

**POLSKIE  
TOWARZYSTWO  
ANATOMICZNE**

**TOM 5 · NR 2**

**1978 (93–216)**

**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 526 + 104 egz. Ark. wyd. 11,25. Ark. druk. 7,75 + 1<sup>2</sup>/<sub>6</sub> wkl. Papier druk. sat. III kl.  
80 g, 70 × 100 cm. Oddano do składania w lutym 1978 r. Podpisano do druku w maju 1978 r.  
Druk ukończono w czerwcu 1978 r. Zam. 143/78 — M-10. Cena zł 20.—

Wrocławska Drukarnia Naukowa, Wrocław, ul. Lelewela 4



## RÓŻNICOWANIE SIĘ KOMÓREK WIRKÓW PODCZAS REGENERACJI

CELL DIFFERENTIATION IN *TURBELLARIANS* DURING REGENERATION

Jerzy MORACZEWSKI

Zakład Cytologii Instytutu Zoologii Uniwersytetu Warszawskiego

*Streszczenie.* Wirki, a szczególnie wypławki, odznaczają się dobrze rozwiniętymi zdolnościami regeneracyjnymi. W procesie regeneracji biorą udział nie zróżnicowane komórki, tzw. neoblasty. W artykule przedstawiono poglądy na ich pochodzenie oraz omówiono zmiany submikroskopowe podczas różnicowania się komórek i powstawania tkanek: nerwowej, mięśniowej i nabłonka.

*Summary.* *Turbellarians* and, particularly, *Tricladida* have highly developed regenerative abilities. Undifferentiated cells, neoblasts participate in the process of regeneration. Their origin, differentiation on the submicroscopic level and subsequent formation of nervous, muscle and epithelial tissue are discussed.

## 1. WSTĘP

Jedną z grup zwierząt o dużych zdolnościach regeneracyjnych są wirki, a wśród nich wypławki, mogące z niewielkiego fragmentu odbudować cały organizm.

Na przełomie lat 50 i 60 naszego stulecia badania nad regeneracją weszły w nową fazę. Na międzynarodowej konferencji w Atenach w 1964 r. przedstawiono aktualne wówczas poglądy na regenerację [38]. W końcu lat 60 opublikowano kilka prac podsumowujących wiadomości na temat regeneracji wirków i mechanizmów nią rządzących (Brøndsted [7], Sengel [85], Goss [29]). Okazało się, że regenerujące zwierzęta są bardzo dogodnym obiektem badania różnicowania komórkowego.

W ostatnich latach ukazały się prace [12, 13, 20, 36, 72, 76] rzucające nowe światło na różnicowanie się komórek w regenerujących wirkach.



Sądzę, że warto pokusić się o zebranie aktualnych wiadomości na ten temat, tym bardziej, że istnieją różne poglądy dotyczące pochodzenia komórek nie zróżnicowanych, z których odtwarzają się uszkodzone tkanki.

## 2. POCHODZENIE KOMÓREK NIE ZRÓŻNICOWANYCH

### 2.1. KONCEPCJA NEOBLASTÓW

Nie zróżnicowane komórki, tworzące pęczek regeneracyjny — blastemę, zwane są neoblastami („Stammzellen”). [74]. Morgan [64] i inni [14, 97, 100] sądzili, że są to komórki totipotentne i tylko one są zdolne do odtwarzania uszkodzonych tkanek. Pogląd ten był podtrzymywany i ugruntowany dzięki pracom pochodzącym ze szkoły Wolffa [22, 23, 26, 50, 51, 85, 108].

Neoblasty są niewielkimi komórkami wykrywanymi z łatwością na preparatach mikroskopowych dzięki ich silnej bazofilności. Na podstawie badań zwierząt nie operowanych, regenerujących oraz głodzonych, stwierdzono, że liczba neoblastów u poszczególnych osobników jest zmienna, ale są one równomiernie rozmieszczone w całej parenchymie [8, 53, 68, 69] z wyjątkiem okolic mózgu i pni nerwowych, gdzie jest ich więcej [94].

Po raz pierwszy submikroskopową budowę neoblastów opisał Pedersen [68]. Cechą najbardziej rzucającą się w oczy jest duża gęstość elektronowa cytoplazmy tych komórek, wynikająca z dużej ilości wolnych rybosomów, równomiernie rozmieszczonych w całej komórce.

Dalsze badania [65, 70, 71, 86, 97, 100] pozwoliły na stwierdzenie, że neoblasty różnią się zdecydowanie od komórek parenchymy i pozwoliły na dokładne opisanie ultrastruktury neoblastów u różnych gatunków wirków [46, 48, 51, 65, 70, 78, 82, 86, 95, 103]. Są to komórki owalne lub gruszkowate (2–5  $\mu\text{m}$  długości) [51, 78, 79, 82]. Prawie 2/3 objętości komórki neoblastu zajmuje owalne lub płatowate jądro (ryc. 1). Według Morita i wsp. [65] cechą charakterystyczną neoblastów jest wielkie jąderko z bardzo rozbudowaną częścią ziarnistą (ryc. 2 a, b, c).

Heterochromatyna jest granularna, zbita i często tworzy skupienia przy otoczce jądrowej (ryc. 3). W cytoplazmie znajdują się bardzo liczne, równomiernie rozproszone wolne rybosomy. Endoplazmatyczne retikulum jest bardzo ubogie, składa się z kilku krótkich cystern pokrytych rybosomami i nielicznych drobnych, gładkich pęcherzyków. Oprócz tego w cytoplazmie stwierdza się skupienia materiału o morfologicznym podobieństwie do chromatyny, są to tzw. emisje jądrowe [78, 79, 81, 82] lub ciała chromatoidalne [19, 33, 36], kontaktujące się z otoczką jądrową (ryc. 2). Taki sam materiał obserwuje się w jądrach neoblastów, w pobliżu porów otoczki jądrowej [45, 65].



W oparciu o poglądy Morgana [64] oraz innych autorów, Dubois [22] stwierdza, że neoblasty są typowymi totipotentnymi komórkami embrionalnymi, rozmieszczonymi pojedynczo, zdolnymi do wytworzenia zarówno komórek rozrodczych, jak i komórek biorących udział w regeneracji. Le Moigne [41–44, 46] potwierdził przypuszczenia Dubois. W młodych zarodkach znalazł on nie zróżnicowane komórki wywodzące się bezpośrednio z blastomerów wczesnych stadiów bruzdkowania. Komórki te nie różnią się niczym od nieaktywnych neoblastów (ryc. 4). Neoblasty są więc nie zróżnicowanymi komórkami embrionalnymi o zahamowanej potencji rozwojowej, a pobudzone przez czynnik indukujący migrują w kierunku rany, dzielą się i skupiają tworząc blastemę, która różnicuje się dając początek tkankom i narzodom.

## 2.2. KONCEPCJA ODRÓŻNICOWANIA

Ta grupa poglądów na temat pochodzenia nie zróżnicowanych komórek wirków nie jest tak jednolita jak poprzednio omówiona. Wielu autorów, nie negując zdolności neoblastów do różnicowania się w procesie regeneracji, twierdzi, że nie są to jedynie komórki biorące udział w tym procesie [5, 37, 57, 98], nie wszystkie bowiem utracone tkanki powstają z neoblastów [27, 31, 75, 77, 107]. Poza neoblastami w regeneracji biorą również udział komórki powstające przez odróżnicowanie się tkanek. Steinmann [90–92] stwierdził, że regeneracja następuje dzięki powstawaniu komórek „przejściowych” pochodzących z tkanki rozrodczej, gruczołowej, nabłonka jelitowego lub parenchymy. Z komórek „przejściowych” następnie różnicują się nowe tkanki. Child i Watanabe [15] nazywają ten proces reorganizacją starej tkanki. Inni autorzy [16–20, 32–36, 77, 109], przeprowadzając analogię z regeneracją u płazów, uważają, że jedynie komórki powstałe drogą odróżnicowania się tkanek w okolicy rany są zdolne tworzyć blastemę. W procesie odróżnicowania uczestniczy gastroderma, komórki gruczołowe i mięśnie, a neoblasty w ogóle nie istnieją. Hay i Coward [36], w oparciu o szereg swoich poprzednich badań, bardzo krytycznie ocenili dotychczasowe opisy mikroskopowej i submikroskopowej struktury neoblastów wirków. Uważają oni, że komórki opisywane jako neoblasty to różne komórki lub fragmenty komórek pochodzące z różnych tkanek. Kryterium, na podstawie którego rozpoznawano neoblasty w mikroskopie optycznym, to ich powinowactwo do barwników zasadowych oraz kształt. Cechy takie posiada wiele innych komórek, a szczególnie niewielkie komórki gruczołowe rozmieszczone tuż pod warstwą mięśni. Wielka ilość wolnych rybosomów oraz brak struktur błoniastych, obserwowane w mikroskopie elektronowym, nie mogą być również cechami wyróżniającymi neoblasty. Podobnie zbudowane są



części sarkoplazmatyczne komórek mięśniowych, komórki rabditotwórcze oraz tzw. komórki beta, opisane w 1974 r. przez Coward [17] (ryc. 5). Mają one duże jądro z dobrze rozwiniętym jąderkiem. Ich cytoplazma jest wypełniona licznymi wolnymi rybosomami. W pobliżu jądra leżą emisje jądrowe, zwane przez Coward [17] ciałami chromatoidalnymi. Mitochondria są nieliczne, a endoplazmatyczne retikulum prawie nie rozwinięte. Submikroskopową budową komórki beta przypominają neoblasty. Hay i Coward [36] przypuszczają, że komórki beta uczestniczą w fizjologicznej regeneracji, np. zastępują zużywające się komórki gruczołowe. Jest więc to pewien typ komórek somatycznych, zdolnych do częstych podziałów, które błędnie opisywano jako totipotente neoblasty. Komórki beta są zdolne różnicować się w określonym kierunku, a ilość ich nie zmienia się podczas pourazowej regeneracji. Dotychczas niestety nie ukazała się zapowiadana dalsza część pracy, w której wspomniani autorzy mieli ustosunkować się do podobieństwa, wręcz identyczności, komórek beta, neoblastów i komórek blastemy.

Głosicielką najbardziej skrajnych poglądów na pochodzenie neoblastów jest Chandebois [10–12]. Przedstawiła ona bardzo złożoną koncepcję aktywacji jąder syncycjalnej parenchymy przez pojawiające się w uszkodzonej tkance RNA i powodujące proliferację tzw. stałych składników parenchymy. Z pojawiających się tą drogą komórek tworzy się blastema. Jedynie trzech autorów uważało, że parenchyma jest syncycjalna [4, 40, 73]. Wszyscy pozostali, pracujący zarówno metodami cytologii klasycznej, jak i posługujący się mikroskopem elektronowym, opisywali komórkową strukturę parenchymy. Pedersen [68–70] wykazał niezbicie, że w parenchymie dorosłych wypławków nie ma syncycium. Występuje ono jedynie we wczesnych stadiach rozwojowych [41, 48, 49] i związane jest z obecnością żółtka pochodzącego z komórki jajowej. Chandebois w swojej ostatniej pracy [13] wycofuje się z poglądów na temat syncycjalnego charakteru parenchymy, jednak uważa nadal, że blastema powstaje z komórek wchodzących w skład parenchymy. Równocześnie autorka ta przedstawiła bardzo interesujący pogląd na ogólne mechanizmy regeneracji w oparciu o koncepcje pola morfogenetycznego. Sądzi ona, że w populacji komórek znajdujących się w pobliżu rany występują zarówno definitywnie zróżnicowane komórki, jak również komórki zdolne do odróżnicowania. One to właśnie, odróżnicowując się, zastępują komórki niektórych tkanek (nabłonek, gonady) w procesie normalnej fizjologicznej regeneracji. Podczas regeneracji pourazowej komórki te odróżnicowują się, tworząc neoblasty.

Badając niższe wirki [63] doszliśmy do wniosku, że nie zróżnicowane komórki (neoblasty) prawdopodobnie powstają z gastrodermy i nie tworzą, jak to ma miejsce u wypławków, wyraźnego pączka regeneracyjnego.



Neoblasty skupiają się, tworząc odrębne zawiązki utraconych narządów. Stwierdziliśmy również, że oprócz neoblastów istnieje specjalna kategoria komórek, z których podczas wzrostu i regeneracji fizjologicznej powstają komórki nabłonkowe.

Dowody, przedstawione przez zwolenników pierwszej lub drugiej koncepcji pochodzenia komórek nie zróżnicowanych, nie są całkowicie przekonujące. Wydaje się, że w regeneracji biorą udział zarówno neoblasty, czyli komórki nie zróżnicowane pochodzenia embrionalnego, jak i odróżnicowujące się w pobliżu rany komórki niektórych tkanek, o czym świadczą badania Gremigni i wsp. [31], którzy wykazali, że pączek regeneracyjny nie składa się z jednego typu komórek.

### 3. RÓŻNICOWANIE SIĘ TKANEK

#### 3.1. BLASTEMA

Zwolennicy koncepcji neoblastów jak i koncepcji odróżnicowania się tkanek nie negują faktu, że pączek regeneracyjny powstaje z komórek nie zróżnicowanych, a z niego tworzą się zawiązki utraconych narządów. Blastema regeneracyjna tworzy się bardzo wcześnie [47, 71, 82, 89], dzięki zdolności neoblastów do wędrówki i skupiania się w pobliżu rany (ryc. 6), co udowodniono eksperymentalnie [21, 23–25, 50, 51, 53, 54, 67, 83, 85, 99, 100, 102–109]. Promieniami X niszczone mianowicie neoblasty wirków, a następnie niektórym osobnikom przeszczepiano fragmenty ciała z neoblastami, pobrane od zwierząt nie napromieniowanych. Regenerowały tylko te osobniki, którym „dostarczono” neoblastów. W innych doświadczeniach wirkom ze zniszczonymi neoblastami przeszczepiano fragmenty tkanek z neoblastami znakowanymi  $H^3$  - urydyną. Na kolejnych skrawkach obserwowano wędrówkę znakowanych neoblastów i zbieranie się ich w pączek regeneracyjny. Blastemę tworzą przede wszystkim neoblasty leżące w pobliżu rany, które po zranieniu przechodzą szereg podziałów mitotycznych [2]. W przypadku wyczerpania się neoblastów w pobliżu rany mogą prawdopodobnie zostać pobudzone do migracji i podziałów neoblasty leżące w pewnym oddaleniu od miejsca zranienia [93, 95].

W ciągu pierwszych 24 godzin po zabiegu następuje aktywacja neoblastów [47, 55, 84], która przejawia się powiększeniem jąderka oraz zwiększeniem mas heterochromatynowych w jądrze [78]. Rybosomy zbierają się w polisomy, zwiększa się ilość cystern szorstkiego, endoplazmatycznego retikulum, zwiększa się również ilość emisji jądrowych [65, 71, 78, 89]. Morita [65] zaobserwował w jądrze pojawianie się ciał granularno - fibrylarnych, a następnie przechodzenie ich przez pory jądrowe do cytoplazmy (ryc. 7). Uważa on, że może to być „ekstra” DNA po-



chodzenia jądrowego. Analogiczne procesy obserwuje się w wielu dojrzewających oocytach. Inni autorzy nie analizują tej struktury, wspominając jedynie, że może ona być związana z tworzeniem się mitochondriów lub innych struktur błoniastych [45, 81].

Między 24 a 48 godziną po operacji w cytoplazmie neoblastów pojawia się aparat Golgiego [65, 71, 78], błony pierścieniowe [65], krople lipidowe [78] oraz mikrotubule. Gremigni i wsp. [31] przedstawili dowody na pochodzenie części komórek blastemy z komórek odróżnicowujących się. Prowadząc badania kariologiczne na jednym ze szczepów *Dugesia lugubris* stwierdzili oni, że w 4 - dniowym pączku regenerującego „ogona” jest około 4% komórek pochodzących z jąder (testes). Komórki te różnią się ilością chromosomów od neoblastów i łatwo je rozpoznać na preparatach.

Blastema 60 - godzinna utworzona jest z komórek nieco większych niż nieaktywne neoblasty [47, 89]. Komórki mają liczne wypustki. Jądro nadal zajmuje znaczną część objętości komórki. W centralnej części jądra leży duże jąderko [65, 71]. W cytoplazmie znajduje się już dobrze rozwinięte szorstkie endoplazmatyczne retikulum, kilka diktiosomów i nie-liczne gładkie pęcherzyki wypełnione materiałem o średniej elektrono-wej gęstości. Komórki blastemy różnią się między sobą pod względem rozbudowy szorstkiego endoplazmatycznego retikulum, aparatu Golgiego i ilości rybosomów [31]. W niektórych neoblastach pojawiają się w tym okresie ciała wielopęcherzykowe. Według Pedersena [71] wszystko to świadczy o początku różnicowania się tkanek (rys. 8).

### 3.2. RÓŻNICOWANIE SIĘ KOMÓREK NERWOWYCH

Pierwszą różnicującą się w blastemie tkanką jest tkanka nerwowa. Już w 48 godzinie po operacji, wśród różnicujących się komórek blastemy pojawiają się wydłużone komórki z wypustkami. Mają one rozwinięte diktiosomy i liczne polirybosomy. W 72 godzinie można już wyróżnić neuroblasty [78] z widocznymi perykarionami i aksonami. W cytoplazmie perykarionu znajdują się liczne polirybosomy i jasne gładkie pęcherzyki (ryc. 9). Kompleks Golgiego jest bardzo aktywny. Peryferyczne pęcherzyki diktiosomów wypełniane są gęstą elektrono-wo substancją, a często otoczone są również pęcherzykami dużymi jasnymi i drobnymi o średniej gęstości elektrono-wej. W pobliżu aparatu Golgiego leżą ciała wielopęcherzykowe. Liczne lizosomy i mikrotubule rozmieszczone są obok jądra, a w proksymalnych odcinkach aksonów występują bardzo liczne rybosomy oraz pęcherzyki i mikrotubule ułożone równolegle do osi akso-nów (ryc. 10) w odcinkach dystalnych prawie nie ma rybosomów i mito-chondriów, w jasnej cytoplazmie są jedynie mikrotubule i gładkie pęche-



rzyki. Mniej więcej w 4 dniu po operacji kończy się różnicowanie tkanki nerwowej. W perykarionie zwiększa się ilość ciałek wielopęcherzykowych, natomiast ilość mikrotubul zmniejsza się i stają się one krótsze, przyjmując wygląd typowych neurotubul. W niektórych komórkach nerwowych w pobliżu kompleksu Golgiego można zauważyć pęcherzyki z ziarnami o średnicy 80 nm (najprawdopodobniej są to pierwotne ziarna neurosekretu). Spiegelman i Dudley [89] uważają, że jeszcze w 7 - dniowej blastemie nie ma żadnych morfologicznych oznak wskazujących na pojawienie się różnych typów komórek. Zwracają oni uwagę na grupowanie się w pobliżu jądra dużej ilości elektronowo gęstego materiału, prawdopodobnie pochodzenia jądrowego. W pobliżu tych struktur gromadzą się lub pojawiają się mikrotubule, tworząc coś w rodzaju centrosfery. Cytowani autorzy nigdy nie widzieli w tych komórkach centrioli.

Nieco inaczej przebiega różnicowanie się tkanki nerwowej u badanych przez nasz zespół *Catenulida* [61-63]. Po usunięciu przedniego odcinka ciała aż do początku jelita, w pobliżu rany zbierają się neoblasty, tworząc zawiązek mózgu. Neoblasty leżące bliżej centrum zawiązka wytwarzają wypustki (przyszłe aksony). Pojawiają się w nich mikrotubule i gładkie pęcherzyki, a następnie we wszystkich komórkach tworzącego się mózgu zjawiają się ziarna neurosekretu. Wypustki komórek nerwowych, kierując się ku środkowi zawiązka, tworzą neuropil. W neuropilu między aksonami pojawiają się pierwsze synapsy. Część zewnętrzna mózgu zbudowana jest z korpusów komórek nerwowych. W końcowym stadium różnicowania, między dwoma zawiązkami mózgu pojawia się pęcherzyk statocysty, który zostaje następnie dość ściśle otoczony przez komórki mózgu.

### 3.3. RÓZNICOWANIE SIĘ KOMÓREK MIĘŚNIOWYCH

W niektórych komórkach 3 - dniowej blastemy pojawiają się struktury wskazujące na różnicowanie się ich w komórki mięśniowe [70, 78, 80]. W pobliżu jądra pojawiają się nieliczne grube i cienkie filamenty, które następnie skupiają się na jednym z biegunów komórki (ryc. 11). Między 10 a 15 dniem po operacji wśród filamentów widoczne są gęste elektronowo ciała. Wokół skupień filamentów zbierają się płaskie, gładkie pęcherzyki wchodzące w skład sarkoplazmatycznego retikulum. W końcowym okresie różnicowania myoblasty znacznie się wydłużają, a powierzchnia jądra fałduje się. W niektórych komórkach nadal, jak w neoblastach, występują emisje jądrowe (ryc. 12). Wokół części kurczliwej komórki mięśniowej, w otaczającej ją substancji międzykomórkowej, pojawiają się włókienka kollagenowe tworzące zewnątrzkomórkową sieć charakterystyczną dla układu mięśniowo - łącznotkankowego wypławków



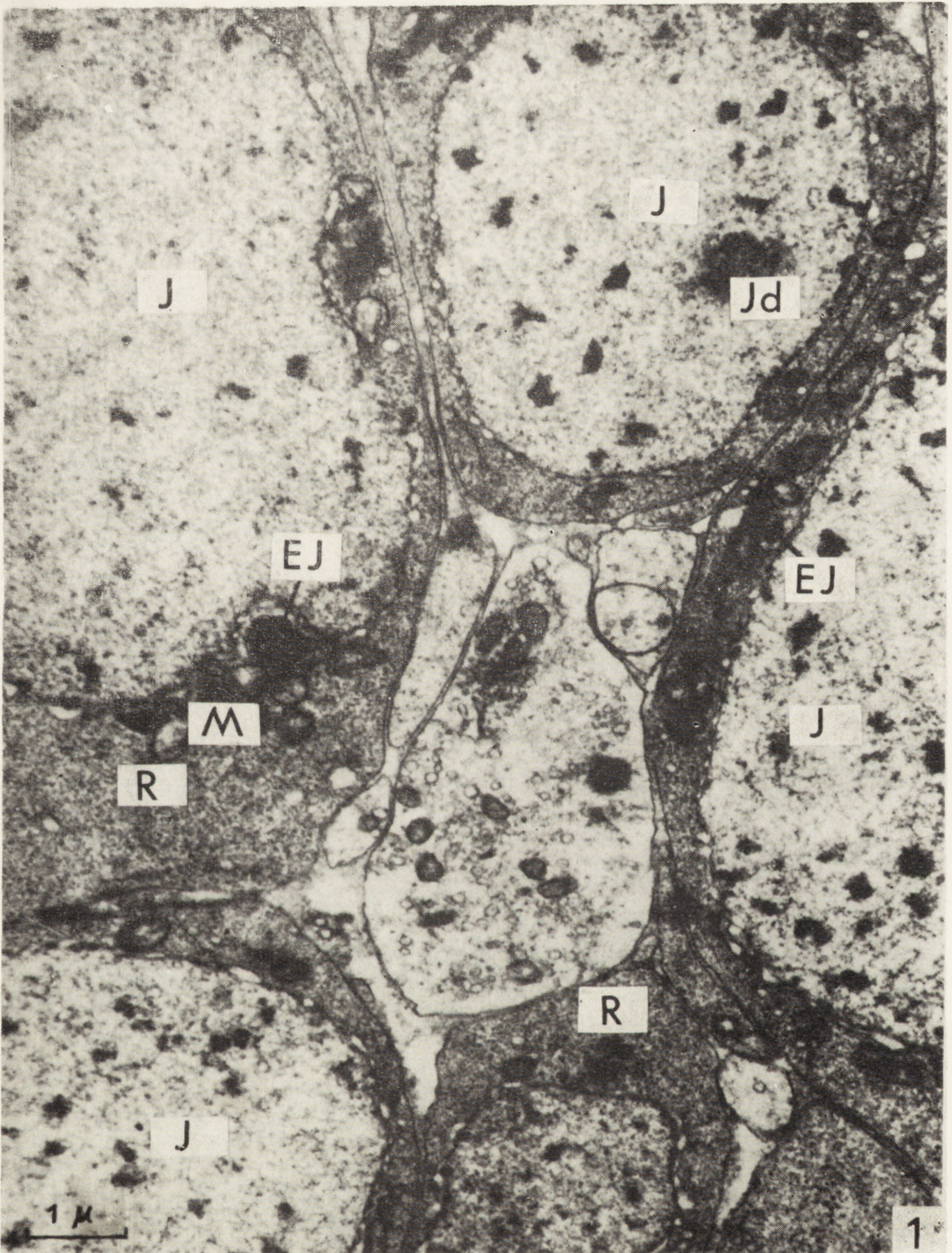
(ryc. 12). W podobny sposób różnicują się komórki mięśniowe wirków niższych. Jedyna różnica, jaką zaobserwowaliśmy, to pojawienie się, oprócz cienkich i grubych filamentów [60, 62, 63], także mikrotubul.

#### 3.4. RÓŻNICOWANIE SIĘ NABŁONKA

Epitelializację, czyli gojenie się rany, opisywano w licznych pracach [1, 3, 4, 6, 39, 40, 72, 75, 96, 98, 101, 103]. Niestety, na ich podstawie nie można wyrobić sobie jasnego obrazu przebiegu tego procesu. Różne są poglądy na pochodzenie komórek nabłonkowych, a mianowicie: nowy nabłonek może odtwarzać się przez proliferację starego nabłonka, albo dzięki neoplastom, lub też odróżnicowywaniu się komórek innych tkanek, lub z komórek twórczych nabłonka. Po odcięciu fragmentu ciała wypławka rana lekko obkurcza się i pokrywa się cienką bezkomórkową osłonką (badania w mikroskopie optycznym). Jej pochodzenie może być różne: według jednych tworzy ją mezoderma [9], według innych powstaje ona z rabditów wyrzucanych w pobliżu rany [104] lub też z płynu tkanekowego [7] koagulującego po zetknięciu ze środowiskiem zewnętrznym.

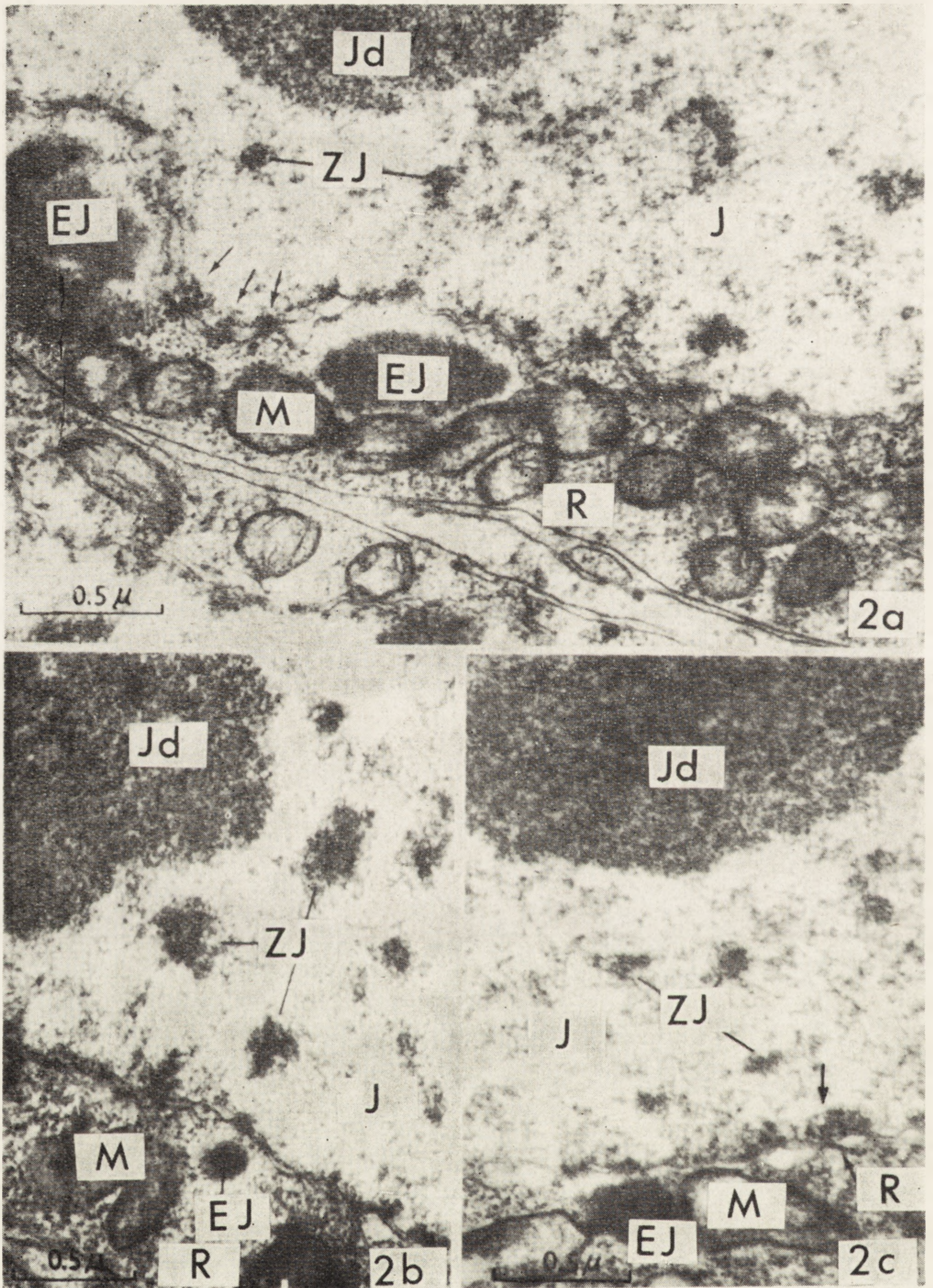
Niewielu badaczy zajmowało się subkomórkowym różnicowaniem nabłonka podczas regeneracji [66, 72, 87, 89, 104]. Komórki nabłonkowe wypławka powstają z komórek blastemy [66, 87], z tzw. komórek rabdito-twórczych [56], a w okolicy rany nie stwierdza się ani wzrostu, ani proliferacji komórek starego nabłonka [66, 87, 104]. W neoplastach dających początek komórkom nabłonkowym najpierw, tak jak przy tworzeniu się rabditów, najintensywniej rozwija się retikulum endoplazmatyczne szorstkie. Następnie w kilku miejscach w cytoplazmie pojawiają się zagęszczenia amorficznej substancji oraz krótkie mikrotubule, dające prawdopodobnie początek kinetosomom. W tym stadium rozpoczyna się wędrówka komórek ku powierzchni rany. W okolicy rany wciskają się one między stare komórki nabłonka, a ich błony tworzą z nimi desmosonalne połączenie [66, 89, 104]. W ten sposób przyrastający obok rany nabłonek powoli ją zamyka (ryc. 13). Nieco inny obraz epitelializacji obserwował w mikroskopie skaningowym Pedersen [72]. Według tego autora w pierwszych 4 godzinach po operacji rana obkurcza się wyraźnie i otacza się lekko zgrubiałym nabłonkiem. Na jej powierzchni widoczne są liczne włókienka, krople tłuszczu, śluz, rabdity, komórki gruczołowe oraz niewielkie okrągłe komórki niewiadomego pochodzenia. Te leżące w ranie komórki, łącząc się ze sobą za pomocą długich filopodiów, tworzą sieć (ryc. 14). Nie widać połączeń między siecią komórek przykrywającą ranę a brzegiem rany. W ciągu następnych kilkunastu godzin powierzchnia rany pokrywa się coraz liczniejszymi i coraz częściej połączonymi ze sobą komórkami; zanikają widziane wcześniej komórki gruczołowe, śluz i rabdity. Brzeg rany nadal jest wolny i — jak sądzi Pedersen — ko-





Ryc. 1. Skupisko naoblastów wypławka *Dugesia dorotocephala* [65]  
Jądro (J), jąderko (Jd), rybosomy (R), emisje jądrowe (EJ) i mitochondria (M.) × 13100





Ryc. 2a, b, c. Przekrój przez neoblasty *Dugesia dorotocephala* po 2 dniach od operacji [65]

Jądro (J), jąderko (Jd), grupy ziarnistości (ZJ) prawdopodobnie pochodzenia jąderkowego migrują do cytoplazmy przez pory jądrowe (strzałki). Emisje jądrowe (EJ), mitochondria (M), rybosomy (R). a —  $\times 38600$ , b —  $\times 33300$ , c —  $\times 37500$

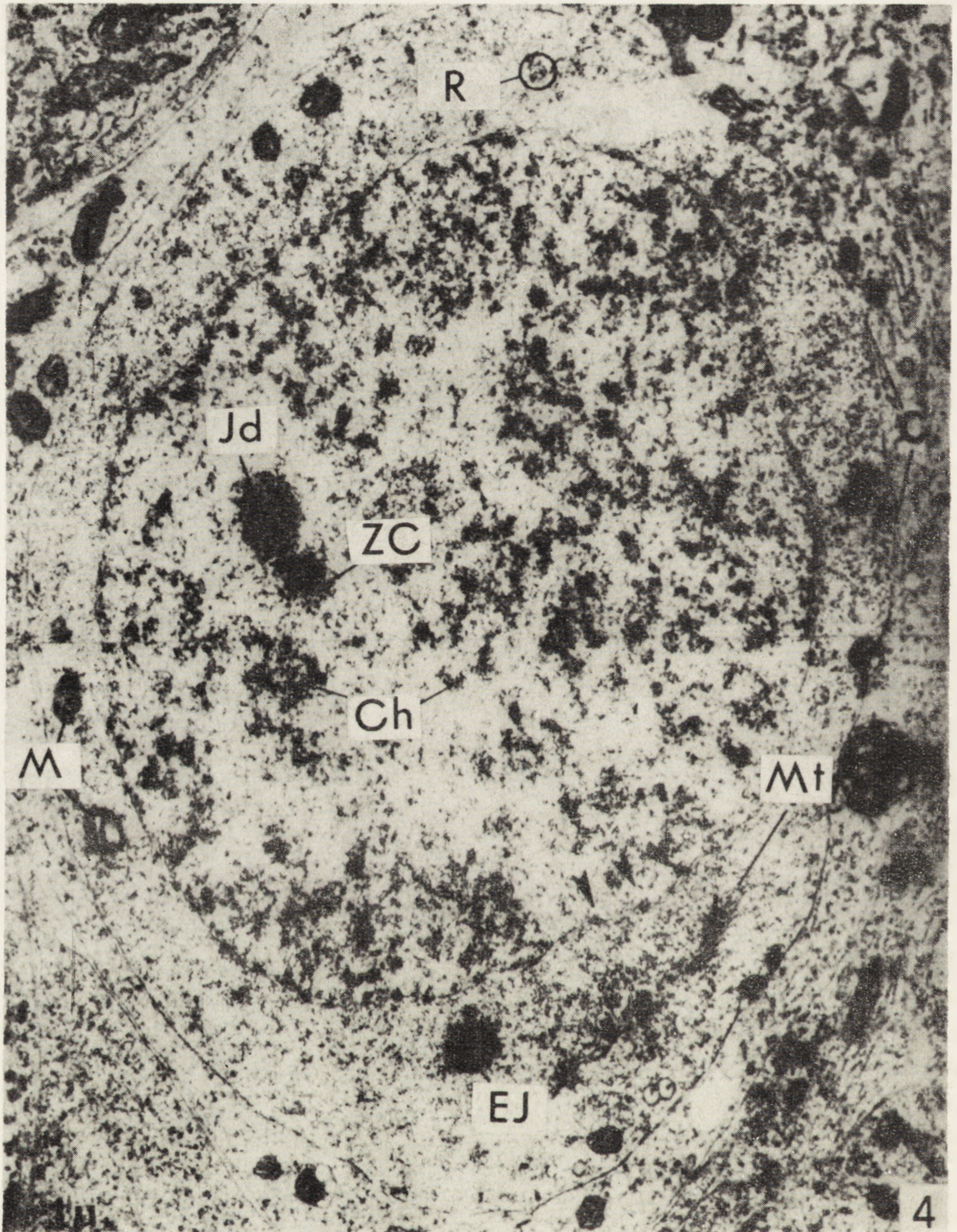




Ryc. 3. Neoblast z jednodniowej blastemy wypławka [70]

Heterochromatyna (strzałka) przylega ściśle do otoczki jądrowej, nieliczne kanaliki szorstkiego endoplazmatycznego retikulum (ER) oraz mitochondria (M).  $\times 21000$



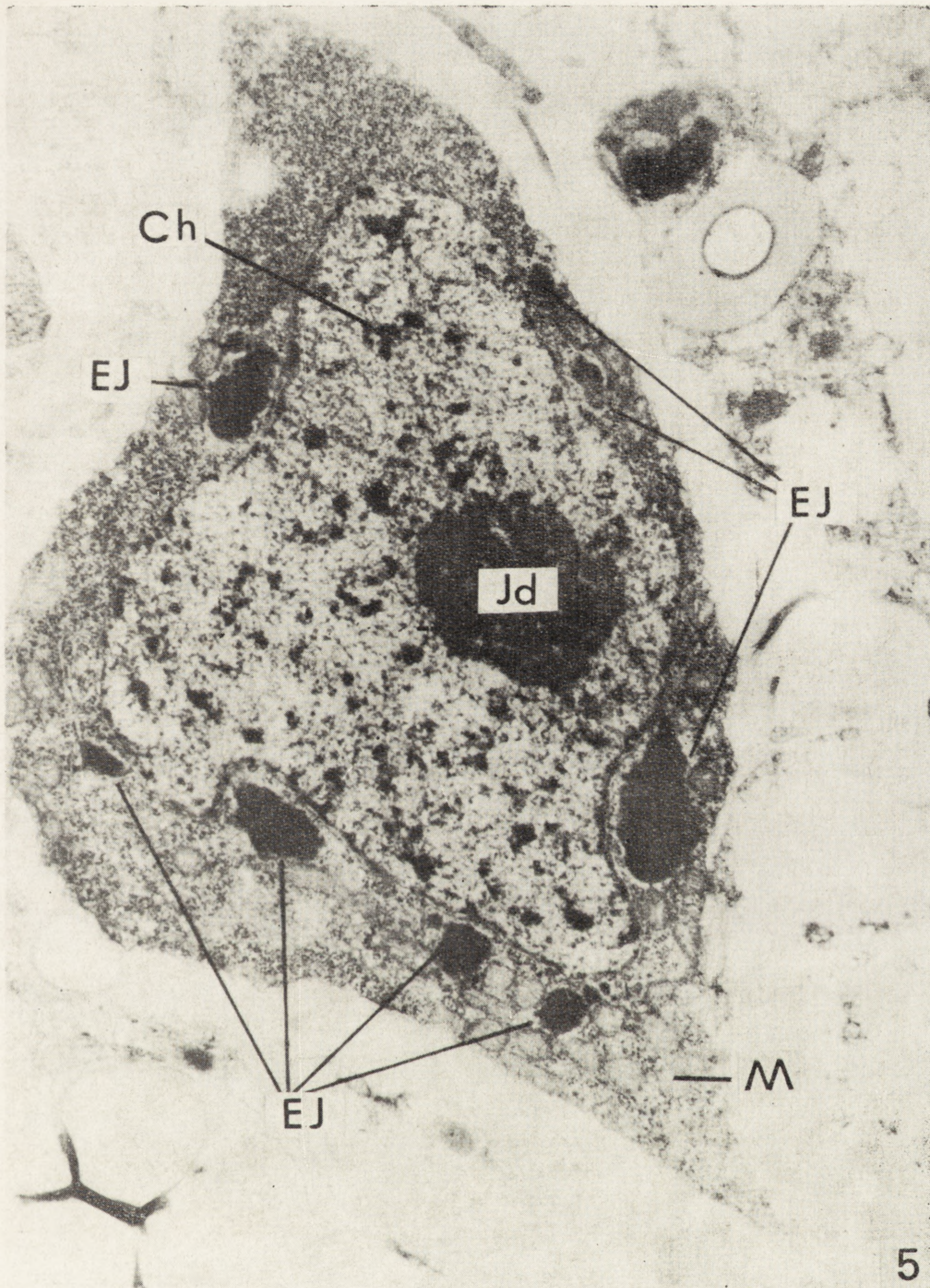


Ryc. 4. Nie zróżnicowana komórka zarodka *Polycelis nigra* [42]

Na terenie jądra widoczne są skupiska heterochromatyny (Ch), ziarna interchromatynowe (ZC) i jąderko (Jd). Strzałki wskazują na przechodzący przez pory jądrowe materiał ziarnisty. Widoczne są liczne rybosomy (R), mitochondria (M), emisje jądrowe (EJ) i mikrotubule (Mt).

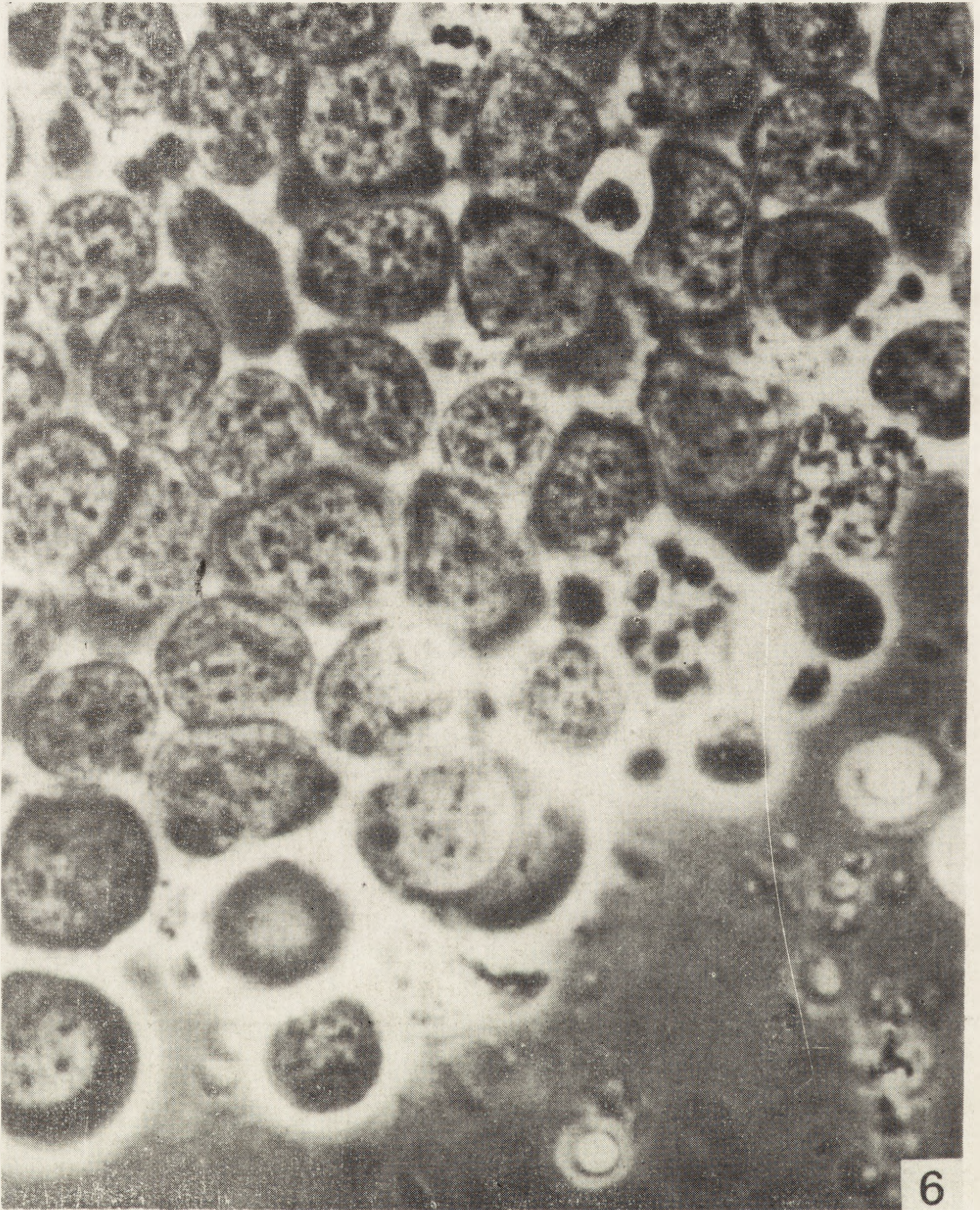
× 22600





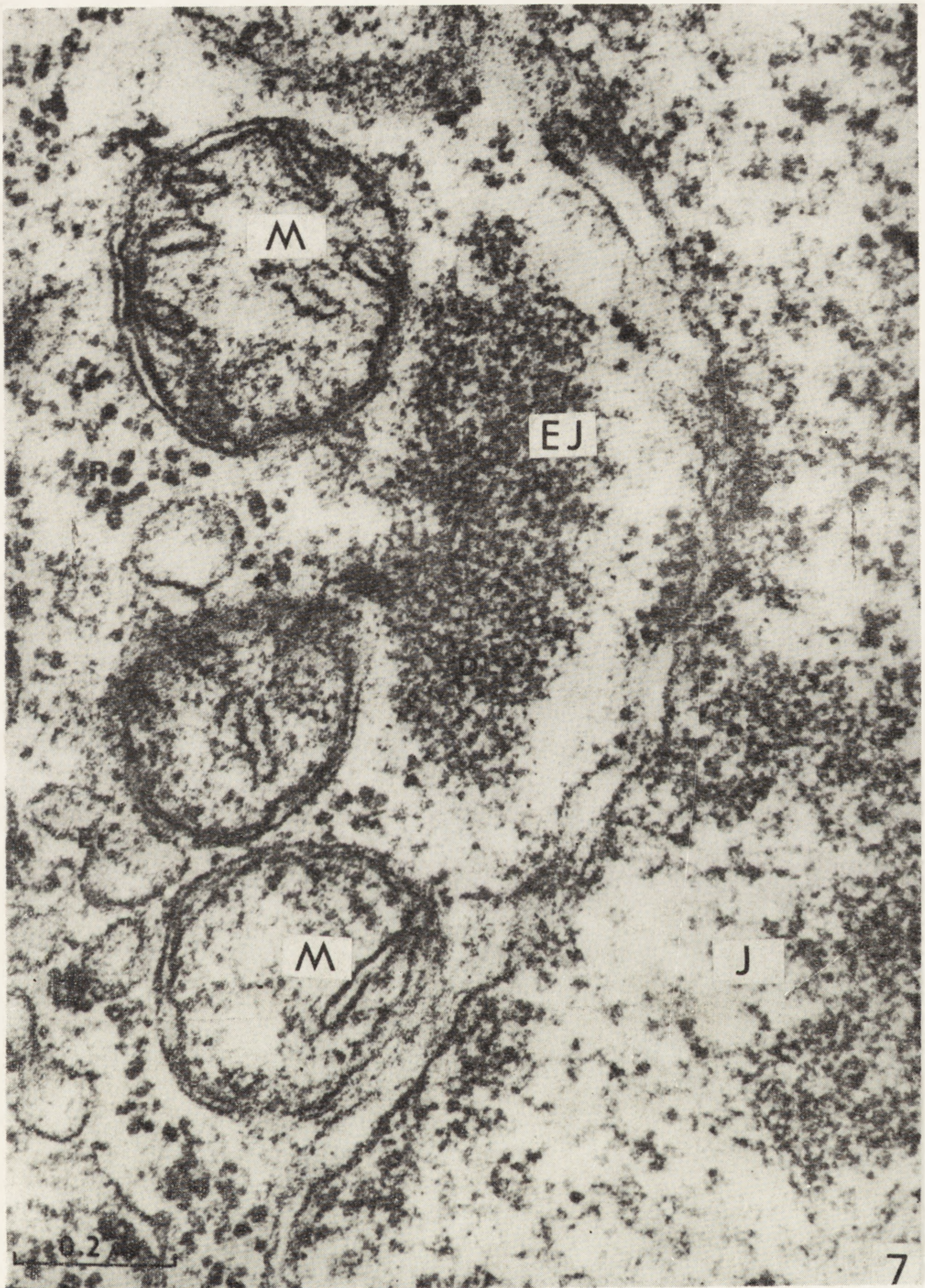
Ryc. 5. Komórka beta wśród komórek parenchymy wypławka *Dugesia* [36]  
Na terenie jądra widoczne duże jąderko (Jd) i heterochromatyna (Ch). Cytoplazma wypełniona jest rybosomami i zawiera nieliczne mitochondria (M) oraz wyraźnie widoczne emisje jądrowe (EJ)  $\times 21000$





Ryc. 6. Neoblasty z żywej rozgniecionej blastemy wypławka *Dugesia trigrina* (mikroskop kontrastowo - fazowy).  $\times 3000$  [71]

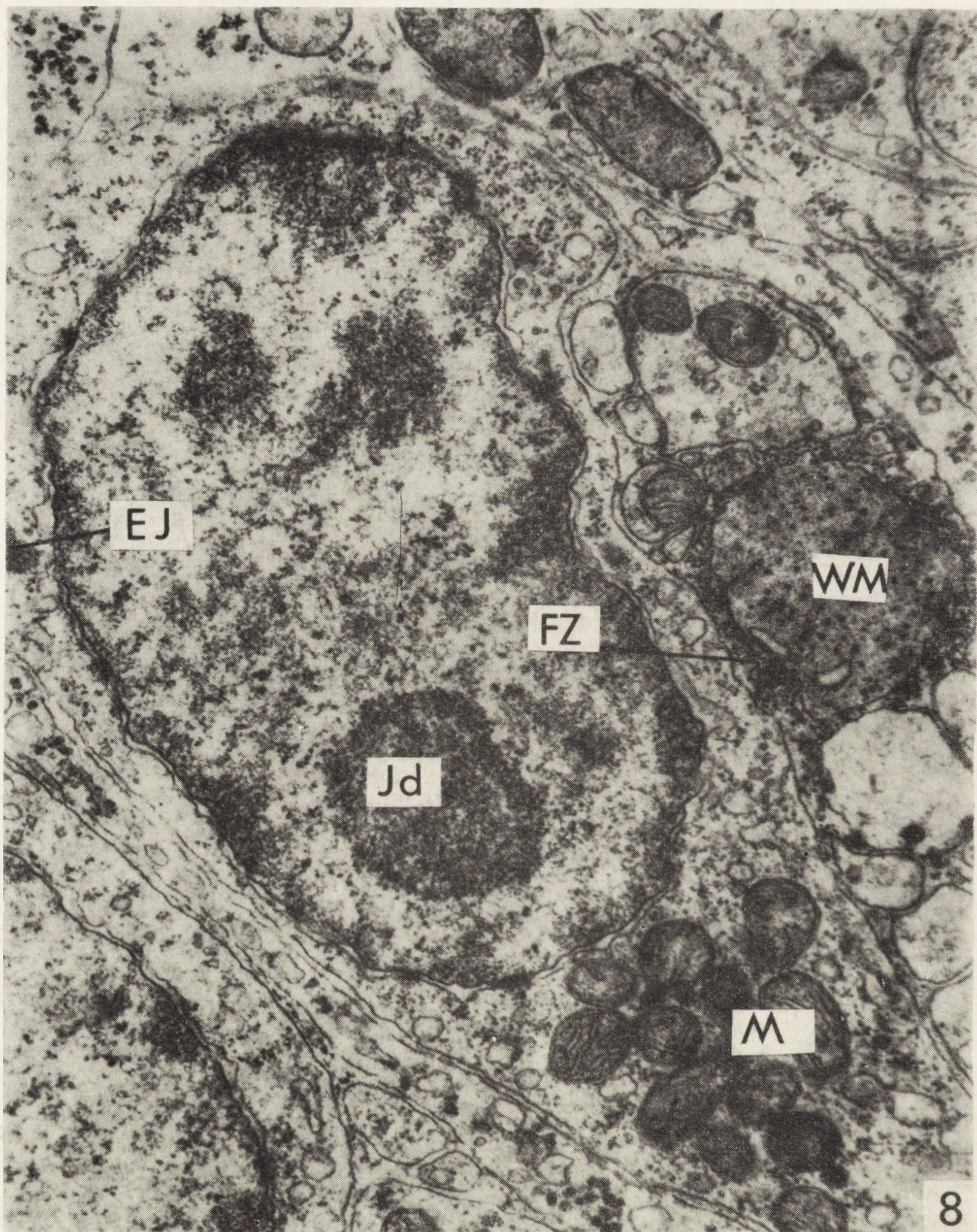




Ryc. 7. Fragment neoblastu wypławka *Dugesia dorotocephala* kilka godzin po operacji [65]

Widoczna jest struktura emisji jądrowych (EJ), mitochondria (M) i jądro (J)  $\times 11000$

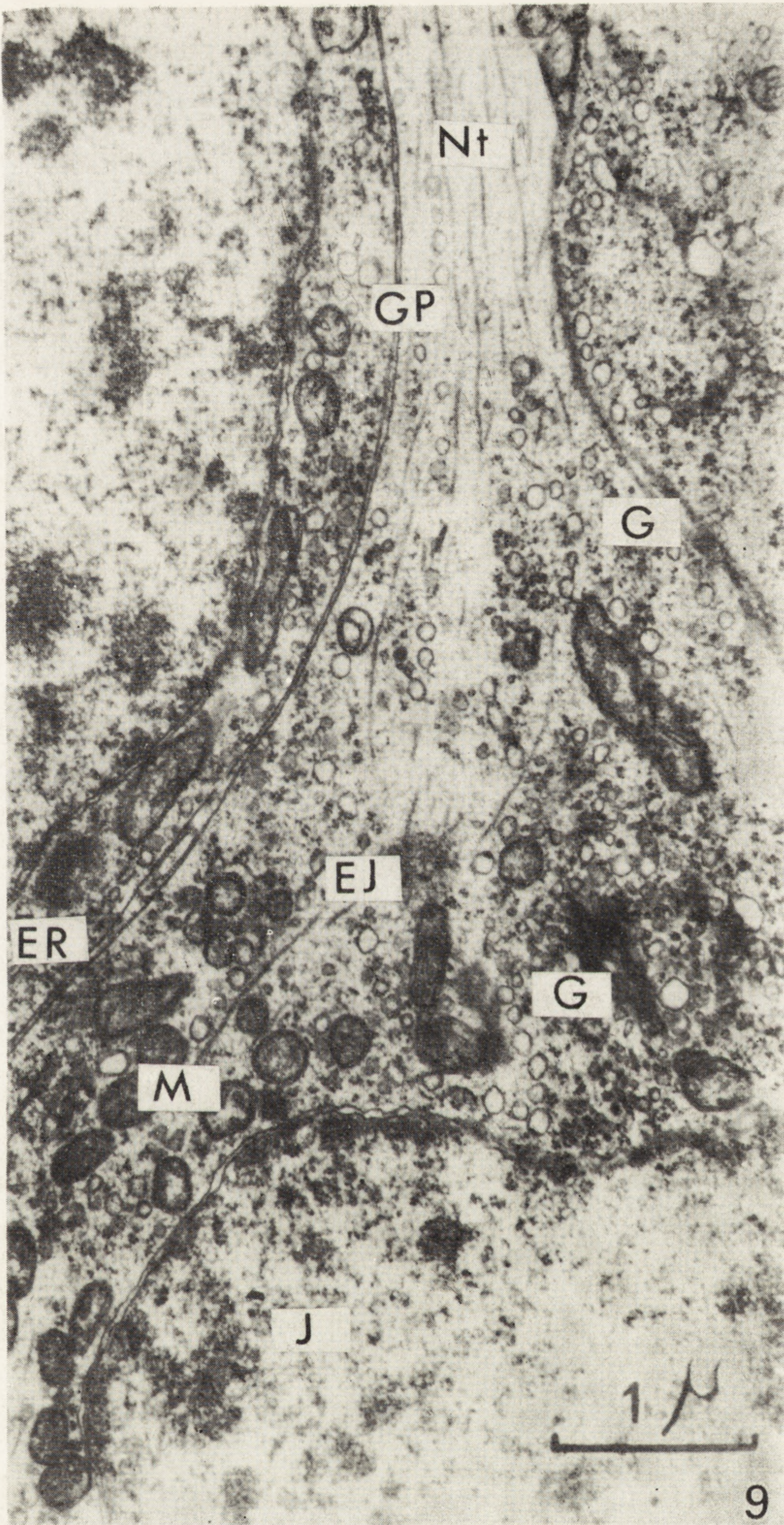




Ryc. 8. Neoblast z blastemy wypławka *Dugesia trigrina* pobudzony do różnicowania się [70]

Na terenie jądra widoczne jąderko (Jd) i liczne skupiska heterochromatyny. Na terenie cytoplazmy widać grupę mitochondriów (M), emisje jądrowe (EJ), włókno mięśniowe (WM), fibryle zewnątrzkomórkowe (FZ).  $\times 27000$





Ryc. 9. Perykarion różnicującej się komórki nerwowej *Dugesia gonocephalis* [79]

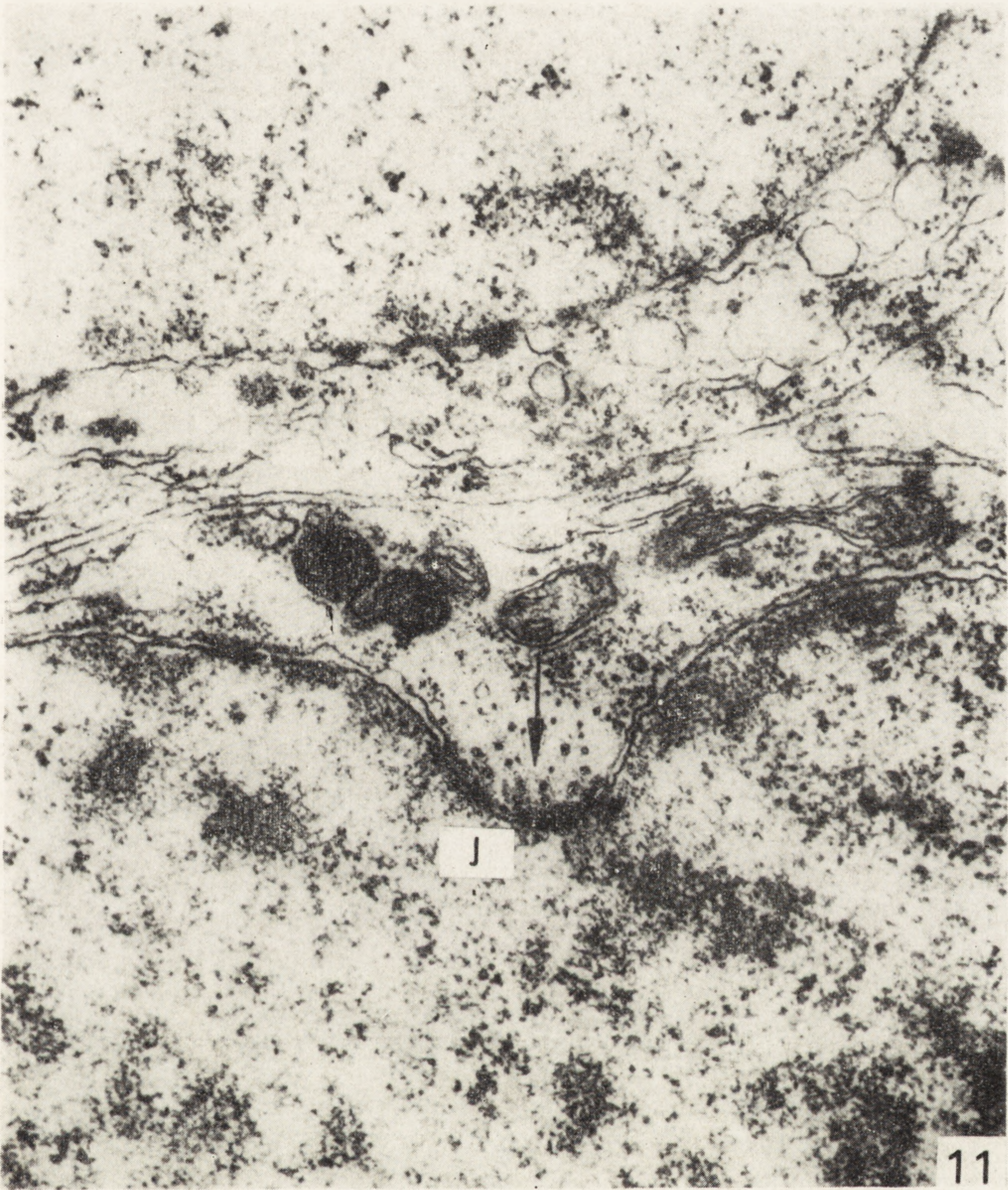
Jądro (J). Na terenie cytoplazmy widoczne są liczne gładkie pęcherzyki (GP), mitochondria (M), kompleks Golgiego (G), szorstkie endoplazmatyczne retikulum (ER), emisje jądrowe (EJ) oraz neurotubule (Nt)





Ryc. 10. Fragmenty aksonu różnicującej się komórki nerwowej wypławka *Dugesia gonocephala* [79]  
 Rybosomy (R), neurotubule (Nt), mitochondria (M), endoplazmatyczne retikulum (ER), gładkie pęcherzyki (GP), aparat Golgiego (G), ciała wielopęcherzykowe (CWP)

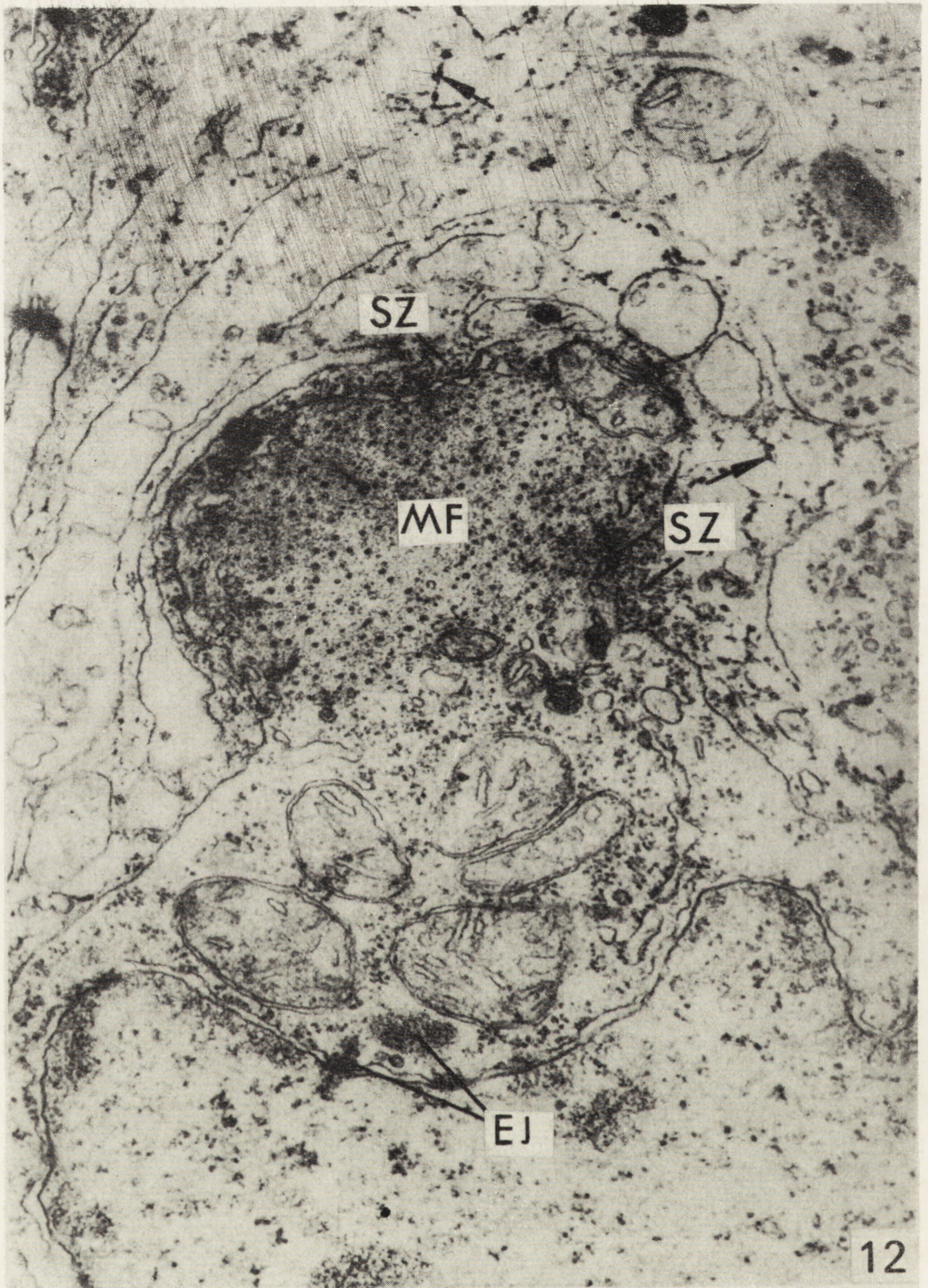




Ryc. 11. Fragment różnicującej się komórki mięśniowej regenerującego wypływka *Dugesia trigrina* [70]

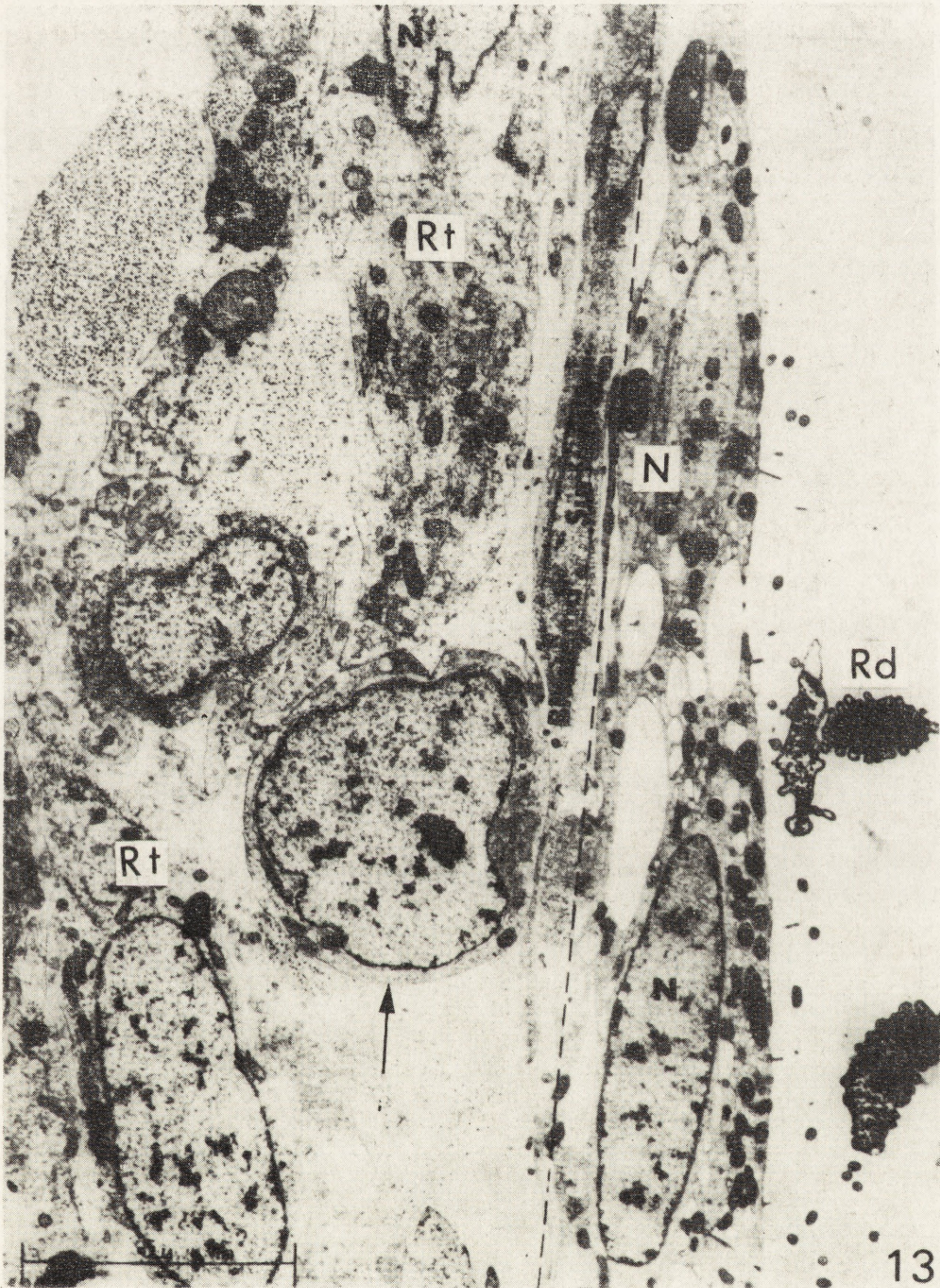
Strzałki wskazują filamenty miozynowe pojawiające się w pobliżu jądra (J). × 48000





Ryc. 12. Myoblast z ośmiodniowej blastemy wypławka *Dugesia trigrina* [70]  
W cytoplazmie widoczne są emisje jądrowe (EJ), filamety grube (MF) i cienkie tworzące część kurczliwą komórki. Na zewnątrz komórki widać fibryle (strzałka) wchodzące w skład substancji zewnątrzkomórkowej (SZ).  $\times 32000$

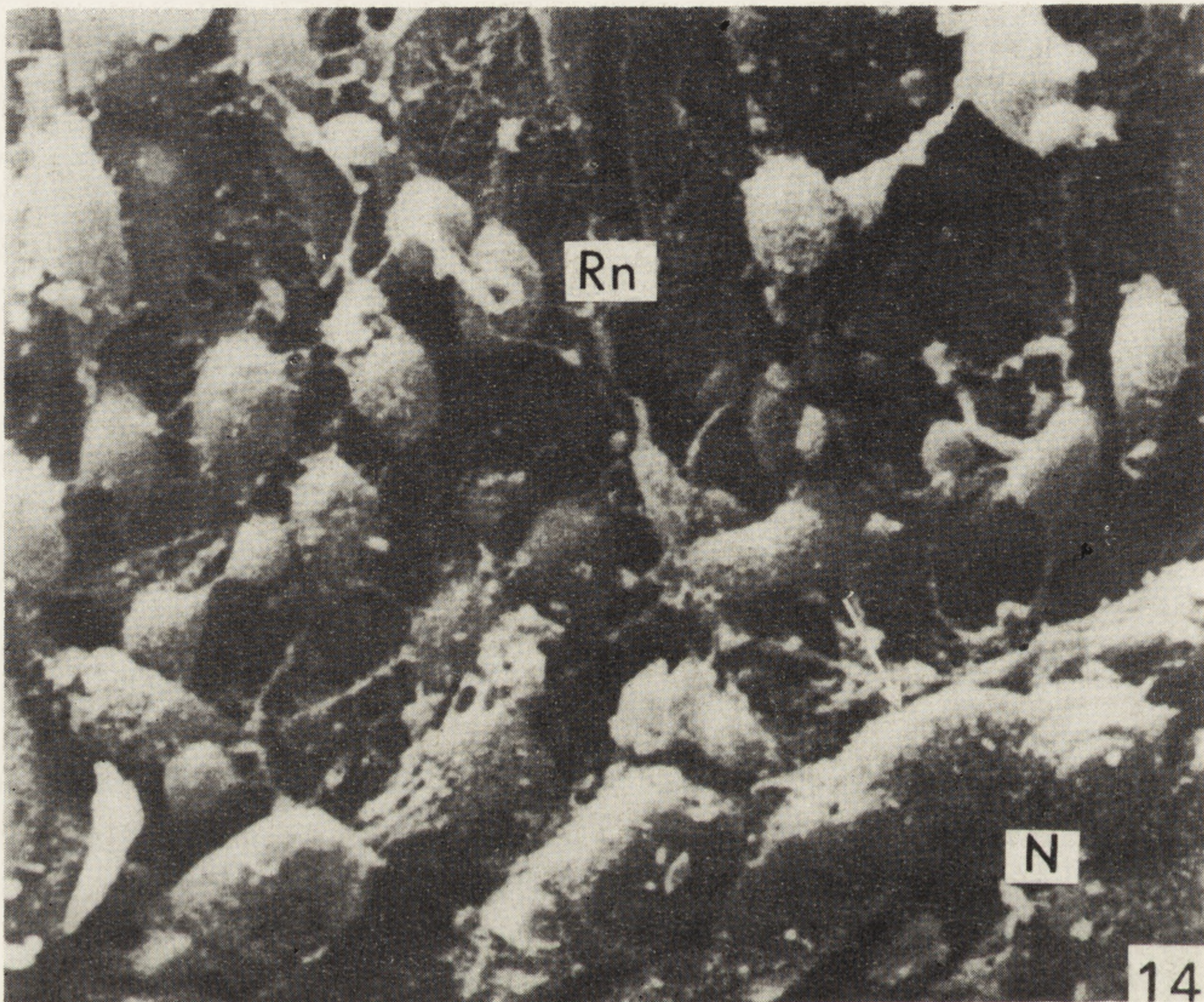




Ryc. 13. Regenerujący nabłonek wypławka *Dugesia dorotocephala* [66]

Linia przerywaną biegnącą wzdłuż zdjęcia zaznaczono płaszczyznę operacji. Zrastające ranę komórki pozbawione są mikrokosmków i rzęsek, pod nimi widoczne są neoblasty (strzałka) i komórki rabsditotwórcze (Rt), rabsdity (Rd), jądra (N)

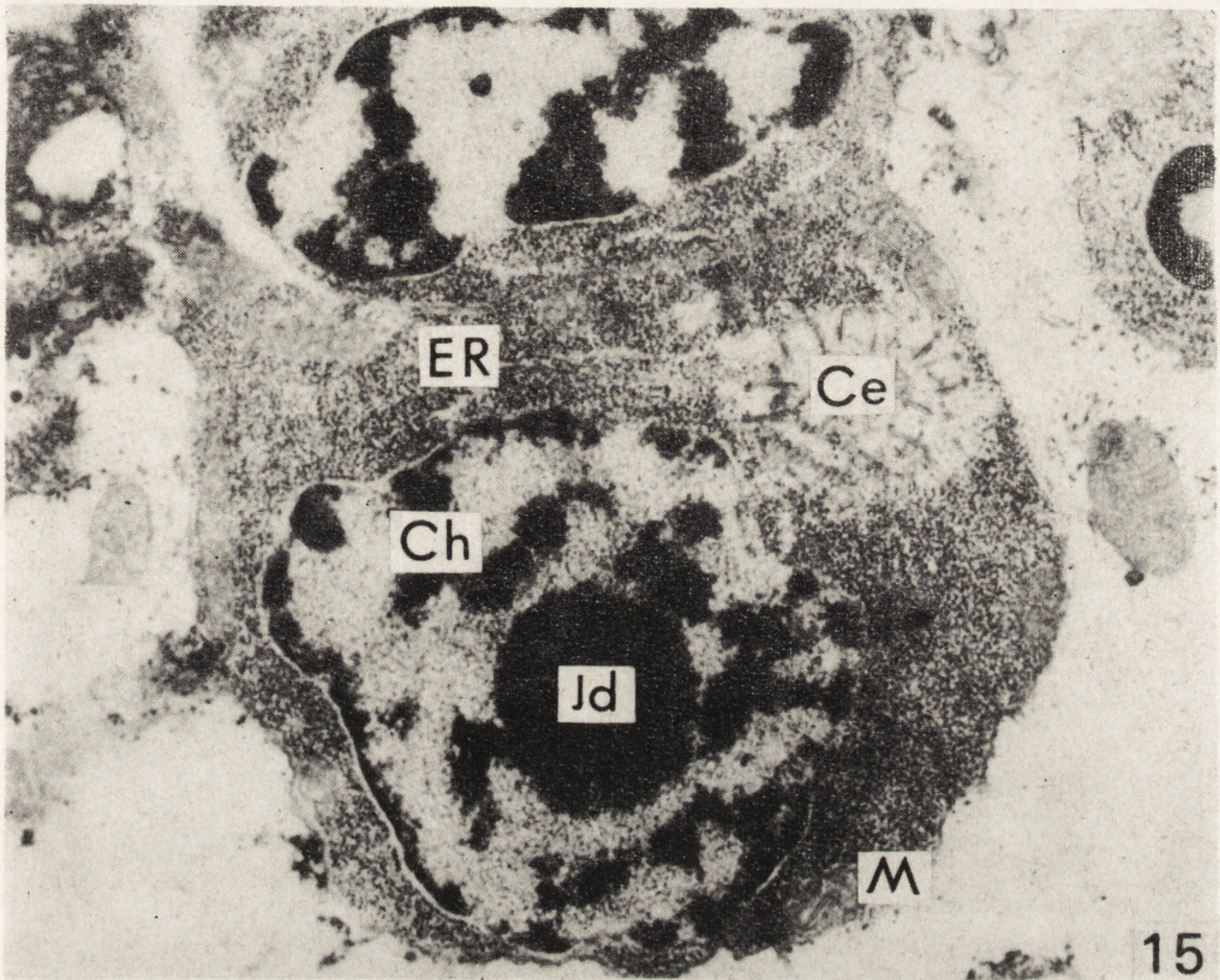




Ryc. 14. Elektronogram z mikroskopu skaningowego 4 - godzinnej rany wypławka [72]

Na brzegach (strzałka) rany (Rn) widoczna jest warstwa nieuszkodzonego nabłonka (N). W ranie występują liczne komórki z filopodiami.  $\times 1500$

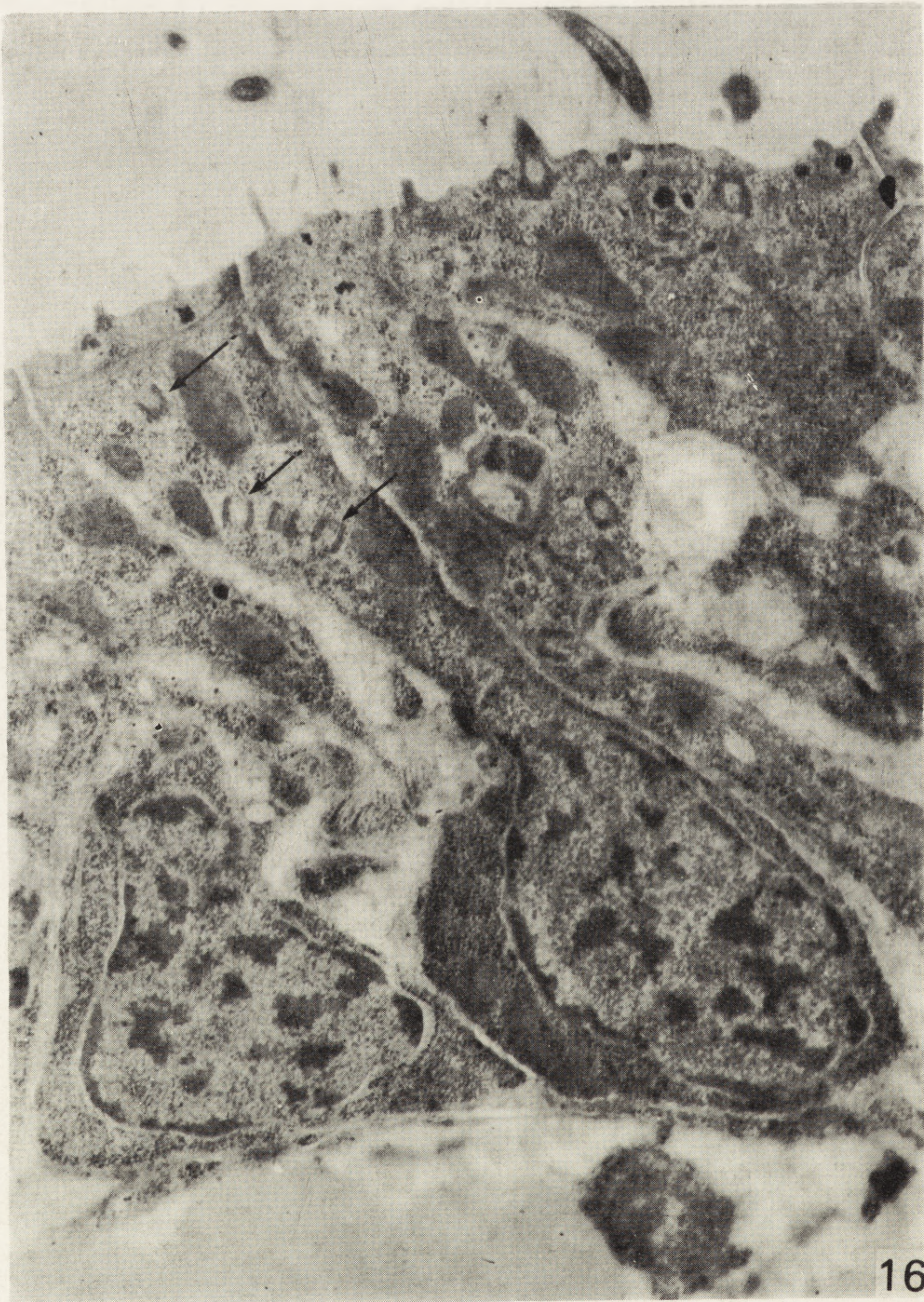




Ryc. 15. Komórka twórcza nabłonka wirka *Catenula* sp. [88]

Duże jąderko (Jd), rybosomy (R), skupiska heterochromatyny (Ch), duże skupisko centrioli (Ce), nieliczne kanaliki endoplazmatycznego retikulum (ER) i mitochondria (M).  $\times 21000$





16

Ryc. 16. Różnicująca się komórka nabłonka *Catenula* sp. [63]  
W cytoplazmie komórki, wciśniętej między komórki nabłonka, widoczne są centriole (strzałki) wędrujące ku powierzchni.  $\times 21000$



mórki pokrywające ranę łączą się w tym miejscu z głębszą warstwą wora skórno - mięśniowego leżącą pod nabłonkiem. W ciągu 2 dnia po zabiegu następuje rozkurcz rany i brzeg jej wygładza się. Nadal jednak widoczna jest wyraźna różnica między starym nabłonkiem a powierzchnią rany. Zarówno w ranie, jak i w starym nabłonku ciągle pojawiają się komórki, które wciskają się między już istniejące i tworzą coraz ściślejszą warstwę powierzchniową. W 3 lub 4 dniu komórki brzegów rany łączą się wypustkami z komórkami okrywającymi ją. Poczynając od 5 dnia młody nabłonek pokrywa się mikrokosmkami i rzęskami.

U *Catenuli* [63, 88] rana po operacji bardzo silnie obkurcza się. Nabłonek zrasta się i po kilkunastu godzinach, gdy skurcz ustępuje, rana pokryta jest rozciągniętym starym nabłonkiem. Stwierdziliśmy, że u tego wirka występują odrębne komórki twórcze nabłonka, które są bardzo podobne do neoblastów (ryc. 15), mają wielkie jądro z dużym jąderkiem i znaczną ilością heterochromatyny, w ich cytoplazmie znajdują się wolne rybosomy, nieliczne gładkie pęcherzyki i słabo rozwinięte retikulum endoplazmatyczne szorstkie. Cechą charakterystyczną tych komórek jest występowanie na terenie cytoplazmy grupy od kilku do kilkunastu centrioli. Obserwowaliśmy, że komórki z centriolami wciskają się między komórki nabłonka (ryc. 16), gdzie wyrastają z nich rzęski. Komórki twórcze nabłonka u osobników nie operowanych są rozmieszczone dość regularnie pod epidermą i wokół jelita.

#### 4. UWAGI KOŃCOWE

Przedstawione tu procesy zmian morfologicznych zachodzących podczas różnicowania się niektórych tkanek wirków, a szczególnie wypławków, zostały już dość dobrze poznane. Obecnie w wielu pracowniach skupiono natomiast uwagę na poznaniu mechanizmów działania substancji przenoszących informacje między komórkami w zranionym wirku. Wielu badaczy, jak Golding [28], Grasso [30] i Lender [52], wykazało, że tę funkcję pełni neurosekret. Aktualnie trwają więc poszukiwania receptorów hormonów w neoblastach. Bada się również oddziaływanie amin biogennych i neurotransmitterów na neoblasty i tkanki regenerujące. Substancje te są bowiem uważane za aktywne składniki neurohormonów wirków.

#### LITERATURA

- [1] Anderson GORDON M., Observations of epidermal differentiation in regeneration, *Virg. J. Sci.*, **13**: 248-254, 1962.
- [2] BAGUNA J., Mitosis in the intact and regenerating planarian *Dugesia mediterranea* n. sp., *J. Exp. Zool.*, **195**: 57-64, 65-79, 1976.



- [3] BANDIER J., Histologische Untersuchungen über die Regeneration der Landplanarien, Arch. Entw-Mech., **135**: 316-348, 1973.
- [4] BARTSCH O., Die Histogenese der Planarienregenerate, Zool. Anz., **56**: 63-67, 1923.
- [5] BONDI C., Osservazioni sui rapporti tra rigenerazione degli occhi e sistema nervoso in *Dugesia lugubris*, Arch. Zool. Ital., **44**: 141-150, 1959.
- [6] BOWEN I. D., RYDER T. A., The fine structure of planarian *Polycelis tenuis* (Iijima). III. The epidermis and external features, Protoplasma, **70**: 381-392, 1974.
- [7] BRØNDSTED H. V., Planarian regeneration, Pergamon Press, Oxford 1969.
- [8] BRØNDSTED A., BRØNDSTED H. V., Number of neoblasts in the intact body of *Euplanaria torva* and *Dendrocoelum lacteum*, J. Embr. Exp. Morph., **9**: 167-172, 1961.
- [9] CHANDEBOIS R., Recherches experimentales sur la régénération de la Planaire marine *Procerodes lobata*. O. Schm., Bull. Biol. Fr. Belg., **91**: 1-94, 1957.
- [10] — Sur la source de l'histogenèse régénératrice chez les planaires, C. R. Acad. Sc. Paris, **251**, 1960.
- [11] — Rôle des éléments fixe et libre du parenchyme dans la régénération de *Planaria subtentaculata* Drap., Bull. Biol. Fr. Belg., **96**: 203-227, 1962.
- [12] — Cell transformation systems in planarians. [w] Regeneration in Animals, red. Kiortsis V., Trampusch H. A. L. North-Holl. Publ. Comp., Amsterdam 1965, 131-142.
- [13] — General mechanisms of regeneration as elucidated by experiments on planarians and by a new formulation of the morphogenetic field concept, Acta Biotheoretica, **22**: 2-33, 1973.
- [14] CHILD C. M., Studies on regulation. I. Fission and regulation in *Stenostomum*, Roux Arch. Entwm., **15**: 187-237, 1903.
- [15] CHILD C. M., WATANABE Y., The head frequency gradient in *Euplanaria dorotocephala*, Phys. Zool., **8**: 1-40, 1935.
- [16] COWARD S. J., Regeneration in planarians: some unresolved problems and questions, J. Biol. Psych., **11**: 15-19, 1969.
- [17] — Chromatoid bodies in somatic cells of the planarian; observation of their behavior during mitosis, Ant. Rec., **180**: 533-546, 1974.
- [18] COWARD S. J. HIRSH F. M., TAYLOR J. H., Thymidine kinase activity during regeneration in the planarian *Dugesia dorotocephala*, J. Exp. Zool., **173**: 269-278, 1970.
- [19] COWARD S. J., HAY E. D., Fine structure of cells involved in physiological and reconstructive regeneration in planarians, Anat. Rec., **172**: 296-305, 1972.
- [20] COWARD S. J., BENNET C. E., HALZLEHURST B. L., Lisosomes and lisosomal enzyme activity in the regeneration planarian evidence in support of dedifferentiation. J. Exp. Zool., **189**: 133-139, 1974.
- [21] DUBOIS F., Démonstration de la migration des cellules de régénération des Planaires par la méthode des greffes et des irradiations combinées, C. R. Acad. Sc. Paris, **226**: 1316-1317, 1948.
- [22] — Contribution à l'étude de la migration des cellules de régénération chez les Planaires, Bull. Biol., Fr., Belg. **83**: 213-283, 1949.
- [23] — Potentialités histogénétiques des néoblastes chez *Euplanaria lugubris* et facteur qui déclanche leur migration, Ann. Biol., **26**: 693-708, 1949.



- [24] FEDECKA-BRUNER B., Radiodestruction des testicules suivie de régénération chez la Planaire *Dugesia lugubris*, C. R. Acad. Paris, 258: 2353-3356, 1964.
- [25] FLICKINGER A. A., Isotopic evidence for a local origin of blastema in regenerating Planaria, Exp. Cell. Res., 34: 403-412, 1964.
- [26] GABRIEL A., Étude biochimique et autoradiographique de la synthèse d'acide ribonucléique au cours de la régénération de Planaire *Dugesia gonoccephala* (*Turbellaria*, *Trilada*) effects des rayons X et du mercaptoétanol sur cette synthèse, Ann. Embr. Morph., 1: 249-258, 1968.
- [27] GAZSÓ L. R., Contribution à l'étude de la régénération du pharynx du *Dendrocoelum lacteum* et *Dugesia lugubris*, Acta Biol. Acad. Sc. Hung., 8: 263-273, 1958.
- [28] GOLDING E. W., A survey of neuroendocrine phenomena in nonanthropod invertebrates, Biol. Reviews, 49: 161-224, 1974.
- [29] GOSS R., Principles of regeneration, Academic Press, New York 1969.
- [30] GRASSO, M., Some aspects of sexuality and agamy in Planarians, Bull. Zool., 41: 379-393, 1974.
- [31] GERMIGNI V., PUCCINELLI I., A contribution to the problem of the origin of the blastema cells in Planarians, J. Exp. Zool., 199: 57-72, 1977.
- [32] HAY E. D., Regeneration, Holt, New York, 1966.
- [33] — Fine structure and origin of regeneration cells in planarians, Anat. Rec., 160: 363-375, 1968.
- [34] — Differentiation and metaplasia in vertebrate and invertebrate regeneration, [w] The Stability of the Differentiated State, red. Ursprung H., Springer Verlag, New York 1968, 85-108.
- [35] — Cellular basis of regeneration, [w] Concept of Development, red. Lash J., Whittaker J. R., Sinauer Assoc., Stamford 1974.
- [36] HAY E. D., COWARD S. J., Fine structure studies on the planarian *Dugesia*. I. Nature of the „Neoblast” and other cells types in non-injured worms, J. Ultrastruct. Res., 50: 1-21, 1975.
- [37] KIDO T., Studies on the pharynx regeneration in planarian *Dugesia gonoccephala*, Sc. Rep. Kanazawa Univ., 7: 15-26, 1961.
- [38] KIORTSIS V., TRAMPUSCH H. A. L., Regeneration in animals and related problems, North-Holl. Publ. Comp. Amsterdam 1965.
- [39] KOLMAYER S., STEPHAN-DUBOIS F., Néoblastes et limitation du pouvoir de régénération céphalique chez le planaire *Dendrocoelum lacteum*, J. Embr. Exp. Morph., 8: 376-386, 1960.
- [40] LANG A., Ueber Regeneration bei Planarien, Arch. Mikr. Anat., 79: 361-426, 1912.
- [41] Le MOIGNE A., Étude du développement embryonnaire de *Polycelis nigra* (*Turbellaries*, *Triclade*), Bull. Soc. Zool., 88: 403-422, 1963.
- [42] — Mise en évidence au microscope électronique de la persistance de cellules indifférenciés au cours du développement de la Planaire *Polycelis nigra* C. R. Acad. Sc. Paris, 265: 242-244, 1966.
- [43] — Étude du développement embryonnaire et recherches sur la cellules de régénération chez l'embryon de la Planaire *Polycelis nigra*, J. Embryol. Exp. Morphol., 15: 39-52, 1966.
- [44] — Étude au microscope électronique de cellules l'embryonnaire de *Polycelis* (*Turbellarie*, *Triclade*), au début de leur développement, C. R. Acad. Sc. Paris, 263: 550-553, 1966.



- [45] — Présence d'émission nucléaires fréquemment associées à des mitochondries, dans les cellules embryonnaires de Planaires, C. R. Biol., **161**: 508–515, 1967.
- [46] — Étude du développement et de la régénération embryonnaires de *Polycelis nigra* et *Polycelis tenuis* Turbellarie Triclade, Ann. Embr. Morph., **2**: 51–69, 1969.
- [47] Le MOIGNE A., SAUZIN M. J., LENDER T., DELAVAUT R., Quelques aspects des ultrastructures du blastème de régénération et des ultrastructures du blastème régénération et des tissus voisins chez *Dugesia gonocephala* (Turbellarie, Triclade), C. R. Soc. Biol., **159**: 530–538, 1965.
- [48] Le MOIGNE A., SAUZIN M. J., LENDER T. Comparasion de l'ultrastructure du néoblaste et de la cellule embryonnaire des Planaires d'eau douce, C. R. Acad. Sc. Paris, **263**: 627–629. 1966.
- [49] Le MOIGNE A., GABRIEL A. Mise en évidence du caractere „activité” des cellules indifférenciés du parenchyme chez de jeunes Planaires en croissance, C. R. Soc. Biol., **163**: 1070–1071, 1969.
- [50] LENDER T., La régénération des Planaires, [w] Regeneration in Animals, red. V. Kiortsis, A. A. L. Trampusch, Plenum Press, Amsterdam 1965, 95–111.
- [51] — Quelques recherches récentes sur les cellules de régénération des Planaires d'eau douce, Bull. Soc. Zool. Fr., **92**: 309–312, 1967.
- [52] — The role of neurosecretion, [w] Fresh-water planarian. Libbie H. Hyman memorial volume. „Biology of Turbellaria”, red. N. W. Riser and M. P. Morse, Mc Graw Hill Co., New York, 1974, 460–475.
- [53] LENDER T., GABRIEL A., Sur la répartition des néoblastes de *Dugesia lugubris* (Turbellarie, Triclade) avant et pendant la régénération, C. R. Acad. Sci., Fr., **250**: 2465–2467, 1960.
- [54] Étude histochemique des néoblastes (Turbellarie, Triclade) avant et pendant la régénération Bull Soc. Zool. Fr., **85**: 100–116, 1960.
- [55] — Le comportement des néoblastes pendant la régénération de la Planaire *Dugesia lugubris* (Turbellarie, Triclade), Bull, Soc. Zool., Fr., **86**: 67–72, 1961.
- [56] LENZ T. L., Rhabdite formation in Planaria: The role of microtubules, J. Ultrastruct. Res., **17**: 114–126, 1967.
- [57] LINDH N. O., The nucleic acids composition and nucleotide content during regeneration in the flatworm *Euplanaria polychroa*, Ark. Zool., Ser. 2, **11**: 153–166, 1957.
- [58] — Histological aspects on regulation in *Euplanaria polychroa*, Ark. Zool., Ser 2, **11**: 89–103, 1957.
- [59] MORACZEWSKI J., CZUBAJ A., Muscle ultrastructure in *Catenula lemnae* (Dug) Turbellaria, Archoophora, J. Submicr. Cytol., **6**: 29–36, 1974.
- [60] MORACZEWSKI J., BAŁKOWSKA J., KACZMARCZYK J., CZUBAJ A., Ultrastructure of brain and neurosecretory cells in *Catenulida* (Turbellaria), Annals Med. Sect. Pol. Acad. Sci., **20**: 101–103, 1975.
- [61] MORACZEWSKI J., CZUBAJ A., KWIATKOWSKA J., Localization of neurosecretion in nervous system in *Catanulida*, Zoomorphologie, **87**: 97–102, 1977.
- [62] MORACZEWSKI J., CZUBAJ A., BAŁKOWSKA J., Organization and ultrastructure of nervous system in *Catenulida*, Zoomorphologie, **87**: 97–102, 1977.
- [63] MORACZEWSKI J., Asexual reproduction and regeneration of *Catenula* (Turbellaria, Archoophora), Zoomorphologie, **88**: 65–80, 1977.
- [64] MORGAN T. H., Regeneration in planarians Roux Arch. Entwm., **13**: 58–119, 1900.



- [65] MORITA M., BEST J. B., NOEL J., Electron microscopic studies of planarian regeneration. I. Fine structure of neoblast in *Dugesia dorotocephala*, J. Ultrastruct. Res., **27**: 7-23 1969.
- [66] MORITA M., BEST J. B., Electron microscopic studies of planarian regeneration. II. Changes in epidermis during regeneration, J. Exp. Zool., **187**: 345, 1974.
- [67] PEDERSEN K. J., Morphogenetic activities during planarian regeneration as influenced by triethylenemelamine, J. Embr. Exp. Morph., **6**: 308-334, 1958.
- [68] — Some features of the fine structure and histochemistry of planarian subepidermal gland cells, Z. Zellforsch., **50**: 121-142, 1959.
- [69] — Cytological studies on the planarian neoblast, Z. Zellforsch., **50**: 799-812, 1959.
- [70] — Studies on the nature of planarian connective tissue, Z. Zellforsch., **53**: 568-608, 1961.
- [71] — Studies on regeneration blastemas of the planarian *Dugesia trigrina* with special reference to differentiation of the muscle-connective tissue filament system, Roux Arch., **169**: 134-169, 1972.
- [72] — Scanning electron microscopical observation on epidermal wound healing in the planarian *Dugesia trigrina*, W. Roux Arch., **179**: 251-273, 1976.
- [73] PRENANT M., Recherches sur la parenchyme des Plathelminthes. Essai d'histologie comparée, Arch. Morph. Gen. Exp., **5**: 1-175, 1922.
- [74] RANDOLPH H., Observations and experiments on regeneration in planarians, Roux Arch. Entw. **5**: 352-367, 1897.
- [75] REESE D. H., An autoradiographic study of the origin of regenerated epidermis, acidophilic gland cells and pharynx in the planarian *Dugesia dorotocephala*, Thesis Univ. Maryland 1964.
- [76] RISER N. W., MORSE M. P., (red.) Biology of Turbellaria, Mc Graw-Hill Book Company, New York 1974.
- [77] ROSE C., SHOSTAK S., The transformation of gastrodermal cells to neoblast in regenerating *Phagoceta gracilis*, Exp. Cell. Res., **50**: 553-561, 1968.
- [78] SAUZIN M. J., Étude au microscope électronique du néoblaste de la Planaire *Dugesia gonocephala* (*Turbellaria*, *Triclada*) et ses changements au cours des premiers stades de la régénération, C. R. Acad. Sc. Paris, **263**: 605-608, 1966.
- [79] — Étude ultrastructurale de la différenciation du néoblastes au cours de la Planaire *Dugesia gonocephala*. I. Différenciation en cellule nerveuse, Bull. Soc. Zool. Fr., **92**: 313-318, 1967.
- [80] Étude ultrastructurale de la différenciation du néoblastes au cours de la régénération de la Planaire *Dugesia gonocephala*. II. Différenciation musculaire, Bull. Soc. Zool., Fr., **92**: 613-618, 1967.
- [81] — Présence d'émission nucléaire dans les cellules différenciées et en différenciation de la Planaire adulte *Dugesia gonocephala*, C. R. Acad. Paris, **267**: 1148, 1968.
- [82] SAUZIN-MONNOT M. J., Étude ultrastructurale des néoblastes de *Dendrocoelum lacteum* au cours de la régénération, J. Ultrastruct. Res., **45**: 206-222, 1973.
- [83] — Étude autoradiographique en microscopie électronique de la synthèse



- d'acides robonucléiques dans les néoblastes de la Planaire *Dendrocoelum* après section au différent niveau, Ann. Embr. Morph., 7: 51-59, 1974.
- [84] SAUZIN-MONNOT M. J., LENDER T., GABRIEL A., Étude autoradiographique ultrastructurale des néoblastes dans le blastème de régénération de 24h et dans le tissu en arrière du blastème chez la Planaire *Dugesia gonocephala* (*Turbellaria*, *Triclada*), C. R. Acad. Paris, 271: 1892-1895, 1970.
- [85] SENDEL P., Aspects récents de la morphogenèse chez les Planaires, [w] Chemistry of Learning, red. W. C. Corning S. C. Ratner, Plenum Press, New York 1967, 73-115.
- [86] SKAER R. J., Some aspects of cytology of *Polycelis nigra*, Quart. J. Micr. Sc., 5: 295-318, 1961.
- [87] — The origin and continuous replacement of epidermal cells in the planarian *Polycelis tenuis* (Iijima), J. Embr. Exp. Morph., 13: 129-139, 1965.
- [88] SOŁTYŃSKA M. S., MROCZKA B., MORACZEWSKI J., Ultrastructure of epidermis in turbellarian from the family *Catenulida* (*Archoophora*), J. Submicr. Cytol., 87: 293-301, 1976.
- [89] SPIEGELMAN M., DUDLEY P. L., Morphological stages of regeneration in the planarian *Dugesia trigrina*: A light and electron microscopic study, J. Morph., 139: 155-184, 1973.
- [90] STEINMANN P., Untersuchungen über das Verhalten des Verdauungssystems bei der Regeneration der Tricladen, Roux Arch. Entw., 25: 523-568, 1908.
- [91] — Das Verhalten der Zellen und Gewebe in regenerierenden Tricladenkörper, Verh. Naturf. Ges. Basel, 36: 133-162, 1925.
- [92] — Transplantationsversuche mit vital gefärbten Tricladen, Rev. Suisse Zool., 40: 269-272, 1933.
- [93] STEPHAN - DUBOIS F., Les cellules de régénération chez la Planaire *Dendrocoelum lacteum*, Bull. Soc. Zool. Fr., 86: 173-185, 1961.
- [94] — Les néoblastes chez les planaires, [w] Regeneration in Animals, red. V. Kior-tis, H. A. L. Trampusch North-Holl. Amsterdam 1965, 112-130.
- [95] STEPHAN - DUBOIS F., GUSSE M., Les néoblastes dans la régénération antérieure de *Dendrocoelum lacteum*, *Turbellarie*, *Triclade*, Roux Arch., 171: 286-294, 1973.
- [96] STEVENS N. M., Notes on regeneration in *Planaria lugubris*, Arch. Entwemch. Org., 13: 396-409, 1902.
- [97] — Histological study of regeneration in *Planaria simplicissima*, *P. maculata*, and *P. Morgani*, Roux Arch. Entw., 24: 359-373, 1907.
- [98] TESHIROGI W., Dynamic morphological change and time-table during the regeneration of the turbellarian *Bdellocephala brunnea*, Sc. Rep. Hirosaki Univ., 9: 21-48, 1962.
- [99] — Transplantation experiments of two short pieces of a freshwater planarian *Bdellocephala brunnea*, Jap. J. Zool., 14: 21-48, 1963.
- [100] THATCHER H. F., The regeneration of the pharynx in *Planaria maculata*, Amer. Natur., 36: 633-641, 1902.
- [101] TÖRÖK L. J., Experimental contributions to the regenerative capacity of *Dugesia lugubris* O. Sch., Acta Biol. Sci. Hung., 9: 79-98, 1958.
- [102] VANDEL A., La régénération des glandes génitales chez les Planaires. C. R. Acad. Sc. Paris, 172: 1072-1074, 1921.
- [103] VERHOEF M. A., The mitotic activity during the regeneration of *Polycelis nigra*, Proc. Kon. Ned. Acad. Wet., 49: 548-559, 1946.



- [104] WETZEL V. K., Studies on the fine structure of regenerating *Dugesia trigrina*, Dies. Harvard Univ., 1961.
- [105] WOLFF E., Recent researches on the regeneration of Planaria, [w] Regeneration, red. Rudnick, Ronald Press, 1962 53-84.
- [106] WOLFF E., DUBOIS F., La migration de cellules de régénération et les facteurs qui la provoquent chez les Triclades, C. R. Acad. Sc. Paris, 224-1388, 1947.
- [107] — Sur la migration des cellules de régénération chez les Planaires, Rev. Suisse Zool., 55: 218-227, 1948.
- [108] WOLFF E., LENDER T., Les néoblastes et les phénomènes d'induction et d'inhibition dans la régénération des Planaires, Ann. Biol., 1: 499-529, 1962.
- [109] WOODRUFF L., BURNETT A. L., The origin of blastemae cells in *Dugesia trigrina*, Exp. Cell. Res., 38: 295-305, 1965.

Otrzymano: 21 marca 1977.

Przyjęto: 20 października 1977.

Adres autora: ul. Krakowskie Przedmieście 26/28, 00 - 827 Warszawa.







## KRWINKA PŁYTKOWA JAKO KOMÓRKA SEKRECYJNA

## THE BLOOD PLATELET AS SECRETORY CELL

Barbara WACHOWICZ

Zakład Biochemii, Instytut Biochemii i Biofizyki Uniwersytetu Łódzkiego

*Streszczenie.* Przedstawiono aktualne poglądy na temat procesu sekrecyjnego zachodzącego w końcowej fazie agregacji krwinek płytkowych (ang. platelet release reaction). Zwrócono uwagę na budowę płytki i obecność ziarnistości jako miejsca magazynowania uwalnianych związków. Scharakteryzowano induktory uwalniania i sposób ich działania, jak również związki wyrzucane z płytek, ich znaczenie, ze szczególnym uwzględnieniem puli nukleotydów adeninowych. Omówiono syntezę płytkowych prostaglandyn (m. in. Tx A<sub>2</sub>, PGG<sub>2</sub>, PGH<sub>2</sub>) oraz udział tych związków w mechanizmach agregacji i sekrecji płytek.

*Summary.* Recent views on the process of secretion occurring in the end phase of the platelet aggregation (platelet release reaction) are presented. Attention is called to the platelet structure and the presence of granules as the site of storage of the compounds released. The release inductors and their action are described as well as the compounds released from the platelets, their significance and, particularly, the adenine nucleotide pool. Platelet prostaglandin synthesis is discussed (including Tx A<sub>2</sub>, PGG<sub>2</sub>, PGH<sub>2</sub>) and the role of these compounds in the mechanisms of platelet aggregation and secretion.

## WSTĘP

Płytki krwi ssaków są niezmiernie interesującym rodzajem komórek nie tylko z uwagi na pełnione funkcje w hemostazie i tworzeniu zakrzepów. Dla biochemików czy fizjologów te pozbawione jądra komórki o ograniczonej syntezie białek stanowią jednorodną populację komórek i służyć mogą za wygodny model doświadczalny. Płytki można łatwo wyizolować i badać w stanie natywnym nie tylko zawieszane w osoczu, ale również w określonym sztucznym środowisku. W takich warunkach płytki reprezentują tkankę, której komórki funkcjonują niezależnie od siebie



i bez wzajemnego oddziaływania. Krwinki płytkowe są bardzo wrażliwe na działanie wielu czynników, jednak przy ściśle kontrolowanych zmianach środowiska pojawiać się może i utrzymywać przez dłuższy czas określony stan oporności na te bodźce.

Gdy odsłonięte są włókna kolagenowe naczynia, płytki ulegają adhezji, rozpoczynając pierwszy etap tworzenia czopu hemostatycznego. Interakcja płytka-płytko prowadzi do wzrostu tego czopu. Specyficzną zdolność tworzenia agregatów płytki wykazują w obecności adenozyndwufosforanu (ADP). W podobny sposób reagują na działanie trombiny i kolagenu. Tworzeniu agregatów w końcowej fazie towarzyszy proces sekrecji.

W warunkach *in vivo*, przy uszkodzeniu ciągłości naczyń, wytworzone agregaty płytkowe uszczelniają ubytki naczyń; w stanach patologicznych tworzą wewnątrznaczyniowe zakrzepy płytkowe.

Krwinki płytkowe są zdolne do fagocytozy niewielkich cząsteczek lateksu, węgla, kolagenu i lipidów. Są zdolne również do aktywnego transportu serotoniny (5-HT), adeniny adenozyminy i tauryny. W płytkach zachodzi biosynteza prostaglandyn.

Współczesne poglądy na rolę płytek w hemostazie z uwzględnieniem budowy i metabolizmu tych komórek opisano szczegółowo w wielu pracach [48, 97, 99, 106]. Celem niniejszej pracy jest przedstawienie krwinki płytkowej jako komórki sekrecyjnej, zdolnej do uwalniania wielu ważnych biologicznie związków.

W świetle ostatnich badań, znaczenie procesu sekrecyjnego krwinek płytkowych wydaje się bezsporne. Uwolnione związki mają wpływ nie tylko na rozmiar tworzonych agregatów płytkowych, przebieg krzepnięcia krwi i fibrynolizy, ale uczestniczą w powstawaniu zmian miażdżycowych i stanów zapalnych.

#### Wykaz stosowanych skrótów

PG — prostaglandyna

Tx — tromboksan

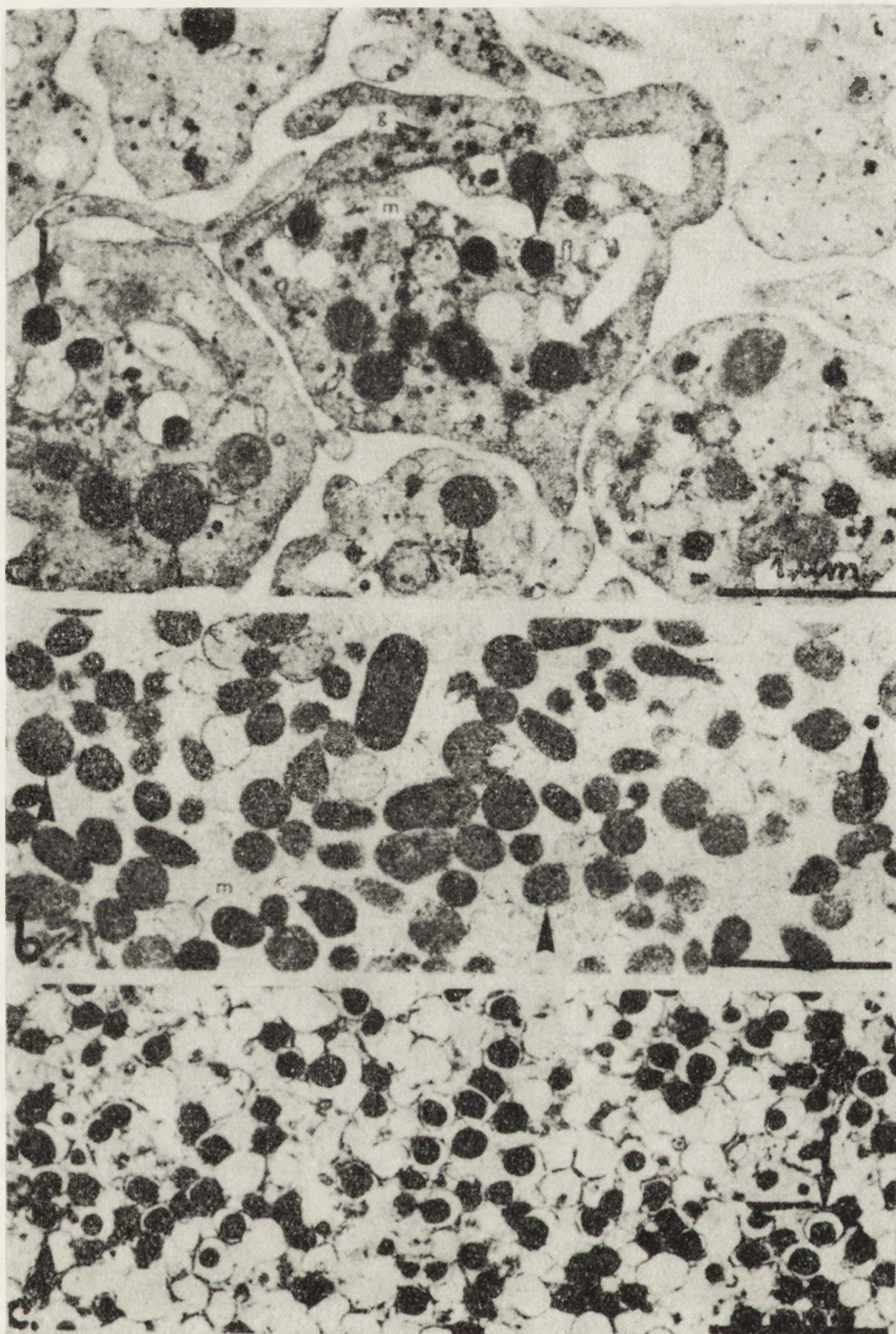
HETE — kwas 12L - hydroksy - 5, 8, 10, 14 - eikozotetraenowy

HHT — kwas 12L - hydroksy - 5, 8, 10 - heptadekatrienowy

#### STRUKTURA I BUDOWA PŁYTKI

Krwinki płytkowe ssaków są bezjądrzastymi fragmentami cytoplazmatycznymi pochodzącymi z megakariocytów — olbrzymich komórek szpiku kostnego. Z jednej komórki macierzystej powstaje około 3 tysięcy drobnych, bezjądrzastych płytek. Proces rozpadu megakariocytów i tworzenie płytek kontrolowany jest przez trombopoetynę [24]. W krążącej





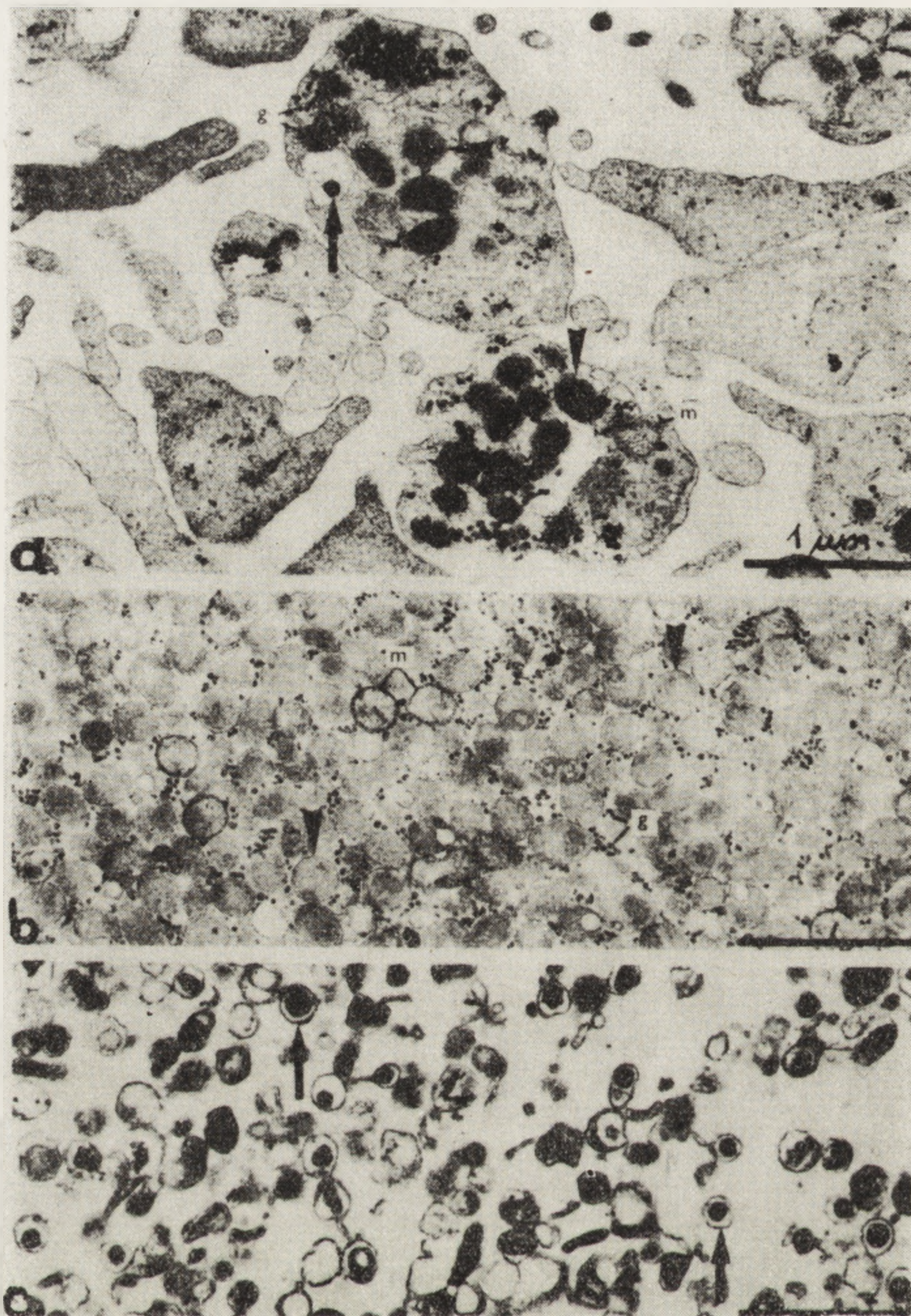
Ryc. 1. Krwinka płytkowa królika (a) oraz subkomórkowe frakcje bogate w  $\alpha$ -ziarnistości (b) i ziarnistości o dużej gęstości elektronowej (c).  $\times 22\ 000$  [16]

a — ziarnistości o dużej gęstości elektronowej zawierające serotoninę ( $\rightarrow$ ),  $\alpha$ -ziarnistości ( $\rightarrow$ ), mitochondria (m) i liczne ziarna glikogenu (g); b — liczne  $\alpha$ -ziarnistości ( $\rightarrow$ ), mitochondria (m) i zanieczyszczenia ziarnistościami magazynującymi serotoninę ( $\rightarrow$ ); c — ziarnistości o dużej gęstości elektronowej zawierające serotoninę ( $\rightarrow$ )

krwi człowieka ilość płytek jest dla danego osobnika stała i waha się od 175 000 do 350 000 w  $\text{mm}^3$ . Czas przeżycia płytek, mierzony w oparciu o technikę znakowania  $^{51}\text{Cr}$ , wynosi około 8–10 dni [24].

Krwinki płytkowe poszczególnych gatunków ssaków wykazują znaczne podobieństwo, jakkolwiek daje się zaobserwować pewne różnice



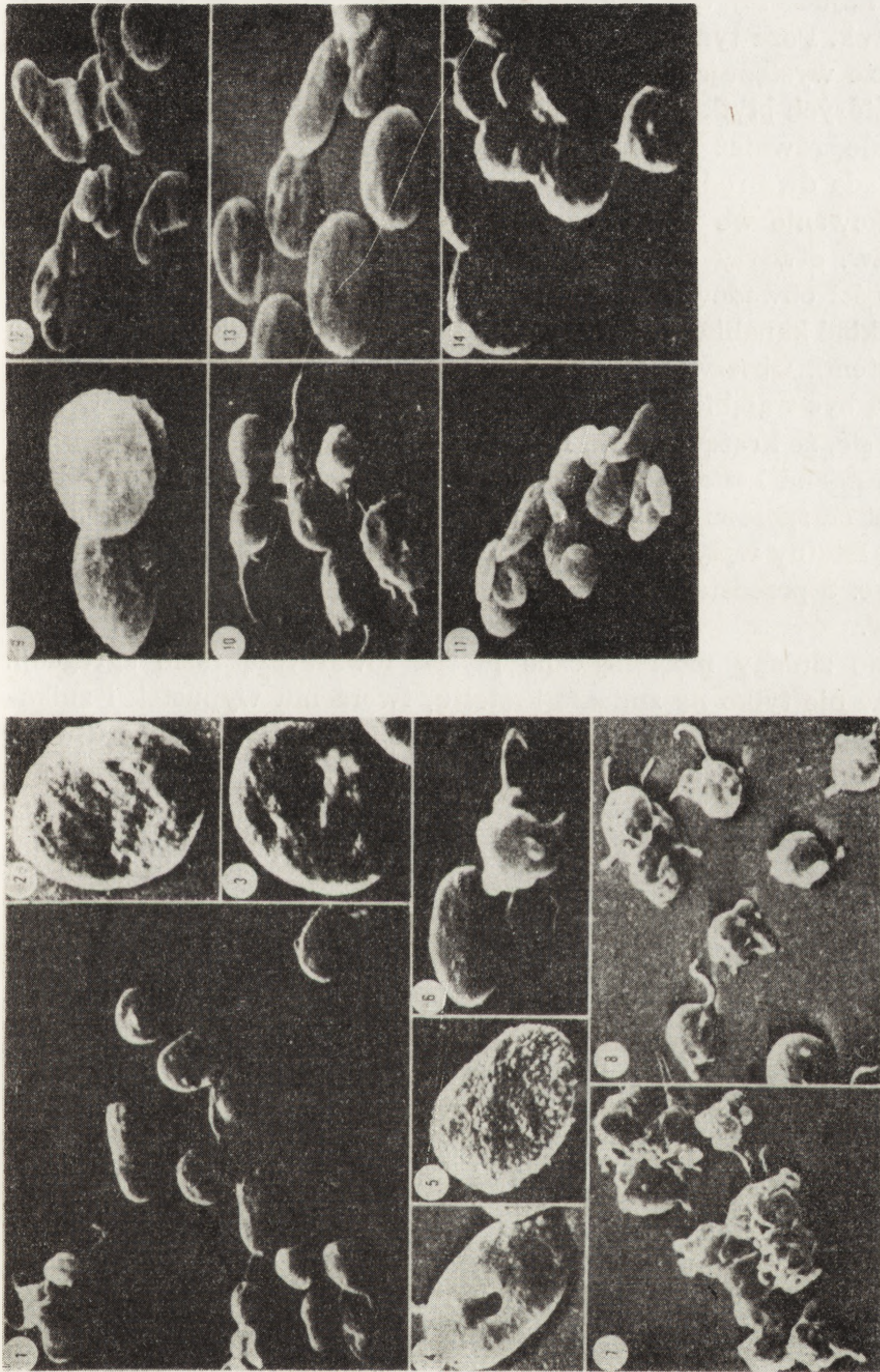


Ryc. 2. Krwinka płytkowa człowieka (a) oraz subkomórkowe frakcje bogate w  $\alpha$ -ziarnistości (b) i ziarnistości o dużej gęstości elektronowej (c).  $\times 22\ 000$  [16]

a — pojedyncze ziarnistości o dużej gęstości elektronowej ( $\rightarrow$ )  $\alpha$ -ziarnistości ( $\rightarrow$ ), mitochondria (m) i liczne ziarna glikogenu (g);  
 b — liczne  $\alpha$ -ziarnistości ( $\rightarrow$ ) zanieczyszczone ziarnami glikogenu (g) i mitochondriami (m);  
 c — ziarnistości o dużej gęstości elektronowej ( $\rightarrow$ ) znacznie zanieczyszczone  $\alpha$ -ziarnistościami ( $\rightarrow$ ) i nie zidentyfikowanymi strukturami

w morfologii tych komórek [43, 100]. Błona komórkowa jest trójwarstwowa, jak u erytrocytów, ale powierzchnia pokryta jest chropowatą, cienką warstwą substancji zawierającej mukopolisacharydy i glikoproteidy. Bezpośrednio pod błoną stwierdzono obecność delikatnych filamentów oraz wiązkę mikrotubul odpowiedzialną za utrzymanie kształtu tej komórki [14, 89]. Centralna część płytki obfituje w ziarnistości, wśród których





Ryc. 3. Obraz krwinek płytkowych ssaków w mikroskopie skanningowym [43]  
 Krwinki płytkowe psa utrwalone bezpośrednio po pobraniu krwi (1-6) i po przechowywaniu krwi przed utwaleniem w środowisku EDTA (7-8) (1 —  $\times 5\ 000$ , 2 —  $\times 13\ 100$ , 3 —  $\times 13\ 500$ , 4 —  $\times 12\ 400$ , 5 —  $\times 12\ 400$ , 6 —  $\times 12\ 000$ , 7 —  $\times 5\ 900$ , 8 —  $\times 6\ 200$ ) 9 — Krwinki płytkowe kota utrwalone w temperaturze pokojowej,  $\times 13\ 200$ , 10 — Krwinki płytkowe kota utrwalone w temperaturze  $4^{\circ}\text{C}$ ,  $\times 6\ 700$ , 11 — Krwinki płytkowe bydłace,  $\times 5\ 700$ , 12 — Krwinki płytkowe konia,  $\times 5\ 200$ , 13 — Krwinki płytkowe owcy,  $\times 10\ 400$ , 14 — Krwinki płytkowe kozy,  $\times 11\ 700$



zwracają uwagę osmofilne ziarnistości o dużej gęstości elektronowej (dense bodies), wyjątkowo liczne w płytkach królika (ryc. 1), oraz reprezentowane najliczniej tzw.  $\alpha$ -ziarnistości przypominające lizosomy innych komórek. Poza tym w płytce występuje znaczna ilość ziaren glikogenu, a także występują nieliczne, słabo rozwinięte mitochondria (ryc. 1 i 2). W niektórych płytkach udało się wykazać nie tylko obecność aparatu Golgiego, ale również obecność retikulum endoplazmatycznego [100]. Płytkę posiada dwa rodzaje kanalików. Część krętych kanalików biegnie nieuporządkowanie we wnętrzu, ma połączenie z powierzchnią komórki i tworzy tzw. otwarty układ kanalików (open canicular system), natomiast w części obwodowej komórki, pod zewnętrzną wiązką mikrotubul przebiega układ kanalików nie mających połączenia z powierzchnią (dense tubular system). Obserwowane na powierzchni płytki nierówności przypisane mogą być wgłębieniom i ujściom otwartego układu kanalików [43].

Uważa się, że krążące płytki mają kształt dysku i nie posiadają pseudopodiów. Zmiana kształtu na formę kulistą i tworzenie wypustek uzależnione jest od sposobu otrzymywania płytek, przechowywania i techniki utrwalania. Istotny wpływ na tego rodzaju zmiany ma niska temperatura [21, 43]. Ryc. 3 przedstawia obraz mikroskopowy płytek różnych gatunków ssaków.

Wyraźne zmiany morfologiczne płytek towarzyszą fazie agregacji. Polegają one nie tylko na zmianie kształtu, tworzeniu wypustek i znikaniu mikrotubul, ale również na przemieszczaniu się ziarnistości i usuwaniu ich zawartości do strefy pozakomórkowej [16, 21].

#### PLYTKOWA REAKCJA UWALNIANIA

Z fizjologicznego punktu widzenia, płytki można zaliczyć do komórek sekrecyjnych, gdyż wykazują one znaczne podobieństwo do innych tego typu komórek [53, 95]. Płytki włączają [7] i gromadzą znaczne ilości serotoniny, która magazynowana jest w płytkach, w ziarnistościach o dużej gęstości elektronowej [15, 85]. Pod wpływem specyficznych stymulatorów wywołujących agregację płytek, komórki te selektywnie wyrzucają do strefy pozakomórkowej szereg związków [30, 31, 53, 60, 71]. Po zakończonym procesie sekrecji nadal spełniają swe podstawowe funkcje i są zdolne do aktywnego włączania i magazynowania serotoniny czy jonów potasowych [107].

Płytkową reakcję uwalniania można porównać z sekrecją zachodzącą w dojrzałych, wielojądrzastych leukocytach, chromochłonnych komórkach rdzenia nadnerczy i komórkach tucznych [53]. W tych znacznie różniących się komórkach, proces sekrecyjny — wywołany określonym rodzajem impulsu — polega na selektywnym uwalnianiu związków zmagazynowa-



nych w tych komórkach. Istotna różnica dotyczy jedynie bodźca, jaki działa wybiórczo na komórkę i inicjuje proces sekrecji. Wybiórcze działanie zależy od obecności swoistych receptorów na powierzchni komórek. Mechanizm wewnątrzkomórkowej transmisji powstałego impulsu, w zasadzie podobny we wszystkich komórkach sekrecyjnych, uzależniony jest od obecności jonów wapnia, cyklicznych nukleotydów i kurczliwego białka [53].

Proces sekrecji krwinek płytkowych, poprzedzony zazwyczaj ich agregacją, został w 1962 r. nazwany przez Grette [30] płytkową reakcją uwalniania (platelet release reaction) i odpowiada w pewnym stopniu wcześniej opisywanej tzw. lepkiej przemianie płytek (viscous metamorphosis).

Badając wpływ trombiny i trypsyny na płytki, Grette [30] wykazał, że płytki uwalniają gwałtownie do otaczającego środowiska serotoninę oraz nukleotydy adeninowe. Autor ten przypuszczał, że wyrzucane związki pochodzą z cytoplazmy i mogą selektywnie, podczas skurczu komórki odbywającego się przy udziale wapnia, przechodzić przez błonę płytki. Późniejsze badania wykazały, że pozakomórkowe jony wapnia nie zawsze muszą być obecne przy zapoczątkowaniu sekrecji, a uwolniony materiał nie pochodzi z cytoplazmy, lecz z licznych, charakterystycznych dla płytki ziarnistości [17, 21, 38, 53, 68]. Niewielka ilość substancji występująca poza ziarnistościami przemieszcza się do strefy pozakomórkowej i przypuszczalnie w ten sposób wydostaje się z komórki czynnik płytkowy 3 [17].

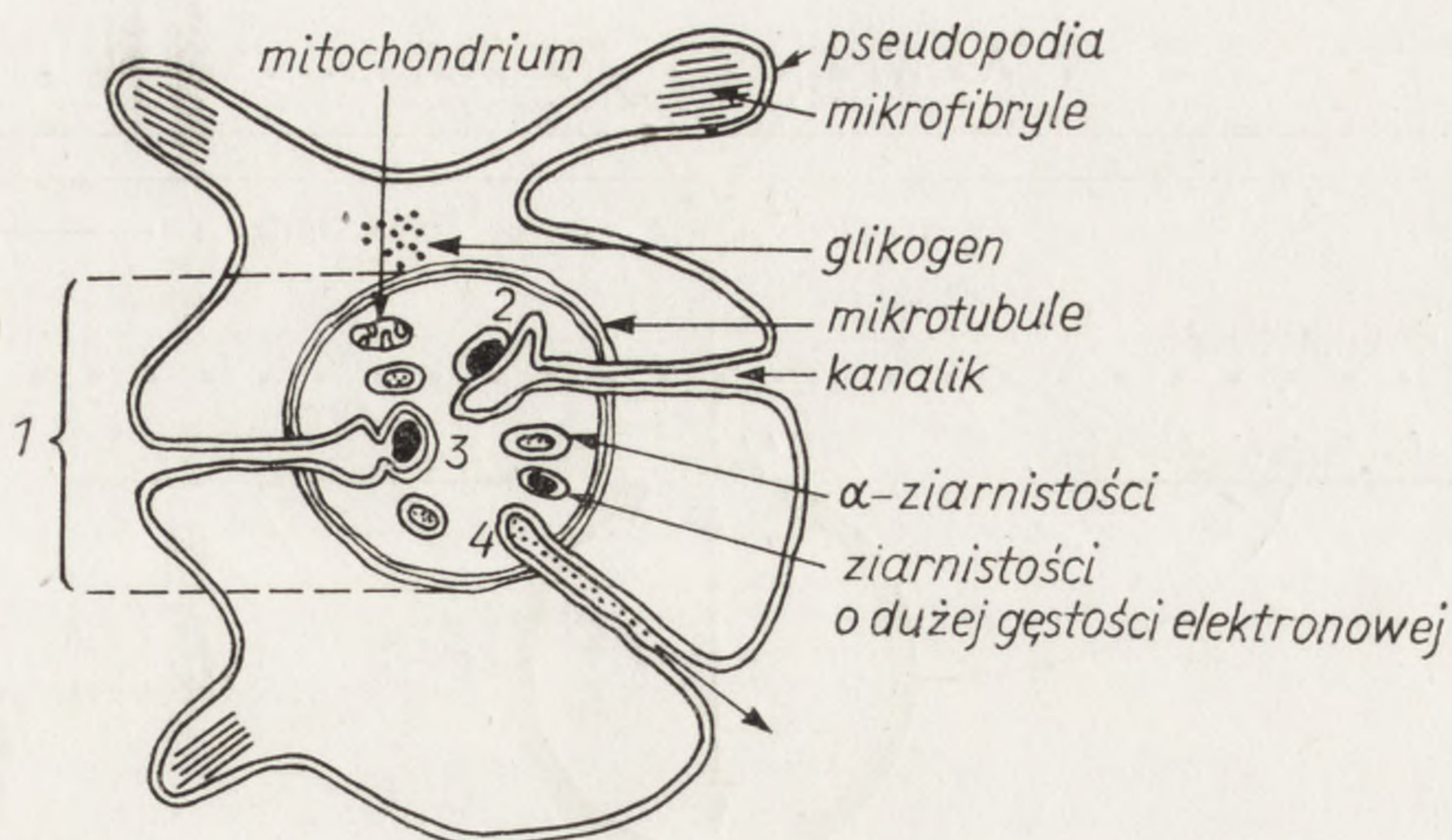
Reakcja uwalniania może być wyzwolona prawdopodobnie przez pobudzenie kurczliwego białka płytki — trombosteniny. Blokowanie interakcji aktyny z miozyną ma miejsce tylko w nieobecności jonów wapnia, zniesienie zaś blokowania może nastąpić po podniesieniu stężenia tych jonów [19].

Proces sekrecyjny regulowany jest przypuszczalnie przez określony poziom wolnego wapnia w płytce [53]. W błonie płytkowej znajduje się białko, które może występować w formie ufosforylowanej (przy udziale fosfokinazy proteinowej stymulowanej cAMP) i zdolnej do odłączania wapnia oraz w formie nieufosforylowanej (zależnej od fosfatazy fosfoproteinowej), wiążącej wapń [53]. W stanie równowagi, przy ufosforylowaniu białka, pewien niedobór wapnia zapobiega aktywacji procesu sekrecyjnego. Kiedy równowaga jest zaburzona i zachodzi defosforylacja białka błony, poziom wewnątrzkomórkowego wapnia wzrasta, zapoczątkowując płytkową reakcję uwalniania. Defosforylacja spowodowana może być pośrednio przez działanie ADP, kolagenu lub trombiny i aktywację fosfatazy fosforproteinowej czy redukcję poziomu cAMP [53, 94]. Udział wolnego wapnia w procesie sekrecyjnym płytek przedstawia ryc. 4.









Ryc. 5. Schemat ultrastruktury hipotetycznej krwinki płytkowej, z uwzględnieniem zmian zachodzących podczas procesu sekrecyjnego [53]

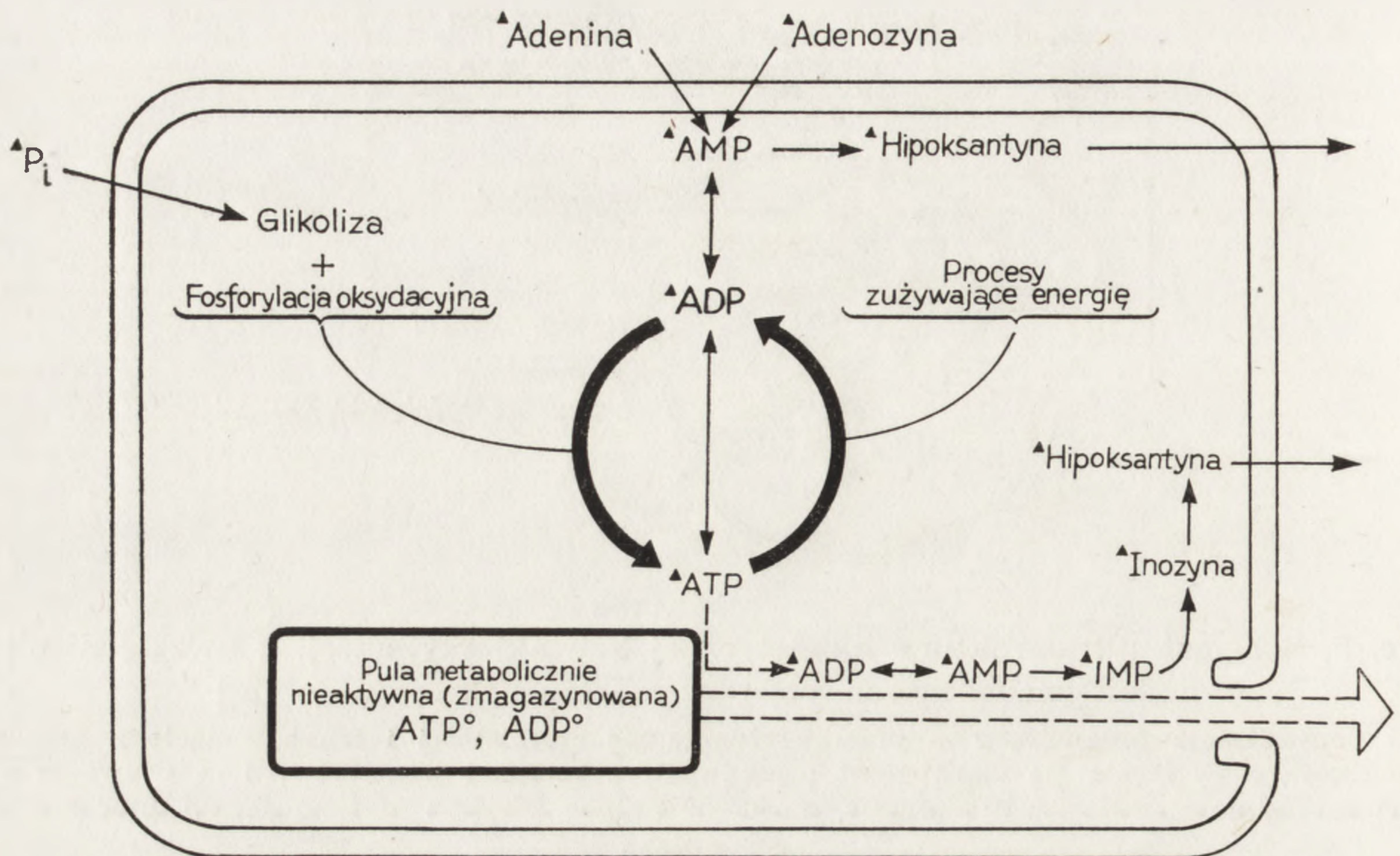
1 — centralizacja organelli, 2 — przemieszczanie się ziarnistości i ich zetknięcie z błonami kanalików, 3 — zlanie się ziarnistości płytkowych z błonami kanalików, 4 — usuwanie zawartości z ziarnistości do kanalików, skąd uwolnione związki dyfundują do otaczającego środowiska

Wcześniejsze stadia zachodzą w megakariocytach [53]. Płytki są więc wyjątkowo korzystnym modelem służącym do badania ostatniej fazy procesu sekrecyjnego.

#### PŁYTKOWE NUKLEOTYDY ADENINOWE

Płytkowa reakcja uwalniania uzależniona jest od przemiany energetycznej tych komórek, a energia dostarczana jest na drodze glikolizy i fosforylacji oksydacyjnej, co zostało wykazane po zastosowaniu inhibitorów metabolicznych blokujących glikolizę czy też fosforylację oksydacyjną [67]. Płytki charakteryzują się niezwykle wysoką zawartością nukleotydów adeninowych [61]. Uwalniane z płytek nukleotydy adeninowe należą do tzw. puli zmagazynowanej, metabolicznie nieaktywnej, zlokalizowanej w ziarnistościach [37, 41]. W 1965 r. Holmsen [37] wykazał, że istnieją przynajmniej dwie pule nukleotydów adeninowych biorących udział w procesie sekrecyjnym: poza pulą uwalnianą, która stanowi około 60% całkowitej ilości obecnych w płytce nukleotydów adeninowych, pozostaje w płytce pula cytoplazmatyczna, tzw. aktywna metabolicznie, dostarczająca energii do procesu uwalniania i zmieniająca się podczas tej reakcji. Część nukleotydów, głównie metaboliczny ATP, przekształca się nieodwracalnie podczas procesu sekrecyjnego w hipoksantynę, natomiast nieznaczna ilość nukleotydów adeninowych zwią-





Ryc. 6. Rozmieszczenie nukleotydów adeninowych i ich udział w procesach metabolicznych zachodzących w płytce w obecności induktorów uwalniania [39]

Po inkubacji płytek ze znakowaną adeniną, adenozyzną czy ortofosforanem radioaktywne prekursorzy ( $\blacktriangle P_i$ ,  $\blacktriangle$ adenina,  $\blacktriangle$ adenozyzna) obecne są w metabolicznej puli nukleotydów adeninowych (trójkąty). W nieobecności induktorów uwalniania, w komórce istnieje równowaga procesów dostarczających i zużywających energię, przy czym niewielka ilość znakowanych nukleotydów przekształca się w hipoksantynę. Zaznaczono to w górnej części schematu.

W płytce człowieka, dwie trzecie całkowitej ilości nukleotydów adeninowych płytki nie uczestniczy w procesach metabolicznych. Ta część nukleotydów (kółka) stanowi pulę nieczynną metabolicznie, zmagazynowaną w ziarnistościach. Pod wpływem trombiny lub kolagenu, nukleotydy tej puli wydostają się kanalikami poza komórkę (linia przerywana). Równocześnie z sekrecją nukleotydów część metabolicznego ATP ulega nieodwracalnemu przekształceniu w hipoksantynę i przedostaje się również do otaczającego środowiska.

zdana jest z aktomiozyną i uczestniczy przypuszczalnie w skurczu komórki, jaki ma miejsce podczas sekrecji przy wyrzucaniu uwalnianego materiału [25]. Ostatnio doniesiono [76], że w płytkach ludzkich, ATP z puli metabolicznej może przechodzić do ziarnistości i tam ulegać hydrolizie do ADP.

Rozmieszczenie nukleotydów adeninowych w płytce (według Holmsena i wsp. [39]) przedstawiono schematycznie na ryc. 6. Z pozostałych w komórce nukleotydów, dzięki ciągłej resyntezie ATP, jest wytwarzana i dostarczana energia potrzebna do retrakcji (obkurczania) skrzepu.

Interakcja płytek z czynnikami agregującymi powoduje gwałtowny i znaczny wzrost glikolizy i oddychania [67, 69]. Wzrost ten rozpoczyna się podczas reakcji uwalniania lub natychmiast po jej zakończeniu i trwa jeszcze długo po ustaniu procesu sekrecyjnego [69].



## INDUKTORY UWALNIANIA

Istnieje wiele różnorodnych, znacznie różniących się budową i wielkością, związków uważanych za induktory uwalniania. Ująć je można w trzy zasadnicze grupy: a) związki o niskiej masie cząsteczkowej (ADP, adrenalina 5-HT), b) enzymy proteolityczne (trombina, trypsyna, jady węzów) oraz c) specyficzne cząsteczki (kolagen, lateks, endotoksyny bakteryjne, wirusy, kompleks antygen-przeciwciało, kwasy tłuszczowe, cykliczne nadtlenki prostaglandyn i Tx A<sub>2</sub>). Poza trombiną, badaną przez Grette [30], do silnych induktorów zalicza się przede wszystkim włókna kolagenu [40], lateks [28], ADP [8], serotoninę, adrenalinę oraz szereg związków czynnych farmakologicznie [17]. Nie ustalono jednak, czy ADP i adrenalina działają bezpośrednio jako induktory uwalniania, czy też jako czynniki agregujące zapoczątkowują proces agregacji zakończony uwalnianiem [17]. Najsilniejszym induktorem agregacji jest Tx A<sub>2</sub> i związek ten wydaje się być mediatorem procesu agregacji i uwalniania [34, 35].

Pomimo dużego i ciągle rosnącego materiału doświadczalnego oraz całego szeregu rozważań teoretycznych, nie udało się jeszcze ostatecznie uzgodnić poglądu na mechanizmy odpowiedzialne za te procesy. Można jednak przypuszczać, że istotną rolę odgrywa Tx A<sub>2</sub>.

Mechanizm działania induktorów uwalniania na płytki, podobnie jak i mechanizm agregacji płytek, pozostaje w sferze hipotez [9]. Intensywne badania, dotyczące zarówno sposobu, jak i miejsca działania induktora, koncentrują się przede wszystkim nad budową i funkcją błony płytkowej, która odgrywa w tym procesie decydującą rolę [2, 45, 72, 74, 84, 94]. Nie ustalono jednak, jaki związek na powierzchni płytek uczestniczy bezpośrednio lub współdziała w interakcji z induktorem uwalniania. Błonie komórkowej nie można przypisać określonej stałej budowy, ale wiele zmieniających się form i od różnego ułożenia białek i lipidów zależą możliwości funkcjonalne błony. Pewne znaczenie w zapoczątkowaniu agregacji płytek zakończonej reakcją uwalniania mogą mieć takie składniki błon płytki, jak glikoproteidy [72], trombostenina, fibrynogen płytkowy czy inne białka [17, 45]. Na agregację płytek połączoną z sekrecją ma wpływ ilość znajdujących się mostków dwusiarczkowych [52] oraz stopień ufosforylowania białek błony [94]. Współdziałać z induktorem mogą również fosfolipidy błon płytkowych [84] czy receptory o nieznanym budowie [9]. Trombina, proteolityczny enzym niezbędny w wykrzepianiu włóknika, działa na białka powierzchniowe płytki w inny sposób aniżeli na fibrynogen osoczowy [4, 56, 63, 74, 75]. Istnieje przypuszczalnie specyficzne białko płytkowe wrażliwe na działanie trombiny [32]. Lawler i wsp. [49] przypuszczają, opierając się na wynikach uzyskanych



na drodze elektroforezy w żelu poliakrylamidowym, że białko opisane przez Hagen [32] stanowi jedną z trzech podjednostek cząsteczki białka o masie 450 000 daltonów.

Trombina jest jedynym fizjologicznym czynnikiem, który może indukować reakcję uwalniania bez równoczesnej agregacji płytek. Do wywołania pełnej sekrecji płytek potrzebne jest zdecydowanie niższe stężenie trombiny i krótszy jej czas działania aniżeli do koagulacji osocza [56, 63]. Należy podkreślić, że płytki są zdolne do katalizowania wielu reakcji prowadzących do wytworzenia trombiny [99]. Trombina przypuszczalnie łączy się z określonymi miejscami receptorowymi na powierzchni płytki i jej działanie przypomina bardziej działanie hormonu aniżeli enzymu [56].

Do procesu sekrecyjnego płytek prowadzą kolejne etapy [38]. Etap zapoczątkowujący (inicjacja), poprzedzony zadziałaniem określonego bodźca, powodować może proces przekazywania, czyli transmisji powstałego impulsu do wnętrza komórki i ostateczna odpowiedź — reakcja komórki na ten impuls, to m. in. zjawisko sekrecji. Etap inicjacji odpowiada w pewnym stopniu rozróżnianej przez Jamiesona [44] fazie rozpoznania, poprzedzającej tzw. fazę cybernetyczną, w której informacja dotycząca rozpoznania jest przetransformowana do wnętrza komórki i wywołać może odpowiedź komórki — uwalnianie. Wewnątrzkomórkowymi przekaznikami są przypuszczalnie jony wapnia czy też cAMP.

Ponieważ zjawisku sekrecji towarzyszą zmiany morfologiczne komórki (ryc. 5), wydaje się bardzo prawdopodobne, że uczestniczy w tym procesie płytkowa aktomiozyna, a zjawiska agregacji i uwalniania można uważać za poszczególne etapy nasilającego się skurczu komórki [17]. Procesy transmisji i sekrecji są procesami zużywającymi energię.

Do zahamowania reakcji uwalniania dochodzi w wyniku antagonicznego działania wielu inhibitorów na induktory agregacji i uwalniania. Heparyna i hirudyna znosi działanie trombiny, dwuhydroergotamina jest antagonistą adrenaliny, podczas gdy imipramina znosi działanie serotoniny. Inhibitory metaboliczne hamują dopływ energii niezbędnej do prawidłowego przebiegu procesu transmisji i sekrecji. Do podstawowych inhibitorów reakcji uwalniania zalicza się inhibitory agregacji, czynniki przeciwzapalne, takie jak np. aspiryna czy indometacyna, oraz związki stabilizujące błony płytkowe, np. amitryptalina [17].

#### PROSTAGLANDYNY PŁYTEK

W indukowaniu agregacji płytek pośredniczy cyklaza adenylowa, katalizująca wytwarzanie cAMP. Ilość powstającego w płytkach cAMP uzależniona jest z jednej strony od związków aktywujących cyklazę ade-



nylową, z drugiej zaś od inhibitorów fosfodwuesterazy [62]. Określony poziom cAMP w płytce może więc kontrolować i regulować rozmiar i przebieg agregacji tych komórek [55, 57–59, 62, 83]. Czynniki, które podnoszą poziom cAMP w płytkach, hamują reakcję uwalniania [55, 58, 59]. Prostaglandyna  $E_1$  przez stymulowanie cykazy adenyłowej podnosi poziom cAMP i w obecności  $PGE_1$  nie dochodzi do płytkowej reakcji uwalniania indukowanej trombiną, ADP i adrenaliną. Słabiej zaznacza się hamujące działanie  $PGE_1$  na sekrecję indukowaną kolagenem [57, 62].  $PGE_1$  nie ma wpływu na poziom cGMP w płytkach [59].

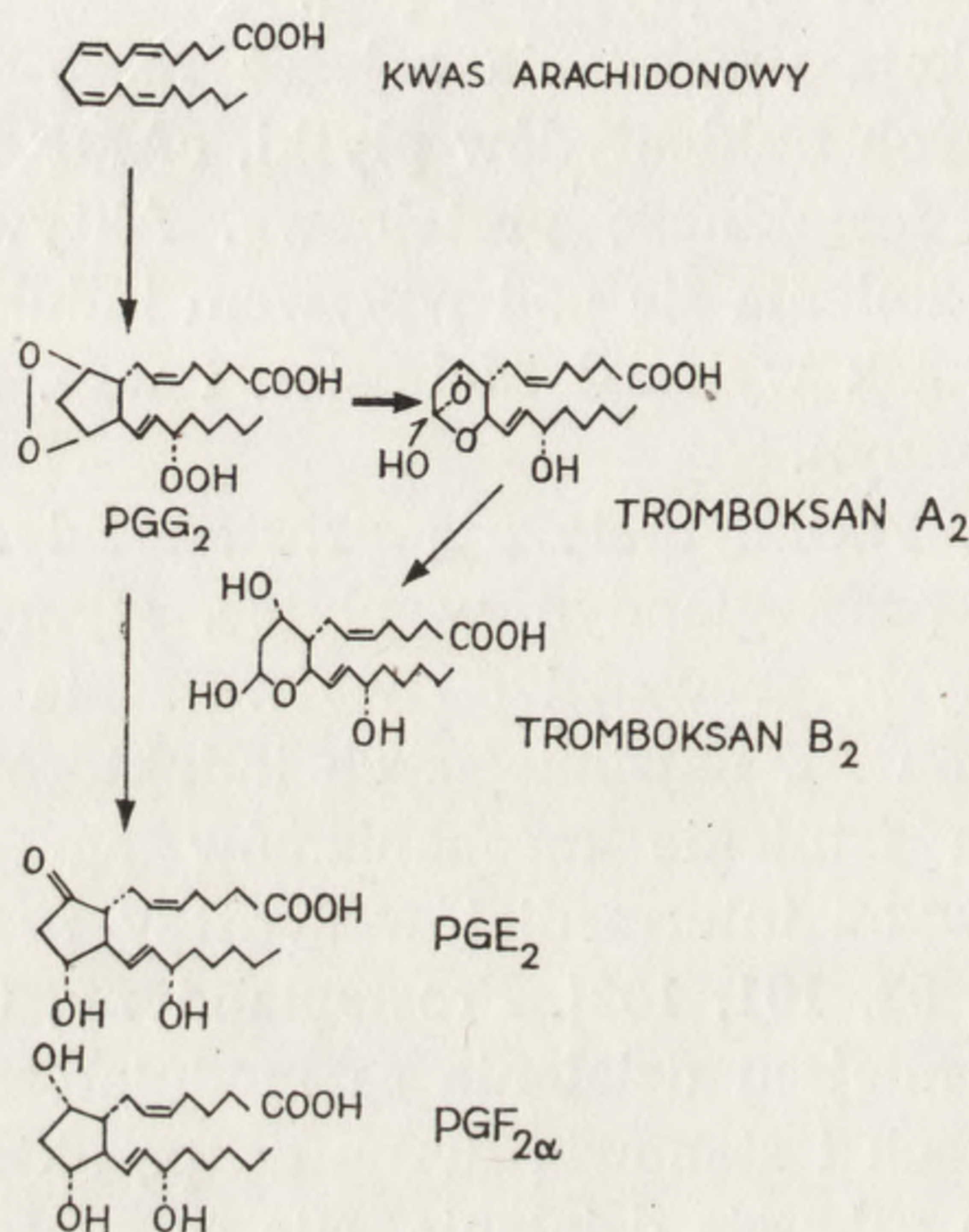
Agregacja i reakcja uwalniania zależą może od antagonistycznie działających cyklicznych nukleotydów płytki, cAMP i cGMP [29]. cAMP stymuluje płytkową fosfokinazę proteinową. Aktywność tego enzymu w płytkach ludzkich zmienia się pod wpływem induktorów i inhibitorów agregacji [6]. cAMP, jak wykazał Malmsten i wsp. [5], hamuje syntezę nadtlenków prostaglandyn.

Wykazanie, że płytki syntetyzują prostaglandyny ( $PGE_2$  i  $PGF_{2a}$ ) i proces biosyntezy prostaglandyn w płytce, stymulowany działaniem czynników agregujących, prowadzi do wytworzenia nadtlenków prostaglandyn i tromboksanu  $A_2$ , najsilniejszych induktorów agregacji i uwalniania, wskazuje na istnienie mechanizmów agregacji zależnych od endogennych płytkowych intermediatów syntezy prostaglandyn [20, 26, 34–36, 54, 70, 88, 90, 92, 101, 102]. Prostaglandyny, tzw. miejscowe hormony, uwalniane w miejscu działania są modulatorami cykazy adenyłowej w wielu tkankach i stanowią liczną grupę aktywnych biologicznie związków o szerokim zakresie działania. Nie są syntetyzowane w sposób ciągły i ich biosynteza, podobnie jak i synteza cAMP, zachodzi w błonie komórkowej. W odpowiedzi na określony rodzaj bodźca dochodzi do aktywacji fosfolipazy A i uwalniania nienasyconych kwasów tłuszczowych z fosfolipidów błony komórkowej. Nienasycone kwasy tłuszczowe z kolei, w obecności enzymów mikrosomalnych, tlenu cząsteczkowego i glutationu, przekształcane są do prostaglandyn [36, 93]. Kwas arachidonowy jest prekursorem prostaglandyn  $E_2$   $F_{2a}$ , a z kwasu linolenowego powstaje  $PGE_1$  i  $PGF_{1a}$ .

Prostaglandyny egzogenne, szczególnie z grupy E, wywierają różnorodny wpływ na funkcję płytek [47].  $PGE_1$  jest bardzo silnym inhibitorem agregacji [57, 62].  $PGE_2$  wykazuje zdecydowanie odmienne działanie [12, 47]. W niskich stężeniach ( $5 \times 10^{-8}$ – $10^{-6}$ M) stymuluje agregację ludzkich płytek [47].  $PGE_1$  oraz w znacznie mniejszym stopniu  $PGE_2$  aktywują cyklazę adenyłową. Stymulujące działanie  $PGE_1$  jest hamowane jonami wapnia [78]. Przeciwnie działające na płytki  $PGE_1$  i  $PGE_2$  trudne jest do wyjaśnienia.  $PGE_2$  różni się od  $PGE_1$  obecnością dodatkowego wiązania podwójnego między 5 a 6 atomem węgla.



Prostaglandyny typu A, B czy F są zdecydowanie mniej czynne w modyfikowaniu płytkowej agregacji i syntezy cAMP [91]. PGE<sub>1</sub> powoduje wzrost cAMP, ale nie ma wpływu na poziom cGMP [59]. PGE<sub>2</sub> w zależności od stężenia podnosi lub obniża poziom cAMP w płytkach. Przy wzroście cAMP zaobserwowano obniżoną produkcję tromboksanu B<sub>2</sub> (PHD; kwas 8 [1 - hydroksy - 3 oksypropyl] - 9, 12L - dwuhydroksy - 5, 10 heptadekadienowy), co Malmsten i wsp. [55] tłumaczą zdolnością cAMP do hamowania syntezy nadtlenków prostaglandyn.



Ryc. 7. Schemat przemiany kwasu arachidonowego w płytce ilustrujący powstawanie tromboksanów i prostaglandyn [93]

Krwinki płytkowe są zdolne do syntezy prostaglandyn z endogennych kwasów tłuszczowych. Zastosowanie techniki radioimmunologicznej pozwoliło wykazać, że prostaglandyny PGE<sub>2</sub> i PGF<sub>2α</sub> tworzą się podczas nieodwracalnej agregacji indukowanej różnymi czynnikami [90]. Leki hamujące agregację płytek (aspiryna, indometacyna) hamują również syntezę prostaglandyn [86, 88]. Kwas arachidonowy (kwas 5, 8, 11, 14 - ejkzotetraenowy), prekursor PGE<sub>2</sub> i PGF<sub>2α</sub>, może wywołać agregację i sekrecję płytek [5, 46]. Działanie tego kwasu uzależnione jest od nietrwałych metabolitów powstających w obecności aktywnych cyklicznych oksigenaz płytkowych [5, 46]. Jak wykazano, PGE<sub>2</sub> i PGF<sub>2α</sub>, jak również takie związki utworzone z kwasu arachidonowego, jak Tx B<sub>2</sub>, HHT, HETE czy dwualdehyd malonowy, nie mają własności agregujących [20, 93]. Uwaga badaczy skierowana została na formy przejściowe, tworzące się podczas syntezy prostaglandyn płytkowych [33, 34, 55, 101, 102]. Hamburg i wsp. [35, 54] wykazali, że w odpowiedzi na działanie trombiny,



z kwasu arachidonowego powstają przynajmniej dwie grupy labilnych związków. Są to cykliczne nadtlutki prostaglandyn oraz ich pochodne — tromboksan (ryc. 7). Cykliczne nadtlutki prostaglandyn posiadają wewnętrzny mostek tlenowy pomiędzy 9 a 11 atomem węgla. Atomy tlenu pochodzą z jednej cząsteczki tlenu. Nadtlutki prostaglandyn [34], a przede wszystkim tromboksan  $A_2$ , uważać można za czynniki chemiczne odpowiedzialne za indukowanie agregacji i uwalniania [34, 54]. Najpotężniejszym induktorem agregacji i uwalniania jest  $Tx A_2$  — produkt przejściowy przy tworzeniu się trwałego  $Tx B_2$ . Aktywność tromboksanu  $A_2$  przypisywano poprzednio hipotetycznej substancji LASS (labile aggregation - stimulating substance) [101, 102, 103].

Kiedy dochodzi do agregacji płytek, stymulowane fosfolipazy płytkowe uwalniają z fosfolipidów zestryfikowany kwas arachidonowy. Przy udziale wyjątkowo aktywnych cyklicznych oksigenaz kwasu tłuszczowego, związanych z frakcją mikrosomalną [36, 93], kwas arachidonowy zostaje przekształcony w cykliczne nadtlutki prostaglandyn,  $PGG_2$  i  $PGH_2$ , o okresie półtrwania około 5 min. [35, 101, 102].  $PGG_2$  oraz  $PGH_2$  (powstająca w znacznie mniejszej ilości) jest stymulatorem płytkowej agregacji. Ulega jednak przekształceniu w znacznie aktywniejszy czynnik  $Tx A_2$ , bardzo nietrwały w środowisku wodnym [70]. Jego krótki okres półtrwania ( $t_{1/2}$  — 32 sek. w temperaturze  $37^\circ C$ ) wzrasta w obecności osocza [92]. Nietrwały  $Tx A_2$  przechodzi w nieczynny, półacetalowy związek  $Tx B_2$  [35].

Nadtłutki prostaglandyn mogą być również przekształcane w 17 - węglowy związek — HHT, z uwolnieniem trójwęglowego fragmentu-dwu-aldehydu malonowego. HHT jest nieaktywny. Powstający aldehyd jest wygodnym markerem tego rozpadu  $PGG_2$  [93].

Trzecią przemianą cyklicznych nadtlutków prostaglandyn jest tworzenie trwałej, klasycznej prostaglandyny  $E_2$  i  $F_{2a}$  [93]. W odpowiedzi na działanie trombiny, zdecydowanie więcej powstaje  $PGG_2$  aniżeli  $PGE_2$  i  $PGF_{2a}$  [33, 34].

Kwas arachidonowy płytek może być metabolizowany nie tylko przy udziale cyklicznych oksigenaz. W obecności aktywnych lipooksygenaz ulega przekształceniu i tworzy HETE, związek nie biorący udziału w inicjowaniu agregacji. Ilość HETE wzrasta w obecności aspiryny [54].

W osoczu bogatopłytkowym kwas arachidonowy nie ulega utlenieniu i cyklizacji. Jest włączony do fosfolipidów płytkowych (fosfatydylocholina, fosfatydyloinozytol), które z kolei dostarczają ten związek do biosyntezy prostaglandyn [5]. Kwas ejkozotetraynowy blokuje uwalnianie kwasu arachidonowego z fosfolipidów i w jego obecności dochodzi do inaktywacji przemian katalizowanych lipooksygenazami i cyklicznymi oksigenazami [5].



Do blokowania syntezy nadtlenków prostaglandyn i Tx A<sub>2</sub> dochodzi w obecności takich leków przeciwzapalnych, jak aspiryna czy indometacyna [5, 33, 54, 86, 93]. Poprzez acetylację aspiryna inaktywuje cykliczne oksygenazy płytkowe i w ten sposób hamuje konwersję kwasu arachidonowego w PGG<sub>2</sub>, PGH<sub>2</sub> i Tx A<sub>2</sub>. Indometacyna ma podobne, lecz przejściowe i krótko trwające działanie [5, 33]. Wymienione leki ograniczają również produkcję takich metabolitów, jak HHT i Tx B<sub>2</sub>, lecz powodują wzrost syntezy HETE. Aspiryna nie hamuje agregacji wywołanej nadtlenkami prostaglandyn [33].

#### ZWIĄZKI UWALNIANE Z PŁYTEK I MIEJSCE ICH MAGAZYNOWANIA

Nie wszystkie związki są uwalniane z płytek w tym samym czasie. Zależy to od ich subkomórkowej lokalizacji, a także od rodzaju i stężenia stosowanego induktora uwalniania. Ze względu na różną szybkość wyrzucania poszczególnych związków z płytek, uzależnioną przypuszczalnie od miejsca magazynowania, Day i Holmsen [17] rozgraniczyli uwalnianie prawie natychmiastowe (uwalnianie I) od uwalniania powolniejszego (uwalnianie II). Pierwsze odpowiada gwałtownemu wyrzuceniu z płytki serotoniny, nukleotydów adeninowych i jonów wapnia. Związki te zlokalizowane są w ziarnistościach o dużej gęstości elektronowej i wyrzucane są już po upływie 20 sek. od momentu dodania trombiny. Uwalnianie II zachodzi dopiero po upływie 60 sek. od zadziałania czynnika uwalniającego i dotyczy wydzielania enzymów lizosomalnych znajdujących się w  $\alpha$ -ziarnistościach. Wysokie dawki trombiny lub kolagenu powodują zarówno uwalnianie I, jak i II, natomiast ADP i adrenalina wyzwalają jedynie taką samą ilość nukleotydów adeninowych i serotoniny jak pod wpływem trombiny: nie powodują jednak uwalniania II.

Aspiryna znosi uwalnianie I indukowane ADP, adrenaliną i małymi dawkami kolagenu. Nie ma wpływu na uwalnianie II i na I wywołane dużymi dawkami kolagenu i trombiny [53]. Kolagen i trombina uwalniają serotoninę i ADP nawet wtedy, kiedy biosynteza prostaglandyn jest zahamowana [42, 53, 63]. Nadtlenki prostaglandyn powodują uwalnianie ADP i serotoniny, ale nie opróżniają  $\alpha$ -ziarnistości. MacIntyre [53] sugeruje, że istnieją przynajmniej dwa mechanizmy związane z uwalnianiem serotoniny i ADP oraz zupełnie oddzielny mechanizm opróżniania  $\alpha$ -ziarnistości. Ponieważ do wszystkich procesów konieczna jest obecność jonów wapnia, poszczególne mechanizmy wykorzystują przypuszczalnie różne pule wewnątrzkomórkowego wapnia [53].

Uwalnianie I hamowane jest przez niesterydowe leki przeciwzapalne. W warunkach *in vitro*, po preinkubacji z aspiryną ( $10^{-8}$ – $10^{-5}$ M), płytki nie są zdolne do reakcji uwalniania. *In vivo*, ten sam efekt wywołuje przyjęcie 150 mg aspiryny. Po zażyciu aspiryny stan oporności



płytek na działanie czynników agregujących trwać może wiele dni. Działanie indometacyny i większości przeciwzapalnych związków trwa znacznie krócej, zazwyczaj kilka godzin [53, 86, 88, 101, 102].

Kolagen wywołuje uwalnianie I i II, ale typ I i III kolagenu wykazuje zdecydowanie silniejszą reakcję uwalniania aniżeli typ II i IV [42]. Zahamowanie agregacji indukowanej kolagenem powoduje także zahamowanie procesu sekrecyjnego [42].

Do związków uwalnianych wybiórczo z płytki, poza serotoniną, nukleotydami adeninowymi (ATP, ADP), aminokwasami, jonami potasu i wapnia, należą enzymy lizosomalne (katepsyny,  $\beta$ -glikuronidaza) [17], glikozoaminoglikany (kwas hialuronowy i siarczan chondroityny) [31] oraz wiele białek płytkowych, wśród których poza fibrynogenem [10] i albuminą [30] zidentyfikowano specyficzne białko płytkowe należące do globulin. Białko to, o masie cząsteczkowej 37 000 daltonów, nazwano  $\beta$ -tromboglobuliną [64, 66]. Równocześnie z nukleotydami adeninowymi i serotoniną uwalniany jest płytkowy czynnik krzepnięcia 4 ( $PF_4$ ), wykazujący aktywność neutralizującą heparynę [71]. Miejscem jego magazynowania nie są wyłącznie ziarnistości o dużej gęstości elektroneowej, jak sądził Day i wsp. [18] czy Walsh i Gagnatelli [98], ale przypuszczalnie  $\alpha$ -ziarnistości magazynujące związki o dużej masie cząsteczkowej, takie jak albumina, fibrynogen i  $\beta$ -tromboglobulina [16].  $PF_4$  jest białkiem o masie cząsteczkowej 27 000 daltonów, bogatym w leucynę [65] i występuje w postaci kompleksu z nośnikiem o charakterze glikozoaminoglikanu [3].  $PF_4$  z płytek ludzkich, jak wykazano przy zastosowaniu metod immunologicznych, jest identyczny z  $PF_4$  płytek małpy *Macaca Mulatta* i ma okres półtrwania około 21 dni [27].

Z płytek pod wpływem kolagenu wydostaje się elastaza działająca na ścianę naczynia [77]. Elastaza i proelastaza płytkowa występuje w  $\alpha$ -ziarnistościach. Z błoną ziarnistości związana jest znaczna aktywność tego enzymu. Elastaza płytkowa jest pojedynczym łańcuchem polipeptydowym o masie cząsteczkowej około 26 000 daltonów [50].

Badanie materiału uwolnionego z płytek *Macaca Nemestrina* (indukowanych trombiną) [79], jak również z płytek ludzkich indukowanych ADP i adrenaliną [13, 80, 82], wykazało obecność czynnika aktywującego proliferację komórek mięśni gładkich i fibroblastów. Subkomórkowa lokalizacja tego czynnika nie jest całkowicie poznana. Można przypuszczać, że pochodzi z  $\alpha$ -ziarnistości, chociaż nie wyklucza się ziarnistości o dużej gęstości elektroneowej jako miejsca jego magazynowania [13, 80]. Płytkowy czynnik wzrostowy (cell growth promoting factor, multiplication stimulating activity) został scharakteryzowany jako zasadowe białko, termostabilne, wykazujące duże podobieństwo do czynnika wzrostowego wyizolowanego z przysadki mózgowej [80]. Ross i wsp. [80] przy-



puszczają, że czynnik wzrostowy pochodzi z przysadki, a płytki są miejscem jego magazynowania. Autorzy ci nie wykluczają jednak możliwości syntezy tego czynnika w megakariocytach.

#### ZNACZENIE PŁYTKOWEJ REAKCJI UWALNIANIA

Płytkowa reakcja uwalniania odgrywa ważną rolę w przebiegu procesu hemostazy i tworzenia zakrzepów. Uwolnione z płytek związki biorą udział w procesach powodujących powstawanie w tętnicach zmian miażdżycowych, stanów zapalnych, a także odpowiedzialne są za gojenie się ran i odrzucanie przeszczepów.

Agregację potęgują, zwiększając rozmiar tworzonych agregatów, uwolniony ADP i serotonina. Poprzez inaktywowanie heparyny, czynnik płytkowy 4 wzmacnia także agregację. Wyrzucony z płytek fibrynogen może stać się dodatkowym substratem dla trombiny [53]. Inhibitorem agregacji jest adenozyna, powstająca z uwalnianych nukleotydów adeninowych [17].

Troficzne działanie płytek na ścianę naczynia, wzbudzające ostatnio zainteresowanie wielu badaczy, uzależnione jest od biologicznie aktywnych związków wydostających się z płytek do krwiobiegu podczas procesu sekrecyjnego. Sposób działania tych związków jest przedmiotem badań w różnych ośrodkach [13, 22, 23, 29, 50, 53, 54, 79, 80–82, 87, 96, 104].

Na ścianę naczynia działa bezpośrednio uwalniana z ziarnistości płytek serotonina i histamina, której wyjątkowo duża ilość akumulowana jest w płytkach królika, jak również histamina pochodząca z komórek tucznych i wydzielana z nich pod wpływem specyficznego białka płytkowego [29]. Z  $\alpha$ -ziarnistości wydostaje się czynnik białkowy wywołujący chemotaksję wielojądrzastych leukocytów i inicjujący lokalny wzrost przepuszczalności naczyń. Związek ten odszczepia ze składnika komplementu (C5) aktywny fragment stymulujący chemotaksję leukocytów [29].

Na wzrost przepuszczalności naczyń wpływ ma  $\text{PGE}_2$  syntetyzowana w płytkach w obecności trombiny oraz jeden z produktów utleniania kwasu arachidonowego, HETE, działający poprzez indukowanie chemotaksji leukocytów [93, 96]. Enzymy lizosomalne płytek (glikozydazy, proteiny) odpowiedzialne są m. in. za destrukcję tkanki łącznej, a obserwowane zmiany wywołane działaniem tych enzymów przypominają stany zapalne [29]. Intensywność stanów zapalnych wzrasta w obecności płytek [11]. Płytki niektórych zwierząt, np. królika, są źródłem bakteriobójczego białka [29].

Badania prowadzone przez Rossa i wsp. [79–82] wykazały, że jednym z głównych mitogennych czynników wykrywanych w pełnej krwi, a nieobecnych w bezpłytkowym osoczu, jest pochodzący z płytek i wydostają-



cy się z nich podczas sekrecji czynnik wzrostowy stymulujący w warunkach *in vitro* proliferację komórek mięśni gładkich i fibroblastów. Płytki transportują i przekazują ten czynnik do określonych miejsc uszkodzonego naczynia, gdzie stymuluje on proliferację komórek mięśni gładkich i syntezę białek tkanki łącznej.

Czynnik wzrostowy wraz z czynnikiem zmieniającym przepuszczalność śródbłonna naczyń stymuluje, obserwowany w zmianach miażdżycowych, ogniskowy rozrost tkanki łącznej i mięśniowej [29]. Istnieje koncepcja, że przyczyną zawałów mogą być mikrozatory formowane z oderwanych fragmentów agregatów płytkowych i osadzone w ogniskach miażdżycowych aorty i tętnic wieńcowych. Agregaty płytkowe tworzące się przy zaburzeniach mikrokrążenia mięśnia sercowego stanowią bezpośrednią przyczynę zawału serca [51, 104].

Wykrycie w płytkach  $\text{Tx A}_2$  i poznanie jego własności przyczyniło się do wzrostu zainteresowania płytkami i ich roli w powstawaniu zmian miażdżycowych [23, 35, 36, 46, 54, 55, 87]. Produkty utleniania kwasu arachidonowego w płytkach, cykliczne nadtlenki prostaglandyn i  $\text{Tx A}_2$ , pobudzają do skurczu mięśnie gładkie [23]. Za skurcz mięśni gładkich naczyń odpowiedzialny jest przede wszystkim  $\text{Tx A}_2$  [23, 70]. Badania Needlemana i wsp. [70] wykazały, że własności  $\text{Tx A}_2$  odpowiadają wcześniej opisanemu czynnikowi wywołującemu skurcz aorty królika (rabbit aorta contracting substance, RCS). W mniejszym stopniu za skurcz tętnic mogą być odpowiedzialne cykliczne nadtlenki prostaglandyn,  $\text{PGG}_2$  i  $\text{PGH}_2$  [23].

Agregacja płytek inicjowana uszkodzeniem śródbłonna czy kompleksem antygen-przeciwciało odgrywa pewną rolę w odrzucaniu przeszczepów [1, 11]. Leki hamujące reakcję uwalniania przedłużają okres przeżycia przeszczepionych organów [11].

Płytkowa reakcja uwalniania jest więc ważnym biologicznie procesem dostarczającym do krwiobiegu czynne fizjologicznie substancje. Badanie prawidłowości przebiegu płytkowej sekrecji pozwoliło na wykrycie nowych zaburzeń oraz przyczyniło się do zrozumienia patogenezy znanych od dawna zaburzeń zależnych od nieprawidłowej czynności płytek.

Istnieją wrodzone zaburzenia układu krzepnięcia krwi spowodowane zmniejszeniem się zawartości związków magazynowanych w płytkowych ziarnistościach lub upośledzoną zdolnością ich uwalniania (storage pool disease, SPD). W trombocytopatii A stwierdzono charakterystyczny spadek zawartości nukleotydów adeninowych, nie zawsze połączony z obniżeniem ilości magazynowanej serotoniny. W trombocytopatii B poziom magazynowanych nukleotydów adeninowych nie jest zmieniony. Upośledzona jest tylko sekrecja tych związków i zaburzenie uwalniania przypomina efekt wywołany działaniem aspiryny na płytki zdrowych osób.



Trombocytopatia B określana jest jako defekt aspiryno - podobny (aspirin-like platelet disease) [105]. U chorych z defektem mechanizmu uwalniania został wykryty wrodzony niedobór cyklicznych oksigenaz kwasu tłuszczowego [54].

Wnikliwsze badania mechanizmów odpowiedzialnych za prawidłowy przebieg płytkowej reakcji uwalniania przyczynią się z pewnością do wyjaśnienia wielu zaburzeń, nie tylko hemostazy, i stworzą możliwości ich zwalczania.

#### LITERATURA

- [1] ALEDORT L. M., TAUB R., BURROWS L., LEITER E., GLABMAN S., HEIMOW M., NIRMUL G., BERGER S., Use of inhibitors of platelet function in renal rejection phenomena, [w] Platelets and Thrombosis, red. Sherry S., Scrabine A., University Park Press, Baltimore, London, Tokyo 1974, 263-271.
- [2] BARBER A. J., JAMIESON C. A., Isolation and characterization of plasma membranes from human blood platelets, *J. Biol. Chem.*, **254**: 6357-6356, 1970.
- [3] BARBER A. J., KÄSER-GLANZMANN R., JAKABOVA M., LÜSCHER E. F., Characterization of a chondroitin-4-sulphate proteoglycan carrier for heparin neutralizing activity (platelet factor 4) released from human blood platelets, *Biochim. Biophys. Acta*, **286**: 312-321, 1972.
- [4] BEANZIGER N. L., BRODIE G. N., MAJERUS P. W., A thrombin sensitive protein of human platelet membranes, *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **68**: 240-243, 1971.
- [5] BILLS T. K., SMITH J. B., SILVER M. J., Metabolism of <sup>14</sup>C arachidonic acid by human platelets, *Biochim. Biophys. Acta*, **424**: 303-314, 1976.
- [6] BISHOP G. A., ROZENBERG M. C., The effect of ADP, calcium and some inhibitors of platelet aggregation on protein phosphokinases from human blood platelets, *Biochim. Biophys. Acta*, **384**: 112-119, 1975.
- [7] BORN G. V. R., GILLSON R. E., Studies on the uptake of 5-hydroxytryptamine by blood platelets, *J. Physiol.*, **146**: 472-491, 1959.
- [8] BORN G. V. R., Aggregation of blood platelets by adenosine diphosphate and its reversal, *Nature*, **194**: 927-929, 1962.
- [9] — Current ideas on the mechanism of platelet aggregation, *Ann. N. Y. Sci.*, **201**: 4-12, 1972.
- [10] BROEKMAN M. J., HANDIN R. I., COHEN P., Distribution of fibrinogen and platelet factors 4 and XIII in subcellular fractions of human platelets, *Br. J. Haemat.*, **31**: 51-55, 1975.
- [11] BROWN D. L., Platelets in immunological reactions, [w] Platelets in Biology and Pathology, red. Gordon J. L., Elsevier/North Holland Biomedical Press, 1976, 313-330.
- [12] BRUNO J. J., TAYLOR L. A., DROLLER M. J., Effect of prostaglandin E<sub>2</sub> on human platelet adenyl cyclase and aggregation, *Nature*, **251**: 721-723, 1974.
- [13] BUSCH C., WASTESON A., WESTERMARK B., Release of a cell growth promoting factor from human platelets, *Thrombosis Research*, **8**: 493-500, 1976.



- [14] CRAWFORD N., Platelet microfilaments and microtubules, [w] Platelets in Biology and Pathology, red. Gordon J. L., Elsevier/North Holland Biomedical Press, 1976, 121-157.
- [15] DA PRADA M., TRANZER J. P., PLETSCHER A., Storage of 5-hydroxytryptamine in human blood platelets, *Experientia*, **28**: 1328-1329, 1972.
- [16] DA PRADA M., JAKABOVA M., LÜSCHER E. F., PLETSCHER A., RICHARDS J. G., Subcellular localization of heparin-neutralizing factor in blood platelets, *J. Physiol.*, **257**: 495-502, 1976.
- [17] DAY H. J., HOLMSEN H., Concepts of the blood platelet release reaction, *Ser. Haematol.*, **4**: 3-27, 1971.
- [18] DAY H. J., STORMORKEN H., HOLMSEN H., Subcellular localization of platelet factor 3 and platelet factor 4, *Scand. J. Haematol.*, **10**: 254-260, 1973.
- [19] DĄBROWSKA R., Systemy regulujące cykl skurczowo-rozkurczowy mięśni, *Post. Biochem.*, **22**: 467-482, 1976.
- [20] DEYKIN D., Platelet lipids and platelet function, [w] Platelets in Biology and Pathology, red. Gordon J. L., Elsevier/North Holland Biomedical Press, 1976, 111-119.
- [21] DROLLER M. J., Ultrastructure of the platelet release reaction in response to various aggregation agents and their inhibitors, *Lab. Invest.*, **29**: 595-606, 1973.
- [22] DRUMMOND A. H., Interactions of blood platelets with biogenic amines: uptake stimulation and receptor binding, [w] Platelets in Biology and Pathology, red. Gordon J. L., Elsevier/North Holland Biomedical Press, 1976, 303-239.
- [23] ELLIS E. F., OELTZ O., ROBERTS L. J., PAYNE N. A., SWEETMAN B. J., NIES A. S., OATES J. A., Coronary arterial smooth muscle contraction by a substance released from platelets: evidence that it is thromboxane A<sub>2</sub>, *Science*, **193**: 1135-1137, 1976.
- [24] ERSLEV A. J., Platelet kinetics, [w] Platelets and Thrombosis, red. Sherry S., Scrabine A., University Park Press, Baltimore, London, Tokyo 1974, 127-137.
- [25] FRENCH P. C., WACHOWICZ B., Investigation of the binding component of the ethanol insoluble metabolic ADP of human platelets and its relation to the release reaction, *Haemostasis*, **3**: 271-281, 1974.
- [26] GERRARD J. M., WHITE J. G., RAO G. H. R., TOWNSELD D., Localization of platelet prostaglandin production in the platelet dense tubular system, *Am. J. Pathol.*, **83**: 283-298, 1976.
- [27] GJESDAL K., PEPPER D. S., Half life of platelet factor 4 (PF-4) in plasma and platelets from *Macaca Mulatta*, *Thrombos. Research*, **37**: 73-80, 1977.
- [28] GLYNN M. F., MOVAT H. Z., MURPHY E. A., MUSTARD J. F., Study of platelet adhesiveness and aggregation with latex particles, *J. Lab. Clin. Med.*, **65**: 179-201, 1965.
- [29] GORDON J. L., MILNER A. J., Blood platelets as multifunctional cells, [w] Platelets in Biology and Pathology, red. Gordon J. L. Elsevier/North Holland Biomedical Press, 1976, 3-22.
- [30] GRETTE K., Studies on the mechanism of thrombin-catalysed hemostatic reactions in blood platelets, *Acta Physiol. Scand.*, **56**, Supl. **196**: 1-93, 1962.
- [31] HAGEN I., The release of glycosaminoglycans during exposure of human platelets to thrombin and polystyrene latex particles, *Biochim. Biophys. Acta*, **273**: 141-148, 1972.



- [32] — Effects of thrombin on washed human platelets. Changes in the subcellular fractions, *Biochim. Biophys. Acta*, **393**: 242–254, 1975.
- [33] HAMBERG M., SVENSSON J., WAKABAYASHI T., SAMUELSSON B., Isolation and structure of two prostaglandin peroxide that cause platelet aggregation, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **71**: 345–349, 1974.
- [34] HAMBERG M., SAMUELSSON B., Prostaglandin peroxides. Novel transformations of arachidonic acid in human platelets, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **71**: 3400–3404, 1974.
- [35] HAMBERG M., SVENSSON J., SAMUELSSON B., Thromboxanes A new group of biologically active compounds derived from prostaglandin peroxides, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **72**: 2994–2998, 1975.
- [36] HO P. P. K., WALTERS C. P., HERMANN R. G., Synthesis of platelet-aggregating factor by human platelet microsomes, *Biochem. Biophys. Res. Com.*, **69**: 218–224, 1976.
- [37] HOLMSEN H., Collagen-induced release of adenosine diphosphate from blood platelets incubated with radioactive phosphate in vitro, *Scand. J. Lab. Invest.*, **17**: 239–246, 1965.
- [38] HOLMSEN H., DAY H. J., STORMORKEN H., The blood platelet release reaction, *Scand. J. Haematol., Supl.*, **8**: 1–26, 1969.
- [39] HOLMSEN H., DAY H. J., SETKOWSKY C. A., Secretory mechanisms. Behaviour of adenine nucleotides during the platelet release reactions induced by saline adenosine diphosphate and adrenaline, *Biochem. J.*, **129**: 67–82, 1972.
- [40] HOVIG T., Release of a platelet-aggregating substance (adenosine diphosphate) from rabbit blood platelets induced by saline extract of tendons, *Thromb. Diath. Haemorrh.*, **9**: 264–267, 1963.
- [41] IRELAND D. M., Effect of thrombin on radioactive nucleotides of human washed platelets, *Biochem. J.*, **195**: 857–867, 1967.
- [42] JAFFE R. M., Interaction of platelets with connective tissue, [w] *Platelets in Biology and Pathology*, red. Gordon J. L., Elsevier/North Holland Biomedical Press, 1976, 261–288.
- [43] JAIN N. C., A scanning electron microscopic study of platelets of certain animal species, *Thrombos. Diathes. Haemorrh.*, **33**: 501–507, 1975.
- [44] JAMIESON G. A., Biochemical events in platelet-collagen adhesion, [w] *Platelets and Thrombosis*, red. Sherry S., Scrabine A., University Park Press, Baltimore, London, Tokyo 1974, 139–149.
- [45] JAMIESON G. A., SMITH D. F., Characterisation of plasma membranes from platelets, [w] *Platelets in Biology and Pathology*, red. Gordon J. L., Elsevier/North Holland Biomedical Press, 1976, 89–105.
- [46] KINLOUGH-RATHBONE R. L., REIMERS H. J., MUSTARD J. F., Sodium arachidonate can induce platelet shape change and aggregation which are independent of the release reaction, *Science*, **192**: 1011–1112, 1976.
- [47] KLOEZE J., Relationship between chemical structure and platelet-aggregation activity of prostaglandins, *Biochim. Biophys. Acta*, **187**: 285–292, 1969.
- [48] KOPEĆ M., Budowa, metabolizm i funkcja płytek krwi w świetle nowych badań, *Post. Hig. Med. Dośw.*, **24**: 483–496, 1970.
- [49] LAWLER J. W., CHAO F. C., FANG P. H., Observation of a high molecular weight platelet protein released by thrombin, *Thrombos. Haemostas.*, **37**: 355–257.
- [50] LEGRAND Y., CAEN J. P., ROBERTS L., WANTIER J. L., Platelet elastase



- and leukocyte elastase are two different entities, *Thrombos. Haemostas*, **37**: 580–582, 1977.
- [51] LEVITES R., HAFT J. I., Effect of exercise induced stress on platelet aggregation, *Cardiology*, **60**: 304–314, 1975.
- [52] MACINTYRE D. E., GORDON J. L., Evidence for two populations of disulphide bonds on blood platelets, *Biochem. Soc. Trans.*, **2**: 873–875, 1974.
- [53] MACINTYRE D. E., The platelet release reaction: association with adhesion and aggregation and comparison with secretory response in other cells. [w] *Platelets in Biology and Pathology*, red. Gordon J. L., Elsevier/North Holland Biomedical Press, 1976, 61–85.
- [54] MALMSTEN C., HAMBERG M., SVENSSON J., SAMUELSSON B., Physiological role of an endoperoxide in human platelets. Hemostatic defect due to platelet cyclo-oxygenase deficiency., *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **72**: 1446–1450, 1975.
- [55] MALMSTEN C., GRANSTROM E., SAMUELSSON B., Cyclic AMP inhibits synthesis of prostaglandin endoperoxide (PGG<sub>2</sub>) in human platelets, *Biochem. Biophys. Res. Com.*, **68**: 569–576, 1976.
- [56] MAJERUS P. W., TOLLEFSEN D. M., SHUMAN M. A., The interaction of platelets with thrombin, [w] *Platelets in Biology and Pathology*, red. Gordon J. L., Elsevier/North Holland Biomedical Press, 1976, 241–260.
- [57] MCDONALD J. W. D., STUART R. K., Regulation cyclic AMP levels and aggregation in human platelets by prostaglandin E<sub>1</sub>, *J. Lab. Clin. Med.*, **81**: 838–849, 1973.
- [58] MICHEL H., CAEN J. P., BORN G. V., MILLER R., Relation between the inhibition of aggregation and the concentration of cAMP in human and rat platelets, *Br. J. Haematol.*, **33**: 27–38, 1976.
- [59] MILLER D. V., GORMANN R. R., Modulation of platelet cyclic nucleotide content of PGR<sub>1</sub> and the prostaglandin endoperoxide PGG<sub>2</sub>, *J. Cyclic Nucleotide Res.*, **2**: 79–87, 1976.
- [60] MILLS D. C. B., ROBB I. A., ROBERTS G. C. K., The release of nucleotides, 5-hydroxytryptamine and enzymes from human blood platelets during aggregation, *J. Physiol.*, **195**: 715–729, 1968.
- [61] MILLS D. C. B., THOMAS D. P., Platelet adenine nucleotides in man and other species, *Nature*, **222**: 991–993, 1969.
- [62] MILLS D. C. B., Factors influencing the adenylate cyclase system in human blood platelets, [w] *Platelets and Thrombosis*, red. Sherry S., Scrabine A., Baltimore, London, Tokyo, University Park Press, 1974, 45–67.
- [63] MILLS D. C. B., MACFARLANE D. E., Platelet receptors, [w] *Platelets in Biology and Pathology*, red. Gordon J. L., Elsevier/North Holland Biomedical Press, 1967, 159–202.
- [64] MOORE S., PEPPER D. S., CASH J. D., The isolation and characterisation of a platelet-specific  $\beta$ -globulin ( $\beta$ -thromboglobulin) and the detection of antiurokinase and antiplasmin released from thrombin-aggregated washed human platelets, *Biochim. Biophys. Acta*, **379**: 360–369, 1975.
- [65] — Platelet antiheparin activity. The isolation and characterisation of platelet factor 4 released from thrombin-aggregated washed human platelets and its dissociation into subunits and the isolation of membrane bound antiheparin activity, *Biochim. Biophys. Acta*, **379**: 370–384, 1975.
- [66] MOORE S., PEPPER D. S., Identification and characterization of a platelet specific release product:  $\beta$ -thromboglobulin, [w] *Platelets in Biology and Pa-*



- thology, red. Gordon J. L., Elsevier/North Holland Biomedical Press, 1976, 293-311.
- [67] MÜRER E. H., Release reaction and energy metabolisms in blood platelets with special reference to the burst in oxygen uptake, *Biochim. Biophys. Acta*, **162**: 320-329, 1968.
- [68] — Factor influencing the initiation and extrusion phase of the platelet release reaction, *Biochim. Biophys. Acta*, **261**: 435-440, 1971.
- [69] MÜRER E. H., DAY H. J., Observations on the platelet release reaction, [w] *Platelets and Thrombosis*, red. Sherry S., Scrabine A., University Park Press, Baltimore, London, Tokyo 1974, 1-23.
- [70] NEEDLEMAN P., MONCADA S., BUNTING S., VANE J. R., HAMBERG M., SAMUELSSON B., Identification of an enzyme in platelet microsomes which generates thromboxane A<sub>2</sub> from prostaglandin endoperoxides, *Nature*, **261**: 558-560, 1976.
- [71] NIEWIAROWSKI S., THOMAS D. P., Platelet factor 4 and adenosine diphosphate release during human platelet aggregation, *Nature*, **222**: 1269-1270, 1969.
- [72] NURDEN A. T., CAEN J. P., An abnormal platelet glycoprotein pattern in three cases of Glanzmanns Thrombasthenia, *J. Haematol.*, **28**: 253-260, 1974.
- [73] PALADE G., Intracellular aspects of the process of protein synthesis, *Science*, **189**: 347-358, 1975.
- [74] PHILLIPS D. R., POH AGIN, Thrombin substrates and the proteolytic study of thrombin action on human platelets membranes, *Biochim. Biophys. Acta*, **352**: 218-227, 1974.
- [75] PHILLIPS D. R., Thrombin interaction with human platelets. Potentiation of thrombin-induced aggregation and release by inactivated thrombin, *Thrombos. Diathes. Haemorrh.*, **32**: 207-215, 1974.
- [76] REIMERS H. J., PACKHAM M. A., MUSTARD J. F., Labeling of the releasable adenine nucleotides of washed human platelets, *Blood*, **49**: 89-99, 1977.
- [77] ROBERT B., SZIGETI M., ROBERT L., LEGRAND G., PIGNAUD G., CAEN J., Release of elastolytic activity from blood platelets, *Nature*, **227**: 1248-1249, 1970.
- [78] RODAN G. A., FEINSTEIN M. B., Interrelationships between Ca and adenylylate and guanylate cyclases in the control of platelet secretion and aggregation, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **73**: 1829-1833, 1976.
- [79] ROSS R., GLOMSET J. A., KARIYA B., HARKER L., A platelet-dependent serum factor that stimulates the proliferation of arterial smooth muscle cell in vitro, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **71**: 1207-1210, 1974.
- [80] ROSS R., GLOMSET J. A., Pathogenesis of atherosclerosis, *N. Engl. J. Med.*, **295**: 369-377, 1976.
- [81] ROSS R., GLOMSET J. A., HARKER L., Trophic stimulation by platelets, [w] *Platelets in Biology and Pathology*, red. Gordon J. L., Elsevier/North Holland Biomedical Press, 1976, 373-378.
- [82] RUTHEFORD B. R., ROSS R., Platelet factors stimulate fibroblasts and smooth muscle cell quiescent in plasma-serum to proliferate, *J. Cell Biol.*, **69**: 196-204, 1976.
- [83] SALZMAN E. W., LINDON J. N., RODVIEN R., Cyclic AMP in human blood platelet prostaglandin synthesis induced by centrifugation or surface contact, *J. Cyclic Nucleotide Res.*, **2**: 25-37, 1976.



- [84] SCHICK P. K., YU B. P., The role of platelet membrane phospholipids in the platelet release reaction, *J. Clin. Invest.*, **54**: 1032-1039, 1974.
- [85] — The storage of serotonin in human platelets, [w] *Platelets and Thrombosis*, red. Sherry S., Scrabine A., University Park Press, Baltimore, London, Tokyo 1974, 69-79.
- [86] SCUTER I., FRIEDEL M., Inhibition of platelet-aggregation by acetylsalicylic acid and other inhibitors, *Haemostasis*, **5**: 85-95, 1976.
- [87] SHIMAMOTO T., MOROOKA S., KOBAYASHI M., TAKAHASHI T., TAKASHIMA Y., MOTOMYIA T., NUMANO F., The production of heart attacks and cerebral stroke by thromboxane A<sub>2</sub> mixtures and their prevention with EG626 (phtalazinol). I Florence Conference Haemostasis Thrombosis, Florence 1977, Abstr. 88.
- [88] SILVER M. J., HERNANDOVICH J., INGERMAN C., KOCSIS J. J., SMITH J. B., Persistent inhibition by aspirin of collagen-induced platelet prostaglandin formation, [w] *Platelets and Thrombosis*, red. Sherry S., Scrabine A., University Park Press, Baltimore, London, Tokyo 1974, 91-99.
- [89] SIXMA J. J., MOLENAAR I., Microtubules and microfibrils in human platelets, *Thrombos. Diathes. Haemorrh.*, **16**: 153-162, 1966.
- [90] SMITH J. B., WILLIS A. L., Formation and release of prostaglandins by platelets in response to thrombin, *Brit. J. Pharmacol.*, **40**: 545 P, 1970.
- [91] SMITH J. B., SILVER M. J., INGERMAN C., KOCSIS J. J., Prostaglandins: are they intracellular messenger?, [w] *Platelets and Thrombosis*, red. Sherry S., Scrabine A., University Park Press, Baltimore, London, Tokyo 1974, 81-90.
- [92] SMITH J. B., INGERMAN C., SILVER M. J., Persistence of a Thromboxane A<sub>2</sub>-like material and platelet release inducing activity in plasma, *J. Clin. Invest.*, **58**: 1119-1122, 1976.
- [93] SMITH J. B., SILVER M. J., Prostaglandin synthesis by platelets and its biological significance, [w] *Platelets in Biology and Pathology*, red. Gordon J. L., Elsevier/North Holland Biomedical Press, 1976, 331-352.
- [94] STEINER M., Effect of thrombin on phosphorylation of platelet membrane proteins. *Trombos. Haemostas*, **35**: 635-642, 1976.
- [95] STORMORKEN H., The release reaction of secretion, *Scand. J. Haematol., Supl.*, **9**: 1969.
- [96] TURNER S. F., TAINER J. A., LYNN W. S., Biogenesis of chemotactic molecules by the arachidonate lipoxygenase system of platelets, *Nature*, **257**: 680-681, 1975.
- [97] WACHOWICZ B., KRAJEWSKI T., Rola płytek w hemostazie, *Post. Hig. Med. Dośw.*, **30**: 301-318, 1976.
- [98] WALSH P. N., GAGNATELLI G., Platelet antiheparin activity: storage site and release mechanism, *Blood*, **44**: 157-168, 1974.
- [99] WALSH P. N., Platelet coagulant activities and haemostasis: A hypothesis, *Blood*, **43**: 597-603, 1974.
- [100] WHITE J. G., Platelet morphology, [w] *The Circulating Platelets* red. Johnson S. A., Academic Press, New York 1971, 46-121.
- [101] WILLIS A. L., An enzymatic mechanism for the antithrombotic and anti-hemostatic action of aspirin, *Science*, **183**: 325-327, 1974.
- [102] WILLIS A. L., KUHN D. C., WEISS H. J., Acetylenic analog of arachidonate that acts like aspirin on platelets, *Science*, **183**: 327-329, 1974.
- [103] WEISS H. J., WILLIS A. L., KUHN D., BRAND H., Prostaglandin E<sub>2</sub> poten-



- tation induced by LASS endoperoxide: absent in storage pool disease, normal after aspirin ingestion, *Brit. J. Haematol.*, **32**: 257-264, 1976.
- [104] WU K. K., HOAK J. C., Spontaneous platelet aggregation in arterial insufficiency: mechanisms and implications, *Thrombos Haemostas.*, **35**: 702-711, 1976.
- [105] ZAHAVI J., Acquired "storage pool disease" of platelets, *Thrombos. Haemostas.*, **35**: 501-507, 1976.
- [106] ZUCKER M. B., The value of the platelet in hemostasis and as a scientific tool, *Trans. N. Y. Acad. Sci.*, **36**: 561-568, 1974.
- [107] ZUZEL M., IRVING W., BORN G. V. R., Membrane transports of platelets present in plasma during clotting and lysis, Vth Congress Thrombosis Haemostasis, Paris 1975, Abstr. 16.

*Otrzymano: 25 czerwca 1977.*

*Przyjęto: 10 listopada 1977.*

*Adres autora: ul. Banacha 12/16, 90-237 Łódź.*



PRZEBUDOWA CYTOPLAZMY, IZOLACJA I POLARYZACJA  
W MEJOCYTACH PODCZAS MEGASPOROGENEZY  
U ANGIOSPERMAE

CYTOPLASM RESTRUCTURING, ISOLATION AND POLARIZATION IN  
MEIOCYTES DURING MEGASPOROGENESIS IN ANGIOSPERMS

Bohdan RODKIEWICZ

Instytut Biologii, Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej, Lublin

*Streszczenie.* W czasie megasporogenezy u okrytonasiennych mejocyt przekształca się z komórki sporofitowej w gametofitową, przy tym w ścianie komórkowej i w cytoplazmie zachodzą procesy pod niektórymi względami podobne do procesów widocznych w mikrosporogenezie. W mejocytach (megasporocytach) *Lilium* tworzą się liczne obszary cytoplazmy otoczone podwójnymi membranami, a w pozostałej cytoplazmie następuje degradacja rybosomów. W monosporowym typie rozwoju woreczka zalążkowego w ścianach mejocytu i tetrady megaspor wytwarza się warstwa kalozy. Wzór rozmieszczenia kalozy odpowiada polaryzacji tych komórek. W tetradach typu *Polygonum* funkcjonalna megaspóra różnicuje się na wierzchołku chalazalnym, a w typie *Oenothera* — na mikropylarnym. Kaloza, która początkowo występuje w całej ścianie mejocytu, znika z tego wierzchołka, gdzie następnie tworzy się megaspóra funkcjonalna. W megasporogenezie typu *Oenothera* odbywa się segregacja plastydów, prowadząca do wytworzenia się tetrady, w której plastydy są tylko w mikropylarnej i chalazalnej megasporze, a nie ma ich w megasporach środkowych. Wzór rozmieszczenia kalozy i plastydów wskazuje, że w typie *Oenothera* są gatunki z homopolarnymi i heteropolarnymi układami komórek mejotycznych.

*Summary.* During megasporogenesis a meiocyte is transformed from a sporophytic into a gametophytic cell. In the process the cell wall and cytoplasm undergo several changes in some respects similar to those characteristic for microsporogenesis.

In meiocytes (megasporocytes) of *Lilium* numerous areas of cytoplasm become surrounded by ER cisternae (Fig. 1, Fig 7 — of an orchid *Epipactis*). These areas remain unaffected by the process of ribosome degradation which takes place in the rest of cytoplasm.

Meiocyte and megaspores walls in monosporic (Figs. 13-15, 17, 18) and bisporic (Fig. 16) types of embryo sac development reveal callose deposits. Patterns of callose distribution coincide with the polarization of these cells. Callose which



initially occurs in the entire meiocyte wall later disappears from that apex where the functional megaspore develops: in the *Polygonum* type of megasporogenesis from the chalazal apex (Fig. 19), in *Oenothera* type from the micropylar apex (Fig. 20).

The chalazal wall in meiocytes of some *Orchidaceae* (*Polygonum* type of development — Fig. 23) has finger-like ingrowths (Fig. 5) with a sieve-like callose layer spread in between (Figs. 4, 23). The wall and callose layer are crossed by plasmodesmata (Figs. 6, 24).

A singular event of plastid segregation into two apical megaspores occurs in megasporogenesis of *Onagraceae* (Figs. 8-12, 25). Patterns of callose distribution (Figs. 20, 22) and plastid segregation suggest that the *Onagraceae* family includes species with homeopolar and heteropolar meiotic cells and megaspore tetrads.

### SPOROFIT I GAMETOFIT

W cyklu rozwojowym rośliny okrytonasiennej występują dwa pokolenia: diploidalny sporofit oraz haploidalne gametofity — męski i żeński. Gametofit męski (ziarno pyłku) wytwarza dwie gamety, gametofit żeński (woreczek zalążkowy) jedną komórkę jajową. Oba gametofity u większości gatunków rozwijają się z komórek tego samego sporofitu, jedynie nieliczne gatunki mają rozdzielnopłciowe sporofity. Dojrzałe gametofity są organizmami mikroskopijnymi, najczęściej zbudowanymi ze ściśle określonej liczby komórek — męski z dwu, żeński z siedmiu, podczas gdy sporofity są dużymi roślinami, które codziennie widzimy. Te ogromnie różniące się wyglądem i właściwościami fizjologicznymi organizmy mają takie same genotypy, tyle tylko że w postaci haplo- i diploidalnej.

Wybrane komórki sporofitu przekształcają się w rezultacie mejozy w komórki gametofityczne. Różnice między gametofitem a sporofitem nie są jednak spowodowane mejotyczną redukcją liczby chromosomów. Znane są bowiem gatunki, które z reguły lub bardzo często mają gametofity żeńskie o niezredukowanej liczbie chromosomów — aposporia, apogamia. Także komórki haploidalne mogą się rozwijać partenogenetycznie w organizm o pokroju sporofitu. Doświadczalnie otrzymuje się haploidalne rośliny z mikrospor lub ziaren pyłku w hodowanych in vitro pylnikach [4, 96]. Różnice rozwojowe między obu pokoleniami muszą być zatem uwarunkowane nie liczbą chromosomów, a odmienną represją genomu w embriogenezie i gametofitogenezie. Należy sądzić, że w gametoficie zablokowane są geny odpowiadające za cechy właściwe tylko sporofitowi. Ta blokada musi być dokonana, albo spowodowana przez jakieś czynniki działające na mejocyt, a zwłaszcza na komórki we wczesnej fazie pomejotycznej — młode mikro- i megaspory.

W normalnym pylniku i zalążku wytwarzają się warunki, które inicjują mejozę w ściśle określonym miejscu organu, a następnie skierowują



komórki na drogę gametofitycznego rozwoju. Zmiana naturalnych warunków może diametralnie zmienić kierunek rozwoju; w odciętym pręciku, położonym na pożywkę, komórki pomejotyczne przechodzą z rozwoju gametofitowego na sporofitowy.

#### MEJOCYT W ZALĄŻKU

W zalążkach roślin kwiatowych mejoza odbywa się zwykle w jednej tylko komórce położonej na szczycie ośrodka. U części gatunków komórka mejotyczna jest pod skórą, u innych jest to wewnętrzna komórka z pary powstałej po podziale komórki subepidermalnej. U niektórych gatunków z reguły, a u niektórych wyjątkowo — mejoza rozpoczyna się w grupie paru lub kilkunastu komórek. Pomimo to zwykle powstaje jedna tetrada megaspor, a z megaspory funkcjonalnej — jeden gametofit. Nadliczbowe mejocyty na ogół giną w trakcie mejozy, chociaż czasami może się utworzyć kilka woreczków zalążkowych [19, 20, 95]. W pylnikach jest zupełnie inaczej, ponieważ w każdym różnicuje się bardzo dużo mejocytów, wszystkie one dzielą się mejotycznie i ostatecznie każda mikrospora z tetrady rozwija się w gametofit. Swoiście przejawia się więc tu ogólnobiologiczna tendencja do wytwarzania większej liczby plemników niż jaj.

Potencjalny mejocyt jest początkowo taki sam jak inne komórki ośrodka. Pierwszymi objawami różnicowania się jest: zahamowanie podziałów, wzrost jądra i jąderka oraz nagromadzenie się cytoplazmy. Mejocyt staje się coraz większy w porównaniu z dzielącymi się nadal komórkami ośrodka. W ciągu mejozy komórka sporofitu przekształca się w haploidalne komórki zdolne do wytworzenia woreczka zalążkowego. Poza procesami kariologicznymi, na których tu się nie zatrzymujemy, w mejocycie występuje zespół innych objawów: 1. przebudowa cytoplazmy, 2. przekształcenie się ścian komórkowych, 3. biegunowe zróżnicowanie, które prawdopodobnie jest warunkiem kształtowania się funkcjonalnej megaspory na określonym wierzchołku tetrady. Wymienione procesy zbadano jedynie u niewielu gatunków i trudno dokładnie ocenić czy mają one zasięg powszechny.

Przebudowę cytoplazmy prześledzono ściślej jedynie u trzech gatunków *Lilium*, gdzie rozwija się czterojądrowa coenomegaspora (tetrasporowy typ rozwoju woreczka zalążkowego). Zmiany w ścianie mejocytu stwierdzono natomiast w typie mono- i bisporowym. Polaryzację cytoplazmy mejocytu przejawiającą się segregacją organoidów znaleziono tylko u gatunków z rodziny *Onagraceae*. Innego rodzaju przejawy polaryzacji widać we wszystkich typach rozwoju woreczka zalążkowego. Ciekawe, że podobne pod wielu względami procesy komórkowe odbywają



się także w mikrosporogenezie [24, 60], gdzie zresztą są o wiele lepiej poznane niż w megasporogenezie.

#### ZRÓŻNICOWANIE I PRZEBUDOWA CYTOPLAZMY

Metodami mikroskopii świetlnej stwierdzono już dawno, że w czasie mejozy zmienia się wygląd organoidów komórkowych i okresowo zmniejsza się barwliwość cytoplazmy [47, 71]. Jak znaleziono później, następuje wtedy przebudowa struktury plastydów, mitochondriów i endoplazmatycznego retikulum (ER) oraz zmiana ilości rybosomów i RNA.

W mikro- i makrosporogenezie u *Lilium longiflorum* zmiany w cytoplazmie mają podobny obraz i w obu procesach są skojarzone z tymi samymi stadiami mejozy. W przedmejotycznych komórkach odbywa się prawdopodobnie namnażanie mitochondriów i plastydów. Już począwszy od leptotenu budowa wewnętrzna tych organoidów ulega regresji, tak że mitochondria stają się małymi promitochondriami. Dopiero w pewien czas po drugim podziale mejotycznym odtwarza się bardziej złożona struktura wewnętrzna mitochondriów i plastydów [22–24]. Prosto zbudowane plastydy i mitochondria są też w megasporogenezie innych gatunków roślin [25, 66, 102].

W okresie zygotenu — diplotenu w komórkach macierzystych pyłku spada o kilkadziesiąt procent ilość RNA i wyraźnie zmniejsza się liczba rybosomów [23, 24]. Dane o megasporogenezie są w tym względzie mniej dokładne, ale bez wątpienia rybosomy znikają i duże obszary cytoplazmy stają się optycznie puste. Część rybosomów zostaje jednak zachowana w wyodrębnionych partiach cytoplazmy. Te wyodrębnione obszary o średnicy zwykle od 1 do 5  $\mu\text{m}$  powstają w mejocytach zarówno linii żeńskiej, jak i męskiej. Każdy taki obszar jest obleczony i zamknięty przez jedną lub więcej współśrodkowo ułożonych cystern ER (ryc. 1). Przekształcanie się ER jest najbardziej uderzającym zjawiskiem w cytoplazmie mejocytów *Lilium*.

Od końca ubiegłego stulecia, w cytoplazmie mejocytów z zalążków *Lilium* stwierdzano morfologiczne przemiany prowadzące do wytwarzania się układów struktur, które uznano za fibrylarne i ergastoplazmatyczne [12, 32, 33, 65, 69]. Mikroskop elektronowy pokazał, że w przedprofazowym megasporocycie powstają równoległe układy membran cytoplazmatycznych zaopatrzonych w pory (annulatae lamellae) [24]. W początkach pierwszej profazy mejotycznej te membrany już w postaci szorstkiego ER zmieniają swój układ i w końcu zwijając się otaczają partie cytoplazmy. Tworzą się w ten sposób strefy cytoplazmy zamknięte jedną lub kilku podwójnymi membranami [14, 23, 24, 62, 63, 85, 86]. W mikrosporogenezie, gdzie odbywa się taki sam proces, przeważają ob-



szary izolowane przez jedną cysterne ER [23], w megasporogenezie zaś układy wielowarstwowe. Pod koniec mejozy część membran rozpada się na pęcherzyki lub ulega rozerwaniu, a odizolowana cytoplazma łączy się z pozostałą cytoplazmą już haploidalnej komórki [62, 63]. Zanim to nastąpi, zawartość cytoplazmatycznych inkluzji rozrzedza się, a gładkie wtedy membrany graniczne stają się coraz bardziej nieregularne. Pary tych membran w jednych miejscach oddalają się od siebie, w innych zdają się łączyć. Kiedy inkluzje znikają, w cytoplazmie widać swobodnie leżące cysterny czasami połączone z rybosomami [23].

Trudno powiedzieć, jak powszechne jest zjawisko wyosobniania się cytoplazmy poza rodzajem *Lilium*. Izolacja obszarów cytoplazmy w mikrosporogenezie innych roślin nie była opisywana, ponieważ, być może, inkluzje cytoplazmatyczne otoczone podwójną membraną były brane za plastydy. W megasporogenezie niektórych z badanych gatunków widziało wielowarstwowe, zamknięte układy membran, ale spostrzeżenia są ułamkowe [37]. U storczyka *Epipactis* nieliczne wielowarstwowe układy spotykano tylko w anafazie I podziału mejotycznego (ryc. 7) [9].

Można snuć przypuszczenia, jakie znaczenie ma rozdział cytoplazmy na dwa obszary — izolowany i otwarty. W powstałych pojedynczych lub wielowarstwowych ciałach zawiera się cytoplazma przedmejotycznej, diploidalnej komórki, ulega ona znacznie mniejszym przeobrażeniom w czasie mejozy niż cytoplazma otwarta. Izolowana cytoplazma jest później spożytkowana do budowy gametofitu zarówno w komórkach linii żeńskiej [86, 87], jak i męskiej [24]. Tworzenie się inkluzji cytoplazmatycznych w leptotenie i zygotenie zbiega się z eliminacją rybosomów. Membrany ER szorstkiego zamykające inkluzje stają się gładkie, ale w zamkniętej cytoplazmie, jak się wydaje, rybosomy są nienaruszone [23, 24]. Tymczasem w pozostałej cytoplazmie rybosomy ulegają degradacji. W czasie tych przemian komórka zawiera duże ilości enzymów hydrolitycznych [56, 61, 85] i tłuszczów [59].

Przebudowa cytoplazmy i organoidów w mejocytach roślin okrytozalążkowych jest objawem przekształcania się komórki sporofitowej w gametofitową. Regresja struktury plastydów i mitochondriów nie ma na razie żadnego wytłumaczenia, natomiast usunięcie większej części RNA cytoplazmatycznego i rybosomów przywodzi na myśl dość ogólnikową interpretację. Być może chodzi tu o to, aby przez degradację związanego z rybosomami trwałego m-RNA i samych rybosomów pozbyć się dużej części maszyneryi do syntezy białek właściwych komórce diploidalnej sporofitu [24]. Cytoplazma zanim stanie się siedliskiem haploidalnego jądra oczyszcza się w ten sposób ze struktur i cząsteczek wytworzonych pod kontrolą diploidalnego jądra, co z kolei może wpływać na odblokowanie genów działających w rozwoju gametofitu.



## IZOLACJA MEJOCYTU WARSTWĄ KALOZY

W początkach I profazy mejotycznej ściana komórkowa mejocytów prawie wszystkich grup roślin kwiatowych zostaje wysłana warstwą kalozy, a później przegrody z kalożą tworzą się także między komórkami powstałymi w megasporogenezie. Kalozowe ściany stwierdzono w sporogenezie niektórych mszaków [10], w mikrosporogenezie okrytonasiennych [34, 35, 58, 60] oraz w megasporogenezie paprotników [44, 101], nagonasiennych [94, 99, 100] i okrytonasiennych [5, 6, 47, 48, 55, 67, 68, 76–79, 84, 93, 98], gdzie jednak nie znaleziono kalozy w megasporogenezie roślin o tetrasporowym typie rozwoju woreczka zalążkowego [77]. Na podobieństwo ścian komórkowych w mikro- i megasporogenezie zwrócono uwagę jeszcze w początkach tego stulecia [29].

Kaloza występuje w ścianach komórkowych podczas niektórych etapów gametogenezy u wątrobowców, nagozalążkowych i okrytozalążkowych [38–40]. Stałym składnikiem jest kaloza w rurkach sitowych, a przejściowo syntetyzuje się i w innych komórkach somatycznych [18, 35].

W zalążkach roślin o mono- i bisporowym typie rozwoju woreczka zalążkowego mejocyt osiągnąwszy stadium zaawansowanego leptotenu (lub późniejsze) wytwarza warstwę kalozy, która otacza cały protoplast (ryc. 2). Uderzające jest, że po reakcji z błękitem anilinowym [2] (krytyka metody [75]) kaloza jest widoczna tylko w mejocycie, który fluoryzuje na tle nie fluoryzujących komórek somatycznych.

U monosporowych roślin można wyróżnić dwa zasadnicze wzory roz-

Ryc. 1. Cytoplazma żeńskiego mejocytu *Lilium candidum* w czasie I profazy mejotycznej.

C — obszary cytoplazmy ograniczone jedną lub kilku warstwami błon, P — plastydy, M — mitochondria.  $\times 5000$  (wsp. zdjęcia F. Kadej)

Ryc. 2–3. Fluorescencja kalozy w ścianie profazowego mejocytu i diady w zalążku *Epipactis palustre*.  $\times 800$

Ryc. 4. Fluorescencja chalazalnej powierzchni ściany mejocytu *Epipactis palustre*.  $\times 1500$

Ryc. 5. Chalazalna ściana mejocytu *Epipactis palustre* w przekroju prostopadłym do powierzchni

Widoczne ciemne wyrostki zewnętrznej warstwy ściany, pomiędzy nimi warstwa kalozy przezroczysta dla elektronów, M — część mejocytu, S — część komórki somatycznej.  $\times 20\,000$  (wsp. zdjęcia J. Bednara)

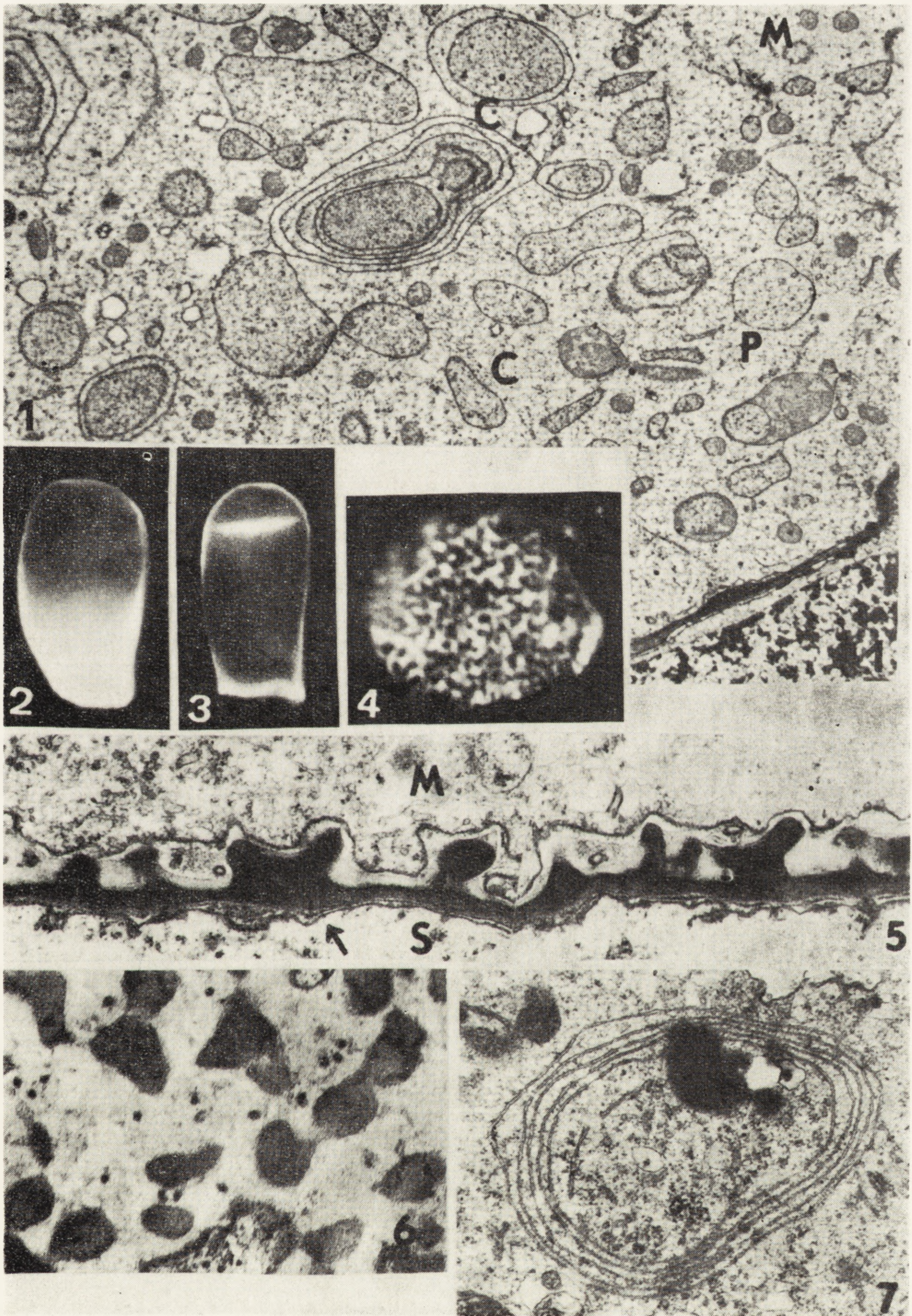
Ryc. 6. Chalazalna ściana mejocytu *Epipactis palustre* w przekroju równoległym do powierzchni

Wyrostki zewnętrznej warstwy ściany widoczne jako duże ciemne owale, pomiędzy nimi poprzecznie przekrojone plazmodesmy na tle jasnej warstwy kalozowej.  $\times 20\,000$  (wsp. zdjęcia J. Bednara)

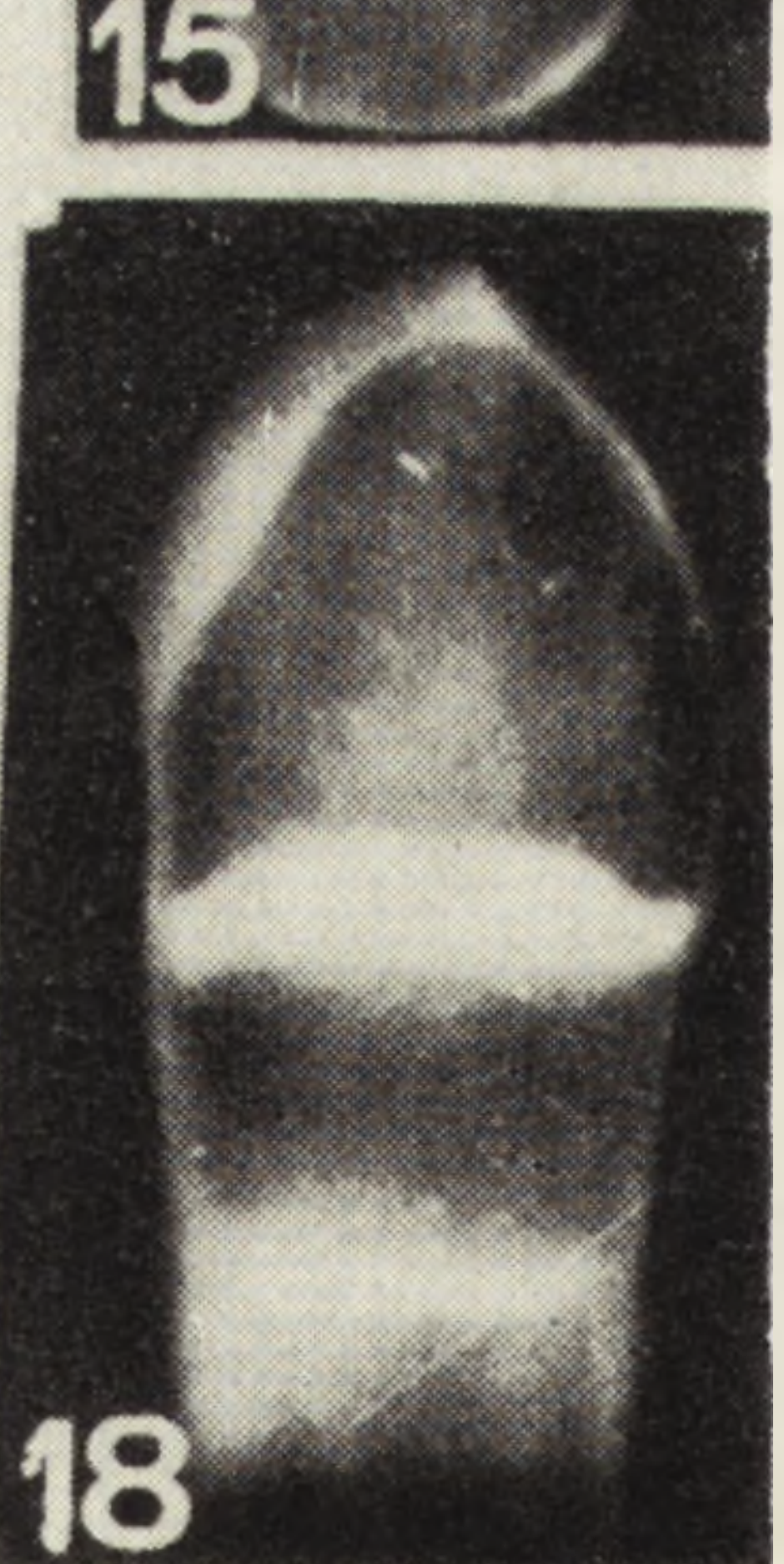
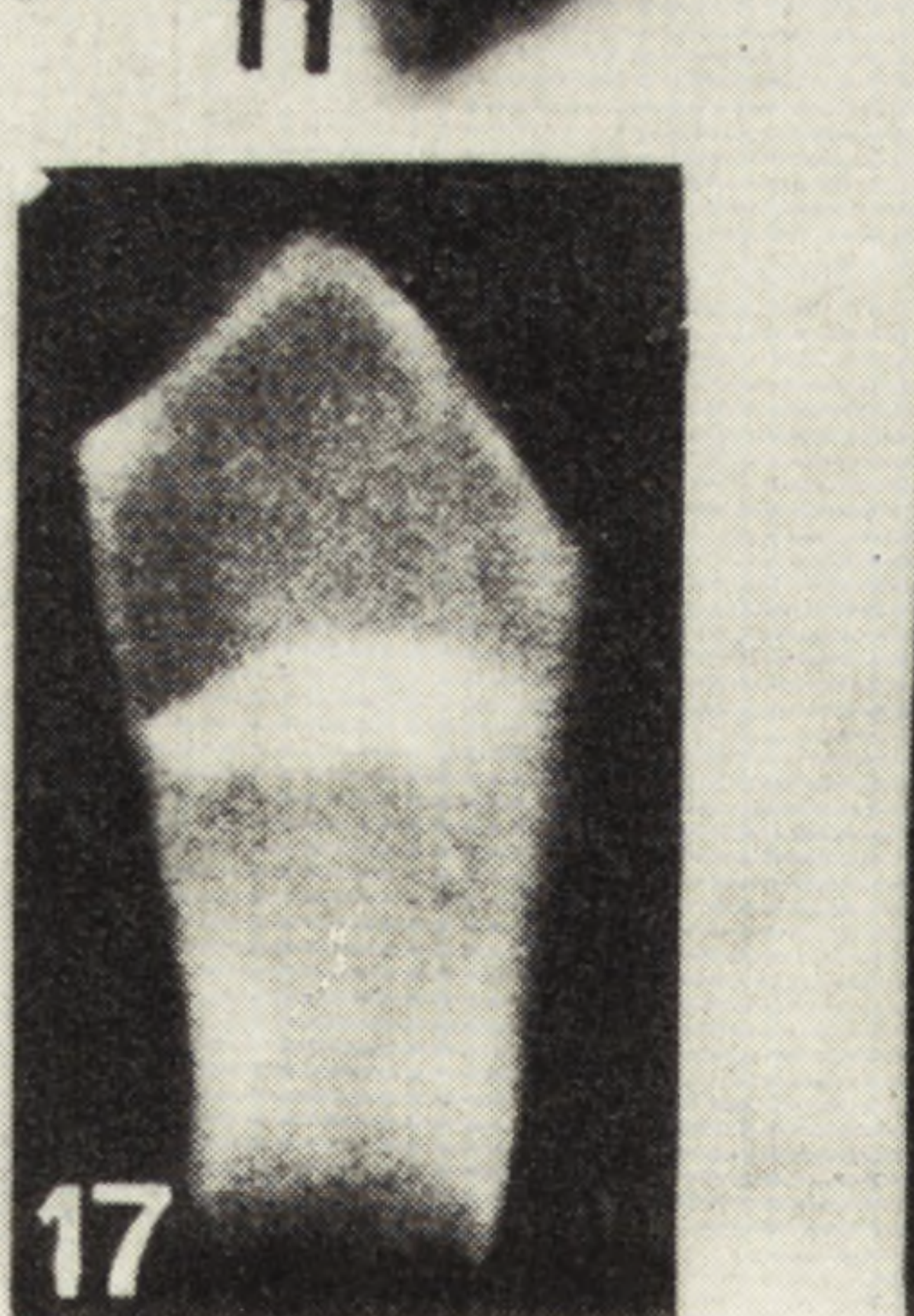
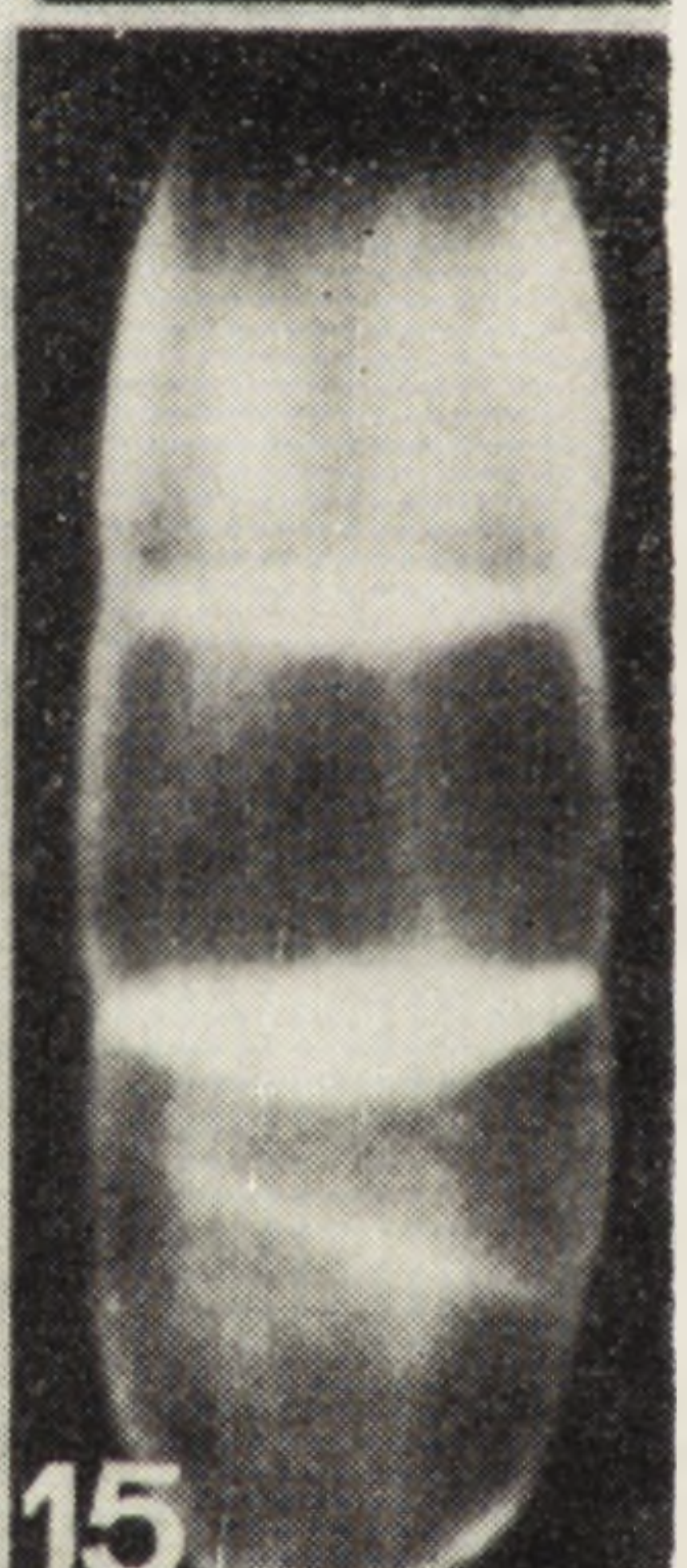
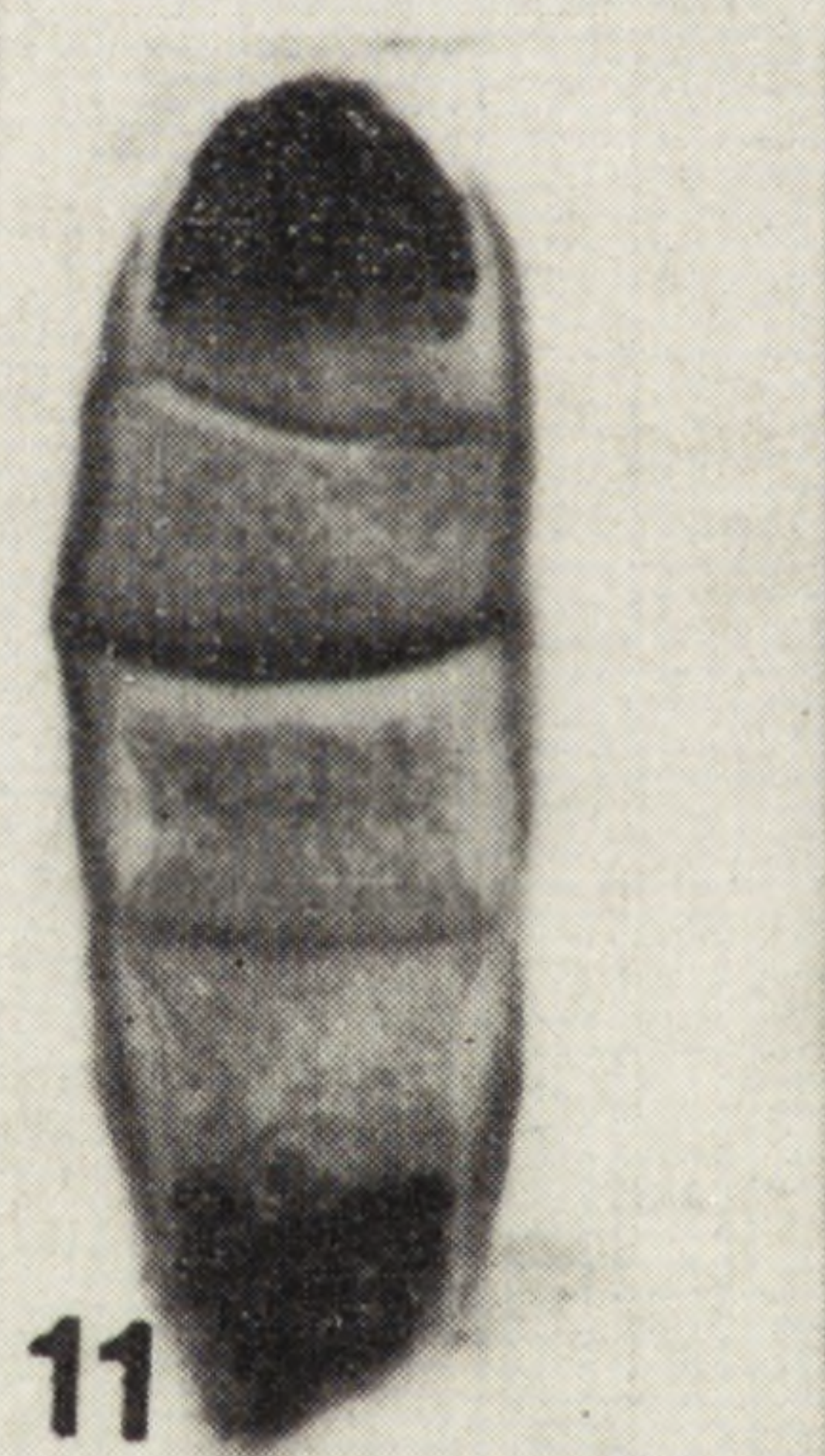
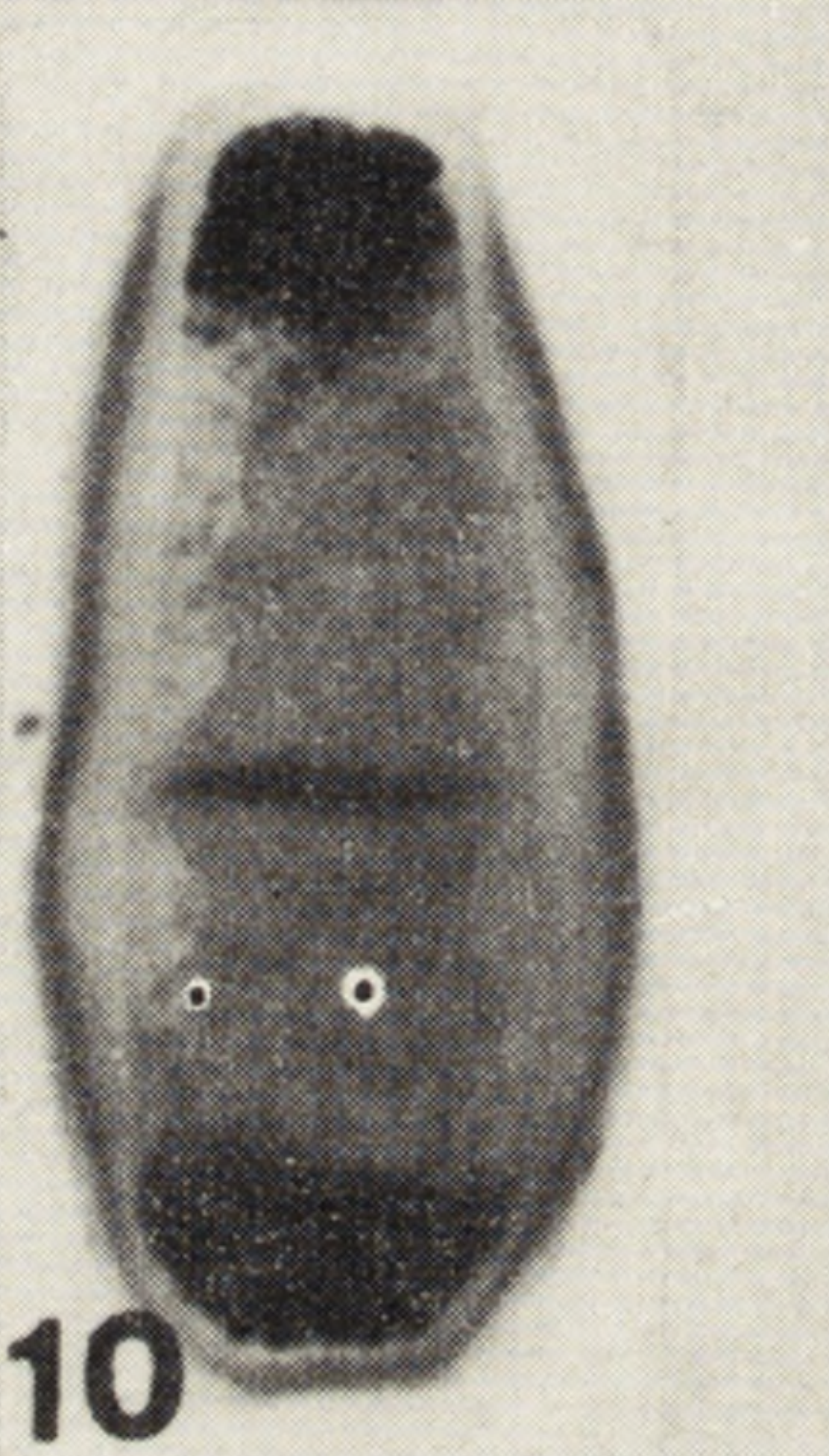
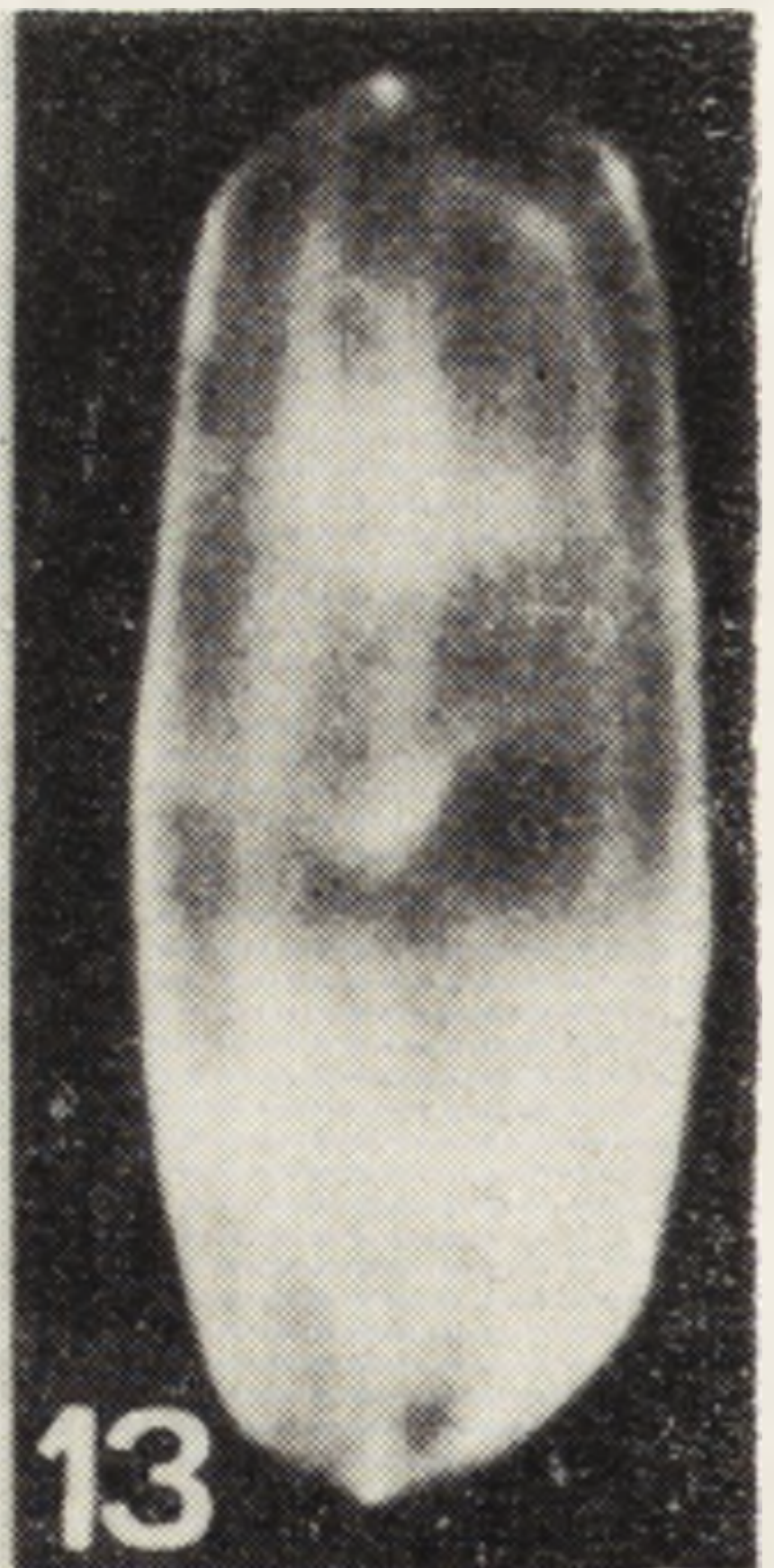
Ryc. 7. Cytoplazma mejocytu *Epipactis palustre* w stadium I mejotycznej anafazy

Obszar cytoplazmy ograniczony cysternami (ER).  $\times 10\,000$  (wsp. zdjęcia J. Bednara)











mieszczenia kalozy podczas megasporogenezy: jeden właściwy rozwojowi woreczka zalążkowego typu *Polygonum* (ryc. 19), drugi *Oenothera* (ryc. 20). W obu typach po krótkim, początkowym okresie, kiedy cały mejocyt jest otoczony kalożą, następuje zanikanie kalozy na jednym z wierzchołków mejocytu. Jeszcze w ciągu pierwszej mejotycznej profazy kaloza znika z całego lub części wierzchołka chalazalnego — w typie *Polygonum*, a z mikropylarnego — w typie *Oenothera* [77, 79]. Następnie kalozowe przegrody oddzielają powstające z mejocytu komórki diady, triady i tetrazy (ryc. 13–15, 17, 18).

Ilość kalozy, jeżeli sądzić po intensywności fluorescencji w reakcji z błękitem anilinowym, bywa bardzo różne u różnych gatunków i rodzin, a zmienia się także w ciągu megasporogenezy [55]. Są gatunki, w których ściana mejocytu ma bardzo małą ilość kalozy lub w ogóle nie daje odpowiedniej reakcji. Z reguły jednak i u tych gatunków ściany oddzielające komórki diady i megaspory, czyli poprzeczne ściany linearnej tetrazy, zawierają dużo kalozy [47, 55, 82, 89].

Można od razu zauważyć zbieżność między umiejscowieniem bezkalozowej części ściany mejocytu a położeniem funkcjonalnej megaspory w tetradzie. W typie *Polygonum* bowiem funkcjonalna megaspora jest na biegunie chalazalnym, a w typie *Oenothera* — na mikropylarnym. W funkcjonalnych megasporach odpowiednio ściana chalazalna lub mikropylarna są bez kalozy. W zbadanych gatunkach bisporowych, gdzie funkcjonuje megaspora chalazalna, również chalazalny wierzchołek ściany nie ma kalozy (ryc. 16).

Początkowo wydawało się, że takiej zgodności położenia ściany kalozowej i funkcjonalnej megaspory nie ma u storczyków *Orchis* [84] i *Epipactis*. U obu bowiem chalazalna ściana mejocytu ma dużo kalozy (ryc. 2, 3), a jednak funkcjonuje megaspora chalazalna.

Ryc. 8. Mikropylarna połowa mejocytu *Epilobium palustre* w I mejotycznej profazie

Plastydy zebrane na wierzchołku mikropylarnym, N — część jądra komórkowego, A — amyloplasty, ściana mejocytu wysłana jasną warstwą kalozy z wyjątkiem wierzchołka mikropylarnego.  $\times 4000$ , (wsp. zdjęcia J. Bednara).

Ryc. 9–12. Rozmieszczenie materiału PAS dodatniego w komórkach ulegających mejozie w zalążku *Epilobium* sp. (*Onagraceae*) (wsp. zdjęć R. Snieżko)

Kolejne zdjęcia przedstawiają rozmieszczenie ziaren skrobi w mejocycie, diadzie, tetradzie megaspor i w triadzie, w której chalazalna komórka nie podzieliła się całkowicie; w komórce tej nastąpiła hydroliza skrobi typowa dla tetrad z rozwijającą się funkcjonalną megasporą na biegunie mikropylarnym.  $\times 1000$

Ryc. 13–15. Fluorescencja kalozy w megasporogenezie u *Epilobium* sp.  $\times 1000$

Kolejne zdjęcia pokazują mejocyt otoczony całkowicie fluoryzującą ścianą, diadę i tetradę bez fluorescencji na wierzchołku mikropylarnym

Ryc. 16–18. Fluorescencja kalozy w ścianach w czasie megasporogenezy.  $\times 1000$

Kolejne zdjęcia przedstawiają mejocyt *Convallaria majalis*, której woreczek zalążkowy rozwija się według typu bisporowego, diadę i triadę *Capsella bursa pastoris* z monosporowym woreczkiem zalążkowym typu *Polygonum*. U wszystkich braknie kalozy na chalazalnym wierzchołku, gdzie rozwija się megaspora funkcjonalna



## PLASMODESMY I WYROSTKI W ŚCIANIE MEJOCYTU

Przy bliższym zbadaniu wspomnianej niezgodności stwierdzono, że warstwa kalozy w ścianie chalazalnej jest nieciągła [79] i podziurawiona jak sito (ryc. 4), pozostałe zaś ściany są wysłane ciągłą warstwą kalozy [81]. Wzór rozmieszczenia kalozy jest zatem w zasadzie taki sam, jak u innych roślin typu *Polygonum*. Ułożenie się kalozy w formie sita wynika ze szczególnej budowy ściany chalazalnej. Składa się ona z dwu warstw: zewnętrznej — z palczastymi wyrostkami i guzkami skierowanymi ku środkowi mejocytu (ta sama ściana jest potem w megasporze funkcjonalnej, ryc. 5); wewnętrznej — utworzonej przez kalozę wypełniającą przestrzeń między wyrostkami, które zatem zajmują oczka sita kalozowego (ryc. 23). Prócz tego przez ścianę chalazalną przechodzą plazmodesmy łączące mejocyt z sąsiednią komórką somatyczną (ryc. 6). Plazmodesmy te biegną w dosyć skomplikowany sposób (ryc. 24). W ścianie komórki somatycznej są one prostopadłe do podstawy wyrostków ściany mejocytu, przechodząc stamtąd do ściany mejocytu plazmodesmy wyginają się i omijając wyrostki przecinają warstwę kalozową [7, 9]. Plazmodesmy zauważono także w ścianie mikropylarnego wierzchołka funkcjonalnych megaspor u *Oenothera* [50] i *Epilobium* [8].

Znalezienie w megasporogenezie plazmodesm między mejotyczną komórką a komórkami sporofitu było pewnego rodzaju niespodzianką, ponieważ w odpowiednich stadiach mikrosporogenezy, uważanej za proces homologiczny, wszystkie plazmodesmy znikają, przerwane przez grubą warstwę kalozy [35, 60, 42]. Również w megasporogenezie storczyka *Dendrobium* nie znaleziono plazmodesm w ścianach profazowego mejocytu [45]. Autorzy nie określają jednak, które ściany były oglądane i dlatego ich spostrzeżenia nie muszą być sprzeczne z naszymi [7, 9]. Plazmodesmy są bowiem tylko w ścianie chalazalnej, możliwej do zobaczenia jedynie w mejocycie przekrojonym równoległe do długiej osi — mikropylarno-chalazalnej. Najczęściej zaś otrzymuje się preparaty w innych płaszczyznach przekroju pokazujących ściany boczne bez plazmodesm. Tym niemniej twierdzenie o kompletnym braku plazmodesm w ścianie podczas megasporogenezy zostało przyjęte i wielokrotnie przytaczane w omówieniach i rozważaniach o megasporogenezie.

Z wymienionych prac wynika, że w mejocycie i funkcjonalnej megasporze storczyka *Epipactis* (o typie *Polygonum*) ściana chalazalna jest przecięta plazmodesmami, analogicznie w typie *Oenothera* plazmodesmy są w mikropylarnej ścianie megaspory funkcjonalnej.

## ROLA WARSTWY KALOZOWEJ

Wytworzenie się warstwy kalozowej w ścianie wyodrębnia mejocyt od pozostałych komórek zalążka i samo przez się wskazuje na zmia-



ny metabolizmu; mejocyt jest przecież jedyną komórką zalążka, w której wtedy powstają warunki do intensywnej syntezy kalozy.

Według obiegowego przekonania, ciągła warstwa kalozy otaczająca mejocyt spełnia rolę wybiórczego filtra molekularnego, który izoluje od otoczenia mejocyt i każdą z młodych pomejotycznych komórek [42, 43, 52]. Nie jest jednak jasne, jakie są granice i mechanizm działania tego hipotetycznego filtra [35], tematowi bowiem przepuszczalności kalozowych ścian mikrosporocytów poświęcono, o dziwo, znikomo mało doświadczeń. Niezależnie od precyzyjności oceny stanu rzeczy można twierdzić, że wytworzona warstwa kalozy zmienia w jakiś sposób właściwości ściany komórkowej, a zatem musi stwarzać w mejocycie inne warunki niż w komórkach bez ściany kalozowej. Być może warstwa kalozy zmniejsza przepuszczalność ściany komórkowej dla niektórych substancji.

Wrażenie o izolacji mejocytu potęguje się, jeśli weźmiemy pod uwagę brak połączeń plazmatycznych we wszystkich ścianach z wyjątkiem ściany chalazalnej lub mikropylarnej ( w zależności od typu rozwoju woreczka zalążkowego). Kiedy wytworzy się bariera kalozowa, warunki wewnątrz mejocytu zostają zmienione w porównaniu z tymi, które panowały poprzednio. Taka zmiana warunków, bliżej zresztą nie określona, nie może być bez wpływu na kierunek rozwoju. Późniejsze zanikanie bariery kalozowej na jednym z wierzchołków mejocytu dowodzi istnienia biegunowego zróżnicowania cytoplazmy i z kolei przyczynia się do zwiększenia tego zróżnicowania. Prawdopodobnie bowiem dostępność i działanie czynników środowiska nie jest jednakowe na każdym z wierzchołków. Mejocyt staje się układem heteropolarnym, w którym na jednym biegunie różnicuje się funkcjonalna megaspory. W typowej mikrosporogenezie spolaryzowane mejocyty opisano tylko u traw [16, 92].

U pewnych roślin mejocyt nie wytwarza otoczki kalozowej [47, 55, 67, 82, 88, 89, 98], występuje wtedy mniej lub bardziej wyraźna tendencja do różnicowania się funkcjonalnej megaspory na obu biegunach tetrady. To zjawisko w pewnym stopniu potwierdza rolę warstwy kalozowej w procesie heteropolaryzacji komórek. W zalążku działają jednak i inne mechanizmy kierujące heteropolaryzacją tetrady; są bowiem także rośliny, które pomimo braku kalozy w mejocycie wytwarzają funkcjonalną megaspore na jednym, określonym biegunie [89].

#### POLARYZACJA MEJOCYTU

Różnicowanie w histogenezie obejmuje zwykle zespoły złożone z licznych komórek dzielących się mniej lub bardziej symetrycznie. Początkiem różnicowania się niektórych typów komórek jest polaryzacja komórki macierzystej i następnie jej asymetryczny podział na dwie komórki. Każda z tych komórek różnicuje się w odmienny sposób [13, 15]. Pola-



ryzacja komórki przed podziałem różnicującym wyraża się czasem zmianami w cytoplazmie, np. przemieszczaniem się ER, diktiosomów czy innych elementów komórkowych [3, 36]. Płaszczyznę asymetrycznego podziału (podobnie jak i symetrycznego) wyznacza pierścień mikrotubul, ale asymetryczne położenie tego pierścienia jest raczej skutkiem, a nie przyczyną polaryzacji [70].

Różnicujący się mejocyt leży wzdłuż osi zalążka łączącej jego wierzchołek z podstawą — oś mikropylarno - chalazalna. Takie położenie narzuca polaryzację komórce mejotycznej, rozwija się ona bowiem w organie zróżnicowanym biegunowo. Ostatecznym przejawem polaryzacji pomejotycznej tetrady jest utworzenie się na jednym wierzchołku funkcjonalnej megaspory i degeneracja pozostałych.

Wpływ położenia mejocytu na sposób konstytuowania się tetrady widać w zalążkach bawełny. Zalążki te zawierają po kilka mejocytów przechodzących tym bardziej prawidłową megasporogenezę, im bliżej położone są bieguna chalazalnego. Wskazuje to wyraźnie na zróżnicowanie na terenie zalążka warunków determinujących rozwój [90].

U wielu roślin monosporowego typu *Polygonum* wyróżnicowanie się funkcjonalnej megaspory jest poprzedzone asymetrycznymi podziałami najpierw mejocytu, a potem chalazalnej komórki diady. Utworzona megaspory funkcjonalna ma znacznie więcej cytoplazmy niż każda z degenerujących się megaspor. Pomimo częstych opisów podziałów asymetrycznych nie ma żadnych dokładniejszych badań na ten temat. U niektórych gatunków typu *Polygonum* notowano częstsze lub rzadsze przejmowanie roli funkcjonalnej megaspory przez inną niż chalazalną komórkę tetrady [11, 21, 26–28, 53, 54, 64, 72, 73].

Dokładniej opisano polaryzację mejocytu u *Helleborus* [30], niektórych *Ranunculaceae* [31], *Fritillaria* — tetrasporowy typ [91] i *Iris pseudoacorus* [57]. U tej ostatniej rośliny subepidermalna komórka zalążka wydłuża się i ulega polaryzacji przejawiającej się w przesunięciu jądra w kierunku mikropylarnym i nierównomiernym rozmieszczeniu cytoplazmy. Komórka ta dzieli się asymetrycznie na mniejszą komórkę przykrywkową (somatyczną) i większą komórkę przekształcającą się w mejocyt. Jeżeli z jakichś powodów podział był symetryczny, to obie komórki potomne rozpoczynają mejozę. W mejocycie jądro komórkowe również leży w szczytowej, mikropylarnej części cytoplazmy i podziały są znowu asymetryczne. Dopiero kiedy funkcjonalna megaspory staje się woreczkiem zalążkowym, jądro komórkowe przesuwa się do centrum i następuje depolaryzacja komórki [57], przynajmniej okresowa.

W megasporogenezie niektórych roślin opisano zmiany rozmieszczenia organoidów świadczące o biegunowym zróżnicowaniu mejocytu i tetrady. Już w dawnej pracy o *Casuarina* są dane o pojawieniu się na obu



wierzchołkach mejocytu gęstej substancji nazwanej trofoplazmą, która była tylko w wierzchołkowych częściach megaspori mikropylarnej i chalazalnej [51]; ten sam autor z początku bieżącego stulecia podaje, że podobnie jest rozmieszczona trofoplazma u *Cynomorium* (*Euphorbiaceae*).

U kilku gatunków z rodziny *Onagraceae* [89] oraz *Orchidaceae* [88] pierwsze oznaki biegunowego zróżnicowania cytoplazmy mejocytu pojawiają się przed utworzeniem się otoczki kalozowej. W wydłużonym mejocyocie *Onagraceae* mogą wystąpić dwa typy zróżnicowania: homeopolarne, kiedy oba wierzchołki są do siebie bardzo podobne, i zróżnicowanie heteropolarne [46, 67], u storczyków zaś jedynie heteropolarne.

#### SEGREGACJA PLASTYDÓW W MEJOCYCIE

W archesporze (przedmejotycznej komórce) zalążków *Onagraceae* [89] i *Orchidaceae* [88] oraz niewielu gatunków innych roślin syntetyzują się ziarna skrobi i, jak się zdaje, wszystkie plastydy działają wtedy jako amyloplasty [80]. U *Onagraceae* plastydy mejocytu są rozdzielane na dwie grupy, z których jedna trafia do mikropylarnej, a druga do chalazalnej megaspori [49, 50, 80, 83]. U *Orchidaceae* podział taki nie zachodzi, toteż plastydy są we wszystkich megasporach tetrady [88].

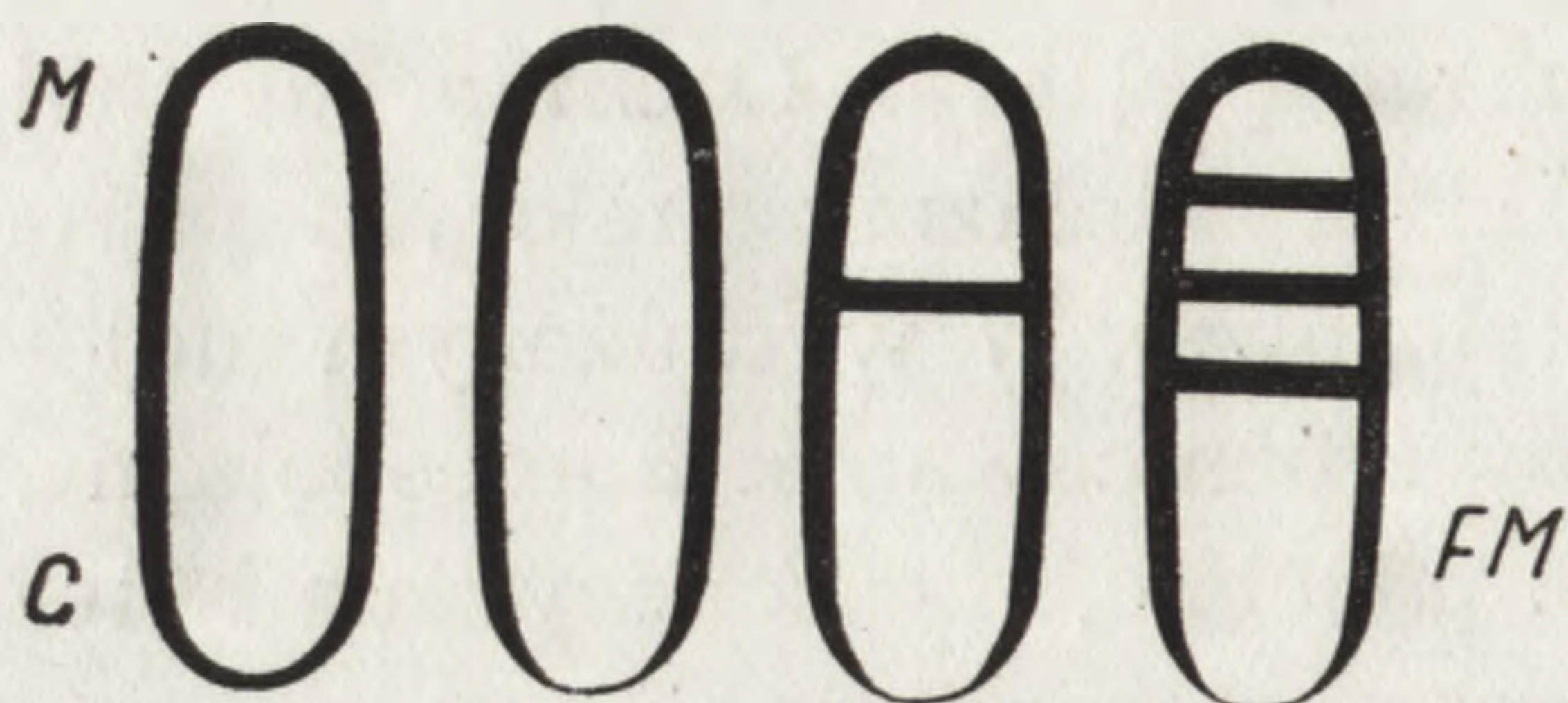
Początkowo ziarna skrobi są rozrzucone w całej cytoplazmie, ale u *Onagraceae* w miarę wydłużania się mejocytu wszystkie ziarna skrobi (i plastydy) zbierają się w dwie grupy położone na przeciwległych wierzchołkach komórki (ryc. 9). W tym czasie cytoplazma mejocytu różnicuje się na strefy, w których zebrane są odmienne rodzaje organoidów (ryc. 8). Obie strefy wierzchołkowe wypełniają się plastydami, środkową część zajmuje jądro otoczone gęsto diktiosomami, między strefami wierzchołkowymi a perinuklearną rozciąga się cytoplazma z dużą liczbą cystern ER; jedynie mitochondria są rozrzucone mniej więcej równomiernie w całej komórce.

Pierwszy podział mejotyczny odbywa się w płaszczyźnie równikowej mejocytu, podobnie drugi — w płaszczyznach równikowych komórek diady (ryc. 10, 12). W rezultacie tetradą składa się z megaspor o równej w przybliżeniu wielkości, ale różniących się zestawami organoidów. Wszystkie typy organoidów są zawarte w megasporach chalazalnych i mikropylarnych, natomiast obie megaspori środkowe zupełnie nie mają plastydów i zdają się być bogatsze w diktiosomy (ryc. 25).

Symetryczne podziały w trakcie mejozy i równy rozdział plastydów pomiędzy wierzchołkowe megaspori mogą świadczyć o tym, że oba bieguny mejocytu są podobne i komórka przejawia oznaki homeopolarności. Homeopolarność mejocytu nie jest jednak całkowita, bo jego mikropylarna ściana traci kalozę (ryc. 14), a drugi podział jest wprowadzie

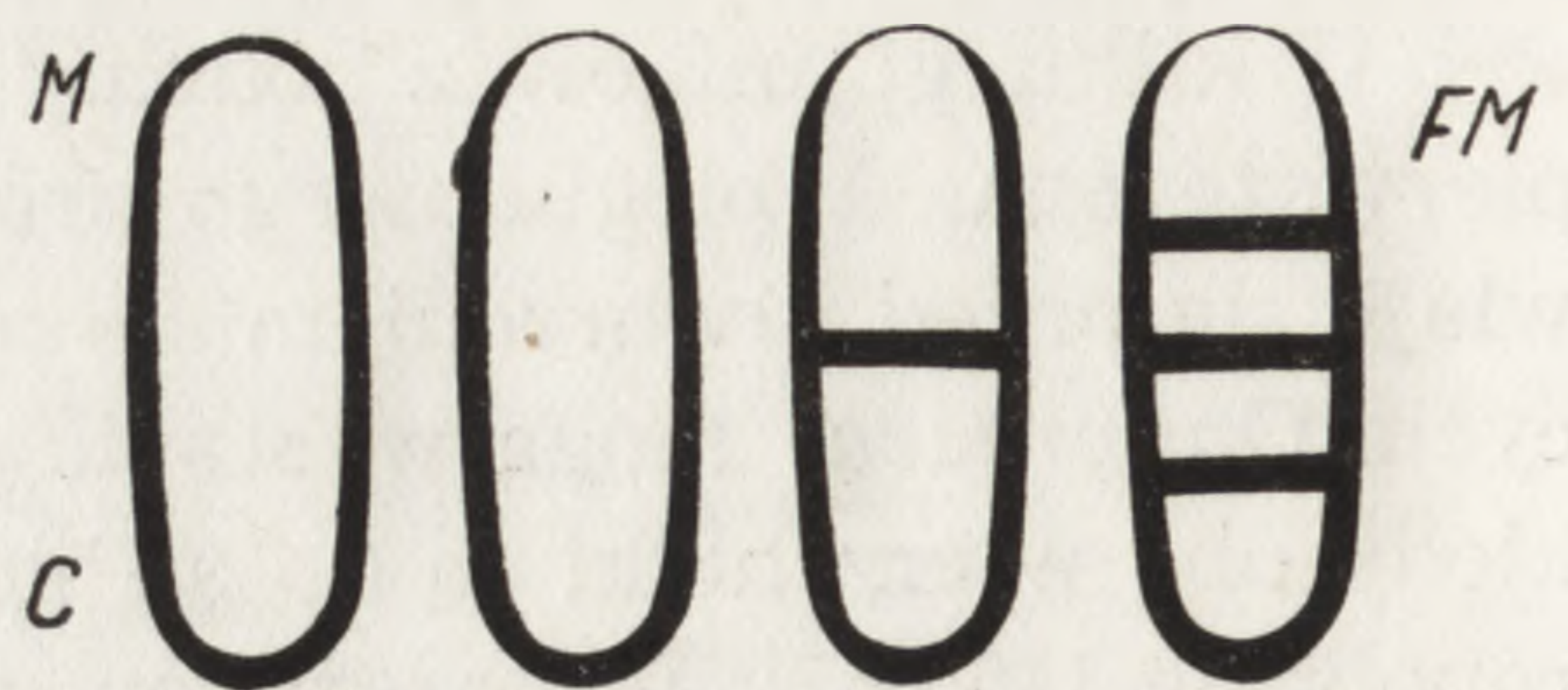


symetryczny, ale zwykle odbywa się asynchronicznie, z opróżnieniem w komórce chalazalnej (ryc. 12). Komórka ta jest w całości otoczona ścianą zawierającą kalozę (ryc. 14, 15).



Ryc. 19. Rozmieszczenie kalozy w megasporogenezie u gatunków o monosporowym typie rozwoju woreczka zalążkowego (*Polygonum*)

M — biegun mikropylarny, C — biegun chalazalny, FM — megaspora funkcjonalna



Ryc. 20. Rozmieszczenie kalozy w megasporogenezie u roślin o monosporowym woreczku zalążkowym typu *Oenothera* (oznaczenia jak na ryc. 19)

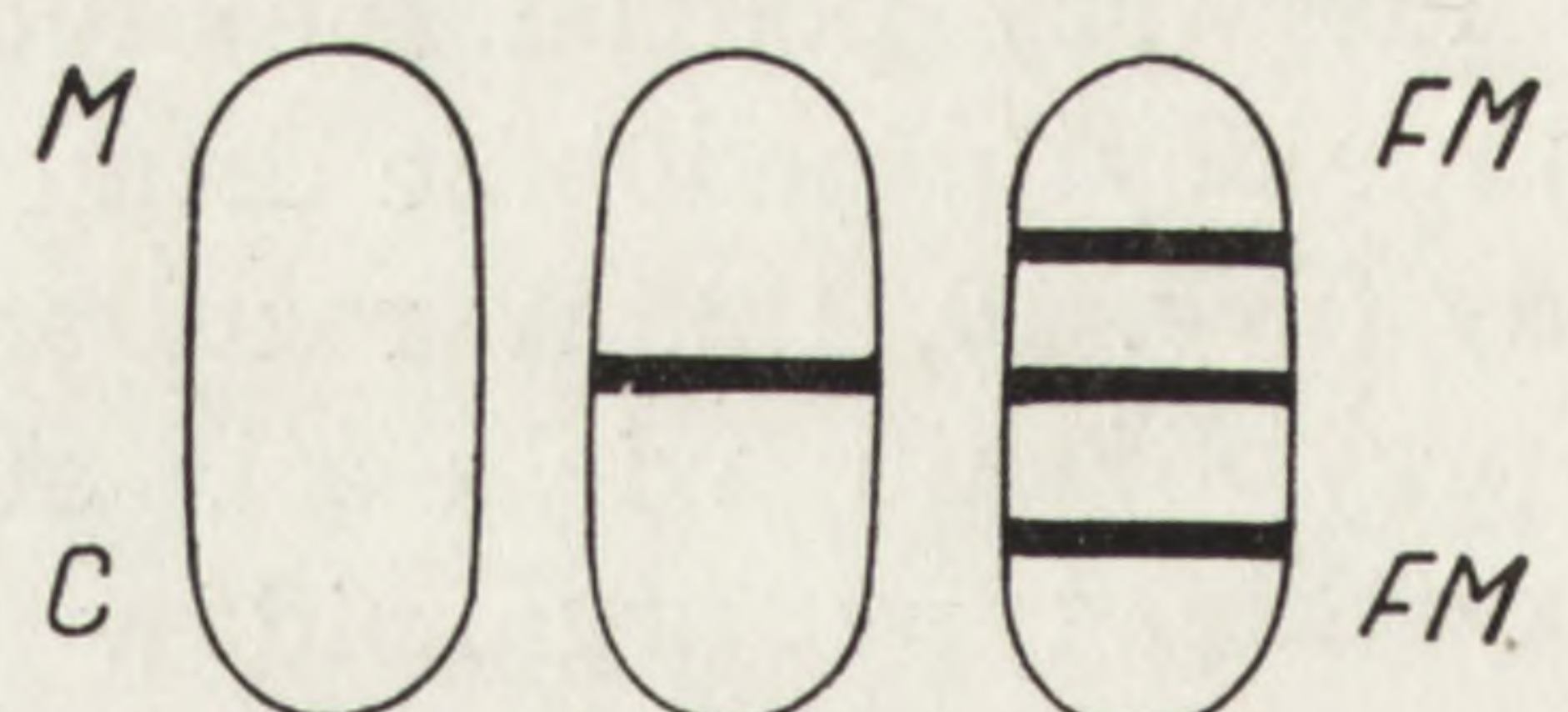
Wierzchołkowe megaspory w tetradzie muszą mieć jednakowe potencjalne zdolności do rozwinięcia się w woreczek zalążkowy, nie różnią się bowiem od siebie budową wewnętrzną. Różnią się jednak od siebie położeniem w zalążku i budową ścian komórkowych. Całą megasporeę chalazalną otacza ściana z kalożą, podczas gdy w megasporze mikropylarnej część ściany od strony mikropyle nie ma kalozy i w dodatku jest przecinana przez plazmodesmy. Ta właśnie megaspora rozwija się w żeński gametofit, gdy tymczasem megaspora chalazalna bardziej odizolowana od tkanek sporofitu obumiera, podobnie jak niepełnowartościowe megaspory bez plastydów [80, 83, 89].

Można przypuścić, że w początkach rozwoju mejocytu *Onagraceae* jest komórka homeopolarna, w której plastydy ulegają równomiernej segregacji na dwa bieguny. Komórka ta jednak u większości *Onagraceae*



Ryc. 21. Rozmieszczenie kalozy w megasporogenezie u *Orchis* i *Epipactis* (*Orchidaceae*)

Rozwija się woreczek zalążkowy monosporowy typu *Polygonum*, kaloza wydaje się otaczać całe komórki, jednak chalazalna ściana ma nieciągłą warstwę kalozową, co pokazują ryc. 23 i 24



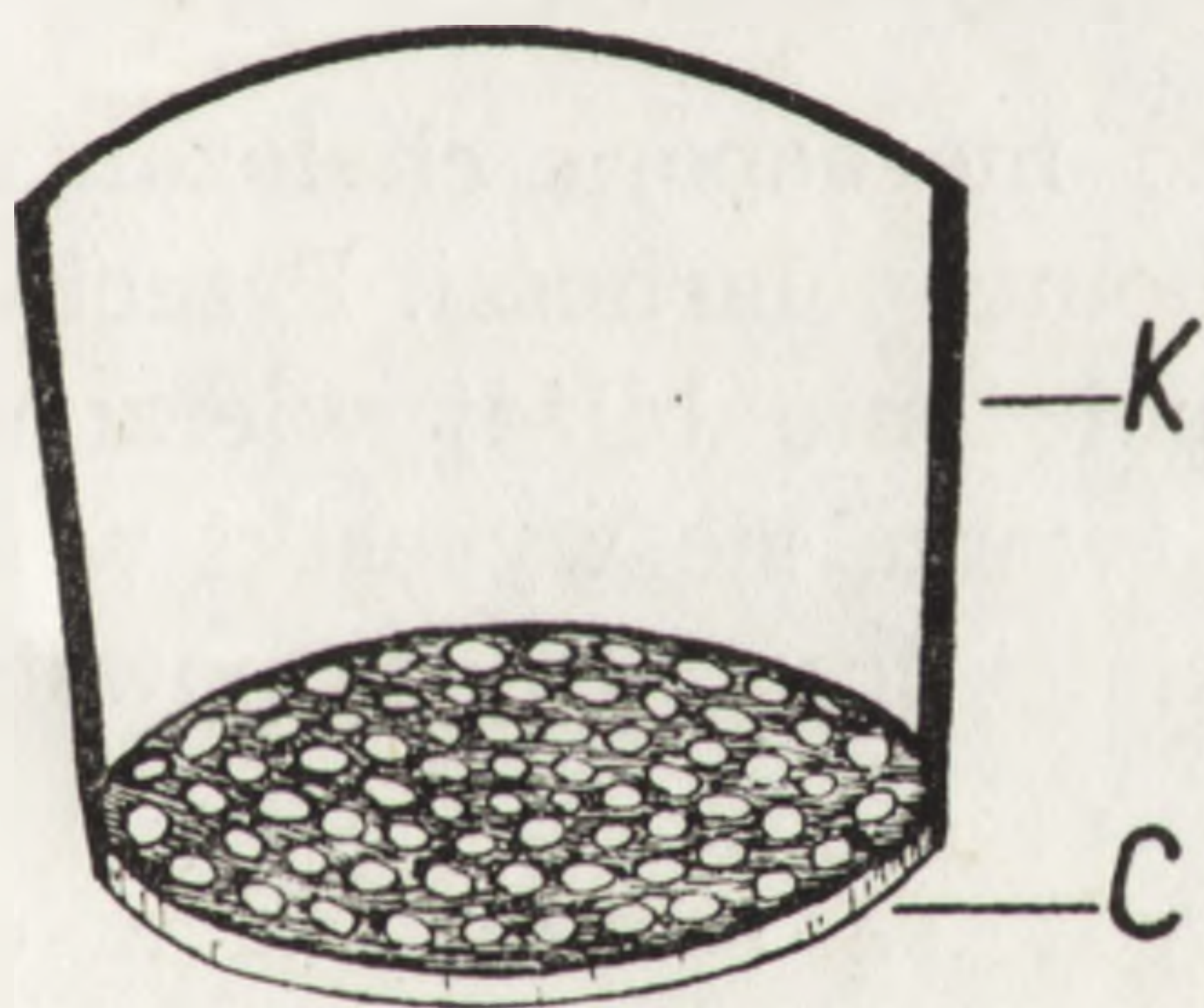
Ryc. 22. Rozmieszczenie kalozy u gatunków *Onagraceae*, w których rozwija się homeopolarna tetradą z funkcjonalną megasporą położoną alternatywnie, tylko ściany poprzeczne mają dużo kalozy (oznaczenia jak na ryc. 19)



staje się heteropolarną, co przejawia się w zróżnicowaniu ściany, a potem w powstaniu funkcjonalnej megaspory na mikropylarnym biegunie tetrady.

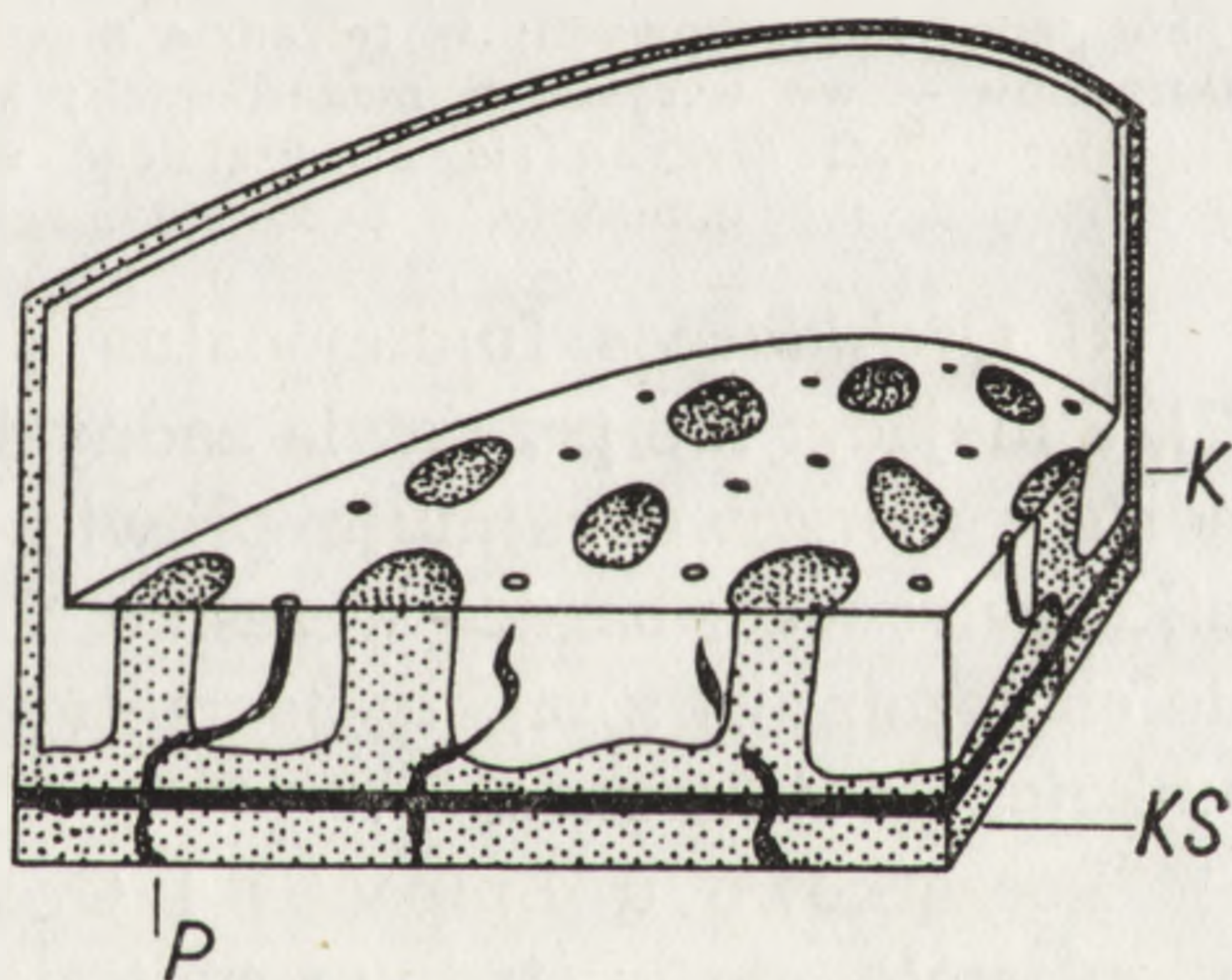
#### POŁOŻENIE FUNKCJONALNEJ MEGASPORY W TETRADZIE

Przemiana mejocytu homeopolarnego w heteropolarny nie zachodzi we wszystkich gatunkach *Onagraceae*. W rodzinie tej są gatunki, w których wytwarza się w pełni homeopolarna tetradą z funkcjonalną megasporą rozwijającą się bądź na biegunie mikropylarnym, bądź na chalazalnym (ryc. 22) — efekt Rennera [74], a także gatunki o słabej heteropolarności i wreszcie gatunki zdecydowanie heteropolarne. Homeopolarność i tendencja do homeopolarności jest w jakimś stopniu związana z brakiem lub małą ilością kalozy w ścianie mejocytu, a później w zewnętrznych ścianach tetrady [67, 68, 83, 89, 98]. U wszystkich *Onagraceae* zaznacza się jednak w ontogenezie megaspor tendencja do homeopolarności, wyrażona przede wszystkim segregacją plastydów.



Ryc. 23. Chalazalna ściana mejocytów *Orchis* i *Epipactis*

Kalozowe części: C — ściana chalazalna (zakreskowana), K — ściana boczna



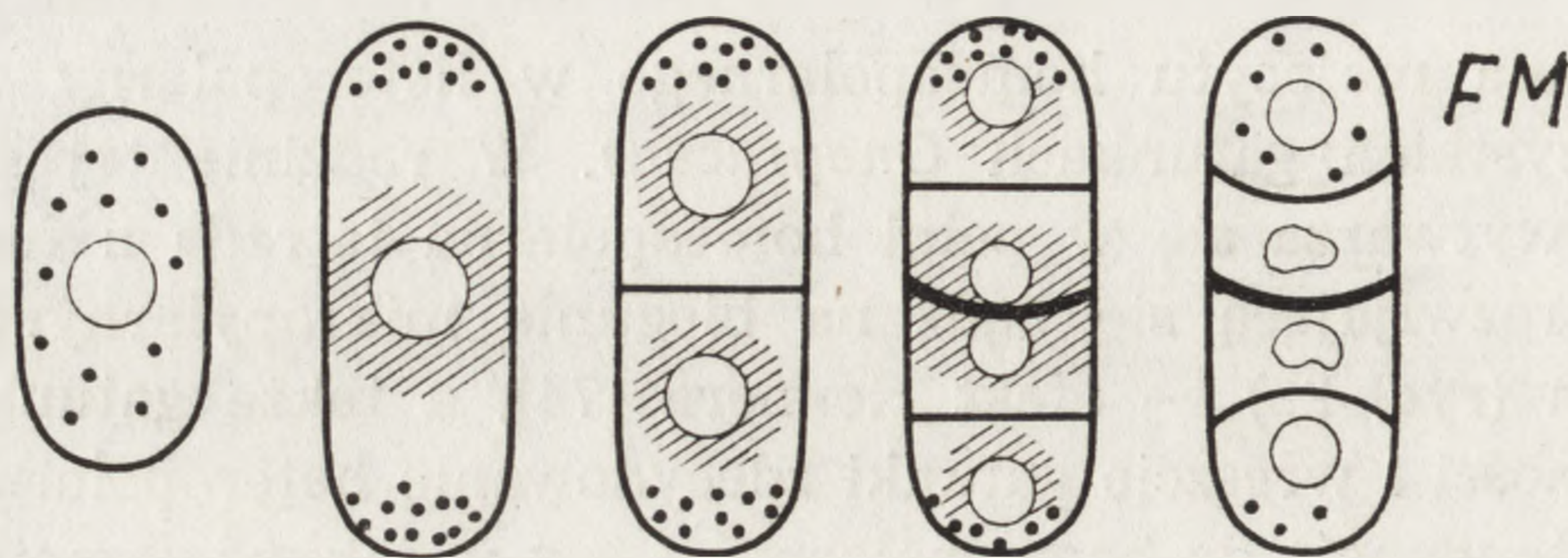
Ryc. 24. Chalazalna ściana mejocytu *Epipactis*

Zakropkowana zewnętrzna warstwa ściany mejocytu — K i oddzielona od niej blaszką środkową ściana komórki somatycznej — KS, warstwa kalozy (nie zakropkowana) jest poprzecinana przez plazmodesmy — P i wyrostki zewnętrznej warstwy ściany

Nawet przy braku kalozy w ścianie mejocytu i zewnętrznych ścianach tetrady może się ostatecznie wytworzyć heteropolarny układ z funkcjonalną megasporą na biegunie mikropylarnym [89]. Wynika stąd, że wytworzenie się ściany kalozowej i jej zróżnicowanie nie jest czynnikiem koniecznym, chociaż bardzo często widocznym w megasporogenezie. Ale



jeśli ściana kalozowa powstaje, to z reguły rozwija się układ heteropolarny, a wykluczony zostaje rozwój układu homeopolarnego megaspor, nawet w rodzinie *Onagraceae*, gdzie w ontogenezie mejocytu zawsze zaznacza się tendencja do homeopolarności wyrażonej segregacją plastydów.



Ryc. 25. Schemat rozmieszczenia plastydów i diktiosomów w megasporogenezie u *Epilobium* (*Onagraceae*)

Położenie plastydów oznaczone kropkami, diktiosomów — kreskami. W przedmejotycznej komórce plastidy i diktiosomy rozmieszczone są bezładnie, w I profazie mejotycznej wszystkie plastidy grupują się na biegunach mejocytu, a dużo diktiosomów w strefie perinuklearnej; w diadzie plastidy pozostają na swych miejscach, a diktiosomy są głównie wokół jąder komórkowych; w tetradzie plastidy są tylko na wierzchołkach dwu megaspor, diktiosomy — we wszystkich megasporach; kiedy na biegunie mikropylarnym funkcjonalna megaspóra (FM) zaczyna się przekształcać w woreczek zalążkowy, plastidy jej zmieniają położenie, a pozostałe megaspory stopniowo degenerują

U *Orchidaceae* funkcjonalna jest zawsze megaspóra chalazalna [1, 97], a mejocyt nie przejawia żadnych oznak homeopolarności. Przeciwnie, jądro komórkowe zajmuje prawie zawsze położenie bliżej wierzchołka mikropylarnego, bardzo wczesnie w rozwoju tworzą się wyrostki w ścianie chalazalnej i z reguły asymetryczne podziały prowadzą do powstania funkcjonalnej megaspory.

Początkowo u *Epipactis* i *Orchis* plastidy są rozrzucone w całej cytoplazmie, ale w stadium syniezis, kiedy chromosomy I profazy mejotycznej tworzą splot przylegający do otoczki jądrowej, plastidy skupiają się w mikropylarnej części komórki. W późniejszej profazie plastidy rozchodzą się znowu po całej cytoplazmie, ale skupiają się głównie w chalazalnej części komórki [9, 88]. Wielka liczba plastydów znajduje się również w tej części mejocytu innego storczyka *Epidendron* [17]. Po I i II podziale mejotycznym większość plastydów pozostaje w chalazalnej megasporze, ale pewna liczba plastydów i skrobi jest widoczna w każdej z degenerujących się megaspor [88].

Przy porównaniu megasporogenezy u *Orchidaceae* i *Onagraceae* wiadać kilka różnic i pewne podobieństwa. Przede wszystkim mejocyt — u badanych storczyków ma on ścianę chalazalną o złożonej strukturze nie spotykanej dotychczas gdzie indziej. Być może tego rodzaju ściana jest przystosowaniem służącym do silnego spolaryzowania komórki i zapew-



nienia asymetrycznych podziałów. U *Onagraceae* zaś mejocyt ma tendencję do homeopolarności, ale w ontogenezie rozwijają się heteropolarne tetrady u większości gatunków, niektóre są homeopolarne i wytwarzają megaspory na każdym z biegunów tetrady. Segregacja plastydów do dwubiegunowych megaspor była dotychczas zauważona tylko w rodzinie *Onagraceae*. Być może segregacja plastydów w megasporogenezie o tendencjach do homeopolarności jest przystosowaniem, które zapobiega rozwojowi dwu środkowych megaspor i wyklucza je z konkurencji odbywającej się między wierzchołkowymi megasporami homeopolarnej tetrady.

Zasadniczym podobieństwem między przedstawicielami *Onagraceae* o heteropolarnych tetradach, a *Orchidaceae* i roślinami wielu innych rodzin jest wytwarzanie w mejocycie otoczki kalozowej, która znika z tego bieguna, gdzie różnicuje się funkcjonalna megaspory. Drugim mniej dokładnie stwierdzonym podobieństwem jest występowanie plazmodesm w ścianie wierzchołka megaspor funkcjonalnej.

#### LITERATURA

- [1] ABE K., Contributions to the embryology of the family *Orchidaceae*. VI. Development of the embryo sac in 15 species of orchids, *Sci. Rep. Tôhoku Univ. Biol.*, **36**: 135–178, 1972.
- [2] ARENS K., Provo de calose per meio da microscopia a luz fluorescente e applicacoes do metodo, *Lilloa Rev. Bot* **18**: 71–75, 1949.
- [3] AVERS C. J., Fine structure studies of Phleum root meristem cells II. Mitotic asymmetry and cellular differentiation, *Amer. J. Bot.*, **50**: 140–148, 1963.
- [4] BARTKOWIAK E., Nowe kierunki w hodowli tkanek i komórek roślinnych in vitro, *Post. Biol. Kom.*, **3**: 161–233, 1976.
- [5] BATYGINA T. B., Some peculiar features of macrosporogenesis and development of the female gametophyte in wheat, *Ann. Univ. ARERS, (Reims)*, **9**: 46–50, 1971.
- [6] — Embriologija pszenicy, Kołos, Leningrad 1974.
- [7] BEDNARA J., Plasmodesmata and ingrowths of chalazal wall in megasporogenesis in an orchid *Epipactis*, *Bull. Soc. Bot., France* 1976 (w druku).
- [8] — Embriologia *Epilobium palustre*. IV Ściany komórkowe w tetradzie megaspor, *Folia Soc. Sci., Lublin* 1977 (w druku).
- [9] BEDNARA J., STOBIECKA H., RODKIEWICZ B., Ultrastructure of meiotic cells in ovules of an orchid *Epipactis*, *Acta Med. Pol.*, **18**: 285–286, 1977.
- [10] BIENFAIT A., WATERKEYN L., Sur la nature des parois sporocytaires chez les Mousses et chez quelques Ptéridophytes, *C. R. Acad. Sci. Paris*, **282**: 2079–2081, 1976.
- [11] BJORNSTAD I. N., Comparative embryology of Asparagoideae-Polygonateae, *Liliaceae*, *Norv. J. Bot.*, **17**: 169–207, 1970.
- [12] BOUIN M., BOUIN P., Sur le développement de la cellule-mère du sac



- embryonnaire des Liliacées et en particulier sur l'évolution des formations ergastoplastiques, Arch. Anat. Micr. Morph. Exper., 2: 419-454, 1898.
- [13] BLOCH R., Polarity and gradients in plants: a survey, [w] Handbuch der Pflanzenphysiologie, red. W. Ruhland, 15 (1), Springer, Berlin 1965.
- [14] BOER DE JEU I., Ultrastructural aspects of megasporogenesis in *Lilium*, Bull. Soc. Bot., France 1976 (w druku).
- [15] BUNNING E., Polarität und inäquale Teilung des pflanzlichen Protoplasten, Protoplasmatologia VIII, Springer, Wien 1958.
- [16] CHRISTENSEN J. E., HORNER H. T., Pollen pore development and its spatial orientation during microsporogenesis in the grass *Sorghum bicolor*, Amer. J. Bot., 61: 604-623, 1974.
- [17] COCCUCI A. E., Embriologia de orquideas, la megaspora de *Epidendrum scutella*, Kurtziana, 5: 7-21, 1969.
- [18] CURRIER H. B., Callose substance in plant cells, Amer. J. Bot., 44: 478-488, 1957.
- [19] CZAPIK R., Embryological studies in the genus *Potentilla* L., I. *P. crantzii*, Acta Biol. Cracov. Bot., 4: 97-119, 1961.
- [20] — Embryological studies in the genus *Potentilla* L., II. *Potentilla arenaria*, Acta Biol. Cracov. Bot., 5: 29-42, 1962.
- [21] — Mechanizm różnicowania cytologicznego w triploidalnych populacjach *Ornithogalum umbellatum*, Acta Biol. Cracov. Bot., 9: 65-86, 1966.
- [22] DICKINSON H. G., Nucleo-cytoplasmic interaction following meiosis in the young microspores of *Lilium longiflorum*. Events at the nuclear envelope, Grana, 2: 107-127, 1971.
- [23] DICKINSON H. G., ANDREWS L., The role of membrane-bound cytoplasmic inclusions during gametogenesis in *Lilium longiflorum* Thunb., Planta, 134: 229-240, 1977.
- [24] DICKINSON H. G., HESLOP-HARRISON J., Ribosomes, membranes and organelles during meiosis in angiosperms, Phil. Trans. R. Soc. London B, 277: 327-342, 1977.
- [25] DUMAS A., Au sujet des caractères ultrastructuraux de l'archéspore et des très jeunes stades du sac embryonnaire de *Conium maculatum*, Ann. Univ. ARERS, 9: 51-57, 1971.
- [26] DZEWAŁTOVSKIJ A. K., Osoblivosti rozvitku zinoczego gametofita u *Lagenaria vulgaris* ser. ta *Luffa cylindrica* (L.) Roem., Pitannja Eksperiment. Bot., Inst. Bot., 88-95, Kijv 1964.
- [27] Embriologiczeskie issledovanija predstavitelej semejstva tykvennych, Citol. Genet., 1: 31-42, 1967.
- [28] ERDELSKA O., The occurrence of two functioning megaspores in the ovules of *Galanthus nivalis*, Biol. Plant. (Praha), 17: 311-313, 1975.
- [29] ERNST A., Chromosomenreduktion, Entwicklung des Embryosackes und Befruchtung bei *Paris quadrifolia* und *Trillium grandiflorum*, Flora, 91: 1-46, 1902.
- [30] EYME J., Recherches cytologiques sur la gamétophyte femelle de *Helleborus foetidus* et *Helleborus niger*, Botaniste, 44: 255-289, 1961.
- [31] — Recherches sur les constituants cytoplasmiques dans l'ovule des renonculacées; l'ergastoplasme chez *Caltha palustris* L., *Ficaria ranunculoides* Roth. et *Nigella damascena* L., Botaniste, 45: 163-189, 1962.
- [32] — Recherches sur la constitution cytoplasmique de l'archéspore et du sac embryonnaire de *Lilium candidum* L., Botaniste, 48: 99-155, 1965.



- [33] FLINT F. F., JOHANSEN D. A., Nucleoplasmic relationship in the *Fritillaria* type of megagametogenesis, *Amer. J. Bot.*, **45**: 464-472, 1958.
- [34] GABARA B., Cytokinesis in pollen mother cells. II. *Magnolia soulangeana* Soul., *Biochem. Physiol. Pflanz.*, **162**: 450-458, 1971.
- [35] — Kaloza w komórkach roślinnych w świetle nowych badań, *Post. Biol. Kom.*, **4**: 279-302, 1977.
- [36] GALATIS B., APOSTOLAKOS P., On the fine structure of differentiating mucilage papillae of *Marchantia*, *Canad. J. Bot.*, **55**: 772-795, 1977.
- [37] GODINEAU J - C., Ultrastructure des différents tissus de l'ovule du *Crepis tectorum* L. au moment de la prophase méiotique. Données sur le cytoplasme de la cellule - mère de mégaspores, *C. R. Acad. Sci. Paris*, **266**: 1008-1010, 1968.
- [38] GORSKA - BRYLASS A., Callose in the wall of the developing male gametophyte in *Gymnospermae*, *Acta Soc. Bot. Pol.*, **37**: 119-124, 1968.
- [39] — Callose in gametogenesis in liverworts, *Bull. Acad. Pol.*, **17**: 549-554, 1969.
- [40] — The callose stage of the generative cells in pollen grains, *Grana*, **10**: 21-31, 1970.
- [41] GUILLIERMOND A., Recherches sur l'évolution du chondriome pendant le développement du sac embryonnaire et des cellules mères des grains de pollen dans les Liliacées et sur la signification des formations ergastoplasmiques, *Ann. Sci. nat. Bot.* **X**, **6**: 5-52, 1924.
- [42] HESLOP - HARRISON J., Cell walls, membranes and protoplasmic connections during meiosis and pollen development, [w] *Pollen Physiology and Fertilization*, red. H. F. Linskens, N. Holland, Amsterdam 1964.
- [43] — Sexuality in angiosperms, [w] *Plant Physiology*, red. F. C. Steward, t. VI, Acad. Press, New York, London 1972.
- [44] HORNER H. T., BELTZ C. K., Cellular differentiation of heterospory in *Selaginella*, *Protoplasma*, **71**: 335-340, 1970.
- [45] ISRAEL H. W., SAGAWA Y., Post - pollination ovule development in *Dendrobium* orchids. III. Fine structure of meiotic prophase I, *Caryologia*, **18**: 15-35, 1965.
- [46] JALOUZOT - ROMAIN M - F., Aspects cytologiques du développement de l'ovule d'*Oenothera biennis*, *Ann. Univ. ARERS*, **7**: 85-95, 1969.
- [47] JALOUZOT M - F., Aspects ultrastructuraux de la mégasporogénèse d'*Oenothera lamarckiana* en rapport avec les dépôts callosiques observés, *Ann. Univ. ARERS*, **9**: 36-45, 1971.
- [48] — Mise en évidence de parois callosiques au cours de la mégasporogénèse et de oogénèse d'*Oenothera biennis*, *C. R. Acad. Sci. Paris*, **270**: 317-319, 1970.
- [49] — Quelques aspects ultrastructuraux des noyau du mégasporocyte d'*Oenothera lamarckiana* en prophase hétérotypique, *Caryologia (supl.)* **25**: 67-84, 1973.
- [50] — Différentiation des éléments de la tétrade femelle chez *Oenothera erythrosepala* Bordas, *Bull. Soc. Bot., France* 1976 (w druku).
- [51] JUEL H. O., Ein Beitrag zur Entwicklungsgeschichte der Samenanlage von *Casuarina*, *Flora*, **92**: 234-293, 1903.
- [52] KNOX R. B., HESLOP - HARRISON J., Direct demonstration of the low permeability of the meiotic angiosperm tetrad using a fluorogenic ester, *Zeits. Pflanzenphysiol.*, **62**: 451-459, 1970.
- [53] KOROBOVA - SEMENCZENKO L. V., K embriologii semejstva *Saxifragaceae*. IV. Megasporogenez, razvitie ženskogo gametofita, endosperma i zarodysza



- u *Saxifraga moschata* Wulf., [w] Morfologija cvetkovych rastenij, Nauka, Moskva 1971.
- [54] KRUPKO S., Megasporogenesis and development of the embryo sac in the *Palestina* variety of *Trifolium alexandrinum* L., *Acta Soc. Bot. Pol.*, **44**: 617-625, 1973.
- [55] KURAN H., Callose localization in the walls of megasporocytes and megasporocytes in the course of development of monospore embryo sacs, *Acta Soc. Bot. Pol.*, **51**: 519-534, 1972.
- [56] KURAN H., MARCINIAK K., Badania cytochemiczne woreczka zalążkowego *Lilium regale* w różnych fazach rozwoju, *Acta Soc. Bot. Pol.*, **38**: 83-92, 1969.
- [57] LE COQ C., La mégasporogénèse chez l'Iris pseudoacorus L. I. Étude cytologique qualitative, *Rev. Cytol. Biol. Vég.*, **35**: 41-164, 1972.
- [58] MANGIN L., Observations sur le développement du pollen, *Bull. Soc. Bot. France*, **36**: 386-393, 1889.
- [59] MARCINIAK K., Cytochemical investigations of the megasporocyte and embryo sac in *Lilium regale* at various stages of development, *Acta Soc. Bot. Pol.*, **44**: 335-347, 1975.
- [60] MASCARENHAS J. P., The biochemistry of angiosperm pollen development, *Bot. Rev.*, **41**: 259-314, 1975.
- [61] MIKI-HIROSIGE H., Metabolism in the ovary tissue of *Lilium longiflorum*, [w] *Pollen Physiology and Fertilization*, red. H. F. Linskens, North-Holland, Amsterdam 1964.
- [62] MIKULSKA E., RODKIEWICZ B., Fine structure of a developing embryo sac of *Lilium candidum*, *Flora*, **155**: 586-595, 1965.
- [63] — Fine structure of four-nucleate stages and the central cell of *Lilium regale* embryo sac, *Flora, Abt. A*, **157**: 365-372, 1967.
- [64] MITCHELL J. P., Megasporogenesis and microsporogenesis in *Vicia faba*, *Canad. J. Bot.*, **53**: 2804-2812, 1975.
- [65] MOTTIER D. M., Ueber das Verhalten der Kerne bei der Entwicklung des Embryosacks und die Vorgänge bei Befruchtung, *Jb. Wiss. Bot.*, **31**: 125-158, 1898.
- [66] NEWCOMB W., The development of the embryo sac of sunflower *Helianthus annuus* before fertilization, *Canad. J. Bot.*, **51**: 863-878, 1973.
- [67] NOHER DE HALAC I., HARTE C., Female gametophyte competition in relation to polarisation phenomena during the megasporogenesis and development of the embryo sac in the genus *Oenothera*, [w] *Gamete Competition in Plants and Animals*, red. D. L. Mulcahy, North-Holland, Amsterdam 1975.
- [68] — Different patterns of callose wall formation during megasporogenesis in two species of *Oenothera* (*Onagraceae*), *Plant Syst. Evol.*, **127**: 23-38, 1977.
- [69] ORMAN E., Recherches sur la différenciation cytoplasmique (ergastoplasme et chondriome) dans les végétaux. I. Le sac embryonnaire des Liliacées, *Cellule*, **28**: 365-441, 1913.
- [70] PICKET-HEAPS J. P., Preprophase microtubules and stomatal differentiation in *Commelina cyanea*, *Austral. J. Bot. Sci.*, **22**: 375-391, 1969.
- [71] PY G., Recherches cytologiques sur l'assise nourricière des microspores et les microspores des plantes vasculaires, *Rév. Gen. Bot.*, **44**: 316-368, 369-413, 450-462, 1932.
- [72] REMBERT D. H., Comparative megasporogenesis in *Papilionaceae*, *Amer. J. Bot.*, **56**: 584-591, 1969.



- [73] — Phylogenetic significance of megaspore tetrad patterns in *Leguminales*, *Phytomorphology*, **21**: 1–9, 1971.
- [74] RENNER O., Heterogamie im weiblichen Geschlecht und Embryosackentwicklung bei *Oenothera*, *Zeitschr. Bot.*, **13**: 609–621, 1921.
- [75] REYNOLDS J. D., DASHEK W. V., Cytochemical analysis of callose localization in *Lilium longiflorum* pollen tubes, *Ann. Bot.*, **40**: 409–416, 1976.
- [76] RODKIEWICZ B., Walls with callose in the megaspores and hypostase of ovules of *Antirrhinum majus* observed in a fluorescence microscope, *Bull. Acad. Pol. Sci.*, **15**: 493–495, 1967.
- [77] — Callose in cell walls during megasporogenesis in angiosperms, *Planta*, **93**: 39–47, 1970.
- [78] — Callose walls in megaspores in *Fuchsia* and *Epilobium*, *Caryologia*, (Supl.) **25**: 59–66, 1973.
- [79] — Sieve-like distribution of callose in meiocyte chalazal wall in ovules of orchid *Epipactis*, *Bull. Acad. Pol. Sci.*, **23**: 707–711, 1975.
- [80] RODKIEWICZ B., BEDNARA J., Distribution of organelles and starch grains during megasporogenesis in *Epilobium*, [w] *Fertilization in Higher Plants*, red. H. F. Linskens, North-Holland, Amsterdam 1974.
- [81] — Cell wall ingrowths and callose distribution in megasporogenesis in some *Orchidaceae*, *Phytomorphology*, **26**: 276–281, 1976.
- [82] RODKIEWICZ B., BEDNARA J., PORA H., Alternative localization of the active megaspore in tetrads in *Oenothera muricata*, *Bull. Acad. Pol.*, **19**: 691–694, 1971.
- [83] RODKIEWICZ B., BEDNARA J., SNIEŻKO R., Poljarizacija kletok v megasporogeneze u *Onagraceae*, *Bot. Žur.*, **61**: 905–909, 1976.
- [84] RODKIEWICZ B., GORSKA-BRYLASS A., Occurrence of callose in the walls of meiotically dividing cells in the ovule of *Orchis*, *Naturwissenschaften*, **54**: 499, 1967.
- [85] RODKIEWICZ B., KWIATKOWSKA M., Enzymy hydrolityczne w rozwijającym się woreczku zalążkowym lili, *Acta Soc. Bot. Pol.*, **34**: 235–242, 1965.
- [86] RODKIEWICZ B., MIKULSKA E., The development of cytoplasmic structures in the electron microscope, *Planta*, **67**: 297–304, 1965.
- [87] — Electron microscope observations of endoplasmic reticulum in *Lilium* megasporocyte, *Flora*, **155**: 341–346, 1965.
- [88] RODKIEWICZ B., STOBIECKA H., Distribution of starch grains in the meiocyte and megaspores of *Orchis* and *Epipactis*, *Bull. Acad. Pol. Sci.* (w druku).
- [89] RODKIEWICZ B., SNIEŻKO R., Differentiation of functional megaspore in *Onagraceae*, *Bull. Soc. Bot.*, France 1976 (w druku).
- [90] ROMANOV I. D., Embriologiczeskie issledovaniya chlopczatnika. II. Makrosporogenez i izmenczivost formy tetrad makrospor, *Trudy Srednoazjatskogo Gos. Univ.*, **73** (20:) 1–45, 1955.
- [91] — Opyt analiza nekotorych osobennostej razvitija zarodyszevogo meszka *Fritillaria*-tipa, *Bot. Žur.*, **50**: 1276–1286, 1965.
- [92] — Osobennosti razvitija pylcy zlakov i znaczenie ich dlja nekotorych genetscheskich issledovanij, *Genetika*, **6** (10): 11–24, 1970.
- [93] SCHWAB C. A., Callose in megasporogenesis of *Dirrhena* (*Gramineae*), *Cand. J. Bot.*, **49**: 1523–1524, 1971.
- [94] SLOOVER J. L., Études sur les *Cycadales*. I. Méiose et mégasporogénèse chez *Encephalartos poggei* Asch., *Cellule*, **62**: 103–116, 1961.



- [95] SOLNCEVA M. P., O razvitii mnogokletocznego archesporija u zemljaniki, [w] Morfologija cvetka i reproductivnyj process u pokrytosemennych rastenij, red. M. S. Jakovlev, Nauka, Moskva, Leningrad 1965.
- [96] SUNDERLAND N., Anther culture: a progress report, Sci. Prog., Oxf., **59**: 527-549, 1971.
- [97] SWAMY B. G. L., Embryological studies in the *Orchioaceae*, I. Gametophytes, Amer. Midland Naturalist, **41**: 184-201, 1949.
- [98] SNIEŻKO R., Distribution of polisaccharides during megasporogenesis in *Onagraceae*, Ann. Univ. M. Curie - Skłodowska, **31**: 183-191, 1976.
- [99] TARCHI A. M. F., Pareti callosiche nella sporogenesi di *Biota orientalis* Endl. Prime osservazioni, Gior. Bot. Ital., **103**: 515-520, 1963.
- [100] WATERKEYN L., Étude des dépôts callosiques au niveau des parois sporocytaires, au moyen de la microscope de fluorescence, C. R. Acad. Sci. Paris, **252**: 4025-4027, 1961.
- [101] WATERKEYN L., BIENFAIT A., Morphologie et nature des parois sporocytaires chez les Ptéridophytes, Cellule, **69**: 7-23, 1971.
- [102] WOODCOCK C. L. F., BELL P. R., Features of the ultrastructure of the female gametophyte of *Myosurus minimus*, J. Ultrastr. Res., **22**: 546-563.

Otrzymano: 18 października 1977 r.

Przyjęto: 23 października 1977.

Adres autora: ul. Akademicka 19, 20 - 033 Lublin.



## CYTOLOGICZNE PROBLEMY ZWIĄZANE ZE SZTUCZNYM UNASIENNANIEM ZWIERZĄT

### CYTOLOGICAL PROBLEMS CONNECTED WITH ARTIFICIAL INSEMINATION OF ANIMALS

Jerzy MORSTIN

Instytut Genetyki i Hodowli Zwierząt Polskiej Akademii Nauk w Jastrzębcu

*Streszczenie:* Dokonano przeglądu najważniejszych badań nad cytologicznymi problemami związanymi ze sztucznym unasiennianiem zwierząt. Omówiono rozwój badań nad rozrodem zwierząt i zasady oceny morfologicznej wad plemników oraz ich związek z płodnością. Przedstawiono czynniki wpływające na zaburzenia reprodukcyjne i uszkodzenia plemników. Szczególną uwagę poświęcono cytologicznym problemom związanym z konserwacją nasienia.

*Summary.* A review was completed of the most important investigations on cytological problems connected with the artificial insemination of animals. Presented are experiments on the reproduction of animals and the principles of estimation of spermatozoa defects and their effect on fertility. The factors causing reproduction disturbances as well as damages to spermatozoa are discussed. Special attention was devoted to the cytological problems connected with semen conservation.

Przez sztuczne unasiennianie rozumiemy sztuczne wprowadzenie nasienia do żeńskich dróg rodnych. Umożliwia ono lepsze wykorzystanie wartościowych rozplodników, pozwala na skuteczne oddziaływanie na hodowlę zwierząt w skali masowej, wpływa na podnoszenie płodności oraz zapobiega niepłodności i chorobom oraz zakażeniom przenoszonym w czasie krycia. Jest metodą hodowlaną, która przyjęła się na całym świecie tak powszechnie i szybko, jak chyba żadna inna metoda zootechniczna.

### ROZWÓJ SZTUCZNEGO UNASIENNIANIA I BADAŃ NAD ROZRODEM ZWIERZĄT

Inseminacja najszerszej weszła do praktyki w hodowli bydła. W ciągu jednego roku unasiennia się około 150 milionów krów [16], natomiast



w Polsce rocznie inseminuje się ponad 5 milionów sztuk krów, co stanowi przeszło 80% ich pogłowia [24].

Pierwsze naukowe badania sztucznego unasienniania zwierząt podjął w roku 1780 włoski fizjolog Spallanzani. Po zastosowaniu z dobrym skutkiem sztucznego unasienniania u różnych płazów, przeprowadził skuteczne unasiennienie suki. Doświadczenia Spallanzaniego zostały powtórzone w 1782 r. przez Rossiego i Branchiego (cyt. według [68]). Wykazały one, że za pomocą sztucznego unasienniania można spowodować ciążę i uzyskać normalne potomstwo. Spallanzani odkrył również, że plemniki pod wpływem niskiej temperatury (użył śniegu dla obniżenia temperatury) tracą ruchliwość, która powraca po podgrzaniu. Doświadczenia Spallanzaniego zapoczątkowały wnikliwe studia nad fizjologią komórek rozrodczych i nad zapłodnieniem w ogóle. Nie dały jednak, jak można by się było spodziewać, bodźca do dalszego rozwoju sztucznego unasienniania.

Dopiero w drugiej połowie XIX w. zainteresowano się znowu tym problemem. W 1866 r. Mantagezza (cyt. według [36]) wykazał, że plemniki ludzkie mogą przeżyć przy działaniu temperatur dochodzących do  $-17^{\circ}\text{C}$ . W pracy swojej, pt. „Hańba temu kto o tym źle myśli”, autor przepowiadał, że żołnierze polegli na polach bitew mając zdeponowane nasienie będą mogli legalnie płodzić swych spadkobierców. Sugerował nawet, że nadejdzie czas, kiedy nasienie ogierów i buhajów będzie transportowane na duże odległości dla poprawy hodowli. Był jednak „prekursorem” przedwczesnym, gdyż ówczesna technika nie potrafiła uzyskać dostatecznie niskich temperatur, które blokowałyby procesy biochemiczne komórki.

Po raz pierwszy metodę sztucznego unasienniania pod hasłem „poprawy pogłowia zwierząt domowych” zastosowano w Rosji (1900 r.). Najbardziej zasłużonym badaczem jest tu Iwanow, którego należy uważać za pioniera sztucznego unasienniania zwierząt domowych (cyt. według [68]). Prace te i badania prowadzono nadal w Związku Radzieckim pod kierunkiem Miłowanowa. Wyniki osiągnięte tam wzbudziły zainteresowanie na całym świecie i od początku 1930 r. we wszystkich niemal krajach europejskich oraz w USA zaczęto zajmować się sztucznym unasiennianiem i prowadzić intensywne prace doświadczalne poświęcone temu doświadczeniu. Udoskonalono głównie technikę sztucznego unasienniania opracowując nowe metody rozrzedzania i konserwacji nasienia [17, 68]. Następną ważną datą w historii badań nad rozrodem jest rok 1949, kiedy to Anglicy w czasie swych prac nad konserwacją nasienia koguta udowodnili ochronne działanie gliceryny dla zamrażanych plemników koguta i ssaków. To fundamentalne odkrycie w krótkim czasie daje wyniki: rodzi się cielę od sztucznie unasiennionej krowy inseminowanej nasieniem zamrożonym w  $-79^{\circ}\text{C}$  [60, 69]. Otwiera to drogę do wielkiej



ilości badań nad zamrażaniem nasienia. Od tego czasu rozwija się prawdziwa rewolucja techniczna w inseminacji bydła i wprowadzone zostają do praktyki nowe metody hodowlane oparte na możliwości długotrwałego przechowywania nasienia.

Opanowanie techniki zamrażania nasienia przygotowało z kolei pole do prób nad dalszym usprawnianiem metody konserwacji nasienia, mianowicie do przechowywania go w stanie odwodnionym. Po wieloletnich próbach w 1974 r. wysiłki te zostały uwieńczone sukcesem, kiedy to Graham i wsp. [25] donieśli o urodzeniu się cieląt po nasieniu liofilizowanym, a na Międzynarodowym Kongresie Rozrodu i Sztucznego Unasienniania Zwierząt w Krakowie w 1976 r. przedstawili dalsze rewelacyjne wyniki w tym zakresie [39]. Są to pierwsze udane doświadczenia od czasów Juszczenki (cyt. według [30]), który w 1957 r. uzyskał ciążę u królic, i Merymana [46], który w 1960 r. uzyskał ciążę u krowy. Wyników tych nie udało się jednak powtórnie osiągnąć ani autorom, ani badaczom, którzy próbowali sprawdzić tę technikę.

#### OCENA MORFOLOGICZNA WAD PLEMNIKÓW I ICH ZWIĄZEK Z PŁODNOŚCIĄ

Od chwili pobrania nasienia aż do wprowadzenia go do żeńskich dróg rodnych plemniki znajdują się poza organizmem. W tym czasie powinno się zapobiegać ich uszkodzeniom. Wobec tego należy zapoznać się z czynnikami wpływającymi na ich budowę i płodność.

W ocenie płodności rozplodników dużą wagę przywiązuje się do badania morfologicznego nasienia, uznanego za jedną z najbardziej obiektywnych metod pozwalających określić wartość nasienia. Rodzaj oraz ilość wad plemników obrazują stopień prawidłowości procesu ich powstawania, a między odsetkiem plemników anormalnych a płodnością istnieje ścisła korelacja negatywna.

Prekursorem badań nad morfologią plemników zwierząt był szwedzki anatom Gustaw Retzius (cyt. według [9]), który za pomocą mikroskopu świetlnego obejrzał, a następnie z dużą dokładnością opisał w 1909 r. wszystkie szczegóły budowy plemnika buhaja; obserwacje jego zostały potwierdzone z chwilą zastosowania mikroskopu elektronowego.

#### KLASYFIKACJA WAD PLEMNIKÓW

Większość oglądanych plemników w rozmazach nasienia samców zwierząt domowych ma typowy kształt, który można by nazwać prawidłowym dla danego gatunku. Poza plemnikami o typowym kształcie spotyka się stale pewną liczbę plemników o zmienionych formach, które nazywa się potocznie postaciami patologicznymi.

Liczba plemników patologicznych u osobników płodnych nie prze-



kracza zwykle kilku procent [2]. W licznych wypadkach obniżonej płodności lub niepłodności wzrasta liczba plemników zmienionych, a także występują specyficzne formy nie spotykane u samców płodnych.

Poprawna klasyfikacja różnych wad plemników w ejakulowanym nasieniu buhaja jest przedmiotem dyskusji już od wielu lat. Lagerlöf w 1934 r. (cyt. według [9]) zalecał zsumowanie wszystkich obserwowanych wad plemników, co w rezultacie prowadziło często do otrzymywania wysokich wartości nawet u buhajów o dobrej płodności.

Blom [5, 6] zaproponował usprawnienie systemu klasyfikacji przez podział wad plemników na dwie grupy:

1. zmiany pierwotne — tj. te, które powstają w czasie spermatogenezy i są związane z procesami patologicznymi przebiegającymi w nabłonku nasieniotwórczym,

2. zmiany wtórne — tj. te, które prawdopodobnie w większości wypadków powstają już po sformowaniu się plemnika i opuszczeniu przez niego jądra.

Schemat ten znalazł szerokie zastosowanie także w Polsce.

Trudności porównywania wyników uzyskiwanych u poszczególnych gatunków przy posługiwaniu się metodą Bloma spowodowały, że Biełański [2] opracował uproszczony schemat badań. Wprowadził on jednolite znakowanie poszczególnych postaci plemników, a także umożliwił rozszerzenie klasyfikacji na nowe, nieprzewidziane postacie zmienionych plemników.

Na podstawie rutynowych prac diagnostycznych i badań mikroskopem elektronowym Blom [11] zaproponował nowe zasady klasyfikacji plemników z podziałem na wady główne oraz pomniejsze. Zdefiniował je następująco:

(a) główne wady cechują wszystkie nieprawidłowe typy plemników, które zostały wykazane jako skorelowane z obniżoną płodnością,

(b) pomniejszymi wadami plemników są inne odchylenia w ich formach, które prawdopodobnie mają mniejsze znaczenie dla płodności buhaja.

Autor zaleca przyjmować za górny limit wad głównych dla normalnego nasienia — 15%. Przekroczenie tej liczby jest wskazówką, że w jądrach lub najądrzach występują jakieś zaburzenia.

## CZYNNIKI WPLYWAJĄCE NA ZABURZENIA REPRODUKCYJNE I USZKODZENIA PLEMNIKÓW

### WARUNKI ŚRODOWISKOWE

Po przeniesieniu samców (buhajów, tryków) z nizin do okolic wysokogórskich, z klimatu umiarkowanego do tropikalnego lub zimnego ob-



serwowano przeważnie znaczne zaburzenia w spermatogenezie [31]. Po upływie kilkunastu dni od chwili przeniesienia gęstość nasienia zaczyna maleć dochodząc w niektórych wypadkach do całkowitej azoospermii. Równocześnie obserwuje się wzrost odsetka nienormalnych plemników, czasami już w kilka dni po przeniesieniu. U niektórych osobników zmiany te po pewnym czasie (przeważnie po upływie kilku miesięcy) ustępowały, u innych utrzymywały się bardzo długo lub stale. Nie wszystkie samce reagowały jednakowo na przeniesienie — jedne znosiły skutki przeniesienia stosunkowo lekko, inne przechodziły znaczne uszkodzenia komórek plemnikotwórczych z całkowitą niepłodnością (cyt. według [31]).

Za czynnik prowadzący zwykle do uszkodzenia jakości nasienia uważane jest przegrzanie organizmu lub podniesienie się temperatury w obrębie jąder i najądrzy. Z doświadczeń nad zaburzeniami w wytwarzaniu plemników wiadomo, że najpewniejszym sposobem wywołania pogorszenia płodności i zmian w budowie histologicznej jąder jest miejscowe ogrzewanie jąder [31, 79].

Z licznych prac dotyczących wpływu podwyższonej temperatury na płodność samców zwierząt gospodarskich wynika, że w miesiącach letnich, w których panują upały, występuje wyraźne obniżenie produkcji nasienia i jego jakości, co w dalszej kolejności odbija się niekorzystnie na płodności samic [31, 33]. Stwierdzono także [3, 29], że sztuczne ochładzanie zwierząt w okresie upałów przeciwdziała pogarszaniu się nasienia buhajów przez zmniejszenie procentu martwych plemników.

Mechanizm działania podwyższonej temperatury na jądra i najądrza nie jest dostatecznie poznany. Nie wiadomo dotychczas, dlaczego podwyższona temperatura uszkadza jądra, nie wiadomo również w jaki sposób dochodzi do zaburzeń w spermatogenezie.

Do zaburzeń czynności układu płciowego, objawiających się spadkiem jakości nasienia lub uszkodzeniom plemników, dochodzi również na skutek takich przeciążeń, jak transport [35], odwodnienie ustroju [34] lub zmiany pór roku [22, 75].

#### WPLYWY ŻYWIENIOWE

Żywienie nie wpływa bezpośrednio na gonady, lecz drogą pośrednią poprzez neurohormonalną regulację przemiany materii. Na ogół stwierdza się, że utrzymanie wysokiego tempa wzrostu w ciągu okresu wychowu zwierząt, a zwłaszcza zbyt wysoki poziom białka w dawce pokarmowej, może wpływać ujemnie na jakość nasienia i histologiczną budowę narządów rodnych [20, 21, 53]. Godnymi uwagi pozycjami przeglądowymi, podsumowującymi wyniki nad zależnością między poziomem żywienia a wydajnością płciową buhajów, są opracowania Meyera [48] i Laszczki [40].



Doświadczenia ze skrajnym obniżeniem ogólnego poziomu składników odżywczych wykazały, że zakłócenia procesu spermatogenezy występują dopiero przy wyniszczeniu głodowym organizmu [41]. Nie stwierdza się jednak ujemnego wpływu bezpośrednich zmian składu dawek żywieniowych na ruchliwość plemników po zamrożeniu i rozmrożeniu [42]. Nie dotyczy to zaś jakości samych pasz jak również stopnia ich uwodnienia, np. poprzez wprowadzenie dużych dawek zielonek.

Szereg obserwacji [34, 40] skłania do twierdzenia, że niektóre pasze i stosowane zmiany w żywieniu ujemnie wpływają na wartość użytkową nasienia i pojawianie się form patologicznych plemników. Ten negatywny wpływ występuje bez względu na to czy zmiana dotyczy przejścia z paszy lepszej na gorszą, czy odwrotnie. Na ogół po upływie 6 tygodni od wprowadzenia zmiany w żywieniu wartość nasienia stopniowo się poprawia i wraca do stanu jak przed zmianą żywienia. Wykazano także, że niedobory mikroelementów oraz witamin wpływają na jakość nasienia i powodują pojawienie się nienormalnych plemników. [33] Bezpośredni wpływ na zaburzenia spermatogenezy ma witamina A, natomiast witaminy E, D i B mają wpływ pośredni.

#### TŁO DZIEDZICZNE WYSTĘPOWANIA WAD PLEMNIKÓW

Istnieją liczne dowody, że w występowaniu anomalii plemników może odgrywać rolę czynnik genetyczny [9, 63].

Charakterystyka niektórych ważniejszych zmian patologicznych plemników:

Buhaje dotknięte wadą „guzowatych plemników” są nieplodne, a cecha ta wydaje się mieć charakter dziedziczny i zależy od jakiegoś genu recesywnego [13]. Prawie cała populacja plemników tych buhajów wykazuje ekscentryczne zgrubienie na przedniej części główki plemnika. W mikroskopie elektronowym można dostrzec, że przednia część akrosomu tworzy nabrzmienie kilkakrotnie większe od normalnego brzegu akrosomu.

Anomalia rozdzielonych główek i witek, tzw. „bezglowych” plemników, jest związana z nieplodnością i ma charakter dziedziczny. U dotkniętych tą wadą buhajów objętych jest prawie 100% ejakulowanych plemników [14]. Badania za pomocą mikroskopu elektronowego wykazały, że rozdzielenie między główką a witką plemnika ma miejsce w głowie najądrza, a prawdopodobną przyczyną tego jest wąskie zagłębienie implantacyjne w główce plemnika.

Wada „niby kropli” przyjmuje postać zgrubień w obrębie wstawki [10]. Częstość występowania tej wady wydaje się wzrastać z wiekiem



buhajów. W tym czasie obniża się ruchliwość plemników i płodność. Zgrubiałe miejsca na wstawce mogą być błędnie interpretowane jako krople protoplazmatyczne, ale mikroskop elektronowy wykazał, że reprezentują one zupełnie inną strukturę. Istnieje możliwość dziedziczenia tej rzadkiej wady.

Wada „Daga” charakteryzuje się silnym pofałdowaniem i zapętle- niem wstawek i witek pod błoną komórkową [8]. Okazało się, że wada ta powstaje w czasie przechodzenia plemnika przez przewód głowy nają- drza, ale przyczyna nie jest rozpoznana. Większość buhajów dotkniętych tą wadą było ze sobą blisko spokrewnionych. Buhaje obarczone tą wadą wykazują niską płodność i bardzo specyficzną morfologię plemników.

Wada „korkociągu” polega na korkociągowatym wyglądzie wstawki. Materiał mitochondrialny wykazuje zgrubienia w formie przypadkowo rozmieszczonych grudkowatych skupień, zamiast regularnych sznurów pereł widocznych na przekrojach normalnego plemnika [7]. Tło tej zmia- ny pozostaje tajemnicą — poza tłem genetycznym wysuwana jest suges- tia, że wada „korkociągu” ma związek z opadem nuklearnym, bowiem porównywane rozmieszczenia przypadków tej wady z krzywą opadu nu- klearnego w Danii wykazuje współzależność. Można to porównać z pod- wójnie wzrosłym szczytem krzywej wskazującej zawartość  $^{131}\text{J}$  w mleku krów w Danii w ciągu 1961 i 1962 r. Począwszy od 1963 r. większość wybuchów nuklearnych była wykonywana pod ziemią. Od tego czasu liczba przypadków „korkociągów” u buhajów duńskich obniżyła się znacznie [12].

Z innych czynników wpływających na zaburzenia w spermatoge- nezie wylicza się jeszcze tło neurohormonalne i intoksykację bakteryjną lub wirusową. Stanowi to odrębne zagadnienie i materiał do odrębnego opracowania.

#### CYTOLOGICZNE PROBLEMY ZWIĄZANE Z KONSERWACJĄ NASIENIA

Proces konserwacji nie jest obojętny dla nasienia. Około 30–50% plemników, żywych w momencie pobrania, ginie do chwili zamrożenia. Stwierdzono, że 5–10% plemników ginie w okresie od pobrania do za- kończenia procesów przygotowawczych do mrożenia. W początkowej fazie zamrażania aż do zamarznienia nasienia ginie około 6%: najwięcej bo ponad 15% plemników ginie w temperaturze od  $-10^{\circ}$  do  $-50^{\circ}\text{C}$ . Wreszcie około 5% plemników ginie w końcowej fazie zamrażania.

Proces obumierania plemników nie kończy się w chwili całkowitego zamrożenia, bo w ciągu 2 dni po zamrożeniu ginie dalszych 5% plem- ników, a w ciągu 30 dni — około 10% plemników [30]. Uważa się, że



po upływie tego czasu proces zamierania plemników już nie postępuje, jednak po długotrwałym przechowywaniu nasienia stwierdza się gorsze wyniki płodności. W Japonii stwierdzono [54] lekką tendencję spadkową w zapłodnialności krów nasieniem przechowywanym 6 lat i więcej (śledzono do 13 lat). W Danii po 5 latach konserwacji nasienia w ciekłym azocie wyniki płodności krów były o 1,4% niższe od nasienia przechowywanego do roku [1]. Pomimo ogromnej ilości prowadzonych na całym świecie badań, mechanizm procesu zamrażania nasienia nie jest jeszcze dostatecznie znany. Ostaszko [55] podaje następujące czynniki uszkadzające plemnik przy zamrożeniu: szok termiczny, zwiększenie koncentracji elektrolitów wchodzących w skład protoplazmy komórki i otaczającego środowiska, zmianę ciśnienia osmotycznego, zmianę koncentracji jonów wodorowych, odwodnienie protoplazmy komórek, rekryształizacja wody przy rozmrożeniu i uwodnienie po rozmrożeniu.

Na szok termiczny (udar chładowy) nasienie jest szczególnie narażone przez kilka godzin po pobraniu, reagując nieodwracalnym uszkodzeniem ruchu plemników [32]. Poznanie zjawiska udaru chładowego należy zawdzięczać Miłowanowowi i jego szkole [49].

W 1940 r. Philips i Lardy (cyt. według [30]) odkryli, że żółtko jaja kurzego w rozcieńczalniku chroni plemniki przed szokiem temperatury. Uważa się obecnie, że substancjami żółtka jaja zabezpieczającymi plemnikami przed szokiem zimna jest kompleks lipoproteidowy [38, 45], a w szczególności lipidy obojętne [56]. Wrażliwość nasienia przeżuwaczy na udar mrozeniowy White i Darin - Bennet [78] przypisują stosunkowi lipidów zawierających nienasycone kwasy tłuszczowe do lipidów zawierających nasycone kwasy tłuszczowe.

Inną, nie mniej ważną substancją ochronną w technice zamrażania plemników zwierząt gospodarskich jest gliceryna. Jej ochronne działanie ma polegać na zapobieganiu tworzenia się dużych kryształków lodu wewnątrz i poza komórką oraz posiada ona zdolność wiązania wolnej wody i przenikania do komórki. W ten sposób zapobiega gliceryna wytwarzaniu się nadmiernego stężenia soli w komórce [55, 76]. Platow [58] uważa natomiast, że ochronne działanie gliceryny polega na przenikaniu do plemnika, co powoduje przejście wody wewnątrzkomórkowej w stan „niby krystaliczny”. Następuje wtedy stabilizacja drobin białkowych. Mechanizm ekwilibracji, jakkolwiek niedostatecznie poznany, zależny jest od rodzaju substancji osłaniającej. Może on być związany z przenikaniem substancji osłaniającej do komórki lub „opłaszczaniem” błony komórkowej, lub też jego działanie może być wypadkową tych dwu zjawisk.

Innym, jeszcze nie rozwiązany problemem w przechowywaniu nasienia są różnice w podatności nasienia na zamrażanie i odporności na udar mrozeniowy plemników zwierząt tego samego gatunku. Zostało to



wykazane w eksperymentach Stewarta i wsp. [70]. Inseminizując krowy świeżym nasieniem mieszanym, zawierającym równą ilość plemników od 4 buhajów, uzyskano taką samą liczbę potomstwa po każdym z nich, ale kiedy inseminowano nasieniem mrożonym tych samych buhajów, jeden z 4 ojców był ojcem aż 50% potomstwa.

Wielu autorów stwierdza różną wartość zapładniającą mrożonego nasienia buhajów i różną ruchliwość plemników po rozmrożeniu [27, 43, 59, 65, 71]. Spotyka się także rozplodniki, których nasienie w ogóle się nie mrozi [19, 72].

Jako powody zróżnicowanej podatności nasienia na zamrażanie podawane są: wiek (trudności w skutecznym zamrożeniu nasienia występują głównie u buhajów młodych [14, 50, 51] i starszych, powyżej 6 lat [26, 77]), pora roku [15, 18, 62, 75], częstość pobierania nasienia [15], jakość nasienia [15, 18, 64] oraz żywienie [66]. Poza indywidualnymi różnicami w reagowaniu na proces zamrażania, każdy gatunek pod tym względem wykazuje pewną specyfikę. Wiele trudności następuje np. mrożenie nasienia tryków i knurów.

Badania za pomocą mikroskopu elektronowego wykazały, że plemniki zwierząt są podatne na wszelkie uszkodzenia w procesie obróbki technologicznej nasienia [28, 37, 74, 90].

W procesie konserwacji nasienia wszystkich gatunków zwierząt największym uszkodzeniom ulega błona komórkowa i akrosom. Zmiany te polegają na wzdęciach, odklejeniu, rozerwaniu lub też całkowitym rozpadzie.

Ocena konserwowanego nasienia samców na podstawie badania ultrastruktury znajduje coraz szersze zastosowanie. Wykazano bowiem, że ilość zmian morfologicznych po zamrożeniu i rozmrożeniu plemników ma odbicie w obniżonej płodności buhajów [52, 73], tryków [67] i knura [61].

W ostatnich latach wiele wysiłków poświęca się dla zbadania, jakie biochemiczne mechanizmy biorą udział w odporności nasienia na udar chładowy lub mrozeniowy. Istotną sprawą stało się odkrycie, że jednym z enzymów lizosomalnych akrosomu jest akrosin, który ma związek z penetracją otoczki przejrzystej. Enzym ten może być unieczynniany przez inhibitor akrosinu, który występuje w osoczu nasienia. Można przypuszczać, że te inhibitory łączą się z akrosomem tylko w plemnikach uszkodzonych, albo ze zniszczonym akrosomem i zapobiegają dostaniu się do komórek jajowych uszkodzonych plemników [44]. To zagadnienie dotyczy w wysokim stopniu nie tylko zwierząt, a także i człowieka, gdyż następstwem mogą być znacznie groźniejsze ze względu na ewentualne uszkodzenia genetyczne ojcowskiej chromatyny na skutek zamrażania i rozmrażania nasienia. Oceną braku uszkodzeń w plemnikach na skutek zamrażania jest także badanie aktywności hialuronidazy w osoczu nasienia [23].



## PODSUMOWANIE

1. Badanie ultrastruktury plemników w mikroskopie elektronowym otworzyło dalszą drogę poznania budowy plemników i pozwoliło na sprawdzanie procesów spermatogenezy.

2. Do ważniejszych czynników wpływających na zaburzenia reprodukcyjne i uszkodzenia plemników należy zaliczyć: warunki środowiskowe, głównie podwyższoną temperaturę, wpływy żywieniowe i czynniki genetyczne.

3. Proces konserwacji nasienia nie jest obojętny dla plemników. Największym uszkodzeniom ulega błona komórkowa i akrosom. Zmiany te polegają na wzdęciach, odklejeniu, rozerwaniu lub też ich całkowitym rozpadzie.

4. Perspektywą badań cytologicznych dla potrzeb sztucznego unasienniania jest wyjaśnienie zmian zachodzących w ultrastrukturze plemników zwierząt powstających w czasie procesu obróbki technologicznej nasienia.

## LITERATURA

- [1] ANDERSEN J. B. PEDERSEN H., Breeding efficiency of frozen bull semen after 5 years storage at  $-196^{\circ}\text{C}$ . in liquid nitrogen, Proc. 8th Int. Congr. Anim. Reprod. and Artif. Insem., Cracow, 4: 783, 786, 1976.
- [2] BIELAŃSKI W., Próba ujednoczenia oceny morfologicznej nasienia, Z. Probl. Post. Nauk Rol., 61: 227-233, 1966.
- [3] BIELAŃSKI W., JANOWSKI T., WOJTACHA H., The influence of air cooling power on bulls semen quality in summer, Bull. de l'Acad. Polon. d. Sci. 9: 5, Ser. d. Sci Biol., 1961.
- [4] BIWEJNIS - KŁOSOWSKA D., KŁOSOWSKI B., Obserwacje nad wpływem czynników środowiskowych na funkcje płciowe królików, Z. Probl. Post. Nauk Rol., 124: 19-24, 1971.
- [5] BLOM E. Über Spermauntersuchungsmethoden beim Bullen, Wien. Tierärztl. Mschr., 36: 49-55, 111-112, 161-168, 1949.
- [6] BLOM E., Interpretation of spermatocytology, Fertil. Steril., 1: 223-238, 1950.
- [7] — A rare abnormality „Corkscrew sperm” associated with sterility in bulls, Nature, 183: 1280, 1959.
- [8] — A new sterilizing and hereditary defect (the „Dag defect”) located in the bull sperm tail, Nature, 209: 739-740, 1966.
- [9] — Ultrastruktura plemnika buhaja, Z. Probl. Post. Nauk Rol., 67: 285-305, 1966.
- [10] — A new sperm defect — „pseudo - droplets” in the middle piece of the bull sperm, Nord. Vet. - Med., 20: 279-283, 1968.
- [11] — The ultrastructure of some characteristic sperm defects and a proposal for a new classification of the bull spermogram, Nord. Vet. - Med., 25: 383-391, 1973.



- [12] — Ocena morfologiczna wad plemników buhaja w świetle nowych badań, Ref. na zebr. Sekcji Fizjol. Patol. Rozr. PTNW, Kraków, maj 1975 (nie opublikowane).
- [13] BLOM E., BIRCH-ANDERSEN A., Ultrastructure of the Sterilizing „Knobbed — Sperm” Defect in the Bull, *Nature*, **194**: 989–990, 1962.
- [14] — Ultrastructure of the „decapitated sperm defect” in Guernsey Bulls, *J. Reprod. Fert.*, **23**: 67–72, 1970.
- [15] BOEHNKE H. J., HAHN R., PFEILSTICKER J., Studies on the freezability of semen of AI — bulls, *Proc. 8th Intern. Congr. Anim. Reprod. and Artif. Insem.*, Cracow, **4**: 787–789, 1976.
- [16] BONADONNA T., SUCCI G., Artificial insemination of animals in the world, *Proc. 8th Intern. Congr. Anim. Reprod. and Artif. Insem.*, Cracow, **4**: 769–773, 1976.
- [17] CHABIBULLIN Ch., KALUŻNY S., Zastosowanie rozcieńczalników podczas przechowywania i przewozu nasienia, *Nowe poglądy i osiągnięcia w biol. rozmn. zwierz. gosp.*, red. PWRiL, Warszawa 1952, 213–219.
- [18] EIBL K., ZODER H. F., Zur Technik der Samentiefkühlung, *Dt. tierärztl. Wschr.*, **62**: 32, 1955.
- [19] EIBL K., Die praktische Bedeutung der Samenkonservierung mittels flüssigen Stickstoff, *Dt. tierärztl. Wschr.*, **71**: 300–304, 1964.
- [20] FILIPSE R. J., ALMQUIST J. O., Effect of total digestible nutrient intake from birth to four years of age on growth and reproductive development and performance of dairy bulls, *J. Dairy Sci.*, **44**: 905–914, 1956.
- [21] FLIS J., GRONEK W., ŁUTCZYK J., Przyczyny nieprzydatności rozplodowej buhajów w woj. kieleckim w latach 1966–1970, *Medycyna Wet.*, **28**: 743–745, 1972.
- [22] FLIS J., ŁUTCZYK J., Spostrzeżenia nad zawartością plemników morfologicznie zmienionych w nasieniu buhajów hodowlanych na przestrzeni roku, *Medycyna Wet.*, **11**: 684–687, 1973.
- [23] FOUKES J. A., WATSON P. A., Hyaluronidase activity in seminal plasma as a method of assesing bull sperm integrity, *J. Reprod. Fertil.*, **43**: 349–353, 1975.
- [24] GŁÓD W., BIELAŃSKI W., Artificial animal insemination in Poland, *Proc. 8th Intern. Congr. Anim. Reprod. and Artif. Insem.*, Cracow, **1**: 90, 1976.
- [25] GRAHAM E. F., LARSON E. V., CRABO B. G., Freezing and freezedrying bovine spermatozoa, *Proc. 5th Conf. on Artif. Insem. and Reprod.*, Nat. Assoc. of Anim. Breeders, Feb., 1974, 14–20, 1974.
- [26] HAHN J., FOOTE R. H., SEIDEL G. E., Quality and freezability of semen from growing and aged Dairy Bulls, *J. Dairy Sci.*, **52**: 1843–1848, 1969.
- [27] HEAGER O., Erfahrungen mit dem Samenkonservierungsverfahren mit flüssigem Stickstoff beim Rind, *Zuchthyg.*, **2**: 67–74, 1966.
- [28] HEALEY P. Effect of freezing on the ultrastructure of the spermatotoon of some domestic animals, *J. Reprod., Fert.*, **18**: 21–27, 1969.
- [29] JANOWSKI T., SIC R., VERGLES V., Effect of air cooling power on temperature of scrotum skim and certain characteristics of Bull’s semen in Summer, *Acta Agr. et Silv.*, **11**: 31–44, 1971.
- [30] JAŚKOWSKI L., Nowsze badania nad konserwacją nasienia buhajów, *Post. Nauk Rol.*, **55**: 55–69, 1959.
- [31] — Obecne poglądy na wpływ aklimatyzacji na płodność samców na tle importu buhajów do Polski, *Z. Probl. Post. Nauk Rol.*, **31**: 61–76, 1961.



- [32] — Badania nad zamrażaniem nasienia. Wpływ lekkich uderów chłodowych na aktywność i zdolność zapładniającą nasienia mrożonego, *Z. Probl. Post. Nauk Rol.*, **61**: 195–202, 1966.
- [33] — Wpływ witamin na płodność, *Medycyna Wet.*, **18**: 385–388, 1969.
- [34] JAŚKOWSKI L., RULSKI T., Wpływ niedoboru wody pitnej na jakość nasienia buhajów, *Pol. Arch. Wet.*, **9**: 533–546, 1966.
- [35] JAŚKOWSKI L., SZULC L., Badania nad zapobieganiem zaburzeniom funkcji gonad powstającym u buhajów na tle transportu, *Pol. Arch. Wet.*, **11**: 451–463, 1968.
- [36] JONDET R., Utilisation du froid intense pour la congelation et la conservation du sperme de taureaux, *Biul., Acad., Vet de France*, **49**: 341–372, 1976.
- [37] JONES R. C., The plasma membrane of ram, boar and bull spermatozoa, *J. Reprod., E. Fert.*, **33**: 179–183, 1973.
- [38] KORYCKI S., Wpływ różnych frakcji żółtka jaja kurzego na podstawowe procesy metabolizmu w plemnikach buhaja, *Z. Probl. Post. Nauk Rol.*, **61**: 202–210, 1966.
- [39] LARSON E. V., GRAHAM E. F., Fertility of freeze - dried bovine spermatozoa, *Proc. 8th Intern. Congr. Anim. Reprod. and Artif. Insem.*, Cracow, **4**: 822–825, 1976.
- [40] LASZCZKA A. Zagadnienia związane z określaniem zależności pomiędzy poziomem żywienia a wydajnością płciową buhajów, *Post. Nauk Rol.*, **20**: 103–120, 1973.
- [41] — Zapotrzebowanie białkowo - energetyczne jako czynnik określający wydajność i wydolność płciową buhajów, *IZ Kraków, Wyd. wł.*, **388**: 1–235, 1976.
- [42] LASZCZKA A., ORAMUS - KASPRZYK B., Wpływ bezpośrednich zmian składu jakościowego dawek żywieniowych na podatność nasienia buhaja na zamrażanie, *Rocz. Nauk Rol.*, B, 1977 (w druku).
- [43] LÜPS P., Die Tiefkühlkonservierung des Rinderspermas, ihre voraussichtlichen Vorteile und Schwierigkeiten, *Wien. tierärztl. Mschr.*, **41**: 650–654, 1954.
- [44] MANN Z., Progress in biology of the gamets. I. Problems in the mal, *Proc. 8th Intern. Congr. Anim. Reprod. and Artif. Insem.*, Cracow, **2**: 39–44 1976.
- [45] MASUDA H., NISHIKAWA Y. Studies on the substances in egg yolk effective on viability and the metabolism of spermatozoa. V. Substances in egg yolk effective in the protection of spermatozoa against cold shock and freezing injury, *Jap. J. Zootechn. Sci.*, **43**: 417–428, 1972.
- [46] MERYMAN H. T., Drying of living mamalian cells, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **85**: 729, 1960.
- [47] MESZAROS S., Der Einfluss der intensiven Aufzucht auf die Samenproduktion von Jungbullen, *Dtsch., Tierärztl. Wschr.* **83**: 542–544, 1976.
- [48] MEYER H., Fütterung und Reproduktionsleistung von Jung- und Deckbullen, *Bayer. Landw. Ib.* **49**: 357–378, 1972.
- [49] MIŁOWANOW K. W., O sposobach przechowywania nasienia przeżuwaczy, [w] *Nowe poglądy i osiągn. w biol. rozmn. zw. gosp.*, PWRiL, Warszawa 1952, 135–160.
- [50] MORSTIN J., Susceptibility of young bull semen to freezing, *Acta Biol. Cracow. Ser. Zool.*, **12**: 131–134, 1969.
- [51] — Zachowanie płciowe i produkcja nasienia buhajów w pierwszym roku wczesnej eksploatacji rozplodowej, *Acta Agr. et Silv. Ser. Zoot.*, **10**: 3–31, 1970.
- [52] MORSTIN J., COUROT M., Ultrastructure des spermatozoïdes de taureaux



- de différente fecondance. Morphologie ultrastructurale, glycoproteines acrosomiques et membranaires charges negatives de surface, *Ann. Biol. Anim. Bioch. Biophys.*, **14**: 581-590, 1974.
- [53] MÜDRA K., GÜNTHER A., WILKE A., Untersuchungen zur Fütterungsintensität in der Aufzucht von Uungbullen, *Fortpfl. Haust.*, **5**: 225-239, 1969.
- [54] NISHIKAWA Y., IRITANI A., SHIRAYNA K., TARAO T., Motility and fertilizing ability of frozen cattle semen stored for long terms (4 to 13 years), *Proc 8th Intern. Vongr. Anim. Reprod. and Artif. Insem. Cracow*, **4**: 838-841, 1976.
- [55] OSTASZKO F. J., Zagadnienia teorii i praktyki konserwacji nasienia zwierząt w niskich temperaturach, *Z. Probl. Post. Nauk Rol.*, **124**: 405-415, 1971.
- [56] PACE M. M., GRAHAM E. F., Components in egg yolk which protect bovine spermatozoa freezing, *J. Anim. Sc.*, **39**: 1144-1149, 1974.
- [57] PESKORATSKOW A. P., Elektronmikroskopisches issledowania morfologiczeskich izmieenij žiwczikow byka pri głubokom zamorażiwani semeni, *Bjul. Naucz. Rabot WIŻ, Dubrowicy*, **27**: 87-88, 1972.
- [58] PLATOW E. M., K teorji ochlażdenija spermy proizvoditelej, *Naucz. Trudy WIK*, **26**: 76-83, 1973.
- [59] POLGE C., The storage of bull semen at low temperatures, I, *Vet. Rec.*, **65**: 557-559, 1953.
- [60] — The fertilizing capacity of boar spermatozoa following freezing and thaving, *Proc. 8th Intern. Congr. Anim. Reprod. and Artif. Insem. Cracow*, **4**: 1061-1064, 1976.
- [61] POLGE C., ROWSON L. E. A., Fertilizing capacity of bull spermatozoa after freezing at  $-79^{\circ}\text{C}$ , *Nature*, **169**: 626-627, 1952.
- [62] ROMANOWSKI W., HERRLER H., MARRE H., Praktische Erfahrungen und Probleme des Einsatzes von Tiefgefriersperma in der Rinderbesamung, *Zuchthyg.*, **7**: 273-281, 1963.
- [63] ROSŁANOWSKI K., Badania nad morfologią nasienia buhajów rasy nizinnej czarno - białej i próba ustalenia niektórych zależności dziedzicznych, *Acta Agr. et Silv., Ser. Zoot.*, **9**: 69-104, 1969.
- [64] ROWSON L. E. A., The storage of bull semen at low temperatures, II, *Vet. Rec.*, **65**: 559, 1953.
- [65] SCHMIDT D., Versuche über die Gefrierkonservierung von Bullen Ziegenbock- und Schafbocksperma in Pelletform, *Rortpflzg. Haust. Bd.*, **4**: 172-200, 1968.
- [66] SMIRNOV - UGRIMOV D. U., Powyszenie ustojczivosti siemieni bykow k zamorażiwaniu posledstwom specjalnego kormlenija, *Dokłady W. A. S. Ch. N. il.*, **21**: 32-35, 1958.
- [67] SMORAĞ Z., KARETA W., Ocena płodności mrożonego nasienia tryków na podstawie stanu akrosomów, *Medycyna Wet.*, **30**: 689-691, 1974.
- [68] SÖRENSEN E., Sztuczne unasiennianie zwierząt gospodarskich, PTZ, Kraków 1946.
- [69] STEWART D. L., Storage of bull spermatozoa at low temperature, *Vet. Rec.*, **63**: 65-66, 1951.
- [70] STEWART D. L., SPOONER R. L., BENNETT G. H., BEATTY R. A., HANCOCK J. L., A second experiment with heterospermic insemination in cattle, *J. Reprod. Fert.*, **36**: 107-116, 1974.
- [71] SWANNEY J. H., The storage of bull semen at low temperatures, *Vet. Rec.*, **65**: 563, 1953.



- [72] SZILAGYI J. MÜLLER E., Untersuchungen über die Einfrierbarkeit von Bullenejakulaten, Dt. tierärztl. Wschr., **18**: 444-448, 1972.
- [73] UZU G., COURTENS J. L. COUROT M., Quantitative analysis of ultrastructural abnormalities of spermatozoa from bulls of different fertility, Proc. 8th Intern. Congr. Anim. Reprod. and Artif. Insem. Cracow, **4**: 748-751, 1976.
- [74] WARNAWSKI A. N., Wozmożnaja przyczyna sniżenia opłodoworjajuszczej sposobnosti zamorożennogo semeni, Owcewods., **2**: 28-29, 1970.
- [75] WELLS M. E., AWA O. A. FANCY S. S., Effect of season on acrosome status in the bull, J. Dairy Sci., **55**: 1174-1178, 1972.
- [76] WIERZBOWSKI S., Podstawy długotrwałej konserwacji materiałów biologicznych, Z. Probl. Post. Nauk Rol., **108**: 139-151, 1970.
- [77] — Zagadnienia kriobiologii w sztucznym unasiennianiu zwierząt, Z. Probl. Post. Nauk Rol., **124**: 363-374, 1971.
- [78] WHITE I. G., DARIN - BENNET A., The lipids of sperm in relation to cold shock, Proc. 8th Intern. Vong. Anim. Reprod. and Artif. Insem. Cracow, **4**: 951-954, 1976.
- [79] ŻABA - BRANNY A., Wpływ termicznych czynników otoczenia na produkcję i właściwości nasienia tryków, Acta Agr. et Silv. Ser. Zoot., **11**: 69-92, 1971.

*Otrzymano: 10 listopada 1977.*

*Przyjęto: 1 grudnia 1977.*

*Adres autora: Jastrzębiec, 05 - 551 Mroków.*



## KOMÓRKI DOKREWNE PRZEWODU POKARMOWEGO

## THE ENDOCRINE CELLS OF THE ALIMENTARY TRACT

Jerzy STACHURA i Franciszek KACZMARSKI

Pracownia Histochemii i Ultrastruktury Instytutu Patologii AM w Krakowie  
Pracownia Mikroskopii Elektronowej Instytutu Pediatrii AM w Krakowie

*Streszczenie.* Znaczny rozwój endokrynologii przewodu pokarmowego w ostatnim dziesięcioleciu dotyczy również morfologii komórek dokrewnych. Zastosowanie wielorakich metod badawczych, w szczególności mikroskopii elektronowej i histochemii, doprowadziło do poznania całej rodziny komórek dokrewnych przewodu pokarmowego. Dalsze bardziej systematyczne badania mogą doprowadzić do rewizji szeregu pojęć o patogenezie niektórych chorób przewodu pokarmowego. Obecna praca obejmuje przegląd aktualnej wiedzy o morfologii komórek dokrewnych przewodu pokarmowego.

*Summary.* The spectacular development of endocrinology of the alimentary tract in the latest decade concerns also the morphology of endocrine cells. The application of multiple investigation methods, and particularly of electron microscopy, and histochemistry, has led to the discovery of a whole family of endocrine cells of the alimentary tract. Further more systematic studies may lead to the revision of some views on the pathogenesis of alimentary tract diseases. The paper gives a review of the up-to-date knowledge of the morphology of endocrine cells of the alimentary tract.

Po raz pierwszy komórki chromafinowe zostały opisane przez Heidenhaina w 1870 r. (cyt. według [102]) w żołądku psa. Nowe metody barwienia odkryte na przełomie ubiegłego i obecnego wieku umożliwiły odkrycie szeregu dalszych typów komórek [17]. Wtedy już sugerowano też ich funkcję dokrewną. W latach trzydziestych obecnego wieku Erspamer odkrył enteraminę zidentyfikowaną następnie jako serotoninę [4, 72]. W tym też okresie Feyrter opisał w przewodzie pokarmowym system komórek jasnych sugerując ich endokrynną czy parakrynną czynność (cyt. według [81]).

Znaczne przyspieszenie rozwoju endokrynologii przewodu pokarmowego rozpoczęło się w ostatnim dziesięcioleciu. Stało się tak dzięki



nowym metodom badawczym pozwalającym na dokładniejsze oznaczenie poziomu hormonów we krwi i tkankach i zidentyfikowanie komórek zawierających lub produkujących dany hormon [48, 81].

Komórki produkujące hormony przewodu pokarmowego, hormony peptydowe, spełniają w większości kryteria komórek serii APUD [81]. Obecnie opisuje się dużą grupę komórek klasyfikowanych według cech histochemicznych, ultrastrukturalnych i zawartości odpowiednich hormonów.

Znaczny postęp w zakresie badań komórek dokrewnych przewodu pokarmowego zaznaczył się po sympozjum w Wiesbaden, na którym ustalono nomenklaturę poszczególnych typów komórek [102]. Nomenklatura ta ze zmianami wprowadzonymi później jest obecnie szeroko przyjęta (tab. 1).

TABELA 1

Zmodyfikowana klasyfikacja komórek dokrewnych przewodu pokarmowego (według [81])

Komórka	Lokalizacja	Hormon
EC <sub>1</sub>	przewód pokarmowy	substancja P
EC <sub>2</sub>	jelito cienkie	motylina
ECL	dno i trzon żołądka	?
G	antrum, dwunastnica	gastryna
A	dno i trzon żołądka	glukagon
D	żołądek, jelito cienkie	somatostatyna
D <sub>1</sub>	żołądek, jelita	?
X	żołądek, dwunastnica	?
S	jelito cienkie	sekretyna
I	dwunastnica, jelito czcze	CCK
K	jelito cienkie	GIP
EG	jelita	enteroglukagon
H	jelito biodrowe i grube	VIP
N	jelito cienkie	neurotensyna

EC — komórki enterochromafinowe, ECL — komórki „enterochromaffin — like”, CCK — cholecystokinina, GIP — żołądkowy peptyd hamujący, VIP — wazoaktywny hormon jelitowy.

Produkcja VIP i bombezyny w komórkach H nie jest jeszcze w pełni udowodniona [81].

Podana w tabeli 1 klasyfikacja w znacznej mierze opiera się na wynikach ultrastrukturalnych badań tkanek standardowo utrwalonych (aldehyd glutarowy - osm). Wiele danych wskazuje, że lista komórek dokrewnych przewodu pokarmowego nie jest jeszcze zamknięta [60]. I tak wykazano immunofluorescencyjnie obecność bombezyny i VIP w obrębie komórek H [81, 89]. Zachodzi pytanie, czy jest to tylko błąd metody wy-



nikający z krzyżowej immunoreaktywności, czy też bombezyna jest produkowana u ssaków. Opublikowano ostatnio szereg prac opisujących strukturę komórek dokrewnych po stosowaniu bodźców stymulujących [67, 68]. Ukazały się również prace o występowaniu i strukturze komórek dokrewnych w stanach patologicznych [14, 26, 58, 70, 76, 86, 88, 92, 93, 106, 108, 109]. Zagadnienia te, a także charakterystykę morfologiczną komórek dokrewnych przedstawiono w literaturze polskiej [49, 50, 60, 61, 91]. Wydaje się jednak celowe ich uaktualnienie, tym bardziej, że badania fizjologiczne endokrynologii przewodu pokarmowego są w Polsce bardzo zaawansowane i znane szeroko, czego dowodem są prace Konturka i wsp. [48].

#### POCHODZENIE KOMÓREK DOKREWNYCH PRZEWODU POKARMOWEGO

Pochodzenie komórek dokrewnych przewodu pokarmowego nie jest w pełni wyjaśnione. Można wyróżnić dwa kierunki poświęcone temu zagadnieniu. Pierwszy, bardziej tradycyjny, sugeruje endodermalne, wspólne z komórkami nabłonkowymi przewodu pokarmowego pochodzenie komórek dokrewnych, co m. in. rzutuje na nomenklaturę stosowaną w patologii. Pogląd ten reprezentują badacze japońscy, uważając, że karcinoidy (rakowiaki) są rakami [99], oraz badacze opierający się na wynikach badań nad przeszczepami i hodowlą tkanek embrionalnych [1, 2, 55, 85]. Inna jest jednak koncepcja Pearse'a o neuroektodermalnym pochodzeniu wszystkich komórek serii APUD, w tym także komórek dokrewnych przewodu pokarmowego [73, 74, 80, 81]. Koncepcja Pearse'a zwraca uwagę na obecność wielu wspólnych cech komórek serii APUD (Amine or amine Precursor Uptake and Decarboxylation):

1. Obecność amin katecholowych lub ich wtórny wychwyty.
2. Zdolność wychwyty prekursorów amin biogennych.
3. Obecność dekarboksylazy aminokwasów.
4. Wysoka zawartość grup karboksylowych lub karboksamidowych.
5. Wysoka aktywność esterazy nieswoistej lub cholinesterazy.
6. Wysoka aktywność dehydrogenazy alfa - glicerofosforanu.

Rodzina komórek serii APUD rozrosła się do 36 członków. W celu wykazania, że komórki tej serii pochodzą z rynienki nerwowej prowadzono szereg badań eksperymentalnych. Udało się to jednak udokumentować tylko w 6 przypadkach na 36 rodzajów komórek. Inne badania wskazują, że uformowana rynienka nerwowa nie jest macierzą dla komórek dokrewnych przewodu pokarmowego. Skłoniło to Pearse'a do rozszerzenia swojej hipotezy. Sugeruje on, że komórki dokrewne pochodzą z „neurally programmed cells of the epiblastic origin” (nerwowo zaprogramowane komórki pochodzące z epiblastów) i to niezależnie czy



komórki dokrewne pochodzą z samej rynienki nerwowej, grzebieni, czy wprost z epiblastu [78]. Silne poparcie dla neuroektodermalnego pochodzenia komórek serii APUD uzyskano dzięki ostatnim odkryciom szeregu peptydów przewodu pokarmowego w mózgu, np. somatostatyna, gastryna, substancja P, VIP. Część peptydów zlokalizowano zarówno w mózgu, jak i w splotach nerwowych ściany jelita, jak wreszcie w samych komórkach dokrewnych przewodu pokarmowego [38, 39, 71, 83, 90]. Wspólne występowanie monoamin w układzie nerwowym i dokrewnym znane jest już od dość dawna. Ostatnio sugeruje się też, że neurotensyna może być produkowana w komórkach dokrewnych przewodu pokarmowego [41, 105].

Występowanie tych samych peptydów w mózgu, gdzie spełniają prawdopodobnie rolę neurotransmitarów, i w przewodzie pokarmowym zrodziło szereg nowych pytań. Wiadomo, że wiele z peptydów hormonalnych przewodu pokarmowego wykazuje podobieństwo strukturalne [48]. Być może filogenetycznie pochodzą one z jednego prekursora. Postuluje się, że „najstarszym” peptydem jest wazoaktywny hormon jelitowy (VIP) [19, 81]. Ciekawostką jest występowanie VIP w ziarnistościach komórek genglioneuroblastoma [81].

Ostateczne wyjaśnienie pochodzenia embioralnego komórek produkujących hormony peptydowe nastąpi dopiero w przyszłości.

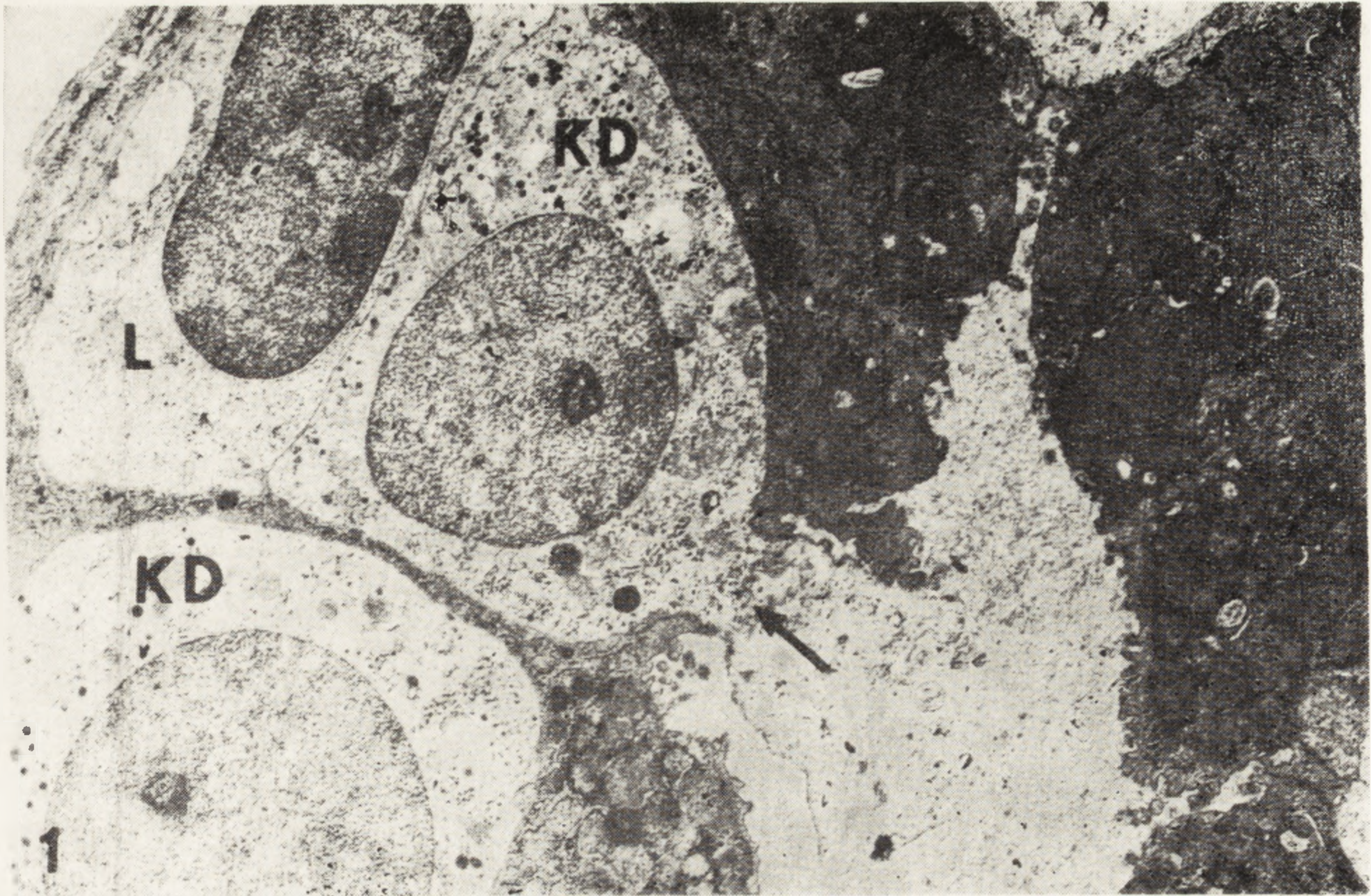
#### METODY BADAŃ KOMÓREK DOKREWNYCH

Komórki dokrewne przewodu pokarmowego w mikroskopie świetlnym są trudno dostrzegalne. Dla odróżnienia ich od innych komórek śluzówki przewodu pokarmowego stosowane są liczne metody o zróżnicowanym stopniu swoistości. Część ze stosowanych metod przedstawiona jest w tabeli 2.

Argentafinowość (metoda srebrowa bez dodatku reduktora) i reakcja dwuazowa wskazują na zawartość serotoniny w komórkach dokrewnych. Reakcja argentafinowa ujawnia kompleks aldehydu (utrwalacza) i serotoniny. Inne związki mogą tworzyć kompleks redukujący roztwór srebra, takie jak histamina, adrenalina, noradrenalina i dopamina, są łatwo rozpuszczalne w utrwalaczach wodnych i dlatego praktycznie jedynym wykrywanym kompleksem jest w zwykłych skrawkach parafinowych kompleks formaldehydu z serotoniną. Kompleks ten wiąże też sole dwuazowe dając nierozpuszczalne barwniki azowe [17].

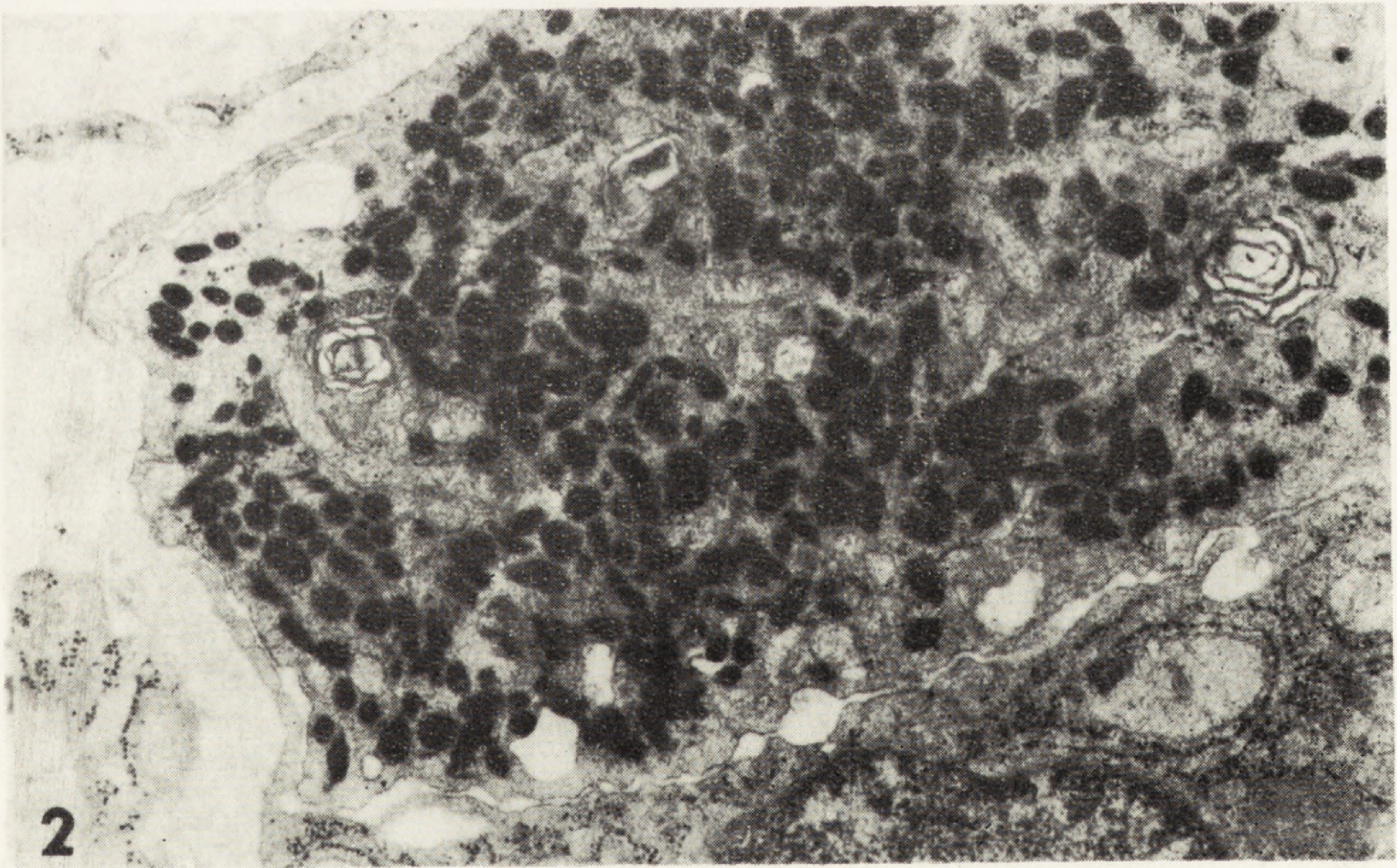
Argyrofilia (metoda srebrowa z dodatkiem reduktora) stosowana jest w szeregu odmianach. Część z nich cytowana jest w tabeli 2. Dopiero zastosowanie argyrofilii w ultracienkich skrawkach i obserwacje pod mikroskopem elektronowym pozwoliły wyjaśnić szereg wątpliwości zwią-





Ryc. 1. Przekrój przez gruczoł śluzówki przyodźwiernikowej części żołądka mężczyzny lat 31

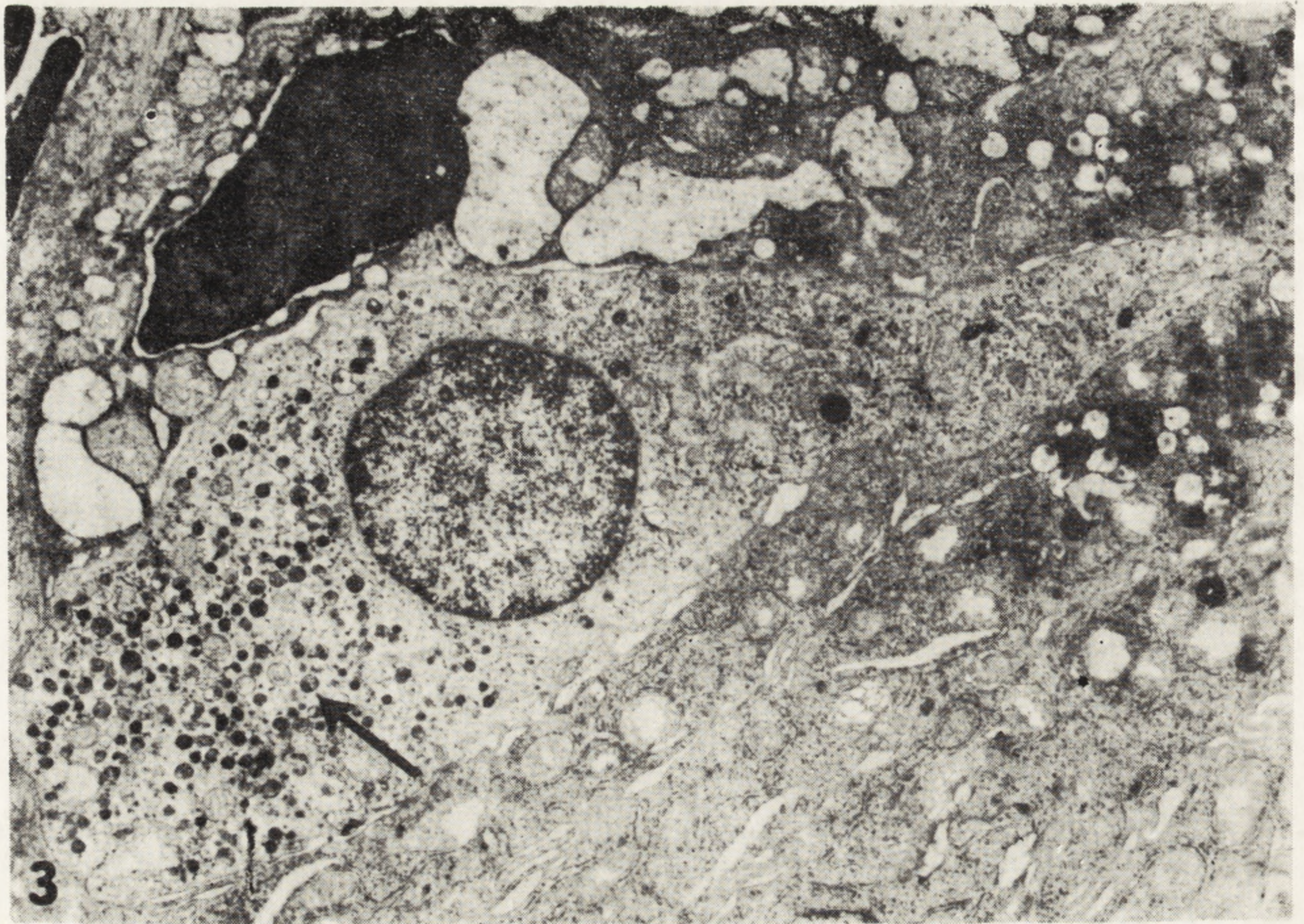
Obraz histologiczny i wydzielanie żołądkowe w granicach normy. Widoczne komórki dokrewne (KD) o charakterystycznej „jasnej” cytoplazmie zawierającej ziarnistości. Jedna z komórek dokrewnych komunikuje się ze światłem gruczołu (strzałka). Limfocyt (L) posiada również jasną cytoplazmę.  $\times 5500$



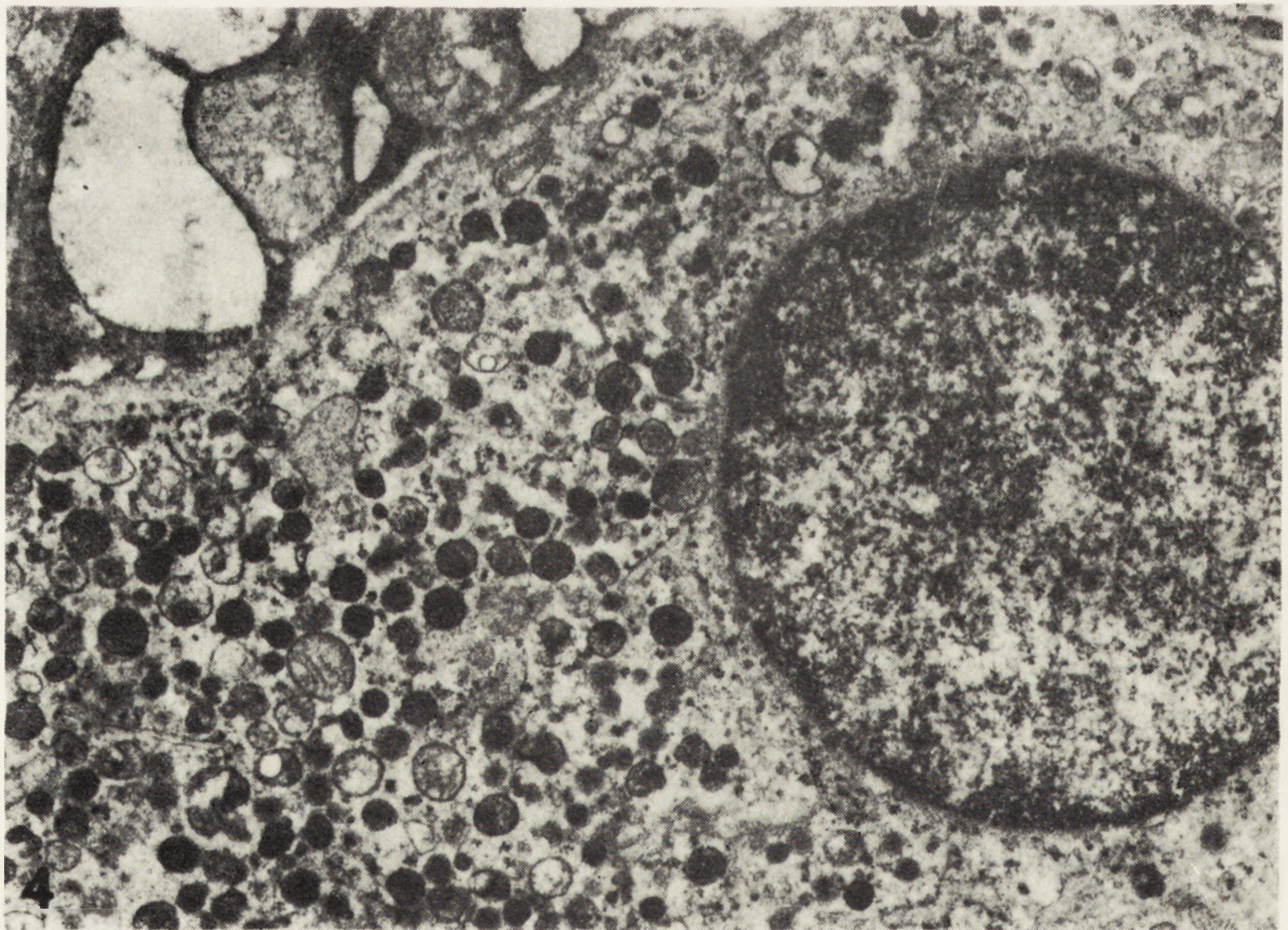
Ryc. 2. Fragment komórki  $EC_2$ . Widoczne są charakterystyczne ziarnistości okrągłe, owalne i wydłużone, silnie elektronowo gęste.  $\times 22000$

Ryc. 2-5 przedstawiają komórki z gruczołów części odźwiernikowej żołądka kobiety lat 55 pobranej do badań przy resekcji żołądka z powodu wrzodu odźwiernika spoza okolicy wrzodu. W badaniu histologicznym stwierdzono zmiany zapalne i cechy metaplazji jelitowej śluzówki



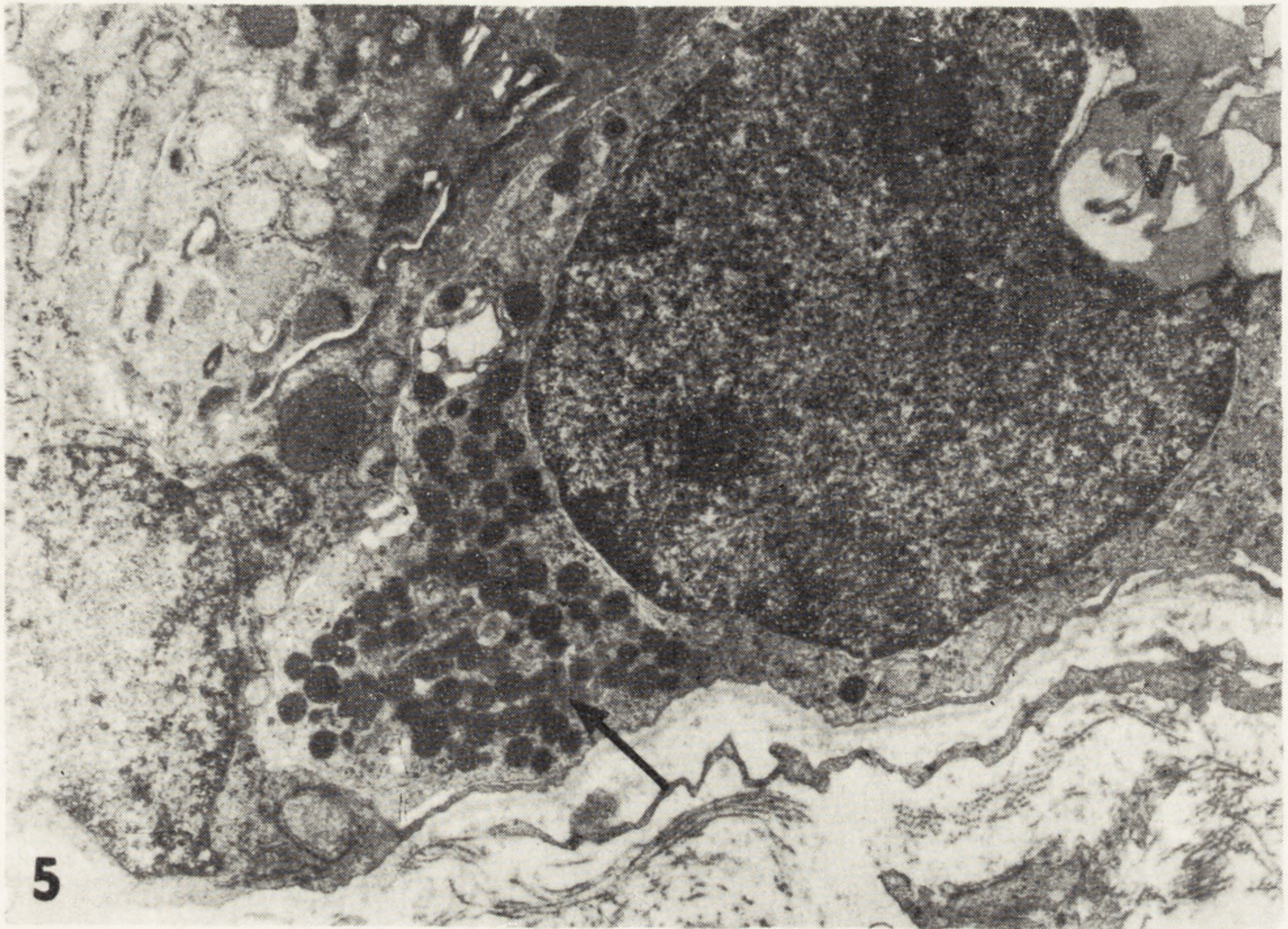


Ryc. 3. Wydłużona komórka G śluzówki odźwiernikowej posiada u podstawy ziarnistości sekrecyjne (strzałka).  $\times 8600$



Ryc. 4. Fragment komórki G z ryc. 3  
Widoczne liczne ziarnistości sekrecyjne o zróżnicowanej gęstości elektronowej.  $\times 17000$





Ryc. 5. Komórka D śluzówki odźwiernikowej żołądka

U podstawy widoczne duże okrągłe ziarnistości sekrecyjne (strzałka). Wakuola tłuszczowa (V).  
× 17 000







TABELA 2

Charakterystyka histochemiczna komórek dokrewnych układu pokarmowego

Typ komórki	5 HT		Argyrofilia	Metachromazja	Inne
	r. argentafinowa	r. duwazowa	Grimelius Sevier-Munger Bodian Davenport	Błękit toluidyny Kwaśna hydroliza	Hem. ołowiowa (Pb-H) PTAH Xanthrol Pseudoizocjanina Fuksyna aldehydowa
EC	++		++++	++	+++--
B	--		----	--	---++
ECL	--		++++	-+/-	+/-??-
G	--		+???	-+	+??--
A	--		+++?	+/-+	+++--
D	--		--?+	-+	+--?--
D <sub>1</sub>	--		++?+/-	-+	++?--
X	--		+??+/-	-+	++???
S	--		+???	??	++???
I	--		--??	??	?????
K	--		++??	??	?????
EG	--		++++	-+	+????
H	--		????	??	?????
N	--		????	??	?????

Skróty oznaczające poszczególne komórki dokrewne wyjaśnione są w tabeli 1. r — reakcja, ? — brak wiarygodnych danych w piśmiennictwie.

zanych z wynikami uzyskanymi metodą srebrzenia różnych typów komórek dokrewnych. Metachromazja natomiast występująca bezpośrednio lub po hydrolizie kwaśnej jak też pozostałe metody podane w tabeli i inne [32, 37, 81] są mniej swoiste i dają wyniki pozytywne również w innych komórkach i tkankach. Jedną z podstawowych metod badawczych komórek dokrewnych jest fluorescencja formalinowa (formalin induced fluorescence — FIF) [34, 35, 37, 43, 51, 52].

Badania ultrastrukturalne są w chwili obecnej najpewniejszą metodą identyfikacji komórek dokrewnych przewodu pokarmowego i stanowią podstawę nowoczesnej klasyfikacji komórek dokrewnych. Prawidłowa interpretacja ultrastruktur wymaga jednak stosowania powtarzalnej metodyki, tj. utrwalania w aldehydzie glutarowym, a następnie w osmie. Zmiany w metodzie, jak choćby np. zmiana pH czy czasu utrwalania, powodują zmianę wyników. Używa się nawet czasami żartobliwego powiedzenia, że klasyfikacja komórek dokrewnych oparta jest na „wystandaryzowanych artefaktach” [15, 85, 94, 96–98, 102, 103].



Metody immunocytochemiczne są także obok ultrastrukturalnych badań przydatne w indentyfikacji komórek dokrewnych. Najbardziej dokładne są metody posługujące się kompleksem peroksydazy i anty-peroksydazy (unlabeled antibody enzyme method) [104]. Można w ten sposób uzyskać preparaty zarówno do mikroskopu świetlnego, jak i mikroskopu elektronowego. Nadaje się on też do preparatów z bloczków parafinowych. Zwraca się jednak uwagę [81], że część z hormonów wymaga użycia innych utrwalaczy (dwiimid węgla, pirowęglanowuetyl, paraben-zochinon), które zachowują strukturę i konformację determinanty antygenowej hormonów.

Stosowanie paru metod badania komórek dokrewnych konieczne jest w chwili obecnej dla uzyskania pełnej indentyfikacji jak też — zwłaszcza w przypadku nowotworów z komórek dokrewnych — współpracy z pracownią radioimmunologiczną. Najpewniejsze metody opierają się na ultrastrukturze komórek z możliwością zastosowania próby immunoperoksydazowej lub też próby immunofluorescencyjnej na półcienkich skrawkach z następowym barwieniem histochemicznym.

#### MORFOLOGIA KOMÓREK DOKREWNYCH

Szerokie zastosowanie omówionych metod badawczych pozwala obecnie na dosyć dokładne przedstawienie morfologii komórek dokrewnych w przewodzie pokarmowym. Fakt ten oraz wyniki badań fizjologicznych i biochemicznych pozwoliły na ustalenie, w porozumieniu międzynarodowym, nomenklatury tych komórek (tab. 2). Komórki dokrewne w ścianie przewodu pokarmowego wyróżniają się szeregiem cech morfologicznych. Po pierwsze, w obserwacjach zarówno pod mikroskopem świetlnym, jak i elektronowym ich cytoplazma jest „jaśniejsza” od cytoplazmy innych komórek, chociaż należy brać pod uwagę, iż cytoplazma komórek nie zróżnicowanych i zajmujących podobne przypodstawne położenie limfocytów jest także jasna (ryc. 1). Komórki dokrewne mają kształt owalny lub wydłużony, a swoją szerszą podstawą przylegają do błony podstawowej. Rozkład organelli komórkowych i w większości przypadków komunikowanie się ze światłem gruczołów mikrokosmkami sugeruje morfofizjologiczne spolaryzowanie tych komórek. Sfera komunikująca się ze światłem gruczołów spełniałaby funkcję receptorową, natomiast sfera kontaktująca się z błoną podstawową — funkcję sekrecyjną [31, 44]. Za taką interpretacją przemawiają wyniki eksperymentów badaczy ze szkoły japońskiej. Wykazali oni obecność licznych pęcherzyków „zlewających” się z plazmolemą komórek dokrewnych przylegającą do błony podstawowej [67, 68]. Może to być morfologiczny dowód na egzocytarny sposób uwalniania się produktu komórek dokrewnych w przewodzie pokarmowym.



## KOMÓRKI EC (ENTEROCHROMAFINOWE)

Komórki EC nazywano wcześniej komórkami żółtymi, komórkami Kulczyckiego lub komórkami Massona - Schmidta. Opisano je w przewodzie pokarmowym ssaków i człowieka [102], a od 1952 r. [24] wiąże się ich obecność z produkcją i uwalnianiem 5 - hydroxytryptaminy (5 - HT) [95]. U człowieka znajdują się w przewodzie pokarmowym, a nie jest pewne, czy występują u człowieka w trzustce i w jej przewodach oraz w woreczku żółciowym i przewodach żółciowych [98].

Sposób rozmieszczenia tych komórek w przewodzie pokarmowym człowieka jest niejednolity [79]. Z wyjątkiem trzonu żołądka w pozostałych odcinkach przewodu pokarmowego komórki EC kontaktują się ze światłem gruczołów [31, 102]. Najczęściej położone są one u podstawy gruczołów, ale sporadycznie spotyka się je również w ich środkowych i górnych warstwach [79].

Z obserwacji pod mikroskopem świetlnym komórki te od dawna znano jako argyrofilne i argentafinowe. Wykazują one także intensywną reakcję chromafinową [102] i intensywną reakcję metachromatyczną w barwieniu błękitnym toluidyny [98, 102]. W metodzie fluorescencyjnej Falcka - Hillarpa komórki EC dają silną żółtą fluorescencję formalinową, co wskazuje na wysoką koncentrację 5 - HT w cytoplazmie tych komórek [102]. Podobnie pozytywną reakcję dają inne testy na obecność 5 - HT, np. reakcja dwuazowa [102].

W obserwacjach pod mikroskopem elektronowym jasna cytoplazma komórek EC zawiera u podstawy charakterystyczne dla tych komórek ziarnistości (ryc. 2). Ich wielkość waha się od 200 do 400 nm. Kształt ich jest bardzo zróżnicowany, co wykazano metodą standardową w mikroskopie elektronowym oraz poprzez zastosowanie reakcji argentafinowej w mikroskopie elektronowym [98, 102]. Według Ferreiry [25], różne kształty ziaren w komórkach EC wynikają z dwukłęsłego kształtu części z nich. W jelicie morfologia ziarnistości wydaje się być przynajmniej częściowo zależną od zawartości w nich 5 - HT. Ziarnistości leżące w pobliżu aparatu Golgiego w komórkach EC, traktowanych rezerpiną lub p - chlorofenyloalaniną, są okrągłe. Takie okrągłe ziarna równocześnie słabiej reagują w testach na 5 - HT, co powodować może, że w mikroskopie świetlnym ziarna uchodzą uwagi, a w mikroskopie elektronowym są mniej osmofilne [11].

W normalnych warunkach pomiędzy ziarnami, których kształt można wyprowadzić z przekroju dwukłęsłej struktury, znajdują się ziarnistości okrągłe mniej osmofilne, z mniejszą prawdopodobnie zawartością 5 - HT, ale które rzadko przeważają liczebnie nad ziarnami bardziej osmofilnymi [102].

Zawartość ziarn otacza ściśle przylegająca błona, chociaż w komór-



kach EC myszy i szczura pomiędzy błoną a osmofilną zawartością znajduje się przestrzeń o małej osmofilności. Ziarna upodobniają się u tych zwierząt w ten sposób do ziaren w komórkach ECL. Traktowanie komórek EC jedną z dwu wymienionych substancji (rezerpina, p-chlorofenyloalanina) prowadzi do zaniku 5-HT w ziarnach. Wykazano to pod mikroskopem świetlnym i elektronowym, stosując odpowiednie reakcje specyficzne [102]. Ziarna takie jednak w dalszym ciągu są osmofilne i wyraźnie reagują dodatnio w metodzie Grimeliusa [102]. Wskazuje to na obecność w ziarnach innych niż 5-HT substancji. Obecność jednej z nich w komórkach EC dwunastnicy i jelita czczego motyliny wskazywały już w 1972 r. badania Pearse'a i współpracowników. W następnych latach szkoła angielska wykazała, przy użyciu metod immunocytochemicznych, składnik peptydowy w komórkach EC przewodu pokarmowego oraz określiła różnice morfologiczne między komórkami EC zlokalizowanymi w jelicie i w całym przewodzie pokarmowym. Wyróżniono dwa typy komórek EC, tj. EC<sub>1</sub> i EC<sub>2</sub>. Komórki EC<sub>1</sub> występują w całym przewodzie pokarmowym i obok 5-HT mają produkować substancję P [38, 39, 81]. Ziarna w komórkach EC<sub>1</sub> są wyłącznie okrągłe [38]. Komórki EC<sub>2</sub> występują wyłącznie w jelicie cienkim i produkują motylinę, a ich ziarna są dwuwklęsłe, a nieliczne z nich są okrągłe [38, 48, 81].

#### KOMÓRKI ECL

Komórki ECL opisano w 1967 r. [36] w śluzówce żołądka. Komórki te posiadają ziarnistości podobne do ziarnistości w komórkach EC. Występują głównie w śluzówce dna żołądka [102], a także (według innych autorów) w trzonie żołądka [98] i w części odźwiernikowej [79].

Podobnie jak komórki EC położone są one w głębszych rejonach gruczołów [102], a tylko bardzo nieliczne w szyjce gruczołów. Nigdy jak dotychczas nie znaleziono ich w nabłonku pokrywającym powierzchnię śluzówki żołądka [102]. Nie stwierdzono też aby komórki ECL kontaktowały się ze światłem gruczołów [46, 102].

Komórki ECL są małe i nieregularnego kształtu [102]. Posiadają ziarnistości silnie argyrofilne w metodzie Bodiana, Seviere - Mungersa i Grimeliusa [102]. Brak argentafilności wynika zapewne z nieobecności serotoniny w ziarnach tych komórek [91]. Jedną z metod odróżniania komórek ECL od komórek EC polega na analizie komórek pod mikroskopem fluorescencyjnym po wcześniejszym wstrzyknięciu DOPA i utrwaleniu w parach paraformaldehydu. Komórki EC dają fluorescencję żółtą wynikającą z obecności kompleksu formaldehydu z serotoniną. Natomiast komórki ECL dają fluorescencję zieloną wywołaną obecnością kompleksu dopaminy z formaldehydem [37]. W odróżnieniu od innych komórek dorewnych zlokalizowanych w śluzówce dna żołądka, komórki ECL wykazują wysoką aktywność pseudocholinerazy, znajdującej się w retiku-



lum endoplazmatycznym i w ziarnistościach sekrecyjnych. Komórki ECL w śluzówce żołądka myszy i szczura zawierają histaminę [12, 37]. U człowieka nie stwierdzono obecności histaminy w tych komórkach [102].

Pod mikroskopem elektronowym stwierdza się w komórkach ECL liczne ziarnistości położone u podstawy komórek, o średnicy około 170 nm [102]. Są one zarówno pęcherzykowate z gęstą elektronowo zawartością położoną asymetrycznie, otoczoną przez błonę znacznie odstającą, jak i o budowie bardziej zwartej. Wtedy błona otacza zawartość elektronowo gęstą z wąskim halo [102]. U człowieka, pomimo iż ziarnistości tych komórek nie zawierają histaminy, są one liczne i gęste elektronowo [102]. Zawartość tych ziarnistości jak dotychczas nie została poznana [81]. Hakanson i wsp. [37] uważają, że komórki te u szczura mogą być źródłem czynnika zapobiegającego anemii albo źródłem czynnika wewnętrznego (IF). Wydaje się jednak, że komórki te, jak inne komórki dokrewne przewodu pokarmowego, zawierają jakiś hormon peptydowy [98]. Cechą charakterystyczną komórek ECL jest też obfitość niewielkich wydłużonych mitochondriów [98].

#### KOMÓRKI G

Jakkolwiek gastryna [17, 33, 42, 48, 59] była jednym z najwcześniej poznanych „hormonów tkankowych” przewodu pokarmowego [20], komórkowa lokalizacja produkcji i uwalniania tego hormonu została ustalona dopiero w ostatnich latach [11, 28, 102]. Początkowo wiązano obecność i produkcję gastryny z komórkami nerwowymi splotu Meissnera [5]. W następnych latach głównie dzięki zastosowaniu metod immunohistochemicznych i mikroskopu elektronowego powiązano duże komórki strefy odźwiernikowej z produkcją gastryny [26, 53, 77, 102].

Komórki te stanowią zasadniczy składnik ilościowy komórek dokrewnych w odźwierniku [14, 102]. Wcześniej, zanim poznano drugi zasadniczy typ komórek dokrewnych w tej strefie (komórki D [21]) i hormon produkowany przez te komórki (somatostatyna [81, 90]), powiązanie komórek G z hormonem gastryną dominującym w tej strefie pozwoliło na ich identyfikację [102]. Niektóre badania ultrastrukturalne sugerują obecność komórek G w części wpustowej żołądka. Problem ten wymaga jednak dalszych szczegółowych studiów [102]. Niektóre badania immunohistochemiczne [102] i ultrastrukturalne [29] dowodzą, że komórki G występują także w kryptach dwunastnicy. Przy użyciu metod biochemicznych izolowano także z tego rejonu gastrynę [22].

U człowieka i u zwierząt posiadających lepiej rozwiniętą tę strefę komórek śluzowych (pies, świnka morska, kot) komórki G rozmieszczone są w środkowej trzeciej części gruczołów, podczas gdy u zwierząt ze słabo rozwiniętą strefą komórek śluzowych komórki te położone są



w głębszej połowie śluzówki [79, 102]. Najlepiej identyfikujący komórki G w mikroskopie świetlnym sposób poza metodą immunoperoksydazową polega na połączeniu metody immunofluorescencyjnej z barwieniem specyficznym ziaren komórek dokrewnych na seryjnych półcienkich skrawkach. Wykazano w ten sposób, że komórki specyficznie reagujące z przeciwciałami gastrynowymi reagują pozytywnie w metodzie Grime-liusa [10, 102], w reakcji Pb - H (hematoksylina ołowiowa) oraz wybarwiają się kwaśnymi barwnikami, takimi jak błękit Evansa i erytozyna w metodzie Harlanta [101, 102]. Komórki G wykazują również reakcję pozytywną na tryptofan [102] i intensywną reakcję na dehydrogenazę alfa - glicerofosforanową [13].

Komórki G zawierają liczne położone u podstawy ziarna (ryc. 3), o dosyć zmiennej średnicy (150–350 nm), otoczone wyraźną błoną [79]. Ziarna te, po rutynowej metodzie utrwalania, są częściowo wypełnione włóknistą zawartością, „bywają puste” lub też całe wypełnione są treścią włóknistą o różnym stopniu gęstości elektronowej [98], (ryc. 4). Stopień zagęszczenia ziaren wydaje się być związany z etapem dojrzewania i byłby odbiciem cyklu sekrecyjnego komórek G [27]. Funkcjonalna interpretacja zagęszczenia ziaren powinna być jednak bardzo ostrożna w związku z wykazaniem ostatnio znacznym wpływem warunków utrwalania na stan zawartości ziarn i ich średnicę [59]. Wykazano mianowicie, że wzrost pH utrwalacza i czas utrwalania powoduje w komórkach G żołądka szczura przyrost procentowy ziaren „pustych” lub częściowo opróżnionych oraz wzrost średnicy ziaren. Wyniki tych badań świadczą, że „puste” ziarna nie powstają w następstwie przenikania ich zawartości do cytoplazmy w momencie wzmożonej aktywności sekrecyjnej komórki [15]. Uwalnianie zawartości ziaren z komórek G, podobnie jak z innych komórek dokrewnych przewodu pokarmowego, odbywa się drogą egzocytozy. Dowodzą tego doświadczenia badaczy szkoły japońskiej, którzy w kontroli morfologicznej po działaniu roztworem kwasu solnego lub 3% kwaśnym węglanem sodu w rejonie antrum i dwunastnicy obserwowali przekroje błon w momencie fuzji ziarna sekrecyjnego z plazmolemą i uwalniania zawartości ziaren na zewnątrz komórki, głównie w rejonie przylegania komórek G do błony podstawowej gruczołów [67, 68].

Ostatnie badania immunohistochemiczne żołądka małpy [40] wykazały, że w części odźwiernikowej komórki G zawierające gastrynę występują w sąsiedztwie komórek D zawierających somatostatynę. Sugeruje to funkcjonalną współzależność tych dwu rodzajów komórek.

#### KOMÓRKI A

W żołądku psa i kota opisano komórki o immunoreaktywności komórek A trzustki i o barwliwości w mikroskopie elektronowym podobnej jak komórki A [81, 85, 102]. Komórek tych nie można odróżnić od ko-



mórek EG(L) występujących w jelicie różnych ssaków, jeżeli zastosuje się tylko immunohistochemiczną metodę identyfikacji [102]. Stwierdzono ich sporadyczne występowanie w dwunastnicy i jelicie czczym człowieka [47].

Komórki A zawierają okrągłe ziarnistości o średnicy od 100 do 400 nm [98, 102]. Zawartość ziaren jest elektronowo gęsta (osmofilna) i położona jest względem błony acentrycznie i wybarwia się silnie kwasem fosforowolframowym [102]. Podobnie jak komórki A trzustki, nieregularne halo powstające w wyniku acentrycznego położenia rdzenia wykazuje pod mikroskopem elektronowym reakcję pozytywną w metodzie Grimeliusa. Komórki A, jak inne komórki dokrewne w dnie żołądka, nie komunikują się ze światłem gruczołów [81]. Znaczna ilość filamentów w cytoplazmie odróżnia komórki A żołądka od komórek A trzustki [102]. Komórki A produkują glukagen [3, 6, 7, 48, 56].

W żołądku małpy (*Tupaia belangeri*) opisano, przy użyciu metody immunohistochemicznej, liczne komórki A w górnych odcinkach żołądka, gdzie występowały w sąsiedztwie komórek D. Sugeruje to funkcjonalną zależność tych dwu rodzajów komórek [40]. Produkcję glukagonu stwierdzono m. in. u człowieka w żołądku i w śliniance [3, 6, 7, 54, 56].

#### KOMÓRKI D

Kolejny typ komórek dokrewnych w żołądku i jelitach wykazuje bardzo duże podobieństwo do komórek D w trzustce [102, 103]. Opisywano je też jako komórki X [107], a w innych pracach zaliczano do tej grupy również komórki D<sub>1</sub> [28]. Przy zastosowaniu nowoczesnych metod identyfikacji komórki te są stosunkowo łatwo odróżnialne [102]. Po raz pierwszy stwierdzono ich obecność w odźwierniku, gdzie też są najczęstszymi komórkami dokrewnymi obok G [62, 102]. Najliczniej występują w odźwiernikowej części żołądka (25,8 komórek/nm<sup>2</sup>). Mniej liczne są w gruczołach dwunastniczych Brunnera (2,7 komórek/nm<sup>2</sup>), a sporadycznie występują też w jelicie biodrowym i okrężnicy (0,5 komórek/nm<sup>2</sup>). Położone są one w głębszych partiach gruczołów [102].

W mikroskopie elektronowym stwierdza się obecność słabo osmofilnych, stosunkowo dużych ziarnistości o średnicy 200–400 nm z homogenną zawartością i ściśle przylegającą błoną [98, 102]. Pod względem średnicy ziarnistości istnieją duże różnice między badanymi zwierzętami [102]. Ziarnistości komórek D reagują pozytywnie w metodzie Davenporta, natomiast nie reagują w metodzie Grimeliusa i nie wybarwiają się kwasem fosforowo-wolframowym [102] (ryc. 5).

Komórki D reagują egzocytozą na wprowadzenie kwasu solnego do żołądka. Wskazuje to, że produkują one hormon uwalniający się



po zakwaszeniu, a hamujący uwalnianie kwasu solnego [30, 45, 102]. W ostatnich latach, dzięki zastosowaniu równocześnie metod srebrzeniowych i immunocytochemicznych wykazano, że komórki D zawierają somatostatynę [20, 23, 65, 71, 81, 87, 90].

#### KOMÓRKI D<sub>1</sub>

Komórki D<sub>1</sub> opisywano już dosyć dawno w żołądku i dwunastnicy [101], jednak nie wyodrębniano ich z komórek typu D [12, 102]. Komórki D<sub>1</sub> odróżniają się od komórek D mniejszymi rozmiarami, małymi i słabo osmofilnymi ziarnistościami o średnicy około 150 nm z bardzo wąskim regularnym halo i niskiej osmofilności. W odróżnieniu od ziaren komórki D, ziarnistości komórek D<sub>1</sub> reagują pozytywnie w metodzie Grimeliusa ocenianej pod mikroskopem elektronowym. Ziarnistości w komórkach D<sub>1</sub> barwią się również w metodzie Seviere - Mungersa kwasem fosforowolframowym i hematoksyliną ołowiową. W metodzie Seviere - Mungersa ziarnistości silniej barwią się na peryferiach [102]. Oprócz charakterystycznych ziarnistości, cytoplazma komórek D<sub>1</sub> zawiera liczne filamenty, szczególnie w okolicach jądra. Jest to również cechą morfologiczną odróżniającą je od komórek D [97].

Komórki D<sub>1</sub> występują w żołądku i w jelitach bez wyraźniejszej koncentracji na jakimkolwiek odcinku przewodu pokarmowego. Funkcja komórek D<sub>1</sub> nie jest znana [81].

W niektórych zanikowych zapaleniach żołądka liczba komórek D<sub>1</sub> rośnie. Obserwowano też ich obecność w argyrofilnych nie argentafinowych rakowiakach żołądka, a także w niektórych nowotworach z komórek dokrewnych trzustki [102].

#### KOMÓRKI X

Komórki X pierwszy raz opisano w śluzówce dna żołądka królika [16]. Potem znaleziono je też w dwunastnicy [8]. Komórki X przez stosunkowo długi okres opisywano łącznie z innymi komórkami dokrewnymi. Dzięki stosowaniu coraz to nowych metod barwienia i obserwacji w mikroskopie elektronowym, komórki X stopniowo wyodrębniono jako osobną grupę komórek dokrewnych przewodu pokarmowego [102]. Capella i wsp. [11] odróżnili te komórki od EC stosując kolejno po sobie metodę srebrzenia według Massona i barwienie — kwas fosforowolframowy, hematoxylina (PTAH). W ten sposób brązowo wybarwione komórki EC odróżniono od niebiesko barwiących się komórek X. Komórki X mylono także z komórkami D. Jednakże pełniejsza analiza morfologiczna wykazuje, że ziarnistości w komórkach X są bardziej osmofilne, mniej okrągłe, dobrze wybarwiają się kwasem fosforowolframowym i w metodzie Grimeliusa, a równocześnie słabo w metodzie Davenporta. Niektóre komórki zakwa-



lifikowane do L również powinny być zaliczone do K [102]. Funkcja komórek X nie jest znana [81].

#### KOMÓRKI S

Komórki S wiąże się z produkcją i uwalnianiem znanego od dawna hormonu — sekretyny [18, 37, 75, 85, 100, 102]. Nazwa tych komórek wywodzi się z małych rozmiarów ziarnistości („small” — [11, 104]) lub też od produkowanej w nich sekretyny [85].

Komórki S występują głównie w błonie śluzowej dwunastnicy i w górnym odcinku jelita czczego [88, 92]. Pod mikroskopem świetlnym ich lokalizacja odbywa się głównie przy użyciu metody immunohistochemicznej [75]. Ponadto komórki S silnie wybarwiają się w metodzie Pb - H, są argyrofilne i nieargentafinowe [85].

Badania w mikroskopie elektronowym wykazują w komórkach liczne małe ziarnistości o średnicy od 150 do 200 nm. Ziarnistości są silnie osmofilne, szczególnie w środkowej części [102]. Pomędzy osmofilnym wnętrzem ziarna o otaczającą je błoną jest wąska regularna przestrzeń o niskiej gęstości elektronowej. Ziarnistości komórek S są podobnie jak ziarnistości komórek D<sub>1</sub> pozytywne w metodzie Grimeliusa, ale odróżniają się większą gęstością elektronową, nieco większą średnicą i mniej wyraźnym halo [102]. W cytoplazmie komórek S znajdują się również liczne filamenty cytoplazmatyczne. Ich układ dzieli wnętrze komórki na rejony, w których gromadzą się ziarnistości. Komórki S są komórkami typu otwartego, komunikując się ze światłem gruczołów nieregularnymi mikrokosmkami [98].

#### KOMÓRKI I

Komórki I nazwane tak zostały przez szkołę włoską ze względu na pośrednią wielkość ziaren (intermediate) między wielkością komórek S i EG(L) [98, 102]. Szkoła japońska z tych samych powodów nazywa je komórkami M [98, 102]. Najliczniej występują one w dwunastnicy, a mniej licznie — w jelicie czczym.

Reakcja immunocytochemiczna wskazuje na obecność cholecystokininy w tych komórkach [37, 39, 81, 102].

Średnica ziaren waha się od 150 do 250 nm. Od ziaren komórek S odróżniają się one pod mikroskopem elektronowym poprzez negatywny wynik reakcji argyrofilnej [102]. Komórki I posiadają ponadto znacznie mniej filamentów cytoplazmatycznych niż komórki S. Strefa szczytowa kolbkowatych komórek I ma regularne promieniście ułożone kosmki, które szkoła japońska uważa za najbardziej charakterystyczną cechę morfologiczną komórek I [98].



## KOMÓRKI K

Jako nowy typ komórek dokrewnych opisano ostatnio [100] komórki K. Komórki te są bardzo podobne do opisanych jako A - podobne przez Osakę i wsp. [69]. Występują najliczniej w jelicie czczym i mniej licznie w dwunastnicy i w górnym odcinku jelita biodrowego [102].

Ziarnistości komórek K mają około 300 nm średnicy, przy czym występują tu dosyć znaczne różnice wielkości i kształtu w obrębie jednej komórki. Ziarnistości reagują w metodzie Grimeliusa i Sevierra - Mungersa [102]. Najsilniejszą reakcję obserwuje się na obwodzie ziaren.

Rozmieszczenie komórek K i wynik reakcji immunocytochemicznej [81, 102] wskazują, że zawierają one GIP [8]. Bez zastosowania barwienia immunocytochemicznego wyodrębnienie tych komórek jest trudne.

## KOMÓRKI EG

Komórki EG ze względu na duże rozmiary zawartych w nich ziarnistości opisuje się również jako L [107] lub też jako typ 2 [102]. Komórki te występują u człowieka we wszystkich odcinkach jelita cienkiego i grubego [81].

Komórki EG charakteryzują się dużymi okrągłymi ziarnistościami (250-400 nm) o homogennej zawartości i wysokiej osmofilności. Ziarna zazwyczaj są regularnie kuliste, sporadycznie można jednak stwierdzić ziarna mniej regularnego kształtu [98]. Błona ziaren przylega do zawartości. W ocenianym pod mikroskopem elektronowym srebrzeniu metodą Grimeliusa ziarnistości komórek EG wykazują peryferycznie położony cienki pasek wysrebrzenia [102]. Komórki EG produkują enteroglukagon [81, 83].

## KOMÓRKI H

Ostatnio wyodrębniono jeszcze jeden typ małych komórek dokrewnych — typ H, który wiąże się z produkcją VIP [9, 19, 48, 81, 83, 84, 89]. Komórki te występują najliczniej w jelicie grubym.

## KOMÓRKI N

Ostatnio wyodrębniono w jelicie cienkim następny typ komórek z dużymi ziarnistościami — komórki N, produkujące neurotensynę [41, 105].

## UWAGI KOŃCOWE

W ostatnim dziesięcioleciu w dziedzinie endokrynologii przewodu pokarmowego dokonano znacznego postępu w zakresie struktury i czynności komórek dokrewnych przewodu pokarmowego i trzustki; wiele za-



gadnień nadal jednak oczekuje na wyjaśnienie. I tak, np. lista hormonów przewodu pokarmowego jak i komórek je produkujących nie jest jeszcze zamknięta. Dotychczasowy stan wiedzy został w znacznej mierze osiągnięty dzięki powiązaniu wyników prac biochemicznych, zwłaszcza radioimmunologicznego oznaczania hormonów we krwi, tkankach i treści jelitowej, z badaniami immunocytochemicznymi komórek dokrewnych. Wprowadzenie nowszych metod cytochemicznych na poziomie ultrastruktury, w zastosowaniu do półcienkich skrawków, pozwoliło na potwierdzenie hipotezy „jedna komórka — jeden hormon” jak też pozwoliło wyosobnić dalsze typy komórek dokrewnych.

Obecnie wiele uwagi poświęca się zachowaniu komórek dokrewnych układu pokarmowego w stanach patologicznych [96, 108]. Zauważono m. in. zaburzenia stosunków ilościowych komórek G:D w części przypadków wrzodów dwunastnicy [81, 83]. Rozrost i przerost komórek D stwierdzono w otoczeniu niektórych wyspiaków trzustki. Stwierdzono również rozrost komórek ECL w części przypadków zespołu Zollingera - Ellisona. Wymienione przykłady, a także rozwijająca się hipoteza czynności parakrynalnej mogą w przyszłości stanowić podstawę nowej interpretacji patogenezы szeregu chorób układu pokarmowego.

#### LITERATURA

- [1] ANDREW A., A study of the developmental relationship between enterochromaffin cells and the neural crest, *J. Embryol. Exp. Morphol.*, **11**: 307-324, 1963.
- [2] — Further evidence that enterochromaffin cells are not derived from the neural crest, *J. Embryol. Exp. Morphol.*, **31**: 589-598, 1974.
- [3] BARRAGAN L. M., RUFENER C., DOBBS R. E., SHANNOW W. A., BAETENS D., UNGER R. H., Immunocytochemical evidence for glucagon — containing cells in the human stomach, *Horm. Metab. Res.*, **9**: 37-39, 1977.
- [4] BASTER R., PEARSE A. G. E., Mammalian enterochromaffin cells as the source of serotonin (5 - hydroxytryptamine), *J. Pathol. Bact.*, **69**: 25-31, 1955.
- [5] BAUGH C. M., BRAVO J. L., BARCENA J., DRAGSTEDT L. R., Studies on the mechanism of gastrin release, *Arch. Surg.*, **76**: 441-446, 1958.
- [6] BLAZQUEZ E., MUNOZ BARRAGAN L., PATTON G. S., DOBBS R. E., UNGER R. H., Demonstration of gastric glucagon hypersecretion in insulin deprived alloxan diabetic dogs, *J. Lab. Clin. Med.*, **89**: 971-977, 1977.
- [7] — Gastric glucagon secretion, *Metabolism*, **25**: 1475-1476, 1976.
- [8] BROWN J. C., DRYBURG J. R., A gastric inhibitory polypeptide. II. The complete amino acid sequence, *Can. J. Biochem.*, **49**: 867-872, 1971.
- [9] BUFFA R., CAPELLA C., SOLCIA E., FRIGORIO B., SAID S. J., Vasoactive intestinal peptide (VIP) cells in the pancreas and gastrointestinal mucosa. An immunohistochemical and ultrastructural study, *Histochemistry*, **50**: 217-227, 1977.



- [10] BUSSOLATI G., PEARSE A. G. E., Immunofluorescent localization of the gastrin — secreting G cells in the pyloric antrum of the pig, *Histochemia*, **21**: 1-4, 1970.
- [11] CAPELLA C., SOLICA E., VASSALLO G., Identification of six types of endocrine cells in the gastrin — intestinal mucosa of the rabbit, *Arch. Histol. Jap.*, **30**: 479-495, 1969.
- [12] — Light and electron microscopic identification of the histamine storing argyrophil (ECL) cell in murine stomach and of its equivalent in other mammals, *Z. Zellforsch.*, **118**: 68-84, 1971.
- [13] CARVALHEIRA A. F., WELSCH U., PEARSE A. G. E., Cytochemical and ultrastructural observations on the argentaffin and argyrophil cells of The gastrointestinal tract in mammals, and their place in the APUD series of polypeptide — secreting cells, *Histochemie*, **14**: 33-46, 1968.
- [14] CREUTZFELDT W., ARNOLD R., FEURLE G., KETTERER H., Gastrin and G cells in the antral mucosa of patients with pernicious anaemia, acromegaly and hyper — parathyroidism and in a Zollinger-Ellison tumor of the pancreas, *Eur. J. Clinic. Invest.*, **1**: 461-479, 1971.
- [15] CREUTZFELDT W., TRACK N. S., CREUTZFELDT C., ARNOLD R. The secretory cycle of the G cell: ultrastructural and biochemical investigations of the effect of feeding in rats, [w] *Gastrointestinal Hormones*, red. J. C. Thompson, University of Texas, Press Austin and London 1975, 197-211.
- [16] DAVIS J. C., The relation between the pancreatic alpha cells and ceration cells in the gastric mucosa, *J. Pathol. Bact.*, **67**: 237-240, 1954.
- [17] DAWSON I. M. P., The endocrine cells of the gastro-intestinal tract and the neoplasms which arise from them, [w] *Pathology of the Gastro-Intestinal Tract*, red. B. C. Morson, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York 1976, 221-258.
- [18] DEMLING L., DOMSCHKE W., RIEMANN J. F., DOMSCHKE S., RUPPIN H., JUNGE O., WINSCH E., Gastrointestinal effects of long-term treatment of duodenal ulcer with depot sercretin: clinical, secretory, ultrastructural and enzymological aspects, *Scand. J. Gastroenter*, **11**, Suppl. **42**: 135-143, 1976.
- [19] DOCKRAY G. J., Molecular evolution of gut hormones. Application of comparative studies on the regulation of digestion, *Gastroenter.*, **72**: 344-358, 1977.
- [20] DUBOIS P. M., PAULIN C., DUBOIS M. P., Gastrointestinal somatostation cells in the human fetus, *Cell. Tiss. Res.*, **166**: 179-184, 1976.
- [21] EDKINS J. S., *J. Physiol. (London)*, **34**: 133, 1906. Cyt według Solcia [100].
- [22] EMAS S., FYRO B., Gastrin — like activity in different parts of the gastro-intestinal tract of the cat, *Acta Physiol. Scand.*, **74**: 359-367, 1968.
- [23] ERLANDSEN S. L., HEGRE O. D., PARSONS J. A., Mc EWEY R. C., EL-DE R. P., Pancreatic islet cel hormones. Distribution of cell types in the islet and evidence for the presence of somatostatin and gastrin within D cell, *J. Histochem. Cytochem.*, **24**: 883-897, 1976.
- [24] ERSPAMER V., ASERO B., Identyfication of enteramine the specific hormone of the enterochromaffin cell system, as 5-hydroxytryptamine, *Nature*, **169**: 800-801, 1952.
- [25] FERREIRA M. N., Argentaffin and other „endocrine” cell of the small intestine in adult mouse. I. Ultrastructure and classification, *Amer. J. Anat.*, **141**: 315-330, 1971.
- [26] FORSMAN W. G., The ultrastructure of the endocrine cells in the normal and pathological gastrointestinal mucosa, [w] *Chromaffin, Enterochromaffin*



- and Related Cells, red. R. E. Ceupland, T. Fujita, Elsevier Publishing Company Amsterdam 1976, 227-241.
- [27] FORSMAN W. G., ORCI L., Ultrastructure and secretory cycle of the gastrin — producing cell, *Z. Zellforsch.*, **101**: 419-432, 1969.
- [28] FORSMAN W. G., ORCI L., PICTET R., RENOLD A. E., ROULLER C., The endocrine cells in the epithelium of the gastrointestinal mucosa of the rat, *J. Cell. Biol.*, **40**: 692-715, 1969.
- [29] FREKINOS J., BALAS D., RIBET A., Cyt. według SOLCIA [100], *Biol. Gastroenter.*, **6**: 105-197, 1973.
- [30] FUJITA T., KOBAYASHI S., Experimentally induced granule release in the endocrine cells of the dog pyloric antrum, *Z. Zellforsch.*, **116**: 52-60, 1971.
- [31] — The cells and hormones of GEP endocrine system. The current studies, [w] *Gastro-entero — pancreatic endocrine system. A cell-biological approach*, red. T. Fujita, Igaku Shoin Ltd., Tokyo 1973, 1-16.
- [32] CHIRINGHELLO B., BUSSOLATI G., Aldehyde-Fuchsin staining of antral endocrine cells, *Histochemistry*, **48**: 145-152, 1976.
- [33] GREIDER M. H., STEINBERG V., McGUIGAN J. E., Electron microscopic identification of the gastrin cell of the human antral mucosa by means of immunocytochemistry, *Gastroenter.*, **63**: 572-583, 1972.
- [34] HAKANSON R., LARSSON L. I., OWMAN Ch., SNELL K. C., SUNDLER F., Fluorescence and electron microscopic histochemistry of endocrine — like cells in gastric mucosa and argyrophil tumor of *Praomys (Mastomys) natalensis*. Analysis of 5-hydroxytryptamine, histamine, histidine decarboxylase and aromatic amino acid decarboxylase, *Histochemie*, **37**: 23-38, 1973.
- [35] HAKANSON R., LARSSON L. I., NISHIZAKI H., OWMAN Ch., SUNDLER F., A new type of formaldehyde induced fluorescence in a population of endocrine cells in cat antro-pyloric mucosa, *Histochemie*, **34**: 1-9, 1973.
- [36] HAKANSON R., OWMAN Ch., Concomitant histochemical demonstration of histamine and catecholamines in enterochromaffin like cells of gastric mucosa, *Life. Sci.*, **6**: 759-766, 1967.
- [37] HAKANSON R., OWMAN Ch., SJOBERG N. O., SPORRONG B., Amine mechanism in enterochromaffin and enterochromaffin-like cells of gastric mucosa in various mammals, *Histochemie*, **21**: 189-220, 1970.
- [38] HEITZ P., POLAK J. M., KASPER M., Immunoelectron cytochemical localization of motilin and substance P in rabbit bile duct enterochromaffin (EC) cells, *Histochemistry*, **50**: 319-325, 1977.
- [39] HEITZ Ph., POLAK J. M., TIMSON C. M., PEARSE A. G. E., Enterochromaffin cells as the endocrine source of gastrointestinal substance P, *Histochemistry*, **49**: 343-347, 1976.
- [40] HELMSTAEDTER V., FEURLE G. E., FORSMAN W. D., Relationship of glucagon-somatostatin and gastrin-somatostatin cells in the stomach of the monkey, *Cell Tiss. Res.*, **177**: 29-46, 1977.
- [41] HELMSTAEDTER V., TAUGNER Ch., FEURLE G. E., FORSMANN W. G., Localization of neurotensin-immunoreactive cells in the small intestine of man and various mammals, *Histochemistry*, **53**: 35-42, 1977.
- [42] JOHNSON L. R., New aspects of the trophic action of gastrointestinal hormones, *Gastroenter.*, **72**: 788-792, 1977.
- [43] JUNGE D. M., DICKAMN P. S., TRAPUDKI S., Nonfunctioning argyrophilic tumor (APUDoma) of the hepatic duct. Simplified methods of detecting biogenic amines in tissue, *Am. J. Clin. Pathol.*, **66**: 40-45, 1976.



- [44] KANNE T., Unidirectional cellular processes in stimulussecretion coupling in cells of the GEP system, [w] Gastro - entero — pancreatic endocrine system. A cell biological approach, red. T. Fujita, Igaku Shoin Ltd., Tokyo 65-70, 1973.
- [45] KOBAYASHI S., FUJITA T., Emiocytotic granule release in the basal granulated cells of the dog induced by intraluminal application or adequate stimuli [w] Gastro - enteropancreatic endocrine system. A cell biological approach, red. T. Fujita, Igaku Shoin Ltd., Tokyo 1973, 49-48.
- [46] KOBAYASHI S., FUJITA T., SASAGAWA J., Electron microscope studies of the endocrine cells of the human gastric fundus, Arch. Histol. Jap., 32: 429-444, 1971.
- [47] KOBAYASHI S., FUJITA T., SASAGAWA T., The endocrine cells of human duodenal mucosa. An electron microscope study, Arch. Histol. Jap., 31: 447-494, 1970.
- [48] KONTUREK S., Fizjologia układu trawiennego, PZWL, Warszawa 1976.
- [49] LAMPRECHT J., Komórki endokrynowe błony śluzowej jelit. I. Komórki endorochromafinowe, Patol. Pol., 25: 587-584, 1974.
- [50] — Komórki endokrynowe błony śluzowej jelit. II. Komórki nieargentafinowe, Patol. Pol., 25: 595-602, 1974.
- [51] LARSON L. I., LJUNGBERG O., SUNDLER F., HAKANSON R., SVENSSON S. O., Antropylic gastrinoma associated with pancreatic nesidioblastosis and proliferation of islets, Virchows Arch. Abt. A. Pathol. Anat., 306: 305-314, 1973.
- [52] LARSSON L. I., SUNDLER F., HAKANSON R., Formaldehyde - hydrochloric acid treatment. A fluorescence histochemical method for the demonstration of tryptophan residues in peptides and proteins, J. Histochem. Cytochem., 23: 873-881, 1975.
- [53] LARSSON L. I., SUNDLER F., HAKANSON R., RECHFELD J. F., STADIL F., Immunofluorescent localization of gastrin in rabbit antropylic mucosa to argyrophil cells exhibiting formaldehyde - ozone - induced fluorescence, Histochemie, 37: 81-87, 1973.
- [54] LAWRENCE A. M., TAN S., HOJVAT S., KIRSTEINS L., MITTON J., Salivary gland glucagon in man and animals, Metabolism, 25, 11, Suppl. 1: 1405-1408, 1976.
- [55] LeDOURIN N. M., The migration of neural crest cells to the wall of the digestive tract in avian embryo, J. Embryol. Exp. Morphol., 30: 31-48, 1973.
- [56] LEFEBVRE P. J., LUYCKX A. S., Factors controlling gastricglucagon release, J. Clinic. Investing., 59: 716-722, 1977.
- [57] MALSTROEM J., STADIL F., RECHFELD J. F., Gastrins in tissue. Concentration and component pattern in gastric, duodenal and jejunal mucosa of normal human subjects and patients with duodenal ulcer, Gastroenter., 70: 697-703, 1976.
- [58] MASSON P., Carcinoids (argentaffin — cell tumors) and nerve hyperplasia of the appendicular mucosa, Am. J. Pathol., 4: 181-211, 1928.
- [59] McMORTENSEN N. J., MORRIS J. F., The effect of fixation conditions on the ultrastructural appearance of gastrin cell granules in the rat gastric pyloric antrum, Cell. Tiss. Res., 176: 251-263, 1977.
- [60] MIRECKA J., Komórki dokrewne cewy pokarmowej. I. Ogólna charakterystyka morfologiczna i histochemiczna. Przegląd Lekarski, 34: 355-360, 1977.



- [61] — Komórki dokrewne cewy pokarmowej. II. Rozmieszczenie oraz podstawy identyfikacji ultrastrukturalnej, *Przegląd Lekarski*, **34**: 419-422, 1977.
- [62] MUNOZ BARRAGAN L., RUFNER C., SRIKANT C. B., DOBBS R. E., SHANNOW W. A., BEOTENS D., UNGER R. H., Immunocytochemical evidence for glucagon-containing cells in the human stomach, *Horm. Metab. Res.*, **9**: 37-39, 1977.
- [63] NOLL W. W., LEVINE E. J., Histidine decarboxylase in gastric tissues of primates, *Biochem. Pharmacol.*, **19**: 1043-1053, 1970.
- [64] ORCI L., PICTET R., FORSSMANN W. G., RENOLD A. E., ROUILLER C., Structural evidence for glucagon-producing cells in the intestinal mucosa of the rat, *Diabetologia*, **4**: 56-67, 1968.
- [65] ORCI L., UNGER R. H., Functional subdivision of islets of Langerhan and possible role of D cells, *Lancet*, Dec. **20**: 1243-1244, 1975.
- [66] ORLOFF M. J., GUILLEMIN R. C. I., NAKAI N. T., Isolation of the hormone responsible for the intestinal phase of gastric secretion, *Gastroenter.*, **72**: 820, 1977.
- [67] OSAKA M., SASAGAWA T., FUJITA T., Emiocytotic granule release in the human antral endocrine cells, [w] *Gastro-enteropancreatic endocrine systems. A cell — Biological approach*. Fujita, Igaku Shoin Ltd., Tokyo 1973, 59-63.
- [68] — Granule release from endocrine cells in acidified human duodenal bulb: An electron microscope study of biopsy materials, *Arch. Histol. Jap.*, **37**: 73-94, 1974.
- [69] — Endocrine cells in human jejunum and ileum. An electron microscope study of biopsy materials, *Arch. Histol. Jap.*, **35**: 235-248, 1973.
- [70] PAGE I. H., CORCORAN A., UDENFRIEND S., SZOEDSMA A., WEISSBACH H., Argentaffinoma as endocrine tumor, *Lancet*, **1**: 198-199, 1955.
- [71] PARSONS J. A., ERLANDSEN S. L., HEGRE O. D., McEVEY R. C., ELDER R. P., Central and peripheral localization of somatostatin. Immunoenzyme immunocytochemical studies, *J. Histochem. Cytochem.*, **24**: 872-882, 1976.
- [72] PEARSE A. G. E., A contribution to the chemistry of mammalian enterochromaffin cells, *Rivista di Istechimica Normale Patologica*, **11**: 103-110, 1956.
- [73] — Common cytochemical and ultrastructural characteristics of cells producing polypeptide hormones (the APUD series) and their relevance to thyroid, *Pros. R. Soc. London (Biol.)*, **170**: 71-80, 1968.
- [74] — The cytochemistry and ultrastructure of polypeptide-hormone producing cells of the APUD series and the embryologic, physiologic and pathologic implications of the concept, *J. Histochem. Cytochem.*, **17**: 303-313, 1969.
- [75] — The endocrine cells of the GI tract: Origins, morphology and functional relationship in health and disease, *Clinics in Gastroenterology*, **3**: 491-510, 1974.
- [76] PEARSE A. G. E., BUSSOLATI G., Immunofluorescence studies of the distribution of gastrin cells in different clinical states, *Gut.*, **11**: 646-648, 1970.
- [77] — The identification of gastrin cells as G cells, *Virchows Arch. Abt. A.*, **355**: 99-104, 1972.
- [78] PEARSE A. G. E., BUSSOLATI G., POLAK J. M., Immunofluorescence studies on the G cells in normal and abnormal gastric mucosa, *Acta Hepato-Gastroenterologica*, **19**: 291-295, 1972.
- [79] PEARSE A. G. E., COULLING J., WEAVERS B., ERIESEN S., The endocrine polypeptica cells of the human stomach, duodenum and jejunum, *Gut.*, **11**: 649-658, 1970.



- [80] PEARSE A. G. E., POLAK J. M., Neural crest origin of the endocrine polypeptide cells of the gastro-intestinal tract and pancreas, *Gut.*, **12**: 783-788, 1971.
- [81] PEARSE A. G. E., POLAK J. M., BLOOM S. R., The newer gut hormones. Cellular sources, physiology, pathology and clinical aspects, *Gastroenter.*, **72**: 746-761, 1977.
- [82] PICTET R. L., RALL L. B., PHELPS P., RUTTER W. J., The neural crest and the origin of the insulin-producing and other gastrointestinal hormone-producing cells, *Science*, **191**: (4223), 191-192, 1976.
- [83] POLAK J. M., BLOOM S. R., BUCHAN A., BRYANT M., PEARSE A. G. E., Comparative distribution of VIP and EG in man (Abstr.), *Gastroenter.*, **72**: 821, 1977.
- [84] POLAK J. M., BLOOM S. R., BUCHAN A., PEARSE A. G. E., Plurihormonal endocrine cells (Abstr.), *Gastroenter.*, **72**: 822, 1977.
- [85] POLAK J. M., BLOOM S. R., COULLING J., PEARSE A. G. E., Immunofluorescent localization of secretin in the canine duodenum, *Gut.*, **12**: 605-610, 1971.
- [86] POLAK J. M., BLOOM S. R., McCROSSAN M. V., McCLAY R., SOUTH L. M., BARON J., PEARSE A. G. E., Abnormalities of endocrine cells in patients with duodenal ulceration and with chronic pancreatitis (Abstr.), *Gastroenter.*, **72**: 822, 1977.
- [87] POLAK J. M., BLOOM S. R., McCROSSAN M. V., TIMSON C. M., PEARSE A. G. E., Distribution of somatostatin producing D cells in the human intestine (Abstr.), *Gastroenter.*, **72**: 822, 1977.
- [88] POLAK J. M., COULLING I., DOE W., PEARSE A. G. E., The G cells in pernicious anaemia, *Gut.*, **12**: 319-323, 1971.
- [89] POLAK J. M., PEARSE A. G. E., GRAUD J. C., BLOOM S. R., Cellular localization of a vasoactive intestinal peptide in the mammalian and avian gastrointestinal tract, *Gut.*, **15**: 720-724, 1974.
- [90] POLAK J. M., PEARSE A. G. E., GRIMELIUS L., Growth hormone release inhibiting hormone (GH — RIH) in gastrointestinal and pancreatic D cells, *Lancet*, **1**: 1220-1222, 1975.
- [91] ROWIŃSKI J., Komórki wewnątrzwydzielnicze żołądka i jelit, *Pol. Arch. Med. Wewn.* **50**: 1097-1101, 1973.
- [92] RUBIN W., A fine structural characterisation of the proliferated endocrine cells in atrophic gastric mucosa, *Am. J. Pathol.*, **70**: 109-118, 1973.
- [93] — An unusual intimate relationship between endocrine cells and other types of epithelial cells in the human stomach, *J. Cell Biol.*, **52**: 219-227, 1972.
- [94] — Endocrine cells in the normal human stomach. A fine structural study, *Gastroenter.*, **62**: 784-800, 1972.
- [95] RUBIN W., GERSHON M. D., ROSS L. L., Electron microscope autoradiographic identification of serotonin — synthesizing cells in the gastric mucosa, *J. Cell. Biol.*, **50**: 399-415, 1971.
- [96] SANDLER M., SNOV P. D. J., An atypical carcinoid tumor secreting 5-hydroxytryptophan, *Lancet*, **1**: 137-139, 1958.
- [97] SASAGAWA T., KOBAYASHI S., FUJITA T., The endocrine cells in the human pyloric antrum. An electron microscope study of biopsy materials, *Arch. Histol. Jap.*, **32**: 275-288, 1970.
- [98] SASAGAWA T., KOBAYASHI S., FUJITA T., Electron microscope studies on the endocrine cells of the human gut and pancreas, [w] *Gastro-enteropan-*



- creatic endocrine system. A cell — biological approach, red. Fujita, Igaku Ltd., Tokyo 1973, 17-37.
- [99] SOGA J., Carcinoids: Their changing concepts and a new histologic classification, [w] Gastro - entropancreatic endocrine systems. A cell — Biological approach, red. Fujita. Igaku Shoin Ltd., Tokyo 1973, 101-119.
- [100] SOLCIA E., The gastrin cell and the secretin cell, *Rendic. Gastroenter.*, 4: 22-30, 1972.
- [101] SOLCIA E., CEPELLA C., VASSALLO G., Lead - hematoxylin as a stain for endocrine cells. Significance of staining and comparison with other selective methods, *Histochemie*, 20: 116-126, 1969.
- [102] SOLCIA E., CAPELLA C., VASSALLO G., BUFFA R., Endocrine cells of the gastric mucosa, *Int. Rev. Cytol.*, 42: 223-286, 1975.
- [103] SOLCIA E., SAMPIETRO R., Cytologic observations on the pancreatic islets with reference to some endocrine - like cells of the gastrointestinal mucosa, *Z. Zellforsch.*, 68: 689-698, 1965.
- [104] STERNBERGER L. A., *Immunocytochemistry*, Prentice — Hall Inc., New York 1974, 129-171.
- [105] SUNDLER F., ALUMETS J., HAKANSON R., CARRAWAY, R., LEEMAN S. E., Ultrastructure of the gut neurotensin cell, *Histochemistry*, 53: 25-34, 1977.
- [106] VASSALLO G., SOLCIA E., BUSSOLATI G., POLAK J. M., PEARSE A. G. E., Non - G - cell gastrin producing tumors of the pancreas, *Virchows Arch. Abt. B. Zellpatho* 11: 66-79 1972.
- [107] VASSALLO G., SOLCIA E., CAPELLA C., Light and electron microscopic identification of several types of endocrine cells in the gastrointestinal mucosa of the cat, *Z. Zellforsch.*, 98: 333-356, 1969.
- [108] WEICHERT R. F., ROTH L. M., HARKIN J. C., Carcinoid - islet cell tumor of the duodenum and associated multiple carcinoid tumors of the ileum. An electron microscopic study, *Cancer*, 27: 910-918, 1971.
- [109] ZAVIACIC M., BREZMAN M., JAKUBOWSKY J., Influence of fasting and stimulation of the rat gastric endocrine cells. Histochemical and ultrastructural study, *Histochemistry*, 49: 315-325, 1976.

*Otrzymano: 6 grudnia 1977.*

*Przyjęto: 20 grudnia 1977.*

*Adres autorów: ul. Grzegórzecka 16, 31 - 531 Kraków.*







## BIOELEKTRYCZNE PODSTAWY AKTYWNOŚCI RUCHOWEJ W ORGANIZMACH PIERWOTNIACZYCH

### BIOELECTRIC BASIS OF MOTOR ACTIVITY IN PROTOZOAN CELLS

Stanisław FABCZAK i Ewa MIKOŁAJCZYK

Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN, Warszawa

*Streszczenie.* Większość komórek pierwotniaczych jest zdolna do reakcji podczas działania na nie szeregu bodźców zewnętrznych. Reakcje te najczęściej przejawiają się w formie zmian zachowania się aparatu ruchowego komórki. Są one spowodowane powstawaniem w określonych rejonach komórki recepcyjnych potencjałów elektrycznych w wyniku działania bodźca i rozprzestrzenieniem się ich następnie na obszar całej błony komórkowej. Mechanizmy jonowe leżące u podstaw takiego zjawiska u pierwotniaków są zasadniczo podobne do pobudliwości membranowej i recepcji bodźców występujących w komórkach tkanek mięśniowych i nerwowych. Ruch jonów poprzez błonę w wyniku powstałych na niej zmian elektrycznych wpływa w sposób bezpośredni lub pośredni na zmiany stężenia określonych jonów w cytoplazmie komórki, wywołując tym samym aktywację układu kurczliwego organelli ruchowych. Proces taki łącznie z morfologicznie wyspecjalizowanym aparatem ruchowym kontroluje całokształt zachowania się ruchowego różnego rodzaju pierwotniaków.

*Summary.* Most of the cell responses of protozoans to external stimuli occur as changes in a behaviour of the motor apparatus of the cell. They are due to electric receptor potential arising in certain regions of the cell membrane and generates an overall electric cell response. The ionic mechanisms which are involved in these phenomena in protozoans are essentially similar to the membrane excitability and stimulus reception occurring in muscle and nerve cells. The movements of ions across the membrane modify directly or indirectly the ion concentration level in the cytoplasm, causing an activation of contractile organelles. This process jointly with the morphologically specialized motor apparatus controls the motile behaviour in various protozoans.



## WPROWADZENIE

Przypuszczenie, że lokalizacja systemu kontrolującego wyzwalanie plazmatycznych właściwości skurczowych komórki odpowiedzialnych za różnorodne przejawy ruchowe jest zawarta w obszarze plazmoemy, było po raz pierwszy sformułowane na początku XX w. przez Lillie [53, 54]. Na podstawie swoich badań wysunął on koncepcję, że skurcz struktur protoplazmatycznych niezależnie od miejsca ich lokalizacji jest zawsze stymulowany przez elektryczną depolaryzację plazmoemy w tym rejonie komórki. Jednakże sugestia ta nie została całkowicie zaakceptowana przez ówczesnych badaczy i dopiero późniejsze badania elektrofizjologiczne nad komórkami tkanek mięśniowych i nerwowych dostarczyły bezpośrednich dowodów na to, że właściwości błony komórkowej kontrolują kurczliwe reakcje struktur wewnątrzkomórkowych [30, 32, 34, 35, 44, 57, 80, 81]. Rozbieżności w poglądach na ten temat istnieją również wśród fizjologów prowadzących badania na komórkach pierwotniaczych. Niektórzy badacze stwierdzają, że niektóre komórki pierwotniacze posiadają niepobudliwą błonę komórkową, mimo występowania w nich zjawiska kurczliwości [36]. Duża jednak liczba doświadczeń elektrofizjologicznych, przeprowadzonych na komórkach pierwotniaczych, których wyniki zostały ostatnio opublikowane, wykazuje w przekonujący sposób istnienie ścisłego powiązania między elektryczną aktywnością błony a właściwościami kurczliwymi układów lokomotorycznych w tych komórkach. Od charakteru bodźca zależy zatem sposób pracy aparatu rzęskowego czy wiciowego (np. szybkość oraz kierunek poruszania się komórki) [2-6, 19, 39, 49, 58, 72, 77].

Również z membranową pobudliwością elektryczną są związane i inne reakcje lokomotoryczne wyrażające się w postaci skurczów ciała u niektórych orzęsków [4, 6, 46, 85-88], poruszania się komórek *Noctiluca* [16], ruchu protoplazmatycznych strumieni w amebie czy śluzowcu *Physarum* [49, 79]. Ten sam mechanizm kontroluje również bioluminescencję u *Noctiluca*, gdzie podczas działania bodźca mechanicznego jest wyzwalany potencjał czynnościowy sprzężony ze świeceniem cytoplazmy komórkowej [16]. Potencjał czynnościowy ma miejsce także przy reakcjach fotofobowych u stentora [88]. Fakty te świadczą o tym, że bioelektryczna kontrola nad zachowaniem się komórek ma charakter ogólny i wydaje się być podobna we wszystkich komórkach niezależnie od ich pochodzenia.

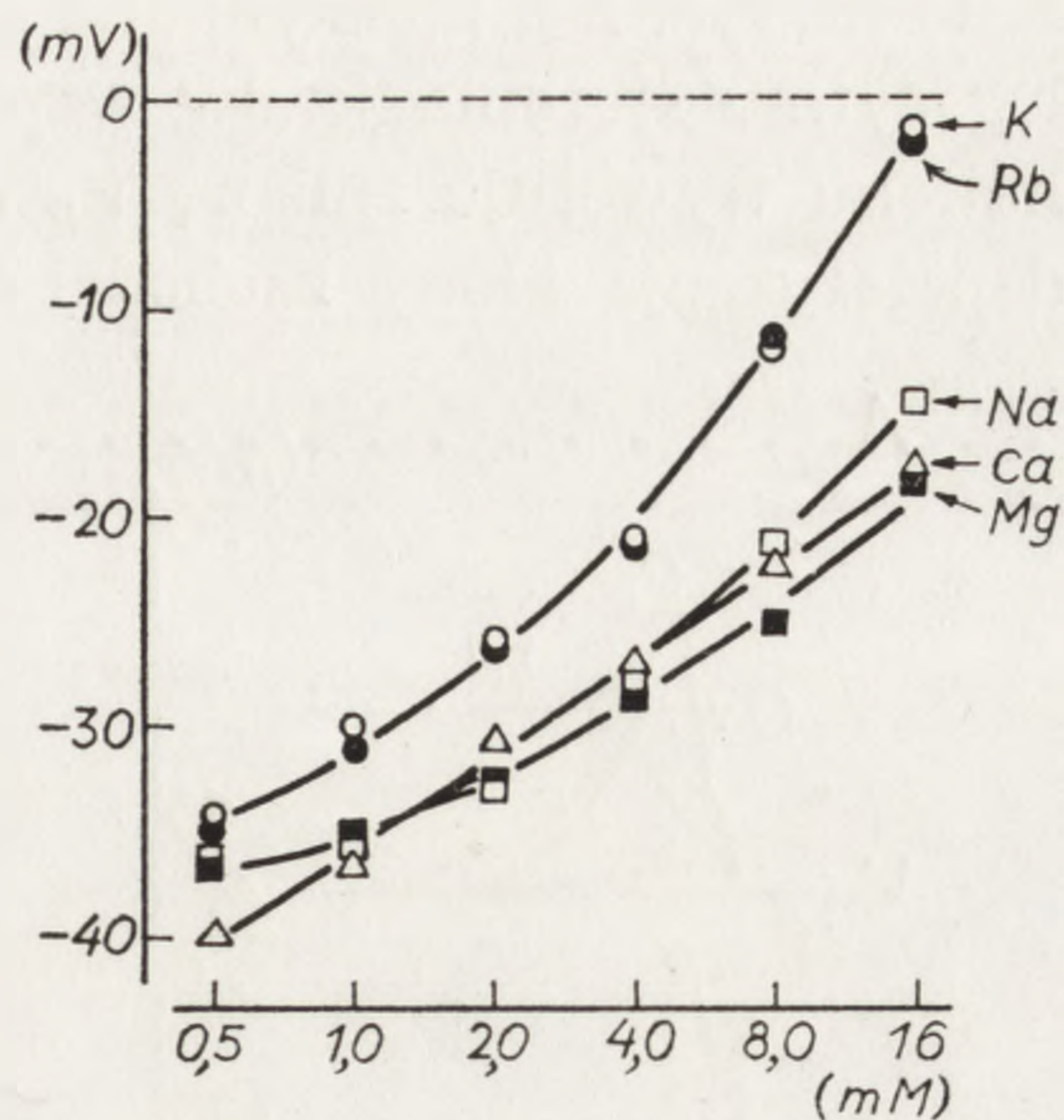
## ELEKTRYCZNA AKTYWNOŚĆ BŁONY KOMÓRKOWEJ

Jednokomórkowce, podobnie jak komórki tkanek nerwowych i mięśniowych, posiadają ujemny potencjał elektryczny na błonie względem



środowiska zewnętrznego [2, 12, 25, 74]. Dla orzęska *Paramecium* fakt ten był stwierdzony po raz pierwszy przez Kamadę [41] i potwierdzony w późniejszych badaniach przez wielu innych badaczy (np. [12, 89]). Badania te wykazały, że wartość potencjału elektrycznego na błonie komórkowej może podlegać stosunkowo dużym wahaniom pod wpływem zmian zachodzących w środowisku zewnętrznym. Podwyższenie stężenia różnego rodzaju kationów w środowisku powoduje spadek potencjału membranowego, a jego ilościowe zmiany są uzależnione od rodzaju poszczególnych kationów (ryc. 1). Zależność ta oznacza, że błona wykazuje zróżnicowaną selektywność przepuszczalności jonowej dla kationów. Na przykładzie *Paramecium* stwierdzono, że wśród wielu testowanych jonów kationy potasu oraz rubidu są przepuszczane najłatwiej do wnętrza komórki ze środowiska, natomiast kationy typu  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^{++}$  oraz  $\text{Mg}^{++}$  posiadają mniejszą możliwość przenikania przez błonę. Z obliczeń dokonanych przez Eckerta i Naitoha wynika, że przewodnictwo jonowe dla potasu jest 10-krotnie wyższe w porównaniu z przewodnictwem wapniowym [12].

Jeżeli poddać komórkę *Paramecium* działaniu prądu elektrycznego za pomocą mikroelektrod wewnątrzkomórkowych, to okazuje się, że błona komórki zachowuje się jak typowa oporność omowa połączona równolegle z kondensatorem (całkowita pojemność elektryczna błony). Przebieg zmian potencjału elektrycznego na błonie w czasie w wyniku działania pola elektrycznego ma charakter wykładniczy (rys. 2A - a). Przekroczenie krytycznej wartości depolaryzacji błony może spowodować pogłębienie tego procesu niezależnie od zakończenia działania samego bodźca. Jest to wartość stanowiąca początek aktywnej reakcji elektrycznej błony na działanie bodźca i jest nazywana potencjałem iglicowym (spike-like potential) lub potencjałem recepcyjnym (ryc. 2A - b). Maksymalna wartość depolaryzacji jak i maksymalna szybkość przebiegu tego procesu ( $V_p$  oraz  $dV_m/dt$  na ryc. 2A - c) wzrasta wraz ze wzrostem intensywności impulsu indukującego depolaryzację. Badania jonowego podłoża aktywnej reakcji błony dokonano za pomocą określania wpływu stężenia różnych jonów w środowisku komórki na wartość  $V_p$  [62]. Jak jest to poka-

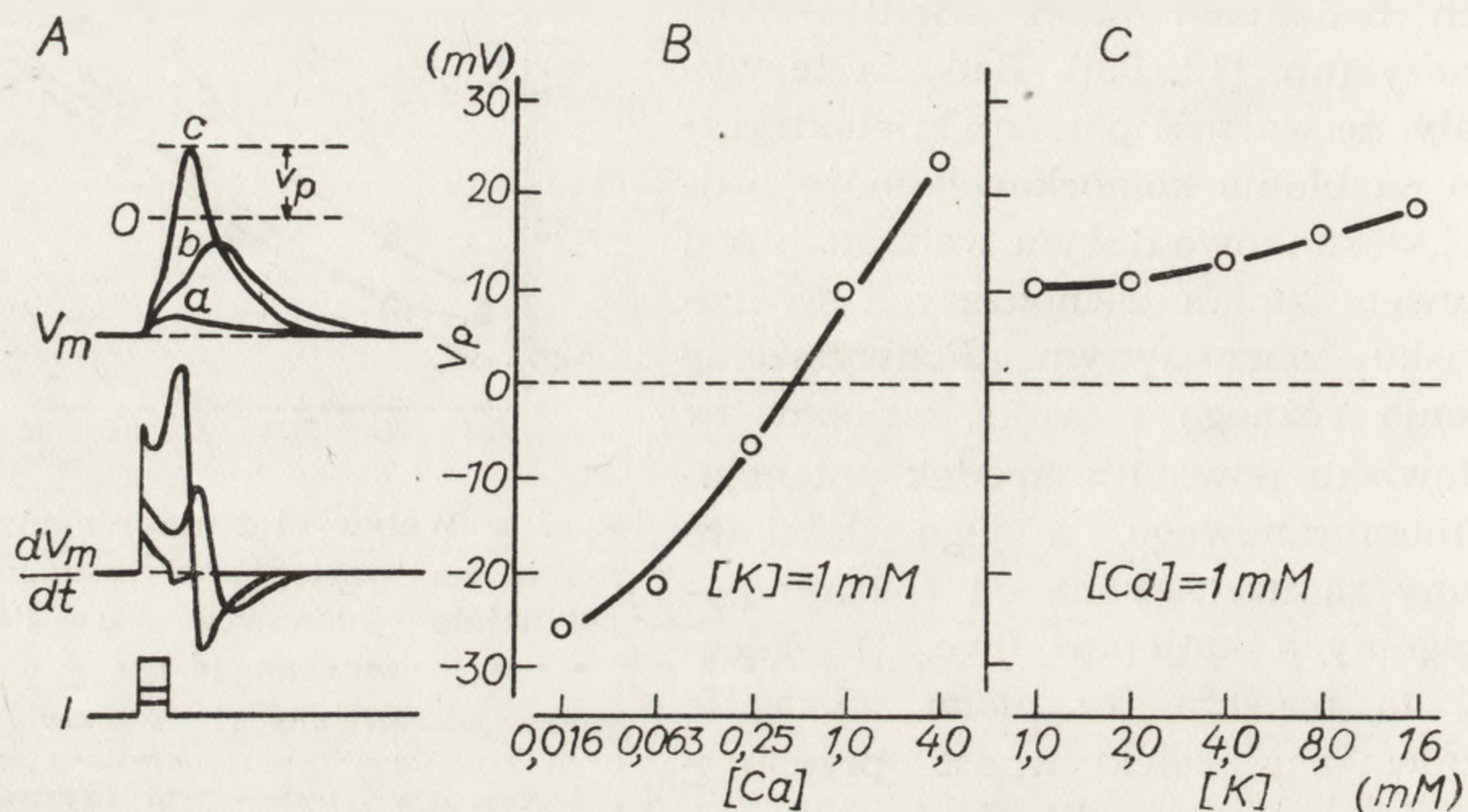


Ryc. 1. Wpływ stężenia niektórych jonów na wartość spoczynkowego potencjału błonowego u *Paramecium* [63]

Wpływ poszczególnych kationów różnych od  $\text{Ca}^{++}$  był określany przy obecności w testowanym roztworze 1 mM  $\text{Ca}^{++}$



zane na rys. 2B, maksymalna depolaryzacja  $V_p$ , rośnie wraz ze wzrostem logarytmu stężenia jonów wapniowych. 10 - krotna zmiana stężenia tego kationu wywołuje zmianę  $V_p$  o około 25mV. Rezultaty te wykazują, że depolaryzacja błony zachodzi wyłącznie dzięki wzrostowi przepuszczal-



Ryc. 2.

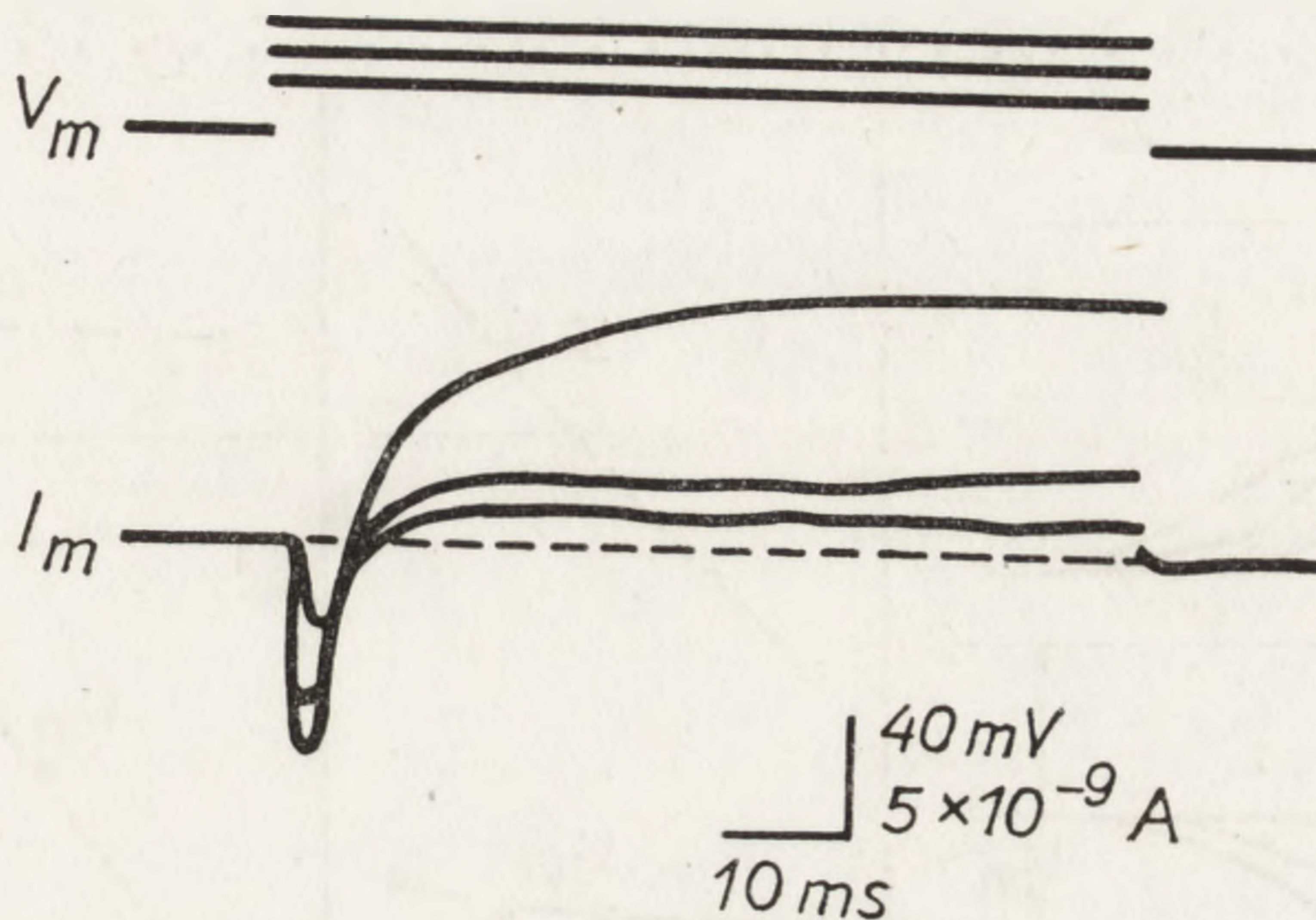
A — zmiany potencjału błony ( $V_m$ ) wywołane prądem depolaryzującym o zmiennej intensywności ( $I$ )  $dV/dt$  — pochodna potencjału błonowego, B — wpływ stężenia  $Ca^{++}$  na maksymalną wartość potencjału ( $V_p$ ), C — wpływ jonów  $K^+$  na wartość  $V_p$  [62]

ności wapniowej, tj. wytworzeniu się jonowego strumienia wapniowego skierowanego do wnętrza komórki zgodnie z gradientem stężenia. Fakty te świadczą, że przebieg procesu depolaryzacji błony *Paramecium* jest zgodny z jonową hipotezą tłumaczącą generowanie stanów aktywnych błon komórkowych organizmów wyższych [31]. Dokładniejsze badania elektrofizjologiczne pozwoliły ustalić, że wznoszącą część potencjału iglicowego tworzą właśnie przepływy wapniowe. Można taki fakt lepiej uwidocznić, jeżeli stosuje się w badaniach elektrofizjologicznych technikę wymuszonej wartości depolaryzacji elektrycznej na błonie (voltage - clamp technique). Na ryc. 3 pokazano, że intensywność strumienia wapniowego jest funkcją  $V_m$  stopnia depolaryzacji błony komórkowej. Późniejsza repolaryzacja (tj. hiperpolaryzacja) błony w wyniku wytwarzania się strumienia jonowego skierowanego na zewnątrz komórki zachodzi dzięki jonom potasu. Tak więc proces przywracania początkowego stanu elektrycznego błony zachodzi za pomocą kationu potasowego (rys. 2A - c). Traktowanie komórki prądem hiperpolaryzującym nie wywołuje żadnej aktywnej reakcji elektrycznej błony [63].

Interesujące efekty zaobserwowano przy stosowaniu stymulacji me-



chanicznej na niektórych orzęskach [24, 62, 85]. Otóż mechaniczne pobudzenie przedniego końca komórki *Paramecium* wywołuje depolaryzację błony identyczną do depolaryzacji uzyskanej w wyniku działania pola elektrycznego (ryc. 4A - a). Natomiast ta sama sty-



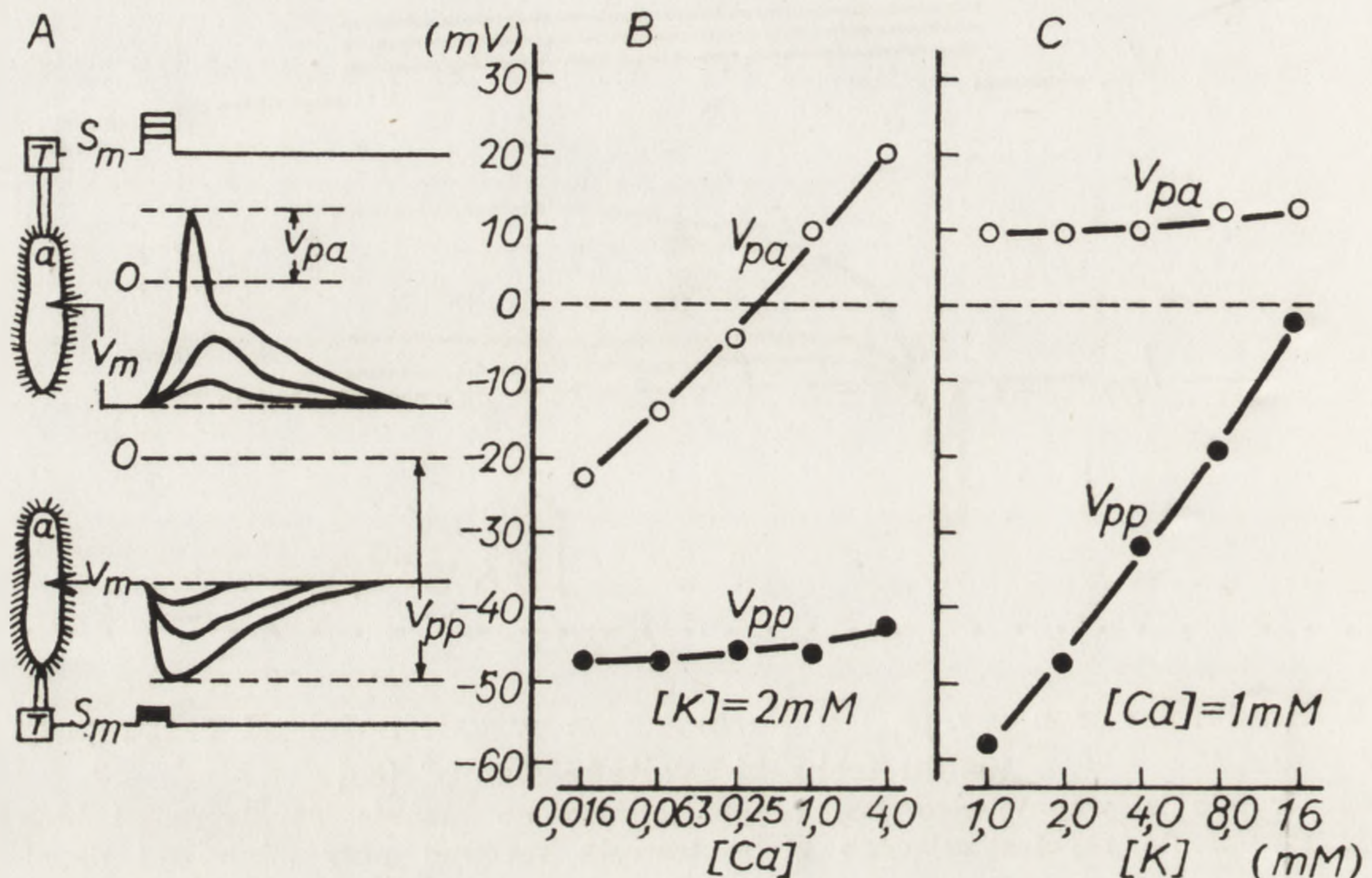
Ryc. 3. Prąd membranowy ( $I_m$ ) u *Paramecium* w zależności od czasu przy stosowaniu techniki „voltage-clamp” [63]

Wartość strumienia wapniowego jest proporcjonalna do stopnia depolaryzacji błony ( $V_m$ ). Wartość strumienia repolaryzującą błonę wzrasta mocniej przy silniejszej depolaryzacji.

mulacja mechaniczna, lecz przeciwległego końca, wytwarza rezultat odwrotny, mianowicie błona ulega hiperpolaryzacji (ryc. 4A - b). Obie reakcje elektryczne (tj. depolaryzacja i hiperpolaryzacja) podczas działania bodźców mechanicznych są uzależnione od intensywności tej stymulacji, im jest ona wyższa, tym mocniejsza jest reakcja. Wpływ różnych kationów w środowisku komórki na pobudliwość błony przy stosowaniu bodźców mechanicznych jest odmienny dla poszczególnych obszarów komórki. Wielkość hiperpolaryzacji błony na tylnym końcu komórki jest liniową funkcją logarytmu stężenia jonów potasowych. 10 - krotna zmiana stężenia tego kationu w zewnętrznym środowisku wywołuje zmianę wartości maksymalnej depolaryzacji o 50 mV ( $V_{pp}$  na ryc. 4 - c). Tak więc przy tylnym końcu komórki następuje lokalny wzrost przepuszczalności potasowej przez błonę i tym samym redukcja ujemnego potencjału elektrycznego. Ponieważ równowagowy potencjał elektrochemiczny dla jonów potasowych jest wyższy, w ujemnych wartościach, aniżeli elektryczny potencjał spoczynkowy błony, to jony te mogą przemieszczać się poprzez tę błonę w kierunku środowiska komórki dając w rezultacie efekt hiperpolaryzacji. Reakcja elektryczna błony przy przednim końcu komórki jest z kolei funkcją logarytmu stężenia zewnątrzkomórkowych kationów  $Ca^{++}$ . 10 - krotny wzrost stężenia jonów wapniowych depolaryzuje błonę o 25 mV ( $V_{pa}$  na ryc. 4B). Dalsze szczegółowe badania tego



zjawiska wykazały dodatkowo, że elektryczna reakcja depolaryzacyjna błony w wyniku mechanicznej stymulacji składa się z dwóch dobrze rozróżnialnych faz. Pierwsza faza reprezentuje sobą stosunkowo wolno przebiegającą depolaryzację, po której następuje druga faza w postaci



Ryc. 4. Elektryczna reakcja błony ( $V_m$ ) w wyniku mechanicznej stymulacji przedniego (a) i tylnego końca komórki [63]

A — impulsy elektryczne ( $S_m$ ) doprowadzane do przetwornika piezoelektrycznego (T) wprawiają w ruch drgający szklany pręt, B — wpływ zewnętrznego  $Ca^{++}$  na wartość  $V_{pa}$  i  $V_{pp}$ , C — wpływ stężenia jonów  $K^+$  na  $V_{pa}$  oraz  $V_{pp}$

szybkiego przebiegu (potencjału iglicowego). Prędkość narastania reakcji elektrycznej błony przy stymulacji mechanicznej jak i wartość amplitudy wzrastają wraz ze wzrostem intensywności działania tego bodźca. Podstawowe cechy szybkiej składowej reakcji depolaryzacyjnej błony *Paramecium* oraz jej zależność od stężenia zewnątrzkomórkowego  $Ca^{++}$  są bardzo zbliżone do potencjałów czynnościowych w wyniku działania prądu elektrycznego (ryc. 2). Wydaje się być prawdopodobne, że szybki przebieg potencjału elektrycznego jest regeneratywną reakcją błony wytworzoną przez początkową powolną depolaryzację w wyniku stymulacji mechanicznej.

#### ROLA JONÓW WAPNIA W ZJAWISKU AKTYWNOŚCI RUCHOWEJ

Badania morfologiczne komórek pierwotniaczych prowadzonych za pomocą transmisyjnego mikroskopu elektronowego wykazują, że błona w sposób ciągły pokrywa podstawową powierzchnię komórki i jej lokomotoryczne organella [21]. Szczególnie wyraźnie jest to widoczne dla



orzęsków. Z faktu tego wypływa oczywisty wniosek, że indukcja strumieni jonowych w błonie komórkowej w trakcie jej pobudzenia elektrycznego może wpływać na aktywność aparatu lokomotorycznego komórki. W celu sprawdzenia tego przypuszczenia przeprowadzono badania dotyczące bezpośredniego wpływu niektórych kationów na aktywację aparatu ruchowego. Doświadczenia takie wykonano na modelach komórkowych orzęska, *Paramecium*. Modele otrzymano za pomocą roztworów ekstrakcyjnych zawierających detergent Triton X - 100 [60]. Traktowanie żywych komórek tym roztworem likwiduje półprzepuszczalne właściwości błony komórkowej, w związku z czym jony znajdujące się w środowisku zewnętrznym stają się bezpośrednio dostępne dla struktur kurczliwych w określonych organellach [61]. Na bazie tych doświadczeń stwierdzono, że obecność jonów magnezowych i cząsteczek ATP w testowanym roztworze wywołuje powolne płynięcie modelu komórkowego do przodu, podobnie jak porusza się żywa komórka nie poddawana stymulacji zewnętrznej. Całkowita więc reaktywacja układu rzęskowego w modelach komórek *Paramecium* jest osiągnięta przy obecności jonów  $Mg^{++}$  oraz ATP. Jony wapniowe w tym procesie nie są konieczne. Zmieniając stężenie jonów magnezowych i ATP w środowisku można uzyskiwać zmiany szybkości poruszania się modelu do przodu (w wyniku zmiany częstotliwości pracy rzęsek). Wprowadzenie do roztworu z  $Mg^{++}$  i ATP również jonów wapniowych wywołuje reorientację przestrzenną pracy rzęski; w miarę wzrostu stężenia zewnętrznego  $Ca^{++}$  maleje szybkość płynięcia komórki do przodu aż do całkowitego odwrócenia tego ruchu w rezultacie zmiany kierunku uderzenia rzęski w przestrzeni. Moment ten zwany zjawiskiem rewersji jest osiągnięty przy stężeniu  $Ca^{++}$  równym w przybliżeniu wartości  $5 \times 10^{-5}M$ . Tak więc w środowiskach o wysokim stężeniu wapnia modele komórek *Paramecium* są w stanie poruszać się wyłącznie tyłem do przodu. Jeżeli umieszczano modele w środowisku z ATP oraz  $Ca^{++}$ , to nie otrzymywano normalnej reaktywacji ruchowej rzęsek, a jedynie zmianę pozycji spoczynkowej rzęski na rewersyjną. Zatem na całkowity obraz pracy układu rzęskowego u *Paramecium* składają się dwa odrębne czynniki. Jeden z nich uzależniony jest od obecności jonów magnezowych kontrolujących cykliczną pracę rzęsek, natomiast czynnik drugi dokonuje kontroli nad przestrzenną orientacją ruchu poprzez udział jonów wapniowych. W obu tych przypadkach w roztworze musi znajdować się ATP uczestniczący w przekształcaniu energii chemicznej w mechaniczną.

Podobne rezultaty otrzymano na modelach dużego słodkowodnego orzęska, *Spirostomum* [75]. Modele otrzymywano w roztworach zawierających detergent, digitoninę. Przywrócenie funkcji aparatu rzęskowego następowało w roztworach z jonami magnezowymi przy ich stężeniu



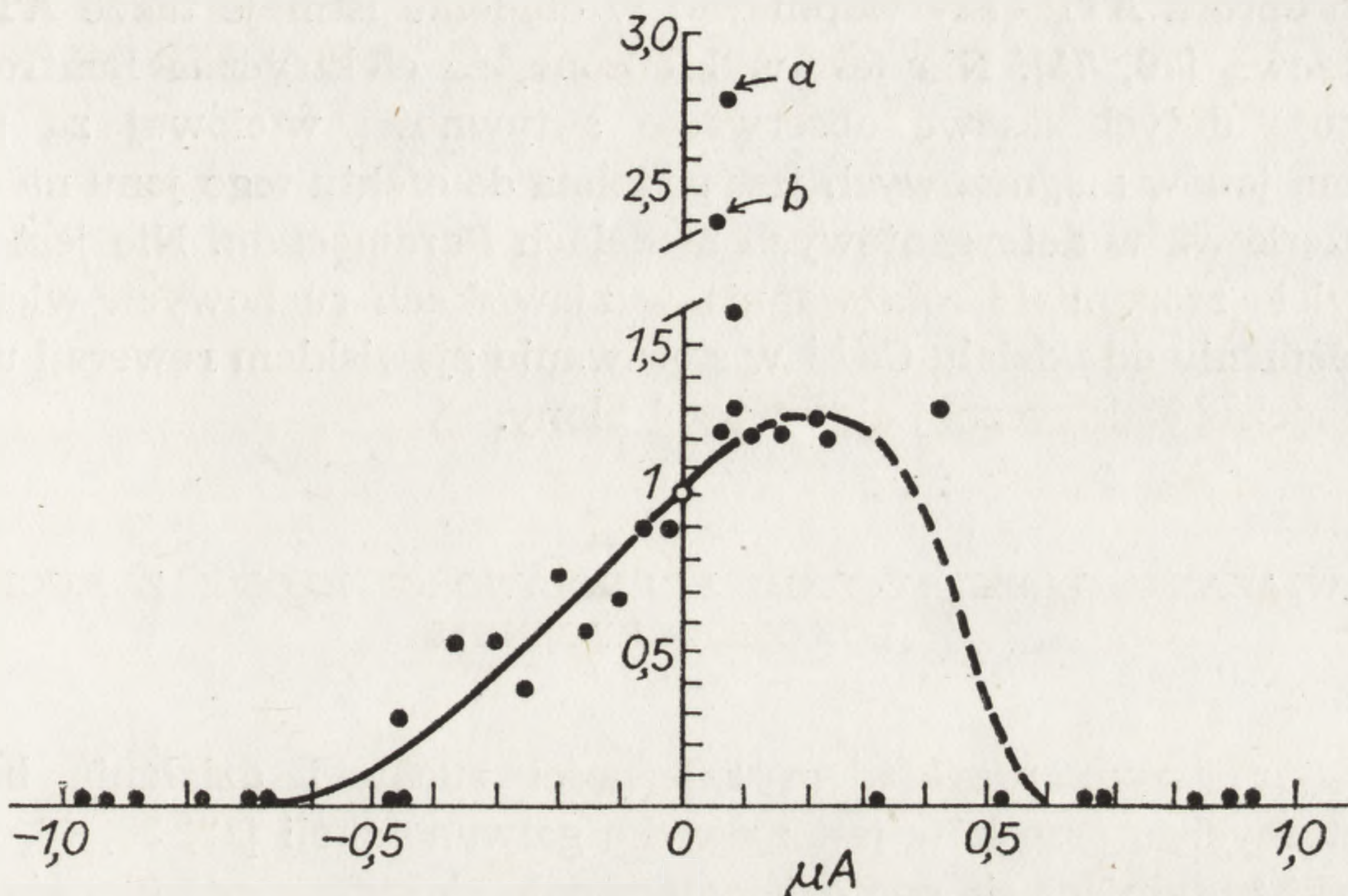
wynoszącym  $10^{-3}\text{M}$  oraz z ATP w stężeniu  $5-10 \times 10^{-4}\text{M}$ . Obecność jonów wapniowych w doświadczalnym roztworze nie powodowała żadnych zmian w aktywności ruchowej cytolizowanych komórek, a powodowała jedynie energiczny skurcz ciała pierwotniaka *Spirostomum*, który oprócz lokomotorycznego układu rzęskowego, jak w komórkach *Paramecium*, posiada mionemalny układ kurczliwy ciała.

Dokonano również prób otrzymania modeli komórkowych wiciowców, w celu stwierdzenia istnienia podobnych mechanizmów kontrolujących aktywność ruchową. Początkowe prace przeprowadzone zostały na wiciowcu, *Euglena*, którego modele otrzymywano w procesie glicerynacji. Wykazały one, że do reaktywacji aktywności wiciowej modelu jest konieczna obecność ATP [84]. Następne doświadczenia o podobnym charakterze, lecz przeprowadzone na żywych komórkach, potwierdziły tę obserwację jak też ujawniły one dalsze fakty [64-66]. Doświadczenia takie polegały na wprowadzaniu elektroforetycznym do wnętrza eugleny niektórych jonów za pomocą wewnątrzkomórkowych mikroelektrod. Standardową aplikację prądu elektrycznego stosowano również w obecności antybiotyku, gramicydyny, w celu modyfikacji przewodnictwa jonowego błony. Gramicydyna jest zdolna wytwarzać poprzeczne kanały w dwuwarstwowych błonach lipidowych [1, 29] oraz zmienia w znacznym stopniu ich przewodnictwo jonowe w szczególności dla kationów metali [20, 28]. Działanie ujemnego prądu elektrycznego przez okres około 1 sek. na komórkę w środowisku fizjologicznym zawierającym ATP oraz wapniowo - magnezowy chelator, EGTA, powoduje zatrzymanie normalnej pracy wici. Renormalizacja jej pracy ma miejsce po około 30 sek., tj. po tym czasie praca wici przebiega w typowy dla eugleny sposób [33, 76]. Dodanie natomiast do tego roztworu testowego gramicydyny w stężeniu  $1 \mu\text{M}$  wydłuża okres elektrycznej stymulacji, w celu osiągnięcia zatrzymania pracy wici do kilku sekund. Najdłuższy okres takiej stymulacji jest konieczny aby osiągnąć ten efekt w środowisku, w którym oprócz gramicydyny znajduje się dodatkowo magnez (około  $1 \text{ mM}$ ). W takich warunkach (tj.  $1 \mu\text{M}$  gramicydyny oraz  $1 \text{ mM Mg}^{++}$ ) stwierdzono, że częstotliwość pracy wici wykazuje zależność od wartości prądu elektrycznego pobudzającego komórkę. Na ryc. 5 jest przedstawiona aktywność wiciowa u *Euglena* jako funkcja intensywności stymulacji elektrycznej. Hiperpolaryzacja błony komórkowej powoduje spadek aktywności, a przy prądzie  $0,3 \mu\text{A}$  aktywność jest zerowa [66].

Wiadomo jest, że zawartość jonów magnezowych w komórce wynosi około  $0,25 \text{ mg/ml}$ , co jest równoznaczne stężeniu około  $10 \text{ mM}$  [69]. W chlorofilu występuje ich niewiele, a więc pozostała ilość magnezu prawdopodobnie jest wykorzystywana do podtrzymania normalnej aktywności wici. W obecności gramicydyny ma miejsce prawdopodobnie pod-



czas stymulacji elektrycznej ucieczka jonów magnezowych z komórki w większej ilości aniżeli bez jej obecności. W przypadku doświadczalnego środowiska zawierającego również kationy magnezu, magnez cytoplazmatyczny uwolniony w trakcie działania stymulacji elektrycznej ma



Ryc. 5. Aktywność wiciowa u *Euglena* jako funkcja prądu polaryzującego błonę w obecności 1 mM EGTA, 10 mM ATP, 1 mM  $Mg^{++}$ , 1  $\mu$ M gramicydyny [66]

mniejsze szanse opuszczenia komórki ponieważ jest zmuszony wędrować przeciwko gradientowi elektrochemicznemu (zarówno gradient elektryczny, jak i koncentracyjny jest dodatni, tj. skierowany na zewnątrz komórki). W związku z tym dla wytłumaczenia zmian aktywności wiciowej u *Euglena* przez zewnątrzkomórkowy magnez należy przyjąć istnienie aktywnego mechanizmu jonowego (pompy) transportującego jony magnezu poza obręb komórki. Fakt, że przy stężeniach wyższych od 3 mM  $Mg^{++}$  w testowanych środowiskach nie ma możliwości zahamowania bicia wici za pomocą ujemnego prądu elektrycznego, świadczy o wysyceniu wydajności tego mechanizmu.

Na euglenie, jak i na komórkach innego wiciowca, *Chlamydomonas*, przeprowadzono badania dotyczące aktywności ruchowej za pomocą elektroforetycznej mikroiniekcji jonów  $Mg^{++}$  oraz  $Ca^{++}$  [65]. Użyto w tym celu wewnątrzkomórkowych mikroelektrod szklanych zawierających oprócz standardowego elektrolitu również te dwa kationy. Stwierdzono, że wstrzyknięcie 0,02 M  $Ca^{++}$  powoduje spadek aktywności wiciowej u *Euglena* i *Chlamydomonas*. Wielkość tego spadku jest uzależniona od ilości wprowadzonych do komórki jonów wapniowych. Całkowite zahamowanie pracy wici następuje przy aplikacji do cytoplazmy komórki



$2 \times 10^{-9}$  ml 0,02 M  $\text{Ca}^{++}$ . Natomiast iniekcja do cytoplazmy *Euglena*  $2 \times 10^{-9}$  ml 0,2 M  $\text{Mg}^{++}$  podwyższa prawie dwukrotnie częstotliwość pracy. Wyniki tych badań wykazują więc istnienie w euglenie magnezowego regulatora aktywności wiciowej. Z biochemicznych badań wiadomo, że oprócz ATP - azy wapniowej w euglenie istnieje także ATP - aza magnezowa [70, 71]. Nie jest wykluczone, że elektryczna kontrola, jak wykazują dotychczasowe obserwacje aktywności wiciowej za pośrednictwem jonów magnezowych jest podobna do efektu tego jonu na aktywność rzęskową w detergentowych modelach *Paramecium*. Nie jest jednak całkowicie zrozumiała rola wapnia w zjawiskach ruchowych wiciowców w odróżnieniu od udziału  $\text{Ca}^{++}$  w sterowaniu zjawiskiem rewersji u orzęsków podczas elektrycznej aktywności błony.

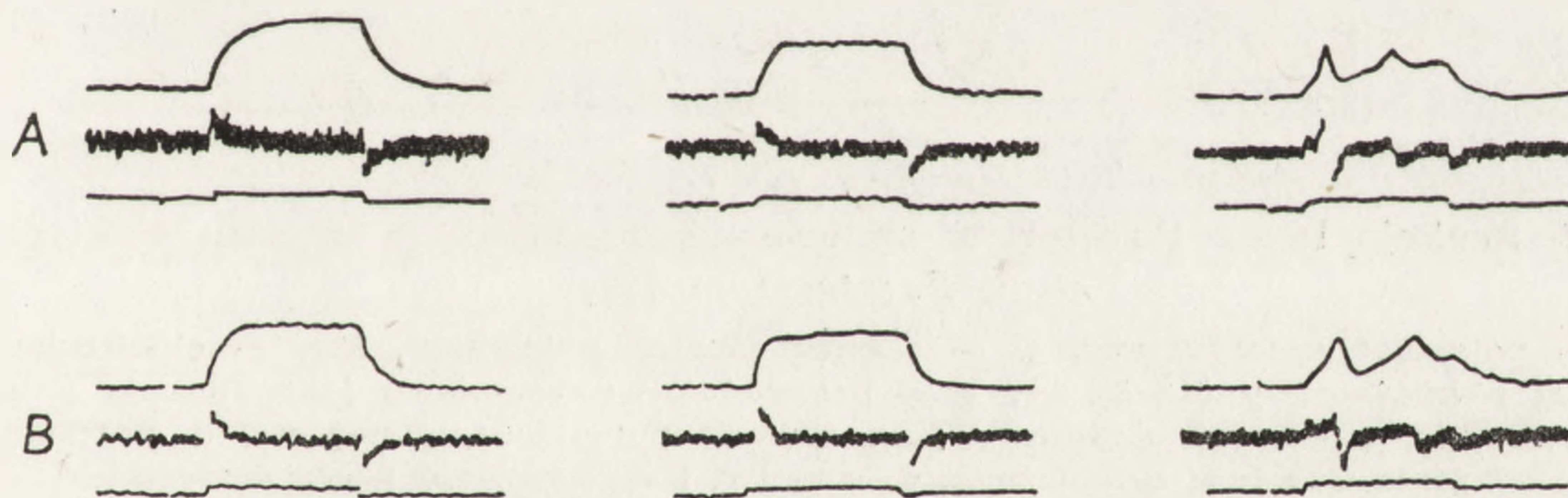
#### POWIĄZANIA ELEKTRYCZNEJ POBUDLIWOŚCI BŁONY Z RUCHEM LOKOMOTORYCZNYM

Najprostszym przykładem zależności ruchu i działania bodźców zewnętrznych u orzęsków jest zjawisko galwanotaksji [22, 38, 40, 55, 83]. Komórki znajdujące się pod działaniem pola elektrycznego ulegają jednokowej orientacji przestrzennej ruchu i migrują ku elektrodzie dodatniej. Zjawisko to zachodzi dzięki zwiększaniu się częstotliwości bicia rzęsek od strony elektrody dodatniej i wchodzeniu w rewersję rzęsek rozmieszczonych na komórce od strony katody i wytworzeniu się sił skręcających, powodujących obracanie się komórki do chwili, w której przedni koniec komórki będzie skierowany w stronę katody (zanik obrotowego momentu sił — zerowa serwokorekcja). Przy silniejszych polach elektrycznych działających na komórkę rewersja układu rzęskowego występuje na większej części błony komórkowej, co wywołuje migrację ku anodzie (galwanotaksję dodatnią). Dla wyjaśnienia tego procesu wysuwano przypuszczenia, że komórkę można traktować jako izolowany przewodnik elektryczny. Błona komórkowa bowiem posiada dużo wyższy opór elektryczny w porównaniu z cytoplazmą czy zewnątrzkomórkowym roztworem fizjologicznym (elektrolitem). Reakcje lokomotoryczne powinny zatem wynikać ze wzrostu lokalnych stężeń jonów wapniowych jako rezultat elektroforetycznych przesunięć jonów w polu elektrycznym [37]. Jednakże w świetle ostatnich badań staje się oczywiste, że mimo bezspornego udziału wapnia w zjawiskach ruchowych komórek za ich zmiany są odpowiedzialne raczej lokalne różnice potencjału elektrycznego na błonie wytworzone przez zewnętrzne pole elektryczne.

Wiadomo na podstawie jednoczesnego zapisu elektrycznej reakcji błony *Paramecium* i jego aktywności rzęskowej, że reorientacja prze-



strzenna bicia rzęski zachodzi dokładnie w momencie rozpoczynania się elektrycznej reakcji błony [56]. Stopień tej reakcji jest tym mocniejszy, im silniejsza jest odpowiedź wapniowa błony. Uzyskano ostatnio dane o istnieniu i lokalizacji kanałów wapniowych w błonie komórkowej *Paramecium*. Tą drogą przedostają się prawdopodobnie jony do wnętrza komórki *Paramecium*, gdzie odgrywają rolę regulatora układu lokomotorycznego tego pierwotniaka [9–11]. Jak się okazało, kanały wapniowe są rozmieszczone w błonie pokrywającej rzęski komórki. Wniosek ten wypływa z faktu, że przy usunięciu z powierzchni komórki większości rzęsek, przez inkubację pierwotniaków w roztworze wodzianu chloralu [43, 52], osiąga się prawie całkowity zanik wapniowej reakcji regeneratywnej. Odrzęsione w ten sposób pierwotniaki przeniesione do roztworu fizjologicznego odzyskują z biegiem czasu zdolność reakcji wapniowej w miarę ponownego odrastania rzęsek (ryc. 6). Taki stan rzeczy wydaje się być prawdopodobny ze względu na większe możliwości modyfikacji stężenia wapnia wokół aksonemy o izopotencjalnych właściwościach [9, 10, 67] aniżeli w całej objętości cytoplazmy. O konieczności istnienia kanałów wapniowych w pobudliwości ruchowej świadczą odkryte niedawno szczepy pierwotniaka *Paramecium*, które nie posiadają w odróżnieniu od normalnych komórek zdolności wchodzenia w rewersję podczas działania bodźców zewnętrznych [50, 51]. Elektrofizjologiczne doświadczenia na tych komórkach, nazywanych w angielskim nazewnictwie „paw”, wy-

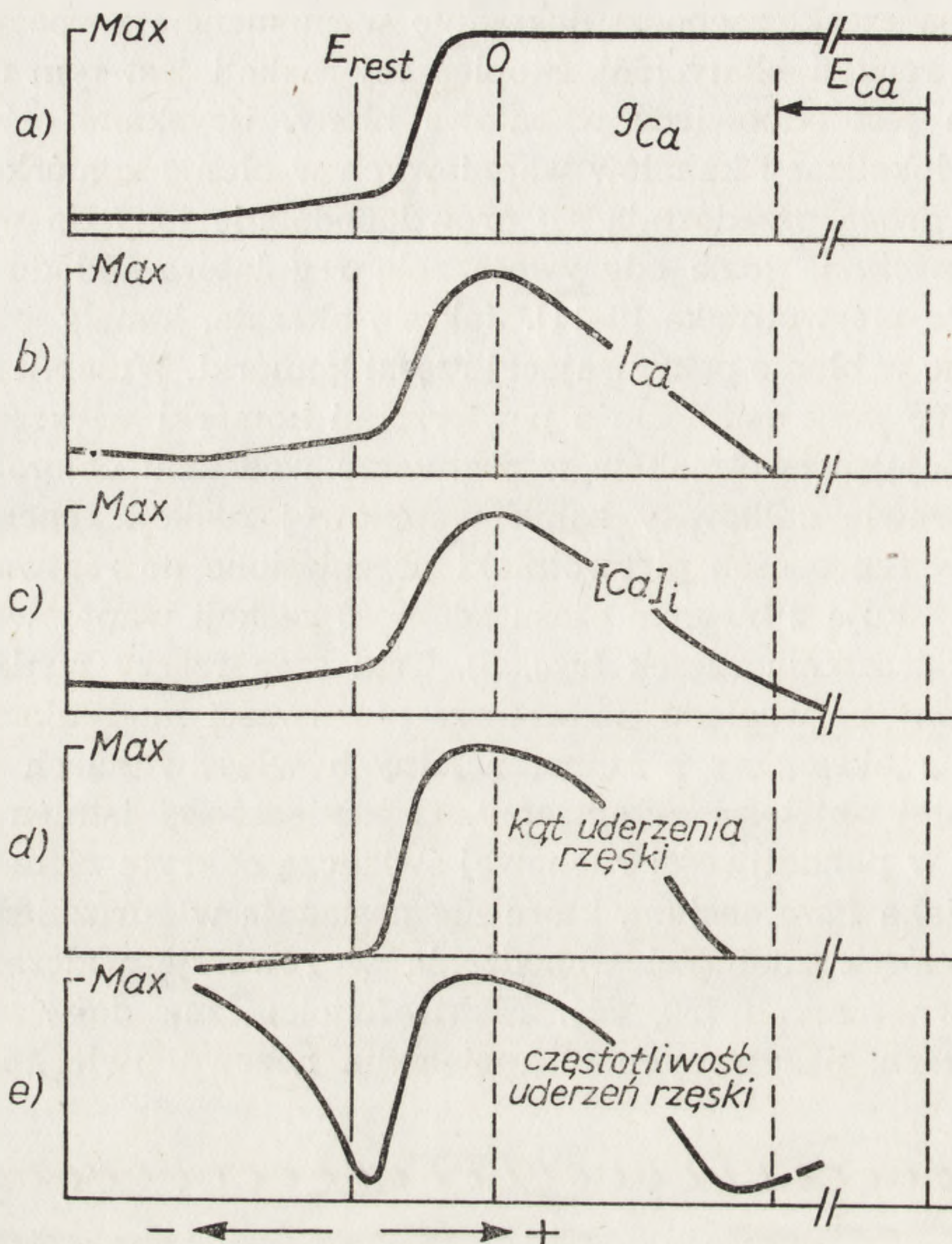


Ryc. 6. Napięciowe reakcje błony komórek *Paramecium* pozbawionych rzęsek — po 3 godzinach odrastania — w komórkach kontrolnych [11]

A — odrastanie rzęsek przebiegało bez przerw, B — odnawianie się rzęsek z 8-godzinną przerwą w obecności 10 mg/ml kolchicyny. Impuls elektryczny kalibracyjny: 10 mV, 10 msek.

kazały, że brak jest w nich elektrycznej reakcji wapniowej. Są to więc komórki będące mutantami błonowymi pozbawionymi kanałów wapniowych [51], ponieważ modele tych komórek wykazywały zdolność rewersji w sposób identyczny jak modele normalnych komórek. Przy braku błonowego przewodnictwa wapniowego, w przypadku komórek odrzęsionych wodzianem chloralu czy mutantów mebranowych (paw), nie zachodzi wzrost stężenia wewnątrzkomórkowego wapnia do wartości krytycznej





Ryc. 7. Reakcja błony i rzęsek w odniesieniu do zmian potencjału elektrycznego u *Paramecium* [18]

$E_{rest}$  — potencjał spoczynkowy, 0 — zerowa różnica potencjału,  $E_{Ca}$  — elektrochemiczny potencjał równowagowy dla  $Ca^{++}$ , a — przewodnictwo wapniowe jako funkcja potencjału membranowego, b — prąd wapniowy jako funkcja potencjału błonowego, c — zmiany stężenia  $Ca^{++}$  w cytoplazmie, d, e — kąt i częstotliwość uderzeń rzęski

(około  $10^{-5}$  M) podczas pobudzania, a tym samym nie osiąga się aktywacji układu rzęskowego [13].

Opierając się na danych doświadczalnych, przedstawionych w tym rozdziale jak i w poprzednim, można podsumować, że depolaryzacja elektryczna błony komórkowej u *Paramecium* powoduje odblokowanie kanałów wapniowych rozmieszczonych głównie w membranie na rzęskach i wzrost przewodnictwa tego jonu do cytoplazmy. W wyniku wchodzenia  $Ca^{++}$  do komórki następuje lokalny wzrost stężenia wapnia w rejonie rzęskowych aksonem i aktywacja wrażliwego na  $Ca^{++}$  mechanizmu aparatu ruchowego komórki, dając w efekcie rewersję układu rzęskowego. Mechanizmy regulujące częstotliwość pracy rzęsek są zbadane w dużo



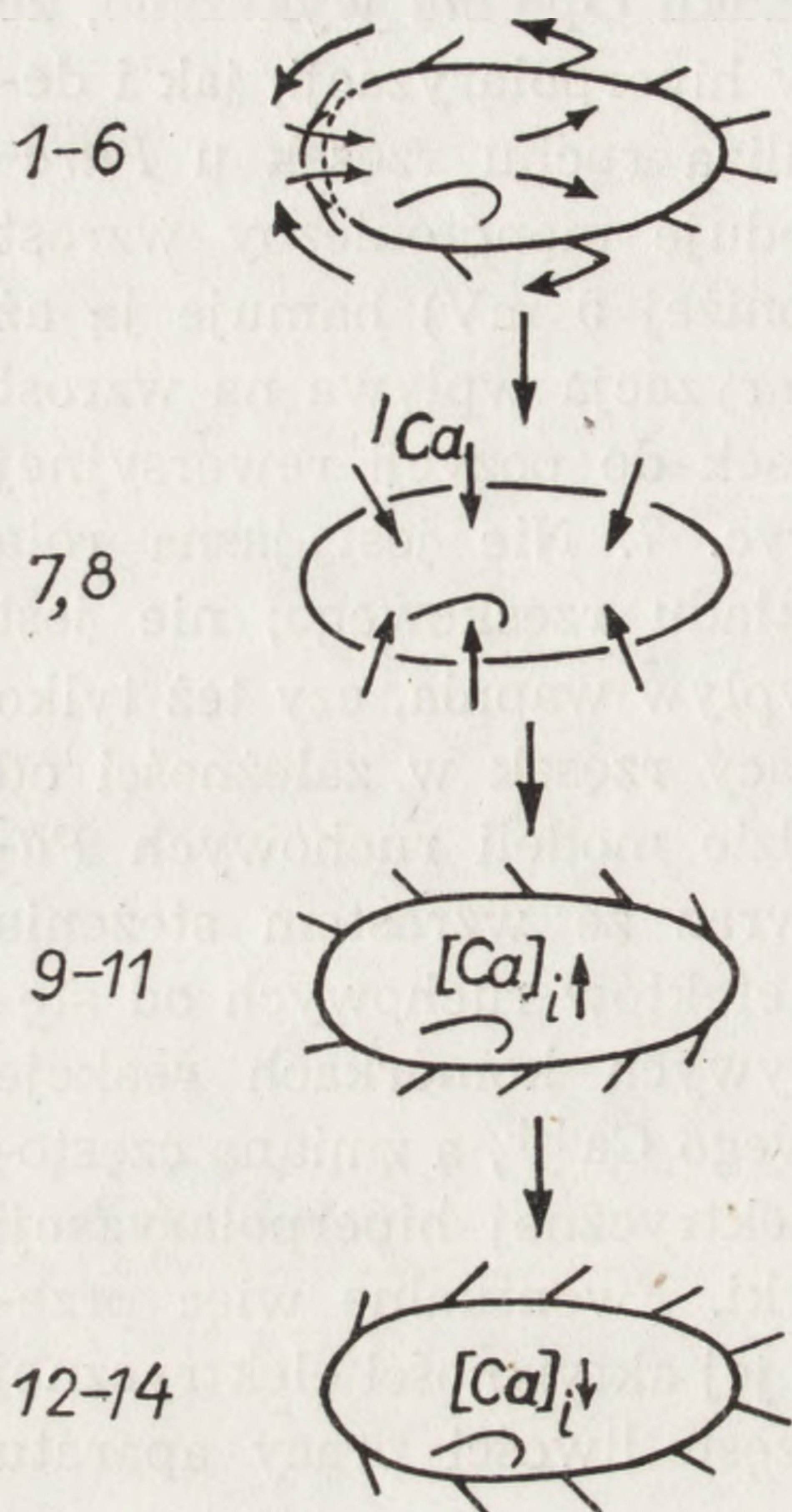
mniejszym stopniu aniżeli rewersja. W przypadku *Opalina* wykazano, że częstotliwość pracy rzęski rośnie zarówno przy hiperpolaryzacji, jak i depolaryzacji [59]. Mikrokinematograficzna analiza ruchu rzęsek u *Paramecium* wykazała, że hiperpolaryzacja powoduje monotoniczny wzrost częstotliwości, a niewysoka depolaryzacja (poniżej 5 mV) hamuje ją aż do całkowitego zatrzymania się. Dalsza depolaryzacja wpływa na wzrost częstotliwości z jednoczesnym przejściem rzęsek do pozycji rewersyjnej [15, 56]. Proces ten jest zilustrowany na ryc. 7. Nie jest jasna rola wapnia w zmianach częstotliwości pracy układu rzęskowego; nie jest wiadome dotychczas czy jest to bezpośredni wpływ wapnia, czy też tylko pośredni efekt. Zestawienie częstotliwości pracy rzęsek w zależności od stężenia  $Mg^{++}$ , ATP oraz  $Ca^{++}$  na przykładzie modeli ruchowych *Paramecium* wykazuje wzrost częstotliwości wraz ze wzrostem stężenia  $Mg^{++}$  i ATP. Brak jest widocznej zależności efektów ruchowych od stężenia  $Ca^{++}$ . Jednak już wiadomo, że w żywych komórkach reakcje ruchowe są uzależnione od zewnątrzkomórkowego  $Ca^{++}$ , a zmiana częstotliwości pracy rzęski ma miejsce podczas elektrycznej hiperpolaryzacji bez obecności magnezu w środowisku komórki. Ewentualne więc przenikanie magnezu przez błonę komórki podczas jej aktywności elektrycznej nie może stanowić podstawy do regulacji częstotliwości pracy aparatu rzęskowego.

Podobne związki między aktywnością ruchową a działaniem stymulacji poprzez elektryczną aktywność błony zachodzą przy fototaksji czy fotofobii zarówno u orzęsków, jak i wiciowców (np. [4, 7, 8, 19, 88]). Są to zjawiska znane stosunkowo dawno, lecz ich poznanie nie jest tak zaawansowane jak reakcje ruchowe *Paramecium*. Jak dotychczas, stwierdzono, że stymulacja świetlna u stentora wywołuje rewersję ruchu rzęskowego analogicznie jak u *Paramecium* pod wpływem pola elektrycznego stowarzyszoną z powstawaniem potencjału regeneratywnego błony [88]. Dla stosunkowo silnych bodźców świetlnych potencjał recepcyjny wywoływał regeneratywną reakcję transmembranową o różnej amplitudzie. Omawiana zależność ma miejsce również u *Spirostomum*. Skurcz ciała *Spirostomum* indukowany przez bodziec świetlny jest zawsze związany z elektrycznym potencjałem czynnościowym [4]. *Euglena* również posiada zdolność reakcji lokomotorycznej na działanie stymulacji elektrycznej, przy czym systemy odpowiedzialne za recepcję obu rodzajów bodźców wydają się być całkowicie niezależne [8, 19].

#### WNIOSKI

Fizjologia cyklu pobudzeniowo - ruchowego na przykładzie *Paramecium* może być podsumowana w sposób następujący (ryc. 8): podczas ko-





lizji pierwotniaka z ciałem stałym (stymulacja mechaniczna) następuje deformacja błony komórkowej przy przednim końcu komórki i aktywacja receptorowych kanałów przewodzących do wnętrza komórki kationy wapniowe. Lokalny prąd recepcyjny rozprzestrzenia się następnie na błonę całej komórki (efekt kablowy), wykorzystując depolaryzację całej komórki. W sposób taki zostają odblokowane wszystkie kanały jonowe specyficzne dla kationów  $Ca^{++}$ , rozmieszczone przeważnie na błonie rzęsek. Ponieważ stężenie jonów wapniowych na zewnątrz komórki jest

Ryc. 8. Ilustracja procesów zachodzących w komórce podczas cyklu pobudzeniowo - ruchowego u *Paramecium* [13]

1-6 — działanie bodźca, generacja bodźca recepcyjnego, depolaryzacja, 7, 8 — wpływ jonów wapniowych, 9-11 — akumulacja  $Ca^{++}$  w cytoplazmie i aktywacja systemu rewersyjnego, 12-14 — obniżenie się stężenia  $Ca^{++}$  i koniec rewersji

najczęściej dużo wyższe od stężenia wapnia cytoplazmatycznego, więc podczas depolaryzacji zostaje wytworzony strumień jonowy skierowany do komórki i powodujący dalszą depolaryzację. Przenikanie  $Ca^{++}$  do komórki w następnej fazie depolaryzacji wytwarza potencjał czynnościowy typu iglicowego (reakcja wapniowa komórki), podwyższa stężenie cytoplazmatycznego  $Ca^{++}$  w obrębie aksonem rzęski, aktywując układ ruchowy i odblokowując kanały potasowe (wzrost przewodnictwa potasowego, repolaryzacja potencjału komórkowego).

Szczegółowe porównanie systemu nerwowego organizmów wyższych i mechanizmów regulujących zjawiska ruchowe w organizmach jednokomórkowych w zakresie specyfiki działania cyklu receptor-efektor wykazuje, że system nerwowy jest zdolny do przetwarzania sygnałów analogowych (stopniowany potencjał recepcyjny) na sygnały typu cyfrowego (iglicowe potencjały czynnościowe) i następnie do ponownego przejścia do sygnału analogowego (potencjał synaptyczny), natomiast u pierwotniaków zachodzi przetwarzanie sygnałów analogowych na analogowe. Tym niemniej jednak komórkowe i subkomórkowe mechanizmy regulujące aktywność lokomotoryczną u pierwotniaków (tj. przetwarzanie sensoryczne, izotonika sygnału elektrycznego, pobudzenie elektryczne itd.) są zbliżone do podobnych mechanizmów w komórkach tkankowców. Na podobnych



zasadach co i u pierwotniaków funkcjonuje sterowanie szeregiem aktywności komórkowych w organizmach tkankowych za pomocą membranowych przepływów wapniowych.

## LITERATURA

- [1] BEMBERG E., LAUGER P., Channel formation kinetics of gramicidin A in lipid bilayer membranes, *J. Memb. Biol.*, **11**: 177-194, 1973.
- [2] BINGLEY M. S., THOMPSON C. M., Bioelectrical potentials in relation to movements in the *amoebae*, *J. Theor. Biol.*, **2**: 16-32, 1962.
- [3] BINGLEY M. S., BELL L. G., JEON K. W., Pseudopod initiation and membrane depolarization in *Amoeba proteus*, *Expl. Cell Res.*, **28**: 208-209, 1962.
- [4] BORSELLINO A., CARLINI F., RIANI M., Excitability and contraction in *Spirostomum ambiguum*, [w] *Progress in Protozool.*, Abstr. IV Int. Congr. Protozool., Clermont — Ferrand 1973.
- [5] BRANDT P. W., FREEMAN A. L., Plasma membrane. Substructural changes correlated with electrical resistance and pinocytosis, *Science*, **155**: 582-585, 1967.
- [6] CHEN V., Recording of membrane potential change in *Spirostomum ambiguum* correlated with mechanically stimulated rapid body contraction, [w] *Abstr. V Int. Congr. Protozool.*, New York 1977.
- [7] DIEHN B., Phototaxis and sensory transduction in *Euglena*, *Science*, **181**: 1009-1015, 1973.
- [8] DIEHN B., MIKOŁAJCZYK E. Dane nie publikowane.
- [9] DUNLAP K., Ca channels in *Paramecium* confined to ciliary membrane, *Am. Zool.*, **16**: 185, 1976.
- [10] DUNLAP K., ECKERT R., Ca channels in the ciliary membrane of *Paramecium*, *J. Cell Biol.*, **70**: 245a, 1976.
- [11] DUNLAP K., Localization of calcium channels in *Paramecium caudatum*, *J. Physiol.*, **271**: 119-133, 1977.
- [12] ECKERT R., NAITOH Y., Passive electrical properties of *Paramecium* and problem of ciliary coordination, *J. Gen. Physiol.*, **55**: 467-483, 1970.
- [13] ECKERT R., Bioelectric control of ciliary activity, *Science, Wash.*, **176**: 473-481, 1972.
- [14] ECKERT R., NAITOH X., Bioelectric control of locomotion in the ciliates, *J. Protozool.*, **19**: 237-243, 1972.
- [15] ECKERT R., MACHEMER H., Regulation of ciliary beating frequency by the surface membrane, [w] *Symp. Soc. Gen. Physiol.*, 151-163, 1975, ed. R. Stephens and S. Inoue, Raven Press, New York.
- [16] ECKERT R., SIBAOKA T., Bioelectric regulation of tentacle movement in a dinoflagellate, *J. Exp. Biol.*, **47**: 433-466, 1967.
- [17] FABCZAK S., III. The effect of polycations on cell membrane excitability, *Acta Protozool.*, **16**: 177-183, 1977.
- [18] ECKERT R., NAITOH Y., MACHEMER H., Calcium in the bioelectric and motor functions of *Paramecium*, [w] *Symp. Soc. Exp. Biol.*, Los Angeles 1976, 233-255.
- [19] FABCZAK S., MIKOŁAJCZYK E., Dane nie publikowane.



- [20] GOODALL M. C., Thickness dependence in the action of gramicidin A on lipid bilayers, *Arch. Bioch. Bioph.*, **147**: 129-135, 1971.
- [21] FAWCETT D. W., Cilia and flagella, [w] J. Brachet and A. E. Mirsky red. 217-297, 1961.
- [22] GÜNTER K., Über den Bau und die Lebensweise der Euglenen, besonders der Arten *E. terricola*, *geniculata*, *proxima*, *sanguinea* und *lucens* nov. spec., *Arch. Protistenkunde*, **60**: 511-603, 1928.
- [23] HAGIWARA S., NAKA K., Calcium spike, *J. Gen. Physiol.*, **48**: 141-149, 1964.
- [24] HAMILTON T. C., OSBORN D., Measurement of contraction latencies and electrical stimulation of the protozoan, *Spirostomum ambiguum*, *J. Cell. Physiol.*, **91**: 403-408, 1977.
- [25] HAWKES R. B., HOLBERTON D. V., Myonemal contraction of *Spirostomum*. I. Kinetics of contraction and relaxation, *J. Cell. Physiol.*, **84**: 225-236, 1974.
- [26] HEILBRUNN D. V., WIERCINSKI F. J., The action of various cations on muscle protoplasm, *J. Cell. Comp. Physiol.*, **29**: 15-32, 1947.
- [27] HEILBRUNN L. V., The action of calcium on muscle protoplasm, *Physiol. Zool.*, **13**: 88-92, 1940.
- [28] HENDERSON P. J. V., MCGIVAN J. D., CHAPPELL J. P., The action of certain antibiotics on mitochondrial, erythrocyte and artificial phospholipid membranes, *Bioch. J.*, **111**: 521-535, 1969.
- [29] HLADKY S. B., HAYDON D. A., Ion transfer across lipid membrane in the presence of gramicidin A. I. Studies of the unit conductance channel, *Bioch. Bioph. Asta*, **274**: 294-312, 1972.
- [30] HODGKIN A. L., KATZ B., The effect of sodium ions on the electrical activity of the giant axon of squid, *J. Physiol. (London)*, **108**: 11-37, 1949.
- [31] HODGKIN A. L., Ionic movements and electrical activity in giant nerve fibres, *Proc. Roy. Soc. London B*, **148**: 1-37, 1957.
- [32] HODGKIN A. L., CHANDLER W. K., Effect of changes in ionic strength on activation and threshold in perfused nerve fibers of loligo, *J. Gen. Physiol.*, **48**: 27-30, 1965.
- [33] HOLWILL M. E. J., The motion of *Euglena viridis*: the role of flagella, *J. Exp. Biol.*, **44**: 579-588, 1966.
- [34] HUXLEY A. F., The links between excitation and contraction, *Proc. Roy. Soc. B*, **160**: 486-488, 1964.
- [35] HUXLEY A. F., TAYLOR R. E., Local activation of striated muscle fibers, *J. Physiol.*, **144**: 426-441, 1958.
- [36] HYMANN L. H. Metabolic gradients in *Amoeba* and their relation to the mechanism of ameboid movement, *J. Exp. Zool.*, **24**: 55-99, 1917.
- [37] JAHN T. L., The mechanism of ciliary movements. I. Ciliary reversal and activation by electrical current, the Ludloff phenomena in terms of core and volume conductors, *J. Protozool.*, **8**: 369-380, 1961.
- [38] JENNINGS H. S., Behaviour of the lower organisms, Columbia Univ. Press, New York 1906.
- [39] JEON K. W., BELL L. G. E., Chemotaxis in large free-living amoebae, *Expl. Cell Res.*, **38**: 536-555, 1955.
- [40] KAMADA T., Polar effect of electric current on the ciliary movements of *Paramecium*, *J. Fac. Sci. Tokyo Univ. Sect.*, **IV**: 285-298, 1931.
- [41] — Some observations on potential differences across the ectoplasm of *Paramecium*, *L. Exp. Biol.*, **11**: 94-102, 1934.



- [42] — Intracellular calcium and ciliary reversal in *Paramecium*, Proc. Imp. Acad. (Tokyo), **14**: 260–262, 1938.
- [43] KENNEDY J. R., BRITTINGHAM E., Fine structure changes during chloral hydrate deciliation of *P. caudatum*, J. Ultrastruct. Res., **22**: 530–545, 1968.
- [44] KEYNS R. D., Ion transport in excitable cells, Protoplasma, **63**: 13–16, 1967.
- [45] KINOSITA N., DRYL S., NAITOH Y., Change in the membrane potential and the response to stimuli in *Paramecium*, L. Fac. Sci. (Tokyo), **IV**: 291–301, 1964.
- [46] KINOSITA H., Electric potentials and ciliary response in *Opalina*, J. Fac. Sci. (Tokyo), **IV**: 1–14, 1954.
- [47] KINOSITA H., MURAKAMI A., YASUDA M., Interval between membrane potential change and ciliary reversal in *Paramecium* immersed in Ba - Ca mixture, J. Fac. Sci. (Tokyo), **IV-10**: 421–425, 1965.
- [48] KINOSITA H., MURAKAMI A., Control of ciliary motion, Physiol. Rev., **47**: 53–82, 1967.
- [49] KOROHODA W., RAKOCZY L., WALCZAK T., On the control mechanism of the protoplasmic streaming in the plasmodia of *Myxomycetes*, Acta Protozool., **22**: 75–90, 1970.
- [50] KUNG C., Genic mutants with altered system of excitation in *Paramecium aurelia*. II. Mutagenesis, streaming, and genetic analysis of the mutants, Genetics, New York, **69**: 27–45, 1971.
- [51] KUNG C., ECKERT R., Genetic modification of the electric properties in an excitable membrane, Proc. Nat. Acad. Sci. USA, **69**: 93–97, 1972.
- [52] KUŹNICKI L., Recovery in *Paramecium caudatum* immobilized by chloral hydrate treatment, Acta Protozool., **1**: 177–185, 1963.
- [53] LILLIE R. S., The relations of ions to contractile process. III. The general conditions of fibrillar contractility, Am. J. Physiol., **22**: 75–90, 1906.
- [54] — The theory of anesthesia, Biol. Bul., **30**: 311–366, 1916.
- [55] LUDLOFF K., Untersuchungen über den Galvanotropismus, Pflügers Arch. Ges. Physiol., **59**: 525–554, 1895.
- [56] MACHEMER H., ECKERT R. Electrophysiological control of reversed ciliary beating in *Paramecium*, J. Gen. Physiol., **61**: 572–587, 1973.
- [57] NACHMANSON D., Chemical control of excitable membranes during electrical activity, Protoplasma, **63**: 295–298, 1967.
- [58] NACHMIAS V. T., Fibrillar structures in the cytoplasm of *Chaos chaos*, J. Cell. Biol., **23**: 183–187, 1964.
- [59] NAITOH Y., Direct current stimulation of *Opalina* with intracellular micro-electrodes, Annotnes Zool. Jap., **31**: 59–73, 1958.
- [60] NAITOH Y., KANEKO H., ATP - Mg - reactivated triton - extracted models of *Paramecium*: modification of ciliary movements by calcium ions, Sci. Wash., **176**: 523–524, 1972.
- [61] — Control of ciliary activities by ATP and divalent cations in triton - extracted models of *Paramecium caudatum*, J. Exp. Biol., **58**: 657–676, 1973.
- [62] NAITOH Y., ECKERT R., FRIEDMANN K., A regenerative calcium response in *Paramecium*, J. Exp. Biol., **56**: 667–681, 1972.
- [63] NAITOH Y., Bioelectric basis of behaviour in protozoa, Am. Zool., **14**: 883–893, 1974.
- [64] NICHOLS K. M., RIKMENSPOEL M., Mg<sup>++</sup> - dependent electrical stimulation of flagellar activity in *Euglena*, J. Cell. Biol., **67**: 308a, 1975.
- [65] — Control of flagellar motion in *Chlamydomonas* and *Euglena* by mechanical



- microinjection of  $Mg^{++}$  and  $Ca^{++}$  and by electrical current injection, *J. Cell Biol.*, **70**: 16a, 1977.
- [66] —  $Mg^{2+}$  - dependent electrical control of flagellar activity in *Euglena*, *J. Cell Biol.*, **23**: 211-225, 1977.
- [67] OGURA A., TAKAHASHI K., Artificial deciliation causes loss of calcium - dependent responses in *Paramecium*, *Nature*, London, **264**: 170-172, 1976.
- [68] OKAJIMA A., Studies on the metachronal wave in *Opalina*. I. Electrical stimulation with the microelectrode, *Jap. J. Zool.*, **11**: 87-100, 1953.
- [69] PRICE C. A., VALLE B. L., *Euglena gracilis*, a test organism for study of zinc, *Plant Physiol.*, Lancaster, **37**: 428-433, 1962.
- [70] PUCCINI E., ALBERGONI V., ATPase activity in isolated flagella from *Euglena gracilis*, *J. Protozool.*, **23**: 456-458, 1973.
- [71] PUCCINI E., ALBERGONI V., COPPELLOTTI O., ATPase activity in *Euglena gracilis*. Localization of the enzyme and effect of detergents, *J. Protozool.*, **22**: 331-335, 1975.
- [72] SEIFRIZ W., Mechanism of protoplasmic movements, *Nature*, **171**: 1136-1138, 1953.
- [73] SINECHKOV O. A. ANDRIANOV V. K., KURELLA G. A., LITVIN F. F., Bioelectric phenomena in unicellular flagellar alga and their relation to phototaxis and photosynthesis, *Fiziologija rastenij*, **23**: 229-237, 1976.
- [74] SAIKI M., HIRAMOTO Y., Control of ciliary activity in *Paramecium* by intracellular injection of calcium buffers, *Cell Struct. Funct.*, **1**: 33-41, 1975.
- [75] SERAVIN L. N., SKOBLO I. I., BAGNJUCK I. G., Mechanism of contraction of myonemes in the ciliate *Spirostomum ambiguum*. *Acta Protozool.*, **3**: 327-335.
- [76] SLEIGH M. A., *Biology of protozoa*, London, E. Arnold ed. 1973.
- [77] STEWARD P. A., The organization of movements in slime mold plasmodia, [w] *Primitive motile systems in cell biology*, Acad. Press, New York and London 1964, 67-78.
- [78] TASAKI I., WATANABE A., TAKAHASHI K., Resting and action potential of intracellularly perfused squid giant axon, *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **48**: 1177-1179, 1962.
- [79] TASAKI I., KAMIYA N., A study of electrophysiological properties of carnivorous *Amoebae*, *J. Cell. Comp. Physiol.*, **63**: 365-380, 1964.
- [80] TOBIAS J. M., A chemically specified molecular mechanism underlying excitation in nerve hypothesis, *Nature*, **203**: 13-14, 1959.
- [81] — Biophysical aspects of conduction and transmission in the nervous system, *Ann. Rev. Physiol.*, **21**: 299-324, 1959.
- [82] UEDA K., Injection of  $Ca^{2+}$  - precipitating agents into *Opalina*, *Annot. Zool. Jap.*, **34**: 99-102, 1961.
- [83] VERWORN M., Die polare Erregung der Protisten durch den galvanischen Strom, *Arch. Gesamt. Physiol.*, **46**: 267-303, 1889.
- [84] VORA M., WOLKEN J. J., Ahn K. S., Biochemical studies of the flagella of *Euglena gracilis*. *J. Protozool.*, **14**: (supplement), 1967.
- [85] WOOD D. C., Parametric studies of the response decrement produced by mechanical stimuli in the protozoan, *Stentor coeruleus*, *J. Neurobiol.*, **1**: 345-360, 1970.
- [86] — Electrophysiological studies of the protozoan, *Stentor coeruleus*, *J. Neurobiol.*, **1**: 363-377, 1970.
- [87] — Electrophysiological correlates of the response decrement produced by



- mechanical stimuli in the protozoan, *Stentor coeruleus*, J. Neurobiol., 2: 1-11, 1970.
- [88] — Action spectrum and electrophysiological responses correlated with the photophobic response of *Stentor coeruleus*, Photochem. Photobiol., 24: 261-264, 1976.
- [89] YAMAGUCHI T., Studies on the mode of ionic behaviour across the ectoplasmic membrane of *Paramecium*. I Electric potential difference measured by the intracellular microelectrode, J. Fac. Sci. (Tokyo), IV-8: 573-591, 1960.

Otrzymano: 10 grudnia 1977.

Przyjęto: 10 stycznia 1978.

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



## K O M U N I K A T

Polskie Towarzystwo Histochemików i Cytochemików powołało Sekcję Tkanki Łącznej.

Celem Sekcji jest m. in.: (1) zbieranie informacji na temat badań prowadzonych w kraju w zakresie biologii i patologii tkanki łącznej; (2) inspirowanie tych badań; (3) organizowanie sympozjów naukowych; (4) współpraca z odpowiednimi organizacjami i ośrodkami zagranicznymi.

Sekcja Tkanki Łącznej PTHC planuje zorganizowanie wiosną 1979 r. sympozjum nt. biologii i patologii tkanki łącznej z udziałem uczestników z CSRS i NRD.

Ośrodki i osoby zajmujące się w kraju problematyką tkanki łącznej proszone są o przesłanie informacji zawierających nazwiska kierowników i nazwiska wykonawców prac oraz ich tematy. Informacje te umożliwią sporządzenie ewidencji badań nad tkanką łączną.

Wspomniane informacje należy przesyłać pod adresem:

Prof. dr hab. Eugeniusz Małyk  
Instytut Reumatologiczny  
ul. Spartańska 1, 02-623 Warszawa



## RECENZJE

M. J. D. WHITE, *Animal cytology and evolution*.

Wydanie trzecie. Broszura („paperback edition”). Cambridge Univ. Press. Cambridge, Londyn, Nowy Jork 1977. Str. 961, funtów ang. 8,95.

Pierwsze wydanie tej monografii, która odegrała wielką rolę w rozwoju biologii, ukazało się w 1945 r.; drugie — w 1954 r., trzecie — w 1973 r. Egzemplarz nadesłany do recenzji należy w istocie do wydania czwartego. Autor podkreśla jednak w przedmowie, że nie chce obecnego przedruku uznać za wydanie czwarte, gdyż nie był w stanie przeprowadzić gruntownej rewizji, przygotowując zaś najnowszy tekst wprowadził tylko poprawki pomyłek, które znalazły się w poprzedniej redakcji. Sprawa jest ważna, gdyż właśnie w ostatnich latach rozwinęły się techniki wykazywania prążków na chromosomach, co tak wpłynęło na stan zapatrywań, że np. wielki cytogenetyk roślin G. L. Stebbins uważa, że dotychczasowe poglądy cytogenetyki wymagają daleko idących zmian. Otóż White stwierdza wprost, że tych zmian nie dokonał, nie uwzględnia też wiadomości pozyskanych dzięki użyciu mikroskopu elektronowego.

Tytuł książki może być mylący. Gdyby ukazywała się ona obecnie po raz pierwszy, autor zapewne nazwał by ją inaczej, np. „chromosomy i ewolucja”. Byłby to lepszy opis zawartości tomu, w którym nie użyto ani razu słowa mitochondrion i ani jednego zdania nie poświęcono rozmiarom komórek. Obecnie sądzimy, że między cytologią i zagadnieniami ewolucji jest znacznie więcej związków niż to podejrzewano w 1945 r., gdy ukazało się pierwsze wydanie tego dzieła. Można więc stwierdzić, że pod pewnymi względami książka jest przestarzała.

Omawia ona m. in. następujące zagadnienia (bez uwzględniania ultrastruktury): budowa chromosomów, mechanizmy mitozy i mejozy, polimorfizm chromosomów w populacjach, ewolucja liczby chromosomów i ich kształtu, determinacja płci i partenogeneza. W zakreślonym w ten sposób kręgu problemów dzieło zachowuje ogromną wartość i przydatność. White z ogromną sumiennością zebrał bardzo obszerną literaturę



i starannie ją przestudiował. Spis cytowanych prac obejmuje około 3000 pozycji na 148 stronach i zawiera m. in. prace autorów polskich, np. Kraczkiewicza, Matuszewskiego, Mikulskiej, Śliżyńskiego, Woykego, także ogłoszone w polskich czasopismach. Fakty zostały bardzo przejrzysto uporządkowane, tak że książka jest wzorowym przeglądem publikacji wydrukowanych przed 1971 r. W wielu miejscach tekstu dostrzega się ostrożność, sceptycyzm i konserwatyzm autora. White niechętnie godzi się na nowe koncepcje i potrafi uparcie doszukiwać się słabych punktów w rozumowaniach twórców nowych uogólnień. Może nie zawsze ma rację, zapewne jest nieraz zbyt sceptyczny, jednak krytyczne omówienie ogromnego materiału przez tak niezrównanego znawcę przedmiotu, jakim jest White, jest kopalnią wiedzy, z której każdy specjalista będzie chętnie czerpać.

Książka wydana jako broszura, w wielkim nakładzie, jest stosunkowo tania, autor wyraża więc nadzieję, że będą jej używać studenci. Zapewne niektórzy do niej sięgną, lecz nie sądzę, aby nawet student, dla którego angielski jest językiem ojczystym, znalazł czas na dokładne przestudiowanie tak obszernej monografii.

Henryk Szarski

#### F. D'AMATO, Nuclear Cytology in Relation to Development.

Wydanie pierwsze w twardej okładce z obwolutą. Wydane przez Cambridge University Press; Cambridge, London, New York, Melbourne, 1977. Str. 283, funtów ang. 15,00.

Książka jest szóstą z serii „Developmental and Cell Biology Series”, której redaktorami są M. Abercrombie, D. R. Newth i J. G. Torrey. Autor książki Franciszek D'Amato urodzony w 1916 r., jest profesorem genetyki na uniwersytecie w Pizie. Jest on cytogenetykiem roślin. Zebrane przez niego informacje dotyczą przede wszystkim współzależności rozwoju i różnicowania się komórek i tkanek od informacji genetycznej oraz sposobów regulowania realizacji programu genetycznego na poziomie genu.

Książka została podzielona na 9 rozdziałów, w których autor omawia w sposób porównawczy wiele aspektów rozwoju organizmów roślinnych i zwierzęcych. Dyskutowane są szczególnie problemy nieograniczoności wzrostu roślin, omnipotentności komórek roślinnych, dzięki czemu można w hodowli in vitro wyhodować kompletny organizm roślinny.

W rozdziale 1 autor omawia cykle życiowe organizmów diplotenicznych, haplotenicznych i diplo-haplotenicznych, zwracając szczególną uwagę na procesy zapłodnienia. Cyklowi życiowemu komórki poświęcony



jest rozdział 2. Czytelnik znajdzie tutaj dokładne omówienie poszczególnych faz cyklu życiowego komórek, gdzie główny akcent jest położony na metabolizmie DNA. Procesy redukcji chromatyny (mejoza) oraz rozmaite modyfikacje tego zjawiska omówione są w rozdziale 3. W rozdziale 4 autor zajmuje się zagadnieniem chimer, zarówno roślinnych, jak i zwierzęcych. Pozostałe rozdziały książki zawierają informacje o cyklach chromosomowych w zróżnicowanych komórkach, o replikacji DNA, ekspresji genowej w procesie różnicowania się i rozwoju organizmów oraz o regulacji aktywności genów. Ostatni rozdział 9 poświęcony jest zjawiskom regeneracji i omnipotentności komórek i jąder komórkowych roślin i zwierząt.

Autor zamyka swoją książkę spisem cytowanych prac, który jest zarazem indeksem autorów (indeks rzeczowy zestawiony jest niezależnie). Spis cytowanych prac obejmuje ponad 1000 pozycji na 47 str. i zawiera m. in. prace autorów polskich, np. Darzynkiewicza (1969), Janczewskiego (1874), Jaworskiej (1973), Nystakowskiej i Tarkowskiego (1968, 1970), Perkowskiej (1968) i Tarkowskiego (1961, 1963, 1964).

Książka stanowi dobrze wyważony zbiór informacji i poglądów, dawnych i współczesnych, na procesy różnicowania się i rozwoju komórek na poziomie ich materiału genetycznego. Autor będąc cytogenetykiem roślin starał się mniej więcej równomiernie dobierać przykłady ze świata roślin i zwierząt, co mu się w pełni udało.

W. Kilariski

EDWARD C. ROSSEN - RUNGE, *The Process of Spermatogenesis in Animals.*

Recenzowana książka należy do znanej serii wydawniczej, „Developmental and Cell Biology Series”, redagowanej przez zespół bardzo dobrze znanych przyrodników, a mianowicie M. Abercrombie, D. R. Newth i J. G. Torrey. Wydawcą tej serii jest Cambridge University Press (Cambridge, London, New York, Melbourne). Książka została wydana w 1977 r., natomiast okres, w którym była tworzona, rozciągnął się na 10 lat. Pomimo tak długiego okresu powstawania dzieła, autor uzupełniał na bieżąco cytowaną literaturę tak, że obejmuje ona pozycje również z 1975 r., tzn. z ostatniego roku pisania książki.

Zebranie kompletnego materiału dotyczącego zagadnienia spermatogenezy jest zadaniem niezwykle trudnym, zwłaszcza, że doniesienia na ten temat rozproszone są prawie po wszystkich dyscyplinach zoologicznych. Autor bardzo sumiennie zgromadził około 750 pozycji począwszy



od 1839 r. do 1975 r., które posłużyły mu za materiał źródłowy do treściwego ujęcia zagadnień spermatogenezy, tak zwierząt kręgowych, jak i bezkręgowych.

W niniejszej książce czytelnik znajdzie omówione problemy spermatogenezy w obrębie kilku typów bezkręgowców, a mianowicie gąbek, parzydełkowców, mięczaków, skorupiaków, pajęczaków i owadów. Każdemu z wymienionych typów poświęca autor odrębny rozdział. W rozdziale 7 są zebrane dość sporadyczne informacje dotyczące raczej budowy nabłonka płciowego i plemników niż kompletnego cyklu formowania się plemników. Wynika to mianowicie z niezwykle skąpych doniesień na temat spermatogenezy przedstawicieli takich grup zwierzęcych; jak np. płazińce, wstężnice, obleńce, jelitodyszne itd.

Zwierzętom kręgowym poświęca autor tylko jeden rozdział, usprawiedliwiając to homogenicznością tej grupy zwierząt, których gonady zbudowane są według wspólnego planu budowy. Najwięcej miejsca poświęca autor rybom i omawia oddzielnie ryby spodouste i kostnoszkieletowe.

Po ośmiu rozdziałach, w których autor omawia szczególne procesy spermatogenezy przedstawicieli poszczególnych typów zwierząt, następują rozdziały zawierające rozważania bardziej ogólne, a dotyczące przede wszystkim kinetyki tworzenia plemników (rozdział 9), procesów degeneracyjnych i polimorfizmu plemników (rozdział 10) i wreszcie mikrośrodowiska, w jakim przebiega spermatogeneza, oraz składników i komórek dodatkowych (rozdział 11).

Po krótkim rozdziale podsumowującym, zebranych w ośmiu punktach, czytelnik znajdzie krótki słowniczek terminów i pojęć używanych przez autora, pełny wykaz cytowanych pozycji literaturowych, indeks autorów, indeks nazw zwierząt oraz indeks rzeczowy.

Recenzowana książka liczy 213 str. druku, liczne rysunki i tabele oraz kilka zdjęć z mikroskopu elektronowego i dwa zdjęcia z mikroskopu skaningowego. Osobiście wydaje mi się, że jak na książkę współczesną jest ona zbyt ubogo ilustrowana oryginalnymi fotografiami. Cena książki jest stosunkowo wysoka (15,50 funtów angielskich). Książka może stanowić przydatny klucz do poszukiwania źródłowej literatury dotyczącej omawianego przedmiotu dla tych osób, które rozpoczynają studia nad procesami plemnikotwórczymi.

W. Kilariski



D. A. EDE, J. R. HINCHLIFFE and M. BALS, editors, *Vertebrate Limb and Somite Morphogenesis*.

Wydane przez Cambridge University Press; Cambridge, London, New York, Melbourne, 1977. Str. 498, twarda okładka z obwolutą, egzemplarz bez podania ceny.

Recenzowana książka jest zbiorem 29 oryginalnych doniesień przedstawionych na trzecim Sympozjum Brytyjskiego Towarzystwa Biologii Rozwoju nt. morfogenezy kończyn i somitów zwierząt kręgowych. Sympozjum odbyło się na Uniwersytecie w Glasgow we wrześniu 1976 r. Godny podkreślenia jest skład aktywnych uczestników sympozjum, których doniesienia zamieszczono w niniejszej książce. Przedstawiono 12 prac z ośrodków amerykańskich, 9 z angielskich, 5 z francuskich i tylko po jednym z Indii, Rumunii i Włoch.

W większości artykułów autorzy omawiają modele wyjaśniające regułę formowania się kończyn, głównie na materiale zarodków kurczęcia. Kilka artykułów dotyczy tych samych aspektów, ale w odniesieniu do płazów, gadów i ssaków z człowiekiem włącznie. Autorzy doniesień stosowali rozmaite techniki badawcze poczynając od klasycznej metody przeszczepów, następnie stosowano metody hodowli tkanek i narządów, mikroskopię elektronową i skaningową.

Poszczególne artykuły są bardzo dobrze ilustrowane fotografiami i przejrzystymi schematami. Zebrana przy każdym artykule cytowana literatura posiada pełną bibliografię. Zamieszczony na końcu książki indeks rzeczowy obejmuje wszystkie artykuły. Książka stanowi wartościową pozycję dla specjalistów interesujących się biologią rozwoju i teratologią.

W. Kilarski



## INFORMACJE DLA AUTORÓW

POSTĘPY BIOLOGII KOMÓRKI drukują artykuły przeglądowe, omawiające najnowsze osiągnięcia w dziedzinie biologii komórki, nie publikowane dotąd w innych wydawnictwach. Autorzy odpowiadają za ścisłość podawanych informacji. Obowiązuje terminologia zgodna z polskim mianownictwem histologicznym, anatomicznym i embriologicznym.

Artykuły drukowane w POSTĘPACH BIOLOGII KOMÓRKI nie mogą być bez zgody Redakcji publikowane w innych periodykach.

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

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

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

Przykłady cytowania literatury:

- [1] Sachsenmayer W., Remy U., Plattner R., Initiation of synchronous mitosis in *Physarum polycephalum*, *Exptl. Cell. Res.*, 73: 41-48, 1972.
- [2] Hnilica L. S., McClure M. E., Speltzberg T. C., Histone biosynthesis and the cell cycle, [w] *Histone and Nucleohistones*, red. D.M.P. Philips, Plenum Press, London, New York 1977, 60-64.

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

Redakcja zastrzega sobie prawo dokonywania skrótów.

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

Artykuły honorowane są według ustalonych stawek, autorzy otrzymują 25 nadbitek bezpłatnie.



## Warunki prenumeraty kwartalnika

### POSTĘPY BIOLOGII KOMÓRKI

Cena prenumeraty krajowej:

rocznie zł 80.--      półrocznie zł 40.—

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

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

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

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

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

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

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

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

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



## SPIS TRESCI

J. MORACZEWSKI, Różnicowanie się komórek wirków podczas regeneracji . . . . .	93
B. WACHOWICZ, Krwinka płytkowa jako komórka sekrecyjna . . . . .	109
B. RODKIEWICZ, Przebudowa cytoplazmy, izolacja i polaryzacja w mejocytach podczas megasporogenezy u <i>Angiospermae</i> . . . . .	135
J. MORSTIN, Cytologiczne problemy związane ze sztucznym unasiennianiem zwierząt . . . . .	155
J. STACHURA i F. KACZMARSKI, Komórki dokrewne przewodu pokarmowego . . . . .	169
S. FABCZAK i E. MIKOŁAJCZYK, Bioelektryczne podstawy aktywności ruchowej w organizmach pierwotniaczych . . . . .	191
Recenzje . . . . .	211