OF THE MEMBRANE

Maria Jolanta BORKOWSKA

Zakład Fizjologii Zwierząt Instytutu Biologii UMK w Toruniu

Streszczenie. Model matematyczny, integralna część teorii Hodgkina-Huxleya, został opracowany, aby opisać zależności przewodności od napięcia i czasu. Pozwolił on na obliczenie teoretycznych przewodności dla jonów sodowych i potasowych oraz na przewidzenie kształtu potencjału czynnościowego, a także na wyjaśnienie licznych innych cech fizjologii aksonu (np. progu pobudzenia, refrakcji, pobudzenia anodowego). Zaproponowany 30 lat temu przez Hodgkina i Huxleya model pobudzenia pozostaje nadal aktualny w swych ogólnych założeniach, chociaż podlega obecnie coraz to nowym modyfikacjom i udoskonaleniom, jeśli chodzi o szczegóły. Istnieją jednak również inne modele pobudliwości, zupełnie odmienne od oryginalnej teorii Hodgkina i Huxleya.

Przedstawiono również tak właściwości elektryczne błony odpowiedzialne za rozprzestrzenianie się w niej zjawisk bioelektrycznych, jak i wydarzenia kontrolujące powstawanie potencjałów czynnościowych, co pozwala zgromadzić wiele wartościowych informacji o odpowiedziach błony komórkowej na depolaryzację i wydarzeniach prowadzących do powstania iglicy.

Summary. The mathematical model (the integral part of Hodgkin-Huxley theory) has been constructed to describe the voltage and time dependencies of the conductances. It permitted to predict the shape of action potentials and theoretical sodium and potassium conductances as well as to account for the other numerous physiological phenomena (the threshold potential, refractoriness, anode break excitation and others). The Hodgkin-Huxley model of excitation, proposed thirty

* Praca wykonana w ramach Problemu Międzyresortowego MR/II.

years ago, is still full of present interest as far as its basic principles are concerned even if it is more and more modified and completed in details. However there are also alternative models of excitability, very different from original Hodgkin and Huxley theory.

The electrical properties of the membrane responsible for the spreading of an electrical event in a membrane as well as the events controlling action potential production, what permits to gain much valuable information about the response of the cell membrane to depolarization and the events leading to spike production, are also presented.

WYKAZ SKRÓTÓW I SYMBOLI

ACh	— acetylocholina
a.m.r.	— aktywna odpowiedź błony (active membrane response)
AP, APs	— potencjał(y) czynnościowy(e) (action potential(s))
E_m , MP	— potencjał błonowy (membrane potential)
E_{Na} , E_K	— potencjał równowagi, odpowiednio, dla jonów sodowych i potasowych
e.p.p.(s.)	— potencjał(y) płytki końcowej (end-plate potential(s))
g_{Na} , g_K	— przewodność błony, odpowiednio, dla jonów sodowych i potasowych
I_{Na} , I_K	— prąd, odpowiednio, sodowy i potasowy
P_{Na}	— współczynnik przepuszczalności = stała przenikania, używane również w znaczeniu — przepuszczalność błony dla jonów sodowych
RP	— potencjał spoczynkowy (resting potential)
VC	— stabilizacja napięcia (voltage clamp)

1. MODEL HODGKINA-HUXLEYA I INNE TEORIE POBUDZENIA

1.1. PRZEWIDYWANIE PRĄDÓW W DOŚWIADCZENIACH VC

Należy pamiętać, że teoria Hodgkina-Huxleya obejmuje faktycznie dwie części: 1. model równoległej przewodności błony aksonu, który w połączeniu z doświadczeniami VC dostarczył tak wiele wartościowych informacji (omówiony w [8]) i 2. model matematyczny, który został stworzony, aby opisać zależności przewodności od napięcia i czasu [34]. Inne, nowsze modele także usiłują wyjaśnić znane właściwości prądu sodowego i potasowego. Oryginalna teoria Hodgkina-Huxleya miała wyjaśnić następujące obserwacje wynikłe z doświadczeń VC: 1. oddzielne prądy niesione przez Na^+ i K^+ , 2. przewodność dla K^+ , która włącza się wolno, z S-kształtnym przebiegiem w czasie, w następstwie impulsu depolaryzacyjnego i 3. przewodność dla Na^+ , która włącza się, startując od niezmiernie niskiej wartości i szybko narastając do około 25 mS/cm^2 , a następnie zanika wykładniczo (wolno inaktywuje się) [33, 34, 44].

Wyjściowym założeniem teorii Hodgkina-Huxleya [34] były oddzielne kanały dla Na^+ , K^+ i innych jonów. Całkowity transmembranowy prąd I w metodzie VC jest dany przez równanie (por. równanie (3) w części II artykułu [8])

$$I = C_m \frac{dV}{dt} + I_i, \quad (1)$$

które, rozwijając wyrażenie I_i — prąd jonowy, można rozwinąć do postaci

$$I = C_m \frac{dV}{dt} + I_{Na} + I_K + I_l = C_m \frac{dV}{dt} + g_{Na}(V - V_{Na}) + g_K(V - V_K) + g_l(V - V_l), \quad (2)$$

gdzie I oznacza gęstość prądu [A/cm^2], V — potencjał błonowy, jako mierzone napięcie [mV], C_m — pojemność błonową [F/cm^2], g_{Na} , g_K , g_l — przewodności, odpowiednio, dla Na^+ , K^+ i upływu [S/cm^2], V_{Na} , V_K , V_l — potencjały równowagi, odpowiednio, dla Na^+ , K^+ i upływu [V]. Równanie to opisuje prąd przez strukturę nerwową, której wnętrze jest izopotencjalne (bez rozprzestrzeniania się prądu wzdłuż). Przewodności g_{Na} i g_K w założeniu zmieniają się wraz ze zmianą potencjału i czasu w sposób deterministyczny. Przewodność upływu jest w założeniu stała. W warunkach VC wielkość zmiany potencjału wynosi zero, a prądy błonowe są czysto jonowe i powinny być dane przez ostatnie 3 części równania (2). Aby stwierdzić, czy model ten pozwala przewidzieć prawdziwe prądy błonowe, konieczne jest przede wszystkim napisanie wyrażen dla g_{Na} i g_K jako funkcji potencjału i czasu [44].

1.2. TEORETYCZNE PRZEWODNOŚCI DLA JONÓW Na i K ORAZ PRZEWIDYWANIE ROZPRZESTRZENIAJĄCEGO SIĘ AP

Jeśli rozważymy równania użyte przez Hodgkina i Huxleya [34] w celu obliczenia kształtu AP, to zobaczymy, że pierwszym etapem było znalezienie na podstawie analizy doświadczeń VC równań dla opisanego obserwowanych zmian przewodności. Przewodność dla K^+ jest opisana równaniem o postaci

$$g_K = \bar{g}_K n^4, \quad (3)$$

gdzie \bar{g}_K oznacza stałą równą maksymalnej wartości g_K , n zaś bezwymiarową zmienną, która zmienia się od 0 do 1 jako funkcja napięcia i czasu. Czwarta potęga n jest potrzebna, aby opisać wolne rozwijanie się g_K w następstwie impulsu depolaryzacyjnego. Fizycznym analogiem takiego procesu jest fakt, że jony K mogłyby przechodzić przez błonę, jeśli 4 naładowane cząsteczki przesuną się do pewnego obszaru błony pod wpływem pola elektrycznego jednocześnie, podczas gdy prawdopodobieństwo, że jedna z tych cząsteczek znajdzie się w prawidłowej pozycji jest proporcjonalne do n [33, 34].

Kanał sodowy jest trochę bardziej skomplikowany, ponieważ ulega on inaktywacji. W celu ujęcia tego w swojej teorii, Hodgkin i Huxley założyli, że przewodność dla Na^+ jest dana przez równanie

$$g_{\text{Na}} = \bar{g}_{\text{Na}} m^3 h, \quad (4)$$

gdzie \bar{g}_{Na} oznacza stałą równą maksymalnej wartości g_{Na} , m — parametr aktywacji, jak n , który zmienia się od 0 do 1 jako funkcja napięcia i czasu, h zaś parametr inaktywacji, również zmieniający się od 0 do 1, jako funkcja napięcia i czasu. W przypadku kanału sodowego dla wyjaśnienia procesów aktywacji i inaktywacji w równaniu (4) zakłada się, że 3 cząsteczki aktywujące i 1 inaktywująca muszą znaleźć się blisko pewnego obszaru błony, aby jony Na mogły przez nią przejść. Prawdopodobieństwo, że w określonym miejscu znajdą się 3 cząsteczki aktywujące i żadna blokująca jest $m^3 h$. Tak więc kanał sodowy jest otwierany przez ruch 3 cząsteczek, z których każda z prawdopodobieństwem m znajdzie się w prawidłowej pozycji, a inaktywowany przez zaistnienie prawdopodobieństwa $(1 - h)$ [33, 34]. W warunkach spoczynku m jest bliskie 0 (0,05), a h ma wartość 0,6, podczas gdy wartość n równa się 0,3. Jest to główna przyczyna tego, że g_{K} jest większe niż g_{Na} w normalnych warunkach spoczynkowych [55]. Kiedy błona zostanie zdepolaryzowana, P_{Na} „włącza się” w wyniku szybkiego zwiększania się m od poziomu spoczynkowego 0,05 do wartości maksymalnej 1, a jej „wyłączenie” podczas utrzymywanej depolaryzacji jest związane ze zmniejszeniem się h , praktycznie do 0. Należy pamiętać, że ponieważ $\tau_n > \tau_m < \tau_h$ (τ — stała czasu), w normalnych warunkach proces m jest najszybszy i początkowa komponenta prądu jonowego jest praktycznie czystym I_{Na} . Repolaryzacja „wyłącza” P_{Na} w wyniku zmniejszania się m [36, 55]. Z prawie taką samą szybkością, z jaką zwiększa się n , h zmniejsza się i I_{Na} wyłącza się z szybkością podobną do „włączania się” I_{K} . Po przywróceniu spoczynkowej wartości potencjału błonowego w warunkach VC, odkomórkowy I_{K} utrzymuje się jeszcze przez chwilę (zwykle określane jako prąd końcowy — tail current). Jest on generowany, ponieważ w warunkach spoczynku E_m nie jest równy E_{K} [55].

Zmiana n , m i h , następująca w wyniku depolaryzacji w warunkach VC w aksonie, pokazana jest na rycinie 1. n rozwija się wykładniczo w czasie, powodując obserwowaną g_{K} , m rozwija się również wykładniczo z małą stałą czasową, a h wykładniczo opada z dużą stałą czasową. Iloczyn $m^3 h$ ma wówczas wymagany kształt, co odpowiada przebiegowi w czasie g_{Na} [44]. Kiedy teoretyczne wartości n , m i h zostaną wstawione do równania (2), przewidywane prądy będą zupełnie bliskie prądom mierzonym techniką VC. Hodgkin i Huxley obliczali prądy jonowe używając dla każdego rodzaju prądu takich równań, jak np.

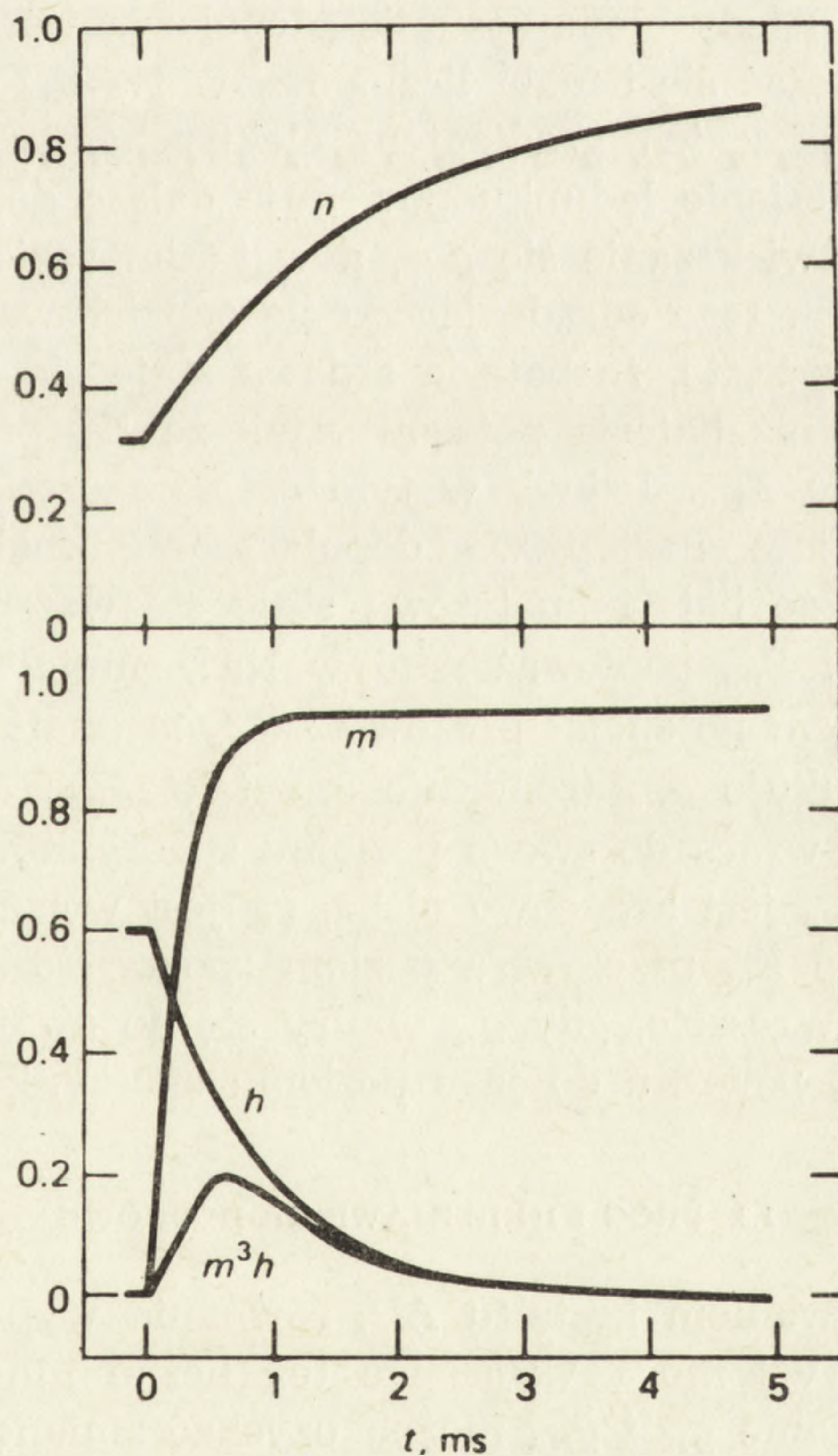
$$I_{\text{K}} = \bar{g}_{\text{K}} n^4 (V - V_{\text{K}}) \quad \text{itd.}$$

Cały prąd błonowy dany jest przez równania (1) i (2), które można teraz rozwinąć do następującej postaci:

$$I = C_m \frac{dV}{dt} + \bar{g}_{Na} m^3 h (V - V_{Na}) + \bar{g}_K n^4 (V - V_K) + \bar{g}_l (V - V_l). \quad (5)$$

Powyższe teoretyczne przewodności obliczone były dla aksonów stabilizowanych pod względem długości, które odpowiadały tym samym potencjałom transmembranowym we wszystkich aktywnych obszarach.

Dodatkowo, teoria ta pozwala przewidzieć kształt AP w tak stabilizowanych aksonach, których wnętrze jest utrzymywane na poziomie izopotencjalnym za pośrednictwem metalowej elektrody. Aby określić kształt AP, Hodgkin i Huxley [34] rozwiązali równanie (5) metodami numerycznymi pod warunkiem, że V może się zmieniać. Ponadto zastosowali oni także swoją teorię do aksonów, które nie były stabilizowane na długość, gdzie potencjał błonowy mógł zmieniać się wraz z odległością wzdłuż aksonu. W tym przypadku AP, V był obliczany z równania (5) rozwiniętego dla rozprzestrzeniającego się AP, gdzie $V = E - E_r$.



Ryc. 1. Zmiana w czasie parametrów Hodgkina-Huxleya, następująca w wyniku depolaryzacji aksonu w warunkach stabilizacji napięcia (według [44])

Kształt AP można obliczyć znając wartości stałych komponent w pojęciowym modelu błony (E_{Na} , E_K , E_l i C_m) i jeśli znane są równania opisujące zachowanie się zmiennych g_{Na} i g_K . Mając te wszystkie potrzebne dane, Hodgkin i Huxley [34] uzyskali wyniki bardzo ściśle tak pod względem ilościowym, jak i pod względem kształtu, z małymi tylko różnicami między przewidywanymi a faktycznie obserwowanymi APs. Rycina 1 w części II artykułu [8] pokazuje takie teoretyczne rozwiązanie zrobione dla rozprzestrzeniającego się AP i towarzyszących mu zmian g_{Na} i g_K . Warto jest prześledzić zmiany potencjału i zachowanie się przewodności podczas przebiegu całego potencjału. Rozprzestrzeniający się AP zasadniczo nie różni się od AP w stabilizowanym na długość aksonie; obydwie mają prawie taką samą amplitudę i obydwie charakteryzują się obecnością dodatniego potencjału następczego, czyli hiperpolaryzacji do poziomu nieco bardziej ujemnego niż spoczynkowy [33, 34, 44]. g_K początkowo jest mała, lecz g_{Na} jest jeszcze mniejsza, tak że RP jest bliski E_K . Kiedy błona zostanie zdepolaryzowana o około 10 mV, g_{Na} zaczyna zwiększać się i mała liczba jonów Na przechodzi przez błonę, płynąc zgodnie z ich gradientem elektrochemicznym do wnętrza aksonu. To przeniesienie ładunku powoduje dalszą depolaryzację, która wywołuje dalsze zwiększanie się g_{Na} , a w takim razie większy napływ Na^+ itd. Rezultatem tego odradzającego się oddziaływania pomiędzy depolaryzacją i g_{Na} jest to, że bateria sodowa staje się ważniejsza w determinowaniu E_m niż bateria potasowa, tak że E_m przesuwa się gwałtownie w kierunku E_{Na} . Jednak w tym czasie zaczynają już odgrywać rolę dwa wolniejsze następstwa depolaryzacji, inaktywacja sodowa i wzrost g_K , tzn. że bateria potasowa staje się ważniejsza niż sodowa w determinowaniu E_m , ponieważ napływ Na^+ zmniejsza się, a wypływ K^+ wzrasta, a zatem potencjał błonowy zaczyna obniżać się. Ta repolaryzacja dalej redukuje g_{Na} (redukuje ona także g_K , ale dużo wolniej), tak że E_m szybko wraca do swego poziomu spoczynkowego. W tym momencie, chociaż g_{Na} jest krańcowo niska, g_K jest wciąż wyraźnie wyższa niż zwykle, tak że E_m przekracza poziom spoczynkowy i przesuwa się nawet bliżej E_K . Wreszcie, gdy g_K obniży się do swojej normalnej, niskiej wartości, E_m powraca do jego poziomu spoczynkowego [3, 33, 45].

1.3. PRÓG I INNE ZJAWISKA BŁONOWE

Poza przewidywaniem kształtu AP, równania wyprowadzone z analizy doświadczeń VC mogą wyjaśniać też liczne inne cechy fizjologii aksonu. Przez dodanie g_K i g_{Na} można uzyskać zmianę impedancji podczas AP i wynik jest bardzo podobny do uzyskanego przez Cole'a i Curtisa [11]. Można również obliczyć przepływy netto jonów przez błonę

w czasie AP [34], co zostało udokumentowane w rozdziale 2.2 części II artykułu [8].

Równania Hodgkina-Huxleya mogłyby także wyjaśniać pewne inne zjawiska błonowe, włączając próg, czyli depolaryzację krytyczną, dla genezy AP. Ponieważ g_{Na} była przejściowo zwiększona przez depolaryzację i ponieważ zwiększona g_{Na} prowadzi z kolei do dalszej depolaryzacji, zmiana E_m podczas iglicy jest zjawiskiem odradzającym się. Powstaje pytanie, jaka jest natura tego odradzającego się procesu, dzięki któremu częściowa depolaryzacja potencjału błonowego zaczyna być automatycznie wzmacniana. Wiadomo, że g_{Na} jest funkcją E_m i wzrasta w miarę zmniejszania się spoczynkowej różnicy potencjałów. W konsekwencji jony Na wnikają w zwiększonej ilości do włókna i niosąc dodatni ładunek przez błonę zwiększają początkowe obniżenie RP, to z kolei powoduje dalszy wzrost P_{Na} i w ten sposób proces zaczyna przebiegać „wybuchowo”, co w schematyczny sposób przedstawiono na rycinie 2 w części II artykułu [8]. Wolniej zwiększająca się g_K daje efekt przeciwny, a mianowicie hiperpolaryzację błony. Warto zastanowienia jest też, że ekstra prąd sodowy płynie pomimo zwiększania się potencjału dodatniego wewnątrz włókna, co jest wbrew prawu Ohma. Innymi słowy, z powodu swojej charakterystycznej zmiany przepuszczalności błona oferuje „ujemną oporność” dla Na^+ w pewnym zakresie swojej zależności prądowo-napięciowej. Czynnikiem odradzającym jest więc wzrost g_{Na} , a czynnikiem odnowy — g_K [15, 44, 45].

W punkcie elektrycznej niestabilności, określanej progiem, potencjał przechodzi przez pewien stan niestabilnej równowagi. Potencjał progowy może być zdefiniowany jako ten potencjał, przy którym dokomórkowy prąd sodowy jest akurat równy odkomórkowemu prądowi potasowemu, co pozwala utrzymać depolaryzację w niestabilnej równowadze. Jeśli prąd potasowy jest większy, potencjał powróci do stanu spoczynkowego (odpowiedź lokalna). Jeśli prąd sodowy jest większy, potencjał stanie się niestabilny i wytworzy iglicę. Tak więc odpowiedzi lokalne, powstające wskutek przemieszczeń E_m mniejszych niż próg, powodowane są przez małe wzrosty g_{Na} , które wkrótce zostają przysłonięte przez wzrost g_K . Próg dla powstania AP jest punktem, w którym wzrost g_{Na} jest wystarczająco duży i szybki, aby usunąć ten efekt [3, 15, 33, 42, 44, 45].

Ponadto model matematyczny Hodgkina-Huxleya mógłby wyjaśnić refrakcję, czyli obniżoną przez pewien czas pobudliwość aksonu, występującą po AP. Dwa czynniki składają się na tę właściwość: 1. fakt, że g_{Na} jest nadal nieco inaktywowana po przejściu impulsu, a więc nie mogłaby osiągnąć tak dużej wartości w odpowiedzi na drugi bodziec i 2. utrzymywanie się wciąż wysokiej g_K (zob. ryc. 1 w części II arty-

kułu [8]). Ilość g_K , która pozostaje aktywowana, powoduje hiperpolaryzację następczą (czyli undershoot), a także czyni trudniejszym uzyskanie prądu sodowego, który przewyższałby prąd potasowy. Przebieg w czasie okresu refrakcji w aksonie kałamarnicy jest zupełnie podobny do przebiegu g_K i h [34]. Zatem okres refrakcji może być rozumiany w warunkach znanego potencjału i zmian w czasie przewodności. Istnienie refrakcji określa górną granicę częstości, z którą akson może przewozić impulsy nerwowe [3, 42, 44].

Po okresie refrakcji bezwzględnej (mniej niż 1 ms), g_K i rozmiary inaktywacji sodowej zmniejszają się nieco, tak że submaksymalna odradzająca się odpowiedź może być zapoczątkowana przez dostateczną depolaryzację. Ten okres odpowiada okresowi względnej refrakcji, kiedy próg jest wyższy niż normalnie i powstający AP może być zredukowany co do wielkości. Wreszcie g_K i proces inaktywacji sodowej powracają do swoich normalnych spoczynkowych poziomów, a błona wykazuje normalną pobudliwość [3, 33, 42].

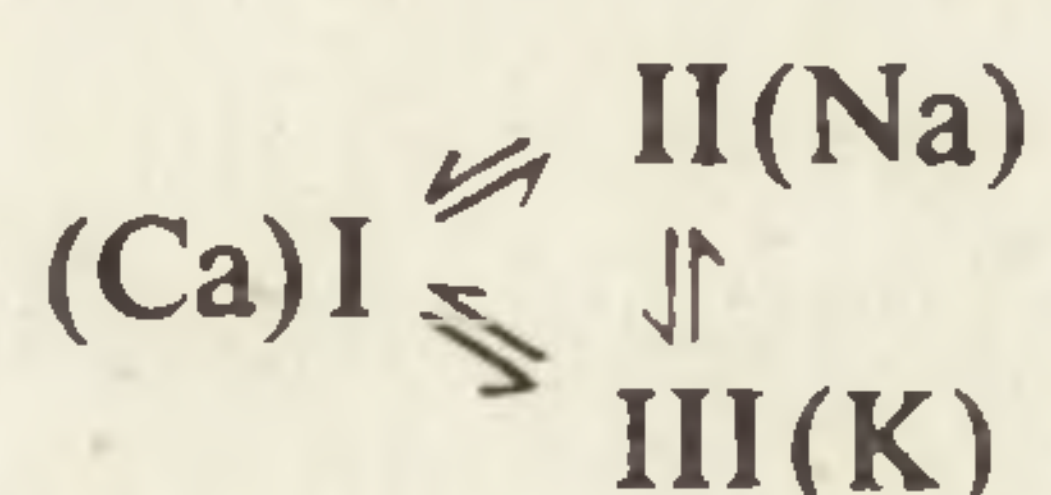
Inne błonowe zjawiska, które równania Hodgkina-Huxleya mogą wyjaśnić, obejmują pobudzenie anodowe (anode-break) i akomodację. Przy dostatecznie silnym bodźcu hiperpolaryzacyjnym próg może obniżyć się poza poziom RP, tak że kiedy ten prąd zostaje wyłączony, E_m znajduje się czasowo powyżej progu. To prowadzi do inicjacji AP i zjawisko to dlatego jest znane jako pobudzenie anodowe. Jest to związane z usunięciem spoczynkowej inaktywacji sodowej i obniżeniem g_K przez impuls hiperpolaryzacyjny [3, 44]. Termin akomodacja jest najczęściej używany dla określenia podwyższania się progu w miarę zmniejszania się szybkości narastania bodźca (np. [5] i [9]). Okolicznościowo jest on używany w rozumieniu zwolnienia powtarzających się wyładowań podczas utrzymującego się bodźca. W każdym przypadku jest to wyjaśniane po prostu przez inaktywację sodową i aktywację potasową podczas bodźca depolaryzacyjnego, wywołane przez wolno rosnący potencjał błonowy, a więc podwyższanie progu [3, 33, 34, 44].

Sukces równań Hodgkina-Huxleya w przewidywaniu tych i innych zjawisk błonowych wykazał użyteczność modelowania matematycznego tego typu.

1.4. INNE MODELE

Model matematyczny Hodgkina i Huxleya, opisujący prądy jonowe, nie jest jedynym, który może to zrobić. Znane są również inne modele, np. Hoyt [37], Goldmana [27], Offnera (według [53]) czy Tasakiego (według [10]), przyjmujące nieco inne założenia i mające te czy inne zalety lub wady w porównaniu z omawianym dotychczas modelem. Przykładowo, model błony pobudliwej Offnera (według [53]) proponuje, że

w czasie depolaryzacji jony Na są zmagazynowane w kanałach, przez które przechodzą również jony K. Podobnie Goldman [27] wyszedł z zupełnie odmiennego, niż przyjęte przez Hodgkina i Huxleya, założenia; założył on, że nośniki jonowe w błonie są te same dla Na^+ i K^+ . Nośniki te w myśl założeń miałyby miejsca wiążące, które mogłyby wymieniać Na^+ na K^+ , a także Ca^{2+} . Można to zilustrować następująco:



Miejsca te mogą być w którymkolwiek z 3 stanów. W stanie I, warunki spoczynkowe, miejsca te preferencyjnie wiążą Ca^{2+} . Depolaryzacja powoduje, że wiele z tych miejsc przechodzi do stanu II. Jest to stan, który powoduje wczesny prąd dokomórkowy. W stanie III miejsca te wiążą K^+ , a to wywołuje późny prąd odkomórkowy. Wreszcie, miejsca powracają do stanu I. Zakłada się, że jest n_{Na} miejsc na cm^2 w stanie Na, n_{K} — w stanie K i n_{Ca} — w stanie Ca w określonym czasie. W wyniku przeprowadzonych obliczeń Goldman [27] uzyskał dane co do zmian n_{Na} i n_{K} w następstwie depolaryzacji, uderzająco podobne do przebiegu krzywych g_{Na} i g_{K} w aksonach kałamarnicy poddanych stabilizacji napięcia [34]. Są też sugestie, że proces pobudzenia obejmuje procesy szybkiej, odwracalnej wymiany kationów (według [10]). W myśl tej teorii nagły wzrost przewodności błony musi być odzwierciedleniem albo raptownego zwiększenia gęstości miejsc ujemnych dostępnych dla jednowartościowych kationów oraz/albo nagłego zmniejszenia zwartości błony (zwiększenia wewnątrz błonowej ruchliwości jonów). Pojęcie „zależnych od napięcia przewodności” nie znajduje zastosowania w tym układzie. Nachmansohn [52] z kolei uważa, że ACh jest niezbędna do wyzwolenia pobudzenia.

Inna prosta hipoteza, która wydaje się bardzo atrakcyjna na pierwszy rzut oka, sugeruje, że Na^+ i K^+ przechodzą przez pory błonowe, które normalnie są blokowane przez jony Ca utrzymywane w tej blokującej pozycji przez błonowy RP. A zatem depolaryzacja redukuje pole elektryczne przez błonę i w ten sposób pozwala Ca^{2+} uciec z porów, tak że Na^+ i K^+ mogą przez nie przechodzić [3, 58]. Jednakże, jeśli ta sugestia byłaby prawidłowa, zależność między E_m a przewodnością błony dla jonów byłaby bardziej wrażliwa na zewnątrzkomórkowe stężenie Ca^{2+} niż ma to miejsce faktycznie. Ujmując bardziej specyficznie, hipoteza ta przewiduje, że e -krotny wzrost zewnątrzkomórkowego stężenia Ca^{2+} byłby równoważny, co do jego wpływu na przewodność dla Na^+ i K^+ , hiperpolaryzacji przynajmniej 12,5 mV, podczas gdy faktycznie tą cyfrą jest 9 mV lub mniej [23]. Pewnym wariantem tego pomysłu jest

sugestia, że kanały jonowe mogą być otwierane przez ruch wielokrotnie naładowanych kompleksów wapniowych w błonie, ale trudno jest do-
ciec, jak ta sugestia mogłaby być sprawdzona (według [3]).

Z zalem nasuwa się wniosek, że dokładne zrozumienie jak kanały jonowe są otwierane i zamykane, w tej chwili wciąż jeszcze leży poza
możliwościami naszych środków technicznych.

Pomimo istnienia innych modeli, być może z powodu pierwszeństwa,
analiza Hodgkina-Huxleya pozostała najbardziej popularna i znalazła
szerokie zastosowanie. Dla zilustrowania jej zastosowania posłużę się kil-
koma tylko przykładami: aksony olbrzymie pierścienic morskich [28]
i homarów [43], ciała komórkowe neuronów [12–14], mięśnie kręgowców
[2] i bezkręgowców [31], a także mięsień sercowy [51], a nawet komór-
ki glonu *Chara* [6, 7]. Nie będzie przesadą stwierdzenie, że teoria Hod-
gkina-Huxleya dominowała w badaniach pobudzenia przez prawie 25 lat.
Tak teraz, jak i przez szereg następnych lat, pomimo że nowoczesne
molekularne osiągnięcia są wykorzystywane w celu odsłonięcia tajników
maszynierii pobudzenia, obserwacje Hodgkina i Huxleya będą nadal tak
dobre, jak najlepiej dostępne, a ich teoria będzie rozpatrywana jako war-
tościowy przewodnik. Nadal jednak istnieje problem ostatecznego roz-
wiązania molekularnych podstaw zmian błonowej przepuszczalności.
Wciąż jeszcze wiemy o tym zbyt mało, chociaż możliwe jest ogranicze-
nie nieco pola możliwych wyjaśnień. Badania procesów transportu
w syntetycznych dwuwarstwach stanowią unikalną drogę poznania mo-
lekularnych podstaw błonowej przepuszczalności, gdyż tutaj stężenie pe-
ptydów i skład lipidowy błony mogą być zmieniane i ponieważ prze-
wodność jonowa tła lipidowej dwuwarstwy jest bardzo mała [20].

2. WŁAŚCIWOŚCI ELEKTRYCZNE BŁONY

2.1. PRZEWODNOŚĆ

Zgodnie z jonową teorią przewodności błony możemy interpretować
właściwości błony na podstawie pojęciowego modelu obwodu elektrycz-
nego. W modelu tym zakładamy, że gradient stężeniowy każdego jonu
działa w tym układzie jako bateria, której siła elektromotoryczna jest
dana przez równanie Nernsta dla danego jonu. Szeregowo z każdą ba-
terią połączona jest określona oporność, ale wygodniej jest mówić o prze-
wodności [3]. Specyficzna oporność jonowa błony, która jest po prostu
oporem błony na przejście określonego jonu, jest niczym innym, jak
miarą przepuszczalności błony dla tego jonu. Błonowa przepuszczalność
jonowa tradycyjnie jest wyrażana jako specyficzna przewodność, będą-
ca łatwością z jaką jon przechodzi przez błonę, a zatem jest ona odwrot-

nością oporności, ponieważ wysoka oporność stanowi wysoką przeszkodę dla przepływu jonowego. Jak wspomniano wcześniej, błona charakteryzuje się różną przewodnością dla różnych jonów w jakimś określonym czasie. Specyficzna przepuszczalność (przewodność) dla pewnego jonu najwyższa będzie w pobliżu jego potencjału równowagi, w którym to punkcie jego elektrochemiczna siła kierująca wynosi 0. Jest to podstawą dla wyprowadzenia przewodności dla poszczególnych jonów [3, 39], wyrażonych przykładowo w postaci równań (4) i (5) w części II artykułu [8].

2.2. PRZEWODZENIE KABLOWE

Jest oczywiste, że sposób, w jaki zjawiska elektryczne rozprzestrzeniają się w błonie, zależy od elektrycznych właściwości tej błony. Kiedy pewien obszar błony aksonu czy włókna mięśniowego zostaje zdepolaryzowany przez dokomórkowy przepływ Na^+ , występuje boczna redystrybucja ładunków i prąd wypływa dalej ze zdepolaryzowanego punktu. Ten przepływ prądu depolaryzuje sąsiednie odcinki błony. Jeśli sąsiednie punkty zostaną zdepolaryzowane do wystarczającego poziomu, następuje wtargnięcie Na^+ w nowym punkcie i ten odcinek z kolei aktywuje następny obszar błony przez przepływ prądu lokalnego. Dlatego jeśli część błony jest dostatecznie spolaryzowana, to stwarza spływ jonowy powodujący przepływ lokalnego prądu odkomórkowego w jakimś odległym punkcie, dając w wyniku depolaryzację krytyczną i powstanie AP w tym odległym punkcie. Jest oczywiste, że rozprzestrzenianie się AP wzdłuż włókna nerwowego czy mięśniowego zależy od rozprzestrzeniania się prądu lokalnego z jednego odcinka do następnego. Ten sposób rozprzestrzeniania się AP nazywany jest przewodzeniem kablowym, gdyż uważa się, że przepływ prądu jest podobny do przepływu w kablu metalowym w przeciwieństwie do przewodzenia skokowego, jakie ma miejsce w nerwie rdzennym. Główną zasadą tej hipotezy jest to, że jeden odcinek błony indukuje depolaryzację innego segmentu i prąd zwarcia płynie między nimi [39]. Jest to właśnie elektroniczne sprzężenie sąsiednich obszarów błony, które odpowiedzialne jest za rozprzestrzenianie się AP [44].

Prędkość rozprzestrzeniania się AP jest proporcjonalna do wartości stałej długości, a ponieważ ta ostatnia rośnie wraz ze średnicą komórki, zatem prędkość przewodzenia proporcjonalna jest do średnicy włókna. W przypadku przewodzenia kablowego, szerzenie się zarówno lokalnych, jak i rozprzestrzeniających się zakłóceń błonowych jest całkowicie zależne od właściwości oporności błony [3, 33, 42, 44].

Hodgkin i Rushton [35] doświadczalnie sprawdzali teorię przewodzenia kablowego na dużych aksonach homara z pozytywnym wynikiem. Stwierdzili oni także, że średnia wartość błonowej oporności i pojemności były, odpowiednio, $2300 \Omega\text{cm}^2$ i $1,3 \mu\text{F}/\text{cm}^2$. Wartości te są bliskie wartościom

otrzymanym dla aksonu kałamarnicy przez Cole'a i Curtisa [11] inną metodą. Pojemność błonowa tych aksonów wynosiła $1,1 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ w warunkach spoczynku i zmniejszała się o około 20% podczas aktywności, podczas gdy u glonu *Nitella* pojemność zmniejszała się o około 15% w czasie aktywności, oporność błony z kolei spadała bardzo wyraźnie podczas aktywności ze spoczynkowej wartości około $1000 \Omega\text{cm}^2$ do $25 \Omega\text{cm}^2$. Pojemność błony mięśni kręgowców jest na ogół nieco większa i waha się mniej więcej pomiędzy 3 a $10 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ [4, 15, 39], a u bezkręgowców jest ona często jeszcze większa i mieści się w granicach 2–47 $\mu\text{F}/\text{cm}^2$, w zależności od rodzaju mięśnia i gatunku zwierzęcia [18, 26, 50, 59, 60]. Niedawne badania Adriana i Almersa [1] wykazały, że pojemność błony mięśnia krawieckiego żaby jest jednak zależna od napięcia oraz że pojemność błony tego mięśnia zwiększa się o 50% pomiędzy -90 a $+50$ mV. Podobne wyniki uzyskali Takashima i wsp. [57], badając aksony kałamarnicy. Wyniki te wskazują, że stałość pojemności błony niekoniecznie stosuje się do wszystkich błon pobudliwych. Natura czy źródło zależnej od napięcia pojemności pozostaje wciąż nieznane. Według Takashimy i wsp. [57] obserwowana zmiana pojemności błony może powstawać w związku z prądem bramkującym.

3. WYWOŁYWANIE POTENCJAŁU CZYNNOŚCIOWEGO

W warunkach naturalnych AP włókna nerwowego czy mięśniowego jest na ogół wywoływany w odpowiedzi na uwolnienie mediatora chemicznego; konsekwencją jego działania są pewne zmiany w przepuszczalności błonowej komórek. Można jednak badać wydarzenia kontrolujące powstawanie AP przez ostrożną, kontrolowaną, bezpośrednią stymulację komórki. Można w ten sposób zgromadzić wiele wartościowych informacji o odpowiedziach błony włókna na depolaryzację i wydarzeniach prowadzących do powstania iglicy [39].

3.1. POTENCJAŁY ELEKTROTONICZNE I AKTYWNA ODPOWIEDŹ BŁONY

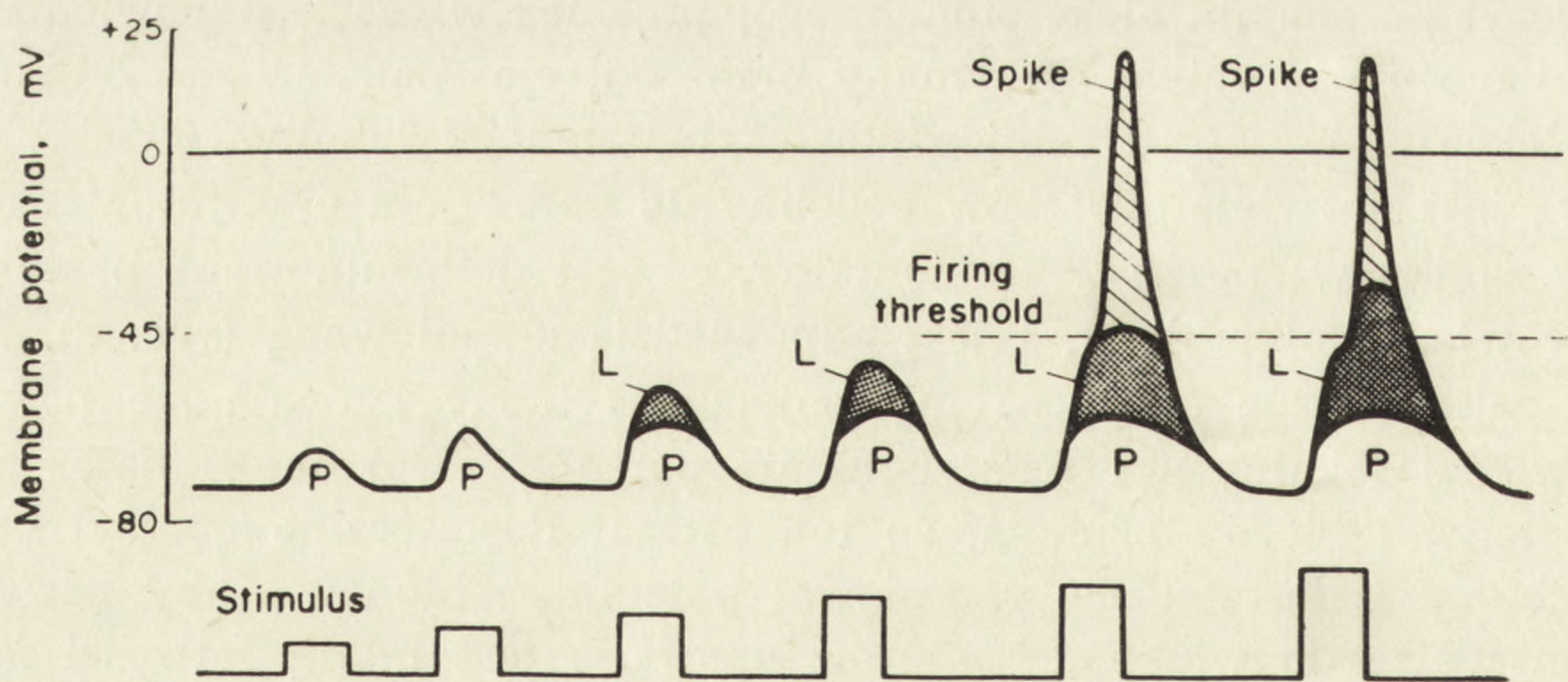
Istotne jest przedstawienie kolejnych etapów powstawania AP. Hodgkin [32] badał odpowiedzi aksonu kraba na podprogowe bodźce elektryczne. Małe depolaryzacyjne bodźce podprogowe prowadzą do powstawania potencjałów elektrotonicznych, które mają charakter bierny i są odzwierciedleniem specyficznej budowy błony neuronu, która posiada właściwości kondensatora. Zanik napięcia po przejściu przez błonę prądu dokomórkowego (stymulacja anodowa) spowodowany jest przez rozładowanie błonowej pojemności przez błonową oporność. Ten typ zmia-

ny elektrycznej (tzn. typ, który może być przypisany przepływowi prądu przez oporność i pojemność spoczynkowej błony) jest znany właśnie jako potencjał elektrotoniczny. Podczas stymulacji katodowej, kiedy intensywność bodźca jest bardzo mała, odpowiedzi są lustrzanym odbiciem odpowiedzi na stymulację anodową i mogą być podobnie opisane jako potencjały elektroniczne. Powstawanie i zanik tych potencjałów jest uzależniony od biernych właściwości kablowych błony komórkowej i dlatego są one traktowane jako bierne odpowiedzi błonowe. Amplituda tych potencjałów jest bezpośrednio proporcjonalna do siły bodźca i może być dokładnie przewidziana. Kiedy jednak intensywność bodźca zostanie zwiększona do około połowy poziomu progowego, osiągnięty zostaje pewien punkt, poza którym odpowiedź błonowa nie powraca do linii podstawowej tak szybko jak w odpowiedzi na stymulację anodową o tej samej sile i ta odpowiedź błonowa nie daje się już przewidzieć zgodnie z prostym elektrotonicznym rozprzestrzenianiem się [3, 39, 44]. Do tego punktu przemieszczenia MP są wydarzeniami biernymi, zależnymi jedynie od oporności i pojemności błony. Poza tym punktem odpowiedź błonowa odbiega od przewidzianego wzorca w związku z powstawaniem dodatkowego zjawiska błonowego, potencjału lokalnego. Potencjał ten jest a.m.r., która wytwarzana jest nie na chybił trafił, ale przy odmiennym poziomie depolaryzacji. Ta aktywna odpowiedź dodaje się do odpowiedzi biernej. Już Hodgkin [32] sugerował, że omawiane odpowiedzi są złożone z lokalnej odpowiedzi błony, która jest odpowiedzią czynną, chociaż nie posiada zdolności rozprzestrzenienia się, nałożonej na szczyt potencjału elektrotonicznego; przebieg w czasie odpowiedzi lokalnej może być zatem otrzymany przez odjęcie spodziewanej odpowiedzi elektrotonicznej od całej odpowiedzi. Potencjał lokalny, chociaż jest a.m.r., jest na wiele sposobów podobny do potencjału elektrotonicznego, który zanika w sposób dekrementalny, co jest determinowane przez kablowe właściwości błony, i jest odpowiedzią stopniowaną (ryc. 2). Musimy zakładać, że oporność lub pojemność błony zmienia się podczas odpowiedzi lokalnych i APs. Istnienie potencjału lokalnego nałożonego na potencjał bierny oznacza, że ten ostatni dostatecznie obniżył oporność błony i dostatecznie rozładował pojemność błonową, aby pozwolić jonom wejść do włókna. Ponieważ oporność jest miarą łatwości przepływu jonów, jakiegokolwiek jej obniżenie będzie podwyższało błonowe przewodności i pozwalało jonom (głównie Na^+) wchodzić do włókna, dalej rozładowując pojemność błonową. Potencjał bierny jest zatem jak klucz, istnieje on jedynie po to, żeby zdepolaryzować błonę na tyle, aby umożliwić wejście zewnętrznym jonom, które generują potencjał lokalny [3, 39].

3.2. POTENCJAŁ IGLICOWY

W końcu, jeśli bodziec jest dostatecznie duży, aby wywołać odpowiedź, która przekroczy pewien szczególny poziom potencjału błonowego, dochodzi do powstania właściwego AP, nazywanego potencjałem iglicowym, który posiada zdolność rozprzestrzeniania się. Ten krytyczny poziom potencjału błonowego nazywany jest potencjałem progu błonowego [32, 42]. Tak więc, kiedy potencjał bierny i związana z nim a.m.r. osiągną tę krytyczną wartość depolaryzacji, czyli poziom wyładowań, zwykle w nerwach rzędu 7–15 mV [25], a w mięśniach 25–40 mV [39] powyżej wartości RP, występuje nagła zmiana charakteru odpowiedzi błonowej. Ta zmiana charakteryzuje się powstaniem dużej, szybkiej depolaryzacji, która przekracza poziom 0 mV i powraca do prawie normalnego poziomu RP w czasie około 1–5 ms. To zjawisko nazywane jest potencjałem iglicowym z powodu jego charakterystycznego kształtu w zapisach oscyloskopowych. Poziom progów wyładowań potencjału, chociaż jest dość stały w każdym jednym neuronie, narażony jest na przypadkowe zmiany w wielu włóknach mięśniowych [38]. Wypadki prowadzące do powstania potencjału iglicowego są przedstawione schematycznie na rycinie 2.

Iglica jest zwykle opisywana jako zjawisko wszystko albo nic, tzn. powstające w ten sam stereotypowy sposób, osiągając dość stały poziom potencjału błonowego w każdym preparacie za każdym razem, kiedy bodziec przekracza poziom progowy [39, 42, 44]. Ten poziom potencjału



Ryc. 2. Wyjaśnienie w graficznej formie powstawania potencjału czynnościowego we włóknie mięśnia szkieletowego poddanego działaniu stopniowo zwiększanego impulsu stymulującego (według [39]). Tak potencjały bierne *P*, jak i lokalne *L* są zjawiskami stopniowanymi, ich wielkość zależy od siły bodźca, podczas gdy ich czas trwania i rozprzestrzenianie się zależą od kablowych właściwości błony. W momencie osiągnięcia progów wyładowań te połączone potencjały elektroniczne wywołują masowe wtargnięcie Na^+ , objawiające się w postaci potencjału iglicowego

błonowego może wahać się od około +10 do +40 mV we włóknach mięśni szkieletowych kręgowców [17, 22, 24, 30, 39, 40, 49]. Tak jak w przypadku neuronów [19], iglica włókna mięśniowego zachowuje dość stały szczyt, nawet gdy wywoływana jest w szerokim przedziale różnych poziomów RP [49] (uzyskanych wskutek różnego stopnia zdepolaryzowania błony przez KCl). W świetle obserwacji utrzymywania stałego przewyższenia staje się oczywiste, że wysokość iglicy jest stała (tzn. jest ona naprawdę zjawiskiem o charakterze wszystko albo nic), ale przebieg całego woltażu AP jest zmienny [39].

3.3. CHARAKTERYSTYKA POTENCJAŁU LOKALNEGO

Normalnym miejscem powstawania potencjału lokalnego jest motoryczna płytko końcowa. Kuffler [46] oraz Fatt i Katz [21] niezłomie wykazali, że e.p.p., powstający w wyniku stymulacji nerwowej, jest potencjałem lokalnym, którego amplituda zmniejsza się wraz z odległością od płytki końcowej i którego rozprzestrzenianie się jest zgodne z normalnymi właściwościami kablowymi.

Jeśli porównamy APs włókien mięśniowych kręgowców rejestrowane blisko płytki końcowej z tymi zapisywanymi dalej wzdłuż włókna, zobaczymy, że AP rejestrowany przy płytce końcowej ma wyraźne wygięcie na ramieniu wstępującym, cechę nieobecną w zapisach z innych miejsc włókna [3, 39]. To wygięcie oznacza punkt powstawania potencjału iglicowego z potencjału lokalnego (e.p.p.). E.p.p. ma charakterystyczną wielkość w każdym preparacie, ale nie jest ogólnie jednolity we wszystkich mięśniach. Ten potencjał jako czysto lokalne zjawisko występuje jedynie w obszarze płytki końcowej i funkcją jego jest po prostu generowanie iglicy przez depolaryzację błony włókna mięśniowego poza próg wyładowań. Potencjał iglicowy raz wywołany jest szybko przewodzony wzdłuż reszty włókna daleko od płytki końcowej, skąd synchronizuje on skurcz całego mięśnia [33, 39, 45]. Należy pamiętać, że szybkie włókna mięśniowe kręgowców są raczej wyspecjalizowane pod tym względem, gdyż ich błona jest elektrycznie pobudliwa i wytwarza rozprzestrzeniający się AP (podobny do AP w bezrdzennych aksonach), jeśli jest dostatecznie spolaryzowana. Pobudzenie większości innych typów włókien mięśniowych nie daje w wyniku rozprzestrzeniających się APs o charakterze wszystko albo nic [3], np. toniczne włókna mięśniowe są elektrycznie niepobudliwe, tak że żadne rozprzestrzeniające się APs nie powstają [47, 48], chyba że po odnerwieniu [56].

Potencjał iglicowy jest wystarczająco dużym zjawiskiem elektrycznym, aby rozprzestrzeniać się wzdłuż włókna dzięki przewodzeniu kablowemu. Napięcie iglicy jest wystarczająco duże i szybkość jej genezy wystarczająco szybka, aby zdepolaryzować do krytycznego poziomu przy-

ległe obszary błony i aby generować nowy potencjał iglicowy, który oczywiście narasta do maksymalnej wartości przewyższenia. Ten mechanizm zapewnia szybkie przewodzenie dużego zjawiska elektrycznego na znaczną odległość bez dekrementu. Ogniskowe unerwienie z umiejscowionym elektrotonicznym e.p.p., wytwarzającym szybko rozprzestrzeniający się potencjał iglicowy, wydaje się podstawowym sposobem synchronizacji aktywacji szybkich ekstrafuzalnych włókien mięśni szkieletowych kręgowców, sposobem zupełnie odmiennym od obserwowanego w większości mięśni szkieletowych bezkręgowców [16, 29, 39, 41, 54, 60]. E.p.p. nie będzie tutaj omawiany bardziej szczegółowo i wystarczy tylko podkreślić, że istnieje on jedynie po to, aby przetwarzać zjawisko transmisji chemicznej na synapsie w nowy sygnał elektryczny i w ten sposób uzupełniać łańcuch aktywacji od nerwu do mięśnia [3, 39].

LITERATURA

- [1] ADRIAN R. H., ALMERS W., The voltage dependence of membrane capacity, *J. Physiol.*, **254**: 317-338, 1976.
- [2] ADRIAN R. H., CHANDLER W. K., HODGKIN A. L., Voltage clamp experiments in striated muscle fibres, *J. Physiol.*, **208**: 607-644, 1970.
- [3] AIDLEY D. J., *The Physiology of Excitable Cells*, Cambridge University Press, Cambridge 1971.
- [4] ALMERS W., LEVINSON S. R., Tetrodotoxin binding to normal and depolarized frog muscle and the conductance of a single sodium channel, *J. Physiol.*, **247**: 483-509, 1975.
- [5] ARAKI T., OTANI T., Accommodation and local response in motoneurons of toad's spinal cord, *Japan. J. Physiol.*, **9**: 69-83, 1959.
- [6] BEILBY M. J., Excitation-revealed changes in cytoplasmic Cl^- concentration in "Cl⁻-starved" *Chara* cells, *J. Membrane Biol.*, **62**: 207-218, 1981.
- [7] BEILBY M. J., Cl^- channels in *Chara*, *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B*, **299**: 435-445, 1982.
- [8] BORKOWSKA M. J., Geneza potencjałów czynnościowych i ich podłoże jonowe. II. Hipoteza sodowa i jej sprawdzanie, *Post. Biol. Kom.*, **10**: 197-238, 1983.
- [9] BRADLEY K., SOMJEN G. G., Accommodation in motoneurons of the rat and the cat, *J. Physiol.*, **156**: 75-92, 1961.
- [10] CARNAY L. D., TASAKI I., Ion exchange properties and excitability of the squid giant axon, [w:] *Biophysics and Physiology of Excitable Membranes*, red. W. J. Jr. Adelman, Van Nostrand Reinhold Comp., New York, Cincinnati, Toronto, London, Melbourne 1971, 379-422.
- [11] COLE K. S., CURTIS H. J., Electric impedance of the squid giant axon during activity, *J. Gen. Physiol.*, **22**: 649-670, 1939.
- [12] CONNOR J. A., STEVENS C. F., Inward and delayed outward membrane currents in isolated neural somata under voltage clamp, *J. Physiol.*, **213**: 1-19, 1971.
- [13] CONNOR J. A., STEVENS C. F., Voltage clamp studies of a transient out-

- ward membrane current in gastropod neural somata, *J. Physiol.*, **213**: 21–30, 1971.
- [14] CONNOR J. A., STEVENS C. F., Prediction of repetitive firing behavior from voltage clamp data on an isolated neurone soma, *J. Physiol.*, **213**: 31–53, 1971.
- [15] DAVSON H., Characteristics of excitable tissue, [w:] *A Textbook of General Physiology*, vol. 2, J. and A. Churchill, London 1970, 1031–1346.
- [16] Del CASTILLO J., HOYLE G., MACHNE X., Neuromuscular transmission in a locust, *J. Physiol.*, **121**: 539–547, 1953.
- [17] De MELLO W. C., CHANG Y. C., Neuromuscular transmission in *Electrophorus electricus* (L.), *Experientia*, **22**: 680–681, 1966.
- [18] DORAI RAJ B. S., Diversity of crab muscle fibres innervated by a single motor axon, *J. Cell. Comp. Physiol.*, **64**: 41–54, 1964.
- [19] ECCLES J. C., *The Physiology of Nerve Cells*, Oxford University Press, Oxford 1957.
- [20] EHRENSTEIN G., LECAR H., Electrically gated ionic channels in lipid bilayers, *Quart. Rev. Biophys.*, **10**: 1–34, 1977.
- [21] FATT P., KATZ B., An analysis of the end-plate potential recorded with an intracellular electrode, *J. Physiol.*, **115**: 320–370, 1951.
- [22] FERRONI A., BLANCHI D., Maximum rate of depolarization of single muscle fibres in normal and low sodium solutions, *J. Gen. Physiol.*, **49**: 17–23, 1965.
- [23] FRANKENHAEUSER B., HODGKIN A. L., The action of calcium on the electrical properties of squid axons, *J. Physiol.*, **137**: 218–244, 1957.
- [24] FRANKENHAEUSER B., LINDLEY B. D., SMITH R. E., Potentiometric measurement of membrane action potentials in frog muscle fibres, *J. Physiol.*, **183**: 152–166, 1966.
- [25] GANONG W. F., *Physiology of nerve and muscle cells*, [w:] *Review of Medical Physiology*, Lange Medical Publications, Maruzen Asia (Pte.) Ltd., Singapore 1979, 21–70.
- [26] GILAI A., PARNAS I., Neuromuscular physiology of the closer muscles in the pedipalp of the scorpion *Leiurus quinquestriatus*, *J. Exp. Biol.*, **52**: 325–344, 1970.
- [27] GOLDMAN D. E., A molecular structural basis for the excitation properties of axons, *Biophys. J.*, **4**: 167–188, 1964.
- [28] GOLDMAN L., SCHAUF C. L., Quantitative description of sodium and potassium currents and computed action potentials in *Myxicola giant* axons, *J. Gen. Physiol.*, **61**: 361–384, 1973.
- [29] GRUNDFEST H., Ionic mechanisms in electrogenesis, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **94**: 405–457, 1961.
- [30] HAGIWARA S., TAKAHASHI K., Resting and spike potentials of skeletal muscle fibers of salt-water elasmobranch and teleost fish, *J. Physiol.*, **190**: 499–518, 1967.
- [31] HAGIWARA S., TAKAHASHI K., JUNGE D., Excitation-contraction coupling in a barnacle muscle fiber as examined with voltage clamp technique, *J. Gen. Physiol.*, **51**: 157–175, 1968.
- [32] HODGKIN A. L., The subthreshold potentials in a crustacean nerve fibre, *Proc. R. Soc. B*, **126**: 87, 1938.
- [33] HODGKIN A. L., *The Conduction of Nervous Impulse*, Liverpool University Press, Liverpool 1967, 1–108.
- [34] HODGKIN A. L., HUXLEY A. F., A quantitative description of membrane

- current and its application to conduction and excitation in nerve, *J. Physiol.*, **117**: 500–544, 1952.
- [35] HODGKIN A. L., RUSHTON W. A. H., The electrical constants of a crustacean nerve fibre, *Proc. R. Soc. B*, **133**: 444, 1946.
- [36] HONERJÄGER P., Cardioactive substances that prolong the open state of sodium channels, *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.*, **92**: 1–74, 1982.
- [37] HOYT R. C., The squid giant axon. Mathematical models, *Biophys. J.*, **3**: 399–431, 1963.
- [38] HUDDART H., Contraction of insect muscle, [w:] *Experiments in Physiology and Biochemistry*, red. G. A. Kerkut, Academic Press, New York 1971.
- [39] HUDDART H., The electrical activity of muscle, [w:] *The Comparative Structure and Function of Muscle*, red. G. A. Kerkut, Pergamon Press, Oxford, New York, Toronto, Sydney 1975, 109–291.
- [40] INOUE F., FRANK G. B., Effects of ethyl alcohol on excitability and on neuromuscular transmission in frog skeletal muscle, *Brit. J. Pharmacol.*, **30**: 186–193, 1967.
- [41] JANISZEWSKI L., Porównawcza analiza elementarnych zjawisk bioelektrycznych u niektórych bezkręgowców, Wydawnictwa UMK, Toruń 1965, 1–44.
- [42] JANISZEWSKI L., Czynność komórki nerwowej, [w:] *Fizjologia człowieka z elementami fizjologii klinicznej*, red. W. Traczyk, A. Trzebski, PZWL, Warszawa 1980, 30–50.
- [43] JULIAN F. J., MOORE J. W., GOLDMAN D. E., Current-voltage relations in the lobster giant axon membrane under voltage clamp conditions, *J. Gen. Physiol.*, **45**: 1217–1238, 1962.
- [44] JUNGE D., *Nerve and Muscle Excitation*, Sinauer Associates, Inc., Sunderland, Massachusetts 1981.
- [45] KATZ B., *Nerve, Muscle and Synapse*, McGraw-Hill Book Company, New York, St Louis, San Francisco, Toronto, London, Sydney 1966.
- [46] KUFFLER S. W., Electric potential changes at an isolated nerve-muscle junction, *J. Neurophysiol.*, **5**: 18–26, 1942.
- [47] KUFFLER S. W., VAUGHAN WILLIAMS E. M., Small-nerve junctional potentials. The distribution of small motor nerves to frog skeletal muscle, and the membrane characteristics of the fibres they innervate, *J. Physiol.*, **121**: 289–317, 1953.
- [48] KUFFLER S. W., VAUGHAN WILLIAMS E. M., Properties of the “slow” skeletal muscle fibres of the frog, *J. Physiol.*, **121**: 318–340, 1953.
- [49] LEVINE L., The effects of modified Ringer’s solutions on the membrane potentials of innervated and denervated frog sartorius muscle fibres, *J. Cell Physiol.*, **67**: 107–124, 1966.
- [50] MALPUS C. M., Electrical and mechanical responses of the skeletal muscle of a primitive insect, *Nature*, **215**: 991–992, 1967.
- [51] MORAD M., ORKAND R. K., Excitation-contraction coupling in frog ventricle: evidence from voltage clamp studies, *J. Physiol.*, **219**: 167–189, 1971.
- [52] NACHMANSOHN D., Proteins in bioelectricity: the control of ion movements across excitable membranes, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **61**: 1034–1041, 1968.
- [53] OFFNER F. F., Temperature-independence of total sodium flow: implications for theory of the active membrane, *J. Physiol.*, **252**: 69P, 1975.
- [54] OLSZEWSKA E., Charakterystyka mięśniowych zjawisk elektrycznych w rozwoju larwalnym mącznika młynarka (*Tenebrio molitor* L.), *Stud. Soc. Sci. Torunensis, Sectio G (Physiologia)*, **3–4**: 1–31, 1972.

- [55] PALTÍ Y., Description of axon membrane ionic conductances and currents, [w:] Biophysics and Physiology of Excitable Membranes, red. W. J. Jr. Adelman, Van Nostrand Reinhold Comp., New York, Cincinnati, Toronto, London, Melbourne 1971, 168–182.
- [56] STEFANI E., CHIARANDINI D. J., Ionic channels in skeletal muscle, Ann. Rev. Physiol., 44: 357–372, 1982.
- [57] TAKASHIMA S., YANTORNO R., NOVACK R., Dipole moment changes and voltage dependent membrane capacity of squid axon, Biochim. Biophys. Acta, 469: 74–78, 1977.
- [58] ULBRICHT W., Ionic channels and gating currents in excitable membranes, Ann. Rev. Biophys. Bioeng., 6: 7–31, 1977.
- [59] USHERWOOD P. N. R., The action of the alkaloid ryanodine on insect skeletal muscle, Comp. Biochem. Physiol., 6: 181–199, 1962.
- [60] USHERWOOD P. N. R., Electrochemistry of insect muscle, [w:] Advances in Insect Physiology 6, red. J. W. L. Beament, J. E. Treherne, V. B. Wigglesworth, Academic Press, New York 1969, 205–278.

Nadesłano: 10 grudnia 1982.

Przyjęto: 30 marca 1983.

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

CHARAKTERYSTYKA PREPARATÓW IZOLOWANYCH JĄDER KOMÓRKOWYCH *

CHARACTERISTICS OF ISOLATED CELL NUCLEI PREPARATIONS

Jacek WOJCIEROWSKI, Barbara ORLICZ-WELCZ

Samodzielna Pracownia Genetyki Człowieka Instytutu Patologii Klinicznej Akademii
Medycznej w Lublinie

Summary. The isolation methods and biochemical characteristics of preparations izolowania oraz biochemicznej charakterystyki preparatów jąder komórkowych ze szczególnym uwzględnieniem przydatności tych preparatów do badania reakcji transkrypcji DNA.

Summary. The isolation methods and biochemical characteristics of preparations of isolated cell nuclei are reviewed. Special attention is given to usefulness of these preparations to investigation of DNA transcription.

WYKAZ SKRÓTÓW I SYMBOLI

ATPaza	—	adenozynotrójfosfataza
DMSO	—	dwumetylosulfotlenek
EDTA	—	kwas etylenodwuaminoczterooctowy
PMSF	—	fenylometylosulfonylofluorek
PVS	—	siarczan poliwinylu
RNaza	—	rybonukleaza
hnRNP	—	rybonukleoproteiny zawierające heterogeny jądrowy RNA
SDS	—	siarczan dodecylanu sodu

Jądro komórkowe, charakterystyczne organellum komórki było od wielu lat przedmiotem szczególnego zainteresowania. Doprowadziło to do ustalenia ważnej, w pewnym sensie nadrzędnej w stosunku do cytoplazmy, funkcji jądra komórkowego jako ośrodka informacji genetycznej [169]. Z drugiej strony znana jest czynnościowa autonomia cyto-

* Praca wykonana w problemie PAN 09.7.4.1.2.

plazmy pozbawionej jądra komórkowego. Dotyczy to zarówno prymitywnych, jak również ewolucyjnie wyższych organizmów eukariotycznych [34, 73, 92, 211, 215]. Hybrydy komórkowe odległych gatunków mogą funkcjonować przez wiele pokoleń mimo oczywistego chaosu informacyjnego [31, 155, 160]. Również izolowane jądra komórkowe przeszczepione w obręb obcej cytoplazmy realizują raczej program tej cytoplazmy [82, 83, 152]. Wynikałoby z tego, że podlegają one silnej kontroli czynników cytoplazmatycznych i stanowią raczej magazyn do uzupełnienia informacji dla metabolizmu podstawowego i dla przeprowadzania procesów szczególnych jak podział lub różnicowanie. Badania „autonomicznej” funkcji jąder komórkowych po wyłączeniu wpływów cytoplazmy mogą mieć duże znaczenie dla poznania mechanizmów regulacji wewnątrzkomórkowej. Izolowane jądra komórkowe są ponadto jedyną matrycą funkcjonującą *in vitro* przy zachowaniu pełnej struktury nadmolekularnej.

Izolowane jądra komórkowe stanowią jednak niezwykle skomplikowany układ. Dokładna charakterystyka biochemiczna preparatów jądrowych w odniesieniu do metod ich izolowania ma zasadnicze znaczenie dla powtarzalności wyników doświadczeń.

I. METODY IZOLOWANIA JĄDER KOMÓRKOWYCH

Opisano wiele metod izolowania jąder komórkowych, przy czym w obrębie danej techniki stosowane są często jej modyfikacje. Ogólnie można wyróżnić trzy etapy preparatyki jąder komórkowych: rozbicie błony komórkowej i cytoplazmy, wstępne oczyszczenie jąder komórkowych, oczyszczenie ostateczne i ewentualne frakcjonowanie preparatów jądrowych.

ROZBICIE BŁONY KOMÓRKOWEJ I CYTOPLAZMY KOMÓREK

Etap ten powinien być zrealizowany możliwie szybko w temperaturze 0–2°C, w warunkach zapewniających integralność struktur lizosomów. Komórki należy homogenizować w teflonowo-szklanym homogenizatorze o ściśle określonej dla danej tkanki szerokości szczeliny (np. 4 µm dla wątroby lub mózgu i 3 µm dla grasicy). Homogenat następnie zazwyczaj oczyszcza się od fragmentów nierozbitej tkanki przez filtrację na siatkach metalowych lub nylonowych, lub na kilku warstwach gazy (wielkość porów od 40 do 250 µm) [17, 52, 202].

1. Metoda cytrynianowa Marshaka [145] i Dounce'a [57]. Zgodnie z tą techniką lizę komórek przeprowadza się w roztworze o niskiej wartości pH, tj. w hipotonicznym roztworze kwasu cytrynowego. Kwas cytrynowy ułatwia rozproszenie tkanki, a otrzymane preparaty nie tworzą

zlepów, jednak aktywność enzymów jądrowych (w tym RNazy) w tych warunkach ulega zahamowaniu [161]. W znacznie mniejszym stopniu blokowana jest aktywność proteaz i nukleaz chromatyny [15, 98, 257]. Otrzymane jądra charakteryzują się znacznie zmienioną strukturą nukleoplazmy i jąderek [232]. Wykorzystanie tej techniki jest ograniczone możliwością spowodowania nieodwracalnej inaktywacji endogennej jądrowej polimerazy RNA [233].

Znane są liczne modyfikacje metody cytrynianowej, np. stosuje się do izolowania jąder roztwory: 2,5% kwasu cytrynowego z 0,14% Tritonem X100 [210] lub 1,5% kwasu cytrynowego z 0,24 M sacharozą [123].

2. Szok hipotoniczny. Podczas preparatyki jąder tą techniką rozpad komórek następuje w buforze hipotonicznym o pH zbliżonym do wartości fizjologicznych, przy czym otoczka jądrowa większości komórek jest odporna na działanie szoku hipotonicznego.

Stosowane są liczne modyfikacje tej metody, np. silnie hipotoniczny [39, 71, 96] lub słabo hipotoniczny bufor [26, 54, 90]. Niekiedy hipotoniczny homogenat tkankowy jest przetrzymywany przez pewien czas w niskiej temperaturze [104, 159].

Szok hipotoniczny może być jedynym sposobem uzyskania czystych preparatów jąder komórkowych z niektórych tkanek [105], chociaż nie daje on gwarancji trwałości błon lizosomów, w połączeniu zaś z przedłużającym się „pęcznieniem” stwarza poważne niebezpieczeństwo autolizy. Charakterystyczna jest również mała stabilność otrzymanych preparatów jądrowych w zawiesinie. Niskie stężenia kationów dwuwartościowych w buforach do izolowania jąder mogą spowodować utratę pewnej ilości jądrowego DNA [20]. Stosowanie warunków hipotonicznych prowadzi także do znacznych ubytków w puli białek jądrowych [190].

Izolowanie jąder techniką szoku hipotonicznego przeprowadza się niekiedy w obecności 0,25 mM spermidyny [10], 1 mM EDTA i 6 mM 2-merkaptoetanolu [204] lub detergentów.

3. Hipertoniczne roztwory sacharozy. Metoda wprowadzona przez Chauveau i wsp. [44] stosowana jest często w modyfikacji Dounce'a i Ickowicza [58, 244]. Użycie sacharozy o stężeniu ponad 2 M w warunkach niskiej siły jonowej, w obecności jonów dwuwartościowych i spermidyny, pozwala na uzyskanie bardzo dobrze oczyszczonych i stabilnych w roztworze preparatów jądrowych, a także zmniejsza straty enzymów, np. RNA polimerazy III [138]. W preparatyce jąder opisanej przez Chauveau i wsp. do buforów dodawany jest 5 mM CaCl_2 stabilizujący błonę jądrową. Do tego celu używany jest również MgCl_2 obok jonów Ca^{2+} [163] lub zamiast jonów Ca^{2+} [52].

Preparatyka sacharozowa jest jednak niebezpieczna dla struktur jądro-
wych ze względu na duże zmiany ciśnienia osmotycznego, znaczne
przyspieszenia przy wirowaniu i zbyt długi czas trwania. Może to pro-
wadzić do uszkodzenia matryc jądro-
wych, czego wyrazem jest akty-
wacja syntezy naprawczej DNA w jądrach izolowanych tą techniką
[19, 127].

Hipertoniczne roztwory sacharozy często stosowane są łącznie z de-
tergentami, np. z Tritonem X100 [189].

4. Izotoniczne roztwory sacharozy w buforach o niskiej sile jonowej.
Metoda ta wprowadzona przez Allfreya i Mirsky'ego [5] stosowana jest
bardzo często i w różnych modyfikacjach [16, 23, 146, 196, 216]. Izolo-
wanie jąder w izotonicznych roztworach sacharozy jest bezpieczne ze
względu na stabilizację lizosomów i struktur jądro-
wych [219], nie wy-
klucza jednak strat enzymów jądro-
wych, zaś otrzymane preparaty są
w mniejszym stopniu oczyszczone. Zgodnie z techniką opisaną przez
Allfreya i Mirsky'ego [5] lizę komórek przeprowadza się w buforze
o niskiej sile jonowej zawierającym 0,25 M/dm³ sacharozy. Niekiedy
stosuje się większe stężenia sacharozy, np. 0,3 lub nawet 0,35 M [196].
Chlorek wapniowy często zastępuje się octanem magnezowym [196], cho-
ciaż można wskazać opinie, że jon Ca²⁺ nie ma żadnego wpływu na
proces transkrypcji [252]. Najczęściej jądra preparowane są w buforze
o pH zbliżonym do 7, jednak nawet dla tej samej tkanki (wątroba szczu-
rza) bywa stosowany bufor o pH 6,5 [69] lub 8 [80]. Ogólnie można
stwierdzić, że w środowisku o wysokiej wartości pH (8 lub ponad 8)
zmniejszona jest aktywność nukleaz, a wzmożona proteoliza [42, 102].
Wskazane jest dodawanie do buforów PMSF, jako inhibitora proteaz,
nawet podczas preparatyki jąder komórkowych używanych do badania
transkrypcji [139, 193].

5. Roztwory detergentów. W metodzie opisanej przez Blobela i Pot-
tera [29] dezintegracja błon komórkowych następuje pod wpływem roz-
cieńczonych roztworów detergentów, przy czym otoczka jądro-
wa pozostaje w tych warunkach nienaruszona [22, 64, 161]. Najczęściej bywa
używany Triton X100 [12, 46, 107], ponadto stosuje się Nonidet P-40
[25, 223], Cemulsol NPT-12 [213], Tween 20 [72], Tween 80 [95], dezo-
ksycholan sodu [238], sarkozyl [198] i saponinę [88]. Często używane są
kombinacje różnych detergentów [88]. Zwykle lizę komórek przepro-
wadza się w buforach zawierających detergenty o stężeniu 0,1–0,5%,
niekiedy 1 [12, 17, 170] lub nawet 2% przy izolowaniu jąder z komórek
roślinnych [43]. Często homogenaty komórkowe pozostawia się w roz-
tworze detergentu na krótki czas w niskiej temperaturze [25, 170].

Jądra komórkowe izolowane w obecności Tritonu X100 są pozbawione zewnętrznej błony otoczki jądrowej, przy czym utrzymują strukturę i funkcję porów [223]. Zachowują też dłużej aktywność matrycową z uwagi na znaczny stopień oczyszczenia od nukleaz i proteaz cytoplazmatycznych [230]. Detergenty niejonowe nie hamują aktywności polimeraz RNA [12, 36], polimeraz DNA [158, 227] ani metylaz [1], nie uszkadzają struktury kompleksów hnRNP [62], jak też kompleksów syntetyzujących białka [168]. Podobne właściwości wykazują niektóre detergenty jonowe, np. SDS o stężeniu 0,047% [72] lub chlorek cetylopirydynowy [161]. Wydaje się, że dzięki pewnej dekondensacji chromatyny preparaty jąder komórkowych poddane działaniu detergentów charakteryzują się sztucznym podwyższeniem aktywności transkrypcyjnej [179, 232, 238, 258], a nawet mogą wykazywać aktywację replikacji DNA [204]. Stężone roztwory detergentów silnie uszkadzają nukleo-proteiny matrycy, powodując symetryczną transkrypcję DNA [198] i obniżają aktywność polimeraz RNA [148, 258].

Stosowanie detergentów jest konieczne do izolowania jąder z niektórych tkanek [26, 175, 183, 240].

Z uwagi na silne uszkodzenie błon lizosomów podczas preparatyki jąder w roztworach detergentów [206] wskazane jest używanie inhibitorów RNaz, np. PVS w ilości 25 mg/ml [213] lub cytoplazmatycznego inhibitora RNazy [25]. Konieczna jest również stabilizacja zawiesiny jąder komórkowych, co osiąga się przez uzupełnienie buforów litycznych pewnymi składnikami, np. 6 mM spermidyną [17] lub 0,4 M sacharozą [213].

Często działanie detergentów łączone jest z efektem szoku hipotonicznego, np. w metodzie Penmana [176], co dostarcza wysoce oczyszczonych preparatów jądrowych, ale jak się wydaje nie wyklucza wad obu technik [26, 108]. Rozpad lizosomów wymaga użycia wysokich stężeń inhibitorów enzymów litycznych [139]. Stosowanie detergentów w izotonicznych roztworach sacharozy daje równie dobre oczyszczenie jąder jak preparatyka detergentowa, jest przy tym bezpieczniejsze ze względu na ochronne działanie sacharozy. Z uwagi na możliwość uszkodzenia błon lizosomów lizę komórek przeprowadza się w rozcieńczonych roztworach detergentów [13, 80, 148, 194, 204], w obecności inhibitorów proteaz [221] i innych enzymów litycznych.

6. Roztwory albuminy. Roztwory 1–5% albuminy zawierające niskie stężenia detergentów i inhibitory enzymów litycznych, zwłaszcza proteaz, pozwalają na zachowanie natywności jąder komórkowych podczas dezintegracji tkanki [66, 254]. Nadmiar białka w środowisku działa hamująco na aktywność proteaz, stabilizuje zawiesinę jąder komórkowych

i ułatwia oczyszczenie preparatów metodą różnicowego wirowania bez konieczności stosowania dużych przyspieszeń, długich czasów wirowania i hipertonicznego działania sacharozy. Bufory do izolowania jąder tą metodą powinny zawierać inhibitory RNaz i deacetylaz histonów (np. sól sodową kwasu masłowego o stężeniu 10 mM).

7. Inne metody. Opisano szereg innych specyficznych technik dezintegracji komórek i preparatyki jąder, np. homogenizację w roztworach glicerolu [68], fikolu 400, dekstranu T2000 [60, 236] i gumy arabskiej [55, 253]. Można również izolować jądra w środowisku niewodnym, np. metodą Kaya i Davidsona [114] lub w gradiencie 3-chloropropanodiolu-1,2 i 12,5% glicerolu [214]. Niewskazana jest preparatyka jąder z poliwinylpiperolidonem, który znacznie hamuje aktywność polimerazy RNA [197]. Ostatnio dość często stosowany jest glikol heksylenowy, niekiedy łącznie z sacharozą [87, 151].

WSTĘPNE OCZYSZCZENIE JĄDER KOMÓRKOWYCH

Niezależnie od sposobu wstępnego rozbicia komórek preparaty jąder komórkowych są oczyszczane z domieszek cytoplazmy i fragmentów tkanki różnymi metodami. W szczególności stosowane jest wirowanie różnicowe w gęstych roztworach sacharozy [2–2,4 M] [61, 80, 142, 148], glicerolu [89, 108, 196], albuminy [159], fikolu [153, 184], fikolu z dodatkiem sacharozy i dekstranu wysokocząsteczkowego [236], 2 M sorbitolu z dodatkiem 30% glicerolu i 7% fikolu [197] lub 4–12% gumy arabskiej [68].

Wirowanie jąder w gęstych roztworach wymaga doboru oraz ścisłej kontroli odpowiedniego stężenia tych roztworów i temperatury. Nawet niewielkie zmiany tych parametrów mogą spowodować znaczny wzrost lub spadek gęstości takich roztworów, co prowadzi do zmniejszenia wydajności preparatyki lub wzrostu zanieczyszczenia jąder frakcją cytoplazmatyczną.

Wirowanie w gęstych roztworach sacharozy daje w rezultacie bardzo dobrze oczyszczone preparaty jąder komórkowych i w pewnym stopniu zmniejsza straty białek jądrowych. Preparatyka sacharozowa jest jednak czasochłonna i niebezpieczna ze względu na konieczność ultrawirowania jąder. Dlatego stosowane jest często wirowanie różnicowe w średnio stężonych roztworach sacharozy (0,75–1 M). Skraca to czas wirowania i eliminuje konieczność stosowania ultrawirowania [60, 170].

Wirowanie różnicowe w gęstych roztworach glicerolu również nie wymaga długich czasów wirowania ani dużych przyspieszeń. Jednak

niektóre preparaty glicerolu w stężeniach powyżej 15% mogą hamować aktywność polimeraz RNA [28].

Wobec usunięcia większości lizosomów i mitochondriów uzasadnione jest dodawanie do gęstych roztworów większych ilości detergentów, nawet wówczas, gdy nie były one stosowane w pierwszym etapie preparatyki. Zazwyczaj używany jest Triton X100, ale również Triton N101, Tween 80, a nawet dezoksyholan sodu [102, 131, 180, 195]. Wymienione detergenty powinny być stosowane łącznie z inhibitorami enzymów litycznych, zwłaszcza proteaz, RNaz i deacetylaz, a także z czynnikami stabilizującymi zawiesinę jąder komórkowych.

OSTATECZNE OCZYSZCZENIE I FRAKCJONOWANIE

Etap ten jest najczęściej jedno- lub wielokrotnym powtórzeniem tej samej lub innej z wymienionych metod oczyszczenia wstępnego.

Celem frakcjonowania jest rozdzielenie jąder komórkowych o różnej ploidności, jąder pochodzących z różnych komórek tej samej tkanki lub jąder z tych samych komórek będących w różnych stadiach cyklu życiowego. Najczęściej rozdziału dokonuje się stosując wirowanie w gradiencie stężenia sacharozy (do 2,8 M) [109, 149, 216], wirowanie strefowe w gradientach stężeń sacharozy lub fikolu [11, 74, 164, 200, 216, 237] lub swobodną sedymentację w gradiencie stężenia sacharozy [239].

II. KRYTERIA CZYSTOŚCI I CHARAKTERYSTYKA BIOCHEMICZNA

Wysoki stopień oczyszczenia preparatów jąder komórkowych nie ma tak dużego znaczenia dla badania reakcji transkrypcji jak dla badań składu chemicznego jąder. Znane są modele permeabilizowanych komórek stosowane z powodzeniem do badań głównie replikacji DNA, ale również transkrypcji [6, 185, 203, 248]. Tym niemniej zanieczyszczenia cytosolowe mogą mieć wpływ na inkorporację prekursorów, na stabilność zawiesiny jąder komórkowych, trwałość dezoksyrybonukleoprotein jądrowych i produktów reakcji.

Zasadniczym kryterium oceny różnych metod izolowania jąder komórkowych jest natywność preparatów, tj. utrzymanie niezmięnionej struktury, składu chemicznego i aktywności enzymatycznej jąder. Niekiedy trudno jest ustalić, czy obserwowane właściwości są wynikiem stanu czynnościowego jąder *in vivo* czy artefaktem powstałym podczas preparatyki. Dotyczy to między innymi powstawania pojedynczych pęknień wiązań fosfodwuestrowych jednej nici dwuniciowego DNA z wytworzeniem wolnych zakończeń 3'-OH (powstawanie „nacięć” — nicks) lub obecności jednoniciowego DNA.

1. OCENY MORFOLOGICZNE

Preparaty jąder komórkowych powinny być na tyle stabilne w zawiesinie, aby można je było policzyć np. w komorze Thoma. Odnoszenie wyników doświadczeń z izolowanymi jądrami tylko do ilości DNA jądrowego bez kontroli mikroskopowej wydaje się niewystarczające.

Mikroskop kontrastowo-fazowy jest bardziej przydatny do oceny czystości preparatów, natomiast barwienie metodą Giemzy — do oceny struktury chromatyny jądrowej. Zazwyczaj zaobserwować można pewne zatarcie struktur chromatynowych, zwłaszcza po stosowaniu w preparatyce Tritonu X100, w skrajnych przypadkach w preparatach pozostają „cienie” jąder komórkowych. Stosowane są również inne metody barwienia, np. zielenią janusową B [183], azurem C [217], pyroniną [120] lub oranżem akrydyny [72]. Znacznie więcej informacji o strukturze chromatyny i otoczki jądrowej, o zanieczyszczeniach, a nawet o samej reakcji transkrypcji można uzyskać stosując mikroskop elektronowy [68, 103, 118, 143, 156, 162, 207].

2. ILOŚCIOWE OCENY BIOCHEMICZNE

Pewną charakterystykę preparatów izolowanych jąder komórkowych można uzyskać na podstawie ilościowej analizy ich podstawowych składników. Badania te mogą służyć do oceny i porównania różnych technik izolowania, a przy identycznych metodach do porównania jąder izolowanych z różnych komórek. Wykazano istnienie zmiennej zawartości różnych składników w jądrach komórek różnicujących się (np. komórek szeregu erytropoezy), tj. stopniowe zmniejszanie się ilości białek jądrowych, zwłaszcza niehistonowych i ilości RNA jądrowego w miarę postępowania różnicowania krańcowego. Stosunek wagowy DNA : histony : białka niehistonowe : RNA dla jąder erytroblastów i erytrocytów ptasich wynosi odpowiednio 1 : 0,85 : 0,95 : 0,11 oraz 1 : 1,02 : 0,36 : 0,01 [124]. Metabolicznie aktywne komórki wyspecjalizowanych tkanek charakteryzują się dużą ilością zarówno jądrowego RNA, jak też niehistonowych białek chromatyny [25, 106, 216]. Analogiczne komórki płodowe, szybko dzielące się, zawierają nieco mniej RNA i białek jądrowych [16]. Średnie wartości stosunków ilościowych DNA : RNA : białka w jądrach komórkowych wątroby szczura można przyjąć jak 1 : 0,2 : 4,3 [2, 224]. Jądra komórek poliploidalnych wykazują z reguły wyższą w stosunku do ilości DNA w jądrze zawartość zarówno RNA, jak i białek [74, 164].

Porównując różne techniki izolowania jąder można zauważyć, że największe wartości stosunku ilości RNA i białek wykazują jądra komórkowe preparowane w środowisku niewodnym. Na przykład stosunek zawartości DNA : RNA : białka w jądrach komórek błony śluzowej jelita królika izolowanych tą metodą wynosi 1 : 0,71 : 13,5 wobec wartości

1 : 0,17 : 3,1 otrzymanych w wyniku analizy składu tych samych jąder preparowanych w roztworze kwasu cytrynowego [114]. Szczególnie niskie względne ilości RNA są charakterystyczne dla jąder komórkowych izolowanych w hipertonicznych roztworach sacharozy [161, 249]. Metoda ta jest stosunkowo mało wydajna [249]. Preparatyka detergentowa charakteryzuje się bardzo wysoką wydajnością, przy czym otrzymane jądra komórkowe są bogate w RNA i ubogie w białko. Jest to prawdopodobnie związane ze znacznymi stratami białek otoczki jądrowej i soku jądrowego [161].

Większość autorów stwierdza, że po wyizolowaniu i oczyszczeniu jąder komórkowych w środowisku wodnym wewnątrzjądrowa pula nukleozydotrójfosforanów jest znikoma [39, 66, 113]. Z badań metabolicznych przeprowadzonych na żywych komórkach wynika ponadto możliwość istnienia odrębnej puli nukleozydotrójfosforanów dla jąder [250].

Były również przeprowadzane próby oznaczeń wewnątrzjądrowego poziomu poliamin [39] i jonów metali [207].

3. OTOCZKA JĄDROWA

Otoczka jądrowa oporna jest na homogenizację, na działanie szoku hipotonicznego, niejonowych lub kationowych detergentów i pewnych rozpuszczalników organicznych. Wydaje się jednak, że w utrzymaniu integralności jądra komórkowego *in vitro* większy udział mają struktury wewnątrzjądrowe niż sama otoczka. W szczególności aparat porów otoczki jądrowej jest silnie związany z wewnętrznym szkieletem jądra komórkowego i pozostaje nie zmieniony tak długo, jak długo ten szkielet istnieje. Aparat ten prawdopodobnie nie jest tylko peryferyjną częścią matriks jądrowej [3, 20, 94, 101, 118, 255].

Niejonowe detergenty jak Triton X100 usuwają z otoczki jądrowej większość struktur lipidowych [181], a w mniejszym stopniu wpływają na składniki białkowe, np. na receptory hormonów [246]. Bardziej stężone roztwory detergentów solubilizują zewnętrzną błonę otoczki jądrowej [29]. Po inkubacji z 1% roztworem Tritonu X100 w czasie 90 sekund w temperaturze 0°C uzyskiwano preparaty jąder komórkowych pozbawionych obu błon otoczki jądrowej, przy czym zarówno aparat porów jądrowych, jak też peryferyjna część matriks jądrowej pozostawały nieuszkodzone [118]. Tak otrzymane jądra komórkowe zachowują regulację transportu RNA [223], natomiast transport białek o masie cząsteczkowej ponad 60 000 jest bardzo ograniczony [32]. Przechodzenie prekursorów RNA prawdopodobnie nie jest regulowane na poziomie otoczki jądrowej w preparatach *in vitro* [79].

Jądra komórkowe preparowane techniką sacharozową Chauveau i wsp. zachowują nienaruszone obie błony otoczki jądrowej [118].

Stosowanie antybiotyków, np. nystatyny i amfoterycyny B, o stężeniach wielokrotnie wyższych od terapeutycznych stężeń (odpowiednio: 400 $\mu\text{g/ml}$ i 100 $\mu\text{g/ml}$) powoduje zahamowanie aktywności enzymów otoczek jądrowych, np. ATPazy [9] i zwiększa przepuszczalność otoczki w warunkach *in vitro* [126].

4. STAN MATRYC JĄDROWYCH

Pewne trudności w ocenie stanu natywności matryc jądrowych wynikają z niedostatecznego poznania ich struktury i zmian zachodzących w czasie transkrypcji, replikacji i syntezy naprawczej DNA *in vivo*. Podczas inkubacji w warunkach *in vitro* nawet w niskich temperaturach natywne cząsteczki DNA ulegają stopniowemu rozpadowi, przy czym proces ten jest zapoczątkowany powstawaniem tzw. nacięć [18]. Ich obecność nie zawsze związana jest z rozpadem autolitycznym. Mogą one tworzyć się w procesach metabolicznych zachodzących *in vivo* [46, 242]. Świadczy o tym obecność nacięć w natywnym DNA komórek [18, 45, 111]. Jest też prawdopodobne, że nacięcia stabilizowane białkami lub peptydami występują zawsze w DNA [112], zaś działanie proteaz ujawniałyby tylko ich obecność [247].

Tworzenie nacięć *in vivo* jest najprawdopodobniej związane z procesami reperacji. W szczególności czynniki interkalujące, takie jak: aktynomycyna D, adriamycyna, elliptycyna i neokarcinostatyna, stymulują aktywność enzymów wycinających uszkodzony fragment nici DNA [191, 235]. Jedynie przerwy ciągłości obu nici helisy nie są reperowane [91, 192]. Proteazy zwiększają wyraźnie tworzenie nacięć w procesach reperacji uszkodzeń po działaniu czynników interkalujących DNA [245]. Reperacja uszkodzeń wywołanych działaniem promieniowania jonizującego lub kortykosterydów na tkankę limfatyczną prawdopodobnie również stymuluje powstawanie nacięć [241]. Ilość nacięć ogromnie wzrasta w przypadku uszkodzenia procesów reperacyjnych, np. w jądrach komórek umierających [7, 18, 201, 234, 251], przy czym fakt ten wydaje się niezależny od aktywności proteaz. Produkty degradacji DNA nie wymywają się z chromatyny buforami o niskiej sile jonowej, zawierającymi 3 mM MgCl_2 , ale łatwo można je usunąć 0,7 mM roztworem EDTA [241].

W komórkach prokariotycznych endonukleazy uczestniczące w procesach reperacji miejsc apurynowych są szczególnie aktywne w tworzeniu nacięć DNA w niskich temperaturach [76, 77]. Podczas izolowania jąder komórkowych i ich inkubacji nacięcia powstają najprawdopodobniej również na skutek działania „reperaz” na DNA uszkodzony w procesach preparatywnych mechanicznie lub też działaniem czynni-

ków chemicznych, np. aktynomycyny D, detergentów lub hipertonicznych roztworów sacharozy [19].

In vitro możliwa jest również utrata pewnych ilości DNA w wyniku wzmożenia procesów nukleolitycznych [35, 97]. Pewne endonukleazy jądrowe mogą być aktywowane niskimi stężeniami Tritonu X100 [236]. Najbardziej narażony na nukleolizę jest „metaboliczny” DNA uczestniczący bezpośrednio w procesach transkrypcji [56, 70, 171, 172, 174, 231]. DNA „strukturalny” lub „osiowy” jest znacznie mniej wrażliwy na działanie endogennych i egzogennych nukleaz [100, 144]. Nie jest zupełnie pewne, czy i w jakim stopniu ten podział DNA odpowiada wyróżnieniu stanów eu- i heterochromatyny, tj. chromatyny nukleazo-wrażliwej i nukleazo-opornej i wyraża związek pewnych odcinków DNA ze strukturami otoczki lub matriks jądrowej [21, 186]. Działanie endonukleaz przyspiesza destabilizację chromatyny i depolimeryzację białek jądrowych [38]. Spośród licznych endonukleaz jądrowych najważniejsze znaczenie w autolitycznym uszkodzeniu DNA mają endonukleazy zależne od jonów Mg^{2+} i Ca^{2+} , aktywne nawet w temperaturze $0^{\circ}C$ [116, 146]. Matryce dezoksyrybonukleinowe jąder komórkowych ulegają znacznym uszkodzeniom w procesie depolimeryzacji DNA [48, 122].

Osobnym problemem jest zmiana konformacji DNA jądrowego. Wiadomo, że jądra komórkowe w warunkach in vivo zawierają odcinki superhelikalnego DNA [50, 51]. Pojawienie się nacięć mogło być przyczyną zniesienia stanu ujemnej superhelikalności DNA. Mechanizm powstawania i wpływ stanu superhelikalności na regulację transkrypcji, replikacji i reperacji został dość dobrze poznany u prokariotów [125, 150, 157]. Dyskutowana jest możliwość istnienia podobnych mechanizmów tych procesów w organizmach eukariotycznych [48, 125, 141]. Rozważany jest również problem istnienia jednoniciowych fragmentów w jądrowym DNA. Prawdopodobnie odcinki takie rzeczywiście występują w natywnym DNA in vivo [228], chociaż wyrażane są opinie, że stanowią one wyłącznie artefakt powstały podczas izolowania jąder komórkowych i samego DNA [159]. Równie często przypisuje się tym jednoniciowym fragmentom rolę aktualnie transkrybowanego DNA [229], jak też DNA replikującego [14, 27, 41, 84, 93].

Stan czynnościowy matryc jądrowych zależy w bardzo dużym stopniu od zmian białek chromatyny. Zmiany te są spowodowane przede wszystkim utratą białek chromatyny w wyniku proteolizy i oddysocjowania od struktur chromatynowych w warunkach preparatyki jąder. Ponadto z uwagi na stan równowagi dynamicznej, w jakim pozostają względem siebie poszczególne struktury w jądrze, a także w całej komórce i możliwość wymiany pewnych składników polipeptydowych między tymi strukturami [129, 209] izolowane jądra komórkowe mogą

być pozbawione niektórych rodzajów białek. Opisano szereg jądrowych białek „ruchomych”, tj. białek, które mogą być usunięte z jąder podczas preparatyki (przegląd literatury w pracy Krohne i Franke [128]), np. silnie ufosforylowane białko nukleoplazmy o masie cząsteczkowej 30 000 [154], białka grupy HMG (high mobility group) [115, 130, 140], specyficznie wiążący się z histonami polipeptyd J-2 o masie cząsteczkowej 25 000 [49], zasadowe białko S-II specyficznie stymulujące aktywność RNA polimerazy II [205], czynnik organizujący nukleosomową strukturę chromatyny (białko kwaśne wiążące histony i przenoszące je do DNA) [133, 134, 256] i inne białka.

Proteoliza białek chromatyny (przegląd literatury w pracy Goryukhinej i wsp. [75]) jest procesem zachodzącym bardzo szybko nawet w niskich temperaturach i w wysokich stężeniach soli. Dysocjacja białek chromatynowych jest tym większa, im wyższe jest stężenie soli w środowisku. Najłatwiej dysocjują białka mające duże znaczenie w zmianach konformacji chromatyny i jej aktywności matrycowej. Do nich należą luźno związane z chromatyną białka niehistonowe o znaczeniu strukturalnym lub regulacyjnym (przegląd literatury w pracy Kłyszewko-Stefanowicz [121]), np. niskocząsteczkowe białka grupy HMG, jak również podfrakcje histonu H1 [4, 63]. W szczególności roztwory zawierające 50 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,25 M NaCl i 10 $\mu\text{g/ml}$ heparyny usuwają 10 - 20% białek chromatyny [13, 40, 53, 99] i powodują wyraźną zmianę profilu denaturacji DNA [53]. Skutkiem tych zmian jest zniesienie różnic w aktywności matrycowej jąder izolowanych z komórek aktywnych metabolicznie i z komórek zahamowanych (quiescent cells) [13, 53]. Wydaje się jednak, że jądra komórkowe izolowane w warunkach izotonicznych zachowują obserwowane *in vivo* właściwości matrycowe [86, 132]. Podczas preparatyki jąder występują dość drastyczne zmiany siły jonowej i ciśnienia osmotycznego, które mają wpływ zarówno na konformację jądrowego DNA, jak również na struktury nukleosomowe chromatyny *in vitro* [222]. Ponadto substancje takie jak spermina lub spermidyna [37], polianiony [200] i DMSO [199], powodują zmiany struktury przestrzennej chromatyny i jej właściwości matrycowych.

In vivo DNA i liczne białka chromatyny, zarówno histony, jak i białka niehistonowe są zmodyfikowane przez przyłączenie grup metylowych, acetylowych, poli ADP-rybozylowych i fosforanowych. Wydaje się, że modyfikacje te mogą mieć istotny wpływ na właściwości matrycowe jąder komórkowych *in vitro*.

Metylacja DNA eukariontów (prawie wyłącznie w formie 5'-(5 mCG)-3') jest najbardziej charakterystyczna dla powtarzających się sekwencji DNA [188, 212], jak również dla obcogatunkowego DNA wprowadzo-

nego do komórki, np. w wyniku hybrydyzacji komórek [59, 182]. Pewne regiony DNA są specyficznie nisko metylowane [24]. Udział metylacji DNA w regulacji transkrypcji, replikacji, rearanzacji genowych, w procesach starzenia się, transformacji nowotworowej i różnicowania był szeroko dyskutowany [117, 187, 188, 243]. Wydaje się jednak, że enzymatyczna metylacja DNA (5 mC) w warunkach *in vitro* nie zmienia w sposób istotny powinowactwa polimeraz DNA lub RNA do matrycy. Natomiast metylacja „nieprawidłowa” (7 mG lub 3 mA) znacznie uszkadza właściwości matrycowe DNA [78]. Metylacja białek chromatyny jest mniej poznanym procesem, możliwe jednak, że odgrywa ona pewną rolę jako modyfikacja białek regulatorowych transkrypcji [30].

Duże znaczenie w regulacji zarówno cyklu komórkowego, jak też procesów transkrypcji i derepresji genów ma fosforylacja białek jądrowych, zwłaszcza białek niehistonowych, między innymi HMG [8, 65, 81, 119, 137].

Poli ADP-rybozylacja białek chromatyny (dotycząca zwłaszcza histonu H1 i białek niehistonowych) ma znaczenie głównie w regulacji cyklu komórkowego [110, 165, 167, 220], natomiast synteza poli ADP-rybozy związana jest, jak się wydaje, głównie z procesami reperacji, a jej zahamowanie jest połączone ze zwiększeniem liczby napięć DNA. Literatura dotycząca tego zagadnienia jest zebrana w pracach Cohena i Bergera [47] oraz Oikawy i wsp. [166].

Pewne znaczenie dla struktury i stanu czynnościowego nukleosomów ma zachowanie grup sulfhydrylowych [135]. Czynniki blokujące grupy —SH stabilizują histony chromatyny, hamując ich defosforylację i proteolizę [173].

Jednym z najważniejszych parametrów stanu chromatyny jest acetylacja histonów, zwłaszcza H3 i H4 (przegląd literatury w pracy Perry'ego i Chalkleya [178]). Dyskutowana jest rola acetylacji histonów w różnicowaniu, regulacji ekspresji genów lub w cyklu komórkowym [85, 225]. Wydaje się jednak, że acetylacja związana jest głównie z precyzyjną regulacją transkrypcji. Wskazuje na to wysoka aktywność deacetylaz histonowych (półokres deacetylacji wynosi zaledwie 3 minuty) [136, 177] oraz bezsporna zależność aktywności matrycowej chromatyny od stopnia acetylacji histonów [33, 67, 147, 208]. Dlatego jest rzeczą bardzo ważną zahamowanie aktywności deacetylaz histonowych w procesie izolowania i inkubacji jąder komórkowych. Do czynników blokujących działanie deacetylaz zaliczyć można maślan sodu (5–10 mM) [177], wysoką siłę jonową środowiska i niską temperaturę [136, 177]. Spermina powoduje wzrost acetylacji histonów i aktywuje syntezę RNA [225]. Białka kwaśne chromatyny prawdopodobnie również mogą być acetylowane [218, 226].

LITERATURA

- [1] ADAMS R. L. P., McKAY E. L., CRAIG L.M., BURDON R. H., Mouse DNA methylase: methylation of native DNA, *Biochim. Biophys. Acta*, **261**: 345–357, 1971.
- [2] AGUTTER P. S., McCALDIN D., McARDLE H. J., Importance of mammalian nuclear-envelope nucleoside triphosphatase in nucleo-cytoplasmic transport of ribonucleoproteins, *Biochem. J.*, **182**: 811–819, 1979.
- [3] AGUTTER P. S., BIRCHALL K., Functional differences between mammalian nuclear-envelope nucleoside triphosphatase in nucleo-cytoplasmic trans-*Res.*, **124**: 453–460, 1979.
- [4] AJIRO K., BORUN T. W., COHEN L. H., Phosphorylation states of different histone H1 subtypes and their relationship to chromatin functions during HeLa S-3 cell cycle, *Biochemistry*, **20**: 1445–1454, 1981.
- [5] ALLFREY V. G., MIRSKY A. E., The role of deoxyribonucleic acid (DNA) and polynucleotides in adenosinetriphosphate synthesis by isolated cell nuclei, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **45**: 589–598, 1957.
- [6] ALONSO M. M., CARRASCO L., Action of membrane active compound on mammalian cells. Permeabilization of human cells by ionophores to inhibitors of translation and transcription, *Eur. J. Biochem.* **109**: 535–540, 1980.
- [7] APPLEBY D. W., MODAK S. P., DNA degradation in terminally differentiating lens fiber cells from chick embryos, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **74**: 5579–5583, 1977.
- [8] ARFMANN H. A., HAASE E., SCHRÖTER H., High mobility group proteins from CHO cells and their modifications during cell cycle, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **101**: 137–143, 1981.
- [9] ASINOVSKAYA N. K., SOKOLOV V. N., KRAVCHENKO L. S., TERESHIN J. M., Changes of ATPase activity in dog kidney nuclear membranes under the effect of polyenic antibiotics, *Biokhimiya (Moscow)*, **43**: 1019–1023, 1978.
- [10] AUSTIN G. E., BELLO L. J., FURTH J. J., DNA dependent RNA polymerase of KB cells. I. Isolation of the enzymes and transcription of viral DNA, mammalian DNA and chromatin, *Biochim. Biophys. Acta*, **324**: 488–501, 1973.
- [11] AUSTOKER J., COX D., MATHIAS P., Fractionation of nuclei from brain by zonal centrifugation and a study of the ribonucleic acid polymerase activity in the various classes of nuclei, *Biochem. J.*, **129**: 1139–1155, 1972.
- [12] AXEL R., CEDAR H., FELSENFELD G., Synthesis of globin ribonucleic acid from duck reticulocyte chromatin in vitro, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **70**: 2029–2032, 1973.
- [13] BACKELER L. T., SMITH K. D., Transcription of isolated mouse liver chromatin, *Biochemistry*, **15**: 3281–3291, 1976.
- [14] BALDARI C. F., AMALDI F., BUONGIORNO-NARDELLI M., Electron microscopic analysis of replicating DNA of sea urchin embryos, *Cell*, **15**: 1095–1107, 1978.
- [15] BALLAL N. R., GOLDBERG D. A., BUSCH H., Dissociation and reconstitution of chromatin without appreciable degradation of the proteins, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **62**: 972–982, 1975.
- [16] BARNABEI O., ROMANO B., di BITONTO G., TOMASI V., SERENI F., Factors influencing glucocorticoid induced increase of ribonucleic acid po-

- lymerase activity of rat liver nuclei, Arch. Biochem. Biophys., 113: 478-486, 1966.
- [17] BATHURST J. C., CRAIG R. K., HERRIES D. G., CAMPBELL P. N., Relative distribution of post nuclear poly (A) containing RNA abundance groups within the nuclear and postnuclear polyadenylated and non-polyadenylated RNA populations of the lactating guinea-pig mammary gland, Biochem. J., 192: 489-498, 1980.
- [18] BEAUPAIN R., IKARD C., MACIEIRA-COELHO A., Changes in DNA alkali sensitive sites during senescence and establishment of fibroblasts in vitro, Biochim. Biophys. Acta, 606: 251-261, 1980.
- [19] BEEBEE T. J. C., BUTTERWORTH P. H. W., Transcription of isolated nuclei and nucleoli by exogenous RNA polymerase A and B, Eur. J. Biochem., 51: 537-545, 1975.
- [20] BEREZNEY R., COFFEY D. S., Identification of nuclear protein matrix, Biochem. Biophys. Res. Commun., 60: 1410-1417, 1974.
- [21] BEREZNEY R., COFFEY D. S., Nuclear matrix. Isolation and characterization of a framework structure from rat liver nuclei, J. Cell Biol., 73: 616-637, 1977.
- [22] BERKOWITZ D. M., TAKEFUDA T., SPORN M. B., A simple and rapid method for the isolation of enzymatically active HeLa cell nuclei, J. Cell Biol., 42: 851-854, 1969.
- [23] BETEL J., KLOUVEN H. M., Adenosine triphosphate synthesis in isolated rat thymus nuclei, Biochim. Biophys. Acta, 76: 327-329, 1963.
- [24] BIRD A. P., The occurrence and transmission of pattern of DNA methylation in *Xenopus laevis* ribosomal DNA, Philos. Trans. R. Soc. London, Ser. B., 283: 325-327, 1978.
- [25] BISWAS D. K., MARTIN T. F. J., TASHIJAN A. H., Extended RNA synthesis in isolated nuclei from pituitary tumor cells, Biochemistry, 15: 3270-3281, 1976.
- [26] BITTER G. A., ROEDER R. G., Transcription of viral genes by RNA polymerase II in nuclei isolated from adenovirus 2 transformed cells, Biochemistry, 17: 2198-2208, 1978.
- [27] BJURSELL G., GUSSANDER E., LINDAHL T., Long regions of single-stranded DNA in human cells, Nature, 280: 420-423, 1979.
- [28] BLAIR D. G. R., Inhibition of nuclear DNA dependent RNA polymerase from mouse ascites tumor and liver by glicerol, Can. J. Biochem., 55: 1117-1120, 1977.
- [29] BLOBEL G., Van POTTER R., Nuclei from rat liver: isolation method that combines purity with high yield, Science, 154: 1662-1665, 1966.
- [30] BOFFA L. C., STERNER R., VIDALI G., ALLFREY V. G., Post-synthetic modifications of nuclear proteins. High mobility group proteins are methylated, Biochem. Biophys. Res. Commun., 89: 1322-1327, 1979.
- [31] BOLUND L., RINGERTZ N. R., HARRIS H., Changes in the cytochemical properties of erythrocyte nuclei reactivated by cell fusion, J. Cell Sci., 4: 71-87, 1969.
- [32] BONNER W. M., Protein migration into nuclei. I. Frog oocyte nuclei in vivo accumulate microinjected histones allow entry to small proteins and exclude large proteins, J. Cell Biol., 64: 421-430, 1975.
- [33] BÖHM J., SCHLAEGER E.-J., KNIPPERS R., Acetylation of nucleosomal histones in vitro, Eur. J. Biochem., 112: 353-362, 1980.
- [34] BRACHET J., FICQ A., TENCER R., Amino acid incorporation into pro-

- teins of nucleate and anucleate fragments of sea urchin eggs: effect of parthenogenetic activation, *Exptl. Cell Res.*, **32**: 168-181, 1963.
- [35] BRAUNGRABER E. G., EARLY A., Autolytic release of DNA from nuclei prepared from rat brain, *Biochem. J.*, **102**: 17p, 1967.
- [36] BROWN A., GARRITY G. M., Detergent induced inhibition of eukaryotic RNA polymerase B activity and amanitin binding, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **92**: 38-45, 1980.
- [37] BROWN K. B., NELSON N. F., BROWN D. G., Effects of polyamines and methylglyoxal bis (guanylhydrazone) on hepatic nuclear structure and deoxyribonucleic acid template activity, *Biochem. J.*, **151**: 505-512, 1975.
- [38] BURGOYNE L. A., MOBBS J. D., MARSHALL A. J., Chromatin structure: a property of the higher structure of chromatin and the time course of its formation during chromatin replication, *Nucleic Acids Res.*, **3**: 3293-3296, 1976.
- [39] BUSIELLO E., di GIROLAMO M., RNA metabolism in nuclei isolated from HeLa cells, *Eur. J. Biochem.*, **55**: 61-70, 1975.
- [40] BUTTERWORTH R. H. W., COX R. F., CHESTERTON C. J., Transcription of mammalian DNA dependent RNA polymerase, *Eur. J. Biochem.*, **23**: 229-241, 1971.
- [41] CARNEVALI F., FILETICI P., Single-stranded molecules in DNA preparations from cultured mammalian cells at different moments of cell cycle, *Chromosoma*, **82**: 377-384, 1981.
- [42] CARTER D. B., CHAE C. B., Chromatin bound protease: degradation of chromosomal proteins under chromatin dissociation conditions, *Biochemistry*, **15**: 180-185, 1976.
- [43] CHAPMAN K. S. R., INGLE J., The stability, polyadenylic acid content and ribonucleoprotein form of nuclear ribonucleic acid in artichoke, *Biochem. J.*, **159**: 585-600, 1976.
- [44] CHAUVEAU J., MOULE Y., ROUILLER C., Morphology and biochemistry of the microsome fraction of liver and pancreas cells, *Exptl. Cell Res.*, **11**: 317-321, 1956.
- [45] CHETSANGA C. J., TUTTLE M., JACOBONI A., JOHNSON C., Age associated structural alterations in senescent mouse brain DNA, *Biochim. Biophys. Acta*, **474**: 180-187, 1977.
- [46] CLAYCOMB W. C., Biochemical aspects of cardiac muscle differentiation. Determination of deoxyribonucleic acid template availability and 3'-hydroxyl termini in nuclei and chromatin by using exogenous deoxyribonucleic acid polymerase, *Biochem. J.*, **171**: 289-298, 1978.
- [47] COHEN J. J., BERGER N. A., Activation of poly(adenosine-diphosphate ribose) polymerase with UV irradiated and UV endonuclease treated SV40 minichromosome, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **98**: 268-274, 1981.
- [48] COLMAN A., COOK P. R., Transcription of superhelical DNA from cell nuclei, *Eur. J. Biochem.*, **76**: 63-78, 1977.
- [49] CONNER B. J., COMMINGS D. E., Nuclear proteins. V. Studies of histone-binding proteins from mouse liver by affinity chromatography, *Biochim. Biophys. Acta*, **532**: 122-136, 1978.
- [50] COOK P. R., BRAZELL J. R., The superhelical density of nuclear DNA from human cells, *Eur. J. Biochem.*, **74**: 527-531, 1977.
- [51] COOK P. R., BRAZELL J. R., Spectrofluorometric measurement of the binding of ethidium to superhelical DNA from cell nuclei, *Eur. J. Biochem.*, **84**: 465-477, 1978.

- [52] DABEVA M. D., DUDOV K. P., HADIJOLOV A. A., STOYKOVA A. S., Quantitative analysis of rat liver nuclear and nucleoplasmic ribosomal ribonucleic acid, *Biochem. J.*, **171**: 367-374, 1978.
- [53] DARŻYNKIEWICZ Z., FRAGANOS F., SHARPLESS T., MELAMED H. R., Effect of 0,25 N sodium chloride treatment on DNA denaturation in situ in thymus lymphocytes, *Exptl. Cell Res.*, **100**: 393-396, 1976.
- [54] DEAKIN H., ORD M. G., STOCKEN L. A., Glucose 6-phosphate dehydrogenase activity and thiol content of thymus nuclei from control and X-irradiated rates, *Biochem. J.*, **89**: 296-304, 1963.
- [55] DICK C., Isolation of nuclei and histones from roots of *Vicia faba*, *Arch. Biochem. Biophys.*, **124**: 431-435, 1968.
- [56] DIMITRIADIS G. J., TATA J. R., Subnuclear fractionation by mild micrococcal nuclease treatment of nuclei of different transcriptional activities causes a partition of expressed and nonexpressed genes, *Biochem. J.*, **187**: 467-477, 1980.
- [57] DOUNCE A. L., Enzyme studies on isolated cell nuclei of rat liver, *J. Biol. Chem.*, **147**: 685-698, 1943.
- [58] DOUNCE A. L., ICKOWICZ R., The use of low concentration of heavy metals in the isolation of rat liver nuclei, *Arch. Biochem. Biophys.*, **137**: 143-155, 1970.
- [59] DRAHOVSKY D., KAUL S., BOEHM T. L. J., WACKER A., Enzymatic hypermethylation of DNA in mouse-mouse somatic cell hybrids, *Biochim. Biophys. Acta*, **607**: 201-205, 1980.
- [60] DUBROFF L. M., NEMER M., Molecular classes of heterogenous nuclear RNA in sea urchin embryos, *J. Mol. Biol.*, **95**: 455-476, 1975.
- [61] ERNEST M. J., SCHUTZ G., FEIGELSON P., RNA synthesis in isolated hen oviduct nuclei, *Biochemistry*, **15**: 824-829, 1976.
- [62] FAIFERMAN Y., HAMILTON M. G., POGO A. O., Nucleoplasmic ribonucleoprotein particles of rat liver. II. Physical properties and action of dissociating agents, *Biochim. Biophys. Acta*, **232**: 685-695, 1971.
- [63] FENSKE H., EICHHORN J., BÖTTGER M., LINDIGKEIT R., Effect of removal of F1 histone on the transcription process and on the conformation of nuclear chromatin, *Streszczenia, IX FEBS Meet., Budapest*, 134, 1974.
- [64] FISHER H. W., HARRIS H., The isolation of nuclei from animal cells in culture, *Proc. Roy. Soc., B*, **156**: 521-523, 1962.
- [65] FRENSTER J. H., Biochemistry and molecular biophysics of heterochromatin and euchromatin, [w:] *Handbook of molecular cytology*, red. A. Lima de Faria, North Holland Publ. Co., 251, 1969.
- [66] FRIEDMAN D. L., On the mechanism of DNA replication in isolated nuclei from HeLa cells, *Biochim. Biophys. Acta*, **353**: 447-462, 1974.
- [67] FUKUSHIMA M., OTA K., FUJIMOTO D., HORIUCHI K., Nucleosome histone acetyltransferase from rat liver chromatin, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **92**: 1409-1414, 1980.
- [68] GABARA B., MICHNIEWICZ-PORAZIŃSKA H., A comparison of the ultrastructure of nuclei in situ with that of nuclei isolated from the root meristem of *Pinus silvestris*, *Folia Histochem. Cytochem.*, **12**: 183-192, 1974.
- [69] GADSKI R. A., CHAE C. B., Effect of proteolysis on transcriptional fidelity of reconstituted chromatin, *Biochemistry*, **16**: 3465-3469, 1977.
- [70] GAREL A., AXEL R., Selective digestion of transcriptionally active ovalbumin genes from oviduct nuclei, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **73**: 3966-3970, 1976.

- [71] GATTONI R., STEVENIN J., JACOB M., Comparison of the nuclear ribonucleoproteins containing the transcripts of adenovirus-2 and HeLa cell DNA, *Eur. J. Biochem.*, **108**: 203-211, 1980.
- [72] GINZBURG-TEITZ Y., KAUFMANN E., TRAUB A., A one step method for the isolation of nuclei from Krebs 2 tumor cells, *Biochim. Biophys. Acta*, **134**: 211-214, 1967.
- [73] GOLDSTEIN L., CAILLEAU R., CROCKER T. T., Nuclearcytoplasmic relationships in human cells in tissue culture, *Exptl. Cell Res.*, **19**: 332-345, 1960.
- [74] GONZALES-MUJICH F., MATHIAS A. P., Studies of nuclei separated by zonal centrifugation from liver of rats treated with thioacetamide, *Biochem. J.*, **132**: 163-183, 1973.
- [75] GORYUKHINA O. A., GONCHAROVA V. P., STEPANOVA J. S., REZTSOVA V. V., The proteinase activity of nuclei from various tissues toward endogenous histones, *Biokhimiya (Moscow)*, **44**: 504-513, 1979.
- [76] GRECZ N., BHATARAKAMOL S., Apurinic acid endonuclease implicated in DNA breakage in *Escherichia coli* subjected to mild heat, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **77**: 1183-1188, 1977.
- [77] GRECZ N., BRUSZER G., Lethal heat induces single strand breaks in the DNA of bacterial spores, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **98**: 191-196, 1981.
- [78] GREENBERG J., KRASNA A. J., Effect of enzymatic methylation on the chemical, physical and biological properties of DNA, *Arch. Biochem. Biophys.*, **177**: 468-479, 1976.
- [79] GROSS K. J., POGO O., Control mechanism of ribonucleic acid synthesis in eukaryotes. The effect of amino acids and glucose starvation and cycloheximide on yeast DNA-dependent RNA-polymerases, *J. Biol. Chem.*, **249**: 568-576, 1974.
- [80] GROSS R. H., RINGLER J., Ribonucleic acid synthesis in isolated *Drosophila nuclei*, *Biochemistry*, **18**: 4923-4927, 1979.
- [81] GRUMMT J., Phosphorylation of nuclear proteins. Identification of a nucleolus-associated protein kinase activity, *FEBS Lett.*, **39**: 125-128, 1974.
- [82] GURDON J. B., Nuclear transplantation and regulation of cell processes, *Brit. Med. Bull.*, **29**: 259-262, 1973.
- [83] GURDON J. B., The control of gene expression in animal development, Oxford University Press, 1974.
- [84] HABENER J. F., BYNUM B. S., SHACK J., Destabilized secondary structure of newly replicated HeLa DNA, *J. Mol. Biol.*, **49**: 157-170, 1970.
- [85] HALLECK M. S., GURLEY L. R., Histone acetylation and heterochromatin content of cultured peromyscus cells, *Exptl. Cell Res.*, **132**: 201-214, 1981.
- [86] HANDMAKER S. D., GRAEF J. W., The effect of PHA on the DNA-dependent RNA polymerase activity of nuclei isolated from human lymphocytes, *Biochim. Biophys. Acta*, **199**: 95-102, 1970.
- [87] HARDIN J. W., CLARK J. H., GLASSER S. R., PECK Jr. E. J., RNA polymerase activity and uterine growth: differential stimulation by estradiol, estriol and nafoxidine, *Biochemistry*, **15**: 1370-1375, 1976.
- [88] HARLOW R., WELLS J. R. E., Preparation of membrane-free chromatin bodies from avian erythroid cells and analysis of chromatin acidic proteins, *Biochemistry*, **14**: 2665-2674, 1975.
- [89] HARRIS B., ROEDER R. G., Structural relationships of low molecular weight viral RNAs synthesized by RNA polymerase III in nuclei from adenovirus 2 infected cells, *J. Biol. Chem.*, **253**: 4120-4127, 1978.

- [90] HASUMA T., YUKIOKA M., NAKAJIMA S., MORISAWA S., INOUE A., Preferential phosphorylation of basic nonhistone proteins by nuclear protein kinase N II from rat liver, *Eur. J. Biochem.*, **109**: 349–357, 1980.
- [91] HATAYAMA T., GOLDBERG I. H., DNA damage and repair in relation to cell killing in neocarzinostatin treated HeLa cells, *Biochim. Biophys. Acta*, **563**: 59–71, 1979.
- [92] HÄMMERLING J., Regenerationsversuche an kernhaltigen und kernlosen Zellteilen von *Acetabularia wettsteinii*, *Biol. Zbl.*, **54**: 650–659, 1934.
- [93] HENSON P., The presence of single-stranded regions in mammalian DNA, *J. Mol. Biol.*, **119**: 487–506, 1978.
- [94] HERLAN G., ECKERT W. A., KAFFENBERGER W., WUNDERLICH F., Isolation and characterization of an RNA containing nuclear matrix from *Tetrahymena macronuclei*, *Biochemistry*, **18**: 1782–1787, 1979.
- [95] HERSHEY H. V., TAYLOR H. J., DNA replication in isolated nuclei. The rate of pulse labelled DNA subunits, *Exptl. Cell Res.*, **94**: 339–350, 1975.
- [96] HERSHEY H., Nature of DNA synthesized in the presence of ATP in isolated nuclei, *Biochim. Biophys. Acta*, **479**: 246–255, 1977.
- [97] HEWISH D. R., BURGOYNE L. A., Chromatin substructure. The digestion of chromatin DNA at regularly spaced sites by a nuclear deoxyribonuclease, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **52**: 504–507, 1973.
- [98] HIGASHI K., NARAYANAN K. S., AAMS H. R., BUSCH H., Utilization of the citric acid procedure and zonal ultracentrifugation for mass isolation of nuclear RNA from Walker 256 carcinosarcoma, *Cancer Res.*, **26**: 1582–1590, 1966.
- [99] HILDEBRAND C. E., GURLEY L. R., TOBEY R. A., WALTERS R. A., Action of heparin on mammalian nuclei. I. Differential extraction of histone H1 and cooperative removal of histones from chromatin, *Biochim. Biophys. Acta*, **477**: 295–311, 1977.
- [100] HINEGARDNER R., Evolution of genome size, [w:] *Molecular evolution*, red. F. J. Ayala, Sunderland Mass., Sinauer Ass., 179–199, 1976.
- [101] HODGE L. D., MANCINI P., DAVIS F. M., HEYWOOD P., Nuclear matrix of HeLa cells. Polypeptide composition during adenovirus infection and in phases of the cell cycle, *J. Cell Biol.*, **72**: 194–208, 1977.
- [102] HOFFMANN P., CHALKLEY R., Procedures for minimizing protease activity during isolation of nuclei, chromatin and the histones, [w:] *Methods in Cell Biology*, Vol. XVII, red. D. M. Prescott, Academic Press, New York, San Francisco, London, 1–12, 1978.
- [103] HOLZMAN E., SMITH J., PENMAN S., Electron microscopic studies of detergent treated HeLa cell nuclei, *J. Mol. Biol.*, **17**: 131–135, 1966.
- [104] HUANG Ch.-H., BASERGA R., Circular dichroism studies of ethidium bromide binding to the isolated nucleolus, *Nucleic Acids Res.*, **3**: 1857–1860, 1976.
- [105] HUDACK E. D., BAKER N., Studies on Ehrlich ascites cell nuclei. I. Methods of isolation of nuclei, *Exptl. Cell Res.*, **22**: 327–337, 1961.
- [106] HUDACK E. D., GIBBONS A. P., BRUMMOND D. O., Studies on Ehrlich ascites cell nuclei. II. Chemical composition of cell fractions, *Exptl. Cell Res.*, **22**: 338–344, 1961.
- [107] HYMER W. C., KUFF E. L., Isolation of nuclei from mammalian tissues through the use of Triton X100, *J. Histochem. Cytochem.*, **12**: 359–363, 1964.
- [108] JACHNING J. A., ROEDER R. C., Transcription of specific adenovirus genes in isolated nuclei by exogenous RNA polymerases, *J. Biol. Chem.*, **252**: 1853–1861, 1977.

- [109] JACKOWSKI S., LIEW Ch., Fractionation of rat ventricular nuclei, *Biochem. J.*, **188**: 363-373, 1980.
- [110] JUMP D. B., BUTT T. R., SMULSON M., Nuclear protein modification and chromatin substructure. 3. Relation between poly (adenosine diphosphate) ribosylation and different functional forms of chromatin, *Biochemistry*, **18**: 983-990, 1979.
- [111] KARRAN D., ORMEROD M. G., Is the ability to repair damage to DNA relaxed to the proliferative capacity of a cell? The rejoining of X ray produced strand breaks, *Biochim. Biophys. Acta*, **299**: 54-64, 1973.
- [112] KASAMATSU H., WU M., Structure of a nicked DNA protein complex isolated from simian virus 40 — covalent attachment of the protein to DNA and nick specificity, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **73**: 1945-1949, 1976.
- [113] KAY E. R. M., DAVIDSON J. N., Acid soluble derivatives in cell nuclei isolated in a nonaqueous medium, *Experientia*, **11**: 439-440, 1955.
- [114] KAY E. R. M., SMELLIE R. M. S., HUMPHREY G. F., DAVIDSON J. N., Comparison of cell nuclei isolated from rabbit tissues by aqueous and non aqueous procedures, *Biochem. J.*, **62**: 160-168, 1956.
- [115] KENNEDY B. P., DAVIES P. L., Acid-soluble nuclear proteins of the testis during spermatogenesis in the winter flounder. Loss of the high mobility group proteins, *J. Biol. Chem.*, **255**: 2533-2539, 1980.
- [116] KHODAREV N. N., VOTRIN J. J., BASNAKYAN A. G., DEBOV S. S., Detection of endonuclease activity and some peculiarities of chromatin autolysis in brain cell nuclei, *Biokhimiya (Moscow)*, **44**: 622-628, 1979.
- [117] KHODAREV N. N., VOTRIN J. J., SOKOLOV N. N., BASNAKYAN A. G., Methylation and degradation of chromatin DNA in isolated rat liver cell nuclei, *Biokhimiya (Moscow)*, **44**: 1058-1067, 1979.
- [118] KIRSCHNER R. H., RUSLI M., MARTIN T. E., Characterization of the nuclear envelope pore complexes and dense lamina of mouse liver nuclei by high resolution scanning EM, *J. Cell Biol.*, **72**: 118-132, 1977.
- [119] KLEINSMITH L. J., STEIN J., STEIN G., Dephosphorylation of nonhistone proteins specifically alters the pattern of gene transcription in reconstituted chromatin, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **73**: 1174-1178, 1976.
- [120] KLOUWEAU H. M., APPELMAN A. W. M., Synthesis of adenine triphosphate in isolated nuclei and intact cells, *Biochem. J.*, **102**: 878-884, 1967.
- [121] KŁYSZEJKO-STEFAŃOWICZ L., Niejednorodność i specyficzność białek niehistonowych, *Post. Biochem.*, **25**: 287-350, 1979.
- [122] KOHNO K., YAMAMOTO M., ENDO H., The effect of micrococcal nuclease and DNase I on bulk and 5 S RNA synthesis in isolated HeLa cell nuclei, *Biochim. Biophys. Acta*, **654**: 142-148, 1981.
- [123] KOZLOV A. P., PLJUSNIN A. Z., EVTUSHENKO V. J., SEITZ J. F., Studies of low molecular weight nuclear RNAs, their influence on RNA synthesis in isolated nuclei, *Mol. Biol. (Moscow)*, **12**: 91-99, 1978.
- [124] KRAJEWSKA W., WIERZBICKI R., KŁYSZEJKO-STEFAŃOWICZ L., Non-histone chromatin proteins during maturation of avian erythroid cells, *Acta Biochim. Polon.*, **23**: 177-182, 1976.
- [125] KRAUTH W., WERNER D., Analysis of the most tightly bound proteins in eukaryotic DNA, *Biochim. Biophys. Acta*, **564**: 390-401, 1979.
- [126] KRAVCHENKO L. S., OKSMAN A. Yu., ASINOVSKAYA M. K., TERESHIN J. M., Effect of polyene antibiotics on isolated dog kidney nuclei, *Biokhimiya (Moscow)*, **41**: 1220-1229, 1976.

- [127] KROKAN H., BJØRKLID E., PRYDZ H., DNA synthesis in isolated HeLa cell nuclei. Optimization on the product, *Biochemistry*, **14**: 4227-4232, 1975.
- [128] KROHNE G., FRANKE W. W., A major soluble acidic protein located in nuclei of diverse vertebrate species, *Exptl. Cell Res.*, **129**: 167-190, 1980.
- [129] KUEHL L., SUMSION E. N., Site of synthesis of several soluble enzymes of the cell nucleus, *J. Cell Biol.*, **50**: 1-9, 1971.
- [130] KUEHL Le ROY, LYNESS T., DIXON G. H., LEVY-WILSON B., Distribution of high mobility group proteins among domains of trout testis chromatin differing in their susceptibility to micrococcal nuclease, *J. Biol. Chem.*, **255**: 1090-1095, 1980.
- [131] KWAN C. N., GOTO S., SCHLESSINGER D., Nucleases in HeLa cell nucleoplasm and nucleoli, *Biochim. Biophys. Acta*, **349**: 428-441, 1974.
- [132] LAND H., SCHÄFER K. P., In vitro synthesis of RNA in isolated nuclei from bovine lymphocytes, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **79**: 947-957, 1977.
- [133] LASKEY R. A., MILLS A. O., MORRIS N. R., Assembly of SV 40 chromatin in a cell-free system from *Xenopus* eggs, *Cell*, **10**: 237-243, 1977.
- [134] LASKEY R. A., HONDA B. M., MILLS A. D., FINCH J. T., Nucleosomes are assembled by an acidic protein which binds histones and transfers them to DNA, *Nature*, **275**: 416-420, 1978.
- [135] LEWIS P. N., CHIU S. S., Effect of histone H3 sulfhydryl modifications on histone-histone interactions and nucleosome formation and structure, *Eur. J. Biochem.*, **109**: 369-376, 1980.
- [136] LILLEY D. M. J., BERENDT A. R., The gross level of in vitro RNA synthesis in HeLa nuclei is unaltered by histone hyperacetylation, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **90**: 917-924, 1979.
- [137] LIMAS C. J., Phosphorylation of myocardial nuclei enhances their susceptibility to deoxyribonuclease I, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **100**: 1347-1352, 1981.
- [138] LIU Y. C., ROSE K. M., JACOB S. T., Evidence for the nuclear origin of RNA polymerase identified in the cytosol: release of the enzymes from the nuclei isolated in isotonic sucrose, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **72**: 114-121, 1976.
- [139] LINDELL T. J., O'MALLEY A. F., PUGLISI B., Inhibition of nucleoplasmic transcription and the translation of rapidly labelled nuclear proteins by low concentrations of actinomycin D in vivo. Proposed role of messenger RNA in ribosomal RNA transcription, *Biochemistry*, **17**: 1154-60, 1978.
- [140] LINNALA-KANKKUNEN A., MÄENPÄÄ P. H., Phosphorylation of high mobility group protein HMG-14 by a cyclic GMP-dependent protein kinase from avian liver nucleoli, *Biochim. Biophys. Acta*, **654**: 287-291, 1981.
- [141] LOVETT M. A., SPARKS R. B., HELINSKI D. R., Bidirectional replication of plasmid R6K DNA in *Escherichia coli*, correspondence between origin of replication and position of single stranded break in relaxed complex, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **72**: 2905-2909, 1975.
- [142] LYNCH W. E., SURREY S., LIEBERMAN J., Nuclear deoxyribonucleic acid polymerases of liver, *J. Biol. Chem.*, **250**: 8179-8183, 1975.
- [143] MANTEIFEL V. M., ERSHOV Yu. V., BANDRINA I. N., ZELENIN A. V., Electron microscopic examination of chromatin in hepatocyte nuclei in situ within first hours after partial hepatectomy, *Mol. Biol. (Moscow)*, **11**: 677-684, 1977.

- [144] MANTIEVA V. L., RAZIN S. A., GEORGIEV G. P., Isolation of DNA fraction bound to the axial structure of metaphase chromosomes and studies of renaturation, *Mol. Biol. (Moscow)*, **13**: 1360–1368, 1979.
- [145] MARSHAK A., ^{32}P uptake by nuclei, *J. Gen. Physiol.*, **25**: 275–291, 1941.
- [146] MARSHALL A. J., BURGOYNE L. A., Interpretation of the properties of chromatin from mammalian nuclei, *Nucleic Acids Res.*, **3**: 1101–1110, 1976.
- [147] MARUSHIGE K., Activation of chromatin by acetylation of histone side chains, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **73**: 3937–3941, 1976.
- [148] MARZLUFF W. F., MURPHY E. C. Jr, HUANG R. C. C., Transcription of ribonucleic acid in isolated mouse myeloma nuclei, *Biochemistry*, **12**: 3440–3447, 1973.
- [149] MARZZOCO A., COLLI W., Isolation of nuclei and characterization of nuclear DNA of *Acanthamoeba castellanii*, *Biochim. Biophys. Acta*, **374**, 292–303, 1974.
- [150] MATTERN M. R., PAINTER R. B., Dependence of mammalian DNA replication on DNA supercoiling. II. Effects of novobiocin on DNA synthesis in chinese hamster ovary cells, *Biochim. Biophys. Acta*, **563**: 306–312, 1979.
- [151] MAUL G. G., AVOALović N., Nuclear envelope proteins from *Spisula solidissima* germinal vesicles, *Exptl. Cell Res.*, **130**: 229–240, 1980.
- [152] McBURNEY W. W., STRUTT B., Fusion of embryonal carcinoma cells to fibroblast cells, cytoplasts and karyoplasts, *Exptl. Cell Res.*, **124**: 171–180, 1979.
- [153] McEVEN B. S., ALLFREY V. G., MIRSKY A. E., Studies on energy yielding reactions in thymus nuclei. I. Comparison of nuclear and mitochondrial phosphorylation, *J. Biol. Chem.*, **238**: 758–766, 1963.
- [154] MERRIAM R. W., HILL R. J., The germinal vesicle nucleus of *Xenopus laevis* oocytes as a selective storage receptacle for proteins, *J. Cell Biol.*, **69**: 659–668, 1976.
- [155] MIGEON B. R., MILLER C. S., Human-mouse somatic cell hybrids with single human chromosome (Group E): link with thymidine kinase activity, *Science*, **162**: 1005–1012, 1968.
- [156] MILLER O. L., BEATTY B. R., Visualization of nucleolar genes, *Science*, **164**: 955–957, 1969.
- [157] MIRKIN S. M., BOGDANOVA E. G., GORLENKO Z. M., GRAGEROV A. J., LARIONOV O. A., Effect of DNA supercoiling on transcription performed by normal and mutant *E. coli* RNA polymerases, *Mol. Biol. (Moscow)*, **13**: 1341–1349, 1979.
- [158] MOSES R. E., Replicative deoxyribonucleic acid synthesis in a system diffusible for macromolecules, *J. Biol. Chem.*, **247**: 6031–6038, 1972.
- [159] MÜLLBACHER A., RALPH R. K., The nature of DNA synthesized in nuclei from mouse L-1210 cells, *Eur. J. Biochem.*, **75**: 347–355, 1977.
- [160] NABHOLZ M., MIGGIANO V., BODMER W., Genetic analysis using human-mouse somatic cell hybrids, *Nature*, **223**: 358–359, 1969.
- [161] NAKAYA K., MANABE H., USHIWATA A., SHIBAYAMA T., NAKAMURA Y., Isolation and some biochemical characteristics of nuclei from AH-66 hepatoma cells, *Cancer Res.*, **37**: 3701–3706, 1977.
- [162] NARAYAN K. S., STEEL W. J., SMETANA K., BUSCH H., Ultrastructural aspects of the ribonucleoprotein network in nuclei of Walker tumor and rat liver, *Exptl. Cell Res.*, **46**: 65–77, 1967.
- [163] NARAYAN K. S., BIRNSTIEL M. L., Biochemical and ultrastructural cha-

- racteristics of ribonucleoprotein particles isolated from rat liver cell nucleoli, *Biochim. Biophys. Acta*, **190**: 470-485, 1969.
- [164] NEAL G. E., GODOY H. M., JUDAH D. J., BUTLER W. H., Some effects of acute and chronic dosing with aflatoxin B₁ on rats liver nucleoli, *Cancer Res.*, **36**: 1771-1778, 1976.
- [165] NOLAN M. L., BUTT T. R., WONG M., LAMBRIANIDOU A., SMULSON M. E., Characterization of poly ADP ribose histone H1 complex formation in purified polynucleosomes and chromatin, *Eur. J. Biochem.*, **113**: 15-25, 1980.
- [166] OIKAWA A., TOHDA H., KANAJ M., MIWA M., SUGIMURA T., Inhibitors of poly (adenosine diphosphate ribose) polymerase induce sister chromatid exchanges, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **97**: 1311-1316, 1980.
- [167] OKAYAMA H., HAYAISHI O., ADP-ribosylation of nuclear protein A 24, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **84**: 755-762, 1978.
- [168] OLSNES S., SPAEREN U., HEIBERG R., PIHL A., Protein synthesis in the presence of non-ionic detergents in a cell free system from rabbit reticulocytes, *Biochem. J.*, **130**: 297-299, 1972.
- [169] ORD M. J., Control of DNA synthesis in *Amoeba proteus*, *Nature*, **221**: 964-966, 1969.
- [170] PALAYOOR T., SCHUMM D. E., WEBB T. E., Transport of functional messenger RNA from liver nuclei in a reconstituted cell-free system, *Biochim. Biophys. Acta*, **654**: 201-210, 1981.
- [171] PAUL J. J., DUERKSEN J. D., Characterization of mouse taper liver tumor hepatoma chromatin autodigestion and the release of euchromatic segments, *Arch. Biochem. Biophys.*, **174**: 489-503, 1976.
- [172] PAUL J. J., DUERKSEN J. D., Release of euchromatic segments by magnesium/calcium dependent autodigestion of chromatin, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **68**: 97-105, 1976.
- [173] PAULSON J. R., Sulfhydryl reagents prevent dephosphorylation and proteolysis of histones in isolated HeLa metaphase chromosomes, *Eur. J. Biochem.*, **111**: 189-197, 1980.
- [174] PELC S. R., Influence of metabolic DNA on determination of the cell cycle, *Int. Rev. Cytol.*, **32**: 327-355, 1972.
- [175] PENMAN S., DNA metabolism in HeLa cell nucleus, *J. Mol. Biol.*, **17**: 117-130, 1966.
- [176] PENMAN S., SMITH J., HOLTZMAN E., Ribosomal RNA synthesis and processing in particulate site in the HeLa cell nucleus, *Science*, **154**: 786-789, 1966.
- [177] PERRY M., NELSON D., MOORE M., CHALKLEY R., Histone deacetylation in nuclei isolated from hepatoma tissue culture cells. Inhibition by sodium butyrate, *Biochim. Biophys. Acta*, **561**: 517-525, 1979.
- [178] PERRY M., CHALKLEY R., The effect of histone hyperacetylation on the nuclease sensitivity and the solubility of chromatin, *J. Biol. Chem.*, **256**: 3313-3318, 1981.
- [179] PETROVIC S. L., Increased synthesis of ribonucleic acids in mouse liver after treatment with a nonionic detergent, *Biochim. Biophys. Acta*, **435**: 13-20, 1976.
- [180] PIERCE D. A., FAUST N., Mechanism of stimulation of chromatin transcription by putrescine, effect on rate of elongation and number of initiation sites utilized, *Biochemistry*, **17**: 102-109, 1978.

- [181] POGO A. A., FAIFERMAN J., SHIOKAWA K., BRAMS L., *Biochemistry of cell nucleus*, Budapest, **33**: 87, 1975.
- [182] POLLACK Y., STEIN R., RAZIN A., CEDAR H., Methylation of foreign DNA sequences in eukaryotic cells, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **77**: 6463-6467, 1980.
- [183] RAPPAPORT D. A., FRITZ R. R., MORACZEWSKI A., *Biochemistry of the developing rat brain. I. Soluble enzymes in isolated nuclei*, *Biochim. Biophys. Acta*, **74**: 42-50, 1963.
- [184] REID B. R., STELLWAGEN R. H., COLE R. D., Further studies on the biosynthesis of very lysine rich histones in isolated nuclei, *Biochim. Biophys. Acta*, **155**: 593-602, 1968.
- [185] REINHARD P., BORKHALTER M., GAUTSCHI J. R., Semiconservative DNA replication in vitro. I. Properties of two systems derived from mouse P-815 cells permeabilization or lysis with Brij 58, *Biochim. Biophys. Acta*, **474**: 500-511, 1977.
- [186] RILEY D. E., KELLER J. M., The ultrastructure of non-membranous nuclear ghosts, *J. Cell Sci.*, **29**: 249-268, 1978.
- [187] ROMANOV G. A., VANYUSHIN B. F., Intragenome specificity of DNA methylation in animals. Tissue differences and changes in the methylation of reiterated sequences during ageing, carcinogenesis and hormonal induction, *Mol. Biol. (Moscow)*, **14**: 357-368, 1980.
- [188] ROMANOV G. A., VANYUSHIN B. F., Methylation of reiterated sequences in mammalian DNAs. Effects of the tissue type, age, malignancy and hormonal induction, *Biochim. Biophys. Acta*, **653**: 204-218, 1981.
- [189] ROSE K. M., JACOB S. T., Nuclear poly(A) polymerase from rat liver and hepatoma. Comparison of properties, molecular weight and amino-acid composition, *Eur. J. Biochem.*, **67**: 12-21, 1976.
- [190] ROSE K. M., ROE F. J., JACOB S. T., Two fundamental states of polyadenylic acid polymerase in isolated nuclei, *Biochim. Biophys. Acta*, **478**: 180-191, 1977.
- [191] ROSS W. E., GLAUBIGER D., KOHN K. W., Qualitative and quantitative aspects of intercalator-induced DNA strand breaks, *Biochim. Biophys. Acta*, **562**: 41-50, 1979.
- [192] ROSS W. E., BRADLEY M. O., DNA double-strand breaks in mammalian cells after exposure to intercalating agents, *Biochim. Biophys. Acta*, **654**: 129-134, 1981.
- [193] ROSSINI M., BASERGA R., RNA synthesis in a cell-cycle specific temperature-sensitive mutant from a hamster cell line, *Biochemistry*, **17**: 858-863, 1978.
- [194] ROTH H. E., BOLLA R., COX G. S., Uptake of ribosomal proteins by isolated HeLa nuclei, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **69**: 608-612, 1976.
- [195] ROY P. H., WEISSBACH A., DNA methylase from HeLa cell nuclei, *Nucleic Acids Res.*, **2**: 1669-1684, 1975.
- [196] RUDICK V. L., WEISSMAN R. A., DNA dependent RNA polymerase from trophozoites and cysts *Acanthamoeba castellanii*, *Biochim. Biophys. Acta*, **299**: 91-103, 1973.
- [197] SAJDEL-SULKOWSKA E. M., BHARGAWA M. M., ARAND W. V., HALVORSON H. O., An improved method for the isolation of yeast nuclei active in mRNA transcription, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **56**: 496-502, 1976.

- [198] SAMAL B., BALLAL N. R., CHOI Y. C., BUSCH H., Effect of sarcosyl on the fidelity of preribosomal RNA synthesis in isolated nucleoli, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **84**: 328–334, 1978.
- [199] SASS H., Effects of DMSO on the structure and function of polytene chromosomes of chironomus, *Chromosoma*, **83**: 619–644, 1981.
- [200] SCHEINTAUB H. M., FIEL R. J., Polyanion induced physical changes in isolated nuclei, *Arch. Biochem. Biophys.*, **158**: 171–176, 1973.
- [201] SCHER W., FRIEND C., Breakage of DNA and alterations in folded genomes by inducers of differentiation in Friend erythroleukemic cells, *Cancer. Res.*, **36**: 1809–1813, 1978.
- [202] SCHIBECI A., MARTONOSI A., Ca^{2+} binding proteins in nuclei, *Eur. J. Biochem.*, **113**: 5–14, 1980.
- [203] SEKI S., LEMAHIEU M., MUELLER G. C., A permeable cell system for studying DNA replication in synchronized HeLa cells, *Biochim. Biophys. Acta*, **378**: 333–343, 1975.
- [204] SEKI S., ODA T., DNA synthesis in detergent treated mouse ascites sarcoma cells, *Biochim. Biophys. Acta*, **476**: 24–31, 1977.
- [205] SEKIMIZU K., MIZUNO D., NATORI S., NAKANISHI Y., Purification and preparation of antibody to RNA polymerase II stimulatory factors from *Ehrlich ascites* tumor cells, *Biochemistry*, **18**: 1582–1588, 1979.
- [206] SELLWOOD S. M., RICHNES P. G., HARRAP K. R., RICKWOOD D., MacGILLIVRAY A. J., CAPPS M., The integrity of nuclear proteins following incubation of isolated nuclei in vitro, *Eur. J. Biochem.*, **52**: 561–566, 1975.
- [207] SHAKOORI A. R., ROMEN W., OELSCHLÄGER W., SCHLATTERE B., SIEBERT G., A new technique for the isolation of nuclei from animal cells, *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, **353**: 1735–1748, 1972.
- [208] SHEWMAKER C. K., COHEN B. N., WAGNER T. T., Chemically induced gene activation. Selective increase in DNase I susceptibility in chromatin acetylated with acetyl adenylate, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **84**: 342–349, 1978.
- [209] SIEBERT G., Glycolytic enzymes and substrates in isolated cell nuclei, *Biochem. Z.*, **334**: 369–387, 1961.
- [210] SIPPEL A. E., HYNES N., GRONER B., SCHÜTZ G., Frequency distribution of messenger sequences within polysomal mRNA and nuclear RNA from rat liver, *Eur. J. Biochem.*, **77**: 141–151, 1977.
- [211] SMITH L. D., ECKER R. E., Protein synthesis in enucleated eggs of *Rana pipiens*, *Science*, **150**: 777–783, 1965.
- [212] SOLAGE A., CEDAR H., Organization of S-methyl cytosine in chromosomal DNA, *Biochemistry*, **17**: 2934–2938, 1978.
- [213] SOLL D. R., SUSSMAN M., Transcription in isolated nuclei of the slime mould *Dictyostelium discoideum*, *Biochim. Biophys. Acta*, **319**: 312–322, 1973.
- [214] SPAEREN U., SCHRODER K., DNA synthesis in nuclei isolated in non aqueous media, *Streszczenia, IX FEBS Meet., Budapest*, 167, 1974.
- [215] SPENCER T., Effect of kinetin on the phosphatase enzymes of *Acetabularia*, *Nature*, **217**: 62–64, 1968.
- [216] STAMBOLOVA M. A., COX D., MATHIAS A. P., The activity of deoxyribonucleic acid polymerase and deoxyribonucleic acid synthesis in nuclei from brain fractionated by zonal centrifugation, *Biochem. J.*, **136**: 685–695, 1973.
- [217] STEELE W. J., OKAMURA N., BUSCH H., Effects of thioacetamide on

- the composition and biosynthesis of nucleolar and nuclear ribonucleic acid in rat liver, *J. Biol. Chem.*, **240**: 1742-1749, 1965.
- [218] STERNER R., VIDALI G., HEINRIKSON R. L., ALLFREY V. G., Post-synthetic modification of high mobility group proteins. Evidence that high mobility group proteins are acetylated, *J. Biol. Chem.*, **253**: 7601-7604, 1978.
- [219] STIRPE F., ALDRIDGE W. N., Diphosphopyridine nucleotide phosphorylase in the nuclei isolated from poisoned and regenerating rat liver, *Biochem. J.* **80**: 481-486, 1961.
- [220] STOCKEN L. A., SMITH J. A., ORD M. G., Chemical and metabolic properties of ADP-ribose derivatives of nuclear proteins, [w:] *International Symposium on Poly(ADP-ribose)*, red. M. Harris, D. C. Washington, 257-259, 1974.
- [221] STOTT D. J., WILLIAMSON A. R., Non histone chromatin proteins of B lymphocytes stimulated by lipopolysaccharide. I. Synthesis, *Biochim. Biophys. Acta*, **521**: 726-738, 1978.
- [222] STRÄTLING W. H., Role of histone H1 in the conformation of oligonucleosomes as a function of ionic strength, *Biochemistry*, **18**: 596-600, 1979.
- [223] STUART S. E., CLAVSON G. A., ROTMAN F. M., PETERSON R. J., RNA transport in isolated myeloma nuclei. Transport from membrane denuded nuclei, *J. Cell Biol.*, **72**: 57-66, 1977.
- [224] SURIAO I., RNA synthesis in nuclei isolated from rat liver, *J. Biochem.*, **65**: 93-104, 1969.
- [225] SUPAKAR P. C., KANUNGO M. S., Chromatin function in developing brain: acetylation of chromosomal proteins and RNA synthesis, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **100**: 73-78, 1981.
- [226] SURIA D., LIEW C. C., Isolation of nuclear acidic proteins from rat tissues. Characterization of acetylated liver nuclear acidic proteins, *Biochem. J.*, **137**: 355-362, 1974.
- [227] TAIT A., CUMMINGS D. J., DNA dependent DNA polymerase activities from *Paramecium macronuclei*, *Biochim. Biophys. Acta*, **378**: 282-295, 1975.
- [228] TAPIERO H., CANEVA R., SCHILDKRAUT C. L., Fractions of chinese hamster DNA differing in their content of guanine + cysteine and evidence for the presence of single stranded DNA, *Biochim. Biophys. Acta*, **272**: 350-360, 1972.
- [229] TAPIERO H., LEIBOWITH G. A., SHAROL D., MONIER M. N., HAREL J., Isolation of single stranded DNA related to the transcriptional activity of animal cells, *Nucleic Acids Res.*, **3**: 953-963, 1976.
- [230] TATA J. R., HAMILTON M. J., COLE R. D., Membrane phospholipids associated with nuclei and chromatin, melting profile template activity and stability of chromatin, *J. Mol. Biol.*, **67**: 231-246, 1972.
- [231] TATA J. R., BAKER B., Enzymic fractionation of nuclei: polynucleosomes and RNA polymerase II as endogenous transcriptional complexes, *J. Mol. Biol.*, **118**: 249-272, 1978.
- [232] TAYLOR C. W., YEOMAN L. C., DASKAL I., BUSCH H., Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis of citric acid nuclei prepared with aid of a tissumizer, *Exptl. Cell Res.*, **82**: 215-226, 1973.
- [233] TEKAMP P. A., VALENZUELA P., MAYNARD T., BELL G. L., RUTTER W. J., Specific gene transcription in yeast nuclei and chromatin by added homologous polymerase I and III, *J. Biol. Chem.*, **254**: 955-963, 1979.
- [234] TERADA M., NUDEL U., FIBACH E., RIFKIND R. A., MARKS P. A., Changes in DNA associated with induction of erythroid differentiation by

- dimethyl sulfoxide in murine erythroleukemia cells, *Cancer Res.*, **38**: 835–840, 1978.
- [235] TIEN KUO M., SAMY T. S. A., Effects of neocarzinostatin on mammalian nuclei: release of nucleosomes, *Biochim. Biophys. Acta*, **518**: 186–190, 1978.
- [236] THIBODEAU L., VERLY W. G., Cellular location of the apurinic-apirimidinic endodeoxyribonucleases in rat liver, *Eur. J. Biochem.*, **107**: 555–563, 1980.
- [237] THORNBURG W., LINDELL T. J., Purification of rat liver nuclear protein kinase N II, *J. Biol. Chem.*, **252**: 6660–6665, 1977.
- [238] TSUKADA K., LIEBERMAN J., Synthesis of ribonucleic acid liver nuclear and nucleolar preparations after partial hepatectomy, *J. Biol. Chem.*, **239**: 2952–2956, 1964.
- [239] TULP A., COLLARD J. G., HART A. A., ATEN J. A., A new unit gravity sedimentation chamber, *Analyt. Biochem.*, **105**: 246–256, 1980.
- [240] UDVARDY A., SEIFART K. H., Transcription of specific genes in isolated nuclei from HeLa cells in vitro, *Eur. J. Biochem.*, **62**: 353–363, 1976.
- [241] UMANSKY S. R., KOROL B. A., NELIPOVICH P. A., In vitro DNA degradation in thymocytes of γ -irradiated or hydrocortisone treated rats, *Biochim. Biophys. Acta*, **655**: 9–17, 1981.
- [242] Van KEULEN H., RETEL J., Transcription specificity of yeast polymerase A. Highly specific transcription in vitro of the homologous ribosomal transcription unit, *Eur. J. Biochem.*, **79**: 579–588, 1977.
- [243] VANYUSHIN B. F., KIRYANOV G. I., KUDRYASHOVA I. B., BIELOZERSKY A. N., DNA-methylase in loach embryos (*Misgurnus fossilis*), *FEBS Lett.*, **15**: 313–316, 1971.
- [244] VINTER V. G., ZOTKINA N. L., GAINULLINA F. K., Mechanism of action of deoxyribonuclease from rat liver chromatin on DNA, *Biokhimiya (Moscow)*, **41**: 119–123, 1976.
- [245] WALDES H., CENTER M. S., The interaction of adriamycin with nuclear DNA: evidence for a drug induced compaction of isolated chromatin, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **98**: 95–101, 1981.
- [246] WATANABE H., ORTH D. N., TOFT D. O., Glucocorticoid receptors in mouse pituitary tumor cells. II. Nuclear binding, *Biochemistry*, **13**: 332–337, 1974.
- [247] WERNER D., KRAUTH W., HERSHEY H. V., Intermediate protein linkers in *Ehrlich ascites* cell DNA, *Biochim. Biophys. Acta*, **608**: 243–259, 1980.
- [248] WICKNER S., HURWITZ J., NATH K., YARBROUGH L., DNA replication in *Escherichia coli* made permeable by treatment with high sucrose, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **48**: 619–627, 1972.
- [249] WIDNELL C. C., TATA J. R., A procedure for isolation of enzymatically active rat liver nuclei, *Biochem. J.*, **92**: 313–317, 1964.
- [250] WIEGERS U., KRAMER G., KLAPPORTH K., HICZ H., Separate pyrimidine nucleotide pools for messenger RNA and ribosomal RNA synthesis in HeLa S3 cells, *Eur. J. Biochem.*, **64**: 535–541, 1976.
- [251] WILLIAMS J. R., LITTLE J. B., SHIPLEY W. U., Association of mammalian cell death with a specific endonucleolytic degradation of DNA, *Nature*, **252**: 754–755, 1974.
- [252] WINICOV I., Liver and kidney nuclear RNA synthesis and modifications in dimethylnitrosamine-treated rats, *Biochim. Biophys. Acta*, **654**: 31–41, 1981.
- [253] WOERNLEY D. L., CARRUTHERS C. A., A versatile method of isolating cell nuclei based on the employment of a high-viscosity suspending me-

- dium, Arch. Biochem. Biophys., 67: 493-494, 1957.
- [254] WOJCIEROWSKI J., ANTOSZ H., The model of isolated cell nuclei. I. Incorporation of (³H)UTP in incomplete transcription system, Genetica Polon., 22: 229-240, 1981.
- [255] WUNDERLICH F., HERLAN G., A reversible contractile nuclear matrix. Its isolation, structure and composition, J. Cell Biol., 73: 271, 1977.
- [256] WYLLIE A. H., LASKEY R. A., FINCH J. T., GURDON J. B., Selective DNA conservation and chromatin assembly after injection of SV 40 DNA into *Xenopus oocytes*, Develop. Biol., 64: 178-188, 1978.
- [257] YEOMAN L. C., TAYLOR C. W., BUSCH H., Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis of acid extractable nuclear proteins of normal rat liver and *Novikoff hepatoma* ascites cells, Biochem. Biophys. Res. Commun., 51: 956-966, 1973.
- [258] ZIRKIN B. R., BOISON A., HESTON W. D., COFFEY D. S., Release of DNA template restrictions in rabbit spermatozoa and rat liver nuclei, J. Exptl. Zool., 197: 283-288, 1976.

Otrzymano: 14 grudnia 1982.

Przyjęto: 5 kwietnia 1983.

Adres autorów: ul. Jaczewskiego 8, 20-090 Lublin.

RECENZJE

R. A. Malt, R. C. N. Williamson: „Colonic Carcinogenesis” Falk Symposium 31.

International Medical Publishers, Lancaster—Boston—The Hague 1982. 406 str., 81 tabel, 110 rysunków.

W ostatnich miesiącach ukazała się bardzo cenna pozycja z dziedziny onkologii dotycząca nowotworu okrężnicy, „Colonic Carcinogenesis” pod redakcją R. A. Malta — redaktora *New England Journal of Medicine* i R. C. N. Williamsona — profesora *Royal College of Surgeons* w Anglii. Książka ta jest sprawozdaniem z 31 Sympozjum organizowanego przez Fundację Falka. Jest ona interesującym studium procesów nowotworowych z zakresu biochemii, biologii molekularnej, histologii, patofizjologii, genetyki, a także epidemiologii.

Autorzy pragnęli przedstawić w bardzo wyczerpujący sposób całość prezentowanych na sympozjum zagadnień wzbogacając rozdziały, będące referatami autorskimi, dyskusją.

Na wstępie zostały przedstawione problemy epidemiologiczne dotyczące głównie Europy Zachodniej i Stanów Zjednoczonych, w tym szczególnie obszarów i miast uprzemysłowionych. Zagadnienia dotyczące genetycznego podłoża nowotworu dotyczyły zespołu Gardnera i Peutz-Jeghersa. Interesujące były również próby wzbogacenia materiału dotyczącego etiologii nowotworu okrężnicy o fakty związane z czynnikami dietetycznymi, a także stosunkiem spożywanych jonów Na^+/K^+ oraz obecnością mikroflory bakteryjnej i produktów jej metabolizmu.

W rozdziale 11 został zaprezentowany pogląd, poparty badaniami Janssona przeprowadzonymi na ludziach rasy białej i czarnej obojga płci, że wyższy stosunek K^+/Na^+ stosowany w diecie obniża śmiertelność i zapadalność na choroby nowotworowe przewodu pokarmowego. Twierdzenie to związane jest z teorią Thoma z 1979 r., która dotyczy wpływu kationów jednowartościowych na organizację białek histonowych (*J. Cell Biol.*, 83: 403, 1979).

Bardzo interesujące jest również studium porównawcze dotyczące cytochemii zdrowych, jak i nowotworowych komórek mięśniówki okrężnicy. Komórki nowotworowe zdaniem Von Bassewitz i wsp. (rozdz. 16) produkują dwa typy kolagenu I i III oraz fibronektynę.

W rozdziale 34 przeprowadzono analizę metod badania biochemicznego szlaku przemian, występującego w komórkach nowotworowych okrężnicy charakteryzującego się aktywnością kluczowych enzymów metabolizmu pirymidyny, puryny i węglowodanów.

Recenzowana książka jest cenną pozycją zawierającą informacje o najnowszych trendach diagnostycznych nowotworu okrężnicy, bogato ilustrowana zdjęciami preparatów histologicznych i autoradiogramami, zawiera wnikliwe i nierzadko krytyczne analizy metod badawczych poparte dyskusją z autorami.

M. Polański

Warunki prenumeraty kwartalnika

POSTĘPY BIOLOGII KOMÓRKI

Cena prenumeraty krajowej:

rocznie zł 320,— półrocznie zł 160,—

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 ze 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”.

Subscription orders for all the magazines published in Poland are available through the local press distributors or directly through the Foreign Trade Enterprise

ARS POLONA

00-068 Warszawa, Krakowskie Przedmieście 7, Poland.

Our bankers:

BANK HANDLOWY WARSZAWA S.A.

SPIS TREŚCI

M. VAN DER PLOEG, P. VAN DUIJN, J. G. J. BAUMAN and A. C. VAN PROOIJEN-KNEGT, In situ hybridization of DNA sequences in human metaphase chromosomes visualized by fluorescence microscopic procedures	157
M. J. BORKOWSKA, Geneza potencjałów czynnościowych i ich podłoże jonowe. I. Ogólna charakterystyka potencjałów czynnościowych w świetle badań porównawczych	165
M. J. BORKOWSKA, Geneza potencjałów czynnościowych i ich podłoże jonowe. II. Hipoteza sodowa i jej sprawdzanie	197
M. J. BORKOWSKA, Geneza potencjałów czynnościowych i ich podłoże jonowe. III. Główne teorie pobudzenia. Elektryczne właściwości błony	239
J. WOJCIEROWSKI i B. ORLICZ-WELCZ, Charakterystyka preparatów izolowanych jąder komórkowych	259
Recenzje	287