

Nr indeksu 362808
PL ISSN 0023-4249

Polskie Towarzystwo Przyrodników
im. KOPERNIKA

KOSMOS



SPIS TREŚCI ROCZNIKA 1994

(Nr zeszytu, strona)

ARTYKUŁY

<i>Andrzejewski Roman</i> — „Szczyt Ziemi” i ochrona przyrody w Polsce	1	3
<i>Bal Jerzy, Maciejko Dorota</i> — Mukowiscydoza — od genu do terapii	3-4	419
<i>Banaszak Józef, Izdebska Barbara</i> — Wpływ skażeń środowiskowych na pszczoły dziko żyjące, pszczołę miodną i produkty pszczele	2	285
<i>Bodył Andrzej</i> — Czy Lamarck miał rację? Kilka uwag o dziedziczeniu cech nabytych	2	213
<i>Chmielewski Tadeusz J.</i> — Ekologiczne, społeczne i gospodarcze problemy funkcjonowania Kampinoskiego Parku Narodowego	1	129
<i>Czyż Andrzej</i> — Agenda 21 — globalny program działań na rzecz ekorozwoju przyjęty na konferencji ONZ „Środowisko i Rozwój” w Rio de Janeiro w 1992 roku	1	17
<i>Fabiszewski Jerzy, Jenik Jan</i> — Wartości przyrodnicze i zagrożenia Karkonoskiego Parku Narodowego	1	101
<i>Gliwicz Joanna</i> — Konwencja o różnorodności biologicznej: jej cele, charakterystyka i skutki dla Polski	1	25
<i>Horst Antoni</i> — Produkty genów przeciwnowotworowych	3-4	523
<i>Hübner Henryk, Mordalska Anna</i> — Genomowy imprinting u człowieka	3-4	493
<i>Janion Stefan M.</i> — Ewolucja ekosystemalna	2	303
<i>Jaruzelska Jadwiga</i> — Fenylketonuria — od genotypu do kliniki	3-4	431
<i>Jungerman Małgorzata</i> — Cukrzyca insulinozależna — skomplikowany przykład choroby uwarunkowanej wieloczynnikowo	3-4	471
<i>Kałużewski Bogdan</i> — Czy chromosomy płciowe są nam potrzebne?	3-4	371
<i>Karczmarczyk Roman</i> — Kukurydza — prastare zboże Indian	2	245
<i>Kloss Marek, Wilpiszewska Izabela</i> — Uwagi o rozwoju i funkcjonowaniu ekosystemów torfowiskowych w zagłębieniach bezodpływowych na Pojezierzu Mazurskim	2	259
<i>Kolbuszewski Jacek</i> — Koncepcja edukacji ekologicznej	1	171
<i>Kostrzewski Jan</i> — Na ratunek ginącym lasom	1	39
<i>Kowalska Anna, Piłacik Bożena</i> — Niedobór alfa-1-antytrypsyny	3-4	459
<i>Kozłowski Stefan</i> — Deklaracja z Rio — początkiem ery ekologicznej	1	11
<i>Kwiatkowska Jolanta, Lisiecka Dobrawa, Słomski Ryszard, Siemieniako Barbara, Sowińska Jadwiga, Galas-Zgorzalewicz Bożena, Emich-Widera Ewa, Marszał Elżbieta, Ciesielski Tadeusz</i> — Diagnostyka molekularna dystrofii mięśniowej Duchenne’a/Beckera	3-4	389

(Ciąg dalszy na III stronie okładki)

KOSMOS

Rok założenia 1876

WARSZAWA 1995

MEDYCZNA AGENCJA WYDAWNICZO INFORMACYJNA

RADA REDAKCYJNA

LESZEK KUŹNICKI (*wiceprzewodniczący*), WŁODZIMIERZ OSTROWSKI,
HENRYK SZARSKI, PRZEMYSŁAW TROJAN,
ADAM URBANEK (*przewodniczący*), KAZIMIERZ ZIELIŃSKI

KOMITET REDAKCYJNY

BRONISŁAW CYMBOROWSKI, WŁADYSŁAW
GOLINOWSKI (*zastępca redaktora naczelnego*), LUCYNA GRĘBECKA,
KAZIMIERZ L. WIERZCHOWSKI (*redaktor naczelny*),
BARBARA BIERZYŃSKA (*sekretarz*)

ADRESY REDAKCJI

Polskie Towarzystwo Przyrodników im. Kopernika
ul. Rakowiecka 36, 02-532 Warszawa

Redaktor Naczelny
Instytut Biochemii i Biofizyki PAN, Pawińskiego 5A, 02-106 Warszawa
tel. 658-47-29

Sekretarz
Muzeum i Instytut Zoologii PAN, Wilcza 64, 00-679 Warszawa
tel. 29-32-21 wew. 24

Wydano z pomocą finansową Komitetu Badań Naukowych

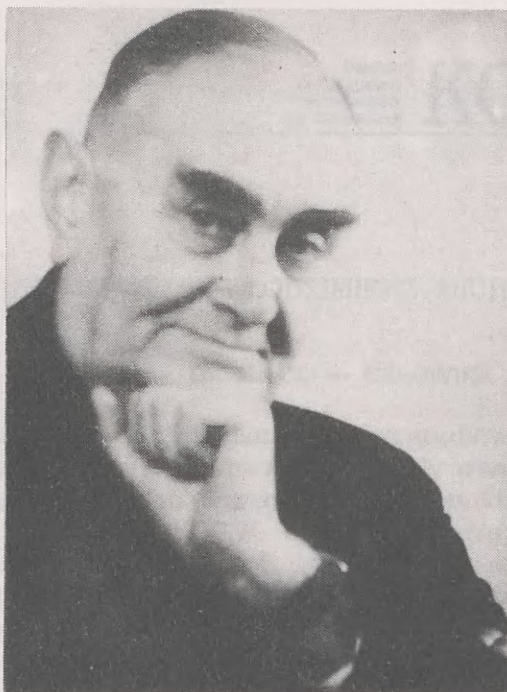
Nr indeksu 362808

PL ISSN 0023-4249

MEDYCZNA AGENCJA WYDAWNICZO INFORMACYJNA

Warszawa, ul. Złota 60/28

Druk: Drukarnia Nr 1, Rakowiecka 37, Warszawa



Z wielkim żalem pożegnaliśmy zmarłego 9 września 1994 roku Profesora Doktora Włodzimierza Michajłowa, Redaktora Naczelnego *KOSMOSU* w latach 1952–1992, członka Komitetu Redakcyjnego i Rady Redakcyjnej naszego pisma do ostatniej chwili Jego życia. Ponad 40 lat pracy Profesora w *KOSMOSIE* w 120-letniej historii pisma jest najlepszą miarą wielkiego wkładu wniesionego przez Niego w utrzymanie wysokiego poziomu i ciągłości wydawania pisma. Profesor Włodzimierz Michajłow dzięki swojej głębokiej wiedzy biologicznej, szerokim zainteresowaniom sięgającym pogranicza biologii i innych dziedzin nauki, w tym również nauk społecznych, czynnemu udziałowi w nauczaniu biologii i popularyzacji jej osiągnięć przyciągał do pisma licznych współpracowników identyfikujących się z jego profilem i wielu doskonałych autorów, wypełniających łamy *KOSMOSU* interesującą i aktualną treścią. Sam wielokrotnie chwycił za pióro dzieląc się z Czytelnikami swoją wiedzą i przemyśleniami dotyczącymi ewolucji, ochrony środowiska, sozologii i nauczania biologii. Jego zasługi dla *KOSMOSU* pozostaną na trwałe w historii pisma i polskiego piśmiennictwa biologicznego.

Na zaproszenie Redakcji, na łamach tego zeszytu, prof. Krystyna Kisielewska, uczennica i wieloletnia współpracowniczka Profesora Michajłowa, przybliży Czytelnikom *KOSMOSU* Jego sylwetkę jako uczonego, nauczyciela, organizatora nauki i człowieka. Czas poświęcony na lekturę tych wspomnień będzie najlepszym wyrazem naszej wdzięcznej pamięci, na jaką sobie Profesor Włodzimierz Michajłow niewątpliwie zasłużył.

Redakcja *KOSMOSU*

PROFESOR DOKTOR WŁODZIMIERZ MICHAJŁOW

UCZONY — DZIAŁACZ — CZŁOWIEK

To była jesień 1950 roku. Zaczynałam drugi rok studiów na Wydziale Biologii i Nauk o Ziemi Uniwersytetu Warszawskiego. Wtedy właśnie po raz pierwszy zetknęłam się z Profesorem Michajłowem. Był wówczas kierownikiem Zakładu Zoologii Wydziału Zootechniki SGGW. Kompletował zespół i zwrócił się do ówczesnego opiekuna mojego roku, prof. Tadeusza Jaczewskiego, aby zaproponował mu kogoś spośród swoich studentów. Profesor Jaczewski polecił mnie. Udałam się na „wstępną rozmowę” i od 1-go stycznia 1951 roku rozpoczęłam pracę na pół etatu w zakładzie Profesora Michajłowa jako młodszy asystent. Tak właśnie zaczęła się moja naukowa przygoda z tym wspaniałym Człowiekiem i Uczonym, który wspomagał i śledził całą moją naukową karierę będąc mi Nauczycielem, Wychowawcą i Przyjacielem. Moja współpraca z Nim przetrwała do jego odejścia na emeryturę, zaś przyjaźń — do końca dni. Odszedł od nas 9 września 1994 roku w wieku 89 lat.

Pragnę nakreślić jego sylwetkę ku pamięci tych, co Go znali, a także aby przybliżyć Jego postać młodym pokoleniom biologów, którzy niewątpliwie będą się stykali, jeśli nie ze specjalistycznymi publikacjami Profesora Michajłowa, to na pewno z jego książkami i artykułami o ewolucji i problemach ochrony środowiska.

Włodzimierz Michajłow urodził się 24 marca 1905 roku w Kijowie, gdzie Jego ojciec był profesorem konserwatorium. Mając lat 17 i ukończone 6 klas gimnazjum wyrusza do Polski z transportem repatriantów (wśród nich znajdowała się polska rodzina Jego matki). Osiedla się w Warszawie. W 1925 roku składa jako ekstern egzamin dojrzałości i wstępuje na Wydział Przyrodniczy UW, gdzie studiuje zoologię. W owym czasie kierownikiem Katedry Zoologii był prof. Konstanty Janicki — twórca polskiej szkoły parazytologicznej. Włodzimierz Michajłow stał się uczniem prof. Janickiego, z czego był bardzo dumny i czemu dał wyraz wieszając w swoim gabinecie na poczesnym miejscu portret swojego mistrza. Włodzimierz Michajłow już w czasie studiów rozpoczął prace badawcze z zakresu parazytologii. Pierwsza z nich ukazała się drukiem w 1932 roku w *Annales de Parasitologie* (Paryż). W 1933 roku (w rok po śmierci prof. Janickiego) Włodzimierz Michajłow uzyskuje stopień magistra filozofii w zakresie zoologii i anatomii porównawczej, zaś w rok później — po odbyciu studiów pedagogicznych na Wydziale Humanistycznym UW — dyplom nauczyciela szkół średnich. Do wybuchu drugiej wojny światowej pracuje jako nauczyciel przyrodznawstwa, a jednocześnie w charakterze wolontariusza kontynuuje pracę naukową w Zakładzie Zoologii UW, co zaowocowało wydaniem w druku w latach

1932–1939 siedmiu prac naukowo-badawczych z dziedziny parazytologii, dwóch prac z zakresu metodyki nauczania biologii oraz szeregu artykułów w czasopismach przyrodniczych i pedagogicznych. W tym też okresie Włodzimierz Michajłow przygotował rozprawę doktorską, której przed wybuchem wojny nie zdążył obronić, zaś podczas oblężenia Warszawy w 1939 roku uległa zniszczeniu wraz z całą dokumentacją. W okresie okupacji nauczał biologii na tajnych kompletach w zakresie szkolnictwa średniego.

Wczesną jesienią 1944 roku Włodzimierz Michajłow udaje się do Lublina, gdzie podejmuje pracę w resorcie oświaty PKWN. Po zakończeniu wojny (9 maja 1945 r.) powraca do Warszawy, gdzie w Departamencie Szkół Wyższych pełni funkcję dyrektora Departamentu Nauki, zaś w latach 1959–1968 jako wiceminister szkół wyższych działał na rzecz odbudowy i organizacji szkolnictwa wyższego w Polsce.

Mimo tak intensywnej pracy w organizowaniu powojennej nauki polskiej Włodzimierz Michajłow nie zapomina o własnej działalności naukowo-badawczej. W 1947 roku uzyskuje tytuł doktora nauk przyrodniczych w Uniwersytecie M. Curie-Skłodowskiej w Lublinie. W dwa lata później obejmuje Katedrę Zoologii Wydziału Zootechniki SGGW. Jednakże zrodzone w czasie studiów pod wpływem prof. Janickiego zainteresowanie dziedziną parazytologii sprawia, że prof. W. Michajłow włącza się do organizowania Zakładu Parazytologii PAN (inicjatorem i pierwszym kierownikiem tego zakładu był prof. Witold Stefański), opuszcza SGGW i 1-ego września 1954 roku obejmuje kierownictwo Pracowni Parazytologii Ogólnej przy Zakładzie Parazytologii PAN (drugą pracownią była Pracownia Parazytologii Weterynaryjnej). Na początku Profesor Michajłow skompletował czteroosobowy zespół, w którym znalazła się niżej podpisana. W krótkim czasie owa pracownia stała się głównym ośrodkiem rozwoju biologicznej i ekologicznej problematyki w parazytologii. W 1961 roku, po odejściu na emeryturę prof. Stefańskiego, Profesor Michajłow przejmuje kierownictwo Zakładu Parazytologii PAN i pozostaje na tym stanowisku do końca grudnia 1975 roku, to jest do chwili przejścia na emeryturę.

Profesor Michajłow będąc jeszcze na studiach — zainspirowany tematyką badawczą swego mistrza, prof. Janickiego — podjął badania nad biologią i cyklami rozwojowymi tasiemców.

Wkrótce jednak zakres tej problematyki przestał wystarczać zarówno Profesorowi Michajłowowi, jak i Jego uczniom. Wraz z powiększającym się ich gronem zaczęto prowadzić wielostronne badania nad układem „żywiciel–pasożyt” — jednym z kluczowych zagadnień w parazytologii. Przede wszystkim rozszerzano warsztat badawczy zespołu o różne modele badań. Oprócz tasiemców badano przywry, pierwotniaki pasożytnicze, a z pasożytów zewnętrznych — kleszcze. Ponadto badania eksperymentalne i terenowe wzbogacano poprzez stosowanie różnorodnej metodyki właściwej takim dziedzinom, jak fizjologia, biochemia, ekologia, ewolucjonizm. Pozwalało to pogłębiać i ukazywać wielopłaszczyznowość zjawisk ujętych ogólnie terminem „pasożytnictwo”.

Osobiste zainteresowania Profesora Michajłowa wzbudziła najbardziej filogeneza pasożytów, powstawanie i kształtowanie się układów żywicielsko-pasożytniczych w toku ewolucji zarówno samych pasożytów, jak i ich żywicieli. To skoncentrowanie się na problemach ewolucji pasożytów oraz pasożytnictwa jako

formy współlistnienia dwóch gatunków (grup gatunków) organizmów znalazło swój wyraz w wielu publikacjach naukowych. Ukazały się także na ten temat trzy książki: *Pasożytnictwo a ewolucja* PWN, 1960, *Zarys parazytologii ewolucyjnej* PWN, 1967 (II wydanie tej pozycji ukazało się w 1972 roku, zaś wydawnictwo *Nauka* przygotowało przekład na język rosyjski) oraz *Problemy ewolucji organicznej*, Ossolineum, 1982.

Już na początku lat pięćdziesiątych Profesor Michajłow zrezygnował z tasiemców jako pierwotnego modelu swoich badań, podjął natomiast badania nad pierwotniakami z grupy *Euglenidae*, pasożytujących u niektórych grup widłonogów (*Copepoda*). Na podstawie materiałów zbieranych przez blisko 40 lat w zbiornikach wodnych wielu krajów Europy ze Skandynawią włącznie, a także Egiptu, Ghany, Kenii, Etiopii i Wietnamu Profesor Michajłow opisał i prześledził cykle rozwojowe około 120 nowych dla nauki gatunków wiciowców pasożytujących w świetle jelita, gonadach, płamce ocznej i innych narządach oczlików (*Copepoda*).

Dzięki tej gigantycznej pracy Profesor Michajłow stał się praktycznie jedynym w świecie tej klasy specjalistą od grupy pasożytniczych *Euglenoidea*.

Profesor Michajłow opracował monografię tej grupy pasożytów w książkach: *Euglenoidine parasitic in Copepoda* (w języku angielskim) oraz *Biologia pasożytniczych Euglenoidina* PWN, 1978 (później tłumaczona na język angielski). W tych opracowaniach książkowych przedstawił Profesor Michajłow aspekty pasożytnictwa tej grupy pierwotniaków z punktu widzenia biologii, fizjologii, ekologii a przede wszystkim ich ewolucji w porównaniu z pokrewnymi formami wolnożyjącymi.

Profesor Michajłow był autorem blisko 300 publikacji, w tym oprócz kilku książek i licznych artykułów merytorycznych i polemicznych — około 200 pozycji to własne prace naukowo-badawcze.

W 1969 roku ukazała się książka autorstwa Profesora Michajłowa *Na tropach ewolucji*, wydana przez Wiedzę Powszechną. Książka ta w założeniu miała mieć charakter popularyzatorski, jednak nie sposób jej rozpatrywać w oderwaniu od działalności naukowo-badawczej jej Autora. Stanowi ona pewnego rodzaju *credo* Uczzonego, w którym wyjaśnia dlaczego podejmował swoje badania, dlaczego obrał taki, a nie inny model badań, pozwala Czytelnikowi śledzić tok swego rozumowania, drogi jakimi dochodził do swoich wniosków. Jednym słowem prezentuje w sposób przystępny nie tylko ideę swoich badań, ale odkrywa kulisy swego warsztatu naukowego.

Prace popularyzatorskie Profesora Michajłowa głównie koncentrują się wokół zagadnień związanych z ewolucją świata organicznego. W badaniach własnych problematykę tę rozwiązywał na modelu raczków planktonowych i ich pasożytniczych pierwotniakach — wiciowcach. Na podstawie tego specyficznego modelu wykazywał, że pewne dane i wynikające z nich koncepcje, mogą być przydatne do uściślenia, rozwinięcia, bądź nawet wyjaśnienia przebiegu i mechanizmów ewolucji. Uczeni od dawna usiłują rozstrzygać o toku i przyczynach ewolucji w oparciu o różne specjalności biologiczne oraz na modelach różnych grup bądź gatunków zwierząt i roślin. Jednak pasożytów nie brano pod uwagę, a to z następujących przyczyn: po pierwsze — parazytologia nie dysponuje formami przejściowymi, mającymi tak duże znaczenie przy rekonstrukcji przemian ewo-

lucyjnych, bowiem pasożyty (zwłaszcza wewnętrzne) nie posiadają twardych części szkieletowych, które mogłyby przetrwać jako szczątki kopalne; po drugie — większość współczesnych grup pasożytniczych stanowi zwarte szczepy, które na skutek daleko idących przystosowań do pasożytniczego trybu życia zatraciły większość cech wspólnych z ewentualnymi wolno żyjącymi formami pokrewnymi. Jednak Profesor Michajłow założył — a dalszymi swymi badaniami udowodnił — że i pasożyty mogą być interesującym obiektem badań z ewolucyjnego punktu widzenia, pod warunkiem, że wytypuje się odpowiednie gatunki pasożytów i żywicieli. Uznał, że obiektów takich należy szukać wśród form pasożytniczych, które stanowią nieliczną grupę w jednostkach systematycznych (np. gromadach), gdzie większość gatunków prowadzi swobodny tryb życia, przy czym pokrewieństwo między nimi a gatunkami pasożytniczymi nie budzi wątpliwości.

Opierając się na tych założeniach, Profesor Michajłow obrał sobie za obiekt badań wspomniane już pierwotniaki — wiciowce, pasożytujące w oczlikach. Wśród wiciowców znaczną grupę stanowią gatunki wolno żyjące (wśród nich znana powszechnie euglena zielona). Dzięki nie budzącemu wątpliwości pokrewieństwu wiciowców pasożytniczych z wolno żyjącymi, ten porównywalny materiał pozwolił Profesorowi Michajłowowi na interpretowanie uzyskanych danych pod kątem istotnym dla ewolucyjnej problematyki. Obiekt badań był w tym przypadku sprawą drugorzędą, natomiast ważnym był ogólniejszy, cenny dla nauki problem, który na tym obiekcie można było prześledzić. Analiza budowy i cykli rozwojowych odkrytych przez siebie pasożytniczych gatunków wiciowców, a także istniejących między nimi różnic wynikających z niejednakowego stopnia zaawansowania w pasożytniczym trybie życia („młodsze” i „starsze” ewolucyjnie pasożyty), pozwoliła Profesorowi Michajłowowi na ułożenie pewnego ciągu przystosowań, służących coraz to sprawniejszemu pasożytowaniu i zachowywaniu ciągłości gatunku. Takie podejście nadało zebrany faktom ewolucyjnego znaczenia, pozwoliło naświetlić rolę pasożytnictwa jako czynnika gatunkotwórczego.

Te mrówcze badania wymagały żmudnej, precyzyjnej i cierplivej pracy. I taki był właśnie Profesor Michajłow: pracowity, systematyczny, punktualny. Gdy pisał książkę, powtarzał uczniom swoją maksymę: „ani jednego dnia bez jednej strony tekstu”.

Zamiłowania Profesora Michajłowa do dydaktyki, ujawnione jeszcze w czasie studiów, wyrażały się publikowaniem po 1945 roku licznych artykułów i opracowań z zakresu metodyki nauczania i popularyzacji wiedzy, wydał też kilka książek popularno-naukowych oraz podręczników szkolnych. I tak na przykład podręcznik biologii dla starszych klas szkoły średniej ukazał się w 18 wydaniach. Także w ramach działalności dydaktycznej Profesor Michajłow powołał do życia, a następnie redagował czasopismo dla nauczycieli *Biologia w Szkole*. Uczestniczył też we władzach Polskiego Towarzystwa im. Kopernika i Towarzystwa Wiedzy Powszechnej, zaś w latach 1979–1991 pełnił funkcję Dyrektora Wszechnicy PAN. Miał też swoich uczniów: wypromował ośmiu doktorów, z których pięciu jest obecnie profesorami, dwoje docentami, jeden zaś wyjechał po doktoracie do Australii i tam z powodzeniem kontynuuje swoją karierę naukową.

Działalność edytorska Profesora Michajłowa nie ograniczała się do redagowania wyżej wspomnianej *Biologii w Szkole*. Był przez wiele lat Redaktorem Naczelny *Acta Parasitologica Polonica* — czasopisma Zakładu Parazytologii PAN

— oraz czasopisma przyrodniczego *Kosmos*. Zasiadał też w kolegiach redakcyjnych wielu innych czasopism naukowych i popularnonaukowych.

Profesor Michajłow był członkiem licznych komitetów naukowych PAN i rad naukowych instytutów PAN i resortowych. Między innymi był przewodniczącym Komitetu i Prezydium Komitetu *Człowiek i Środowisko* PAN, Przewodniczącym Rady Naukowej Instytutu Parazytologii PAN, Instytutu Ekologii PAN, Instytutu Zoologii PAN, Instytutu Kształtowania Środowiska.

Na początku lat siedemdziesiątych Profesor Michajłow skoncentrował swoją uwagę na międzynarodowej współpracy w zakresie ochrony i kształtowania środowiska. Trzykrotnie reprezentował Polską Akademię Nauk w pracach Rady Koordynacyjnej Międzynarodowego Programu UNESCO/MAB (Man and Biosphere). W 1971 roku podczas zgromadzenia Walnego UNESCO zainicjował (przy poparciu parazytologów czechosłowackich) wprowadzenie do Programu MAB problematyki parazytologicznej. W efekcie — w marcu 1975 roku odbyło się w Warszawie Międzynarodowe Sympozjum *Environmental Parasitology in the Programme MAB* (Parazytologia środowiskowa w Programie MAB). Prezydentem Sympozjum i współorganizatorem był Profesor Michajłow. W Sympozjum uczestniczyło ponad 100 parazytologów z 12 krajów świata oraz przedstawiciele UNESCO/MAB, WHO i FAO. Na Sympozjum powołano do życia Centrum PARMAB (Parazytologia w Programie MAB) z siedzibą w Zakładzie Parazytologii PAN w Warszawie. Patronat nad Centrum PARMAB z ramienia UNESCO/MAB objął przybyły na Sympozjum dr B. von Droste, zaś z ramienia Polski — Profesor Michajłow. Szefem Centrum została autorka niniejszego opracowania. Drugie Sympozjum PARMAB odbyło się również w Warszawie w 1978 roku z okazji IV Kongresu Parazytologów (ICOPA IV), którego prezydentem był Profesor Michajłow.

W 1960 roku Profesor Michajłow został wybrany Członkiem Korespondentem, a w 1966 — Członkiem Rzeczywistym PAN. Z Polską Akademią Nauk był związany od zarania jej istnienia. Już w toku przygotowań do I Kongresu Nauki Polskiej (przełom czerwca i lipca 1951) Profesor Michajłow został powołany na Członka Prezydium Komitetu Wykonawczego. Jednym z głównych celów Kongresu było wypracowanie nowych form organizacyjnych nauki polskiej, w wyniku czego powzięto uchwałę o powołaniu Polskiej Akademii Nauk. Podczas obrad Kongresu Profesor Michajłow został wybrany Sekretarzem Prezydium w Komisji Organizacyjnej PAN. W rok później (1952) wszedł do nowo wybranych władz PAN jako Zastępca Sekretarza Naukowego II Wydziału PAN (Wydział Nauk Biologicznych). Na stanowisku tym pozostawał do 1959 roku. W następnych latach dwukrotnie (1965 i 1968) był wybierany w skład Prezydium PAN, zaś w latach 1969–1975 pełnił funkcję Sekretarza Naukowego PAN.

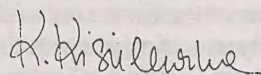
Wieloletnia twórcza działalność naukowa Profesora Michajłowa zjednała Mu powszechne uznanie w kraju i ugruntowała Jego autorytet zarówno w kraju, jak również w skali międzynarodowej. Wyrazem tego były nadane Mu godności doktora honoris causa Akademii Medycznej w Poznaniu, członkostwa honorowego Wszechzwiązkowego Towarzystwa Hemintologicznego w ZSRR, członkostwa honorowego Czechosłowackiego i Bułgarskiego Towarzystwa Parazytologicznego oraz zagranicznego członkostwa Akademii Nauk ZSRR. UNEP/ONZ wciągnęło Profesora Michajłowa na pierwszą listę zasłużonych dla ochrony

środowiska (z Europy znalazło się tam 18 nazwisk), która stanowiła początek światowej listy UNEP (the Global 500).

Po przejściu na emeryturę (31.12.1975) Profesor Michajłow nie zrywa kontaktu z Zakładem, którym kierował przez 15 lat. Bierze nadal czynny udział w jego życiu naukowym i organizacyjnym, wspomaga nowe kierownictwo w kontynuacji starań (które sam zapoczątkował) o uzyskanie dla Zakładu rangi Instytutu, co nastąpiło w 1980 roku. Kieruje też nadal pracami swoich uczniów, sam prowadzi własne prace badawcze, publikuje ich wyniki oraz liczne artykuły w znacznej mierze dotyczące problemów ochrony środowiska.

Profesor Michajłow był odznaczony Państwową Nagrodą Naukową II stopnia za popularyzację wiedzy (1955 r.) i Państwową Nagrodą Naukową II stopnia za działalność naukową (1964). Poza tym otrzymał następujące odznaczenia: Medal Wolności i Zwycięstwa, Srebrny i Złoty Krzyż Zasługi, Medale X, XX i XXX-lecia PRL, Krzyże Kawalerskie Oficerski i Komandorski, Order Odrodzenia Polski, Order Sztandaru Pracy II Klasy, Medal Komisji Edukacji Narodowej.

Opuścił nas wspaniały Człowiek, dużego formatu Uczony, prawie do końca aktywny i twórczy, dopóki nie pokonała Go choroba, z której się już nie wstaje. Poniosła wielką stratę nauka polska, ponieśli wielką stratę Jego uczniowie i współpracownicy. Odszedł Człowiek bez reszty oddany nauce i jej popularyzacji.



Adres domowy:

Krystyna Kisielewska
1 Sierpnia 40 m 63
02-134 Warszawa

EWA JOANNA GODZIŃSKA

*Pracownia Etologii, Zakład Neurofizjologii
Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN
ul. Pasteura 3, 02-093 Warszawa*

TAKTYKI ALTERNATYWNE W ZACHOWANIU SIĘ OWADÓW

WPROWADZENIE

Etologia jest dyscypliną naukową mającą za przedmiot analizę zachowania się ze szczególnym uwzględnieniem jego czynników sprawczych, ontogenezy, ewolucji i funkcji przystosowawczych. Do największych zasług etologii należy stworzenie systemu pojęć, który odegrał i do dziś odgrywa niezwykle istotną rolę w formułowaniu hipotez badawczych i w interpretacji danych doświadczalnych, dotyczących zachowania i jego uwarunkowań przyczynowych, i to zarówno bliższych (neurobiologicznych, ontogenetycznych), jak i dalszych (ewolucyjnych). Znaczenie etologii dla współczesnych badań zachowania się przedyskutowali między innymi THORPE (1979), GOULD (1982), HINDE (1982), GOULD i MARLER (1984) i ALCOCK (1993) zaś w literaturze polskiej — SADOWSKI i CHMURZYŃSKI (1989) oraz GODZIŃSKA (1991, 1992b).

Etologiczna teoria zachowania jest teorią żywą: ulega stale przekształceniom, rozwojowi i wzbogacaniu o nowe pojęcia. Należy do nich pojęcie taktyk alternatywnych. Począwszy od połowy lat siedemdziesiątych, badacze obyczajów zwierząt zaczęli szczególnie silnie podkreślać fakt, że wypełnianie ważnych funkcji biologicznych (takich jak wydanie potomstwa, zdobywanie pożywienia czy też nawigacja) jest zazwyczaj zapewniane w danym gatunku przez cały wachlarz behawioralnych podprogramów. Idea ta pojawiała się w etologii kilkakrotnie i za każdym razem proponowany był inny termin na określenie tego zjawiska. Tak więc, BATESON (1976) zaproponował termin „ekwifinalność” (equifinality) na określenie faktu, że w zachowaniu się zwierząt, a w szczególności w jego ontogenezie, ten sam stan docelowy może być osiągany w sposób konwergentny różnymi drogami. Alternatywne formy zachowania uczestniczące w wypełnianiu tej samej funkcji były określane między innymi również jako „akcje” (actions; MAYNARD SMITH i PARKER 1976), „sposoby” (modes; OSTER i WILSON 1978), „zachowania alternatywne” (alternative behaviors; CADE 1980, AUSTAD 1984) oraz „wzajemnie wspomagające się podprogramy behawioralne” (mutually backup behavioural subroutines; GOULD 1982). Ostatecznie jednak, najszerzej przyjęło się pojęcie „taktyki alternatywne” (alternative tactics; DOMINEY 1984, CARO i BATESON 1986). Stosowanie w sposób zamienny różnych taktyk

w odpowiedzi na zmieniające się warunki środowiska określane bywa też jako „elastyczność behawioralna” (behavioural flexibility, GORDON 1991).

Pojęcia „taktyki alternatywnej” nie należy mylić z pojęciem „strategii”, choć niekiedy, zwłaszcza we wcześniejszych pracach z zakresu ekologii behawioralnej, pojęcia te były używane zamiennie. Obecnie, zgodnie z powszechnie przyjmowanymi definicjami (DOMINEY 1984), „strategia” to genetycznie zaprogramowany zbiór reguł określających, które z alternatywnych wzorców zachowań, stanowiących zbiór określonych opcji, będą przez zwierzę stosowane — i z jakim prawdopodobieństwem — we wszystkich sytuacjach, w jakich znajdzie się ono w ciągu życia. Każdy osobnik może mieć więc tylko jedną strategię; różne strategie muszą reprezentować różnice w genotypie. Termin „taktyki alternatywne” jest używany natomiast na oznaczenie tych właśnie opcji behawioralnych, które stanowią w danej sytuacji przedmiot wyboru, w szczególności zaś, na określenie różnych metod, dzięki którym jest wypełniana określona ważna funkcja biologiczna (np. zdobycie pokarmu, wydanie potomstwa) (porównaj też MCFARLAND 1981, ALCOCK 1993).

Należy tu również dodać, że w języku angielskim pojęcie „alternatywne” jest zdefiniowane jednoznacznie jako „wymagające wyboru pomiędzy dwiema lub większą liczbą możliwości” (*Webster's Third New International Dictionary* 1986, pod red. P. G. GOVE). W języku polskim pojęcie to jest zdefiniowane natomiast jako „wymagające wyboru między dwiema wyłączającymi się możliwościami” (*Słownik języka polskiego*, Tom I: A-Ć, 1958, pod red. W. DOROSZEWSKIEGO). Ten sam *Słownik języka polskiego* podaje jednak jako przykład użycia tego terminu zdanie zaczynające się od słów „dziesięć projektów alternatywnych”. Wydaje się więc, że angielski termin „alternative tactics” można przełożyć na polski jako „taktyki alternatywne” z zachowaniem wszystkich jego odcieni znaczeniowych, a więc i tego, że w grę może wchodzić wybór pomiędzy większą niż dwie liczbą możliwości. W istocie, w przypadku alternatywnych taktyk behawioralnych zwierzę ma najczęściej do wyboru całą wachlarz możliwych opcji.

Pojęcie taktyk alternatywnych było pierwotnie stosowane w analizie zachowania się zwierząt przede wszystkim w pracach z dziedziny ekologii behawioralnej, dyscypliny naukowej powstałej stosunkowo niedawno na styku ekologii, etologii, teorii ewolucji, genetyki populacyjnej i teorii gier (KREBS i DAVIES 1984). Analizy te kładły nacisk przede wszystkim na dalsze (ewolucyjne) uwarunkowania przyczynowe obserwowanych zachowań oraz na ich aspekty genetyczne.

Taktyki alternatywne w zachowaniu się zwierząt są również przedmiotem badań etologicznych. Badania te skupiają się z kolei przede wszystkim na zagadnieniu bliższych (etologicznych i neurobiologicznych) uwarunkowań przyczynowych wyboru przez zwierzę określonej taktyki. Celem tych prac jest często identyfikacja bodźców zewnętrznych oraz czynników wewnętrznych sterujących przełączaniem się z jednej alternatywnej taktyki na inną, a także czynników decydujących o przebiegu ontogenezy taktyk alternatywnych (CARO i BATESON 1986).

Taktyki alternatywne w zachowaniu się owadów były badane przede wszystkim w kontekście motywacyjnym zachowania rozrodczego w szerokim tego słowa znaczeniu (obejmującym także zachowania agonistyczne, terytorializm oraz opiekę nad potomstwem). Koncepcję taktyk alternatywnych zastosowano

między innymi w badaniach zachowania rozrodczego pszczoł z rodzaju *Centris* (ALCOCK i współaut. 1977, ALCOCK 1979), świerszczy (CADE 1979, 1980, 1981), wojsiłków (THORNHILL 1981), różnych gatunków chrząszczy (EBERHARD 1982, FORSH i ALCOCK 1990) i ważek (WOLF i WALTZ 1994, FINCKE 1985, FORSYTH i MONTGOMERIE 1987), pasikoników (GREENFIELD i SHELLY 1985, SHELLY i GREENFIELD 1985) i wreszcie os grzebaczowatych (BROCKMANN i DAWKINS 1979, BROCKMANN i współaut. 1979) oraz pasożytniczych os z rodziny męczelkowatych (*Braconidae*) (FIELD i KELLER 1993). Alternatywne formy zachowania opisano również w licznych pracach poświęconych orientacji i nawigacji owadów, w tym zwłaszcza w nawigacji pszczoły miodnej (GOULD 1982) oraz różnych gatunków mrówek (WEHNER 1992). W zachowaniu mrówek opisano również liczne alternatywne taktyki poszukiwania i zbiórki pokarmu, w tym zwłaszcza polowania i transportu ofiar (OSTER i WILSON 1978, BECKERS i współaut. 1989, TRANIELLO 1987, HÖLLDOBLER i WILSON 1990, SUNDSTRÖM 1993).

W latach 1986–1994, w Pracowni Etologii Instytutu Biologii Doświadczalnej im M. Nenckiego PAN w Warszawie przeprowadzono, we współpracy z innymi ośrodkami w kraju i za granicą, serię prac badawczych, których wyniki umożliwiły dalsze pogłębienie i rozszerzenie naszego stanu wiedzy na temat taktyk alternatywnych w zachowaniu się owadów. Prace te dostarczyły dalszych danych dotyczących taktyk stosowanych przez mrówki podczas atakowania i transportu ofiar. Badania te przyniosły równocześnie opis całego szeregu nowych zjawisk, takich na przykład, jak spontaniczne atakowanie stonki ziemniaczanej przez mrówki z rodzaju *Formica*, różne formy zachowania łowieckiego afrykańskich mrówek z bardzo słabo poznanego rodzaju *Polyrhachis*, oraz wykorzystywanie jako źródło pożywienia kręgowców (gadów, ptaków i ssaków) przez afrykańskie mrówki-tkaczki *Oecophylla longinoda*. Równoległe z badaniami nad taktykami stosowanymi przez mrówki z rodzaju *Formica* podczas polowania na osobniki dorosłe i larwy stonki ziemniaczanej badano również taktyki obrony przed atakiem mrówek stosowane przez ich ofiary. Ponadto, przeprowadzono badania nad taktykami stosowanymi przez mrówki-tkaczki w kontekście motywacyjnym naprawy gniazda oraz nad taktykami obserwowanymi u trzmieli w motywacyjnym kontekście zachowań altruistycznych oraz ucieczki z zamknięcia. Szczególnie te ostatnie prace miały charakter pionierski, stanowiąc pierwsze zastosowanie koncepcji taktyk alternatywnych w badaniach zachowania się owadów w sytuacji ucieczki.

TAKTYKI ATAKU I TRANSPORTU OFIAR OBSERWOWANE U MRÓWEK Z RODZAJU *FORMICA* POLUJĄCYCH NA STONKĘ ZIEMNIACZANĄ

Zachowanie łowieckie mrówek z grupy *Formica rufa* było przedmiotem licznych prac badawczych przede wszystkim z uwagi na to, że odgrywa ono ważną rolę w ochronie lasów przed szkodliwymi owadami (HÖLLDOBLER i WILSON 1990, WAY i KHOO 1992). Badania te miały jednak przede wszystkim charakter stosowany: etologiczne mechanizmy zachowań łowieckich mrówek z tej grupy dalekie są jeszcze od całkowitego poznania.

W latach 1984–1985 przeprowadzono w terenie obserwacje, które wykazały, że mrówki z czterech gatunków z rodzaju *Formica* atakują spontanicznie stonkę ziemniaczaną (*Leptinotarsa decemlineata* Say) (GODZIŃSKA 1986, 1989b, GODZIŃSKA i współaut. 1990). Było to pierwsze doniesienie w literaturze światowej, opisujące regularne i masowe atakowanie stonki ziemniaczanej przez mrówki. W dalszej serii doświadczeń (GODZIŃSKA i współaut., 1990) zbadano również reakcję mrówek z gatunku *F. polyctena* i *F. rufa* na postaci dojrzałe oraz na larwy stonki ziemniaczanej uwalniane w pobliżu mrowisk. Badania te objęły również obserwacje dotyczące taktyk stosowanych przez robotnice tych gatunków podczas atakowania i transportu stonki ziemniaczanej.

Stwierdzono, że podczas polowania na stonkę mrówki te stosowały dwie taktyki ataku: atak indywidualny i atak grupowy. Z reguły, atak miał charakter indywidualny jedynie w fazie początkowej, zaś w fazie końcowej uczestniczyły w nim zazwyczaj liczne robotnice (często ponad dziesięć mrówek). Zaobserwowano również trzy taktyk transportu ofiar: (1) indywidualny transport całych ofiar, (2) grupowy transport całych ofiar, oraz (3) rozcinanie ofiar na części i następnie transport ich fragmentów. Najczęściej obserwowaną taktyką był grupowy transport całej ofiary przez stosunkowo liczne robotnice.

Techniki ataku i transportu zaobserwowane u mrówek z grupy *F. rufa*, polujących na stonkę ziemniaczaną, były już u tych mrówek znane z wcześniejszych badań nad ich zachowaniem łowieckim (CHAUVIN 1950, SUDD 1965, BÜTTNER 1973). Obecnie omawiane prace wykazały jednak również, że techniki te mogą być stosowane przez te mrówki jako alternatywne taktyki podczas polowania na ofiary z tego samego gatunku.

TAKTYKI ALTERNATYWNE W ZACHOWANIU ŁOWIECKIM AFRYKAŃSKICH MRÓWEK NADRZEWNYCH Z GATUNKU *POLYRHACHIS LABORIOSA* F. SMITH

W kolejnej pracy z cyklu poświęconego zachowaniu łowieckiemu mrówek z podrodziny *Formicinae* (DEJEAN i współaut. 1994) zbadano taktyki ataku i transportu stosowane przez afrykańskie nadrzewne mrówki z gatunku *Polyrhachis laboriosa*. Rodzaj *Polyrhachis* liczy około 700 gatunków i należy do największych rodzajów mrówek (BOLTON 1973, DOROW i MASCHWITZ 1990). Biologia i etologia mrówek z tego rodzaju jest zaskakująco słabo znana (DOROW i współaut. 1990). Wraz z pracą LENOIRA i DEJEANA (1994), poświęconą biologii królowych *P. laboriosa* i *P. militaris*, obecnie dyskutowana praca DEJEANA i współaut. (1994) stanowi pierwsze monograficzne opracowanie poświęcone opisowi i doświadczalnej analizie zachowania łowieckiego mrówek z tego rodzaju.

Jak wykazali DEJEAN i współpracownicy (1994), zachowanie łowieckie *P. laboriosa* jest niezwykle elastyczne: mrówki te stosują cały wachlarz taktyk łowieckich, dostosowując swe zachowanie do właściwości atakowanych ofiar, takich jak wielkość, ruchliwość, możliwości obrony przed atakującą mrówką, występowanie pojedynczo lub w grupie.

Tak więc, podczas atakowania niewielkich ofiar niegroźnych dla atakującej mrówki atak następuje w sposób szybki i zdecydowany natychmiast po lokali-

zacji ofiary. Transport może nastąpić natychmiast po pochwytceniu ofiary, bez uprzedniego jej spryskania wydzieliną gruczołu jadowego.

Ofiary średniej wielkości, niegroźne dla atakującej mrówki, są atakowane w sposób podobny, z tym jednak, że po spryskaniu wydzieliną gruczołu jadowego i przed rozpoczęciem transportu każda ofiara jest wielokrotnie nagryzana.

Podczas atakowania bardzo dużych owadów, wielokrotnie przewyższających rozmiarami atakującą mrówkę, spryskiwanie ofiary wydzieliną gruczołu jadowego następuje zazwyczaj natychmiast po jej wykryciu, bez prób pochwytcenia jej w żuwaczki. Następnie, mrówka najczęściej udaje się do gniazda i rekrutuje tam grupę towarzyszek, z którymi powraca do ofiary (oszołomionej już na skutek działania jadu), by pociąć ją na części, zanoszone następnie do gniazda przez indywidualne robotnice.

Podczas atakowania żołnierzy termitów z gatunku *Macrotermes bellicosus* Smeathman, wyposażonych w potężne żuwaczki i z uwagi na to bardzo niebezpiecznych dla atakującej mrówki, *P. laboriosa* stosują taktykę, którą można określić jako „atak z zachowaniem ostrożności”. Atakująca mrówka przybiera charakterystyczną „postawę ostrożności”, odrzucając w tył czułki, co zmniejsza szansę ich uszkodzenia przez termita, i trzymając stale żuwaczki szeroko rozwarte w pełnej gotowości do natychmiastowego ataku. Zbliżanie się do ofiary i atak są powolne i ostrożne, z częstym wycofywaniem się i odwrotami.

Ucieczka ofiary wyzwala u atakującej robotnicy *P. laboriosa* kolejną alternatywną taktykę ataku, tak zwane „zachowanie się rezerwowe”. Lokomocja mrówki ulega znacznemu przyspieszeniu, zwiększa się też częstość zmian kierunku biegu. Atak następuje natychmiast po ponownym wykryciu ofiary, bez poprzedzającego go zazwyczaj kontaktu czułkowego. Mrówka najpierw spryskuje ofiarę wydzieliną gruczołu jadowego i dopiero następnie chwytą ją, używając przy tym nie tylko żuwaczek, lecz także przednich nóg.

Szczególnie dużą zmienność wykazuje zachowanie łowieckie *P. laboriosa* obserwowane w odpowiedzi na napotkanie grupy termitów. W większości przypadków po zabiciu pierwszego termita mrówka zanosila go do gniazda, lecz przejście do fazy transportu mogło też zachodzić dopiero po kolejnym zabiciu kilku ofiar. Mrówka ta następnie powracała do pozostałych termitów albo sama, albo wraz z grupą współtowarzyszek. Odkładanie śladu zapachowego, pozwalającego na rekrutację dalszych współtowarzyszek, było fakultatywne.

Jak wynika z tych danych, *P. laboriosa* polują zawsze w sposób indywidualny. Taktyka ataku grupowego nie jest stosowana przez te mrówki nawet podczas polowania na owady wielokrotnie przewyższające je rozmiarami. *P. laboriosa* nie stosują też taktyki transportu grupowego. Niewielkie ofiary są transportowane w całości przez indywidualne robotnice. Duże ofiary są cięte na części, które są następnie również transportowane indywidualnie.

W omawianej pracy stwierdzono również, że w pełni dojrzałe społeczeństwa *P. laboriosa* są polikaliczne, to znaczy zamieszkują system kilku połączonych ze sobą gniazd. Jak to następnie wykazano, pełna sekwencja zachowania łowieckiego jest obserwowana jedynie u robotnic pochodzących z tych dojrzałych, polikalicznych kolonii. Ponadto, nawet w dużych koloniach *P. laboriosa* tylko niektóre zbieraczki pełnią rolę łowczyń. Dane te dowodzą więc, że samo wystę-

powanie zachowania łowieckiego jest już u *P. laboriosa* jedną z alternatywnych taktyk odpowiedzi na potencjalne ofiary.

TAKTYKI ATAKU I TRANSPORTU OFIAR U AFRYKAŃSKICH MRÓWEK-TKACZEK Z GATUNKU *OECOPHYLLA LONGINODA* LATREILLE

Afrykańskie mrówki-tkaczki *Oecophylla longinoda* zamieszkują nadrzewne gniazda, budowane z żywych liści łączonych w zamknięte komory za pomocą pasm przędzy wydzielanych przez ich larwy. Podczas budowy gniazda mrówki chwytają larwy w żuwaczki i posługują się nimi jak członkami tkackimi, stąd ich nazwa „tkaczki”. Dojrzałe kolonie *O. longinoda* są polikaliczne i mogą osiągać bardzo duże rozmiary (WAY 1954, HÖLLDOBLER 1979, HÖLLDOBLER i WILSON 1990). Zachowanie tych mrówek podczas polowania i transportu ofiar było przedmiotem bardzo licznych prac (DEJEAN 1990a, b, DEJEAN 1991, WAY i KHOO 1992).

W wyniku terenowych obserwacji i doświadczeń przeprowadzonych przez WOJTUSIAKA i współpracowników (w druku), stwierdzono, że *O. longinoda* mogą wykorzystywać jako źródło pokarmu szczególnie duże ofiary zwierzęce, w tym także kręgowce: węże, jaszczurki, ptaki, gryzonie i nietoperze. Wykorzystywanie kręgowców jako źródła pokarmu nie było jak dotąd u tych mrówek opisane. Owe szczególnie duże ofiary były najczęściej transportowane w całości przez bardzo liczne grupy robotnic. Zaobserwowano jednak również alternatywną taktykę transportu, polegającą na cięciu ofiary na części przed rozpoczęciem transportu, lub już w jego trakcie.

Stwierdzono również, że podczas transportu dużych ofiar do nadrzewnych gniazd kluczową rolę odgrywają przyłgi na odnóżach robotnic. Jak to mogliśmy zaobserwować i udokumentować serią zdjęć fotograficznych, dzięki obecności przyłg pojedyncza robotnica *O. longinoda* może utrzymać zwisające w dół ciało małego ptaszka. Przypadki zbiorowego i indywidualnego transportu dużych ofiar przez *O. longinoda* opisane przez WOJTUSIAKA i współautorów należą do najbardziej spektakularnych przykładów transportu dużych obiektów, jakie kiedykolwiek opisano u mrówek.

Opisano również taktyki stosowane przez *O. longinoda* podczas chwytania dużych owadów. Zazwyczaj są one chwytane i przytrzymywane przez pojedyncze robotnice *O. longinoda*. Sukces ataku zależy przede wszystkim od tego, czy mrówka zdoła utrzymać ofiarę do chwili przybycia dalszych współtowarzyszek. Także i tu kluczową rolę odgrywają przyłgi na odnóżach mrówki. Z chwilą przybycia współtowarzyszek atak indywidualny przechodzi w atak grupowy, w którym mrówki stosują technikę „rozciągania” (stretching), chwytając za wystające części ciała ofiary (odnóża, czułki) i ciągnąc je z całej siły w przeciwstawne strony. Jest to wysoce wyspecjalizowana forma ataku grupowego, opierająca się na skoordynowanych działaniach uczestniczących w nim robotnic (HÖLLDOBLER i WILSON 1990, DEJEAN 1990a, b).

O. longinoda polują najczęściej podczas patrolowania swoich terytoriów na zamieszkiwanych przez nie drzewach oraz na ziemi u stóp tych drzew (DEJEAN 1990a, b). Czasami jednak, mrówki te polują także na sposób mrówek nomadnych, wyruszając w zorganizowanych kolumnach na łowieckie rajdy (LEDoux

1950, DEJEAN i współaut. 1991). Jak to stwierdzili WOJTUSIAK i współpracownicy, skuteczność chwytania dużych owadów przez *O. longinoda* jest najwyższa, gdy stosują one taktykę polowania na sposób mrówek nomadnych.

Stwierdzono również, że podobnie jak w opisanym powyżej przypadku *P. laboriosa*, również i u *O. longinoda* zachowanie łowieckie jest tylko jedną z możliwych taktyk odpowiedzi na potencjalne ofiary i zaczyna pojawiać się dopiero wtedy, gdy kolonia tych mrówek osiąga pewną wielkość. Ponadto, nie tylko samo występowanie zachowania łowieckiego, lecz także jego charakter (zainteresowanie określonymi kategoriami ofiar, stosowanie określonych taktyk łowieckich) zależy w przypadku *O. longinoda* od wielkości kolonii. Zarówno zaciąganie do gniazd bardzo dużych ofiar, jak i polowanie na sposób mrówek nomadnych było obserwowane wyłącznie w bardzo dużych, polikalicznych koloniach *O. longinoda*, i to jedynie w okresach, gdy produkowane w nich były formy płciowe.

TAKTYKI ALTERNATYWNE W ZACHOWANIU OBRONNYM STONKI ZIEMNIACZANEJ

Jak już wspomniano, podczas terenowych badań nad atakowaniem stonki ziemniaczanej przez mrówki z rodzaju *Formica* (GODZIŃSKA 1986, GODZIŃSKA i współaut. 1990) obserwowano nie tylko zachowanie łowieckie mrówek, lecz również zachowanie obronne atakowanych przez nie stoniek.

Stonka ziemniaczana jest owadem wyposażonym w szczególnie wyrafinowany system obrony chemicznej przed naturalnymi wrogami. Zarówno postaci dojrzałe, jak i larwy stonki ziemniaczanej bronią się przed napastnikami przede wszystkim poprzez uwalnianie różnych wydzielin obronnych (DEROE i PASTEELS 1977, DALOZE i współaut. 1986, PASTEELS, inf. ustna). Jak to obecnie wykazano (GODZIŃSKA 1986, GODZIŃSKA i współaut. 1990) uwalnianie wydzielin obronnych nie jest jednak jedyną taktyką obrony stosowaną przez te owady w sytuacji ataku przez mrówki. Stonki stosują również aktywną obronę behawioralną, polegającą na mocnym chwytaniu wszystkimi odnóżami gałązek lub ździebeł traw. Zaatakowane stonki starają się również wspiąć jak najwyżej na rośliny.

Wykazano ponadto, że uwalnianie wydzielin obronnych jest taktyką obrony całkowicie nieskuteczną przeciwko atakowi przez mrówki z grupy *F. rufa*. Zarówno postaci dojrzałe, jak i larwy stonki były atakowane przez te mrówki nawet wtedy, gdy ciała ich były pokryte niemal całkowicie mieszaniną wydzielin obronnych. Wyniki te stoją w całkowitej sprzeczności z wcześniejszymi danymi DEROE i PASTEELSA (1977) oraz DALOZE i współpracowników (1986), którzy wykazali, że wydzieliny obronne stonki ziemniaczanej działają odstraszająco na mrówki z gatunku *Myrmica laevinodis* Nyl. oraz są dla nich toksyczne. Dane Godzińskiej i współpracowników dowodzą więc, że obrona chemiczna, skuteczna przeciwko pewnemu określonemu gatunkowi mrówek, może być całkowicie nieskuteczna przeciwko innemu ich gatunkowi. Jak to podkreślili ostatnio WAY i KHOO (1992), badania te otworzyły więc kwestię ewolucji specyficznych mechanizmów obrony przed atakiem ze strony mrówek.

Badania Godzińskiej i współpracowników wykazały zarazem, że taktyka obrony, polegająca na wspinaniu się wysoko na rośliny, jest niezwykle skuteczna przeciwko atakowi mrówek z gatunku *F. rufa*. Stonki, którym udało się wspiąć wysoko na rośliny otaczające mrowisko *F. rufa* nie były tam w ogóle atakowane:

TAKTYKI ALTERNATYWNE ODPOWIEDZI NA USZKODZENIE GNIAZDA U MRÓWEK *OECOPHYLLA LONGINODA*

Jak już wspomniano, afrykańskie mrówki-tkaczki z gatunku *O. longinoda* są znane przede wszystkim z uwagi na niezwykle zachowania budowlane (HÖLLDOBLER i WILSON 1983, 1990).

W wyniku badań doświadczalnych przeprowadzonych w terenie w Nigerii przez WOJTUSIAKA i GODZIŃSKĄ (1993) wykazano, że repertuar zachowań obserwowanych u *O. longinoda* w odpowiedzi na sztucznie dokonane uszkodzenie gniazda obejmuje co najmniej trzy alternatywne taktyki: szybkie podjęcie działań naprawczych, opóźnione podjęcie działań naprawczych i porzucenie gniazda. Stwierdzono również, że wybór pomiędzy tymi taktykami zależy głównie od dwóch grup czynników: z jednej strony, od wielkości uszkodzenia gniazda, z drugiej strony, od pory roku i pory dnia.

Jak stwierdzono, najczęściej stosowaną przez te mrówki taktyką odpowiedzi na sztucznie dokonane uszkodzenie gniazda jest szybkie podjęcie działań naprawczych. Opóźnione podjęcie działań naprawczych jest typową odpowiedzią na niewielkie uszkodzenia gniazda wykonane w południe w czasie pory suchej. Duże uszkodzenia gniazda wykonane w czasie pory suchej prowadzą z reguły do porzucenia gniazda przez mrówki, zwłaszcza jeżeli są wykonane w ciągu dnia.

Stwierdzono również, że działania naprawcze mogą być podejmowane przez *O. longinoda* zarówno w ciągu nocy, jak i w ciągu dnia, jednakże gotowość do ich podejmowania jest wyższa w ciągu nocy.

Prace te stanowią pierwszą ścisłą analizę doświadczalną czynników decydujących o wyborze taktyki odpowiedzi na uszkodzenie gniazda u mrówek z rodzaju *Oecophylla*.

TAKTYKI ALTERNATYWNE W ZACHOWANIU ALTRUISTYCZNYM ROBOTNIC TRZMIELI (*BOMBUS PASCUORUM* SCOPOLI)

W początku lat sześćdziesiątych HAMILTON (1963, 1964) przedstawił swą słynną hipotezę proponującą wyjaśnienie ewolucji zachowań altruistycznych w oparciu o zasadę tak zwaną doboru krewniaczego. Hipoteza ta przewiduje, między innymi, że zachowania altruistyczne oraz współpraca między osobnikami powinny być obserwowane częściej podczas interakcji pomiędzy osobnikami spokrewnionymi niż pomiędzy osobnikami niespokrewnionymi. Ponad dwadzieścia lat później, HAMILTON (1987) wyraził jednak pogląd, że wysoki stopień pokrewieństwa pomiędzy członkami społeczeństwa nie był najważniejszym czynnikiem ewolucji zachowań altruistycznych owadów społecznych. Naczelną zasadą w ewolucji zachowań altruistycznych wydaje się być raczej zasada tak zwanego altruizmu odwzajemnianego (TRIVERS 1971). Zdaniem Hamiltona, prze-

mawia za tym przede wszystkim rosnąca liczba przykładów na to, że wysoki stopień kooperacji może występować również w koloniach owadów społecznych, składających się z osobników stosunkowo słabo spokrewnionych. Przemawia za tym również stale rosnąca liczba doniesień na temat tolerancji i kooperacji międzygatunkowej wśród owadów społecznych.

Zjawisko tolerancji i kooperacji międzykolonijnej i międzygatunkowej może występować również u trzmieli. Jak to ostatnio wykazano (GODZIŃSKA 1989), robotnice trzmieli z gatunku *Bombus pascuorum* mogą wykonywać zachowania altruistyczne (pełnienie roli zbieraczki lub opiekunki potomstwa) nie tylko na rzecz swojej kolonii macierzystej, lecz także na rzecz innych kolonii należących do tego samego gatunku, a nawet na rzecz kolonii należących do innych gatunków. Trzmiele te mogą również stosować taktykę polegającą na pracy na zmianę, raz dla kolonii macierzystej i drugi raz dla kolonii obcej. Podobne zjawiska są znane od dawna u pszczoły miodnej (*Apis mellifera* L.) (FREE 1958, FREE i SPENCER-BOOTH 1961), ograniczają się jednak do przemieszczania się zbieraczek pomiędzy różnymi koloniami z tego samego gatunku.

Jedną z kilku hipotez, jakie zaproponowano jako możliwe wyjaśnienie opisanych powyżej obserwacji, była hipoteza „integracji ponadspołecznej”, zaproponowana po raz pierwszy przez JAISONA (1985) dla wyjaśnienia ewolucji ogromnych, liczących setki milionów osobników konfederacji społeczeństw, występujących w niektórych gatunkach mrówek. GODZIŃSKA (1989) rozszerzyła tę hipotezę, postulując istnienie więzi potencjalnego altruizmu odwzajemnianego pomiędzy koloniami z różnych gatunków należących do tego samego zespołu. Obecnie, hipoteza postulująca istnienie takich więzi znajduje na swe poparcie dalsze argumenty. Najnowsze prace CZECHOWSKIEGO (1993a, 1993b, 1994) oraz PISARSKIEGO i CZECHOWSKIEGO (1994) dowodzą, że mrówki z grupy *F. rufa* mogą adoptować niespokrewnione z nimi królowe, i to nawet królowe z innego gatunku tej grupy. Skłonność do dokonywania takich adopcji jest szczególnie silnie wyrażona przez kolonie osierocone.

TAKTYKI ALTERNATYWNE STOSOWANE PRZEZ ROBOTNICE TRZMIELI W SYTUACJI UCIECZKI Z ZAMKNIĘCIA

Robotnice latających żądłówek (os, pszczoł i trzmieli) reagują na ograniczenie swobody ruchów wytrwałymi próbami wydostania się na wolność (ucieczki). Podstawową taktyką ucieczki z zamknięcia jest u tych owadów zachowanie się fotopozytywne (podążanie ku światłu) (GODZIŃSKA 1983). Owady te mogą jednak próbować również usunąć przeszkodę zagrażającą im drogę. VERLAINE (1927) opisał takie zachowania u os z gatunku *Paravespula germanica* L, badanych przez niego w labiryncie wykonanym z kartonu: badane przez niego osobniki przegryzały ścianki labiryntu zamiast uczyć się jego prawidłowego przebiegania. Zachowanie się fotopozytywne oraz próby usunięcia przeszkody zagrażającej drogę ucieczki mogą być więc uznane za alternatywne taktyki ucieczki z zamknięcia.

Zachowanie się trzmieli z dwóch gatunków — *Bombus pascuorum* Scopoli i *B. terrestris* L. — w sytuacji wyboru pomiędzy tymi taktykami ucieczki było

przedmiotem prac doświadczalnych GODZIŃSKIEJ (1988) oraz GODZIŃSKIEJ i KORCZYŃSKIEJ (1992a), a także dalszych nieopublikowanych jeszcze badań Godzińskiej (w rewizji). Robotnica schwyta w terenie podczas żerowania była umieszczana w próbówce zatkaanej dwucentymetrową warstwą lekko wilgotnego piasku lub zamkniętej za pomocą papierowej membrany. Drugi, zasklepiony koniec próbówki był zawsze skierowany ku źródłu światła (Słońcu).

Badania te wykazały, że zachowanie się robotnic *B. pascuorum* i *B. terrestris* podczas prób ucieczki z zamknięcia wykazuje szereg istotnych różnic. Dotyczą one zarówno zachowań związanych z usuwaniem przeszkód (kopanie/gryzienie), jak i gotowości do wykazywania zachowania fotopozytywnego. Stwierdzono również, że różnice te są skorelowane z różnicami w ekologii gniazdowania tych gatunków. Zachowanie się trzmieli z gatunku *B. terrestris*, gnieźdzących się zazwyczaj pod ziemią, charakteryzuje zarówno wysoka gotowość zarówno do wykazywania zachowania kopiącego/gryzącego, jak i do podążania ku światłu. Zdolność do szybkiego usuwania przeszkody, zamykającej drogę ucieczki obserwowana u trzmieli z tego gatunku, jest najprawdopodobniej przystosowaniem do życia w podziemnych gniazdach. Wysoka gotowość do podążania ku światłu jest również przystosowawcza w warunkach gniazdowania pod ziemią, gdyż światło sygnalizuje otwartą przestrzeń. U trzmieli z gatunku *B. pascuorum*, gnieźdzących się zwykle na powierzchni ziemi, zachowanie się fotopozytywne nie odgrywa istotnej roli podczas prób wydostania się z zamknięcia w próbówce, zaś gotowość do wykazywania zachowania kopiącego/gryzącego jest niższa niż u *B. terrestris*.

Doświadczenia te nie pozwalają na razie na ustalenie, w jakim stopniu różnice behawioralne, zaobserwowane pomiędzy *B. pascuorum* i *B. terrestris* mają charakter zaprogramowany genetycznie, w jakim zaś wynikają z czynników nabytych. Badane w nich osobniki były odławiane w terenie; robotnice *B. terrestris* mogły więc mieć pewne doświadczenie w usuwaniu przeszkód zatykających drogę wyjścia, nabyte podczas oczyszczania tunelu prowadzącego do ich gniazda. Jak to zaś wykazały późniejsze, nieopublikowane doświadczenia GODZIŃSKIEJ i współpracowników, uczenie się odgrywa bardzo istotną rolę w optymalizacji zachowań trzmieli w sytuacji ucieczki z zamknięcia.

Prace te stanowią pierwsze zastosowanie koncepcji taktyk alternatywnych do analizy zachowania się owadów w sytuacji ucieczki. Zastosowano w nich nową, oryginalną metodykę. Dopiero niedawno alternatywne formy zachowania, obserwowane w kontekście motywacyjnym ucieczki, zostały opisane również u karalucha amerykańskiego (*Periplaneta americana*) (WATSON i RITZMANN 1994).

KONCEPCJE TEORETYCZNE DOTYCZĄCE ZNACZENIA SZYBKOŚCI PRZEŁĄCZANIA SIĘ POMIĘDZY ALTERNATYWNYMI TAKTYKAMI DLA OPTYMALIZACJI ZACHOWANIA SIĘ OWADÓW

W artykule teoretyczno-przeglądowym GODZIŃSKA (1987) przedstawiła argumenty na rzecz hipotezy, zgodnie z którą szybkość, z jaką następuje przełączanie się pomiędzy alternatywnymi zachowaniami wyzwalanymi w danej sytuacji, może mieć kluczowe znaczenie dla optymalizacji zachowania się zwierzęcia.

Szybkie tempo przełączania się z jednej aktywności na inną może być korzystne w sytuacjach nieznanego zwierzęciu, gdyż może przyspieszyć odnalezienie właściwej taktyki, która pozwoli mu na optymalne rozwiązanie stojącego przed nim zadania. Zarazem jednak, często określone zachowanie może wypełniać swą funkcję jedynie wtedy, gdy jest wykonywane z dostateczną uporczywością. Na poparcie tej tezy Godzińska przytoczyła między innymi przykłady z własnych badań nad zachowaniem się trzmieli w sytuacji ucieczki z zamknięcia. W czasie tych doświadczeń osobniki, u których przełączanie się pomiędzy alternatywnymi taktykami ucieczki (podążanie ku światłu *versus* kopanie/gryzienie) zachodziło ze zbyt dużą częstością nie były w stanie rozwiązać stawianego im zadania i wydostać się na wolność. Podobnie, badania J. J. Dobrzańskich nad uczeniem się manipulacyjnym u mrówek z rodzaju *Formica* sugerują, że wytrwałość wykazywana przez młode mrówki podczas pierwszych prób podnoszenia stosunkowo ciężkich przedmiotów ma istotne znaczenie w procesie uczenia się właściwych technik chwytania i transportu takich przedmiotów, a w dalszej konsekwencji odgrywa ważną rolę w ich zachowaniach budowlanych. Mrówki z gatunku *Formica cinerea* Mayr, które wykazują znacznie mniejszą uporczywość podczas prób podnoszenia cięższych patyczków niż mrówki z grupy *F. rufa*, nie są w stanie zbudować trwałego kopca, gdyż znoszą nań zbyt lekki materiał (DOBZAŃSKI 1971, DOBZAŃSKI i DOBZAŃSKA 1982).

ALTERNATIVE TACTICS IN INSECT BEHAVIOR

Summary

The term "alternative tactics" is used to denote alternative behavioural options open to an animal in a given choice situation. The research on alternative tactics was carried out from the perspective of behavioural ecology, focusing mostly on their ultimate (evolutionary) causal factors, and from the perspective of ethology, focusing mostly on their proximate causal factors. In particular, stress was laid on the ontogeny of alternative tactics, and on environmental cues which control short-term changes in behaviour (switching between various tactics).

In insect behaviour, alternative tactics were studied mainly in the context of reproduction (including agonistic behaviour, territory defence and brood care), orientation and navigation, and foraging. In particular, much is already known about foraging and hunting tactics of ants.

During the last ten years, alternative forms of insect behaviour were extensively studied in the Laboratory of Ethology of the Nencki Institute of Experimental Biology (Warsaw). "Alternative tactics" were discovered in the hunting behaviour of several species of formicine ants, in the defense behaviour of adults and larvae of the Colorado beetle, in the nest-repairing behaviour of the African weaver ants, and, lastly, in the altruistic and escape behaviour of the bumblebees. The research led also to several hypotheses and questions which are also briefly discussed in the present review.

LITERATURA

- ALCOCK J., 1979. *The evolution of intraspecific diversity in male reproductive strategies in some bees and wasps*. [W:] *Sexual selection and reproductive competition in insects*. M. S. BLUM, N. A. BLUM [red.], New York, Academic Press, 381-402.
- ALCOCK J., 1993. *Animal behaviour: an evolutionary approach*. 3rd ed. Sunderland, Massachusetts, Sinauer Associates, 532 str.
- ALCOCK J., JONES C. E., BUCHMANN S. L., 1977. *Male mating strategies in the bee *Centris pallida**. J. Kansas Entomol. Soc. 52, 623-632.
- AUSTAD S. N., 1984. *A classification of alternative reproductive behaviors and methods for field-testing ESS models*. Am. Zool. 24, 309-319.

- BECKERS R., GOSS S., DENEUBOURG J. L., PASTEELS, J. M., 1989. Colony size, communication and ant foraging strategy. *Psyche* 96, 239-256.
- BATESON P. P. G., 1976. Rules and reciprocity in behavioural development. [W:] *Growing points in ethology*. BATESON P. P. G., HINDE R. A. [red.], Cambridge, Cambridge University Press, 401-421.
- BOLTON B., 1973. The ant genus *Polyrhachis* F. SMITH in the Ethiopian region (Hymenoptera: Formicidae). *Bull. Br. Mus. Nat. Hist. Entomol.* 28, 285-369.
- BROCKMANN H. J., DAWKINS R., 1979. Joint nesting in a digger wasp as an evolutionary stable preadaptation to social life. *Behaviour* 71, 203-245.
- BROCKMANN H. J., GRAFEN A., DAWKINS R., 1979. Evolutionary stable nesting strategy in the digger wasps. *J. theor. biol.* 77, 473-496.
- BÜTTNER K., 1973. Untersuchungen über den Einfluss des Beutetieres auf den Erbeutungsprozess bei der Waldameise, *Formica polyctena* Foerster (Hymen., Formicidae). *Z. ang. ent.* 74, 117-196.
- CADE W., 1979. The evolution of alternative male reproductive strategies in field crickets. [W:] *Sexual selection and reproductive competition in insects*. M. S. BLUM, N. A. BLUM [red.], New York, Academic Press, 343-379.
- CADE W., 1980. Alternative male reproductive behaviors. *Fla. Entomol.* 63, 30-45.
- CADE W., 1981. Alternative male strategies: genetic differences in crickets. *Science* 212, 563-564.
- CARO T. M., BATESON P., 1986. Organization and ontogeny of alternative tactics. *Anim. Behav.* 34, 1483-1499.
- CHAUVIN R., 1950. Le transport des proies chez les fourmis. Y-a-t-il entr'aide? *Behaviour* 2, 275-303.
- CZECHOWSKI W., 1993a. Replacement of species in red wood ant colonies (Hymenoptera, Formicidae). *Ann. Zool.* 44, 17-26.
- CZECHOWSKI W., 1993b. Mixed colonies of red wood ants. *Ann. Zool.* 44: 28-41.
- CZECHOWSKI W., 1994. Queen recruitment in an orphaned colony of *Formica polyctena* Först. *Ann. Zool.* 45: 47-49.
- DALOZE D., BRAEKMAN J. C., PASTEELS J. M., 1986. A toxic dipeptide from the defense glands of the Colorado Beetle. *Science* 233, 211-223.
- DEJEAN A. 1990a. Circadian rhythm of *Oecophylla longinoda* in relation to territoriality and predatory behaviour. *Physiol. Entomol.* 15, 393-403.
- DEJEAN A. 1990b. Prey capture of the African Weaver Ant. [W:] *Applied myrmecology. A world perspective*. VANDERMEER R. K., JAFFE K. and CEDENO A. [red.], Boulder, Colorado, Westview Press, 472-481.
- DEJEAN A., 1991. Adaptation d'*Oecophylla longinoda* (Formicidae-Formicinae) aux variations spatio-temporelles de la densité de proies. *Entomophaga* 36, 29-54.
- DEJEAN A., LENOIR A., GODZIŃSKA, E. J., 1994. The hunting behaviour of *Polyrhachis laboriosa*, a non-dominant arboreal ant of the African equatorial forest (Hymenoptera: Formicidae, Formicinae). *Sociobiology* 23, 293-313.
- DEROE C., PASTEELS J. M., 1977. Defensive mechanism against predation in the Colorado beetle (*Leptinotarsa decemlineata* Say). *Arch. Biol.* 88, 289-304.
- DOBZAŃSKI J., 1971. Manipulatory learning in ants. *Acta Neurobiol. Exp.* 31, 111-140.
- DOBZAŃSKI J. and DOBRZAŃSKA J. 1982. Are the ants capable to learn the nest-building activity atypical to the species? (A study of *Formica cinerea* Mayr). *Acta Neurobiol. Exp.* 42, 369-378.
- DOMINEY W. J., 1984. Alternative mating tactics and evolutionarily stable strategies. *Am. Zool.* 24, 385-396.
- DOROSZEWSKI W. [red.], 1958. *Słownik Języka Polskiego*. Tom pierwszy: A-Ć. Warszawa, Państwowe Wydawnictwo Wiedza Powszechna, 1206 str.
- DOROW W. H. O., MASCHWITZ U. 1990. The Arachne-group of *Polyrhachis* (Formicidae, Formicinae): weaver ants cultivating Homoptera on bamboo. *Ins. Soc.* 37, 73-89.
- DOROW W. H. O., MASCHWITZ U., RAPP S., 1990. Behavioural ecology of *Polyrhachis* (*Myrmhopla*) *muelleri* Forel 1893 (Formicidae-Formicinae), a weaver ant with mimetic larvae and an unusual nesting behaviour. *Trop. Zool.* 3, 181-190.
- EBERHARD W. G., 1982. Beetle horn dimorphism: making the best of a bad lot. *Am. Nat.* 119, 420-426.
- FIELD S. A., KELLER M. A., 1993. Alternative mating tactics and female mimicry as post-copulatory mate-guarding behaviour in the parasitic wasp *Cotesia rubecula*. *Anim. Behav.* 46, 1183-1189.
- FINCKE O. M., 1985. Alternative mate-finding tactics in a non-territorial damselfly (Odonata: Coenagrionidae). *Anim. Behav.* 33, 1124-1137.
- FORSYTH A., ALCOCK J., 1990. Female mimicry and resource defense polygyny by males of a tropicalrove beetle, *Leistotrophus versicolor* (Coleoptera: Staphylinidae). *Behav. Ecol. Sociobiol.* 26, 325-330.

- FORSYTH A., MONTGOMERIE R. D., 1987. *Alternative reproductive tactics in the territorial damselfly Calopteryx maculata: sneaking by older males*. Behav. Ecol. Sociobiol. 21, 73-81.
- FREE J. B., 1958. *The drifting of honeybees*. J. Agric. Sci. 51, 294-306.
- FREE J. B., SPENCER-BOOTH Y., 1961. *Further experiments on the drifting of honey-bees*. J. Agric. Sci. 57, 153-158.
- GODZIŃSKA E. J., 1983. *Strategie przeszukiwania środowiska przez trzmiele rude, Bombus pascuorum Scopoli (Hymenoptera: Apidae) w sytuacji żerowania i ucieczki*. Praca doktorska. Warszawa, str. 204.
- GODZIŃSKA E. J., 1986. *Ant predation on Colorado Beetle (Leptinotarsa decemlineata Say)*. Z. angew. ent. 102, 1-10.
- GODZIŃSKA E. J., 1987. *Programming of behavioural sequences: evolutionary aspects*. [W:] LEONOVICHOVA V., NOVÁK V. J. A. [red.] *Behaviour as one of the main factors of evolution*. Praha, Czechoslovak Academy of Sciences, 157-172.
- GODZIŃSKA E. J., 1988. *Digging as tactic of escape in two bumblebee species with different nesting ecology: Bombus terrestris L. and B. pascuorum Scopoli*. Acta Neurobiol. Exp. 48, 251-258.
- GODZIŃSKA E. J., 1989a. *Extra-colony altruism in the bumblebees: misbehaviour or adaptation?* A. Coll. Ins. Soc. 5, 161-167.
- GODZIŃSKA E. J., 1989b. *New records of predation of the ant Formica polyctena Först. on adults of Colorado beetle (Leptinotarsa decemlineata Say) in Poland*. Pol. Pismo Entomol. 58, 831-833.
- GODZIŃSKA E. J., KIERUZEL M., KORCZYŃSKA J., 1990. *Predation of ants of the genus Formica L. (Hymenoptera, Formicidae) on Colorado Beetles, Leptinotarsa decemlineata Say (Coleoptera, Chrysomelidae)*. Memor. Zool. 44, 47-53.
- GODZIŃSKA E. J., 1991. *Neuroetologiczne modele uczenia się*. [W:] *Mechanizmy uczenia się i pamięci. VIII Szkoła Zimowa Instytutu Farmakologii PAN, Mogilany 1991*. KOSSUT M. [red.], Warszawa, IBD PAN, 67-77.
- GODZIŃSKA E. J., KORCZYŃSKA J., 1992a. *Biting behaviour as a tactic of escape in two bumblebee species with different nesting habits, Bombus terrestris L. and B. pascuorum Scopoli (Hymenoptera: Apidae)*. Acta Neurobiol. Exp. 52, 135-141.
- GODZIŃSKA E. J., 1992b. *Neuroetologiczne mechanizmy uczenia się i pamięci*. Problemy N 11, 9-14.
- GORDON D. M., 1991. *Behavioural flexibility and the foraging ecology of seed-eating ants*. Amer. Nat. 138, 379-411.
- GOULD J. L., 1982. *Ethology: the mechanisms and evolution of behaviour*. New York: Nortons, 1982, str. 544.
- GOULD J. L., MARLER P., 1984. *Ethology and the natural history of learning*. [W:] *The biology of learning*. Dahlem Konferenzen 1984. MARLER P., TERRACE H. S. [red.], Berlin, Springer-Verlag, 47-74.
- GOVE P. G. [red.], 1986. *Webster's Third New International Dictionary*. Vol. 1. A to C. Chicago, Merriam-Webster Inc., str. 1016.
- GREENFIELD M. D., SHELLY T. E., 1985. *Alternative mating strategies in a desert grasshopper: evidence of density-dependence*. Anim. Behav. 33, 1192-1210.
- HAMILTON W.D., 1963. *The evolution of altruistic behaviour*. Am. Nat. 97, 354-356.
- HAMILTON W.D., 1964. *The evolution of social behaviour*. J. Theor. Biol. 7, 1-52.
- HAMILTON W. D., 1987. *Kinship, recognition, disease, and intelligence: constraints of social evolution*. [W:] *Animal societies: theories and facts*. ITŌ Y., BROWN J. L., KIKKAWA J. [red.], Tokyo, Japan Sci. Soc. Press, 81-102.
- HINDE R. A., 1982. *Ethology. Its nature and relations with other sciences*. New York, Oxford University Press, 320 str.
- HÖLDOBLER B., 1979. *Territories of the African weaver ant (Oecophylla longinoda [Latreille]) . A field study*. Z. Tierpsychol. 51, 201-213.
- HÖLDOBLER B., WILSON E.O., 1978. *The multiple recruitment systems of the African weaver ant Oecophylla longinoda (Latreille) (Hymenoptera: Formicidae)*. Behav. Ecol. Sociobiol. 3, 19-60.
- HÖLDOBLER B., WILSON E.O., 1990. *The ants*. Berlin, Springer Verlag, 732 str.
- JAISSON P., 1985. *Social behavior*. [W:] *Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology*. KERKUT G. A., GILBERT L. I. [red.], Oxford, Pergamon Press, 673-694.
- KREBS J.R., DAVIES N.B., [red.]. 1984. *Behavioural ecology. An evolutionary approach*. 2nd ed. Blackwell Scientific Publications, Oxford, 493 str.
- LEDoux A., 1950. *Recherches sur la biologie de la fourmi fileuse (Oecophylla longinoda Latr.)*. Ann. Sci. Nat. 11 série, 12, 313-461.
- LENOIR A., DEJEAN A., 1994. *Semi-claustral colony foundation in the formicine ants of the genus Polyrhachis (Hymenoptera: Formicidae)*. Ins. Soc. 41, 225-234.

- MAYNARD SMITH J., PARKER G. A. 1976. *The logic of asymmetric contests*. Anim. Behav. 24, 159–175.
- McFARLAND D., 1981. *The Oxford Companion to Animal Behaviour*. Oxford, Oxford University Press, 619 str.
- OSTER G., WILSON E.O., 1978. *Caste and ecology in the social insects*. Princeton, Princeton Univ. Press, 352 str.
- PISARSKI B., CZECHOWSKI W., 1994. *Ways to reproductive success of wood ant queens*. Memor. Zool. 48, 181–186.
- SADOWSKI B., CHMURZYŃSKI J. A., 1989. *Biologiczne mechanizmy zachowania*. Warszawa, PWN, 613 str.
- SHELLY T. E., GREENFIELD M. D. 1985., *Alternative mating strategies in a desert grasshopper: a transitional analysis*. Anim. Behav. 33, 1211–1222.
- SUDD J. H., 1965. *The transport of prey by ants*. Behaviour 25, 234–271.
- SUNDSTRÖM L., 1993. *Foraging responses of Formica truncorum (Hymenoptera: Formicidae): exploiting stable vs spatially and temporally variable resources*. Ins. Soc. 40, 147–161.
- THORNHILL R., 1981. *Panorpa (Mecoptera: Panorpidae) scorpionflies: systems for understanding resource-defense polygyny and alternative male reproductive efforts*. Ann. Rev. Ecol. Syst. 12, 355–386.
- THORPE W. H., 1979. *The origins and rise of ethology*. London, Heinemann Educational Books, 174 str.
- TRANIELLO J. F. A., 1987. *Social and individual responses to environmental factors in ants. [W:] From individual to collective behaviour in social insects*. PASTEELS J. M., DENEUBOURG J. L. [Red.], Basel, Birkhäuser, 63–80.
- TRIVERS R. L., 1971. *The evolution of reciprocal altruism*. Q. Rev. Biol. 46, 35–57.
- VERLAINE L., 1925. *L'instinct et l'intelligence chez les hymenopteres. V. La traversée d'un labyrinthe par des guêpes et des bourdons (Vespa germanica Linn., V. crabro Linn., Bombus terrestris Linn., et B. sylvarum Linn.)*. Ann. Soc. Roy. Zool. Belg. 56, 33–98.
- WATSON J.T., RITZMANN R.E., 1994. *The escape response versus the quiescent response of the American cockroach: behavioural choice mediated by physiological state*. Anim. Behav. 48: 476–478.
- WAY M. J., 1954. *Studies of the life history and ecology of the ant Oecophylla longinoda Latreille*. Bull. Ent. Res. 45, 93–112.
- WAY M. J., KHOO K. C., 1992. *Role of ants in pest management*. Annu. Rev. Entomol. 37, 479–503.
- WEHNER R., 1992. *Arthropods. W: Animal homing*. PAPI F. [red.], London, Chapman and Hall, 1992, 45–143.
- WELLENSTEIN G., 1954. *Die Insektenjagd der Roten Waldameise (Formica rufa L.)*. Z. angew. ent. 36, 185–217.
- WOJTUSIAK J., GODZIŃSKA E. J., 1993. *Factors influencing the responses to nest damage in the African weaver ant, Oecophylla longinoda Latreille*. Acta Neurobiol. Exp. 53, 401–408.
- WOJTUSIAK J., GODZIŃSKA E. J., DEJEAN A. [w druku]. *Capture and retrieval of very large prey by workers of the African weaver ant, Oecophylla longinoda Latreille*. Trop. Zool. [w druku].
- WOLF L. L., WALTZ E. C., 1994. *Dominions and site-fixed aggressive behavior in breeding male Leucorrhinia intacta (Odonata: Libellulidae)*. Behav. Ecol. Sociobiol. 14, 107–115.

Piotr MIKOŁAJCZYK

Zakład Fizjologii Bezkręgowców Instytut Zoologii UW
Al. Żwirki i Wigury 93, 02-089 Warszawa

WPŁYW INHIBITORÓW SYNTEZY CHITYNY NA PRODUKCJĘ KUTIKULI
IN VITRO W DYSKACH IMAGINALNYCH SKRZYDEŁ LARW SPODOPTERA
FRUGIPERDA (J. E. SMITH) (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE)

KUTIKULA OWADÓW I JEJ POWSTAWANIE

Posiadanie lekkiego, lecz zarazem mocnego i odpornego szkieletu zewnętrznego jest jednym z zasadniczych elementów, które przyczyniły się do ewolucyjnego sukcesu owadów. Szkielet ten, nazywany integumentem, jest jednym z największych i najistotniejszych organów tworzących ciało owada, integralną strukturą składającą się z kutikuli i warstwy wydzielających ją komórek nabłonkowych. Kutikula nie tylko wyznacza kształt ciała osobnika i jest strukturalno-mechanicznym podłożem lokomocji dzięki znajdującym się na niej przyczepom licznych mięśni, lecz także, tworząc różne zewnętrzne struktury i przydatki, umożliwia odżywianie się, wzrost, rozród i komunikację z otoczeniem. Stanowi ona również skuteczną barierę ochronną przed urazami mechanicznymi, wysychaniem, czy też wnikaniem do wnętrza ciała różnorodnych patogenów i substancji toksycznych. Z nielicznymi wyjątkami (na przykład zakończenia chemoreceptorów, jelito środkowe) integument pokrywa całą powierzchnię zewnętrzną ciała, łącznie z jelitem przednim i tylnym oraz tchawkami.

Ze względu na swoją sztywność i niewielką rozciągliwość kutikula uniemożliwia stały, stopniowy wzrost organizmu. U stawonogów został on zastąpiony przez wzrost skokowy, w którym zwiększanie rozmiarów ciała jest związane z występowaniem co pewien określony czas zjawiska linienia, polegającego na zrzuceniu starej kutikuli. Umożliwia to kontynuację wzrostu w wytworzonej nowej, obszerniejszej kutikuli oraz rozwój osobnika do kolejnych stadiów larwalnych, a następnie wytworzenie poczwarki (u owadów o przeobrażeniu zupełnym) i postaci dorosłej. Procesy te znajdują się pod precyzyjną kontrolą hormonalną. Dwa podstawowe hormony regulujące morfogenezę i rozwój owadów, hormon juwenilny (JH) i 20-hydroksysekdyzon (20-OHE), decydują zarówno o czasie kolejnego linienia, jak też o programie rozwojowym realizowanym przez komórki nabłonkowe i, co za tym idzie, o typie odkładanej kutikuli (larwalnej, poczwarkowej, czy imaginalnej). Hormonem wyzwalającym procesy prowadzące do linienia jest 20-OHE, natomiast charakter tego linienia jest determinowany przez poziom JH w ustroju owada (CYMBOROWSKI 1984, TRUMAN 1985).

Stymulujące działanie 20-OHE na procesy morfogenetyczne w komórkach nabłonkowych wytwarzających kutikulę zostało udokumentowane w licznych badaniach *in vivo* oraz *in vitro*, z wykorzystaniem zarówno kultur tkankowych, jak i linii komórkowych (FRETZ i współaut. 1993, KATO i RIDDIFORD 1987, RIDDIFORD 1985, 1989, SPINDLER-BARTH i współaut. 1992). Badania te wykazały, że przy nieobecności JH w ustroju 20-OHE indukuje zmianę programu morfogenetycznego komórek nabłonkowych, wyrażającą się między innymi zanikiem „larwalnego” mRNA, odpowiedzialnego za syntezę białkowych elementów kutikuli larwalnej. Efektem działania 20-OHE jest też stymulacja podziałów mitotycznych w komórkach nabłonkowych i synteza typowej kutikuli poczwarkowej. Podanie JH przed lub w trakcie inkubacji nabłonka larwalnego z 20-OHE zapobiega uruchomieniu poczwarkowego programu komórek, które w dalszym ciągu syntetyzują kutikulę larwalną. Z drugiej jednak strony JH nie jest w stanie odwrócić lub zahamować realizacji poczwarkowego programu morfogenetycznego komórek nabłonkowych, jeśli został on już wcześniej zapoczątkowany przez 20-OHE.

Komórki nabłonkowe osiągnęły wysoki poziom specjalizacji w syntezie i wydzielaniu substancji składających się na kilkuwarstwową kutikulę. Ogólny plan budowy kutikuli jest dość stały, nie jest ona jednak bynajmniej strukturą statyczną i u owadów spotykamy dużą różnorodność typów występujących u różnych gatunków, stadiów rozwojowych, a nawet w różnych częściach ciała tego samego osobnika. Są to jednak tylko odmiany podstawowego wzoru. W zależności od przyjętego kryterium (obraz w mikroskopie świetlnym lub elektronowym, barwność w metodach histochemicznych, poszczególne etapy wydzielania itp.) wyróżnia się różną liczbę warstw kutikuli, nie ma też w pełni jednolitego systemu ich nazewnictwa i klasyfikacji.

W typowej kutikuli (HEPBURN 1985, LOCKE 1984) można, patrząc od zewnątrz do wewnątrz (co odpowiada kolejności odkładania), wyróżnić warstwę epikutikuli wraz z jej zewnętrzną otoczką zwaną kutikulina oraz warstwę prokutikuli (ryc. 6A). Epikutikula ma charakter głównie białkowo-lipidowy, z udziałem stabilizujących jej strukturę przestrzenną związków z grupy chinonów, nie zawiera chityny. W wielu przypadkach epikutikula jest pokryta warstwą wosków i tak zwaną warstwą cementową (ang. cement layer), złożoną prawdopodobnie ze spolimeryzowanych lipoprotein stabilizowanych polifenolami. Woski oraz warstwa cementowa są wydzielane przez specjalne pory w kutikuli po zakończeniu linienia, kiedy epikutikula i prokutikula są już uformowane.

Prokutikula stanowi wewnętrzną warstwę kutikuli, zbudowaną w głównej mierze z włókien białkowo-chitynowych. Włókna te powstają przypuszczalnie na końcach apikalnych wypustek (mikrokosmków) komórek nabłonkowych, gdzie dochodzi do łączenia się spolimeryzowanych łańcuchów chityny z towarzyszącymi im odpowiednimi białkami, wydzielanymi na drodze egzocytozy, oraz do przestrzennej orientacji nowo powstałych włókien.

W dalszym ciągu niewiele jest wiadomo o końcowych etapach syntezy chityny, jak również o mechanizmie powstawania włókien chitynowo-białkowych i o prawach rządzących ich ułożeniem w kolejno odkładanych warstwach. Cechą charakterystyczną prokutikuli jest jej tak zwana lamellarna struktura, widoczna w mikroskopie jako naprzemiennie występujące jasne i ciemne pasy

(ryc. 7B), lub też rzędy helikoidalnie zagiętych włókien. Według klasycznego modelu (BOULIGAND 1965) obraz taki jest prawdopodobnie artefaktem, optycznym efektem odłożenia pewnej liczby warstw prokutikuli. Obserwowany w mikroskopie „pasiasty” wzór jest wynikiem różnego kąta ułożenia łańcuchów chityny w poszczególnych warstwach prokutikuli w stosunku do płaszczyzny preparatu. U znacznej liczby gatunków pojedyncza lamella (obejmująca jeden jasny i jeden ciemny „prażek”) obrazuje ilość kutikuli odłożonej w warunkach naturalnych w czasie jednej doby (NEVILLE 1975, WIEDENMANN i współaut. 1986).

Chityna jest podstawowym strukturalnym składnikiem kutikuli, stanowiącym aż do 60% jej suchej masy (KRAMER i KOGA 1986, KRAMER i współaut. 1985). Pod względem chemicznym jest długołańcuchowym homopolimerem *N*-acetylo-D-glukozaminy (NAGA), w którym poszczególne reszty cukrowe są połączone wiązaniami β -1-4-glikozydowymi. Dobre własności mechaniczne oraz duża odporność na degradację czynią chitynę doskonałym materiałem na powłoki ciała i ich wytwory. Główne etapy syntezy chityny z glukozy to fosforylacja, aminacja, acetylacja i wytworzenie UDP-NAGA (bezpośredniego substratu polimeryzacji), katalizowane przez enzymy obecne w cytoplazmie. Polimeryzacja (z formalnego, chemicznego punktu widzenia jest to polikondensacja) reszt NAGA w łańcuchy chityny jest katalizowana przez syntetazę chityny (nazwa systematyczna: acetyloaminodeoksyglukozylotransferaza UDP-2-acetamido-2-deoksy-D-glukoza: chityna). Jest to enzym związany przypuszczalnie z błoną cytoplazmatyczną komórek nabłonkowych i występujący w formie kompleksu enzymatycznego jako element tak zwanych „płytek błonowych” (ang. plasma membrane plaques), gęstych elektronowo obszarów zlokalizowanych na szczytach mikrokosmków (COHEN 1987, LOCKE 1984, 1991). Na podstawie licznych badań ultrastrukturalnych i biochemicznych (włączanie znakowanych prekursorów) w układzie *in vivo* i *in vitro* wiadomo, że synteza chityny jest nieodłącznym przejawem aktywności komórek nabłonkowych stymulowanych przez 20-OHE (COHEN 1987, RETNAKRAN i OBERLANDER 1993).

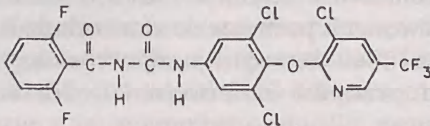
INHIBITORY BIOSYNTETY CHITYNY SZANSĄ W NOWOCZESNYCH METODACH ZWALCZANIA SZKODNIKÓW OWADZICH

Ze względu na fakt, że chityna nie występuje u roślin i zwierząt kręgowych, stała się ona przedmiotem żywego zainteresowania przy wypracowywaniu nowych technik zwalczania szkodników i pasożytów, zarówno reprezentantów typu stawonogów, jak również nicieni (chityna jest składnikiem ich otoczek jajowych) i grzybów (SPINDLER i współaut. 1990). W obecnej dobie rozwoju „przyjaznych dla środowiska” metod walki biologicznej i rosnącej świadomości ekologicznej, nie do pogardzenia jest możliwość skutecznego zakłócenia syntezy chityny i odkładania kutikuli, procesów specyficznych dla dość wąskiej grupy organizmów, bez ryzyka toksycznego wpływu na człowieka, rośliny uprawne czy zwierzęta użytkowe. Podejście to zaowocowało wyprodukowaniem i badaniami nad zastosowaniem całej gamy związków chemicznych i substancji mających zadanie zaburzenia struktury i procesów tworzenia kutikuli zarówno na drodze mechanicznej, jak i na drodze biochemiczno-fizjologicznej (CHEN i MAYER 1985, COHEN 1987,

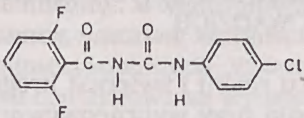
MAYER i współaut. 1990, SPINDLER i współaut. 1990). Wśród różnych klas związków zakłócających syntezę chityny na szczególną uwagę zasługują pochodne benzoilofenyloczynnika (COHEN 1987, ISHAAYA 1990, WRIGHT i RETNAKARAN 1987). Związki z tej grupy (w skrócie BPU, od ang. benzoylphenyl ureas) są selektywnymi insektycydami wprowadzanymi do organizmu głównie drogą trawienną. Skutkiem ich działania na larwy i poczwarki owadów jest zaburzenie odkładania warstwy prokutikuli i w efekcie utrata elastyczności i odporności integumentu oraz nienormalny, letalny przebieg najbliższego linienia (GROSSCURT i ANDERSON 1980, WRIGHT i RETNAKARAN 1987). Wywierają one także szkodliwy wpływ na jaja uniemożliwiając wylęganie się larw, najprawdopodobniej poprzez zaburzenie produkcji kutikuli przez rozwijające się zarodki (ASCHER i współaut. 1987). Poszukiwania nowych związków tej klasy doprowadziło do wytworzenia między innymi teflubenzuronu (TFB) i chlorfluazuronu (CFA), znacznie skuteczniejszych w zwalczaniu szkodników owadów w warunkach *in vivo* w porównaniu z najszerzej stosowanym i najlepiej zbadanym diflubenzuronem (DFB) (ISHAAYA 1990, ISHAAYA i współaut. 1987, ryc. 1).

Badania histochemiczne i ultrastrukturalne nad wpływem inhibitorów syntezy chityny na integument owadów były prowadzone głównie w układzie *in vivo*. Wykazano w nich, że BPU obecne w organizmie zwierzęcia powodują głębokie zmiany w morfologii i architekturze integumentu, będące najwyraźniej konsekwencją braku przestrzennego strukturalnego „szkieletu”, tworzonego przez odpowiednio uformowaną sieć włókien białkowo-chitynowych (BINNINGTON 1985). Obserwowano brak charakterystycznej, lamellarnej struktury prokutikuli (RETNAKARAN i współaut. 1989, SOLTANI i współaut. 1984), czy wręcz niekiedy jej całkowity zanik i występowanie w tym rejonie nieregularnych depozytów tworzonych przez same białka kutikularne (SOLTANI i współaut. 1984). Oprócz zmian w kutikuli stwierdzono także zaburzenia w strukturze i funkcjonowaniu komórek nabłonkowych integumentu, takich jak aktywność mitotyczna i synteza DNA (MEOLA i MAYER 1980, SOLTANI i współaut. 1984), czy też akumulacja w tych komórkach znacznej liczby pęcherzyków wydzielniczych i zanik mikrokosmków (PERCY-CUNNINGHAM i współaut. 1987, RETNAKARAN i współaut. 1989). W skrajnych przypadkach DFB uniemożliwiał wykształcenie się warstwy imaginalnego nabłonka u poczwarki muchy *Stomoxys calcitrans* poprzez zahamowanie proliferacji komórek nabłonkowych (MEOLA i MAYER

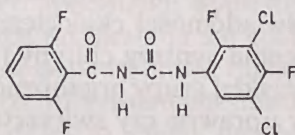
1) Chlorfluazuron (CFA)



2) Diflubenzuron (DFB)



3) Teflubenzuron (TFB)



Ryc. 1. Wzory strukturalne trzech pochodnych benzoilofenyloczynnika, inhibitorów biosyntezy chityny.

1980). W nielicznych badaniach prowadzonych w układzie *in vitro* (MAYER i współaut. 1980, SOLTANI i współaut. 1987) także wykazano wpływ BPU na strukturę kutikuli i proces jej odkładania. SOLTANI i współpracownicy (1987) stwierdzili na przykład, że DFB, w zależności od zastosowanej dawki, wywołuje cały szereg ujemnych efektów w preparatach poczwarkowego integumentu chrząszcza *Tenebrio molitor*, od zakłócenia ogólnej architektury kutikuli i zmniejszenia jej grubości, aż do wręcz całkowitego zahamowania jej wydzielania.

Mimo licznych badań mechanizm działania tych związków pozostaje wciąż nieznan (ISHAAYA 1990, MAYER i współaut. 1990, WRIGHT i RETNAKARAN 1987). W przeciwieństwie do niektórych antybiotyków nukleozydo-peptydowych (nikkomycyna, polioksyna D), które są współzawodniczymi inhibitorami syntezy chityny, BPU nie są w stanie zablokować aktywności tego enzymu w układzie bezkomórkowym (MAYER i współaut. 1990). Wyszukiwano kilka innych hipotez dotyczących mechanizmu działania BPU:

1. Zwiększenie aktywności chitynazy, enzymu degradującego chitynę (ISHAAYA i CASSIDA 1974);

2. Zakłócenie metabolizmu 20-OHE, co prowadzi do zaburzenia ogólnej równowagi hormonalnej w ustroju i, w konsekwencji, funkcjonowania komórek nabłonkowych (YU i TERRIERE 1977, WRIGHT i RETNAKARAN 1987);

3. Zablokowanie proteolitycznej aktywacji zymogenu syntezy chityny, uniemożliwiająca przekształcenie go w aktywną transferazę (LEIGHTON i współaut. 1981);

4. Hamowanie lub zaburzenie ogólnych procesów transportu komórkowego i błonowego, w szczególności transportu prekursorów chityny (MAYER i współaut. 1988, MITSUI 1988, RETNAKARAN i współaut. 1989).

Poparciem dla tej ostatniej hipotezy jest fakt, że wpływ podanych inhibitorów ujawnia się bardzo szybko. Na jej rzecz świadczą także wspomniane wyżej wyniki eksperymentów, w których DFB hamował syntezę DNA w komórkach, prawdopodobnie poprzez blokowanie transportu nukleozydów (DELOACH i współaut. 1981, KLITSCHKA i współaut. 1986). Stwierdzono także hamujący wpływ DFB na aktywność cAMP-zależnych kinaz białkowych (ISHII i MATSUMURA 1992).

TKANKI OWADZIE HODOWANE *IN VITRO* JAKO DOGODNY UKŁAD DOŚWIADCZALNY

Doskonałe możliwości badania procesów syntezy chityny i tworzenia kutikuli oraz ich hormonalnej regulacji i wpływu inhibitorów uzyskano dzięki rozwojowi i udoskonaleniu metod hodowli tkanek i komórek w warunkach *in vitro* (OBERLANDER 1980, OBERLANDER i LYNN 1982). Tkanki owadzie, takie jak fragmenty integumentu czy jelita środkowego, a w szczególności dyski imaginalne, stanowią wspólny układ doświadczalny, który łatwo poddaje się chirurgicznym i hormonalnym manipulacjom, niezależny od wpływu ogromnej liczby procesów i efektów maskujących istniejących w przypadku doświadczeń prowadzonych na całym organizmie zwierzęcia (OBERLANDER 1985, Yund 1989).

Dyski imaginalne są zawiązkami narządów owada dorosłego, złożonymi w głównej mierze z komórek nabłonkowych. Komórki te pozostają nieodróżnico-

wane w ciele larw owadów o przeobrażeniu zupełnym, aktywnie się dzieląc przez cały okres larwalnego rozwoju. W momencie rozpoczęcia procesów metamorfozy sygnały hormonalne stymulują morfogenezę i przeobrażenie się dysków imaginalnych w odnóża, skrzydła, czułki, oczy, czy też przydatki gębowe i płciowe.

W licznych badaniach dobrze udokumentowano zdolność dysków imaginalnych do reagowania na 20-OHE poprzez rozwój morfologiczny, syntezę RNA i odpowiednich białek, a także syntezę chityny i tworzenie kutikuli poczwarkowej (FRISTROM 1981, OBERLANDER i LYNN 1982, OBERLANDER 1985, Yund 1989). FERKOVICH i współpracownicy (1980) wykazali, że dyski imaginalne skrzydeł motyla nocnego *Plodia interpunctella* reagują na obecność 20-OHE zwiększonym wbudowywaniem znakowanego prekursora chityny, [^{14}C]NAGA. W dalszych badaniach okazało się, że synteza chityny stymulowana przez 20-OHE wymaga niezakłóconej syntezy białek i dobrze rozwiniętego cytoszkieletu, gdyż stosowanie odpowiednich inhibitorów powodowało w następstwie również upośledzenie tworzenia chityny (OBERLANDER i współaut. 1980, 1983). Również linie komórkowe otrzymane z niezróżnicowanych dysków imaginalnych *Lepidoptera* pobierają i akumulują cząsteczki prekursorów chityny pod wpływem 20-OHE, obserwowano także wzmoczoną syntezę i wydzielanie przez te komórki glikopeptydu zawierającego liczne reszty NAGA (PORCHERON i współaut. 1988, 1991). Niestety, syntezę samej chityny udało się dotychczas potwierdzić jedynie w liniach komórkowych muchówek i karaczanów (DINAN i współaut. 1990, LONDERSHAUSEN i współaut. 1988).

HAMOWANIE SYNTEZY CHITYNY W DISKACH IMAGINALNYCH SKRZYDEŁ *SPODOPTERA FRUGIPERDA*

Dyski imaginalne skrzydeł motyli okazały się bardzo dogodnym obiektem w doświadczeniach *in vitro* z zastosowaniem inhibitorów syntezy chityny. W badaniach przeprowadzonych na dyskach imaginalnych skrzydeł *Plodia interpunctella* OBERLANDER i współpracownicy (1991) stwierdzili, że DFB i TFB hamują syntezę chityny mierzoną wbudowywaniem radioaktywnego prekursora, [^{14}C]NAGA, lecz nie mają wpływu na jego pobieranie przez komórki nabłonkowe. Autorzy wyciągnęli na tej podstawie wniosek, że w zastosowanym układzie mechanizm działania badanych inhibitorów nie polega na blokowaniu pobierania i transportu prekursora chityny do komórek.

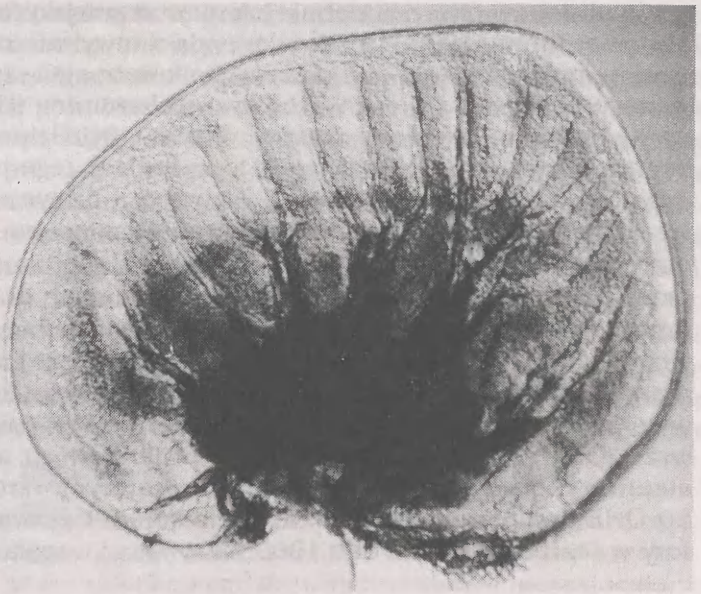
Aby sprawdzić, czy wyniki uzyskane w poprzednich doświadczeniach na *P. interpunctella*, ważnym szkodniku magazynowym należącym do rodziny omacnicowatych (*Pyralidae*), znajdują potwierdzenie u gatunku należącego do innej rodziny, w opisanych niżej doświadczeniach użyto dysków imaginalnych skrzydeł larw *Spodoptera frugiperda* (ryc. 2), motyla nocnego z rodziny sówkowatych (*Noctuidae*).

Motyle z rodzaju *Spodoptera* także należą do niezwykle ważnych z ekonomicznego punktu widzenia szkodników różnorodnych upraw, powodujących w rejonach o ciepłym klimacie (np. Bliski Wschód czy południowo-wschodnie obszary USA) znaczne straty zagrażające nie tylko produkcji roślinnej, ale

i zwierzęcej. W USA, w rejonach ich występowania, uznano je za jeden z istotnych czynników ograniczających produkcję paszy dla bydła.

Przeprowadzenie doświadczeń w układzie *in vitro* wymaga niejednokrotnie dość dużych ilości materiału biologicznego, co ułatwia śledzenie badanych procesów. Dyski imaginalne skrzydeł *S. frugiperda* są kilkakrotnie większe niż ich odpowiedniki pochodzące z larw *P. interpunctella*. Umożliwiło to użycie mniejszej liczby dysków inkubowanych w każdej próbie (pięć zamiast dwudziestu) przy porównywalnej ilości tkanki. Przyspieszyło to i bardzo ułatwiło operacje mikrochirurgiczne (wycinanie dysków imaginalnych) i wszelkie manipulacje, na przykład przy sporządzaniu preparatów mikroskopowych, oraz pozwoliło na zwiększenie liczby prób w danym doświadczeniu.

Wypracowanie skutecznych, a zarazem jak najmniej szkodliwych dla środowiska metod walki z gatunkami z rodzaju *Spodoptera* jest niezwykle pilnym i ważnym wyzwaniem stojącym przed entomologami. Jak wspomniano wcześniej, pochodne benzoilfenylomocznika (BPU) wydają się spełniać te warunki. Podstawowym zatem celem przeprowadzonych badań było określenie wpływu trzech spośród tych związków na dynamikę syntezy chityny w układzie *in vitro*, w dyskach imaginalnych skrzydeł *S. frugiperda* zastymulowanych przez 20-OHE. Chciano porównać dynamikę inhibicji i skuteczność najszerszej stosowanego i najlepiej poznanego diflubenzuronu (DFB) z później wprowadzonymi związkami z tej grupy: teflubenzuronem (TFB), a szczególnie chlorfluazuronem (CFA). Ponadto, przy użyciu metod histochemicznych i mikroskopowych, zamierzano określić wpływ CFA na ultrastrukturę i proces wydzielania przez dyski imaginalne kutikuli poczwarkowej pod wpływem 20-OHE.



Ryc. 2. Dysk imaginalny skrzydła pierwszej pary, pochodzący z larwy ostatniego stadium *Spodoptera frugiperda*, przed zapoczątkowaniem procesów metamorfozy. Szerokość dysku imaginalnego w tym stadium wynosi około 0,6 mm.

Dyski imaginalne mają postać kieszeniowatego fałdu podwójnej warstwy nabłonka. Fałd wewnętrzny przekształca się w procesie morfogenezy we właściwą strukturę skrzydła. Otoczony jest warstwą zewnętrzną, tak zwaną błoną peripodialną (widoczna na zdjęciu w postaci cienkiej otoczki wokół krawędzi dysku), która w trakcie morfogenezy skrzydła oddziela się i zsuwa z fałdu wewnętrznego. Ciemny obszar widoczny u podstawy dysku imaginalnego to zbita masa drobnych tchawek, które, pod wpływem 20-OHE wyzwalającego procesy metamorfozy, wydłużają się, rozgałęziają i „migrują” w głąb wewnętrznej „kieszeni” dysku imaginalnego.

W niniejszej pracy, podobnie jak we wcześniejszych badaniach OBERLANDERA i współautorów (1983, 1991), jako podstawowy miernik intensywności syntezy chityny przez komórki nabłonkowe dysków imaginalnych przyjęto ilość znakowanego prekursora, [^{14}C]N-acetylo-D-glukozaminy ([^{14}C]NAGA), włączonego w nowo tworzone łańcuchy chityny w ciągu 4-godzinnej inkubacji. Równolegle badano intensywność pobierania i akumulacji tego prekursora w tkance jako drugiego, uzupełniającego elementu procesu biosyntezy chityny. W badaniach histochemicznych i ultrastrukturalnych z zastosowaniem mikroskopu elektronowego skoncentrowano się na strukturze i stopniu rozwoju kutikuli odkładanej przez komórki nabłonkowe dysków imaginalnych oraz na ultrastrukturze samych komórek. Ponadto, stosując lektynę (aglutyninę z zarodków pszenicy, ang. wheat germ agglutinin, w skrócie WGA) specyficzną względem chityny i jej monomerów (LEATHEM i ATKINS 1983) wyznakowaną z użyciem koloidalnego złota, wykrywano obecność chityny w warstwie prokutikuli. Dyski imaginalne pierwszej pary skrzydeł wycinano ze śródtułowiowego segmentu larw ostatniego stadium *S. frugiperda* w okresie poprzedzającym wzrost poziomu endogennego 20-OHE, występujący w połowie tego stadium i wyzwalający program metamorfozy w tkankach (RIDDIFORD 1985; ZIMOWSKA i współaut. 1985).

BIOCHEMICZNE BLOKOWANIE SYNTEZY CHITYNY

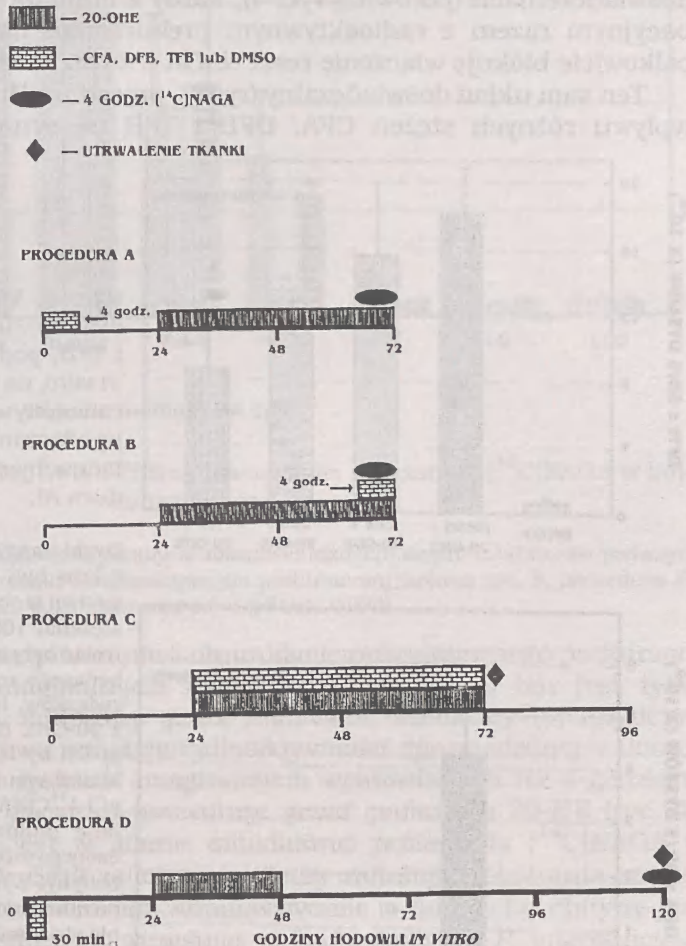
Przetestowanie całego szeregu kombinacji czasów inkubacji i dawek 20-OHE wykazało, że pierwszy znaczący wzrost syntezy chityny występuje przy 16-godzinnej ekspozycji na ten hormon (MIKOŁAJCZYK i współaut. 1994), co jest zgodne z wcześniejszymi danymi uzyskanymi w przypadku *P. interpunctella* (FERKOVICH i współaut. 1980). Układem doświadczalnym, dającym maksymalną intensywność zarówno pobierania [^{14}C]NAGA, jak i jej wbudowywania w chitynę, jest inkubacja dysków imaginalnych przez 48 godzin z 20-OHE w stężeniu 2 μM . W przypadku dysków imaginalnych *S. frugiperda* reakcja na działanie 20-OHE jest znacznie lepsza w porównaniu z efektem 24-godzinnej stymulacji hormonalnej, stosowanej wcześniej w przypadku *P. interpunctella* (OBERLANDER i współaut. 1991), mimo zastosowania jedynie pięciu dysków. Odpowiedź ta jest bardzo stabilna i wzmoczona synteza chityny utrzymuje się przez co najmniej 48 godzin po zakończeniu inkubacji z 20-OHE. Ponadto, zgodnie z wynikami poprzednich prac (FERKOVICH i współaut. 1980), do zainicjowania i utrzymania syntezy chityny niepotrzebne jest usunięcie 20-OHE z płynu inkubacyjnego, konieczne według niektórych autorów (DUTKOWSKI i współaut. 1977, FRISTROM i współaut. 1991) do wydzielenia kutikuli charakteryzującej się normalną, dobrze wykształconą strukturą. Wręcz przeciwnie, w innych seriach doświadczeń wykazano, że przerwanie ciągłej ekspozycji tkanki na 20-OHE przez odpowiedni czas powoduje znaczny spadek syntezy chityny (MIKOŁAJCZYK i współaut. 1995).

Porównując w tym samym wariantcie doświadczalnym radioaktywność prekursora pobranego i zgromadzonego w tkance dysków imaginalnych z radioaktywnością włączoną w tym samym czasie w łańcuchy chitynowe okazuje się, że w większości przypadków zaledwie około 12%–25% całkowitej ilości prekursora obecnego w tkance znajduje się ostatecznie w nowo syntetyzowanej chitynie (MIKOŁAJCZYK i współaut. 1994). Może to świadczyć o tym, że komórki nabłon-

kowe szybko akumulują pokaźną ilość prekursora, którego pula jest wykorzystywana stopniowo do syntezy chityny. Nie można także wykluczyć (mimo dokładnego płukania tkanki po inkubacji z prekursorem) udziału cząsteczek NAGA obecnych w tkance poza komórkami nabłonkowymi. Charakterystyczne jest także to, że pobieranie [^{14}C]NAGA jest stymulowane przez znacznie szerszy zakres stężeń 20-OHE, niż jej włączanie w łańcuchy chityny (MIKOŁAJCZYK i współaut. 1994). Być może końcowe etapy syntezy chityny: wydzielanie cząsteczek prekursora przez komórki nabłonkowe i ich polimeryzacja, podlegają bardziej precyzyjnej regulacji hormonalnej niż procesy transportu i akumulacji NAGA w komórkach.

Wypracowany w pierwszej fazie badań układ doświadczalny stosowano następnie we wszystkich biochemicznych eksperymentach z użyciem inhibitorów (schematy procedur doświadczalnych są przedstawione na ryc. 3). Podobnie jak w pierwszym etapie, punktem wyjścia były tu eksperymenty przeprowadzone wcześniej na *P. interpunctella* (OBERLANDER i współaut. 1991). W doświadczeniach na

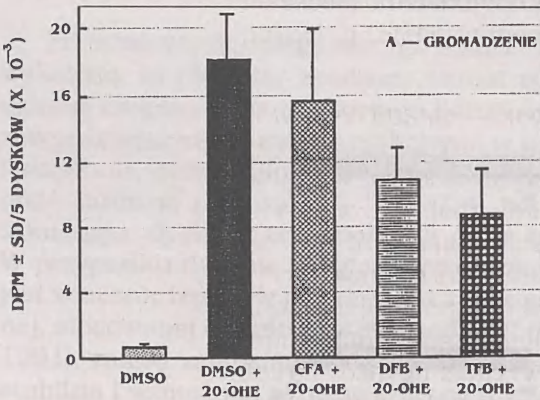
dyskach imaginalnych *S. frugiperda* również stwierdzono hamujące działanie wysokich dawek DFB i TFB, a także CFA na włączanie [^{14}C]NAGA. W obecnych badaniach (MIKOŁAJCZYK i współaut. 1994) posunięto się jednak znacznie dalej w określeniu dynamiki i mechanizmu tej inhibicji. Stwierdzono, że efekt ten jest taki sam w odniesieniu do wszystkich trzech testowanych związków i nie zależy od czasu ich podania. Inkubacja dysków imaginalnych z inhibitorem przed, w trakcie, czy po ekspozycji na 20-OHE jest równie skuteczna, powodując 94%-96% redukcję ilości wbudowanego radioaktywnego prekursora Ryc. 3. Schematyczne przedstawienie procedur doświadczalnych stosowanych w poszczególnych etapach badań.



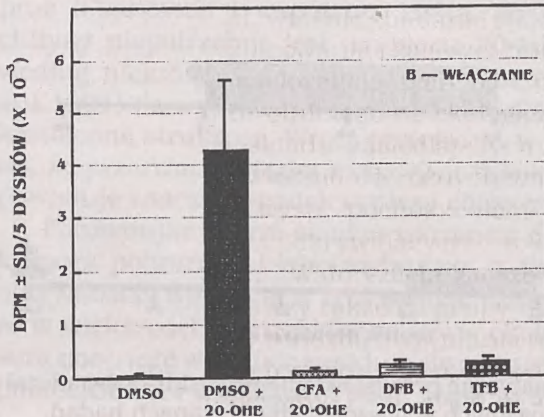
mi kontrolnymi. W kolejnych doświadczeniach (ryc. 4) okazało się, że już 4-godzinna ekspozycja tkanki na DFB, TFB lub CFA jest wystarczająca do zablokowania syntezy chityny, i to nawet w sytuacji, kiedy związki te są podawane tuż po wycięciu dysków imaginalnych i umieszczeniu ich w płynie inkubacyjnym (ryc. 3, procedura A), czyli jeszcze przed podaniem 20-OHE i morfogenetyczną indukcją komórek nabłonkowych do produkcji kutikuli. W przypadku CFA czas ten został jeszcze bardziej skrócony i stwierdzono, że nawet 15-minutowe działanie inhibitora jest zdolne zahamować w 89% syntezę chityny zastymulowaną dopiero później przez podanie 20-OHE i mierzoną po 72 godzinach.

Badane związki okazały się równie skuteczne w hamowaniu już zainicjowanej i zachodzącej z dużą intensywnością syntezy chityny, to jest w momencie podania ich pod koniec optymalnej, 48-godzinnej ekspozycji na 20-OHE, jednocześnie z [14 C]NAGA (ryc. 3, procedura B). Niemal identycznie jak w poprzednich doświadczeniach (porównaj ryc. 4), każdy z inhibitorów obecny w płynie inkubacyjnym razem z radioaktywnym prekursorem niezwykle szybko i niemal całkowicie blokuje włączenie reszt NAGA w tworzone łańcuchy chityny.

Ten sam układ doświadczalny (ryc. 3, procedura B) zastosowano do zbadania wpływu różnych stężeń CFA, DFB i TFB na syntezę chityny (MIKOŁAJCZYK

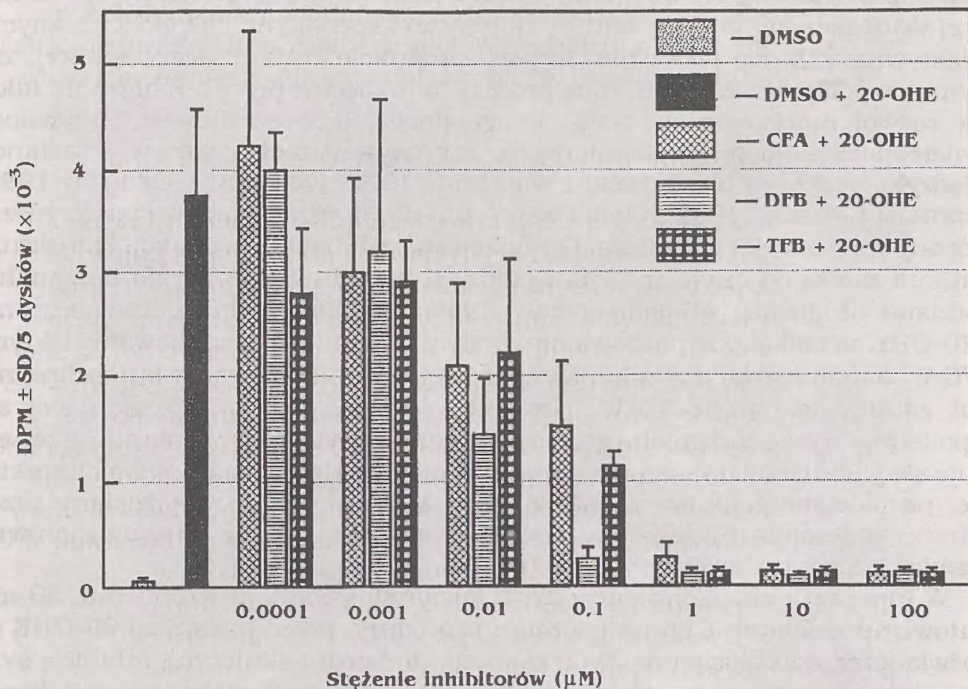


Ryc. 4. Wpływ 4-godzinnej inkubacji dysków imaginalnych z CFA, DFB i TFB, podanymi na początku hodowli *in vitro*, na pobieranie i gromadzenie [A] radioaktywnej NAGA przez tkankę lub jej włączenie [B] w nowo syntetyzowane łańcuchy chityny (zobacz ryc. 3, procedura A).



Dyski imaginalne bezpośrednio po wycięciu z larw były umieszczane w płynie inkubacyjnym w obecności jednego z inhibitorów (w stężeniu 100 μ M) na 4 godziny. Dyski kontrolne były inkubowane w obecności DMSO, będącego rozpuszczalnikiem dla badanych związków. Inkubacja dysków imaginalnych z 20-OHE (2 μ M) rozpoczęła się 24 godziny po ich wycięciu i trwała przez 48 godzin. Pod koniec inkubacji z hormonem dodawano 0.5 μ Ci [14 C]NAGA i po 4 godzinach mierzono ilość radioaktywnego prekursora zgromadzonego w tkance lub włączonego w łańcuchy chityny. Wyniki przedstawiono w rozpadach na minutę (dpm) wraz z wartościami odchylenia standardowego (co najmniej 5 powtórzeń) na pięć dysków imaginalnych inkubowanych razem w każdej próbie. (z: MIKOŁAJCZYK i wespółaut. 1994).

i współaut. 1994). Stwierdzono, że w układzie *in vitro* wszystkie trzy inhibitory hamują włączanie [^{14}C]NAGA w podobny, zależny od dawki sposób (ryc. 5). Niezgodne jest to z wynikami uzyskanymi w warunkach *in vivo* (ISHAAYA 1990, ISHAAYA i współaut. 1987), w świetle których CFA i TFB są znacznie skuteczniejsze od DFB dzięki dłuższemu utrzymywaniu się w organizmie owada i większej odporności na fizjologiczne procesy detoksyfikacyjne.



Ryc. 5. Wpływ stężenia CFA, DFB i TFB na hamowanie włączania [^{14}C]NAGA w łańcuchy chityny.

Dyski imaginalne inkubowano przez 4 godziny w obecności różnych stężeń inhibitorów podanych pod koniec procedury, jednocześnie z radioaktywnym prekursorem (zobacz ryc. 3, procedura B). Pozostałe objaśnienia jak w ryc. 4. (z: MIKOŁAJCZYK i współaut. 1994).

Badając wpływ BPU na pobieranie i akumulację radioaktywnego prekursora przez tkankę dysków imaginalnych stwierdzono, że proces ten jest tylko w ograniczonym stopniu zakłócany przez testowane inhibitory (MIKOŁAJCZYK i współaut. 1994). Częściową redukcję radioaktywności zgromadzonej w tkance obserwuje się jedynie w dyskach imaginalnych wystawionych na 4-godzinne działanie DFB i TFB na początku procedury, przed podaniem 20-OHE (ryc. 4). Żaden ze związków nie jest w stanie zablokować pobierania [^{14}C]NAGA w pozostałych przypadkach. Brak zależności między redukcją pobierania cząsteczek prekursora i hamowaniem ich wbudowywania w łańcuchy chityny jest zgodny z wynikami uzyskanymi wcześniej w badaniach na *P. interpuncteua* (OBERLANDER i współaut. 1991) i sugeruje, że w zastosowanym układzie *in vitro* mechanizm blokowania syntezy chityny przez BPU nie może polegać na zabu-

rzeniu pobierania i transportu cząsteczek prekursora z płynu inkubacyjnego do komórek docelowych.

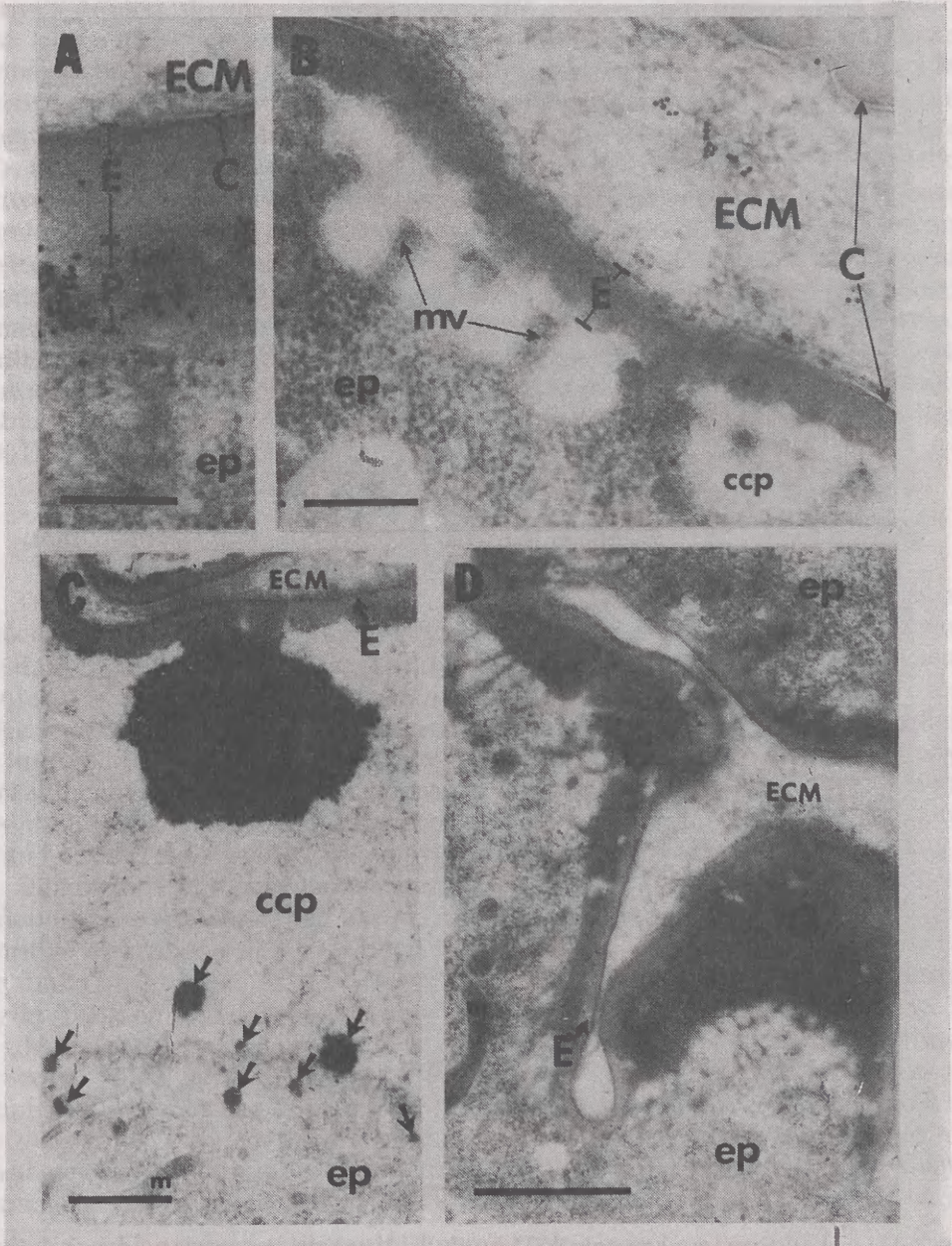
ZMIANY HISTOCHEMICZNO-ULTRASTRUKTURALNE POD WPLYWEM CFA

Doświadczenia histochemiczno-ultrastrukturalne, stanowiące następny etap badań (ZIMOWSKA i współaut. 1994) wykazały, że CFA (w dawce zapewniającej skuteczne hamowanie syntezy chityny w eksperymentach biochemicznych) selektywnie zaburza tworzenie chityny i produkcję kutikuli poczwarkowej, zastymulowane przez 20-OHE. Inne procesy indukowane przez ten hormon, takie jak rozwój morfologiczny dysku imaginalnego, jego ewaginacja, aktywność wydzielnicza komórek nabłonkowych, czy zmiany zachodzące w substancji międzykomórkowej (DUTKOWSKI i współaut. 1977, FRISTROM i LIEBRICH 1986, FRISTROM i RICKOLL 1982, NARDI i współaut. 1985), przebiegają w sposób niezakłócony w obecności inhibitora. Obserwowane zaburzenia produkcji i struktury kutikuli zależą od czasu trwania ekspozycji tkanki na CFA. Dyski imaginalne poddane długiemu, 48-godzinnemu działaniu CFA podanego równocześnie z 20-OHE są całkowicie pozbawione warstwy prokutikuli wyznakowanej lektyną (WGA), natomiast odkładanie niechitynowej epikutikuli wraz z kutikulina nie jest zaburzone (ryc. 6B). W pewnych rejonach kutikuli, znajdującej się u podstawy dysku imaginalnego, zamiast normalnej warstwy prokutikuli obserwuje się globularne depozyty materiału o prawdopodobnie białkowym charakterze, pozbawione znakowania przez WGA. Materiał ten jest wydzielany przez warstwę nabłonka i odkładany pod warstwą epikutikuli w postaci nierówno rozmieszczonych skupisk (ryc. 6C, 6D, 7A).

W innej serii eksperymentów dyski imaginalne poddano krótkiemu, 30-minutowemu działaniu CFA na początku procedury, przed podaniem 20-OHE (w doświadczeniach biochemicznych zapewnia to bardzo skuteczną inhibicję syntezy chityny). W tych warunkach, w przeciwieństwie do długiej ekspozycji tkanki na CFA, obserwuje się regularną warstwę utworzonej prokutikuli, która jednak wciąż jest pozbawiona swojej charakterystycznej lamellarnej struktury (ryc. 7B) i nie zawiera znakowania WGA, z wyjątkiem cienkiej warstwy tuż nad nabłonkiem (ryc. 7C, 7D). Znakowanie to nie jest jednak, jak się okazuje, objawem przywrócenia normalnego funkcjonowania tkanki po działaniu inhibitora i świadczy jedynie o obecności niespolimeryzowanej NAGA, gdyż przeprowadzenie biochemicznego testu w takim samym układzie doświadczalnym wykazuje w tym czasie całkowity brak syntezy chityny.

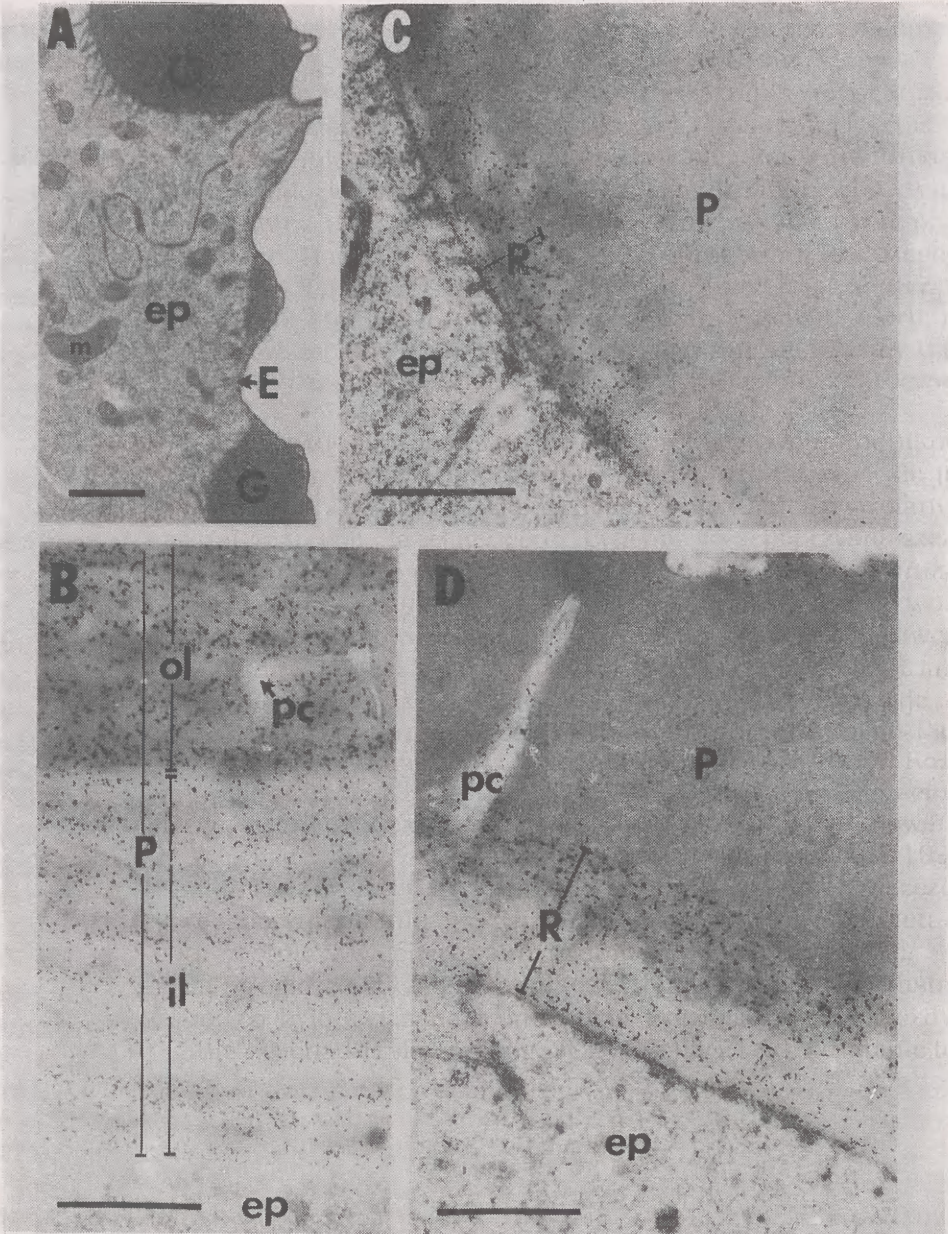
Powyższe wyniki uzyskane w układzie *in vitro* są zgodne z opisem efektów działania BPU obserwowanych w wyżej wspomnianych badaniach ultrastrukturalnych

epikutikuli wraz z kutikulina (C) nie jest zakłócone przez ten inhibitor. [C, D]. W niektórych rejonach kutikuli dysku imaginalnego inkubowanego w obecności CFA obserwuje się drobne skupiska gęsto elektronowo materiału (strzałki) o prawdopodobnie białkowym charakterze, wydzielanego przez komórki nabłonkowe (ep). Skupiska te łączą się w duże masy (G) materiału pozbawionego znakowania WGA, nierównomiernie odkładanego tuż pod warstwą epikutikuli (E). Substancja międzykomórkowa wypełniająca przestrzenie między nabłonkiem a kutikulą oraz pomiędzy warstwami kutikuli wydzielanymi przez sąsiednie warstwy nabłonka została oznaczona odpowiednio jako ccp i ECM. m = mitochondrium, mv = mikrokosmki. Skala: odcinki [A] i [B] = 0,25 μm , odcinki [C] i [D] = 1,0 μm (z: ZIMOWSKA i współaut. 1994).



Ryc. 6. Ultrastruktura i znakowanie lektyną (WGA) kutikuli wydzielanej przez dyski imaginalne inkubowane przez 48 godzin jednocześnie z CFA ($10 \mu\text{M}$) i 20-OHE ($2 \mu\text{M}$) [B, C, D], oraz przez dyski kontrolne, inkubowane w obecności DMSO [A], zgodnie z procedurą C (ryc. 3).

[A], w dyskach kontrolnych WGA dobrze wiąże się w warstwie prokutikuli (P) zawierającej chitynę, podczas gdy pozbawiona chityny epikutikula (E) jest pozbawiona znakowania WGA. [B], Dyski imaginalne poddane działaniu CFA są zupełnie pozbawione prokutikuli, natomiast odkładanie



Ryc. 7. Ultrastruktura i znakowanie WGA kutikuli [A] wydzielanej przez nabłonek dysków imaginalnych inkubowanych jednocześnie z CFA i 20-OHE przez 48 godzin (ryc. 3, procedura C, porównaj też ryc. 6), w porównaniu z kutikulą [C, D] wytworzoną przez dyski imaginalne poddane krótkiemu, 30-minutowemu działaniu CFA ($10 \mu\text{M}$), a następnie 24-godzinne działaniu 20-OHE ($2 \mu\text{M}$), dającym według innych autorów (DUTKOWSKI i współaut. 1977) dobrze wykształconą kutikulę o prawidłowej ultrastrukturze (zobacz ryc. 3, procedura D). Kutikula wydzielana przez nabłonek (ep) dysków kontrolnych [B], inkubowane przez 30 min. w obecności DMSO (ryc. 3, procedura D) posiada dobrze wykształconą warstwę lamellarnej prokutikuli (P) silnie wyznakowanej WGA,

ralnych *in vivo*. Wykazano w nich ponadto, że składniki białkowe kutikuli są wydzielane przez nabłonek dysków imaginalnych nawet przy zablokowanej syntezie chityny przez CFA. Sugerować to może, że sekrecja białek nie wydaje się być w tym przypadku zależna czy fizjologicznie sprzężona z tworzeniem łańcuchów chitynowych. Jednakże, jak się okazuje, długa ekspozycja tkanki na CFA może wywoływać zaburzenia wydzielania i/lub dystrybucji białek kutikularnych. Obecny stan wiedzy o tych procesach nie pozwala, niestety, na stwierdzenie, czy CFA wpływa w tym przypadku bezpośrednio na mechanizm transportu i/lub sekrecji białek kutikularnych, czy też uniemożliwia właściwe formowanie się warstwy prokutikuli przez białka prawidłowo wydzielane, lecz pozbawione chitynowego „szkieletu”. Mimo, że badane związki selektywnie blokują syntezę chityny, to jednak w nielicznych przypadkach wykazano także ich hamujący wpływ na syntezę białka towarzyszącego chitynie w linii komórek nabłonkowych uzyskanych z dysków imaginalnych (PORCHERON i współaut. 1991).

JAKI JEST ZATEM MECHANIZM DZIAŁANIA BADANYCH INHIBITORÓW?

Tak więc, wszystkie trzy związki odznaczają się podobną, wysoką skutecznością w hamowaniu syntezy chityny. Są one ponadto selektywne w swoim działaniu. Wskazują na to zarówno doświadczenia biochemiczne (hamowanie syntezy chityny przy ograniczonym lub żadnym wpływie na pobieranie i akumulację w tkance jej prekursora), jak również obserwacje ultrastrukturalne, kiedy to inne, poza syntezą chityny, procesy zależne od 20-OHE zachodzą w sposób niezakłócony po podaniu CFA. Prowadzi to do przypuszczenia, że BPU prawdopodobnie nie zakłócają procesów związanych z odebraniem sygnału hormonalnego i odpowiedzią tkanki na ten sygnał.

Blokowanie wbudowywania znakowanego prekursora w nowo syntetyzowane łańcuchy chityny następuje bardzo szybko. Zgodne jest to z wynikami uzyskanymi w warunkach *in vivo* (DEUL i współaut. 1978) i sugeruje, że mechanizm działania badanych BPU nie może polegać jedynie na zaburzaniu wspomnianych wyżej ogólnofizjologicznych procesów hormonalnych (nieobecnych przecież w układzie *in vitro*), ogólnokomórkowych procesów transportu, czy też innych procesów biochemicznych wymagających czasu, jak na przykład transport nukleozydów i synteza DNA, czy też aktywność enzymów katalizujących reakcje we wczesnych etapach szlaku biosyntezy chityny. Wręcz przeciwnie, wyniki te wskazują, że badane inhibitory oddziałują na jakieś miejsca docelowe łatwo dla nich dostępne i wiążą się z nimi w sposób trwały i nieodwracalny. Co więcej,

składającej się z lamelli wewnętrznych (il) i zewnętrznych (ol). W przeciwieństwie do długotrwałego działania CFA, efektem krótkiej inkubacji z inhibitorem jest wykształcenie się warstwy prokutikuli [C, D], która jednak wciąż nie zawiera chityny i nie znakuje się przy użyciu WGA. W dyskach takich obserwować można „odtworzonego się” znakowania lektyną (R) w wewnętrznych warstwach prokutikuli, leżących bezpośrednio nad nabłonkiem (ep), wynikającego prawdopodobnie z obecności NAGA niespolimeryzowanej w łańcuchy chitynowe [C, D]. m — mitochondrium, pc — kanał („por”) w kutikuli.

Skala, wszystkie odcinki — 1 μm (z: ZIMOWSKA i współaut. 1994).

te struktury czy też cząsteczki najprawdopodobniej istnieją w komórkach nabłonkowych zanim nastąpi ich morfogenetyczna indukcja przez 20-OHE, na co wskazuje fakt skutecznego hamowania syntezy chityny przez inhibitory zastosowane przed podaniem tego hormonu. Natychmiastowość efektu wywieranego przez BPU może sugerować zaangażowanie błony cytoplazmatycznej i umiejscowionych w niej enzymów i/lub przENOŚNIKÓW kierujących ostatnimi etapami transportu na zewnątrz komórki i polimeryzacji cząsteczek prekursora. Za hipotezą tą przemawiają doniesienia o nagromadzeniu UDP-NAGA w komórkach traktowanych BPU (VAN ECK 1979). Stwierdzono również występowanie w tych komórkach znacznej liczby pęcherzyków wydzielniczych (RETNAKARAN i współaut. 1989). Świadczyłyby to, zdaniem tych autorów, o zablokowaniu wydzielania prekursora na zewnątrz komórek spowodowane prawdopodobnie zanikiem mikrokosmków pod wpływem wysokich dawek DFB. W niniejszej pracy nie zaobserwowano jednak tego rodzaju cytotoksycznych efektów CFA na komórki dysków imaginálnych. Przy zahamowanej produkcji chityny mikrokosmki są normalnie rozwinięte, a obraz procesów endocytozy i egzocytozy również nie odbiega od obrazu charakterycznego dla dysków kontrolnych (ZIMOWSKA i współaut. 1994).

Trudno w obecnym stanie wiedzy pokusić się o wskazanie konkretnych struktur czy cząsteczek będących bezpośrednim celem działania badanych inhibitorów. Wynika to w głównej mierze z faktu, że jak wspomniano, wciąż jest słabo poznany mechanizm ostatniego etapu tworzenia chityny, to znaczy transportu jej prekursorów (lub całych łańcuchów) przez błonę cytoplazmatyczną na zewnątrz komórki i formowania się włókien białkowo-chitynowych. Wydaje się, że wczesne etapy biosyntezy chityny, zachodzące w cytoplazmie i prowadzące do wytworzenia UDP-NAGA, wspólne są dla owadów, innych stawonogów i grzybów, różnice występują natomiast w ostatnim stadium, czyli transporcie i polimeryzacji reszt cukrowych budujących cząsteczki chityny.

Jedna z możliwości (HORST i współaut. 1993) jest taka, że proces polimeryzacji NAGA w chitynę u stawonogów jest podobny do szlaku biosyntezy błonowych glikoprotein lub innych wielkocząsteczkowych elementów substancji międzykomórkowej u większości zwierząt. Polega on na obfitej glikozylacji (dołączaniu reszt cukrowych lub oligosacharydów) peptydów transportowanych do światła retikulum endoplazmatycznego, a następnie do cystern aparatu Golgiego, przed ich wydzieleniem na zewnątrz komórki, na drodze egzocytozy. W pierwszej fazie dochodziłoby więc do łączenia się cząsteczek UDP-NAGA z dolichylofosforanem, lipidem prenylowym pełniącym rolę błonowego przENOŚNIKA reszt cukrowych. Powstały produkt, dolichylodifosfo-NAGA, którego obecność wykryto w komórkach nabłonkowych syntetyzujących chitynę (KRAMER i KOGA 1986, MITSUI 1988) brałby udział w glikozylacji krótkiego peptydu w świetle retikulum endoplazmatycznego. Dalszy ciąg glikozylacji, czyli dołączanie kolejnych reszt NAGA i tworzenie długich łańcuchów chityny, byłby katalizowany przez syntetazę chityny zlokalizowaną w błonach pęcherzyków aparatu Golgiego. W końcu, gotowe włókna chitynowe byłyby wydzielane na zewnątrz komórki dzięki egzocytozie.

RETNAKARAN i MACDONALD (1988) także postulują, że wstępne etapy biosyntezy chityny odbywają się w cytoplazmie. Jednakże, według tych autorów,

wytworzone krótkie oligosacharydy, złożone z reszt NAGA, są transportowane przy udziale dolichylofosforanu bezpośrednio na zewnątrz komórek, gdzie wiążą się z jednocześnie wydzielanym białkiem akceptorowym i tam dopiero następuje końcowa faza tworzenia długich łańcuchów chitynowych, prawdopodobnie przez dołączanie do tych oligosacharydów (pełniących rolę „primerą”) kolejnych reszt cukrowych przez syntetazę chityny zlokalizowaną w błonie mikrokosmków.

Ważnym enzymem w obu powyższych modelach jest, jak się wydaje, N-acetyloglukozaminotransferaza, której substratem jest UDP-NAGA i która katalizuje reakcję tworzenia oligosacharydów dolichylodifosfo-NAGA (HORST i współaut. 1993, KRAMER i KOGA 1986). Blokada tego enzymu przez BPU także jest jednym z proponowanych mechanizmów działania tych związków (MAYER i współaut. 1981).

Oprócz cząsteczek „primerą” w centrum aktywnym syntetazy chityny powinny się także znaleźć cząsteczki UDP-NAGA. Blokowanie ich transportu przez błonę cytoplazmatyczną z wnętrza komórek do rejonów polimeryzacji na szczycach mikrokosmków przez DFB postulują MITSUI i współautorzy (1984, 1988). Według nich cząsteczki syntetazy chityny mają swoje centra aktywne skierowane na zewnątrz komórki. Swój wniosek oparli na fakcie, że DFB nie był w stanie zablokować polimeryzacji reszt NAGA i powstawania chityny, jeśli UDP-NAGA została podana bezpośrednio na apikalną powierzchnię nabłonka w preparacie jelita środkowego motyla *Mamestra brassicae*.

Jeszcze inny postulowany schemat syntezy chityny zakłada, że biosynteza łańcuchów chityny z wykorzystaniem UDP-NAGA odbywa się wewnątrz komórki i jest katalizowana bezpośrednio przez syntetazę chityny bez udziału związków pośrednich (COHEN 1987). Według tej hipotezy centra aktywne cząsteczek syntetazy chityny znajdują się od strony cytozolu. Nowo zsyntetyzowane łańcuchy chityny są transportowane w bliżej nie znany sposób na zewnątrz komórki, by tam połączyć się z wydzielanymi równolegle białkami kutikularnymi. Słabym punktem tego modelu jest fakt, że wspomnianą orientację cząsteczek syntetazy chityny wykryto w komórkach drożdży, a nie owadów (CABIB i ROBERTS 1982). Podobny jest on więc do postulowanego mechanizmu biosyntezy celulozy przez syntetazę celulozy w komórkach roślinnych i wydaje się odzwierciedlać raczej proces syntezy chityny u grzybów, choć nie wyklucza się całkowicie istnienia u owadów dwóch niezależnych dróg biosyntezy łańcuchów chitynowych.

Duża część obecnej wiedzy o syntezie chityny (np. jej kinetyka, synteza w postaci nieaktywnego zymogenu, czy też wrażliwość na poszczególne inhibitory) pochodzi z badań przeprowadzonych na grzybach. Wiele kwestii dotyczących biosyntezy chityny u owadów czeka na ostateczne rozstrzygnięcie. Wyniki niniejszej pracy sugerują w każdym razie, że wspomniane wyżej „płytki błonowe”, umiejscowione na końcach mikrokosmków komórek nabłonkowych owadów, w skład których wchodzi prawdopodobnie kompleksy enzymatyczne syntetazy chityny, nie są miejscem oddziaływania badanych inhibitorów. Po pierwsze, podanie CFA jest skuteczne zanim ekspozycja na 20-HE stymuluje powstanie tych struktur. Po drugie, inne przejawy aktywności płytek błonowych (synteza epikutikuli wraz z kutikulina) nie są zakłócane przez ten związek.

PODSUMOWANIE

W podsumowaniu wyników przeprowadzonych badań stwierdzić można, że:

1. Dyski imaginalne skrzydeł *Spodoptera frugiperda* są bardzo dogodnym obiektem do badań procesów tworzenia kutikuli, a także ich hormonalnej regulacji i możliwość oddziaływania czynnikami chemicznymi w warunkach *in vitro*. Decyduje o tym łatwość pozyskania tkanki, jej duża wrażliwość na stymulację hormonalną, a także intensywna synteza chityny i produkcja kutikuli. Układ ten może znaleźć szerokie zastosowanie w badaniach podstawowych, dotyczących, na przykład, regulacji procesów morfogenezy, jak też w naukach stosowanych, przy testowaniu nowych insektycydów oraz całej gamy innych związków chemicznych, zdolnych oddziaływać na aktywne komórki nabłonkowe.

2. Wszystkie trzy badane inhibitory: chlorflazuuron (CFA), diflubenzuron (DFB) i teflubenzuron (TFB), odznaczają się podobną, wysoką skutecznością w blokowaniu syntezy chityny *in vitro*. Efekt ten jest zależny od dawki, nie zależy natomiast od momentu podania inhibitora.

3. Działanie badanych związków jest natychmiastowe i nie może być odwrócone przez ich usunięcie z płynu inkubacyjnego. Sugeruje to trwałe wiązanie się cząsteczek inhibitora w tkance docelowej.

4. CFA nie tylko hamuje syntezę chityny, lecz także zakłóca odkładanie białkowych elementów wytwarzanej prokutikuli, co prowadzi do poważnego zaburzenia jej struktury.

5. Uzyskane wyniki sugerują, że mechanizm działania badanych inhibitorów polega na selektywnym zakłócaniu procesów związanych z ostatnimi etapami syntezy chityny i produkcji kutikuli:

— transportem cząsteczek prekursora przez błonę cytoplazmatyczną komórek nabłonkowych i/lub

— ich ostateczną polimeryzacją w łańcuchy chityny.

Przedstawione badania dostarczają zatem wielu nowych danych na temat procesów syntezy chityny i produkcji kutikuli w dyskach imaginalnych oraz sposobu działania pochodnych benzoilofenyloamocynianów. Potwierdzają one, że związki te są istotnie niezwykle obiecującym narzędziem w zwalczaniu szkodników owadów, w tym *Spodoptera frugiperda* ze względu na swoją selektywność i skuteczność działania. Spośród kilku hipotez dotyczących mechanizmu działania BPU przedstawione wyniki dostarczają nowych przesłanek na poparcie jednej z nich, to jest hipotezy o zakłócaniu końcowych procesów transportu przez błonę cytoplazmatyczną i/lub polimeryzacji cząsteczek prekursora chityny. Mimo intensywnych badań problemy te są wciąż dalekie od rozwiązania. W chwili obecnej można by na podstawie niniejszej pracy i doniesień literaturowych powiedzieć, że więcej wiadomo o tym, czego inhibitory te nie robią, niż o tym, co robią. Wydaje się jednak, że metoda eliminacji poszczególnych możliwości jest również uprawnioną metodą badania naukowego.

Bardzo serdecznie dziękuję moim współpracownikom z laboratorium United States Department of Agriculture-Agricultural Research Service w Gainesville,

Floryda, USA, doktor Grażynie Zimowskiej, doktorowi Herbertowi Oberlanderowi, doktorowi Donaldowi L. Silhackowi oraz Eddiemu Leach, biorącym udział w przedstawionych w niniejszym artykule badaniach. Były one finansowane przez United States-Israel Binational Agricultural Research and Development Fund. Większość przedstawionych rycin (ryc. 4 —ryc. 7 oraz elementy ryc. 3) zostały opublikowane w Archives of Insect Biochemistry and Physiology, prawa autorskie należą do wydawnictwa Wiley-Liss, New York, 1994.

Bardzo dziękuję Panu Profesorowi Bronisławowi Cymborowskiemu za krytyczne uwagi i cenne dyskusje w trakcie przygotowywania tekstu.

EFFECT OF CHITIN SYNTHESIS ON CUTICLE PRODUCTION
IN VITRO IN WING IMAGINAL DISCS OF *SPODOPTERA FRUGIPERDA*
(LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE) LARVAE

Summary

Chitin is a major supportive component in insect cuticles. Because of its critical importance to insect survival and its absence in plants and vertebrates it is regarded as a good target for selective pesticide action.

The effects of three benzoylphenyl urea chitin synthesis inhibitors, chlorfluazuron (CFA), diflubenzuron (DFB), and teflubenzuron (TFB) on 20-hydroxyecdysone (20-OHE)-stimulated chitin production were studied in vitro in wing imaginal discs from the last instar larvae of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera), a major agricultural pest. Chitin synthesis was quantitatively measured as uptake and incorporation of [¹⁴C]N-acetyl-D-glucosamine ([¹⁴C]NAGA).

All three inhibitors blocked 20-OHE-dependent [¹⁴C]NAGA incorporation into chitin by the wing imaginal discs in a similar, dose-dependent manner. Their potency was not affected by the time of their application, i.e. exposures before, during, or after 20-OHE treatment were equally effective in blocking chitin synthesis. The inhibition was rapid and could not be removed by removing an inhibitor from the culture medium. This may indicate immediate and irreversible binding of the inhibitor molecules in the imaginal disc epithelial cells. However, while all three compounds inhibited [¹⁴C]NAGA incorporation, only DFB and TFB in some cases reduced but did not block the uptake of [¹⁴C]NAGA by the tissue.

Also, ultrastructural effects of CFA on 20-OHE-stimulated cuticle secretion by the wing imaginal discs were studied using electron microscopy and chitin labelling with Wheat Germ Agglutinin-gold (WGA). Treatment with CFA in two types of structural response depending on the duration of the exposure of the wing discs to the inhibitor: 1) total absence of chitin in procuticle with disrupted architecture (long inhibitor treatment), and 2) formation of procuticle which was WGA-positive but lacked its usual lamellar structure and did not contain polymerised chitin (short inhibitor treatment).

These results suggest that the site of inhibition may reside in the transport of NAGA to the surface of the epithelium and/or final assemblage of MASA molecules into chitin.

LITERATURA

- ASCHER K. R. S., MELAMED-MADJAR V., NEMNY N. E., TAM S., 1987. *The effect of benzoylphenyl urea molting inhibitors on larvae and eggs of the European Corn Borer, Ostrinia nubilalis* Hb. J. Plant Diseases and Prot. 94, 584-589.
- BINNINGTON K. C., 1985. *Ultrastructural changes in the cuticle of the sheep blowfly, Lucilia, induced by certain insecticides and biological inhibitors.* Tissue Cell 17, 131-140.
- BOULIGAND Y., 1965. *Sur une architecture torsadée répandue dans de nombreuses cuticules d'Arthropodes.* C. R. Hebd. Séanc. Acad. Sci. Paris 261, 3665-3668.
- CABIB E., ROBERTS R., 1982. *Synthesis of the yeast cell wall and its regulation.* Ann. Rev. Biochem. 51, 763-793.

- CHEN A. C., MAYER R. T., 1985. *Insecticides, effects on the cuticle*. [W:] *Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology* Kerkut G. A., Gilbert L. I. (red.), tom 12, str. 57-77, Pergamon Press, Oxford.
- COHEN E., 1987. *Interference with chitin biosynthesis in insects*. [W:] *Chitin and Benzoylphenyl Ureas* WRIGHT J. E., RETNAKARAN A. (red.), str. 43-73, Dr. W. Junk Publishers, Dordrecht.
- CYMBOROWSKI B., 1984. *Endokrynologia owadów*. PWN, Warszawa.
- DELOACH J. R., MEOLA S. M., MAYER R. T., THOMPSON J. M., 1981. *Inhibition of DNA synthesis by diflubenzuron in pupae of the stable fly Stomoxys calcitrans (L.)*. Pestic. Biochem. Physiol. 15, 172-180.
- DEUL D. H., DEJONG B. J., KORTENBACH J. A. M., 1978. *Inhibition of chitin synthesis by two 1-2,6-disubstituted benzoyl-3-phenylurea insecticides*. Pestic. Bloch. Physiol. 8, 98-105.
- DINAN L., SPINDLER-BARTH M., SPINDLER K-D., 1990. *Insect cell lines as tools for studying ecdysteroid action*. Invertebr. Reprod. Develop. 18, 43-53.
- DUTKOWSKI A. B., OBERLANDER H., LEACH C. E., 1977. *Ultrastructure of cuticle deposited in Plodia interpunctella wing discs after various β -ecdysone treatments in vitro*. Wilhelm Roux's Arch. 183, 155-164.
- FERKOVICH S. M., OBERLANDER H., LEACH C. E., VAN ESSEN F., 1980. *Hormonal control of chitin synthesis in imaginal discs*. [W:] *Invertebrate Systems In Vitro*. KURSTAK E., MARAMOROSH K., DÜBENDORFER A. (red.), str. 209-216, Elsevier, North Holland Biomedical Press.
- FRRETZ A., LÜBBERT A., MARKMANN-MULISH U., SPINDLER-BARTH M., SPINDLER K-D., 1993. *Effects of 20-hydroxyecdysone on protein synthesis in the epithelial cell line from Chironomus tentans*. Insect Biochem. Molec. Biol. 23, 159-164.
- FRISTROM J. W., 1981. *Drosophila imaginal discs as a model system for the study of metamorphosis*. [W:] *Metamorphosis, a Problem in Developmental Biology* Gilbert L. I., Frieden E. (red.), II wyd., str. 217-240, Plenum Press, New York.
- FRISTROM D., LIEBRICH W., 1986. *The hormonal coordination of cuticulin deposition and morphogenesis in Drosophila imaginal discs in vivo and in vitro*. Dev. Biol. 114, 1-11.
- FRISTROM D. K., RICKOLL W. L., 1982. *The morphogenesis of imaginal discs of Drosophila*. [W:] *Insect Ultrastructure*. AKAI H., KING R. C. (red), tom 1, str. 247-277, Plenum Press, New York.
- FRISTROM J. W., FRISTROM D. K., APPLE R. T., BIRR C., FECHTEL K., WOLFGANG W. J., 1991. *Hormone-induced differentiation of the imaginal disc epidermis, pupal cuticle formation i Drosophila*. [W:] *Physiology of the Insect Epidermis* BINNINGTON K., RETNAKARAN A. (red.), str. 55-76, CSIRO, Australia.
- GROSSCURT A. C., ANDERSON S. O., 1980. *Effect of diflubenzuron on some chemical and mechanical properties of the elytra of Leptinotarsa decemlineata*. Proc. K. Ned. Akad. Wet. 83C, 143-150.
- HEPBURN H. R., 1985. *Structure of the integument*. [W:] *Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology*. KERKUT G. A., GILBERT L. I. (red.), tom 3, str. 1-58, Pergamon Press, Oxford.
- HORST M. N., WALKER A. N., KLAR E., 1993. *The pathway of crustacean chitin synthesis*. [W:] *The Crustacean Integument — Morphology and Biochemistry*. HORST M. N., FREEMAN J. A. (red.), str. 113-149, CRC Press.
- ISHAAYA I., 1990. *Benzoylphenyl ureas and other selective insect control agents— mechanism and application*. [W:] *Pesticides and Alternatives* Cassida J. E. (red.), str. 365-376, Elsevier Science Publishers B. V., Biomedical Division), Amsterdam.
- ISHAAYA I., CASSIDA J. E., 1974. *Dietary TH-6040 alters composition and enzyme activity of housefly larval cuticle*. Pestic. Biochem. Physiol. 4, 484-490.
- ISHAAYA I., YABLONSKY S., ASCHER K. R. S., 1987. *Toxicological and biochemical aspects of novel acylureas on resistant and susceptible strains of Tribolium castaneum*. [W:] *Proceedings of the 4th International Working Conference on Stored-Product Protection, 1986, Tel Aviv*. DONAHAYE E., NAVARRO S. (red.), str. 613-622, Capsit, Jerusalem.
- ISHII S., MITSUMURA F., 1992. *Diflubenzuron-induced changes in activities of the cAMP-dependent protein kinase in the newly molted integument of the American Cockroach in situ and in cell-free conditions*. Insect Biochem. Molec. Biol. 22, 69-79.
- KATO Y., RIDDIFORD L. M., 1987. *The role of 20-hydroxyecdysone in stimulating epidermal mitoses during the larval-pupal transformation of the tobacco hornworm, Manduca sexta*. Development 100, 227-236.
- KLITSCHKA G. E., MAYER R. T., DROLESKEY R. E., NORMAN J. O., CHEN A. C., 1986. *Effects of chitin synthesis inhibitors on incorporation of nucleosides into DNA and RNA in a cell line from Manduca sexta (L.)*. Toxicology 39, 307-315.

- KRAMER K. J., KOGA D., 1986. *Insect chitin- physical state, synthesis, degradation and metabolic regulation*. *Insect Biochem.* 16, 851-877.
- KRAMER K. J., DZIADIK-TURNER C., KOGA D., 1985. *Chitin metabolism in insects*. [W:] *Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology* Kerkut G. A., Gilbert L. I. (red.), tom 3, str. 75-115, Pergamon Press, Oxford.
- LEATHAM A. J. C., ATKINS N. J., 1983. *Lectin binding to paraffin sections*. [W:] *Techniques in Immunocytochemistry* Bullock G. R., Petrusz P. (red.), tom 2, str. 39-70, Academic Press, New York.
- LEIGHTON T., MARKS E., LEIGHTON F., 1981. *Pesticides, insecticides and fungicides as chitin synthesis inhibitors*. *Science* 213, 905-907.
- LOCKE M., 1984. *Epidermal cells*. [W:] *Biology of the Integument, Vol. 1, Invertebrates* BEREITER-HAHN J., MATOLCSY A. G., RICHARDS K. S. (red.), str. 502-522, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg.
- LOCKE M., 1991. *Insect epidermal cells*. [W:] *Physiology of the Insect Epidermis* BINNINGTON K., RETNAKARAN A. (red.), str. 1-22. CSIRO, Australia.
- LONDERSHAUSEN M., KAMMANN V., SPINDLER-BARTH M., SPINDLER K-D., THOMAS H., 1988. *Chitin synthesis in insect cell lines*. *Insect Biochem.* 18, 631-636.
- MAYER R. T., MEOLA S. M., COPPAGE D. L., DELOACH J. R., 1980. *Utilization of imaginal tissues from pupae of the stable fly for the study of chitin synthesis and screening of chitin synthesis inhibitors*. *J. Econ. Entomol.* 73, 76-80.
- MAYER R. T., CHEN A. C., DELOACH J. R., 1981. *Chitin synthesis inhibiting insect growth regulators do not inhibit chitin synthase*. *Experientia* 37, 337-338.
- MAYER R. T., WITT W., KLITSCHKA G. E., CHEN A. C., 1988. *Evidence that chitin synthesis inhibitors affect cell membrane transport*. [W:] *Endocrinological Frontiers in Physiological Insect Ecology* Sehnal F., Zabza A., Denlinger D. L. (red.), str. 567-581, Wrocław Technical University Press, Wrocław.
- MAYER R. T., CUNNINGHAM G., GUPTA J., 1990. *Insecticides based on differences in metabolic pathways*. [W:] *Safer Insecticides - Development and Use*. HODGSON E., KUHR R. J. (red.), str. 209-255, Marcel Dekker Inc., New York and Basel.
- MEOLA S. M., MAYER R. T., 1980. *Inhibition of cellular proliferation of imaginal epidermal cells by diflubenzuron in pupae of the stable fly*. *Science* 207, 985-987.
- MIKOŁAJCZYK P., OBERLANDER H., SILHACEK D. L., ISHAAYA I., SHAAAYA E., 1994. *Chitin synthesis in Spodoptera frugiperda wing imaginal discs, I. Chlorfluazuron, diflubenzuron, and teflubenzuron inhibit incorporation but not uptake of [¹⁴C]N-acetyl-D-glucosamine*. *Arch. Insect Bioch. Physiol.* 25, 245-258.
- MIKOŁAJCZYK P., ZIMOWSKA G., OBERLANDER H., SILHACEK D. L., 1995. *Chitin synthesis in Spodoptera frugiperda wing imaginal discs, III. Role of the peripodial membrane*. *Arch. Insect Bioch. Physiol.* 28, 173-187.
- MITSUI T., 1988. *Chitin biosynthesis in insects*. [W:] *Endocrinological Frontiers in Physiological Insect Ecology*. SEHNAL F., ZABZA A., DENLINGER D. L. (red.), str. 489-496, Wrocław Technical University Press, Wrocław.
- MITSUI T., Nobusawa C., Fukami J., 1984. *Mode of inhibition of chitin synthesis by diflubenzuron in the cabbage armyworm, Mamestra brassicae L.* *J. Pestic. Sci.* 9, 19-26.
- NARDI J. B., HARDT T. A., MAGEE-ADAMS S. M., OSTERBUR D. L., 1985. *Morphogenesis in wing imaginal discs, its relationship to changes in the extracellular matrix*. *Tissue Cell* 17, 473-490.
- NEVILLE A. C., 1975. *Biology of the Arthropod Cuticle*. [W:] *Zoophysiology and Ecology*. FARNER D. S. (red.), Vol. 4/5, Springer, Berlin, Heidelberg, New York.
- OBERLANDER H., 1980. *Tissue culture methods*. [W:] *Cuticle Techniques in Arthropods*. MILLER T. A. (red.), str. 253-272, Springer-Verlag, New York.
- OBERLANDER H., 1985. *The imaginal discs*. [W:] *Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology*, D. Kerkut G. A., Gilbert L. I. (red.), tom 2, str. 151-182, Pergamon Press, Oxford.
- OBERLANDER H., LYNN D. E., 1982. *Morphogenesis in insect tissue culture*. [W:] *Advances in Cell Culture*. Maramorosh K. (red.), tom 2, str. 237-265, Academic Press, New York.
- OBERLANDER H., FERKOVICH S. M., LEACH E., VAN ESSEN F., 1980. *Inhibition of chitin synthesis in cultured wing imaginal discs, effects of alpha-amanitin, actinomycin-D, cycloheximide, and puromycin*. *D Wilhelm Roux's Arch.* 188, 81-86.
- OBERLANDER H., LYNN D. E., LEACH C. E., 1983. *Inhibition of cuticle production in imaginal discs of Plodia interpunctella (cultured in vitro): effects of colcemid and vinblastine*. *J. Insect Physiol.* 29, 47-53.

- OBERLANDER H., SILHACEK D. L., LEACH E., ISHAAYA I., Shaaya E., 1991. *Benzoylphenyl ureas inhibit chitin synthesis without interfering with aminosugar uptake in imaginal wing discs of Plodia interpunctella (Hübner)*. Arch. Insect Biochem. Physiol. 18, 219-227.
- PERCY-CUNNINGHAM J., NICHOLSON D., RETNAKARAN A., 1987. *The effect of ingested benzoylphenylurea on the ultrastructure of the cuticle deposited during the last larval instar of Choristoneura fumiferana Clem. (Lepidoptera, Tortricidae)*. Can. J. Zool. 65, 2715-2723.
- PORCHERON P., OBERLANDER H., LEACH C. E., 1988. *Ecdysteroid regulation of amino sugar uptake in a lepidopteran cell line derived from imaginal discs*. Arch. Insect Biochem. Physiol. 7, 145-155.
- PORCHERON P., MORINIERE M., COUDOUEL N., OBERLANDER H., 1991. *Ecdysteroid-stimulated synthesis and secretion of an N-acetyl-D-glucosamine-rich glycopeptide in a lepidopteran cell line derived from imaginal discs*. Arch. Insect Biochem. Physiol. 16, 257-271.
- RETNAKARAN A., MACDONALD A., 1988. *Biosynthesis and deposition of chitin in insects and interference with this system as a means of control*. [W:] *Endocrinological Frontiers in Physiological Insect Ecology*, Sehnał F., Zabza A., Denlinger D. L. (red.), str. 547-566, Wrocław Technical University Press, Wrocław.
- RETNAKARAN A., OBERLANDER H., 1993. *Control of chitin synthesis in insects*. [W:] *Chitin Enzymology*. Muzzarelli R. A. A. (red.), str. 89-99, materiały ze zjazdu European Chitin Society, Ancona, Włochy.
- RETNAKARAN A., MACDONALD A., NICHOLSON D., PERCY-CUNNINGHAM J., 1989. *Ultrastructural and autoradiographic investigations of the interference of chlorfluazuron with cuticle differentiation in the spruce budworm, Choristoneura fumiferana*. Pestic. Biochem. Physiol. 35, 172-184.
- RIDDIFORD L. M., 1985. *Hormone action at the cellular level*. [W:] *Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology*, Kerkut G. A., Gilbert L. I. (red.), tom 8, str. 37-84, Pergamon Press, Oxford.
- RIDDIFORD L. M., 1989. *The epidermis as a model system for ecdysteroid action*. [W:] *Ecdysone — from Chemistry to Mode of Action*, Koolman J. (red.), str. 407-413, Georg Thieme Verlag-Thieme Medical Publishers, Inc., Stuttgart, New York.
- SOLTANI N., BESSON M. T., DJ., 1984. *Effects of diflubenzuron on the pupal-adult development of Tenebrio molitor (L.): growth and development, cuticle secretion, epidermal cell density, and DNA synthesis*. Pestic. Biochem. Physiol. 21, 256-264.
- SOLTANI N., QUENNEDY A., DELBECQUE J. P., DELACHAMBRE J., 1987. *Diflubenzuron-induced alterations during in vitro development of Tenebrio molitor pupal integument*. Arch. Insect Biochem. Physiol. 5, 201-209.
- SPINDLER K-D., SPINDLER-BARTH M., LONDERSHAUSEN M., 1990. *Chitin metabolism, a target for drugs against parasites*. Parasitol. Res. 76, 283-288.
- SPINDLER-BARTH M., JUNGER E., SPINDLER K-D., 1992. *Vesicle formation and ecdysteroid-induced cellular differentiation in the epithelial cell line from Chironomus tentans*. Tissue and Cell 24, 919-934.
- TRUMAN J. W., 1985. *Hormonal control of ecdysis*. [W:] *Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology*, Kerkut G. A., Gilbert L. I. (red.), tom 8, str. 413-440, Pergamon Press, Oxford.
- VAN ECK W. H., 1979. *Mode of action of two benzoylphenyl ureas as inhibitors of chitin synthesis in insects*. Insect Biochem. 9, 295-300.
- WIEDENMANN G., LUKAT R., WEBER F., 1986. *Cyclic layer deposition in the cockroach endocuticle, a circadian rhythm?* J. Insect Physiol. 32, 1019-1027.
- WRIGHT J. E., RETNAKARAN A., 1987. *Chitin and Benzoylphenyl Ureas*. 309 str., Dr. W. Junk Publishers, Dordrecht.
- YU S. J., TERRIERE L. C., 1977. *Ecdysone metabolism by soluble enzyme from three species of Diptera and its inhibition by the insect growth regulator T-6040*. Pestic. Biochem. Physiol. 7, 48-55.
- Yund M. A., 1989. *Imaginal discs as a model for studying ecdysteroid action*. [W:] *Ecdysone — from Chemistry to Mode of Action*, Koolman J. (red.), str. 384-392, Georg Thieme Verlag-Thieme Medical Publishers, Inc., Stuttgart, New York.
- ZIMOWSKA G., HANDLER A. M., CYMBOROWSKI B., 1985. *Cellular events in the prothoracic glands and ecdysteroid titers in the last larval instar of Spodoptera littoralis*. J. Insect Physiol. 31, 331-340.
- ZIMOWSKA G., MIKOŁAJCZYK P., SILHACEK D. L., OBERLANDER H., 1994. *Chitin synthesis in Spodoptera frugiperda wing imaginal discs, II. Selective action of chlorfluazuron on Wheat Germ Agglutinin binding and cuticle ultrastructure*. Arch. Insect Biochem. Physiol. 27, 89-108.

JÓZEF BANASZAK, TOMASZ CIERZNIAK

*Katedra Biologii i Ochrony Środowiska WSP w Bydgoszczy
Chodkiewicza 51, 85-667 Bydgoszcz*EKONOMICZNE EFEKTY ZAPYLANIA ROŚLIN UPRAWNYCH PRZEZ
PSZCZOŁĘ MIODNĄ I DZIKO ŻYJĄCE PSZCZOŁOWATE (APOIDEA)

WPROWADZENIE

Uprawy polowe zajmują w Polsce obecnie 13,56 mln ha. Większość z nich, bo 10,81 mln ha, to uprawy roślin wiatro- i samopylnych, takich jak: pszenica, żyto, jęczmień, owies, kukurydza, ziemniak, burak cukrowy, tytoń, chmiel, konopie, sorgo i inne (Rocznik Statystyczny GUS 1993). Pozostałą część, czyli około 20% upraw, stanowią rośliny, dla których zapylanie przez owady z punktu widzenia plonowania jest efektywne lub niezbędne. W Polsce około 60 gatunków roślin uprawnych jest w mniejszym lub większym stopniu zależnych od owadów zapylających, przede wszystkim od pszczół szeroko tutaj rozumianych. Wśród tych roślin część gatunków charakteryzuje się częściową samopłodnością, jednak zapylanie przez owady jest dla nich bardzo korzystne i znacznie zwiększa plon takich roślin, jak: rzepak, rzepik, proso, gorczyca, mak, len, łubin żółty, wyka ozima, groch siewny, peluszką, soja, komonica. Z kolei wiele roślin zapylają wyłącznie lub prawie wyłącznie owady, jak: grykę, słonecznika, koniczynę, lucernę, esparcetę, drzewa owocowe, rośliny jagodowe (truskawki, maliny, porzeczki, agrest, warzywa, kapustę nasienną i inne.

Już z powyższego zestawienia można wnosić, jak istotna rola przypada owadom zapylającym w produkcji rolnej. Dotyczy to głównie pszczoły miodnej *Apis mellifera* L., chociaż nadal, poza środowiskiem specjalistów, jej ekonomiczne znaczenie jest postrzegane głównie jako producenta miodu, wosku, mleczka pszczelego i innych produktów pszczelich. Natomiast drugi aspekt działalności pszczół, to znaczy zapylanie roślin i w konsekwencji wzrost plonowania, jest ciągle jeszcze mało doceniany. Wpływ na wysokość plonowania, chociaż bardzo zmienny, mają także pszczoły żyjące dziko. W Polsce występuje ponad 450 gatunków dzikich pszczół, przedstawicieli nadrodziny Apoidea, o różnym stopniu rozwoju socjalnego, to jest od zupełnie samotnych po właściwie społeczne, jak trzmielce. Pełny ich wykaz zawiera spis sporządzony przez BANASZAKA (1991), a informacje na temat biologii, ekologii i znaczenia gospodarczego tych owadów można znaleźć w dwóch książkach tego autora: *Pszczoły i zapylanie roślin* (BANASZAK 1987) i *Ekologia pszczół* (1993).

Mimo ukazania się licznych prac dotyczących zapylenia wybranych gatunków roślin przez owady, w literaturze krajowej brak jest zestawienia ekonomicznych efektów zapylenia roślin uprawnych przez pszczoły. Dotyczy to w równym stopniu pszczoły miodnej, co i dziko żyjących pszczół. Przyczynami są zapewne trudności metodologiczne, na przykład niepełne dane o wpływie entomogamii na wzrost plonów poszczególnych gatunków roślin, konieczność uwzględnienia wielu odmian roślin, a jednocześnie brak aktualnych danych o areale i plonach (zwłaszcza z okresu ostatnich pięciu lat, co jest spowodowane transformacją całej gospodarki. Mimo wspomnianych wyżej trudności można wykonać szacunkowe obliczenie ekonomicznych efektów zapylenia roślin uprawnych przez pszczoły w skali kraju, które z pewnością umożliwiają ukazanie wymiernego znaczenia pszczół szeroko rozumianych w rolnictwie. Takie właśnie zadanie postawili sobie autorzy niniejszego opracowania.

MATERIAŁ I METODY

Wielkość wzrostu plonowania danej rośliny w wyniku zapylenia jej przez pszczoły można obliczyć stosując różne metody. Do dokładnej analizy procesu zapylenia stosuje się metodę opartą na szczegółowym określeniu wszystkich znanych czynników składających się na końcowy efekt zapylenia — wzrost plonów. Można ją nazwać „metodą szczegółową”. W metodzie tej określa się takie elementy jak: a) skład gatunkowy pszczół zapyłających dany gatunek rośliny, b) zagęszczenie danego gatunku pszczoły, c) dzienną efektywność zapylenia dla badanego gatunku pszczoły, na którą składa się liczba godzin pracy owada w ciągu dnia, wydajność pracy czyli liczba zapylnych kwiatów w jednostce czasu (min, godz), liczba nasion (owoców) uzyskanych z zapylnego kwiatu, wielkość tych nasion (owoców) uzyskanych w wyniku zapylenia, d) ogólną efektywność zapylenia dla danego gatunku pszczoły, na którą składają się z kolei: dzienna efektywność zapylenia oraz liczba tak zwanych dni lotnych, którą oblicza się biorąc pod uwagę terminy występowania danego gatunku pszczoły i terminu zakwitania plantacji oraz liczbę dni z temperaturą umożliwiającą oblot plantacji przez pszczoły. W zależności od badanego gatunku pszczoły i rośliny są uwzględniane inne szczegółowe czynniki, jak na przykład płeć owadów, odmiana rośliny, pokos i wiele innych. Przykłady omawianej metodyki można znaleźć w pracach DYLEWSKIEJ i współautorów (1970) JABŁOŃSKIEGO (1970) BORNUSA i współautorów (1976), PESENKI (1992). Metoda szczegółowa jest bardzo pracochłonna i dlatego tego typu obliczenia wykonano dla niewielu gatunków roślin. Jednocześnie istnieje zawsze możliwość pominięcia pewnych istotnych czynników kształtujących końcowy efekt zapylenia.

Druga metoda, najczęściej stosowana, polega na wykorzystaniu izolatorów. Wybrane powierzchniowo badanej plantacji lub pojedyncze rośliny izoluje się przed owadami zapyłającymi, stosując gęstą siatkę, a następnie porównuje się plonowanie roślin izolowanych z plonowaniem roślin, do których owady zapyłające miały swobodny dostęp. Metoda ta pozwala ocenić efekt końcowy zapylenia badanej rośliny przez pszczoły. Jest mniej pracochłonna od poprzedniej, aczkol-

wiek nie informuje o znaczeniu poszczególnych czynników składających się na proces zapylenia.

W niniejszej pracy wykorzystano wyniki uzyskane obiema metodami. Z metody „izolatorowej” wykorzystano dane o samopłodności rośliny — średni plon nasion (owoców) uzyskany bez udziału pszczół w zapyleniu oraz o wzroście plonu przy danym zagęszczeniu pszczół, natomiast metoda „szczegółowa” dostarczyła danych o procentowym udziale poszczególnych gatunków pszczół w zapyleniu wybranych upraw. W obliczeniach za punkt wyjścia przyjęto: a) stopień samopłodności danej rośliny; b) średnie zbiory i plon w kraju (do obliczeń brano średnie z lat 1990–1992), jeżeli dane pochodziły z innego okresu zaznaczono to przy ich podaniu); c) średnie zagęszczenie pszczół na plantacjach danej rośliny; d) udział procentowy pszczoły miodnej i dziko żyjących Apoidea w zapyleniu oraz e) wzrost plonów przy określonym zagęszczeniu Apoidea.

Z 60 gatunków roślin zależnych w mniejszym lub większym stopniu od zapylenia przez owady wybrano pięć: lucernę, koniczynę czerwoną, rzepak, grykę i jabłoń. Kierowano się przy tym następującymi kryteriami: a) wielkością areалу zajmowanego przez daną uprawę, b) stopniem zależności rośliny od owadów zapyłających oraz c) dostępnością danych umożliwiających obliczenie wzrostu plonu związanego z zapyleniem przez owady pszczołowe.

W obliczeniach wykorzystano głównie dane z literatury krajowej, doceniając zarówno jej wartość merytoryczną, jak też biorąc pod uwagę fakt, że dane dotyczące zapylenia i plonowania, uzyskane w innych szerokościach geograficznych, klimacie i sposobie gospodarowania, mogą być nieadekwatne do warunków polskich.

WYNIKI I DYSKUSJA

LUCERNA

Lucerna należy do cennych roślin pastewnych. W Polsce uprawy lucerny zajmują obecnie około 200 tys. ha (JELINOWSKA — informacja ustna). Na produkcję nasienną przeznaczają się obecnie około 1,5 tys. ha. W ostatnich latach zaznaczył się wyraźny spadek powierzchni plantacji nasiennych: w 1976 — 13136 ha, w 1980 — 2275 ha, w 1985 — 1989 ha i w 1989 — 1584 ha (dane wg GUS). Jednym z podstawowych czynników ograniczających powierzchnię upraw są trudności w produkcji nasiennej.

Lucerna jest rośliną wybitnie obcopolną. Może, co prawda, zachodzić samozapylenie, które według różnych autorów obejmuje 17%–46% kwiatów (CARLSON i współaut. 1950, PALMER-JONES i FORSTER 1965 — za FREE 1970), jednak liczba wytworzonych w takim procesie nasion (jak również ich wielkość) jest znacznie mniejsza niż w zapyleniu krzyżowym (PETERSEN 1954, PALMER-JONES, FORSTER 1965 — za FREE 1970, JANY 1973). Zapylenie (zarówno samozapylenie, jak i zapylenie krzyżowe) następuje tylko w wypadku otwarcia kwiatu, które ma miejsce w trakcie odwiedzin owadów zapyłających lub sporadycznie zachodzi samoistnie. Stwierdzono, że w warunkach Polski samoootwieranie występuje u 3%–6% wytworzonych przez plantację kwiatów. Ilość nasion powstała z takich kwiatów może wynosić do 9 kg/ha (JABIŃSKI 1970).

Badania w Polsce wykazały występowanie na plantacjach lucerny aż 144 gatunków *Apoidea* (WÓJTOWSKI 1965, RUSZKOWSKI 1968, RUSZKOWSKI i WÓJTOWSKI 1970, ANASIEWICZ 1973, SOWA 1973, SOWA i współaut. 1979, BANASZAK 1984). Według ANASIEWICZ (1973) za charakterystyczne gatunki pszczół dla upraw lucerny należy uznać: *Eucera longicornis* Vecht, *Melitta leporina* (Panz.), *Rhophitoides canus* (Evers.), *Megachile willughbiella* (K.), *M. centuncularis* (K.), *Halictus rubicundus* (Christ.) *Andrena gelriae* Vecht, *A. wilkella* (K.), *A. labialis* (K.), *Bombus terrestris* (L.), *B. lucorum* (L.), *B. distinguendus* Mor., *Lasioglossum albipes* (F.), *Halictus tumulorum* (L.) i *Apis mellifera* (L.). Gatunki te są silnie związane troficznie z lucerną i w całym kraju tworzą zespoły zapyłaczy o zbliżonym składzie gatunkowym (SOWA 1973), aczkolwiek ich liczebność jest bardzo zmienna. Najliczniej oblatuje lucernę pszczoła miodna, której udział może wynosić do 98% wszystkich *Apoidea*, a zagęszczenie waha się od 5000–13240 osobników/ha (ANASIEWICZ 1975, BANASZAK 1984, DYLEWSKA i współaut. 1970, JABŁOŃSKI 1970, SOWA 1973). Jednak jej rola w warunkach umiarkowanego i wilgotnego klimatu Polski jest znacznie mniejsza, niż wynikałoby to z jej liczebności na plantacjach. Pszczoły miodne przeważnie zbierają nektar nie otwierając kwiatów podczas ich odwiedzin. Za najważniejszych zapyłaczy lucerny są uznawane następujące dzikie pszczoły: *Melitta leporina* (Vecht) *Bombus* spp., *Eucera longicornis* (L.), *Rhophitoides canus* (Evers.), *Andrena* spp. Pszczoły te występują jednak zazwyczaj niezbyt licznie, w każdym razie bardzo zmienna jest ich liczebność w różnych miejscach kraju. Średnie ich zagęszczenie w Polsce wynosi 380,4 osobników/ha na lucernie pierwszego pokosu i 534,1 osobników/ha na lucernie drugiego pokosu (średnie zagęszczenie obliczono wg prac: JABŁOŃSKI 1973, SOWA i współaut. 1979, SOWA 1973, DYLEWSKA i współaut. 1970, BANASZAK 1984).

Uwzględniając średnie zagęszczenie pszczół na plantacjach lucerny I i II pokosu, a także samopłodność lucerny, średni plon całkowity i średni areal (średnia za lata 1976–1989. zbiory lucerny, które są wynikiem zapyłania przez pszczoły, oszacowano na 790,1 ton w skali kraju (tab. 1). Efekt ekonomiczny, przy średniej cenie 5 nowych zł za kg (koniec 1993 r.) wynosi 1,9 mln \$. Powyższe wyniki graficznie prezentuje rysunek 1.

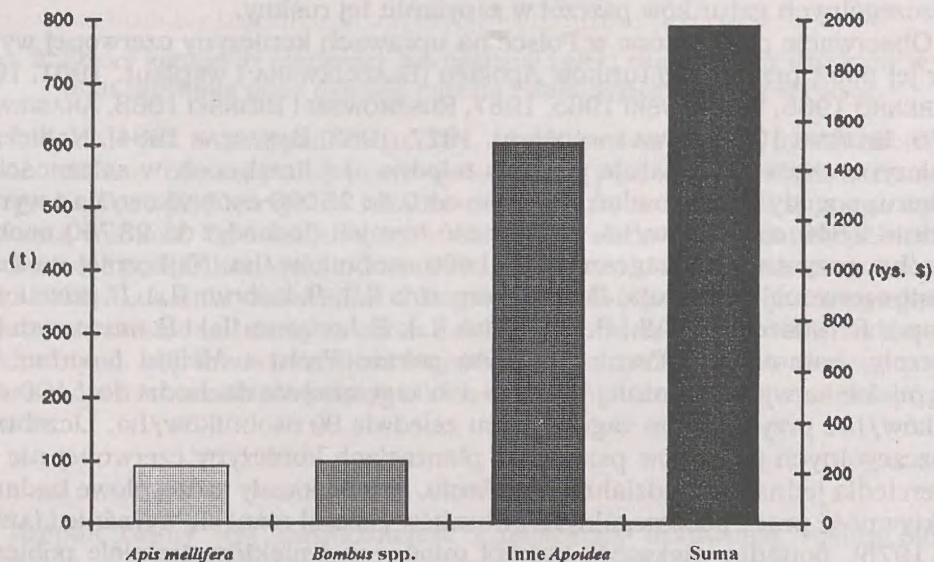
Tabela 1

Zagęszczenie zapyłaczy, udział w zapyłaniu i efekt ekonomiczny (zwyżka plonów) zapyłania
wybranych roślin entomogamicznych w Polsce.

a — średnia z lat 1976–1989, b — średnia z lat 1985–1987, c — obliczenia dotyczą arealu, który może być optymalnie zapyłony przy założeniu, że 20% pni jest wywozonych na kwitnące uprawy rzepaku, d — kg/drzewo, e — mln drzew.

Gatunek lub grupa <i>Apoidea</i>	Średnie zagęszczenie <i>Apoidea</i> (osobników/ha)		Udział (%) w zapyłaniu	Średni plon (kg/ha)		A r e a l (tys. ha)		Zbiory w wyniku zapylenia (t)
	I pokos	II pokos		całkowity	w wyniku samopłodności	w wyniku zapylenia	Areal (tys. ha)	
Lucerna								
<i>Apis mellifera</i>	9309,6	10810,3	11,4			24,4		90,1
<i>Bombus</i>	38,8	28,1	12,3	223	9	26,3	3691,8 ^a	97,1

Inne Apoidea	341,6	506,0	76,3			163,3		602,9
Suma	9690,0	11344,4	100,0			214,0		790,1
Koniczyna czerwona								
<i>Apis mellifera</i>		2840,0	27,7			56,8		2272,0
<i>Bombus</i>		1490,0	70,9	210	5	145,3	40000 ^b	5812,0
Inne Apoidea		80,0	1,4			2,9		116,0
Suma		4410,0	100,0			205,0		8200,0
Rzepak								
<i>Apis mellifera</i>		30000,0	99,0			670,7		53656,0
<i>Bombus</i> i inne Apoidea		117,0	0,5	2710	2032,6	3,4	80000	272,0
Suma		30117,0	99,5			674,1		53928,0
Gryka								
<i>Apis mellifera</i>		13383,5	91,9			367,6		9925,2
<i>Bombus</i> i inne Apoidea		670,0	4,5	1000	600	18,0		486,0
Suma		14053,5	96,5			385,6		10411,2
Jabłoń								
<i>Apis mellifera</i>		1000,0	94			25,4 ^e		932180,0
<i>Bombus</i>		30,0	3	32 ^d	5 ^d	0,8 ^d	36,7 ^e	29360,0
Inne Apoidea		20,0	2			0,5 ^e		18350,0
Suma		1050,0	99			26,7 ^e		979890,0



Rys. 1. Zbiory lucerny (na nasiona) i efekt ekonomiczny uzyskany w wyniku zapylania przez pszczołę miodną i dziko żyjące pszczoły w Polsce.

Warto w tym miejscu podkreślić, że lucerna należy do niewielu krajowych roślin uprawnych bardzo ściśle zależnych od zapylania przez dziko żyjące pszczoły. W trzech czwartych winna być zapylana przez owady, których liczebność jest często niewystarczająca. Między innymi jest to główną przyczyną

zawodności plonowania lucerny. Stąd i konieczność zakupu drogich nasion za granicą. Możliwości poprawienia tej sytuacji należy szukać między innymi we wzroście populacji dziko żyjących *Apoidea* przez odpowiednią gospodarkę rolniczą, uwzględniającą zasady ekologii; prowadzenia sztucznej hodowli dzikich zapylaczy oraz typowaniu odpowiednich miejsc pod plantacje nasienne z uwzględnieniem zasobów naturalnych dzikich pszczołowatych w danej okolicy.

KONICZYNA CZERWONA

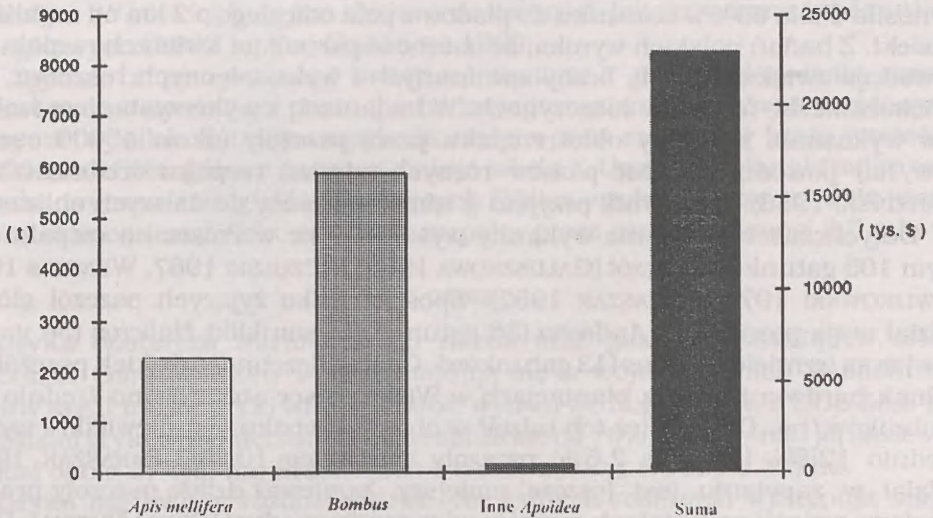
Koniczynę czerwoną zalicza się do najważniejszych roślin pastewnych. W Polsce uprawy zajmują obecnie około 600 tys. ha. Polska jest również, obok dawnej Czechosłowacji, największym producentem materiału siewnego w Europie. W końcu lat osiemdziesiątych zbierano nasiona z powierzchni 40 tys. ha (CORREIA i TASEI 1989).

Koniczyna czerwona, podobnie jak lucerna, jest rośliną wybitnie obcopylną i owadopylną. Kwiaty pozbawione dostępu owadów zapylających nie zawiązują prawie wcale nasion. Według niektórych doniesień (na przykład FREE 1970) koniczyna czerwona nie oblatywana przez owady zapylające może wytworzyć pewną ilość nasion, które mogą stanowić jednak najwyżej 6% plonu uzyskanego przy dobrym zapyleniu.

Dzięki badaniom nad biologią kwitnienia i zapyłania koniczyny czerwonej oraz szeroko zakrojonym badaniom terenowym, które objęły obszar całego kraju, dysponujemy cennymi danymi, pozwalającymi określić zagęszczenie i udział poszczególnych gatunków pszczół w zapyłaniu tej rośliny.

Obserwacje prowadzone w Polsce na uprawach koniczyny czerwonej wykazały jej oblot przez 78 gatunków *Apoidea* (BŁĄZEJEWSKA i współaut. 1961, HONCZARENKO 1965, WÓJTOWSKI 1965, 1967, RUSZKOWSKI i BILIŃSKI 1968, ANASIEWICZ 1976, BILIŃSKI 1977, SOWA i współaut. 1977, 1983, BANASZAK 1984). Najliczniej koniczynę czerwoną oblatuje pszczoła miodna. Jej liczebność, w zależności od regionu, pogody i roku badań waha się od 0 do 25 000 osobników/ha i wynosi średnio 2840 osobników/ha. Liczebność trzmieli dochodzi do 23 750 osobników/ha, przy średnim zagęszczeniu 1 490 osobników/ha. Najliczniej na koniczynie czerwonej występują: *Bombus terrestris* (L.), *B. lucorum* (L.), *B. pascuorum* (Scop.), *B. ruderarius* Müll., *B. lapidarius* (L.), *B. hortorum* (L.) i *B. muscorum* (L.); Pszczoły samotnice (głównie *Andrena gelriae* Vecht i *Melitta leporina* Pz.) i trzmielce są wyraźnie mniej liczne — ich zagęszczenie dochodzi do 1 100 osobników/ha, przy średnim zagęszczeniu zaledwie 80 osobników/ha. Liczebność poszczególnych gatunków pszczół na plantacjach koniczyny czerwonej nie odzwierciedla jednak ich udziału w zapyłaniu. Jak wykazały szczegółowe badania, efektywność pracy poszczególnych gatunków pszczół różni się wyraźnie (JABIOŃSKI 1975), ponadto większość pszczół miodnych i niektóre trzmielce pobierają nektar przez otwory wygryzione z boku korony kwiatowej. Uwzględniając te fakty oraz liczebność poszczególnych gatunków *Apoidea* na plantacjach stwierdzono, że w warunkach Polski koniczyna czerwona jest zapyłana średnio w 27,7% przez pszczołę miodną, 22,8% przez trzmielce krótkożyzyczkowe (*Bombus* s. str.), 48,1% przez pozostałe gatunki trzmieli oraz w 1,4% przez pozostałe *Apoidea* (pszczoły samotnice i trzmielce) (SOWA i współaut. 1983).

Po uwzględnieniu wyżej wymienionych danych, a także średniego plonu koniczyny czerwonej, samopłodności (przyjęto 2,4% plonu całkowitego — po uwzględnieniu danych zawartych w pracy FREE 1970) i areалу upraw nasiennych, zbiory uzyskane dzięki zapyleniu przez pszczoły w skali kraju wynoszą 8 200 ton, co daje produkt o wartości 21,5 mln \$ (cena 1kg — 5,50 nowych zł) (tab. 1 i rys. 2).



Rys. 2. Zbiory koniczyny czerwonej (na nasiona) i efekt ekonomiczny uzyskany w wyniku zapylenia przez pszczołę miodną i dziko żyjące pszczoły w Polsce.

Podobnie jak w przypadku lucerny, plony nasion koniczyny czerwonej są silnie zależne od zapylenia przez dziko żyjące pszczoły, szczególnie trzmielę. Z tego względu jest korzystne lokalizowanie upraw w rejonach licznego występowania trzmieli. Do takich rejonów należą w Polsce województwa północno-, środkowo- i południowo-zachodnie (SOWA i współaut. 1983, RUSZKOWSKI i współaut. 1992). Lokalnie do terenów o bogatszych zasobach owadów zapyłających należą urozmaicone tereny rolnicze z dużym udziałem (około 20%) zadrzewień śródpolnych, kęp krzewów, miedz i innych tak zwanych użytków ekologicznych. Lokalizacja upraw nasiennych na takich terenach może znacznie zwiększyć plon nasion.

RZEPAK

Rzepak ozimy jest najważniejszą i najszerszej uprawianą rośliną oleistą w Polsce. Areal zasiewów wynosi obecnie 461,7 tys ha (razem z rzepikiem) (Rocznik Statystyczny 1993).

Kwiaty są obupłciowe, przedślupne. Z tego względu nie następuje samoza-pylenie, ale możliwe jest zapylenie sąsiedzkie, kiedy na znamię dostanie się pyłek z rozwiniętych wcześniej kwiatów tej samej rośliny. W pewnym stopniu kwiaty rzepaku są więc samopłodne. Wysokie plony zapewnia jednak tylko zapylenie krzyżowe. Przy takim zapyleniu stwierdzono bowiem zwiększenie się ciężaru

nasion (FECHNER 1927 — za FREE 1970). Lepsze zapylenie wpływa na równomierne dojrzewanie nasion, co umożliwia trafniejszy wybór terminu sprzętu. Literatura przedmiotu podaje różne wielkości wzrostu plonów w efekcie dobrego zapylenia. Według KOLARIKA (1964), dobre zapylenie może zwiększyć plony od 25% do 126%. Doświadczenia przeprowadzone w dawnej Czechosłowacji wykazały, że zwyczajka plonów z pola rzepaku, na którym ustawiono ule z pszczołmi, wynosiła około 65% w stosunku do plonów z pola odległego o 2 km od najbliższej pasieki. Z badań polskich wynika, że obecność pszczół na kwiatkach rzepaku nie powoduje zwiększenia się liczby zawiązanych i wykształconych łuszczyn, lecz zwiększa liczbę nasion w łuszczynach. W badaniach z wykorzystaniem izolatorów wykazano, że dobry oblot rzepaku przez pszczoły (około 45000 osobników/ha) powoduje wzrost plonów różnych odmian rzepaku średnio o 25% (JABŁOŃSKI 1986). Ten wynik przyjęto w niniejszej pracy do dalszych obliczeń.

Dotychczasowe badania wykazały występowanie w Polsce na rzepaku ozimym 105 gatunków pszczół (GAŁUSZKOWA 1965, MICZULSKI 1967, WENGRIS 1973, PAWLIKOWSKI 1978, BANASZAK 1982). Spośród dziko żyjących pszczół główny udział mają pszczolinki *Andrena* (36 gatunków) i smukliki *Halictus* (36 gatunków) oraz trzmiele *Bombus* (13 gatunków). Ogólna liczebność dzikich pszczół jest jednak bardzo niska. Na plantacjach w Wielkopolsce stwierdzono średnio 117 osobników/ha. Dlatego też ich udział w oblocie rzepaku jest niewielki i wynosi średnio 12,8% (trzmiele 2,5%, pszczoły samotnice 10,3%, BANASZAK 1982). Udział w zapyleniu jest jeszcze mniejszy, ponieważ dzikie pszczoły pracują o połowę wolniej na kwiatkach rzepaku od pszczoły miodnej (FREE i NUTTALL 1968, RADČENKO 1964). Na plantacjach, na które są podwożone pasieki, udział dzikich zapyłaczy w oblocie rzepaku (oprócz pszczół występują również muchówki) nie przekracza 1% (JABŁOŃSKI 1986). Dla uproszczenia przyjęto, że udział procentowy w zapyleniu rzepaku wynosi wtedy 99% dla pszczoły miodnej i po 0,5% dla pozostałych *Apoidea* i innych owadów. Podstawowym zapyłaczem w tych warunkach jest pszczoła miodna. Jej zagęszczenie jest bardzo zmienne i zależy od wielkości plantacji (BANASZAK i CIERZNIAK 1994), liczby uli, wydajności miodowej (BOBRZECKA i BOBRZECKI 1973) i oczywiście od tego czy na daną plantację zostały podwiezione rodziny pszczele. Przy braku pasiek w pobliżu upraw rzepaku zagęszczenie pszczoły miodnej dochodzi do 1000 osobników/ha (BANASZAK 1982). Wskutek takiej liczebności wzrost plonów w wyniku zapylenia jest minimalny (około 1% — przy założeniu, że wzrost plonów jest wprost proporcjonalny do liczby zapyłających pszczół). W tej sytuacji należy uwzględnić przede wszystkim plantacje rzepaku zapylane przez specjalnie podwożone pasieki. Ponieważ brak jest danych o liczbie rodzin pszczelich, wywożonych corocznie na plantacje rzepaku, przyjęto, że maksymalnie 20% rodzin może być podwiezionych na kwitnące uprawy rzepaku — taka liczba pasiek jest bowiem przystosowana do transportu (PIDEK 1992). Jako ogólną liczbę rodzin w Polsce przyjęto średnią z trzech ostatnich lat (1990–1993) — 1,2 mln. Wynika z tego, że około 240000 rodzin może zapylać rzepak. Optymalnie zapyłone może być w takiej sytuacji około 80000 ha, na których wzrost plonu, wywołany dobrym zapyleniem, sięga 25%.

Do obliczeń efektu ekonomicznego zapylenia nie można zastosować średniego plonu krajowego, ponieważ w większości (około 80%) odnosi się on do plantacji

słabo zapyłonych. Spowodowałoby to znaczne obniżenie wyniku obliczeń. Aby tego uniknąć, obliczono średni plon z plantacji dobrze zapyłonych. Takiej wielkości nie podają oczywiście dane GUS. Znając jednak areal ogólny, areal dobrze zapyłonych plantacji (wielkość przez nas założona), ogólne zbiory i plon uzyskany bez zapylenia (— 75% plonu uzyskanego przy dobrym zapyleniu. łatwo obliczyć średni plon z upraw rzepaku dobrze zapyłonych przez pszczoły. Wynosi on 2710,1 kg/ha i jest zbliżony do wartości, jaką uzyskano w badaniach szczegółowych (2985 kg/ha) (JABIOŃSKI 1986).

Zgodnie z poczynionymi wyżej założeniami i po uwzględnieniu arealu zasiewów oraz średniego plonu pochodzącego z plantacji dobrze zapyłonych, zbiory w wyniku dobrego zapylenia części upraw rzepaku w kraju wzrastają o 53928 ton. Szczegółowe dane prezentuje tabela 1. Uwzględniając aktualne ceny rzepaku notowane na giełdach rolniczych (330 nowych zł/t przy zakupie prosto z pola) ekonomiczny efekt zapyłania rzepaku przez pszczoły wynosi 8,5 mln \$.

GRYKA

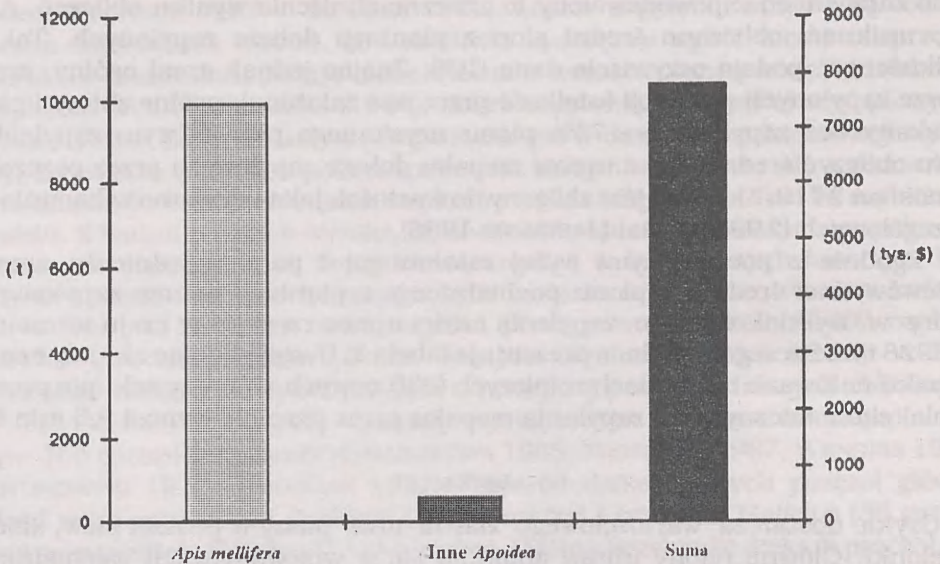
Gryka dostarcza wartościowego ziarna oraz paszy w postaci plew, słomy i zielonki. Główne rejony upraw znajdują się w województwach wschodnich. Ogólny areal upraw gryki wraz z prosem wynosi według statystyk GUS 38,3 tys. ha. Udział gryki w wymienionej liczbie zbliża się do 70%, a więc areal jej zasiewów wynosi około 27 tys. ha. Średni plon z hektara waha się około 1 t/ha.

Gryka ma kwiaty różnosłupkowe. Na jednych roślinach występują słupki krótsze od pręcików, na innych roślinach odwrotnie. Powoduje to, że zapylenie kwiatów, a więc i plony są silnie zależne od owadów.

W Polsce przeprowadzono nieliczne badania nad składem i zagęszczeniem pszczół oblatujących grykę. BANASZAK (1984) stwierdził oblot kwiatów gryki przez 6 gatunków pszczół, wśród których zdecydowanie dominowała pszczoła miodna (95%). Ogólne zagęszczenie pszczół wahało się w granicach 3250–31050 osobników/ha, średnio wynosiło 14083,5 osobników/ha. Również według JABIOŃSKIEGO i SZKLANOWSKIEJ (1990) kwiaty gryki są odwiedzane głównie przez pszczoły miodne, które stanowią średnio 92,4% ogółu entomofauny zapyłającej. Udział trzmieli wynosił średnio 3,6%, pszczół samotnic 0,5% a muchówek 3,5%. Średnie zagęszczenie pszczoły miodnej wynosiło 50–60 tys. osobników/ha.

Badania JABIOŃSKIEGO i SZKLANOWSKIEJ (1990) z zastosowaniem izolatorów wykazały, że dobry oblot gryki przez pszczoły zwiększa plonowanie ziarna o 35% u powszechnie uprawianej odmiany Hruszczowska oraz o 50% u odmiany tetraploidalnej Emka. Badania zagraniczne wykazują nawet wyższy wzrost plonów dzięki dobremu zapyleniu. MATERIKINA (1956 — za FREE 1970) stwierdziła 2,5-krotny wzrost plonów na plantacji, na której znajdowała się pasieka w stosunku do uprawy oddalonej o 1,5 km od pasieki. KOPELKIEVSKI (1960 — za FREE 1970) w zbliżonej sytuacji uzyskał wzrost plonów o 58%. Dla potrzeb niniejszej pracy przyjęto wzrost plonów o 40% przy średnim oblocie przez pszczoły (10–15 tys. osobników/ha).

Obliczenia wykonane w oparciu o zaprezentowane wyniki wykazały, że dzięki zapyłającej działalności pszczół plony nasion gryki wynoszą w skali kraju około 10,5 tys. ton i stanowią wartość 8,7 mln \$ (tab. 1, rys. 3).



Rys. 3. Zbiory gryki i efekt ekonomiczny uzyskany w wyniku zapylenia przez pszczołę miodną i dziko żyjące pszczoły w Polsce.

JABŁOŃ

Jabłoń jest najważniejszą rośliną sadowniczą w Polsce. W latach 1990–1992 było w kraju średnio 36,6 mln jabłoni, co stanowi 60% ogólnej liczby drzew owocowych. Udział jabłek w ogólnych zbiorach owoców był jeszcze większy i wynosił 83,3%. Według danych GUS, średnie zbiory wynoszą 1175300 ton rocznie.

Większość uprawianych w Polsce odmian jest samobezpłodna i dla wydania owocu musi być zapylna pyłkiem innej odmiany. Takie zapylenie zapewniają owady. Najliczniejszym zapylnicem w sadach jabłoniowych jest pszczoła miodna. Jej udział zazwyczaj przekracza 90% wszystkich zapylniczy. BORNUS i współpracownicy (1976b) stwierdzili, że kwiaty jabłoni są zapylane w 60%–99% przez pszczołę miodną, 0,3%–10% przez trzmiele oraz 0,1%–40% przez inne owady. W ostatniej grupie owadów niemal całość stanowiły muchówki i tylko pojedyncze owady należały do pszczół samotnic. Prace zagraniczne określają udział pszczoły miodnej w przedziale od 75% do 99% (MENKE 1952, TSYGANKOV 1953, Wafa i IBRAHIM 1957, DYCE 1958, FREE 1966 — za FREE 1970.) Należy jednak zaznaczyć, że czasem notuje się również znaczny udział pszczół dziko żyjących w zapyłaniu jabłoni. ANASIEWICZ (1972) stwierdziła, że pszczoły samotnice i trzmiele stanowiły 31% owadów zapyłających. Wśród pszczół samotnic największe znaczenie posiada rodzaj *Andrena*, zwłaszcza *A. varians* (K.), *A. propinqua* Schck., *A. haemorrhoea* (F.) i *A. jakobi* Perk. Spośród trzmieli najczęściej wymienianymi gatunkami są *Bombus hypnorum* (L.), *B. terrestris* (L.), *B. lucorum* (L.), *B. pascuorum* (Scop.) i *B. pratorum* (L.) (RUSZKOWSKI i BILIŃSKI 1968). Udział procentowy poszczególnych grup owadów może więc różnić się znacznie

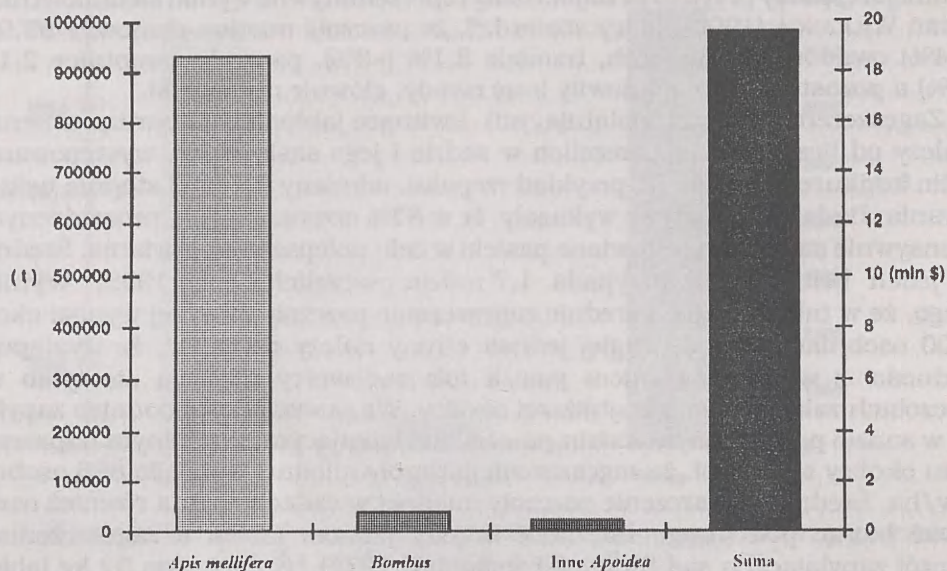
w zależności od roku, miejsca badań i odmiany. Ponieważ brak jest szerzej zakrojonych badań w skali kraju trzeba przyjąć pewną wartość średnią. W niniejszej pracy przyjęto za najbardziej reprezentatywne wyniki siedmioletnich badań WILKAŃCA (1990), który stwierdził, że pszczoły miodne stanowiły 93,9% (~94%) owadów zapylających, trzmiel 3,1% (~3%), pszczoły samotnice 2,1% (~2%) a pozostała część stanowiły inne owady, głównie muchówki.

Zagęszczenie pszczół oblatujących kwitnące jabłonie jest bardzo zmienne i zależy od liczby rodzin pszczelich w sadzie i jego sąsiedztwie, występowania roślin konkurencyjnych, na przykład rzepaku, odmiany drzewa i stopnia nektarowania. Badania ankietowe wykazały, że w 82% nowoczesnych, prowadzonych intensywnie sadów są wystawiane pasieki w celu polepszenia zapylenia. Średnio na jeden hektar sadu przypada 1,7 rodzin pszczelich (PIDEK 1992). Wynika z tego, że w takich sadach średnie zagęszczenie pszczoły miodnej wynosi około 5000 osobników/ha. Z drugiej jednak strony należy pamiętać, że występują trudności z wydzierżawianiem pasiek lub sadownicy opierają się tylko na pszczołach zalatujących z najbliższej okolicy. WILKANIEC (1990) badając zapylenie w sadzie pozbawionym rodzin pszczelich i bazującym na ogólnym napszczeniu okolicy stwierdził, że zagęszczenie pszczoły miodnej wynosiło 886 osobników/ha. Średnie zagęszczenie pszczoły miodnej w sadach można również oszacować biorąc pod uwagę zależność między plonem jabłek a zagęszczeniem pszczół zapylających sad (BORNUS i współaut. 1976). Średni plon 32 kg jabłek z drzewa wskazuje, że średnie zagęszczenie pszczoły miodnej w sadach jabłoniowych wynosi około 1000 osobników/ha.

Większość odmian jabłoni można zaliczyć do kategorii roślin całkowicie zależnych od pszczół. Są znane wprawdzie odmiany częściowo samopłodne, jak na przykład Golden Delicious i James Grieve, jednak nawet u tych odmian zapylenie krzyżowe zwiększa plon od 25% do 50%. Ponadto owoce powstałe w wyniku samozapylenia mają gorsze walory smakowe, a większość zawiązków owoców powstałych z samozapylenia opada, chociaż jest ich mniej niż drzewo potrafi wyżywić (JABIOŃSKI i współaut. 1979, 1981. W badaniach z wykorzystaniem izolatorów wykazano, że drzewa odmian Jonatan i Bankroft pozbawione dostępu pszczół wytwarzały zaledwie od 0,12 kg do 3,25 kg (średnio 1,3 kg/drzewo), co stanowiło średnio 2,3% wagi owoców uzyskanych przy optymalnym zapyleniu (BORNUS i współaut. 1976), LIPIŃSKI (1976) podaje, że plon jabłek przy braku zapylenia wynosi 4,4 kg/drzewo. JABIOŃSKI i współpracownicy (1979) stwierdzili, że 23 badane przez nich odmiany jabłek można podzielić na dwie grupy różniące się zdolnością zawiązywania i wykształcania owoców przy zapyleniu własnym pyłkiem: odmiany o niskim stopniu samopłodności oraz odmiany o wyższym stopniu samopłodności. Jabłonie pierwszej grupy odmian pozbawione dostępu pszczół wytwarzały 19,5% ilości owoców w stosunku do drzew dobrze zapylnych — w drugiej grupie odmian procent ten wynosił 4,9%.

Uwzględniając odmiany częściowo samopłodne przyjęto, że w wyniku samopłodności średnio w polskich sadach można uzyskać 5 kg jabłek z jednego drzewa, pozostała część zbiorów powstaje w wyniku zapylenia jabłoni przez owady zapylające, głównie pszczoły. W skali kraju daje to prawie 980 tys. ton (tys. 4). Ponieważ cena jabłek w zależności od odmiany, jakości i miesiąca wykazuje duże wahania (od 0,04 nowych zł/kg — jabłka przemysłowe do 0,65 nowych zł/kg — niektóre

odmiany jabłek konsumpcyjnych) wartość uzyskanych w wyniku zapylenia jabłek można określić w przedziale od 18,7 mln \$ do 303,3 mln \$.



Rys. 4. Zbiory jabłek i minimalny efekt ekonomiczny uzyskany w wyniku zapylenia przez pszczołę miodną i dziko żyjące pszczoły w Polsce.

WNIOSKI

1. Oceniono wpływ pszczoły miodnej i pszczół dziko żyjących (*Apoidea*) na wydajność plonowania i oszacowano wartości plonów pięciu roślin uprawianych w Polsce, zależnych od działalności zapyłającej owadów: lucerny, koniczyny czerwonej, rzepaku, gryki i jabłoni.

2. Największy udział (92%–99%) w zapyłaniu rzepaku, gryki i jabłoni ma pszczoła miodna, natomiast plonowanie lucerny wybitnie zależy (powyżej 90%) od pszczół dziko żyjących, zaś koniczyny czerwonej w znacznym stopniu (ponad 70%) od dobrego zapylenia przez dzikie pszczoły, głównie przez trzmielce.

3. W wyniku przeprowadzonych szacunków, uwzględniając areał upraw, średnie zagęszczenie *Apoidea* oraz ich udział w zapyłaniu wyliczono, że zbiory 5 roślin uprawnych w Polsce w wyniku zapylenia przez pszczoły są następujące:

- nasiona lucerny — 790,1 t;
- nasiona koniczyny czerwonej — 8200,0 t;
- rzepaku — 53928,0 t;
- gryki — 10411,0 t;
- jabłek — 979890,0 t.

Odpowiednie efekty ekonomiczne uzyskane w wyniku zapylenia przez owady pszczołowate w Polsce są następujące:

- nasiona lucerny — 1,9 mln \$;

- nasiona koniczyny czerwonej — 21,5 mln \$;
- rzepaku — 8,5 mln \$;
- gryki — 8,7 mln \$;
- jabłoni — 18,7 mln \$—303,3 mln \$.

Ogólny efekt ekonomiczny zapylenia 5 roślin jest równy 59,2 mln — 343,8 mln \$. W tym wartość plonów uzyskanych z działalności pszczoły miodnej wynosi 40,6 mln — 311,4 mln \$, a łącznie przez dziko żyjące pszczoły 18,5 mln — 32,4 mln \$.

ECONOMICAL EFFECTS OF ARABLE CROPS POLLINATION BY HONEY BEE AND WILD BEES (APOIDEA)

Summary

Economical effects of pollination of five crops: alfalfa, red clover, rapeseed, buckwheat and apple tree by honey bee and wild Apoidea in Poland were estimated. From the estimates taking into account crop acreage, mean density of Apoidea and their contribution to pollination, the yields of the five crops in Poland due to pollination by bees were calculated. The total economical effect of pollination of the five crops by bees equals 59.2 mln-343.8 mln \$, per year.

LITERATURA

- ANASIEWICZ A., 1972. *Oblot niektórych gatunków drzew owocowych i porzeczek czarnej przez błonkówki pszczołowe (Hymenoptera, Apoidea)*. Pol. Pismo Entomol. 52, 491-506.
- ANASIEWICZ A., 1973. *Błonkówki pszczołowe (Apoidea, Hymenoptera) występujące na plantacjach lucerny mieszańcowej (Medicago media Pers.) i skład florystyczny zebranego przez nie pyłku*. AR Lublin, Rozprawy naukowe 5, 1-39.
- ANASIEWICZ A., 1976. *Dzikie błonkówki pszczołowe (Apoidea, Hymenoptera) występujące na plantacjach lucerny mieszańcowej (Medicago media Pers.) i skład florystyczny zebranego przez nie pyłku*. AR Lublin, Rozprawy naukowe 5, 1-39.
- ANASIEWICZ A., 1975. *The bees (Apoidea, Hymenoptera) on alfalfa (Medicago media Pers.) plantations. I. The species composition and variation of flights*. Ekol. Pol. 23, 129-146.
- BANASZAK J., 1982. *Występowanie i zagęszczenie pszczół (Hymenoptera, Apoidea) na rzepaku ozimym*. Bad. Fizjograf. Pol. Zach. C-Zoologia 33, 117-127.
- BANASZAK J., 1984. *Występowanie i zagęszczenie pszczół (Apoidea) na plantacjach wybranych roślin uprawnych w Wielkopolsce*. Pol. Pismo Entomol. 53, 623-631.
- BANASZAK J., 1987. *Pszczoły i zapylenie roślin*. PWRIL, Poznań, 255 ss.
- BANASZAK J., 1991. *A checklist of the bee-species (Apoidea) of Poland with remarks to their taxonomy and zoogeography*. Acta Univ. Lodzensis, Folia Zool. 7, 15-66.
- BANASZAK J., 1993. *Ekologia pszczół*. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa-Poznań, 263 ss.
- BANASZAK J. CIERZNIK T., 1994. *The effect of neighbouring environments and the acreage of winter rapeseed plantation on differentiation and density of Apoidea*. Zesz. Nauk. WSP w Bydgoszczy, Studia Przyrodnicze 10, 25-38.
- BILIŃSKI M., 1977. *Oblot koniczyny czerwonej przez owady zapyłające*. Pol. Pismo Entomol. 47, 487-505.
- BŁĄŻEJWSKA A., LEJA S., MATYSIAK T., 1961. *Z obserwacji nad występowaniem trzmieli (Bombus Latr.) na uprawach koniczyny czerwonej w okolicy Torunia*. Zesz. Nauk. UMK Toruń, Biol. 8, 51-107.
- BOBRZECKA D., BOBRZECKI J., 1973. *Wpływ zróżnicowanego nawożenia mineralnego na nektarowanie, obloty przez pszczoły oraz plonowanie rzepaków*. Pszczeln. Zesz. Naukowe 17, 87-109.
- BORNUS L., JABŁOŃSKI B., KRÓL S., 1976. *Próba określenia optymalnej ilości pszczół do dobrego zapylenia sadu jabłoniowego*. Pszczeln. Zesz. Nauk. 20, 1-20.
- BORNUS L., JABŁOŃSKI B., KRÓL S., KUNA K., BYSTYDZIŃSKI W., OPALA M., CEGŁOWSKI M., RECHNIO H., MICHAŁSKI W., STĘPOROWIE J. I J., 1976b. *Próba określenia optymalnej ilości pszczół do dobrego zapylenia sadu jabłoniowego*. Pszczeln. Zesz. Nauk. 20, 21-39.

- CARLSON J. W., EWANS R. J., PEDERSEN M. W., STOKER G. L., 1950. *Growing alfalfa for seed in Utah*. Circ. Utah. agric. Exp. Stn. 125.
- CORREIA M. L. M., TASEI J. N., 1989. *Survey on pollinators of legumes in Europe*. [W:] *Unconventional methods in lucerne breeding*. Proceedings. Medicago sativa Working Group Meeting, ss. 30-36.
- DYCE E. J., 1958. *Honeybees and the pollination problem in New York State*. Glean. Bee Cult. 86, 140-143.
- DYLEWSKA M., JABŁOŃSKI B., SOWA S., BILIŃSKI M., WRONA S., 1970. *Próba określenia liczby pszczoł (Hym., Apoidea) potrzebnych do należytego zapylenia lucerny*. Pol. Pismo Entomol. 40, 2, 371-398.
- FECHNER E., 1927. *Untersuchungen über die Einwirkung eines Rückganges der Bienenzucht auf den Samenertrag einiger landwirtschaftlichen Kulturpflanzen*. Arch. Bienenk. 8, 1-72.
- FREE J. B., 1970. *Insect Pollination of Crops*. Academic Press Inc, London, 544 ss.
- FREE J. B., 1966. *The pollinating efficiency of honeybee visits to apple flowers*. J. hort. Sci. 41, 91-94.
- FREE J. B., NUTTALL P. M., 1968. *Effect of the time of day at which honeybee colonies are first allowed flight in a new location on their choice of flower species*. Nature (London) 218, 982.
- GALUSZKOWA H., 1965. *Pszczołowate (Apidae) zebrane na rzepaku ozimym na Niżu i Wyżu Dolnego Śląska*. Pol. Pismo Entomol., ser. B, 3-4, 218-228.
- HONCZARENKO J., 1965. *Trzmielie (Bombus Latr.) zapylające koniczynę czerwoną (Trifolium pratense L.) w okolicach Szczecina*. Tow. Wyd. Przyr. Roln. 20, 3-60.
- JABŁOŃSKI B., 1970. *Badania biologii kwitnienia i zapylania lucerny mieszańcowej (Medicago media Pers.)*. Pszczeln. Zesz. Nauk. 14, 1-74.
- JABŁOŃSKI B., 1975. *Zagęszczenie owadów pszczołowych na koniczynie czerwonej potrzebne do dobrego jej zapylenia*. Pszczeln. Zesz. Nauk. 19, 13-29.
- JABŁOŃSKI B., 1986. *Nektarowanie i wydajność niskoenergetycznych odmian rzepaku*. Pszczelarstwo 4, 3-6.
- JABŁOŃSKI B., SKOWRONEK J., MARCINKOWSKI J., MALEWSKI W., 1981. *Owocowanie jabłoni (James Grieve i Golden Delicious) po zapyleniu ich własnym pyłkiem przez pszczoły*. Pszczeln. Zesz. Nauk. 25, 129-139.
- JABŁOŃSKI B., ZMARLIKI C., SKOWRONEK J., 1979. *Wyniki badań stopnia samopłodności jabłoni*. Pszczeln. Zesz. Nauk. 23, 115-122.
- JABŁOŃSKI B., SZKLANOWSKA K., 1990. *Wartość pszczelarska i wymogi zapylania gryki tetraploidalnej*. Pszczeln. Zesz. Nauk. 34, 51-56.
- JABŁOŃSKI B., SZKLANOWSKA K., DAŃSKA B., 1978. *Badanie biologii kwitnienia, nektarowania i zapylania jabłoni (Malus domestica Borkh.)*. Pszczeln. Zesz. Nauk. 22, 129-145.
- JANY H., 1973. *Die Bedeutung der wildlebenden Apiden für die Luzerne-Saatguterzeugung*. Zesz. Probl. Post. Nauk Roln. 131, 85-91.
- KOLARIK J., 1964. *Efektivnost' opylovců einosti v fely medonosne u repky*. Včelárství 17, 4, 56-59.
- KOPELKIEVSKI G. V., 1960. *Bees and the buckwheat seed crop*. Pčelovodstvo 37, 36-39.
- LIPIŃSKI M., 1976. *Pożytki pszczoły — zapylanie i miódodajność*. PWRiL, Warszawa, 424 ss.
- MATERIKINA E. I., 1956. *Supplementary pollination of buckwheat*. Zemledelie 4, 127.
- MENKE H. F., 1952. *Behavior and population of some Insect Pollinators of apples in Eastern Washington*. Rep Iowa St. Aplarist 66-93.
- MICZULSKI B., 1967. *Błonkówki (Hymenoptera) w biocenozie upraw rzepaku. Część IV. Żądłowki (Aculeata)*. Pol. Pismo Entomol. 37, 3, 486-506.
- PALMER-JONES T., FORSTER I. W. (1965). *Observations on the pollination of lucerne (Medicago sativa Linn.)*. N. Z. Jl agric. Res. 8, 340-349.
- PAWLIKOWSKI T., 1978. *Związki pokarmowe pszczołowych (Hymenoptera, Apoidea) występujące na uprawach rzepaku ozimego — Brassica napus L. z innymi roślinami zielnymi w okolicy Torunia*. Pol. Pismo Entomol. 48, 267-277.
- PESENKO A. YU., 1992. *Isopolzowanie pfel (Hymenoptera, Apoidea) dlja opylenija ljucerny; osnovnye napravlenija sistema mier, metody ocenki zasposov dikich pfel i effektivnost opyltitielej*. Entomol. Obozr. 71, 2, 249-266.
- PETERSEN H. L., 1954. *Pollination and seed setting in lucerne*. Askr. k. Vet.- Landbohojksk 138-160.
- PIDEK A., 1992. *Wykorzystanie pszczoł do zapylania roślin sadowniczych w polsce 1987-1990*. Pszczeln. Zesz. Nauk. 36, 15-19.
- RADČENKO T. G., 1964. *The influence of pollination on the crop and the quality of seed of winter rape*. Bdzhl'nitstvo 1, 68-74.
- RUSZKOWSKI A., 1968. *Oblot lucerny przez trzmielie*. Pam. Puł. 31, 189-200.
- RUSZKOWSKI A., BILIŃSKI M., 1968. *Oblot koniczyny czerwonej przez trzmielie*. Pam. Puł. 36, 301-320.

- RUSZKOWSKI A., BILIŃSKI M., 1968. Skład gatunkowy trzmieli oblatujących rośliny różowate i skalnicowate. Pszczeln. Zesz. Nauk. 12, 43-66.
- RUSZKOWSKI A., WÓJTOWSKI F., 1970. Przegląd badań polskich nad owadami zapyłającymi lucernę. Rocz. Nauk Roln.
- RUSZKOWSKI A., BILIŃSKI M., SOWA S., KOSIOR A., 1992. Localization of bumblebee species in Poland. [W:] Natural resources of wild bees in Poland. BANASZAK J. (red). Pedagogical Univ. Bydgoszcz 79-92.
- SOWA S., DYLEWSKA M., JABIOŃSKI B., BILIŃSKI M., 1979. Próba wyjaśnienia przyczyn licznego występowania dzikich Apoidea na plantacji lucerny w Nowosiótkach. Pszczeln. Zesz. Nauk. 23, 131-139.
- SOWA S., RUSZKOWSKI A., BAWOLSKI S., BILIŃSKI M., 1977. Number of pollinator insects with reference to seed setting in red clover in different regions of Poland. Pszczeln. Zesz. Nauk. 21, 219-227.
- SOWA S., RUSZKOWSKI A., BILIŃSKI M., KOSIOR A., 1983. Liczebność i skład gatunkowy owadów zapyłających koniczynę czerwoną (*Trifolium pratense* L.) w Polsce w latach 1972-1975. Biuletyn IHAR 151, 147-161.
- SOWA S., 1973. Z badań nad owadami zapyłającymi lucernę w Polsce. Zesz. Probl. Post. Nauk Roln. 131, 145-152.
- TSYGANKOV S. K., 1953. Pollination by bees increases the number and improves the quality of fruit. Pčelovodstvo 30, 36-38.
- WAF A. K., IBRAHIM S. H., 1957. The honeybee as an important insect for pollination. Bull. Fac. Agric. Ain Shams Univ. 162.
- WENGRIS J., 1973. Z badań nad owadami zapyłającymi rzepak ozimy (*Brassica napus* L. subsp. *oleifera* (Metzg) Sink, for. *biennis*) i rzepik (*Brassica campestris* L.). Zesz. Nauk. ART Olsztyn, Rolnictwo 4, 249-255.
- WILKANIEC Z., 1990. Intensywność i efektywność oblotu jabłoni przez owady zapyłające w zależności od formy korony i odmiany. Roczniki AR w Poznaniu, Rozprawy Naukowe zesz. 207, 1-55.
- WÓJTOWSKI F., 1965. Zastosowanie błonkówek pszczołowatych z rodzaju *Bombus* Latr. oraz *Anthophora* Latr., Hymenoptera, Apoidea do zapylenia plantacji nasiennych roślin motylkowych. Rocz. WSR Poznań 24, 223-274.
- WÓJTOWSKI F., 1967. Badania nad użytecznością gospodarczą pszczoł porobnic (*Anthophora parietina* F.) w nasiennictwie koniczyny czerwonej. Rocz. WSR Poznań 36, 271-282.

JÓZEF BANASZAK¹, HALINA RATYŃSKA¹, WOJCIECH SZWED²

¹Katedra Biologii i Ochrony Środowiska WSP,
Chodkiewicza 51, 85-667 Bydgoszcz;

²Katedra Botaniki Leśnej AR,
Wojska Polskiego 71D, 60-625 Poznań

WYSPY LEŚNE JAKO WAŻNY SKŁADNIK KRAJOBRAZU

Szczególnie cenny obiekt architektury bądź krajobrazu zwykło się określać perłą tej architektury lub krajobrazu. Dla przykładu, perłą architektury Wielkopolski jest z pewnością zamek kórnicki czy pałac w Rogalinie, a z kolei za perłę Wielkopolskiego Parku Narodowego można by uważać Jezioro Góreckie, gdyby mieszkańcy Poznania chcieli dać wiarę ekologom o jego wartości przyrodniczej i nie czynili z niego kąpieliska miejskiego. Do szczególnie cennych elementów struktury każdego krajobrazu rolniczego należą drobne kępy zadrzewień śródpolnych, prawdziwe wyspy pośród pól uprawnych, tkwiące niczym przysłowiowe perły w krajobrazie, o szczególnym znaczeniu ekologicznym. Kierowana jest ku nim uwaga coraz większej liczby ekologów. Tym wyspom środowiskowym z otuliny Parku Krajobrazowego Puszcza Zielonka jest poświęcony niniejszy artykuł. Ale najpierw co to jest Puszcza Zielonka i dlaczego badania krajobrazu rolniczego mają miejsce właśnie na jej obszarze?

„ŚNI MI SIĘ WIERZENICA”

„Puszcza Zielonka” jest potoczną nazwą dużego kompleksu leśnego, rozciągającego się między Poznaniem, Murowaną Gośliną, Skokami, Kiszkowem i Pobiedziskami. Obszar słabo zurbanizowany, niezmiernie za to atrakcyjny krajobrazowo, w znacznym stopniu zalesiony, chociaż nie brak enklaw rolniczych. Spośród 350 km² powierzchni, lasy zajmują około 150 km². Południowa część „Puszczy” leży na obszarze pasma środkowopoznańskiej moreny czołowej z kulminacją na Dziewiczej Górze — 143 m n.p.m. (ANDERS 1981). Na obszarze blisko 10 tysięcy ha w roku 1991 utworzono Park Krajobrazowy Puszcza Zielonka (PKPZ). Park osłania otulina o powierzchni ponad 12 tys. ha.

Ta niezmiernie bogata przyrodniczo część Wielkopolski ma również interesującą tradycję historyczną i kulturalną. Żeby wymienić tu chociażby Wierzenicę, starą wieś leżącą nad rzeką Główną, o której istnieniu mówią już historyczne zapiski z XII wieku (KOZIEROWSKI 1935), a której obszar był zamieszkiwany już w późnej epoce kamiennej. Mówią o tym prace wykopaliskowe prof. Józefa Kostrzewskiego, przeprowadzone na początku bieżącego stulecia w sąsiadują-



Zadrzewienie śródpolne w otulinie PK Puszcza Zielonka — refugium flory i fauny.

cym ze wsią zadrzewieniu śródpolnym, tak zwanym Żaliku (KOSTRZEWSKI 1920). Przede wszystkim jednak Wierzenica była siedzibą hr. Augusta Cieszkowskiego (1814–1894), jednego z najwybitniejszych przedstawicieli polskiej filozofii narodowej, a także działacza politycznego i społecznego. W jakimś sensie była też małym centrum ówczesnego życia kulturalnego i naukowego. Znanego filozofa odwiedzało bowiem wielu uczonych, literatów, polityków. August Cieszkowski był również współtwórcą i dwukrotnym prezesem najstarszego w Polsce towarzystwa naukowego, mianowicie Poznańskiego Towarzystwa Przyjaciół Nauk. W okresie szalejącej hakiety towarzystwo to skupiało poznańską inteligencję, umożliwiając jej intelektualną działalność, rozwój i przetrwanie. Autorowi *Ojczyzna* bliski był także rozwój nauk przyrodniczych, które z dużą uwagą śledził; między innymi wypowiadał się w swych pismach na temat świeżo ogłoszonej i gorąco wówczas dyskutowanej teorii Darwina. Brał aktywny udział w posiedzeniach wydziału przyrodniczego TPN i otaczał wydział ten szczególną opieką, niejednokrotnie wspomagając badania przyrodnicze środkami pochodzącymi z własnej kieszeni (CHŁAPOWSKI 1895). W czasie licznych podróży Cieszkowski obserwował postęp w światowym rolnictwie i rozumiał, że jedynie badania naukowe i postęp techniczny zastosowane w praktyce mogą zapewnić ziemianom Wielkiego Księstwa Poznańskiego odpowiednie miejsce i uznanie w świecie. Tak zrodziła się myśl powołania do życia szkoły rolniczej, która byłaby zarówno placówką naukowo-badawczą, jak też szkołą kształcąca ówczesnych organizatorów nowoczesnego rolnictwa. Pomysł swój najpierw zamierzał zrealizować w Wierzenicy, ostatecznie jednak został urzeczywistniony w postaci szkoły rolniczej im. Haliny Cieszkowskiej w Żabikowie pod Poznaniem w roku 1870.

Szkoła ta była prywatną szkołą zawodową stopnia średniego (HELLWIG 1979, GORYŃSKA-BITTNER i STĘPIEŃ 1994).

Serdeczna przyjaźń łączyła Augusta Cieszkowskiego z Zygmuntem Krasińskim, który w latach 1843–1845 wielokrotnie bawił w dworku wierzenickim. Jak dobry to był dla poety pobyt, świadczą słowa wypowiedziane w liście z 25 sierpnia 1843 roku: „Śni mi się Wierzenica teraz jak Nicea dawniej, wyrwam się ku niej, ...”, a w kolejnym liście z Gdańska, z 28 października 1843 Krasiński wdzięczny za gościnę pisze: „Drogi Auguście mój! Wyjechałem z Wierzenicy tak, jak niegdyś wyjeżdżałem z miejsc, gdzie mi dobrze, błogo, błękitno było” (KRASIŃSKI 1988).

EKOLOGIA KRAJOBRAZU — OBIECUJĄCY KIERUNEK BADAŃ

Ekologia krajobrazu — zainicjowana przez profesora Adama Wodzickę już przed II wojną światową na Uniwersytecie Poznańskim — należy dziś do najintensywniej rozwijanych zagadnień ekologicznych w wielu ośrodkach naukowych na świecie i przez licznych badaczy. Skromne ramy tego artykułu nie pozwalają na szersze omówienie tego zagadnienia. Jednakże zainteresowanego Czytelnika odsyłamy do obszernego zbioru materiałów na ten temat pt. *Krajobraz ekologiczny*, opublikowany ostatnio pod red. J. BANASZAKA (1993) i do podręcznika *Ekologia krajobrazu* autorstwa A. RICHLINGA i J. SOLONA (1994).

Znaczące miejsce w ekologii krajobrazu zajmują obszary rolne, dominujące w wielu krajach Europy Zachodniej i Środkowej. W Polsce stanowią one około 60% powierzchni kraju, w decydującym stopniu wpływają zatem na jakość całego naszego środowiska przyrodniczego.

Zabiegi agrotechniczne wraz z urbanizacją i innymi przejawami ludzkiej aktywności parcelują środowisko życia wielu gatunków roślin i zwierząt na niewielkie, izolowane wyspy. W krajobrazach rolniczych wielu krajów Europy lasy zostały zredukowane do niewielkich fragmentów otoczonych polami uprawnymi o intensywnej gospodarce rolnej. Te drobne wyspy leśne, zwane też wyspami środowiskowymi, łącznie z innymi tak zwanymi dotąd nieużytkami, jak zadrzewienia na przydrożach i wzdłuż rowów melioracyjnych, miedze i podobne stanowią ostoje życia fauny i flory w krajobrazie rolniczym — tym ważniejsze z ekologicznego punktu widzenia, im bardziej intensywna jest gospodarka rolna. Nowa ustawa o ochronie przyrody z 16 października 1991 roku szczęśliwie chroni owe cenne fragmenty krajobrazu pod nazwą „użytków ekologicznych”.

Na temat roli zadrzewień śródpolnych wypowiadało się już wielu badaczy, jak chociażby CZARNECKI (1956), WILUSZ (1958), ZAJĄCZKOWSKI (1988), KARG (1983), BUGAŁA (1986), WALIGÓRA (1986), RATYŃSKA (1986), DĄBROWSKA-PROT (1987), GÓRKA i współaut. (1991). W skrócie należy wymienić następujące funkcje spełniane przez zadrzewienia:

1. Biocenotyczne: ochronienie dla wielu gatunków roślin i zwierząt, wychwytywanie substancji toksycznych w przypadku zadrzewień wzdłuż szlaków komunikacyjnych i przyzakładowych, oczyszczanie biologiczne w przypadku zadrzewień przywodnych, zapobieganie erozji wodnej i eolicznej.

2. Klimatyczne: zmniejszanie prędkości wiatru, zmniejszanie parowania potencjalnego, zwiększanie pojemności wodnej.

3. Produkcyjne: wpływają na powiększenie produkcji upraw w sąsiedztwie, obecność gatunków roślin miododajnych, pozysk drewna.

4. Estetyczne: ozdobna rola wysokiej zieleni w odlesionym krajobrazie.

Mając na uwadze poważne znaczenie zadrzewień śródpolnych w krajobrazie rolniczym w roku 1991 podjął działalność interdyscyplinary Zespół Badań Ekologii Krajobrazu, kierowany przez prof. dra hab. Józefa Banaszaka. Grupa licząca kilkunastu badaczy z ośrodków naukowych Poznania (PAN, UAM) i Bydgoszczy (WSP) prowadzi badania nad rolą zadrzewień śródpolnych w krajobrazie rolniczym. Celem szczegółowym tych badań jest, między innymi, określenie wpływu wielkości oraz izolacji wysp środowiskowych na zróżnicowanie i zagęszczenie różnych grup zwierzęcych (pożytecznych i szkodliwych), zasiedlających krajobraz rolniczy. Są poddane ocenie również przemiany szaty roślinnej badanego obszaru, zarówno w przeszłości, jak i dzisiejsze.

Terenem tych badań są obszary rolnicze, leżące około 15 km w kierunku północno-wschodnim od Poznania, pomiędzy wsiami: Wierzenica — Wierzonka — Milno — Kicin. Badaną enklawę rolną o powierzchni około 1200 ha otacza od zachodu kompleks lasów Dziewiczej Góry, od wschodu zaś rzeka Główna i lasy kobylnickie. Obszar ten odznacza się szczególnie dużym udziałem zadrzewień śródpolnych, zwłaszcza zaś drobnych kęp leśnych nazywanych remizami.

WYSPY ŚRODOWISKOWE — CHARAKTERYSTYKA FLORYSTYCZNA

Omawiany obszar, aczkolwiek niewielki powierzchniowo, cechuje się zróżnicowaną rzeźbą terenu i bogatą siecią zadrzewień śródpolnych, szczególnie punktowych. Zadrzewienia śródpolne są wykształcone w postaci remiz o niewielkich powierzchniach, najczęściej o obwodzie 150–200 m. Te niewielkie kępy drzew i krzewów, porastające dziś zagłębienia terenowe lub niewielkie wzniesienia, mają swoją dłuższą historię, nigdy jednak nie były użytkowane rolniczo. Są to albo zładowione dziś dawne oczka wodne, albo — w przypadku stożkowych wzniesień — cmentarzyska lub miejsca kultu religijnego. Przykładem może być tak zwany Żalik, znajdujący się w pobliżu wsi Wierzenica. Jest to niewielkie wzniesienie otoczone polami, porośnięte sosną. Na stokach południowych gatunki południowe znajdują korzystne dla swego rozwoju siedliska. U podnóża stwierdzono niewielki płat czyżni — zarośli tarniny z dorodną gruszą polną. Żalik był w roku 1918 miejscem badań archeologicznych kierowanych przez prof. Józefa Kostrzewskiego, który w tym miejscu odnalazł kilkadziesiąt grobów z trzech epok: późnej epoki kamiennej, początku epoki żelaza (wczesnego okresu lateńskiego) i groby szkieletowe z okresu wczesnohistorycznego (X–XI w.). Prawdopodobnie około XII w. wzgórek Żalika był również miejscem osady (KOSTRZEWSKI 1920).

W niewielkich rynnach, zbiegających ku dolinie rzeki Głównej, występują największe na tym terenie, poza przyległymi kompleksami leśnymi, zadrzewienia powierzchniowe. Pola Stacji Nasiennie-Rolniczej w Wierzenicy i Wierzonce są rozdzielone miedzami i drogami z pasami przydrożnymi, na których rosną pojedyncze drzewa i krzewy oraz spotyka się też szerokie (20–30 m), zwarte czyżnie (płaty *Pruno-Crataegum*), długości kilkuset metrów. Drogom polnym

i szosom towarzyszą jedno- i dwurzędowe zadrzewienia. Na uwagę zasługuje obustronne nasadzenie, złożone z *Acer platanoides*, *A. pseudoplatanus* i *Quercus robur*, ciągnące się od wsi Wierzonka do Milna. Z uwagi na bardzo wysoki stopień kompletności i wiek drzew zasługuje ono na ochronę i uznanie jako pomnika przyrody. Na badanym terenie występują też rzędowe nasadzenia z *Tilia cordata*, *Quercus rubra*, *Fraxinus excelsior* i inne.

W trakcie dotychczasowych (1991–1994) rozpoznaiń terenowych szczegółowym badaniom botanicznym poddano 10 różnorodnych zadrzewień śródpolnych (remiz oraz pasów). Skład florystyczny drzewostanów ma charakter półnaturalny. Często jednak, ze względu na niewielką powierzchnię, silny wpływ otaczających upraw, nie kontrolowany wyrąb i brak zabiegów pielęgnacyjnych, przedstawiają one sobą różne postacie degeneracji zbiorowisk leśnych. Łączna liczba zbiorowisk roślinnych, zaobserwowanych w badanych zadrzewieniach wynosi 50.

Najbardziej zróżnicowany pod względem wchodzących w jego skład fitocenonów jest laszek porastający wąwóz schodzący ku dolinie rzeki Głównej między Wierzenicą a Wierzonką. Stwierdzono w nim bowiem aż 46 zbiorowisk roślinnych. Wyróżnia się on obecnością dobrze zachowanych łągów wiązowo-jesionowych (*Ficario-Ulmetum campestris*) oraz takich fitocenonów, jak: *Urtico-Aegopodium*, *Convolvulo-Rubetum caesii*, *Helianthetum tuberosi* i zbiorowisko z *Chelidonium maius*, a więc nitrofilnych zbiorowisk o charakterze okrajkowym.

Natomiast w niewielkich obszarowo remizach śródpolnych wykazano zaledwie 8–9 fitocenonów. Ale nawet te drobne wyspy śródpolne stają się ostojami gatunków leśnych w krajobrazie rolniczym. W trakcie badań odnaleziono w nich, pomijając drzewa i krzewy, między innymi trzy gatunki paproci: narecznicę krótkoostną (*Dryopteris spinulosa*), narecznicę samczą (*D. filix-mas*) i orlicę pospolitą (*Pteridium aquilinum*), liczne trawy: wiechlinę gajową (*Poa nemoralis*), kostrzewę olbrzymią (*Festuca gigantea*), kłosownicę leśną (*Brachypodium sylvaticum*), kupkówkę Aschersona (*Dactylis aschersoniana*), perlówkę zwisłą (*Melica nutans*) oraz trędownik bulwiasty (*Scrophularia nodosa*).

Badane remizy są wykształcone głównie na siedlisku gładowym. Strefę kontaktową z otaczającymi polami stanowią zwykle zbiorowiska roślinności zielnej o ruderalnym i okrajkowym charakterze. Są to płaty *Leonuro-Ballotetum* oraz zbiorowiska z *Urtica dioica* i *Agropyron repens*. Bardziej wewnętrzny pas to mniej lub bardziej zwarte czyżnie, reprezentowane przez fitocenozy *Pruno-Crataegetum* i *Sambucetum nigri*. Drzewostan omawianych remiz jest bardzo zróżnicowany. Na ogół nie odznacza się dużym zwarcie, wiele drzew jest martwych, część z nich usunięto. Jeśli chodzi o skład gatunkowy, to w czasie badań terenowych stwierdzono występowanie dębów, osik, wiązów, klonów, świerków, jesionów i gruszy. Ich wiek waha się od kilkudziesięciu do ponad stu lat. Na szczególną uwagę zasługują pomnikowe okazy grusz — *Pyrus communis*, o obwodach około 200 cm, występujące w kilku zadrzewieniach. Warstwa krzewów jest wykształcona w różnym stopniu. Niekiedy są to bardzo zwarte zarośla tarniny, liczne są drzewiaste okazy głogu, często notowano też bez czarny. Runo ma również zróżnicowany charakter; pod okapem drzew i krzewów występują płaty nitrofilnych zbiorowisk okrajkowych: *Alliario-Chaerophylletum* i z *Urtica dioica*, w przejaśnieniach dominują fitocenozy trawiaste. Nieco inny charakter miał teren zadrzewiony dziesięcioma dębami we wsi Kliny, kryjący

stary, głównie poniemiecki cmentarz. Latem 1991 roku teren ten został przez społeczność wiejską „uporządkowany”; wycięto wszystkie krzewy i usunięto całkowicie roślinność zielną. Pod okapem drzew masowo występował bez lilak, a w runie dominował bluszcz pospolity. Z dawnych roślin ozdobnych występował też licznie barwinek. W okresie wiosennym usytuowany na wzgórzu cmentarzyk wyglądał z daleka jak wielki bukiet.

Zbiorowiska roślin zielnych badanych zadrzewień są zgrupowane w trzech głównych grupach: fitocenozy o charakterze okrajkowym, ruderalnym i odpolnym, których geneza jest związana z bezpośrednim sąsiedztwem pól uprawnych. Pierwsze z nich są reprezentowane głównie przez płaty z pokrzywą zwyczajną (*Urtica dioica*), z czosnaczką pospolitą (*Alliarietum officinalis*) i świerząbką gajowym (*Chaerophyllum temnium*) (*Alliario-Chaerophylletum*) oraz z przytulią czepną (*Galium aparine*) i przetacznikiem bluszczowym (*Veronica hederifolia*), czyli *Galio-Veronicetum*. Zespoły ruderalne, których obecność, podobnie jak i zbiorowisk segetalnych, jest wynikiem silnej presji człowieka, nie zajmują dużej powierzchni. Najbardziej są rozpowszechnione wśród nich fitocenozy z mierznicą czarną (*Balloto-Leonuretum*) oraz z łopianem pajęczynowatym (*Leonuro-Arctietum*). Wśród zbiorowisk, których obecność jest związana ściśle z sąsiadującymi polami uprawnymi, powierzchniowo dominują płaty z perzem pospolitym (*Agropyron repens*). W większości omawianych zadrzewień obserwowano także fitocenozy z gwiazdnicą pospolitą (*Stellaria media*).

WYSPY LEŚNE — REFUGIAMI FAUNY

Zadrzewienia tkwiące w krajobrazie pól dają schronienie setkom gatunków zwierząt krajobrazu rolniczego, jednocześnie ciągle kryją wiele zagadek ich ekologii, biologii i etologii. Nie znamy dotąd, na przykład, minimalnej powierzchni niezbędnej do przetrwania i rozwoju większości z nich. Nie do końca jest rozpoznany problem migracji zwierząt w krajobrazie i kontaktu (wymiany informacji) pomiędzy populacjami poszczególnych wysp. Praktycznym zadaniem będzie też określenie roli różnych zadrzewień śródpolnych w dyspersji zwierząt pożytecznych i szkodliwych z rolniczego punktu widzenia. Celem interdyscyplinarnego Zespołu Badań Ekologii Krajobrazu na obszarze rolniczym w PKPZ jest, między innymi, właśnie zbadanie efektu wielkości oraz izolacji wysp środowiskowych na różnicowanie i zagęszczenie różnych grup zwierzęcych krajobrazu rolniczego. Konsekwencją tych badań będzie, na przykład, sporządzenie modelu krajobrazu rolniczego na ekologicznych zasadach.

Pod względem składu zasiedlających je zwierząt, zadrzewienia różnią się między sobą, odpowiednio do różnych warunków w nich panujących, związanych z wielkością wysp, pochodzeniem (zładowione stawki lub wyniesienia terenowe), zespołami pokrywających je roślin, stopniem izolacji, mikroklimatem i innymi czynnikami. Waloryzacja zadrzewień śródpolnych z punktu widzenia gospodarki rolnej zależy także od grupy obecnych w nich zwierząt.

Najbardziej korzystne dla utrzymania różnorodności fauny drobnych ssaków (*Micromammalia*) na terenie agrocenoz i z punktu widzenia gospodarki rolnej jest tworzenie lub zachowanie zadrzewień na obrzeżach drobnych, okresowo wysy-

chających oczek wodnych i zadrzewienia w nieznacznym zagłębieniu terenu, podobne do zbiorowisk leśnych o urozmaiconym runie i grubej warstwie ściółki. Są one korzystne dla wielu gatunków, a jednocześnie nie stanowią dogodnych refugium ułatwiających przetrwanie zabiegów agrotechnicznych, stosowanych na polach najbardziej szkodliwym gryzoniom, jak nornik zwyczajny i mysz domowa. Zadrzewienia śródpolne dają schronienie i możliwość zdobycia pokarmu drapieżnikom: lisowi, kunie, kamionce, w mniejszym stopniu łasicy i grono-stajowi. Drobne ssaki zamieszkujące zadrzewienia śródpolne stanowią dla nich rezerwę pokarmu, wykorzystywaną w czasie niskiej liczebności nornika zwyczajnego (PIŁACIŃSKA, w druku).

Z kolei dotychczasowe obserwacje nad owadami zapylającymi (*Apoidea*), przeprowadzone w krajobrazie rolniczym PKPZ zdają się wskazywać, że wyspy leśne (remizy) o bardzo małej powierzchni i bardziej oddalone od środowisk „donorowych”, względnie mniej atrakcyjne dla pszczół, na przykład bardziej wilgotne, zasiedlane są przez mniejszą liczbę gatunków, w dodatku gatunków drobniejszych, mniej ruchliwych; natomiast są odwiedzane okresowo przez owady silniejsze i bardziej ruchliwe, na przykład przez trzmiele. Takie wędrówki młodych matek trzmielich, przelatujących pomiędzy różnymi kępami zadrzewień śródpolnych, można obserwować zwłaszcza wiosną.

Niewielkie obszarowo zadrzewienia śródpolne stanowią środowiska przejściowe, zwane przez ekologów ekotonami. Łączą one w sobie elementy flory i fauny częściowo pola, częściowo lasu. Dochodzi w nich do tak zwanego efektu styku, wyrażającego się zwiększoną liczbą gatunków i większą ich liczebnością. W badanych remizach PKPZ również stwierdzono podwyższoną liczebność niektórych badanych zwierząt. Szczególnie wyraźnie zjawisko to obserwowano w przypadku roztoczy glebowych (*Acarina*) i drobnych ssaków. Dla przykładu, w jednym z badanych zadrzewień w okresie jesiennym stwierdzono nie wykazaną dotąd w Polsce wartość zagęszczenia, wynoszącą ponad 200 tysięcy osobników na jeden metr kwadratowy (S. KACZMAREK, dane nie publikowane).

Najbardziej dziś uznani ekolodzy krajobrazu, FORMAN i GODRON (1986) przyjmują, że stabilność krajobrazu polega na zdolności utrzymywania w nim na określonym poziomie biomasy, energii i różnorodności gatunkowej. W myśl tej zasady, wyspy zadrzewień śródpolnych, utrzymujące wymienione elementy w krajobrazie rolniczym, są podstawą jego stabilności. Czyż zatem nie zasługują na miano pereł tego krajobrazu?

FOREST ISLANDS AS AN IMPORTANT ELEMENT OF THE LANDSCAPE

Summary

The biocenotic significance of forest islands in an agricultural landscape is presented. Floristic and faunistic (incidence of soil mites, spiders, wild bees, weevils and small mammals) characteristics are given.

LITERATURA

- ANDERS P., 1981. *Puszcza Zielonka*. Przewodnik. Wyd. Poznańskie, Poznań, ss. 110.
BANASZAK J. (red.) 1993. *Krajobraz ekologiczny*. WSP, Bydgoszcz, ss. 456.

- BUGAŁA W., 1986. *Zadrzewienia śródpolne i przydrożne, zagrożenia i perspektywy rozwoju*. Mat. na Konf. Nauk.: *Niektóre zagadnienia ochrony środowiska i krajobrazu w świetle aktualnych potrzeb kraju*. Poznań.
- CHŁAPOWSKI F., 1895. *O stosunku ś.p. Augusta Cieszkowskiego do nauk przyrodniczych w ogóle, a do wydziału przyrodniczego w szczególności*. Roczn. TPN Poznańskiego 21, 335–355.
- CZARNECKI Z., 1956. *Materiały do ekologii ptaków gnieźdzących się w śródpolnych kępach drzew*. Ekol. Pol. A. 4(13), 379–417.
- DĄBROWSKA-PROT E., 1987. *Rola zadrzewień śródpolnych w krajobrazie rolniczym*. Wiad. Ekol. 33(1), 47–59.
- Forman R., Godron M., 1986. *Landscape ecology*. John Wiley and Sons. New York — Toronto, ss. 618.
- GORYŃSKA-BITNER B., STĘPIEŃ J., (red.) 1994. *August Cieszkowski — Wielkopolanin i Europejczyk*. Akademia Rolnicza w Poznaniu, Poznań, 185 pp.
- GÓRKA W., ZAJĄCZKOWSKI K., ZAJĄCZKOWSKA B., 1991. *Określenie wielkości zasobów drewna w zadrzewieniach w Polsce*. Ekspertyza nr 12–V–3, IBL, Warszawa, ss. 1–14.
- HELLWIG J. 1979., *Cieszkowski*. Wiedza Powszechna, Warszawa, 33, 240.
- KARG J., 1983. *Wpływ struktury krajobrazu rolniczego na bogactwo fauny*. Kronika Wielkopolski 3/4, 143–158.
- KOSTRZEWSKI J., 1920. *Badania archeologiczne w Wierzenicy, w powiecie poznańskim wschodnim*. Zapiski Muz. 4–5, 30–40.
- KOZIEROWSKI S., 1935. *Szematyzm historyczny ustrojów parafialnych dzisiejszej archidiecezji poznańskiej*. PTPN, Poznań, ss. 484.
- KRASIŃSKI Z., 1988. *Listy do Augusta Cieszkowskiego, Edwarda Jaroszyńskiego, Bronisława Trentowskiego*. Tom I, PIW, Warszawa, ss. 848.
- PIŁAĆIŃSKA B., (w druku) *Drobne ssaki w zadrzewieniach śródpolnych*. Zeszyty Nauk. WSP w Bydgoszczy, Studia Przyr.
- RATYŃSKA H., 1986. *Charakterystyka fitosocjologiczna i florystyczna zbiorowisk leśnych i zaroślowych na obszarze projektowanego Parku Agroekologicznego im. gen. D. Chłapowskiego (mscr.)*.
- RICHLING A., SOLON J., 1994. *Ekologia Krajobrazu*. Wyd. Nauk. PWN, Warszawa, 226 pp.
- WALIGÓRA J., 1986. *Zadrzewienia*. Urząd Woj., Poznań ss. 143.
- WILUSZ Z., 1958. *Wpływ zadrzewienia ochronnego na gospodarkę wodną i plonowanie przyległych terenów*. Ekol. Pol. A 6(1).
- ZAJĄCZKOWSKI K., 1988. *Stan zadrzewień w Polsce oraz potrzeby i możliwości ich rozwoju*. IBL, Warszawa, ss. 116.

MAREK JURGOWIAK, RYSZARD OLIŃSKI

*Katedra i Zakład Biochemii Klinicznej
Akademii Medycznej im. L. Rydygiera w Bydgoszczy
Kartowicza 24, 85-092 Bydgoszcz*

*„O niczym nie wiemy, że jest przyczyną
czegoś innego, bez doświadczenia”.
Dawid Hume (1711-1776)*

WOLNE RODNIKI A STARZENIE SIĘ

WPROWADZENIE

Starzenie się jest procesem, którego mechanizmu ciągle nie potrafimy dostatecznie zrozumieć. Zadziwiającym wydaje się fakt, że organizm, który powstaje w złożonym procesie morfogenezy nie jest w stanie sprostać — wydawałoby się prostszemu zadaniu — utrzymać się w stanie, w jakim już funkcjonuje. Starzejemy się właściwie z każdą chwilą swojego istnienia. W samym fakcie istnienia jest zawarta bowiem immanentna cecha starzenia się. Pewne trudności nomenklaturowe narzuca natomiast fakt, że język polski nie odróżnia jasno procesu „wiekowienia” (ang. ageing) od starzenia się (ang. senescence). Mówiąc więc o procesach starzenia mamy zwykle na uwadze zachodzące procesy involucyjne, a nie fakt upływu czasu trwania organizmu.

Należy w tym miejscu podkreślić, że biogerontologia, jako nauka zajmująca się wyjaśnieniem biologicznych mechanizmów odpowiedzialnych za procesy starzenia, rozwinęła się praktycznie w ciągu ostatnich 15-20 lat.

Procesowi starzenia się ulegają wszystkie organizmy wielokomórkowe; podobnie uniwersalnym zjawiskiem jest ich śmierć. W trakcie starzenia powstaje szereg zmian strukturalnych i funkcjonalnych w organizmie, a śmierć osobnika jest konsekwencją tych zdarzeń. Należy jednakże pamiętać, że zauważalne zmiany w funkcjonowaniu starzejącego się organizmu jako całości są poprzedzo-

Wykaz stosowanych skrótów: SOD (ang. superoxide dismutase) — dysmutaza ponadtlenkowa, Cu Zn SOD — dysmutaza ponadtlenkowa zawierająca miedź i cynk, Mn SOD — dysmutaza ponadtlenkowa zawierająca mangan, GSH-Px — peroksydaza glutationowa, GS — syntetaza glutaminowa, mRNA (ang. messenger RNA) — informacyjny RNA, (.) — kropka przy symbolu rodnika oznacza obecność niesparowanego elektronu na orbicie zewnętrznej, 8-OH-dG — 8-hydroksy-2'-deoksyguanozyna (nazwa zmodyfikowanej oksydacyjnie zasady azotowej stosowana w przeważającej części cytowanego piśmiennictwa — według nowszych badań jest to forma 8-oxo-2' — deoksyguanozyna), HPLC — wysokociśnieniowa chromatografia cieczowa.

ne wystąpieniem zaburzeń w czynności a także morfologii poszczególnych komórek i ich organelli.

Istnieje kilka hipotez próbujących wyjaśnić fenomen starzenia się organizmu (MEDVEDEV 1990). Na przykład procesy starzenia mogą być efektem łączenia się cząsteczek na poziomie subkomórkowym (BJORKSTEN 1968); zmian w funkcjonowaniu układu immunologicznego (WALFORD 1969); patologii mającej początek w szyszynce (ROZENCWAIG i współaut. 1987); uszkodzeń wywołanych przez reakcje wolnorodnikowe (HARMAN 1956, 1968, 1992); programu zawartego w genach (HAYFLICK 1987), bądź na skutek mutacji i niestabilności materiału genetycznego (KIRKWOOD 1985). Obecnie, żadna z wymienionych teorii nie znajduje wyłącznej i powszechnej akceptacji. Wątpliwe wydaje się też, aby tylko jedna z nich mogła wyjaśnić wszystkie mechanizmy związane z procesem starzenia się (VIJG 1990).

W 1956 roku D. HARMAN zaproponował po raz pierwszy „wolnorodnikową teorię starzenia się”. Autor ten wysunął przypuszczenie, że starzenie się jest wynikiem komasacji nieodwracalnych uszkodzeń komórek i tkanek wywołanych przez wolne rodniki. Poparciem dla tej koncepcji była obserwacja przyspieszenia niektórych objawów starzenia się na skutek radiolitycznej generacji rodników po naświetleniu organizmu promieniami X. Wiadomym jest obecnie, że wolne rodniki tlenowe są stale produkowane w przebiegu metabolizmu komórkowego. Znacznym źródłem rodników jest system cytochromu P₄₅₀ i mitochondrialny łańcuch transportu elektronów (HALLIWELL i GUTTERIDGE 1989). Przyjmuje się, że w warunkach fizjologicznych zazwyczaj 1%–2% metabolizowanego tlenu ulega konwersji do form wolnorodnikowych (O₂⁻ i H₂O₂) (JOENJE 1989). Każda komórka szczeniaka przetwarza dziennie około 10¹² cząsteczek O₂. Częściowa redukcja obejmuje około 2% cząsteczek tlenu, w wyniku czego powstaje w komórce 2 × 10¹⁰ cząsteczek O₂⁻ i H₂O₂ każdego dnia (AMES i współaut. 1993). Natomiast jak podają HALLIWELL i GUTTERIDGE (1989), w tkankach płuc szczeniaka eksperymentalnie na działanie powietrza, aż 9% metabolizowanego tlenu uczestniczy w generowaniu rodników ponadtlenkowych.

W trzydzieści lat po ogłoszeniu „wolnorodnikowej teorii starzenia się” nastąpił nowy okres badań, co było związane z odkryciem i opisaniem biologicznych właściwości dysmutazy ponadtlenkowej (ang. SOD, EC 1.15.1.1.). Działanie tego enzymu zarówno u muszki owocowej, jak i u człowieka, polega na neutralizacji rodników ponadtlenkowych (O₂⁻). Fakt istnienia w komórkach aerobowych złożonych mechanizmów, zarówno enzymatycznych, jak i nieenzymatycznych (patrz dalej), które chronią je przed toksycznym działaniem tlenu, wskazywać może na udział rodników tlenowych w wielu zjawiskach patologicznych, łącznie ze starzeniem się.

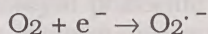
Ponieważ istnienie i prawidłowe funkcjonowanie organizmu aerobowego w pełni jest uzależnione od tlenu obecnego w atmosferze, wydaje się paradoksalnym fakt, że wolnorodnikowe formy tlenu indukować mogą procesy prowadzące do uszkodzeń komórek i powolnego starzenia się organizmu, a w efekcie do jego śmierci. Już w 1954 roku R. GERSCHMAN i współpracownicy (GERSCHMAN 1981) przedstawili pogląd, według którego wiele szkodliwych efektów tlenu należy przypisać tworzeniu rodników a rozwinięciem tej hipotezy jest tak zwana ponad-

tlenkowa teoria toksyczności tlenu przedstawiona głównie przez FRIDOVICHA (1975).

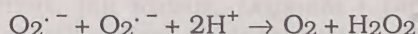
POWSTAWANIE AKTYWNYCH FORM TLENU W ORGANIZMACH

Cząsteczki lub atomy, określane jako wolne rodniki, są wysoce reaktywnymi czynnikami, posiadającymi niesparowany elektron na orbicie zewnętrznej. Powstają one w przebiegu reakcji wolnorodnikowych, będących zazwyczaj procesami nieodwracalnymi. W przypadku wolnych rodników tlenowych są to: redukcja tlenu cząsteczkowego, peroksydacja lipidów i wytwarzanie rodników semi-chinonowych (MARNETT 1987).

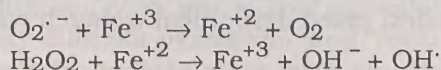
Każda komórka aerobowa wytwarza, w przebiegu metabolizmu, pewne ilości reaktywnych form tlenu. W wyniku przyjęcia przez O_2 jednego elektronu powstaje anionorodnik ponadtlenkowy $O_2^{\cdot -}$



W środowisku komórkowym przemiany anionorodnika ponadtlenkowego mogą prowadzić do powstania H_2O_2 , zarówno na skutek spontanicznej, jak i katalizowanej przez dysmutazę ponadtlenkową reakcji dysmutacji (SOD przyspiesza tę reakcję około 10^4 razy)



Nadtlenek wodoru w warunkach *in vivo* powstaje prawdopodobnie głównie z $O_2^{\cdot -}$ w mitochondriach komórek (HALLIWELL i GUTTERIDGE 1989, 1990, SOHAL i BRUNK 1992). H_2O_2 , który ma zdolność łatwego przenikania przez błony komórkowe (FLOYD 1990) sam nie będąc rodnikiem, łatwo ulega przekształceniu w taką formę. Formą tą jest rodnik hydroksylowy OH^{\cdot} , który powstaje w komórkach według reakcji Fentona, katalizowanej przez jony żelazawe;



Tak więc, obecność $O_2^{\cdot -}$ w komórce nieuchronnie prowadzi do tworzenia H_2O_2 oraz, co gorsze, wysoce niebezpiecznego dla wszystkich komórek OH^{\cdot} . Rodnik hydroksylowy jest uważany za najbardziej toksyczny wśród reaktywnych form tlenu produkowanych przez komórki organizmu (HALLIWELL 1992).

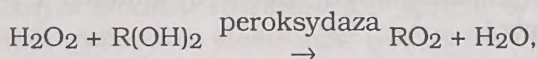
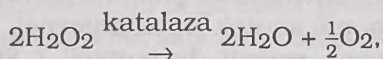
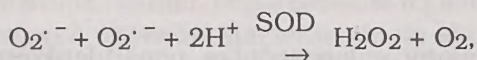
Dodatkowo, niektóre egzogenne czynniki zanieczyszczające środowisko życia organizmów, przenikając do komórek i reagując z endogennym H_2O_2 , mogą powodować powstawanie rodników hydroksylowych (KASPRZAK 1991). Należą do nich metale ciężkie, takie jak Cr i Ni. Źródłem znacznej ilości wolnych rodników są także substancje smoliste będące wynikiem spalania paliw stałych, gazy wydechowe silników spalinowych oraz dym powstający podczas palenia tytoniu (HALLIWELL i GUTTERIDGE 1985). Dwutlenek siarki (SO_2), którego źródłem są paliwa, takie jak węgiel czy olej napędowy, może indukować reakcje wolnorod-

nikowe poprzez jony siarczynowe (SO_3^{-2}), będące przejściowym produktem powstawania siarczanów (SO_4^{-2}) (HALLIWELL i GUTTERIDGE 1989).

MECHANIZMY ZABEZPIECZAJĄCE ORGANIZM PRZED DZIAŁANIEM TOKSYCZNYCH FORM TLENU

Od najwcześniejszych etapów ewolucji, w większości układów komórkowych, dochodziło do stopniowego wyodrębniania i doskonalenia zabezpieczeń przed szkodliwym wpływem różnorodnych procesów chemicznych (w tym reakcji wolnorodnikowych), na które są narażone tak istotne składniki komórek, jak między innymi DNA, RNA oraz białka i lipidy.

Zarówno w komórkach prokariotycznych, jak i eukariotycznych występują mechanizmy chroniące przed toksycznym działaniem tlenu i produktami jego redukcji. Głównie są to układy enzymatyczne, do których należą: SOD, katalaza, peroksydaza glutationowa,



ponadto reduktaza glutationowa, dehydrogenaza glukozy-6-fosforanowa oraz mechanizmy nieenzymatyczne, wśród których można wyróżnić kompleksy jonów metali grup przejściowych i wolne jony, które katalizują reakcje dysmutacji rodników; antyutleniacze (tokoferol, glutation, kwas askorbinowy, melatonina, bilirubina) a także zmiatacze wolnych rodników (kwas moczowy, glukoza, manitol) (FRAGA i współaut. 1991, LICZMAŃSKI 1988b, REITER 1994). Człowieka charakteryzuje potencjalnie najwyższy wśród ssaków maksymalny czas trwania życia, co jest związane, jak się przypuszcza, z wykształceniem bardziej skutecznych mechanizmów chroniących komórki przed działaniem wolnych rodników (ONO i OKADA 1985).

TEMPO STARZENIA SIĘ ORGANIZMU

W miarę starzenia się organizmu wzrasta prawdopodobieństwo jego śmierci. Każdy gatunek ma sobie tylko właściwy, maksymalny czas trwania życia. Szacuje się, że pułapem możliwym do osiągnięcia przez człowieka jest wiek nawet w granicach od 90 do 115 lat. Jak jednak ocenia KIRKWOOD (1985), inwestycje gatunku *Homo sapiens*, służące podtrzymywaniu czynności organizmu, wystarczają do zapewnienia sprawnego funkcjonowania ludzkiego ciała w ciągu niespełna 40 lat, co pokrywa się z przeciętnym czasem życia człowieka przez większą część naszej filogenezy. Po upływie tego czasu wyczerpaniu ulegają mechanizmy obronne, co stopniowo prowadzi do zaniku prawidłowej reakcji na stresy wywołane działaniem takich czynników, jak chociażby wolne rodniki

tlenowe. Głównie z powodu chorób infekcyjnych bądź niewłaściwego odżywiania się w populacjach o niskim stopniu rozwoju cywilizacyjnego tylko niewielu osobnikom udaje się osiągnąć maksymalną długość życia. W społeczeństwach bardziej rozwiniętych przypadki śmierci z takich przyczyn są rzadsze. Tylko niewielki odsetek wśród populacji ludzkich umiera przed ukończeniem 35 roku życia na skutek różnych schorzeń, podczas gdy zgon ludzi w starszym wieku dużo częściej jest wynikiem patologii, takich jak choroba niedokrwienna serca bądź nowotwory. Występowanie chorób nowotworowych w znacznym stopniu jest związane z wiekiem; większość przypadków raka odnotowuje się od 4 do 6 razy częściej proporcjonalnie do wzrastającego wieku osobnika. Odnosi się to zarówno do gatunków krótko żyjących, takich jak szczur i mysz (około 30% osobników w wieku od 2 do 3 lat choruje na raka), jak i gatunków o długim okresie życia, do których należy człowiek (około 30% ludzi w wieku 85 lat choruje na raka). Tak więc, w przypadku człowieka, przeciętna długość życia osobników społeczeństw „cywilizowanych” jest większa niż w przypadku społeczeństw o niższym poziomie rozwoju cywilizacyjnego, jednak potencjalnie maksymalny czas życia w obu przypadkach prawdopodobnie nie różni się. Obecnie przypuszcza się, że jakkolwiek maksymalny okres trwania życia jest specyficzny gatunkowo, to długość życia osiągana przez danego osobnika zmieniać się może zależnie od warunków środowiskowych. Interesującą wydaje się obserwacja, iż ograniczenie ilości pożywienia podczas wczesnej fazy rozwoju prowadzi do statystycznie istotnego wzrostu średniej długości życia w przypadku takich zwierząt, jak szczur, *Daphnia* i *Drosophila*. SOHAL i współpracownicy (1994) stwierdzili wzrost długości życia u myszy z ograniczoną dietą i spadek poziomu uszkodzonych oksydacyjnie białek w porównaniu do grupy kontrolnej tych zwierząt.

Składniki diety to kolejny, ważny jak się wydaje, czynnik wpływający na długość życia. Doskonałym tego przykładem może być królowa pszczoła (*Apis mellifera*). Czas życia królowej wynosi około 6 lat, podczas gdy robotnice żyją od 3 do 6 miesięcy. Zróznicowanie to nie może być efektem różnic genetycznych pomiędzy królową i robotnicami, ponieważ ich genomy są identyczne. Różnica w długości życia jest w tym wypadku związana z pobieraniem bądź nie przez owady mleczka pszczelego (ang. royal jelly) podczas stadium larwalnego. Substancja ta wydłuża okres życia owadów około 20-krotnie.

Długość życia pozostaje również w związku z temperaturą otoczenia. R. PEARL (1928) opublikował teorię starzenia się, którą nazwał „teorią tempa życia” pierając się na wynikach wcześniejszych badań M. Rubnera oraz J. Loeba i J. H. Northrupa. W przypadku *Drosophila* hipoteza ta postuluje, iż dorosłe muchy żyją krócej w podwyższonej temperaturze, ponieważ wzrasta intensywność ich procesów życiowych, to znaczy aktywność metaboliczna. Od czasu ukazania się tej publikacji wielu badaczy zwróciło uwagę na współzależność pomiędzy temperaturą i tempem metabolizmu a długością życia *Drosophila* (MIQUEL i współaut. 1976, 1983; SOHAL 1976, 1987). Wykazano mianowicie, że zużycie tlenu, będące miarą tempa metabolizmu jest odwrotnie skorelowane z długością życia *Drosophila* (FLEMING i współaut. 198, MIQUEL i współaut. 1976). O ile średni czas życia tych owadów wynosi 120 dni w temperaturze otoczenia równej 10°C, to przy temperaturze 30°C już tylko 14 dni. Wiąże się to ze wzmożeniem

konsumpcji tlenu w podwyższonej temperaturze. Analogiczne badania przeprowadzone przez SOHALA i współpracowników popierają teorię starzenia się, bazującą na tempie metabolizmu w przypadku *Musca domestica* (SOHAL i BUCHAM 1981). Eksperymentalne dane popierające tę koncepcję pochodzą również z badań zwierząt ulegających hibernacji. Chomiki ulegające hibernacji cechuje dłuższy okres życia, proporcjonalnie do czasu przebytego w tym stanie (LYMAN i współaut. 1981).

Całkowita wartość energii zużywanej na gram masy ciała, w okresie od osiągnięcia dojrzałości do śmierci, dla pięciu różnych gatunków ssaków (koń, krowa, pies, kot, świnka morska), których potencjalna długość życia zamyka się w granicach od 6 do 30 lat, jest szacowana na około 200 kcal. Dane te popierają koncepcję, że różne gatunki posiadają zróżnicowany, ale względnie stały potencjał metaboliczny. Późniejsze badania wykazały, że potencjał metaboliczny w przypadku człowieka wynosi około 800 kcal, innych naczelnych 400 kcal a pozostałych ssaków 200 kcal (CUTLER 1991). Większość wniosków wynikających z badań potencjału metabolicznego generalnie sprowadza się do stwierdzenia, że tempo zużycia energii determinuje długość życia. RAO i współpracownicy (1990) obserwowali, że aktywność i poziom mRNA dysmutazy ponadtlenkowej, katalazy i peroksydazy glutationowej (GSH-Px) ulega obniżeniu u starych szczurów. Spadek aktywności i poziomu mRNA wymienionych enzymów eliminowano doświadczalnie ograniczając zużycie energii przez zwierzęta (patrz również tab.1).

Tabela 1

Wpływ ograniczenia zużycia energii na niektóre efekty związane z procesem starzenia się (wg różnych autorów, za VELTHUIS-TE WIERIK I VAN DEN BERG 1994 — zmienione).

Badany czynnik	Kierunek zmian z wiekiem	Efekt ograniczenia dopływu energii na starzenie się	Badany organizm
Aktywność Cu-Zn SOD	-	O	szczur
Poziom mRNA	-	O	szczur
Poziom mRNA	B	N	mysz
Aktywność Mn SOD	B	N	mysz
Poziom mRNA	-	O	mysz
Aktywność SOD	B	N	mysz
Aktywność SOD	-	N	szczur
Aktywność katalazy	-	O	szczur
Aktywność katalazy	-	O	mysz
Poziom mRNA	-	O	szczur
Poziom mRNA	+	N	mysz
Aktywność GSH-Px	-	N	szczur
Aktywność GSH-Px	B	N	szczur
Poziom mRNA	-	O	szczur
Poziom mRNA	B	N	mysz
Poziom mRNA cytochromu P450	-	O	mysz

Rozkład cytochromu P ₄₅₀ przez H ₂ O ₂	+	O	szczur
Lipofuscyna	+	O	szczur
Peroksydacja lipidów	+	O	mysz
Peroksydacja lipidów	+	O	szczur

+ — oznacza wzrost, — — spadek, B — brak efektu, N — brak wpływu na starzenie się, O — ograniczenie efektów starzenia się.

Biochemiczne implikacje, powiązania długości życia i tempa metabolizmu (zużycia O₂) nie były w pełni zrozumiałe do czasu odkrycia, że toksyczność tlenu jest związana z metaboliczną generacją rodników ponadtlenkowych (O₂^{·-}) (FRIDOVICH 1975). Tak więc, odkrycie, że komórki aerobowe produkują rodniki tlenowe w procesach oddychania, dało możliwość powiązania „teorii tempa życia” z faktem generowania w komórkach reaktywnych form tlenu (SOHAL i ORR 1993). Wszystkie ssaki wykonują około 200 milionów oddechów w przeciętnym okresie osobniczego życia gatunku, niezależnie od tego czy wynosi ono 2 czy też 80 lat. Mitochondria związane z oddychaniem komórkowym coraz częściej są określane jako „zegar biologiczny” — odmierzający czas życia organizmu. Dla porównania, mitochondria myszy, która żyje tylko dwa lata, „pracują” 40 razy intensywniej w porównaniu do mitochondriów człowieka (HARMAN 1972).

PODSTAWY WOLNORODNIKOWEJ TEORII STARZENIA SIĘ

Stwierdzenie faktu, że wzmoczone działanie przeciwutleniające dysmutazy ponadtlenkowej ma u mutantów *Drosophila melanogaster* związek z ich długowiecznością, może być znakomicie odniesione do teorii HARMANA (1956) wiążącej działanie wolnych rodników ze starzeniem się. Z badań przeprowadzonych przez CUTLERA (1991) wynika, że komórki organizmu ludzkiego i innych gatunków długowiecznych wytwarzają większe ilości SOD, wykazując jednocześnie większą odporność na procesy utleniania niż komórki organizmów o krótkim czasie życia. Zdaniem cytowanego autora, starzenie się jest wynikiem stopniowego upośledzenia wcześniej skuteczniej działających mechanizmów chroniących komórki przed utlenianiem. Ponieważ ochrona przed działaniem wolnych rodników nie jest w pełni wystarczająca, komórki stale są narażone, w mniejszym bądź większym stopniu, na uszkodzenia ich struktur. Na pytanie, w jakim zakresie kumulacja tych uszkodzeń jest przyczyną starzenia się i śmierci?, wciąż nie ma jasnej odpowiedzi.

Jeden z najbardziej aktualnych obecnie kierunków badań jest nastawiony na wyjaśnienie związku pomiędzy długością życia organizmu a niedoborem układów antyoksydacyjnych. W końcu lat siedemdziesiątych BARTOSZ i współpracownicy (1979) wykazali, że mutanty *Drosophila melanogaster* o skróconym okresie życia cechuje obniżona aktywność SOD. Jednakże, MASSIE i współpracownicy (1975) donoszą o nieznacznej różnicy w aktywności SOD pomiędzy dzikimi szczepami *Drosophila*, których czas życia był zróżnicowany nawet o ponad 40%. W innych badaniach wykazano, że długowieczny szczep Samarkand muszek owocowych cechuje niemalże dwukrotnie wyższa aktywność katalazy w porównaniu do krótkowiecznego szczepu Swedish C, lecz oba szczepy

nie wykazywały istotnych różnic w aktywności SOD (FLEMING i współaut. 1992). Interesująca jest ponadto większa skuteczność szczepu Samarkand w zmiataniu rodników hydroksylowych generowanych *in vitro* (FLEMING i współaut. 1988).

Według ROSE (1991) długowieczne muszki posiadają szczególnie wariant genu kodującego dysmutazę ponadtlenkową, dzięki czemu mogą wytwarzać enzym bardziej wydajny od występującego zwykle w cytoplazmie komórek. Należy jednakże pamiętać, że SOD jest tylko jednym z wielu czynników mogących wpływać na tempo starzenia się. Długowieczne szczepy *Drosophila* są bowiem bardziej odporne na głodzenie, ponieważ mają zwiększone zapasy tłuszczu. Są także w mniejszym stopniu zagrożone odwodnieniem, bowiem magazynują większe ilości glikogenu. W przypadku mutantów *Drosophila* nie wykazujących aktywności Cu Zn SOD stwierdza się ich nadwrażliwość na parakwat (herbicyd wywołujący powstawanie rodników ponadtlenkowych) oraz drastycznie skrócony czas życia. Ponadto ARKING i współpracownicy (1991) wykazali, że odporność na parakwat jest powiązana ze znacznym wydłużeniem życia u wyselekcjonowanych genetycznie szczepów *Drosophila*. Niewątpliwie więc SOD odgrywa pewną rolę w regulacji długości życia u muszki owocowej, kontrolując łącznie z katalazą poziom toksycznych rodników tlenowych, z którymi wiąże się pewne aspekty procesu starzenia komórek.

Podobne wyniki uzyskał JOHNSON (1990) badając krzyżówki długo żyjących osobników nicienia glebowego *Caenorhabditis elegans*. Według JOHNSONA mutacja pojedynczego genu nazwanego *age-1*, przedłuża życie *C. elegans* o prawie 70%. Dodatkowo, zmutowane osobniki produkują większe ilości przeciwutleniaczy (SOD oraz katalazy), wykazując jednocześnie zwiększoną odporność na toksyczne działanie parakwatu. Ponieważ mutacja *age-1* prowadzi do unieczynienia tego genu, znaczy to, że kodowane przez nie białko przestaje być syntetyzowane. Brak produktu genu *age-1* powoduje wzmożoną syntezę antyoksydantów, a więc prawdopodobnie produkt ten hamuje ich wytwarzanie. Przyjmując przedstawione dane trzeba jednocześnie pamiętać, że w przypadku człowieka mechanizmy starzenia się mogą być nieco inne niż u zwierząt niższych, będących obiektem najintensywniejszych badań.

Oprócz opisanych powyżej endogennych antyoksydantów, na wydłużenie okresu życia mają również wpływ przeciwutleniacze zawarte w diecie organizmów doświadczalnych (HARMAN 1993). Włączenie jednego z licznych antyoksydantów do diety wydłuża okres życia w przypadku myszy i szczura (BUN-HOI i RATSUNAMANGA 1959), muszki owocowej (MIQUEL i współaut. 1979), nicieni (EPSTEIN i GERSHON 1972), podobnie jak i w przypadku *Neurospora crassa* (MUNKRES i MINSSEN 1976).

Wprowadzenie 1,0% 2-merkaptotylaminy do diety samców myszy LAF₁ (HARMAN 1968) tuż po zakończeniu ssania, wydłuża średni czas ich życia o około 30%. Odpowiada to przedłużeniu średniego czasu życia człowieka z 73 do 95 lat. Podobnie, 0,5% 6-etoksy-1,2-dihydro-2,2,4-trimetylochinoliny (ethoxyquin) w diecie osobników męskich i żeńskich myszy C3H powoduje wydłużenie ich życia, odpowiednio o 18% i 20% (COMFORT 1971).

Dotychczas, dobrze opisano tylko trzy czynniki przyczyniające się do wydłużenia potencjalnie maksymalnego okresu życia u myszy. Są to: 2-merkaptotanol (HEIDRICK i współaut. 1984) i dwie pochodne pirydyny, takie jak 2-etyl-6-me-

tyl-3-hydroksypirydyna (EMANUEL 1976) oraz 2-6-dimetyl-3,5-dietoksykarbonyl-1,4-dihydropirydyna (EMANUEL i współaut. 1981). Generalnie, jakkolwiek wpływ niektórych, egzogennych antyoksydantów na długość życia jest znaczny, to jednak większość z nich hamuje funkcje mitochondriów, już przy koncentracji poniżej poziomu niezbędnego do wyhamowywania reakcji wolnorodnikowych uszkadzających te organella.

Powróćmy do wcześniej postawionego pytania — czy wraz z wiekiem dochodzi do kumulacji uszkodzeń składników komórkowych, wywołanych przez wolne rodniki i w jakim stopniu są one przyczyną starzenia się?

Sporo danych wskazuje na to, że utlenione cząsteczki stanowią jeden z czynników wywołujących wiele schorzeń charakterystycznych dla okresu starczego (miażdżyca, zapalenie stawów, nowotwory, dysfunkcje mózgu). Są to białka, lipidy, węglowodany oraz kwasy nukleinowe, o których wiadomo, że ulegają uszkodzeniu na skutek działania wolnych rodników (PACIFICI i DAVIES 1991). Utlenione białka i lipidy podlegają degradacji, jak i procesom reperacyjnym, podczas gdy DNA zwykle nie podlega degradacji, będąc obiektem licznych procesów naprawczych a utlenione zasady są wydalane z organizmu wraz z moczem (RICHTER i współaut. 1988).

Generalnie, jakkolwiek poziom przeciwutleniaczy oraz enzymów antyoksydacyjnych jest zróżnicowany tkankowo, gatunkowo oraz w przypadku osobników w różnym wieku (RAO i współaut. 1990, SEMSEI i współaut. 1991), to wydaje się, że wolnorodnikowe uszkodzenia komórkowe u osobników starzejących się wynikają co najmniej w równym stopniu ze wzrostu ilości utlenionych cząsteczek w komórkach, jak i zmian w funkcjonowaniu systemów ochronnych.

Udowodnione jest, że wraz z wiekiem dochodzi w organizmie do akumulacji produktów tlenowych uszkodzeń cząsteczek o szczególnie długim czasie trwania, takich jak kolagen (BAYNES 1991), z wytworzeniem *N*-(karboksymetyl)lizyny. To samo dotyczy elastyny (BAILEY i współaut. 1977) oraz DNA (RATTAN 1989). Do innych zmian, związanych z działaniem wolnych rodników, zaliczyć należy ponadto defekty w obrębie mukopolisacharydów (MATSUMA i współaut. 1966) i akumulację pigmentu starczego (HARMAN 1990), czy też zmiany w błonach niektórych organelli a głównie mitochondriów i lizosomów (NOHL i KRAMER 1980), modulacje poziomu jonów Ca^{+2} przedziałów wewnątrzkomórkowych (HARMAN 1993, ORRENIUS i współaut. 1991). Ca^{+2} odgrywa znaczącą rolę w starzeniu się i śmierci komórki, ponieważ skutkiem wzmożenia szoku tlenowego jest trwałe podniesienie w komórce poziomu jonów Ca^{+2} , wynikiem czego jest uszkodzenie cytoszkieletu i aktywacja *Ca*-zależnych enzymów katabolicznych.

PIGMENT STARCZY

W etiologii wielu schorzeń wskazuje się na rolę utlenionych lipidów, o których wiadomo ponadto, że odkładają się w starych komórkach (HARMAN 1990). Klasycznym tego przykładem jest akumulowany wewnątrzkomórkowo barwnik fluorescencyjny — lipofuscyna (pigment starczy, ang. age pigment), będąca najwcześniej poznany wyznacznikiem wzrostu poziomu uszkodzeń wolnorodnikowych wraz z wiekiem. U osób w wieku 90 lat więcej niż 7% objętości komórek

zajmują ziarnistości lipofuscyny. Po raz pierwszy gromadzenie się lipofuscyny w neuronach opisał już w połowie ubiegłego stulecia HANNOVER. Skład chemiczny lipofuscyny nie jest dokładnie poznany, chociaż wiadomo, że zawiera ona około 50% substancji lipidowych: trójglicerydy, fosfolipidy, cholesterol oraz białka i węglowodany. Pigment ten jest ponadto źródłem wysokiej koncentracji jonów metali, takich jak: cynk, miedź a głównie żelaza. W późniejszym okresie stwierdzono, że lipofuscyna jest gromadzona w procesach fizjologicznego starzenia się ustroju w wielu tkankach, zarówno człowieka, jak i szczura, nicieni, muszki owocowej oraz muchy domowej (SOHAL i ALLEN 1986). Okazało się ponadto, że tkanki o wysokiej aktywności metabolicznej gromadzą większe ilości lipofuscyny. U muchy domowej zawartość pigmentu w mięśniach wyraźnie wzrasta wraz z intensyfikacją lotu. W mięśniu sercowym człowieka obserwuje się znikomą ilość lipofuscyny bądź jej zupełny brak przed ukończeniem drugiej dekady życia, niemniej jej akumulacja gwałtownie wzrasta w ciągu następnej dekady życia do poziomu 0,3% objętości narządu. Z drugiej strony, barwnik fluorescencyjny pojawiać się może wcześniej w przebiegu ontogenezy, jak choćby w obrębie rdzenia kręgowego. Według FRIEDE (1962) gromadzenie się pigmentu w różnych częściach ludzkiego układu nerwowego jest związane z aktywacją enzymów oksydacyjnych. Z badań przeprowadzonych na szczurach wynika, że tempo gromadzenia lipofuscyny znacznie wzrasta w komórkach tych zwierząt przy niedoborze witaminy E (HARMAN 1990). Witamina E, jak wiadomo, należy do silnych antyoksydantów, hamujących formowanie lipofuscyny. Podobne zjawisko obserwowano przy wzroście poziomu nienasyconych lipidów błonowych (BRIZZEE i współaut. 1984). Pewne dane wskazują na fakt gromadzenia się lipofuscyny głównie w komórkach postmitotycznych układu nerwowego, serca i włókien mięśniowych. Komórki dzielące się akumulują mniejszą ilość pigmentu.

Badania ziarnistości fluorescencyjnych, uzyskiwanych przez ekstrakcję rozpuszczalnikami organicznymi (chloroform + metanol) wskazują, że lipofuscyna stanowi końcowy produkt utleniania lipidów oraz ich wiązania z białkami i innymi cząsteczkami zawierającymi grupy aminowe (NH₂). Pewne dane mogą wskazywać jednak, iż utlenione lipidy nie są głównym składnikiem lipofuscyny. Bowiem pigment akumulowany w wątrobie owiec dotkniętych lipofuscynozą składa się w dwóch trzecich z białek. Jak jednak wiadomo, materiał fluorescencyjny może być generowany *in vitro* przez wolnorodnikowe uszkodzenia zarówno węglowodanów, DNA, białek, jak i nienasyconych lipidów. Znaczna aktywność fosfatazy kwaśnej w złogach lipofuscyny sugeruje, że jej gromadzenie się jest związane z upośledzeniem funkcji lizosomów. Najprawdopodobniej, pigment jest generowany w lizosomach, w przebiegu metalozależnej peroksydacji (*via* reakcja Fentona) autofagowanych „prawidłowych lipidów” (HALLIWELL i GUTTERIDGE 1989). Peroksydacja lipidów zachodzi na skutek zaburzenia relacji pomiędzy poziomem pro- i antyoksydantów, co wiąże się z występowaniem charakterystycznych dla reakcji wolnorodnikowych produktów. Wzrost ich kumulowania ujawnia zwiększenie się poziomu utleniaczy w trakcie starzenia organizmu. Gromadzenie się lipofuscyny w podwyższonych ilościach jest obserwowane w przypadku abetalipoproteinemii. Podobne zjawisko ma miejsce w przypadku zespołu Chediak-Higashi. Jest to rzadkie u człowieka schorzenie,

dziedziczone w sposób recesywny-autosomalny, w którym „olbrzymie ziarnistości” pochodzenia lizosomalnego gromadzą się w wielu tkankach.

Do końca jednak nie jest wyjaśnione, czy akumulacja pigmentu starczego stanowi bezpośrednią przyczynę śmiertelnego uszkodzenia komórki.

BIĄŁKA I DNA A STARZENIE SIĘ

Bardziej przekonujące dane, co do udziału toksycznych form tlenu w procesach starzenia się, pochodzą z badań białek i DNA. Do niedawna brak było dowodów na to, że z upływem czasu dochodzi do wzrostu ilości utlenionych białek, w różnych typach komórek ludzkich. Pod koniec lat osiemdziesiątych została opracowana metoda ilościowego oznaczania grup karbonylowych, będących produktem ubocznym procesu utleniania białek. Okazało się wówczas, że ilość utlenionych białek w wielu komórkach naszego ciała wzrasta wykładniczo z wiekiem organizmu. Dotyczy to również badanych komórek zwierzęcych (STADTMAN 1992, OLIVER i współaut. 1987a). W swych pionierskich badaniach OLIVER i współpracownicy (1987b) wykazali, że ilość utlenionych białek znacznie wzrasta z wiekiem hodowanych fibroblastów (komórek wytwarzających kolagen i inne składniki tkanki łącznej). Ponadto, cytowani autorzy opisali wyższy poziom grup karbonylowych w komórkach pochodzących od osób chorych na progerię (zespół Wernera). Jest to rzadkie, dziedziczne schorzenie objawiające się przedwczesnym starzeniem organizmu. U zdrowych osobników tej samej grupy wiekowej ilość utlenionych białek była znacznie niższa (OLIVER i współaut. 1987b). Na podstawie tych danych przyjmuje się, że u osobników w podeszłym wieku na skutek utleniania co najmniej połowa białek, w tym wiele enzymów, może być uszkodzona. Uszkodzone w ten sposób enzymy wykazują obniżoną aktywność, bądź jej zanik, a to z całą pewnością wywiera ujemny wpływ na metabolizm komórek. W innych badaniach, STARKE-REED i OLIVER (1989) wykazali, że hepatocyty szczura, wraz ze wzrostem wieku zwierząt, zawierają odpowiednio wyższy poziom utlenionych białek. Ponadto, jak się przypuszcza, wraz ze wzrostem ilości utlenionych białek wzrasta tempo starzenia się zwierząt.

Wzrostowi poziomu utlenionych białek wraz z wiekiem towarzyszy spadek aktywności syntetazy glutaminowej (EC 6.3.1.2., GS), enzymu bardzo czułego na uszkodzenia tlenowe. Dotyczy to także obojętnej proteazy, która degraduje utlenione białka do wolnych aminokwasów. Związek pomiędzy wzrostem poziomu utlenionych białek i spadkiem aktywności GS oraz obojętnej proteazy odkryli STARKE-REED i OLIVER (1989) badając hepatocyty szczura. Aktywność obojętnej proteazy w hepatocytach dwudziestosześcioletniego szczura stanowi tylko 20% jej wartości w porównaniu do hepatocytów szczura w wieku 3 miesięcy.

Uzyskano również bezpośredni dowód na to, że wolne rodniki oddziałując z białkami zaburzają ich funkcje biologiczne, na podstawie badań utlenionych białek w mózgach gerbili (CARNEY i współaut. 1991). Kora mózgu starych zwierząt (15–18-miesięcznych) posiada wyższy o 85% poziom utlenionych białek w porównaniu do zwierząt młodszych (3-miesięcznych). Również aktywność GS spadła u starszych gerbili o 65% a aktywność zasadowej proteazy wynosiła 33% aktywności tego enzymu u młodszych zwierząt kontrolnych. Dodatkowo okazało

się, że zaaplikowanie fenylobutyronitronu (PBN) przywróciło poziom utlenienia białek charakterystyczny dla zwierząt młodych (CARNEY i współaut. 1991).

Ponadto badania ludzkiego mózgu dały interesujące wyniki. Odkryto, że poziom utlenionych białek w mózgu człowieka wzrasta wyraźnie wraz z wiekiem, a ich ilość w płacie czołowym rośnie dwa razy szybciej niż obserwuje się to w płacie potylicznym tych samych osobników (SMITH i współaut. 1991). Nie wykazano przy tym różnic pomiędzy poziomem utlenionych białek w mózgach pacjentów dotkniętych chorobą Alzheimera i w mózgach osób z grupy kontrolnej osób w tym samym wieku. Natomiast aktywność GS jest znacząco mniejsza w mózgach osobników z zespołem Alzheimera w przeciwieństwie do grupy kontrolnej.

Obecnie nauka dysponuje już dowodami na to, że utlenione, nieaktywne białka są akumulowane w komórkach. Jest to wynikiem utraty przez organizm, z upływem czasu, zdolności do ich degradacji. Zresztą wydajność innych systemów naprawczych (np. DNA) również, jak się wydaje, spada z wiekiem i zostaje ograniczona możliwość ich reagowania na działanie utleniaczy.

Jeszcze w latach sześćdziesiątych nie istniały właściwie dowody na to, że z biegiem czasu dochodzi do nieodwracalnych uszkodzeń DNA. ALEXANDER (1967) jako pierwszy zasugerował, że uszkodzenia DNA mogą być pierwotną przyczyną starzenia się, jednakże autor dysponował zbyt małą liczbą dowodów, które mocno poparłyby tę koncepcję. W późniejszym okresie rozwinięto hipotezę, która zakłada dużą rolę uszkodzeń DNA w procesach starzenia się. Poświęcono temu zagadnieniu wiele szczegółowych opracowań, między innymi takich autorów, jak AMES i GOLD (1991), BERNSTEIN i BERNSTEIN (1991), MULLAART i współautorzy (1990) oraz TICE i SETLOW (1985).

Podatność DNA na działanie wolnych rodników tlenowych ($O_2^{\cdot -}$, OH^{\cdot}) jest dość dobrze udokumentowana (DIZDAROGLU i współaut. 1993, HAYAKAWA i współaut. 1992, OLIŃSKI 1993 — w opracowaniu tym są omówione oksydacyjne modyfikacje zasad azotowych w DNA i ich rola w procesie karcynogenezy, TAKASAWA i współaut. 1993). Wiadomo również, że liczba uszkodzeń tlenowych DNA, powstających w komórce każdego dnia, wynosi około 10 000 w przypadku człowieka i około 100 000 u szczura (AMES i GOLD 1991). Interesującym w tym aspekcie wydaje się spostrzeżenie, że jakość diety ma znaczący wpływ na poziom uszkodzeń DNA. Wykazano bowiem, że ilość uszkodzeń tlenowych DNA u osób odżywiających się wysokokaloryczną dietą jest 2–3 krotnie wyższa w porównaniu do osób stosujących dietę niskokaloryczną (SIMIC i BERGTOLD 1991). Liczne badania wskazują na znaczną akumulację uszkodzeń DNA w komórkach postmitotycznych bądź wolno dzielących się i postępującą wraz z wiekiem (różni autorzy). Dane te pochodzą z badań DNA komórek myszy, szczura, psa, królika oraz człowieka. Jak się szacuje u starych szczurów (2 letnich) przypada około 2 miliony różnych uszkodzeń DNA na komórkę, czyli ilość dwukrotnie wyższa niż u zwierząt młodych (AMES i współaut. 1993).

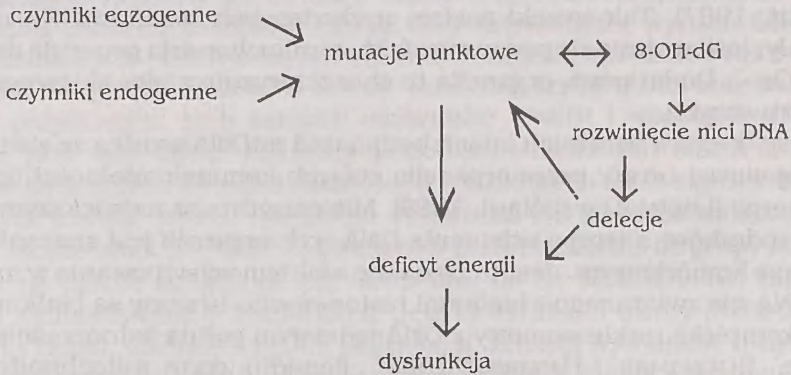
Zespół AMESA (SHIGENAGA i AMES 1991) wykazał obecność markerów wolnorodnikowych uszkodzeń DNA, które stale są wydalane wraz z moczem z organizmów ssaków. Do markerów tych z pewnością należą glikol tyminowy i 5-hydroksymetylouracyl. 8-Hydroksy 2-deoksyguanozyna to kolejny produkt tlenowego uszkodzenia DNA, który z dużą czułością jest wykrywany metodą HPLC (SHIGENAGA i AMES 1991). Szacuje się, że poziom 8-hydroksy 2-deoksyguanozyny jest

szesnastokrotnie wyższy w mitochondrialnym DNA (mtDNA) w porównaniu do DNA jądrowego, co odpowiada poziomowi uszkodzeń jednej na 8000 zasad (SAUL i współaut. 1987). Tak wysoki poziom uszkodzonych zasad mtDNA może być zrozumiały, jeśli weźmie się pod uwagę fakt, że mitochondria generują duże ilości rodnika $O_2^{\cdot -}$. Dodatkowo, organella ta charakteryzuje niska aktywność systemów naprawczych.

Intensyfikacja w ostatnich latach badań nad mtDNA wynika ze stwierdzenia faktu stopniowej utraty przez organella starych komórek zdolności do wytwarzania energii (LINNANE i współaut. 1989). Mitochondria są największym źródłem wolnych rodników, a tempo utleniania DNA tych organelli jest znacznie wyższe niż w jądrze komórkowym. Jest to związane z faktem występowania w mitochondriach DNA nie związane z białkami histonowymi. Histony są białkami, które tworząc kompleks nukleosomowy z DNA jądrowym pełnią jednocześnie funkcje ochronne (LJUNGMAN i HANAWALT 1992). Ponadto geny mitochondrialne są w minimalnym stopniu chronione przez enzymy, które w jądrze wycinają uszkodzone fragmenty DNA. Jest to przyczyną częstych mutacji w obrębie mtDNA, a PIKO i współpracownicy (1988) wykazali, że ilość mutacji mtDNA u szczura i myszy wzrasta podczas starzenia się. Również inne, liczne doniesienia wskazują na akumulację mutacji w mtDNA wraz z wiekiem (TORII i współaut. 1992, YEN i współaut. 1991). Konwersja deoksyguanozyny do 8-hydroksy 2-deoksyguanozyny może być przyczyną mutacji punktowej (CHENG i współaut. 1992). FRAGA i współpracownicy (1991) wykazali w mitochondriach, związany z wiekiem, wzrost poziomu 8-hydroksy 2-deoksyguanozyny będącej, jak wiadomo, produktem tlenowego uszkodzenia deoksyguanozyny i sugerują jego związek z procesem starzenia się. Można więc przypuszczać, że atak utleniaczy na mtDNA jest przyczyną postępującego z wiekiem spadku wydolności mitochondriów. Jest zatem zrozumiały fakt niedostatku energii w komórce, gdy liczba uszkodzonych w ten sposób mitochondriów przekroczy pewną wartość krytyczną. Z tymz kolei, wiąże się zmniejszenie sprawności działania wielu narządów. SOHAL i BRUNK (1992) opisali 49% wzrost produkcji rodnika $O_2^{\cdot -}$ w mitochondriach mózgu osiemnastomiesięcznych szczurów w porównaniu do zwierząt w wieku 3 miesięcy.

TAKASAWA i współpracownicy (1993) obserwowali spadek zawartości mtDNA w szczurzych sercach w miarę starzenia się, jednocześnie nie dotyczyło to mitochondriów wątroby. W tych samych badaniach wykazano, że zawartość 8-hydroksy 2-deoksyguanozyny w mtDNA serca wzrasta w miarę spadku poziomu deoksyguanozyny. Wiele doniesień potwierdza związek między ubytkiem mtDNA oraz wzrostem ilości mutacji a zaburzeniami w funkcjonowaniu licznych narządów w miarę starzenia się (HAYAKAWA i współaut. 1992, YEN i współaut. 1991). Wyraźny wzrost poziomu tlenowych defektów mtDNA w komórkach serca ludzkiego odnotowali HAYAKAWA i współpracownicy (1992). Podobnie CORTOPASSI i ARNHEIM (1990) wcześniej opisali w komórkach mięśnia sercowego i mózgu osobników w podeszłym wieku defekt mtDNA, nie spotykany w tkankach płodowych. Konsekwencją mutacji w mtDNA są defekty enzymów łańcucha oddechowego, co prowadzi do deficytu energii w komórkach, a co za tym idzie w całej tkance. Fakty te upoważniają do wyciągnięcia wniosku, że w trakcie życia człowieka pogłębia się nie-miażdżycowa dysfunkcja serca a także innych tkanek

organizmu, co przedstawić można według poniższego schematu (HAYAKAWA i współaut. 1992):



gdzie 8-OH-dG oznacza 8-hydroksy 2'-deoksyguanozynę.

Wiele danych wskazuje na istnienie związku między przewlekłymi schorzeniami wieku starczego a niewydolnością mitochondriów. Zalicza się do nich cukrzycę typu II, chorobę Parkinsona i chorobę Alzheimera.

Odnosząc powyższe dane do teorii tempa życia, należy odnotować pracę SAULA i współautorów (1987), którzy wykazali, że poziom utlenionej tymidyny wydalanej z organizmu jest zgodny z tempem metabolizmu i przeciwnie skorelowany z długością życia. Dla przykładu, szczury wykazujące wyższe tempo metabolizmu i krótszy okres życia niż człowiek wydają około 15 razy większą ilość glikolu tymidynowego i glikolu tyminy na kilogram masy ciała w porównaniu do organizmu ludzkiego. Obserwacje te popierają wolnorodnikową teorię starzenia się bazującą na fakcie, iż tempo metabolizmu jest powiązane z poziomem generowanych wolnych rodników.

Wszystkie przedstawione wyniki badań zdają się świadczyć, że powolne starzenie się organizmu nie jest wynikiem programu genetycznej śmierci zapisanego w chromosomach (gerontogeny), ale jest wynikiem procesów, prowadzących do stopniowej degradacji składników komórkowych organizmu. Natomiast na ustalenie odpowiedzi na pytanie — czy reaktywne formy tlenu są pierwotną przyczyną uszkodzeń komórki, czy też ich wzmożone generowanie w komórce ma charakter wtórny — przyjdzie nam zapewne jeszcze poczekać.

FREE RADICALS AND AGEING

Summary

Numerous specific mechanisms have been proposed to explain the process of ageing. No single theory has been generally accepted: "this remarkable process remains a mystery".

Damage caused by free radicals to DNA, proteins and other macromolecules accumulates with age and has been postulated to be a major type of endogenous damage leading to ageing.

This review is an attempt to summarize our present knowledge on the free radical involvement in ageing.

LITERATURA

- AMES B. N., GOLD L. S., 1991. *Endogenous mutagens and the causes of aging and cancer*. Mutation Res. 250, 3-16.
- AMES B. N., SHIGENAGA M. K., HAGEN T. M., 1993. *Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 7915-7922.
- ALEXANDER P., 1967. *The role of DNA lesions in processes leading to aging in mice*. Symp. Soc. Exp. Biol. 21, 29-50.
- ARKING R., BUCK S., BERRIOS A., DWYER S., BAKER III G. T., 1991. *Elevated paraquat resistance can be used as a bioassay for longevity in a genetically based long-lived strain of Drosophila*. Dev. Genet. 12, 362-370.
- BARTOSZ G., LEYKO W., FRIED R., 1979. *Superoxide dismutase and life-span of Drosophila melanogaster*. Experientia 35, 1193-1194.
- BAILEY A. J., RANTA M. H., NICHOLLS A. C., PARTRIDGE S. M., ELSDEN D. F., 1977. *Isolation of alpha-amino adipic acid from mature dermal collagen and elastin: evidence for an oxidative pathway in the maturation of collagen and elastin*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 78, 1403-1410.
- BAYNES J. W., 1991. *Role of oxidative stress in development of complications in diabetes*. Diabetes 40, 405-412.
- BERNSTEIN C., BERNSTEIN H., 1991. *Aging, sex and DNA repair*. Academic Press, San Diego, CA.
- BJORKSTEN J., 1968. *The crosslinkage theory of aging*. J. Am. Geriat. Soc. 16, 408-427.
- BUN-HOI N. P., RATSUNAMANGA A. R., 1959. *Age retardation in the rat by nordihydroguaiaretic acid*. Compte rendus des Seances de la Societe de Biologie Paris 153, 1180-1182.
- BRIZZEE K. R., EDDY D. E., HARMAN D., ORDY J. M., 1984. *Free radical theory of aging. Effect of dietary lipids on lipofuscin accumulation in the hippocampus of rats*. Age 7, 9-15.
- CARNEY J. M., STARKE-REED P. E., OLIVER C. N., LANDUM R. W., CHENG M. S., WU J. F., FLOYD R. A., 1991. *Reversal of age related increase in brain protein oxidation, decrease in enzyme activity and loss in temporal and spatial memory by chronic administration of the spin-trapping compound N-tert-butyl-alpha-phenylnitron*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 88, 3633-3636.
- CHENG K. C., CAHILL D. S., KASAI H., NISHIMURA S., LOEB L. A., 1992. *8-hydroxyguanine, an abundant form of oxidative DNA damage, causes G-T and A-C substitutions*. J. Biol. Chem. 267, 166-172.
- COMFORT A., 1971. *Effect of ethoxyquin on the longevity of C3H mice*. Nature 229, 254-255.
- CORTOPASSI G. A., ARNHEIM N., 1990. *Detection of a specific mitochondrial DNA deletion in tissues of older humans*. Nucleic Acids Res. 18, 6927-6933.
- CUTLER R. G., 1991. *Recent progress in testing the longevity determinant and dysdifferentiation hypotheses of aging*. Arch. Gerontol. Geriatr. 12, 75-98.
- DIZDAROGLU M., OLINSKI R., DOROSHOW J. H., AKMAN S., 1993. *Modification of DNA bases in chromatin of intact target human cells by activated human polymorphonuclear leukocytes*. Cancer Res. 53, 1269-1272.
- EMANUEL N. M., DUBURS G., OBUKHOV L. K., ULDRIKIS J., 1981. *Drug for prophylaxis of aging and prolongation of lifetime*. Chemical Abstracts 94, 9632a.
- EMANUEL N. M., 1976. *Free radicals and the action of inhibitors of radical processes under pathological states and aging in living organisms and man*. Quarterly Review of Biophysics 9, 283-308.
- EPSTEIN J., GERSHON D., 1972. *Studies on aging in nematodes, IV. The effect on antioxidants on cellular damage and life span*. Mech. Ageing Dev. 1, 257-264.
- FLEMING J. E., WALTON J. K., DUBITSKY R., BENSCH K. G., 1988. *Aging results in an unusual expression of Drosophila heat shock proteins*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 85, 4099-4103.
- FLEMING J. E., REVEILLAUD J., NIEDZWIECKI A., 1992. *Role of oxidative stress in Drosophila aging*. Mutation Res. 275, 267-279.
- FLOYD R. A., 1990. *Role of oxygen free radicals in carcinogenesis and brain ischemia*. FASEB J. 4, 2587-2597.
- FRAGA C. G., MOTCHNIK P. A., SHIGENAGA M. K., HELBOCK H. J., JACOB R., AMES B. N., 1991. *Ascorbic acid protects against endogenous oxidative DNA damage in human sperm*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 88, 11003-11006.
- FRIDOVICH J., 1975. *Superoxide dismutase*. Annu. Rev. Biochem. 44, 147-159.
- FRIEDE R. L., 1962. *The relation of the formation of lipofuscin to the distribution of oxidative enzymes in the human brain*. Acta Neuropathol. 2, 113-125.

- GERSCHMAN R., 19981. *Historical introduction to the "Free radical theory of oxygen toxicity"*. [W:] GILBERT D. L. (red.) *Oxygen and living processes: an intrerdisciplinary approach*. Springer Verlag, New York, NY 44-46.
- HALLIWELL B., 1992. *Reactive oxygen species and the central nervous system*. J. Neurochem. 59, 1609-1623.
- HALLIWELL B., GUTTERIDGE J. M., 1985. *The importance of free radicals and catalytic metal ions in human diseases*. Mol. Aspects Med. 8, 89-193.
- HALLIWELL B., GUTTERIDGE M. C., 1989. *Free Radicals in Biology and Medicine*. Second edition, Clarendon Press, Oxford.
- HALLIWELL B., GUTTERIDGE M. C., 1990. *Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease*. Met. Enzym. 186, 1-36.
- HARMAN D., 1956. *Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry*. J. Gerontol. 11, 298-300.
- HARMAN D., 1968. *Free radical theory of aging: effect of free radical inhibitors on the mortality rate of male LAF₁ mice*. J. Gerontol. 23, 476-482.
- HARMAN D., 1972. „The biological clock”: The mitochondria? J. Amer. Geriat. Soc. 20, 145-149.
- HARMAN D., 1990. *Lipofuscin and ceroid formation: the cellular recycling system*. [W:] *Lipofuscin and ceroid pigments*. E. A. PORTA (red.) Plenum Press, New York, 3-15.
- HARMAN D., 1992. *Free radical theory of aging: history*. [W:] *Free radicals and aging*. EMERT I. i CHANCE B. (red.) Birkhauser, Basel, 1-10.
- HARMAN D., 1993. *Free radical involvement in aging. Pathophysiology and therapeutic implications*. Drug and Aging 3(1), 60-80.
- HARMAN D., 1993. *Free radical theory of aging: A hypothesis on pathogenesis of senile dementia of the Alzheimer's type*. Age 16, 23-30.
- HAYAKAWA M., HATTORI K., SUGIYAMA S., OZAWA T., 1992. *Age associated oxygen damage and mutations in mitochondrial DNA in human hearts*. Bioch. Biophys. Res. Commun. 182 (2), 979-985.
- HAYFLICK L., 1987. *Origins of longevity*. [W:] *Modern biological theories of aging*. M. R. WARNER (red.) Raven Press, New York, 21-34.
- HEIDRICK M. L., HENDRICKS L. C., COOK D. E., 1984. *Effects of dietary 2-mercaptoethanol on the life span, immune system, tumor incidence, and lipid peroxidation damage in spleen lymphocytes of aging BC₃F₁ mice*. Mech. Ageing Dev. 27, 341-358.
- JOENJE H., 1989. *Genetic toxicology of oxygen*. Mutation Res. 219, 193-208.
- JOHNSON T. E., 1990. *Increased life span of age-1 mutants in Caenorhabditis elegans and lower Gompertz rate of aging*. Science 249, 908-912.
- KASPRZAK S. K., 1991. *The role of oxidative damage in metal carcinogenicity*. Chem. Res. Toxicol. 4, 604-615.
- KIRKWOOD T. B. L., 1985. *Comparative and evolutionary aspects of longevity*. [W:] *Handbook of the biology of aging*. C. E. FINCH i E. L. SCHNEIDER (red.) 2nd edn., Van Nostrand Reinhold, New York, NY, 27-44.
- LICZMAŃSKI A. E., 1988b. *Toksyczność tlenu. II Mechanizmy obronne*. Post. Biochem. 34, 293-310.
- LINNANE A. W., MARZUKI S., OZAWA T., TANAKA M., 1989. *Mitochondrial DNA mutations as an important contributor to aging and degenerative diseases*. Lancet 1, 642-645.
- LJUNGMAN M., HANAWALT P. C., 1992. *Efficient protection against oxidative DNA damage in chromatin*. Mol. Carcinog. 5, 264-269.
- LYMAN C. P., O' BRIAN R. C., GREEN N. C., PAPAFRANGOS E. D., 1981. *Hibernation and longevity in the Turkish hamster Mesocricetus brandti*. Science 212, 668-670.
- MASSIE H. R., BAIRD M. B., McMAHON M. M., 1975. *Loss of mitochondrial DNA with aging*. Gerontology 21, 231-237.
- MATSUMA G., HERP A., PIGMON W., 1966. *Depolymerization of hyaluronic acid by antioxidants and radiations*. Radiation Res. 28, 735-752.
- MARNETT L. J., 1987. *Peroxyl free radicals: potential mediators of tumor initiation and promotion*. Carcinogenesis 8, 1365-1373.
- MEDVEDEV Z. A., 1990. *An attempt at a rational classification of theories of aging*. Biological Review 65, 375-398.
- MIGUEL J., LUNDGREN P. R., BENSCH K. G., ATLAN H., 1976. *Effects of temperature on the life span, vitality and fine structure of Drosophila melanogaster*. Mech. Ageing Dev. 5, 347-370.
- MIGUEL J., ECONOMOS A. C., BENSCH K. G., ATLAN H., JOHNSON JR J. E., 1979. *Review of cell aging in Drosophila and mouse*. Age 2, 78-88.

- MIGUEL J., BINNARD R., FLEMING J. E., 1983. *Role of metabolic rate and DNA repair in Drosophila ageing: Implications for the mitochondrial mutation theory of cell aging*. *Exp. Gerontol.* 18, 161–171.
- MULLAART E., LOHMAN P. H. M., BERENDS F., VIJG J., 1990. *DNA damage metabolism and aging*. *Mutation Res.* 237, 189–210.
- MUNKRES K. D., MINNSSEN M., 1976. *Aging of Neurospora crassa. I Evidence for the free radical theory of aging from studies of a natural death mutant*. *Mech. Ageing Dev.* 5, 790–798.
- NOHL H., KRAMER J., 1980. *Molecular basis of age-dependent changes in the activity of adenine nucleotide translocase*. *Mech. Ageing Dev.* 14, 137–144.
- OLIŃSKI R., 1993. *Uszkodzenia DNA indukowane działaniem aktywnych form tlenu i ich rola w procesie karcynogenezy*. *Post. Hig. Med. Dośw.* 47(6), 463–474.
- OLIVER C. N., LEVINE R. L., STADTMAN E. R., 1987a. *A role of mixed function oxidation reactions in the accumulation of altered enzyme forms during aging*. *J. Am. Geriat. Soc.* 35, 947–956.
- OLIVER C. N., ALIN B. W., MOERMAN E. J., GOLDSTEIN S., STADTMAN E. R., 1987b. *Age-related changes in oxidized proteins*. *J. Biol. Chem.* 262, 5488–5491.
- ONO T., OKADA S., 1985. *Unique increase of superoxide dismutase level in brains of long living mammals*. *Exp. Gerontol.* 19, 349–354.
- ORRENIUS S., Mc CONKEY D. S., NICOTERA P., 1991. *Role of calcium in toxic and programmed cell death*. *Adv. Exp. Med. Biol.* 283, 419–425.
- PACIFICI R. E., DAVIES K. J., 1991. *Protein, lipid and DNA repair systems in oxidative stress: the free radical theory of aging revisited*. *Gerontology* 37, 166–180.
- PEARL R., 1928. *The rate of living*. Knopf, New York, NY.
- PIKO L., HOUGHAM A. J., BULPITT K. J., 1988. *Studies of sequence heterogeneity of mitochondrial DNA from rat and mouse tissues: Evidence for an increased frequency of deletions/additions with aging*. *Mech. Ageing Dev.* 43, 279–293.
- RAO G., XIA E., RICHARDSON A., 1990. *Effect of age on the expression of antioxidant enzymes in male Fischer F 344 rats*. *Mech. Ageing Dev.* 53, 49–60.
- RATTAN S. J. S., 1989. *DNA damage and repair during cellular aging*. *Int. Rev. Cytol.* 116, 47–88.
- REITER R. J., 1994. *Free radicals, melatonin and cellular antioxidative defense mechanisms*. [W:] *Pathophysiology of immune-neuroendocrine communication circuit*. D. GUPTA, H. A. WOLLMANN, P. G. FEDOR-FREGBERGH (red.). Mattes Verlag, Stuttgart, 135–160.
- RICHTER G., PARK J. W., AMES B. N., 1988. *Normal oxidative damage to mitochondrial and nuclear DNA is extensive*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 85, 6465–6467.
- ROSE M. R., 1991. *Evolutionary biology of aging*. Oxford University Press.
- ROZENCWAIG R., GRAD B. R., OCHOA J., 1987. *The role of melatonin and serotonin in aging*. *Med. Hypotheses* 23, 337–352.
- SAUL R. L., GEE P., AMES B. N., 1987. *Free radicals, DNA damage and aging*. [W:] *Modern biological theories of aging*. H. R. WARNER, R. N. BUTLER, R. L. SPROTT, E. L. SCHNEIDER (red.) Raven Press, New York, NY, 113–129.
- SEMSEI I., RAO G., RICHARDSON A., 1991. *Expression of superoxide dismutase and catalase in rat brains as a function of age*. *Mech. Ageing Dev.* 58, 13–19.
- SHIGENAGA M. K., AMES B. N., 1991. *Assays for 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine: a biomarker of in vivo oxidative DNA damage*. *Free Radical Biol. Med.* 10, 211–216.
- SIMIC M. G., BERGTOLD D. S., 1991. *Dietary modulation of DNA damage in human*. *Mutation Res.* 250, 17–24.
- SMITH C. D., CARNEY J. M., STARKE-REED P. E., OLIVER C. N., STADTMAN E. R., FLOYD R. A., MARKESBERY W. R., 1991. *Excess brain protein oxidation and enzyme dysfunction in normal aging and in Alzheimer's disease*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 88, 10540–10543.
- SOHAL R. S., 1976. *Metabolic rate and lifespan*. [W:] *Cellular aging: concepts and mechanisms*. R. WITLER (red.) Karger, Basel, 25–40.
- SOHAL R. S., BUCHAM P. B., 1981. *Relationship between physical activity and life span in the adult housefly Musca domestica*. *Exp. Gerontol.* 16, 159–167.
- SOHAL R. S., ALLEN R. G., 1986. *Relationship between oxygen metabolism, aging and development*. *Free Radical Biol. Med.* 2, 117–160.
- SOHAL R. S., 1987. *The free radical theory of aging: a critique*. *Rev. Biol. Res. Aging* 3, 431–449.
- SOHAL R. S., BRUNK U. T., 1992. *Mitochondrial production of pro-oxidants and cellular senescence*. *Mutation Res.* 275, 295–304.
- SOHAL R. S., ORR W. C., 1993. *Oxidative stress and aging*. [W:] *Biologie prospective*. M. M. GALTEAU, G. SIEST, J. HENNY (red.). Comptes rendus du 8 Colloque de Pont-a-Mousson. John Libbey Eurotext, Paris, 513–518.

- SOHAL R. S., HUNG-HAI KU, AGARVAL S., FORSTER M. J., LAL H., 1994. *Oxidative damage, mitochondrial oxidant generation and antioxidant defenses during aging and in response to food restriction in the mouse*. Mech. Ageing Dev. 74, 121-133.
- STADTMAN E. R., 1992. *Protein oxidation and aging*. Science 257, 1220-1224.
- STARKE-REED P. E., OLIVER C. N., 1989. *Protein oxidation and proteolysis during aging and oxidative stress*. Arch. Biochem. Biophys. 275, 559-567.
- TAKASAWA M., HAYAKAWA M., SUGIYAMA S., HATTORI K., ITO T., OZAWA T., 1993. *Age-associated damage in mitochondrial function in rat hearts*. Exp. Gerontol. 28, 269-280.
- TICE R. R., SETLOW R. B., 1985. *DNA repair and replication in aging organisms and cells*. [W:] *Handbook of the biology of aging*. C. E. FINCH, E. L. SCHNEIDER (red.) 2nd edn, Van Nostrand Reinhold, New York, NY, 173-224.
- TORII K., SUGIYAMA S., TANAKA M., TAKAGI K., HANAKI Y., IIDA K., MATSUYAMA M., HIRABAYASHI N., UMO Y., OZAWA T., 1992. *Aging-associated deletions of human diaphragmatic mitochondrial DNA*. Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. 6, 543-549.
- WALFORD R. L., 1969. *The immunologic theory of aging*. Munksgaard, Copenhagen.
- VELTHUIS-TE WIERIK E. J. M., VAN DEN BERG H., 1994. *Energy restriction, the basis for successful aging in man?* Nutrition Res. 14(7), 1113-1134.
- VIJG J., 1990. *Searching for the molecular basis of aging: the need for life extension models*. Ageing 2, 227-229.
- YEN T. C., SU I. H., KING K. L., WEI Y. H., 1991. *Ageing-associated 5Kb deletion in human liver mitochondrial DNA*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 178, 12.

TADEUSZ WŁOSTOWSKI

*Instytut Biologii filia UW w Białymstoku
Świerkowa 20B, 15-950 Białystok*

METALOTIONEINA A PODZIAŁ KOMÓRKI

WSTĘP

Metalotioneinę (MT) po raz pierwszy odkryto w korze nerki końskiej jako małowcząsteczkowe białko zawierające kadm (MARGOSHES, VALLEE 1957). Mimo upływu już prawie 40 lat od odkrycia MT, jej dokładna funkcja pozostaje ciągle nie znana. Z dotychczasowych badań wynika, że MT może być białkiem wielofunkcyjnym — co wiąże się najprawdopodobniej z obecnością licznych grup sulfhydrylowych w cząsteczce tego białka (BREMNER i BEATTIE 1990). Tak więc sugeruje się udział MT między innymi w detoksykacji metali ciężkich, takich jak kadm i rtęć, oraz w metabolizmie cynku i miedzi (PIOTROWSKI i MOGILNICKA 1976; BREMNER i BEATTIE 1990). Istnieją dane doświadczalne wskazujące na to, że białko to może być również jednym ze składników systemu antyoksydacyjnego komórki, funkcjonującego jako tak zwany zmiatacz wolnych rodników (SATO i BREMNER 1993). Badania ostatnich lat sugerują także, że MT może uczestniczyć w podziale komórki. Tej ostatniej funkcji jest poświęcony w głównej mierze niniejszy artykuł.

CHARAKTERYSTYKA METALOTIONEINY

Cechą charakterystyczną struktury pierwszorzędowej MT są powtórzone sekwencje aminokwasowe Cys-X-Cys oraz Cys-Cys. Reszty cysteinowe stanowią około 30% wszystkich reszt aminokwasowych, wśród których brak jest aminokwasów aromatycznych (KÄGI i SCHÄFFER 1988). Ze względu na różny stopień pokrewieństwa z MT końską, którą traktuje się jako standardową, wyróżniono trzy klasy tego białka (FOWLER i współaut. 1987). Klasa I obejmuje białka o dużym stopniu homologii właśnie z MT końską. Należy tutaj MT wszystkich kręgowców, a także niektórych bezkręgowców, na przykład krabów, *Drosophila*, mięczaków oraz MT niektórych grzybów. Przyjmuje się, że klasa I miała wspólnego przodka, który charakteryzował się strukturą zbliżoną do MT z *Neurospora crassa* (MÜNGER i współaut. 1985). Białko to składa się jedynie z 25 aminokwasów i strukturalnie oraz funkcjonalnie odpowiada połowie MT od końca N u innych organizmów. Klasa II obejmuje białka o niskim stopniu pokrewieństwa z MT

końską. MT zaliczoną do klasy II stwierdzono między innymi u nicieni, szkarłupni, drożdży, sinic i roślin okrytonasiennych. Przypuszcza się, że białko to powstało niezależnie od MT klasy I. Klasa III obejmuje polipeptydy składające się z podjednostek γ -glutamylcysteinowych i występuje głównie u grzybów i roślin obok MT klasy I lub II.

Klasa I MT charakteryzuje się znacznym polimorfizmem. W tkankach kręgowców zwykle występują dwie izoformy MT oznaczane jako I i II, kodowane przez dwa różne geny i różniące się pojedynczym ładunkiem elektrycznym (KÄGI i SCHÄFFER 1988). Jednak u niektórych gatunków ptaków, płazów i ryb występuje tylko jedna forma MT. Ostatnio u człowieka i myszy wykryto trzecią izoformę MT, występującą tylko w mózgu (w astrocytach), która składa się z 68 aminokwasów i jest o 7 aminokwasów dłuższa od izoformy I i II (PALMITER i współaut. 1992).

Pod względem strukturalnym i funkcjonalnym MT klasy I składa się z dwóch różnych domen; domeny β , obejmującej łańcuch polipeptydowy od pierwszego do trzydziestego aminokwasu od końca N oraz z domeny α , obejmującej łańcuch od końca C. U *N. crassa* występuje tylko domena β (MÜNGER i współaut. 1985, KÄGI i SCHÄFFER 1988, BREMNER i BEATTIE 1990).

Domena β wiąże 3 atomy kadmu lub cynku, natomiast domena α wiąże 4 atomy tych pierwiastków. W wiązaniu metali uczestniczą wszystkie grupy sulfhydrylowe reszt cysteinowych. Badania nad rekonstytucją tioneiny — a więc białka pozbawionego metali, wykazały ponadto, że domena β wykazuje szczególne powinowactwo do jonów miedzi, wiążąc 6 atomów tego pierwiastka, natomiast domena α preferuje wiązanie kadmu i cynku, chociaż przy nadmiarze jonów miedzi wokół cząsteczki, kadm i cynk mogą być wypierane i zastępowane przez miedź. MT grzybów wiąże *in vivo* tylko jony miedzi, co funkcjonalnie odpowiada domenie β u ssaków (KÄGI i SCHÄFFER 1988, BREMNER i BEATTIE 1990).

Obecność dwu odmiennych strukturalnie i funkcjonalnie domen potwierdzają także badania nad strukturą genu MT. Gen strukturalny MT jest genem mozaikowym, składającym się z 3 eksonów i 2 intronów (HAMER 1986, KÄGI i SCHÄFFER 1988). Eksony I i II łącznie kodują sekwencje aminokwasów domeny β , natomiast ekson III koduje całą domenę α . Okazało się, że krótki łańcuch MT z *N. crassa* również jest kodowany przez dwa eksony, co potwierdza bliskie pokrewieństwo MT tych grzybów z domeną β kręgowców (MÜNGER i współaut. 1985).

EKSPRESJA GENU METALOTIONEINY

Szczególną własnością MT jest jej indukowalność. Już na początku lat sześćdziesiątych wykazano, że kadm indukuje syntezę MT w wątrobie ssaków (PISCATOR 1964). Późniejsze badania w pełni potwierdziły to pierwsze spostrzeżenie. W wielu laboratoriach udowodniono, że oprócz kadmu syntezę MT indukują także inne metale, na przykład cynk, miedź, rtęć, srebro, bizmut (KÄGI i SCHÄFFER 1988, BREMNER i BEATTIE 1990). Poza metalami syntezę tego białka stymulują także niektóre hormony, takie jak glukokortykoidy i katecholaminy, jak również szereg czynników związanych ściśle z układem odpornościowym

i stanem zapalnym, na przykład interleukina 1, interleukina 6, endotoksyna (HAMER 1986).

Stosując inhibitory syntezy RNA (na przykład aktynomycyna D) i białka (cykloheksimid) wykazano, że kontrola syntezy MT odbywa się na poziomie transkrypcji. Założono więc, że induktor, na przykład metal, wiąże się ze swoistym jądrowym czynnikiem regulującym, tak zwanym *trans*-aktywującym, po czym powstały kompleks rozpoznaje określoną sekwencję nukleotydów w promotorze, zwaną *cis*-aktywującą, inicjując w ten sposób transkrypcję genu MT (HAMER 1986). Istotnie, w regionie promotorowym genu MT wykryto charakterystyczne sekwencje nukleotydowe MRE wrażliwe na metale ciężkie (ang. metal responsive element). Podstawowa sekwencja MRE składa się z siedmiu nukleotydów (TGCA/GCNC) i jest konserwatywna ewolucyjnie (STUART i współaut. 1985). Sekwencje te mogą występować w jednym promotorze w kilku kopiach. Poza sekwencjami MRE w regionie promotorowym MT wykryto również swoiste sekwencje wiążące glukokortykoidy połączone z receptorem (GRE) oraz miejsca wiążące czynniki transkrypcji, takie jak SP-1, AP-1 i AP-2 (KOIZUMI i współaut. 1991).

Ostatnio podjęto również próbę zidentyfikowania i scharakteryzowania jądrowych czynników *trans*-aktywujących, oddziałujących swoiście z sekwencjami MRE w regionie promotorowym. Najlepiej poznanymi czynnikami są ACE1 u drożdży *Saccharomyces cerevisiae* i AMT1 u *Candida glabrata* (BUCHMANN i współaut. 1989, THIELE 1992, ZHOU i współaut. 1992). W obu przypadkach jest to białko zawierające na końcu N 11 reszt cysteinowych, które wiążą 6 atomów miedzi. To wiązanie miedzi powoduje taką zmianę konformacyjną białka, że staje się możliwa jego interakcja z DNA w promotorze. Również w komórkach zwierzęcych stwierdzono jądrowe czynniki regulujące (MRP, MRF, MTF-1, MBF-1, MEP-1, ZRF, p39), które do swej aktywności wymagają albo jonów cynku, albo kadmu (IMBERT i współaut. 1989, ANDERSEN i współaut. 1990, KOIZUMI i współaut. 1992, LABBE i współaut. 1993). Jak dotąd w komórkach zwierzęcych, w przeciwieństwie do drożdży, nie stwierdzono czynników *trans*-aktywujących, oddziałujących swoiście z jonami miedzi. Dotychczasowe badania wskazują, że w komórkach zwierzęcych i ludzkich najprawdopodobniej występują różnorodne czynniki regulujące, zarówno swoiste tkankowo, jak i swoiste dla poszczególnych izoform MT oraz poszczególnych jonów metali.

METALOTIONEINA JAKO BIAŁKO CYKLU KOMÓRKOWEGO

Ostatnie badania przypisują istotną, jeśli nawet nie nadrzędną rolę kinazie białkowej C w modulowaniu poziomu MT w komórce (GARRET i współaut. 1992, XIONG i współaut. 1992, ARIZONO i współaut. 1993). Wiele danych eksperymentalnych wskazuje, że kinaza białkowa C moduluje poziom MT w komórce poprzez indukcję i modyfikację chemiczną dwóch białek kodowanych przez proto-onkogeny komórkowe *c-fos* i *c-jun*, dla których w promotorze genu MT wykryto swoiste sekwencje wiążące heterodimer składający się z białka Fos i Jun, a określane jako czynnik transkrypcyjny AP-1 (na przykład LEE i współaut. 1987, BAUKNECHT i współaut. 1993). Przyjmuje się, że to właśnie określone aktywatory kinazy

białkowej C są odpowiedzialne za intensywną syntezę MT obserwowaną, na przykład, w wątrobie ssaków w okresie ich rozwoju płodowego i postnatalnego oraz w regenerującej wątrobie osobników dorosłych (TOHYAMA i współaut. 1993). Okazało się ponadto, że w warunkach fizjologicznych, a więc przy braku określonego zewnętrznego induktora, MT jest syntetyzowana głównie w komórkach przechodzących przez cykl mitotyczny, na przykład w spermatogoniach nabłonka płciowego, w komórkach nabłonkowych rogowki, siatkówki i jelita cienkiego (NISHIMURA i współaut. 1989a, b, 1990, 1991). Badania te jednocześnie wykazały, że ilość MT, mierzona intensywnością reakcji immunohistochemicznej, jest zależna od częstości, z jaką dzielą się komórki. Komórki dzielące się rzadko zawierają mniej tego białka niż komórki dzielące się częściej; komórki znajdujące się w fazie spoczynkowej G₀ w ogóle nie wykazują obecności MT (NISHIMURA i współaut. 1991).

Stosując metody immunohistochemiczne wykazano ponadto istotne zróżnicowanie w wewnątrzkomórkowym rozmieszczeniu tego białka. Na przykład, w wątrobie noworodków szczurzych i ludzkich MT znajduje się nie tylko w cytoplazmie, lecz także w jądrach komórkowych (PANEMANGALORE i współaut. 1983, NARTEY i współaut. 1987a). Podobnie w większości komórek regenerującej wątroby białko to podlega przemieszczeniu do jądra komórkowego już po 3 godzinach od momentu częściowej hepatoctomii (TOHYAMA i współaut. 1993). Celem bliższego poznania związku pomiędzy MT a cyklem komórkowym, TSUJIKAWA i współpracownicy (1991) stymulowali hepatocyty w hodowli pierwotnej za pomocą nabłonkowego czynnika wzrostu (EGF) i insuliny a następnie techniką immunofluorescencji pośredniej śledzili ewentualne zmiany lokalizacji tego białka wewnątrz komórek. Okazało się, że MT w fazie G₁ jest obecna przede wszystkim w cytoplazmie hepatocytów, podczas gdy na początku fazy S znajduje się głównie w jądrze komórkowym. W szczytowym okresie fazy S białko to ponownie znajdowało się w cytoplazmie. Dane te wyraźnie wskazują, że MT może pełnić określoną rolę w podziale komórki, zwłaszcza na granicy fazy G₁/S cyklu komórkowego.

Badania z zastosowaniem technik immunohistochemicznych, jakkolwiek bardzo ważne, nie dostarczyły jednak informacji dotyczącej, na przykład, formy w jakiej MT występuje na terenie cytoplazmy i jądra komórkowego, a więc czy tworzy ona kompleks z cynkiem, miedzią czy też z obydwoma tymi pierwiastkami oraz jaką pełni tam funkcję. Odpowiedź na to pytanie, przynajmniej częściową, przyniosły badania biochemiczne. Już w 1978 roku wykazano, że MT obecna w cytoplazmie komórek regenerującej wątroby tworzy kompleks z cynkiem (OHTAKE i współaut. 1978). Podobnie w szybko rosnącej wątrobie płodu i noworodków szczurzych i ludzkich z MT znajdującą się w cytoplazmie jest związany głównie cynk z domieszką miedzi (MASON i współaut. 1980; RIORDAN i RICHARDS 1980, KLEIN i współaut. 1991), przy czym u świnki morskiej, chomika syryjskiego i cieląt ten stosunek jest odwrotny (HARTMAN i WESER 1977, BAKKA i WEBB 1981, LUI 1987). W nowszych badaniach okazało się, że skład pierwiastkowy MT, jak również jej rozmieszczenie wewnątrzkomórkowe mogą podlegać istotnym zmianom podczas rozwoju pre- i postnatalnego ssaków. Na przykład, w wątrobie nornicy rudej wykazano, że w cytoplazmie MT tworzy kompleks głównie z cynkiem, przy czym stężenie tego kompleksu gwałtownie maleje pomiędzy

1 a 5 dniem po urodzeniu (WŁOSTOWSKI 1992). Ten zanik MT cytoplazmatycznej ma miejsce akurat w momencie poprzedzającym intensywny wzrost wątroby oraz w okresie gwałtownego wzrostu stężenia miedzi w jądrach komórkowych, przy równoczesnym obniżeniu stężenia tego pierwiastka w cytoplazmie. Stwierdzono jednocześnie, że większość MT znikającej z cytoplazmy pomiędzy 1 a 3 dniem po urodzeniu została zmagazynowana w jądrach komórkowych, przy czym białko to na terenie jądra komórkowego tworzyło kompleks głównie z miedzią, co wskazuje, że nastąpiła wymiana cynku na miedź w cząsteczce MT albo podczas translokacji, albo na terenie jądra komórkowego.

Biorąc pod uwagę powyższe dane oraz wyniki badań TSUJIKAWA i współpracowników (1991) można przypuszczać, że podstawową funkcją MT w podziale komórki jest transport jonów miedzi z cytoplazmy do jądra komórkowego na granicy fazy G₁/S cyklu komórkowego (WŁOSTOWSKI 1993). Z kolei jony miedzi nagromadzone w ten sposób w jądrze komórkowym mogą uczestniczyć w syntezie DNA jądrowego, ponieważ, jak wskazują dotychczasowe badania, niedobór tego pierwiastka powoduje zahamowanie inkorporacji [³H]-tymidyny (LUKASIEWICZ i PROHASKA 1983, DAVIS i współaut. 1988, KRAMER i współaut. 1988). Jakkolwiek dokładna rola jonów miedzi w syntezie DNA jądrowego pozostaje problemem otwartym, to jednak można przypuszczać, że jedną z możliwych funkcji miedzi w tym procesie jest denaturacja podwójnej spirali DNA w miejscu inicjacji widełek replikacyjnych. Dotychczasowe badania wskazują bowiem, że spośród jonów metali jedynie jony miedzi powodują dysocjację podwójnej spirali DNA na dwa pojedyncze łańcuchy (przegląd SZKOLNIK 1980, LIPPERT 1992). Ze względu jednak na tę właściwość miedzi, nie jest pożądana obecność zbyt dużych ilości wolnych jonów tego pierwiastka na terenie jądra komórkowego. Na szczęście większość jonów miedzi na terenie jądra komórkowego jest właśnie związana z MT (RIORDAN i RICHARDS 1980, WŁOSTOWSKI 1992).

Ponieważ jony miedzi związane z tym białkiem tracą swoją reaktywność chemiczną (THIELE i współaut. 1986), nie można więc wykluczyć, że podstawową funkcją MT obecnej w jądrze komórkowym jest wiązanie i detoksykacja nadmiernej ilości wolnych jonów tego metalu. Mówiąc o funkcji MT na terenie jądra komórkowego, nie sposób pominąć poglądu niektórych autorów, sugerujących udział tego białka przede wszystkim w zaopatrywaniu niektórych enzymów w cynk (MESKEL i współaut. 1993), oraz w usuwaniu jonów tego pierwiastka z czynników transkrypcyjnych, regulujących ekspresję określonych genów (ZENG i współaut. 1991). Jak widać, dokładna funkcja fizjologiczna MT na terenie jądra komórkowego na granicy fazy G₁/S cyklu komórkowego budzi jeszcze wiele wątpliwości i wymaga dalszych badań.

METALOTIONEINA A NOWOTWORY

Komórki nowotworowe charakteryzują się wysoką częstością podziałów, dlatego też można oczekiwać, że również w tych komórkach powinna występować MT, której poziom jest regulowany głównie przez produkty proto-onkogenów komórkowych *c-fos* i *c-jun*. Istotnie, duże ilości MT znaleziono w komórkach nowotworów tarczycy (NARTEY i współaut. 1987b), pęcherza moczowego (BAHN-

SON i współaut. 1991), piersi (SCHMID i współaut. 1993) i skóry (ZELGER i współaut. 1993) u człowieka. Podobnie jak w komórkach normalnych, również w przypadku komórek rakowych wykazano istotne zróżnicowanie w wewnątrzkomórkowym rozmieszczeniu tego białka. Na przykład, w komórkach wymienionych nowotworów MT znaleziono zarówno w cytoplazmie, jak i w jądrach komórkowych. Rodzi się przy tym pytanie, jaka jest funkcja fizjologiczna MT w cytoplazmie i jądrze komórkowym oraz jaki jest jej ewentualny wpływ na skuteczność terapii nowotworów.

O ile nie ma jeszcze dokładnej odpowiedzi na pierwszą część pytania — można jedynie przypuszczać, że funkcja ta jest identyczna z funkcją jaką pełni MT w komórkach zdrowych przechodzących przez cykl mitotyczny (poprzedni rozdział) — o tyle uzyskano już w dużym stopniu odpowiedź na drugą część powyższego pytania. Badania ostatnich lat wyraźnie wskazują, że wraz ze wzrostem stężenia tego białka w komórkach nowotworów maleje szansa wyleczenia choroby nowotworowej chemio- i radioterapią (KASAHARA i współaut. 1991, CHERIAN i współaut. 1993, ZELGER i współaut. 1993). Innymi słowy MT obecna w komórkach rakowych czyni je opornymi na leki przeciwnowotworowe. Oporność ta polega najprawdopodobniej na wiązaniu chemicznych środków przeciwnowotworowych przez MT, takich jak cisplatyna, dzięki czemu tracą one swoją reaktywność (KASAHARA i współaut. 1991, CHERIAN i współaut. 1993, SATOH i współaut. 1993a). Ponadto przypuszcza się, że oporność ta może polegać na inaktywacji przez to białko wolnych rodników generowanych w komórce przez leki przeciwnowotworowe i naświetlanie. Na domiar złego okazało się, że same środki antyrakowe indukują syntezę MT w komórkach nowotworowych, przyczyniając się do zwiększenia ich oporności (WOOD i współaut. 1993). Aby przełamać tę oporność należy więc stosować coraz większe dawki leku, które niestety wywołują na ogół ujemne skutki uboczne w postaci uszkodzenia zdrowych tkanek, głównie nerek, serca i szpiku kostnego a nawet indukują proces nowotworzenia w tych tkankach (NAGANUMA i współaut. 1987, 1988, KALDOR i współaut. 1988, SATOH i współaut. 1988, 1993b). Jest to poważna przeszkoda w skutecznej terapii nowotworów. Idealnym sposobem leczenia choroby nowotworowej byłoby zlikwidowanie MT w komórkach nowotworowych a zwiększenie jej poziomu w komórkach normalnych tak, aby białko to chroniło komórki zdrowe przed toksycznym oddziaływaniem leków przeciwnowotworowych, a nie czyniło tego w przypadku komórek rakowych. Ostatnie wyniki badań są pełne optymizmu zrealizowania tej właśnie idei. Wykazano mianowicie, na razie tylko u zwierząt laboratoryjnych, że propargylglicyna, będąca inhibitorem szlaku syntezy cysteiny, skutecznie hamuje syntezę MT w komórkach rakowych, nie wywierając jednocześnie ujemnego wpływu na indukcję syntezy tego białka, na przykład przez cynk w nerkach (SATOH i współaut. 1993a). Wykazano ponadto, że sole bizmutu indukują syntezę MT w sercu i nerkach, lecz nie stymulują jej produkcji w nowotworach (NAGANUMA i współaut. 1987, 1988). Jak dotąd, nie jest znana przyczyna tak odmiennego, lecz korzystnego dla pacjenta, reagowania nowotworów i tkanek normalnych na traktowanie ich propargylglicyną i solami bizmutu. Dzięki zastosowaniu propargylglicyny, soli cynku i cisplatyny udało się w dużym stopniu zniszczyć raka pęcherza moczowego u myszy laboratoryjnej,

nie wywołując przy tym zaburzeń w funkcji zdrowych tkanek (SATO i współaut. 1993a).

Wykorzystując ten właśnie sposób manipulowania zawartością MT w komórkach rakowych i zdrowych można nawet zastosować w chemioterapii bardziej zabójcze leki przeciwnowotworowe niż stosowane dotychczas. Jednym z kandydatów tego typu leków jest kadm (WAALKES i współaut. 1993). Należy jednak podkreślić, że jest to metal bardzo toksyczny tylko w stosunku do tych komórek, które w cytoplazmie nie zawierają MT. Obecność MT w komórce sprawia zaś, że kadm jest silnie wiązany przez to białko, dzięki czemu traci on swoją reaktywność (PIOTROWSKI i MOGILNICKA 1976, KÄGI i SCHÄFFER 1988). Zwiększając więc poziom MT w komórkach zdrowych a zmniejszając jej stężenie w komórkach nowotworowych przy użyciu, na przykład propargylglicyny i soli bizmutu, i podając następnie odpowiednią dawkę kadmu, jedynie komórki rakowe powinny ulec zniszczeniu. Tego rodzaju chemioterapię z użyciem kadmu jako leku przeciwnowotworowego zastosowano z powodzeniem w przypadku raka płuc u myszy laboratoryjnej (WAALKES i współaut. 1993). Autorzy cytowanych prac sugerują zastosowanie propargylglicyny i soli bizmutu także w chemioterapii niektórych chorób nowotworowych u człowieka i być może na pierwsze wyniki nie trzeba będzie zbyt długo czekać.

Reasumując, metalotioneina, której dokładna funkcja fizjologiczna w podziale komórki nie jest jeszcze poznana, okazała się być dużą przeszkodą w skutecznej terapii nowotworów. Im wyższy jest bowiem poziom tego białka w komórkach rakowych, tym gorsza jest prognoza dla pacjenta. Należy jednak mieć nadzieję, że myśl ludzka pokona niebawem i tę przeszkodę.

METALLOTHIONEIN AND CELL PROLIFERATION

Summary

Metallothionein (MT) is a low-molecular weight, cysteine-rich, metal-binding protein found in a variety of organisms, from the animal and plant kingdoms, to fungi and some prokaryotes. MT exhibits a strong affinity for, and is inducible by, various metals (cadmium, zinc, copper, mercury, bismuth) and hormones, as well as by some nonmetallic chemicals and physical stress.

The MT protein has been implicated in the detoxification of toxic metals, in the metabolism of zinc and copper, as well as in the scavenging of free radicals; MT can also be involved in cell proliferation.

Certain tumour types have a high content of MT. Although the exact physiological role of MT in rapidly proliferating tumour cells is unknown, the protein appears to be responsible for an acquired anticancer multidrug resistance.

LITERATURA

- ANDERSEN R. D., TAPLITZ S. J., OBERBAUER A. M., CALOME K. L., HERSCHMAN H. R., 1990. *Metal-dependent binding of nuclear factor to the rat metallothionein-I promoter*. Nucl. Acids Res. 18, 6049-6050.
- ARIZONO K., PETERSON K. L., BRADY F. O., 1993. *Inhibitors of Ca²⁺ channels, calmodulin and protein kinases prevent A23187 and other inductions of metallothionein mRNA in EC3 rat hepatoma cells*. Life Sci. 53, 1031-1037.
- BAHNSON R. R., BANNER B. F., ERNSTOFF M. S., LAZO J. S., CHERIAN M. G., BANERJEE D., CHIN J. L., 1991. *Immunohistochemical localization of metallothionein in transitional cell carcinoma of the bladder*. J. Urol. 146, 1518-1520.

- BAKKA A., WEBB M., 1981. *Metabolism of zinc and copper in the neonates: changes in the concentrations and contents of thionein-bound Zn and Cu with age in the liver of the newborn of various mammalian species*. *Biochem. Pharmacol.* 30, 721-725.
- BAUKNECHT T., ANGEL P., KOHLER M., KOMMOSS F., BIRMELIN F., PFLEIDERER A., WAGNER E., 1993. *Gene structure and expression ana- lysis of the epidermal growth factor receptor, transforming growth factor- α , myc, jun, and metallothionein in human ovarian carcinomas*. *Cancer* 71, 419-429.
- BREMNER I., BEATTIE J. H., 1990. *Metallothionein and the trace minerals*. *Annu. Rev. Nutr.* 10, 63-83.
- BUCHMANN C. P., SKROCH J., WELCH J., FOGEL S., KARIN M., 1989. *The CUP2 gene product, regulator of yeast metallothionein expression, is a copper-activated DNA-binding protewspółaut*. *Mol. Cell. Biol.* 9, 4091-4095.
- CHERIAN M. G., HUANG P. C., KLAASSEN C. D., LIU Y. P., LONGFELLOW D.G. WAALKES M. P., 1993. *National Cancer Institute workshop on the possible roles of metallothionein in carcinogenesis*. *Cancer Res.* 53, 992-925.
- DAVIS M. A., JOHNSON W. T., BRISKE-ANDERSON M., KRAMER T. R., 1987. *Lymphoid cell functions during copper deficiency*. *Nutr. Res.* 7, 211-222.
- FOWLER B. A., HILDERBRAND C. E., KOJIMA Y., WEBB M., 1987. *Nomenclature of metallothionein*. *Experientia (suppl.)* 52, 19-22.
- GARRET S. H., XIONG X., ARIZONO K., BRADY F. O., 1992. *Phorbol ester induction of rat hepatic metallothionein in vivo and in vitro*. *Int. J. Biochem.* 24, 1669-1676.
- HAMER D., 1986. *Metallothionein*. *Ann. Rev. Biochem.* 55, 913-951.
- HARTMANN H. J., WESER U., 1977. *Copper-thionein from fetal bovine liver*. *Biochim. Biophys. Acta* 491, 211-216.
- MBERT J., ZAFARULLAH M., CULOTTA V. C., GEDAMU L., HAMER D., 1989. *Transcription factor MBF-I interacts with metal regulatory elements of higher eucaryotic metallothionein genes*. *Mol. Cell. Biol.* 9, 5315-5323.
- KÄGI J. H. R., SCHÄFFER A., 1988. *Biochemistry of metallothionein*. *Biochemistry* 27, 8509-8515.
- KALDOR J. M., DAY N. E., HEMMINKI K., 1988. *Quantifying the carcinogenicity of antineoplastic drugs*. *Eur. J. Cancer Clin. Oncol.* 24, 703-711.
- KASAHARA K., FUJIWARA Y., NISHO K., OHMORI T., SUGIMOTO Y., KOMIYA K., MATSUDA T., SAJIO N., 1991. *Metallothionein content correlates with the sensitivity of human small cell lung cancer cell lines to cisplatin*. *Cancer Res.* 51, 3237-3242.
- KLEIN D., SCHOLTZ P., DRASCH G. A., MÜLLER-HÖCKER J., SUMMER K. H., 1991. *Metallothionein, copper and zinc in fetal and neonatal human liver, changes during development*. *Toxicol. Lett.* 56, 61-67.
- KOIZUMI S., OTSUKA F., YAMADA H., 1991. *A nuclear factor that interacts with metal responsive elements of a human metallothionein gene*. *Chem. Biol. Interact.* 80, 145-157.
- KOIZUMI S., YAMADA H., SUZUKI K., OTSUKA F., 1992. *Zinc-specific activation of a HeLa cell nuclear protein which interacts with a metal responsive element of the human metallothionein-II gene*. *Eur. J. Biochem.* 210, 555-560.
- KRAMER T. R., JOHNSON W. T., BRISKE-ANDERSON M., 1988. *Influence of iron and the sex of rats on hematological, biochemical and immunological changes during copper deficiency*. *J. Nutr.* 118, 214-221.
- LABBE S., LAROCHE L., MAILHOT D., SEGUIN C., 1993. *Purification of mouse MEP-1, a nuclear protein which binds to the metal regulatory elements of genes encoding metallothionein*. *Nucl. Acids Res.* 21, 1549-1554.
- LEE W., HASLINGER A., KARIN M., TJAN R., 1987. *Activation of transcription by two factors that bind promotor and enhancer seqences of the human metallothionein gene and SV40*. *Nature* 325, 368-372.
- LIPPERT B., 1992. *From cisplatin to artificial nucleases —t he role of metal ion-nucleic acid interactions in biology*. *BioMetals* 5, 195-208.
- LUI E. M. K., 1987. *Metabolism of copper and zinc in the liver and bone of the perinatal guinea-pig*. *Comp. Biochem. Physiol.* 86C, 173-183.
- LUKASIEWICZ O. A., PROHASKA J. R., 1983. *Lymphocytes from copper deficient mice exhibit decreased mitogen reactivity*. *Nutr. Res.* 3, 335-341.
- MARGOSHES M., VALLEE B. L., 1957. *A cadmium protein from equine kidney cortex*. *J. Am. Chem. Soc.* 79, 4813-4814.
- MASON R., BAKKA A., SAMARAWICKRAMA G. P., WEBB M., 1980. *Metabolism of zinc and copper in the neonates, accumulation and function of (Zn, Cu)-metallothionein in the liver of the newborn rat*. *Br. J. Nutr.* 45, 375-389.

- MESKEL H. H., CHERIAN M. G., MARTINEZ V. J., VEINOT L. A., FREI J. V., 1993. *Metallothionein as an epithelial proliferative compartment marker for DNA flow cytometry*. *Modern Pathol.* 6, 755-760.
- MÖNGER K., GERMAN U. A., LERCH K., 1985. *Isolation and structural organization of the Neurospora crassa copper metallothionein gene*. *EMBO J.* 4, 2665-2668.
- NAGANUMA A., SATOH M., IMURA N., 1987. *Prevention of lethal and renal toxicity of cis-diamminedichloro-platinum (II) by induction of metallothionein synthesis without compromising its antitumor activity in mice*. *Cancer Res.* 47, 983-987.
- NAGANUMA A., SATOH M., IMURA N., 1988. *Specific reduction of toxic side effects of Adriamycin by induction of metallothionein in mice*. *Jpn. J. Cancer Res.* 79, 406-411.
- NARTEY N.O., BANERJEE D., CHERIAN M. G., 1987a. *Immunohistochemical localization of metallothionein in cell nucleus and cytoplasm of fetal human liver and kidney and its changes during development*. *Pathology* 19, 233-238.
- NARTEY N. O., BANERJEE D., CHERIAN M. G., 1987b. *Immunohistochemical localization of metallothionein in human thyroid tumors*. *Am. J. Pathol.* 129, 177-182.
- NISHIMURA H., NISHIMURA N., TOHYAMA C., 1989a. *Immunohistochemical localization of metallothionein in developing rat tissues*. *J. Histochem. Cytochem.* 37, 715-722.
- NISHIMURA N., NISHIMURA H., TOHYAMA C., 1989b. *Localization of metallothionein in female reproductive organs of rat and guinea-pig*. *J. Histochem. Cytochem.* 37, 1601-1607.
- NISHIMURA H., NISHIMURA N., TOHYAMA C., 1990. *Localization of metallothionein in the genital organs of the male rat*. *J. Histochem. Cytochem.* 38, 927-933.
- NISHIMURA H., NISHIMURA N., KOBAYASKI S., TOHYAMA C., 1991. *Immunohistochemical localization of metallothionein in the eye of rats*. *Histochemistry* 95, 535-539.
- OHTAKE H., HASEGAWA K., KOGA M., 1978. *Zinc-binding protein in the livers of neonatal, normal and partially hepatectomized rats*. *Biochem J.* 174, 999-1005.
- PALMITER R. D., FINDLEY S. D., WHITMORE T. E., DURHAM D.M., 1992. *MT-III, a brain-specific member of the metallothionein gene family*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 6333-6337.
- PANEMANGALORE M., BANERJEE D., ONOSAKA S., CHERIAN M. G., 1983. *Changes in intracellular accumulation and distribution of metallothionein in rat liver and kidney during postnatal development*. *Dev. Biol.* 97, 95-102.
- PIOTROWSKI J. K., MOGILNICKA E. M., 1976. *Metallothioneina*. *Post. Biochem.* 22, 401-419.
- PISCATOR M., 1964. *On cadmium in normal human kidney together with a report on the isolation of metallothionein from livers of cadmium exposed rabbits*. *Nord. Hyg. Tidsk.* 45, 76-82.
- RIORDAN J. R., RICHARDS V., 1980. *Human fetal liver contains both zinc and copper-rich forms of metallothionein*. *J. Biol. Chem.* 255, 5380-5383.
- SATO M., BREMNER I., 1993. *Oxygen free radicals and metallothionein*. *Free Radical Biol. Med.* 14, 325-337.
- SATOH M., NAGANUMA A., IMURA N., 1988. *Involvement of cardiac metallothionein in prevention of Adriamycin induced lipid peroxidation in the heart*. *Toxicology* 53, 231-237.
- SATOH M., KLOTH D. M., KADHIM S. A., CHIN J. L., NAGANUMA A., IMURA N., CHERIAN M. G., 1993a. *Modulation of both cisplatin nephro-toxicity and drug resistance in murine bladder tumor by controlling metallothionein synthesis*. *Cancer Res.* 53, 1829-1832.
- SATOH M., KONDO Y., MITA M., NAKAGAWA I., NAGANUMA A., IMURA N., 1993b. *Prevention of carcinogenicity of anticancer drugs by metallothionein induction*. *Cancer Res.* 53, 4767-4768.
- SCHMID K. W., ELLIS I. O., GEE J. M. W., DARKE B. M., LEES W. E., KAY J., CRYER A., STARK J. M., HITTMAIR A., ČFNER D., DÜNSTER M., MARGREITER R., DAXENBICHLER G., NICHOLSON R. I., BIER B., BÖCKER W., JASANI B., 1993. *Presence and possible significance of immunocytochemically demonstrable metallothionein over-expression in primary invasive ductal carcinoma of the breast*. *Virchows Archiv. A Pathol. Anat.* 422, 153-159.
- STUART G. W., SEARLE P. F., PALMITER R. D., 1985. *Identification of multiple metal regulatory elements in mouse metallothionein-1 promoter by assaying synthetic sequences*. *Nature* 317, 828-831.
- SZKOLNIK M., 1980. *Mikroelementy w życiu roślin*. PWRL, Warszawa, 411 str.
- THIELE D. J., 1992. *Metal-regulated transcription in eukaryotes*. *Nucl. Acids Res.* 20, 1183-1191.
- THIELE D. J., WALLING M. J., HAMER D., 1986. *Mammalian metallothionein is functional in yeast*. *Science* 231, 854-856.
- TOHYAMA C., SUZUKI J. S., HEMALRAAD J., NISHIMURA N., NISHIMURA H., 1993. *Induction of metallothionein and its localization in the nucleus of rat hepatocyte after partial hepatectomy*. *Hepatology* 18, 1193-1201.

- TSUJIKAWA K., IMAI T., KAKUTANI M., KAYAMORI Y., MIMURA T., OTAKI N., KIMURA M., FUKUYAMA R., SHIMIZU N., 1991. *Localization of metallothionein in nuclei of growing primary cultured adult rat hepatocytes*. FEBS Lett. 283, 239-242.
- WAALKES M. P., DIWAN B. A., WEGHORST C. M., WARD J. M., RICE J. M., CHERIAN M. G., GOYER R. A., 1993. *Further evidence of the tumor-suppressive effects of cadmium in the B6C3F1 mouse liver and lung: late stage vulnerability of tumors to cadmium and the role of metallothionein*. J. Pharmacol. Exp. Therap. 266, 1656-1663.
- WOOD D. P., KLEIN E., FAIR W. R., CHAGANTI R. S. K., 1993. *Metallothionein gene expression in bladder cancer exposed to cisplatin*. Modern Pathol. 6, 33-35.
- WŁOSTOWSKI T., 1992. *Postnatal changes in subcellular distribution of copper, zinc and metallothionein in the liver of bank vole (Clethrionomys glareolus): a possible involvement of metallothionein and copper in cell proliferation*. Comp. Biochem. Physiol. 103C, 285-290.
- WŁOSTOWSKI T., 1993. *Involvement of metallothionein and copper in cell proliferation*. BioMetals 6, 71-76.
- XIONG X., ARIZONO K., GARRETT S. H., BRADY F. O., 1992. *Induction of zinc metallothionein by calcium ionophore in vivo and in vitro*. FEBS Lett. 299, 192-196.
- ZELGER B., HITTMAIR A., SCHIR M., ÖFNER C., ÖFNER D., FRITSCH P. O., BÖCKER W., JASANI B., SCHMID K. W., 1993. *Immunohistochemically demonstrated metallothionein expression in malignant melanoma*. Histopathology 23, 257-264.
- ZENG J., HEUCHEL R., SCHAFFNER W., KÄGI J. H. R., 1991. *Thionein (apometallothionein) can modulate DNA binding and transcription activation by zinc finger containing factor Sp1*. FEBS Lett. 279, 310-312.
- ZHOU P., SZCZYPKA M. S., SOSINOWSKI T., THIELE D. J., 1992. *Expression of a yeast metallothionein gene family is activated by a single metalloregulatory transcription factor*. Mol. Cell. Biol. 12, 3766-3775.

WANDA KŁOPOCKA

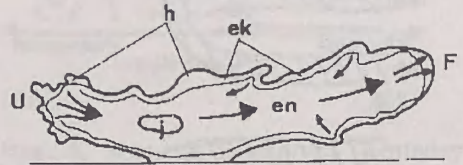
Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN
Pasteura 3, 02-093 Warszawa

ROLA WEWNĄTRZKOMÓRKOWEGO WAPNIA W RUCHU AMEBOIDALNYM I W ZJAWISKACH Z NIM ZWIĄZANYCH

MECHANIZM I REGULACJA LOKOMOCJI

W świecie żywym występują różne rodzaje ruchu. Jednym z nich jest bardzo rozpowszechniony ruch ameboidalny. Poruszają się nim nie tylko organizmy jednokomórkowe, takie jak ameby, ale również zwierzęce komórki tkankowe. Pomiedzy tymi komórkami występują olbrzymie różnice biologiczne i morfologiczne. Jednak podczas migracji wszystkie wykazują polaryzację ruchową, to znaczy mają morfologicznie i funkcjonalnie zróżnicowany przedni i tylny rejon komórki, są przytwierdzone do podłoża, rozwijają przejściowe organy lokomotoryczne, zwane nibynóżkami (pseudopodia) i wytwarzają siłę motoryczną dzięki aktywności kurczliwej aktomiozynowego cytoszkieletu, zwanego korteksem. Tworzy on ciągłą warstwę podścielającą wewnętrzną powierzchnię błony komórkowej i ma strukturę trójwymiarowej sieci o konsystencji półsztywnego żelu, utworzonej z filamentów F-aktyny powiązanych przez białka sieciujące. W aktywniej sieci nierównomiernie są rozmieszczone krótkie, grube filamety miozynowe oraz miozyna oligomeryczna, która również może reagować z F-aktyną. W czasie lokomocji w tylnej strefie komórki, a u ameb również w wycofywanych pseudopodiach, proces skurczu jest połączony z zolifikacją, to jest fragmentowaniem sieci (TAYLOR i współaut. 1979, TAYLOR i FECHHEIMER 1982). Materiał powstały w wyniku dezorganizacji aparatu kurczliwego, a więc: nisko oligomeryczna aktyna, G-aktyna, cząsteczki miozyny oraz białka regulujące, jest

przenoszony w postaci strumienia endoplazmatycznego do strefy frontальной, gdzie ulega ponownej żelifikacji (rys. 1) (GREBECKI 1986, STOCKEM i HOFFMANN 1986). Procesy degradacji i rekonstrukcji warstwy kurczliwej są więc rozdzielone pomiędzy dwa bieguny komórki. Aktywność kurczliwa warstwy korytkalnej pomiędzy nimi jest odpowiedzialna za generowanie siły motorycznej (GREBECKI 1981, 1982). Aby mogły powstać mechaniczne efekty działa-

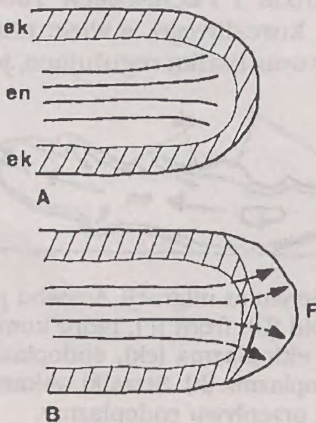


Rys. 1. Schemat migracji *Amoeba proteus*. Uroid (U), front (F), jądro komórkowe (j), ektoplazma (ek), endoplazma (en), hialoplazma (h). Strzałki wskazują kierunek przepływu endoplazmy.

nia takiej siły aktomiozynowa sieć musi być połączona z błoną plazmatyczną bezpośrednio bądź poprzez białka łączące. W komórkach poruszających się ruchem ameboidalnym połączenia aktyny z błoną są krótkotrwałe, równie szybko się tworzą, jak i rozpadają (BERSHADSKY i VASILIEV 1988). Dzięki swej dynamice umożliwiają zmiany kształtu komórki, wysuwanie i wycyfywanie pseudopodiów.

Kurczenie się peryferyjnego cylindra stowarzyszone z jego stopniową zolifikacją to jeden z dwu najważniejszych aspektów ruchu ameboidalnego. Drugim jest rytmiczne odklejenie się warstwy mikrofilamentów od błony komórkowej, zachodzące w wierzchołkach wysuwanych nibynózek. Skurcz całej peryferyjnej sieci aktynowej przyczepionej do błony podnosi ciśnienie hydrostatyczne wewnątrz komórki. W miejscach, w których cytoskielet jest oderwany od błony występuje lokalny spadek ciśnienia. W tym kierunku, zgodnie z prawami hydrodynamiki, płynie endoplazma i tam tworzy się nowy front. Rytmiczne odklejenie się zrekonstruowanej warstwy mikrofilamentów od błony w wierzchołkach wysuwanych pseudopodiów powoduje więc oscylacje gradientu ciśnienia hydrostatycznego w komórce. Odbudowa sieci aktynowej połączonej z błoną, a następnie jej skurcz prowadzi do zmniejszenia tego gradientu i zwolnienia lub zatrzymania przepływu endoplazmy oraz posuwania się krawędzi czołowej. Następne rozdzielenie kompleksu błona-cytoskielet wywołuje kolejny lokalny spadek ciśnienia i przywrócenie albo przyspieszenie przepływu endoplazmy oraz progresji strefy wodącej (rys. 2) (GRĘBECKI 1990). U *Amoeba proteus* cykl ten powtarza się średnio co 2 sekundy (GRĘBECKI 1990, 1991, 1994). Rozdzielenie kompleksu błona-cytoskielet zachodzi również u *Dictyostelium discoideum* (SPUDICH 1989), a także w komórkach tkankowych: fibroblastach (HEATH 1983), keratynocytach (THERIOT i MITCHISON 1991) i makrofagach (HARTWIG i YIN 1988). Sugeruje się, że właśnie strefa frontalna kontroluje zarówno szybkość, jak i kierunek lokomocji (GRĘBECKI i współaut. 1981, GRĘBECKI 1987).

Ruch amebowy wymaga niezwykle precyzyjnej kontroli, zarówno transformacji zol-żel-zol, jak i cyklicznych zmian zachodzących w wierzchołkach wysuwanych nibynózek. Regulacja interakcji miozyny z aktyną, reologicznych właściwości cytoplazmy oraz zjawisk zachodzących w strefach frontalnych jest zależna od $[Ca^{2+}]_i$. Omówiony więc zostanie kolejno wpływ wapnia na funkcjo-

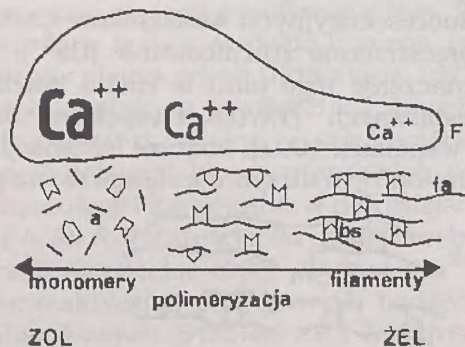


Rys. 2. Schemat funkcjonowania frontu ameby. A — obkurczanie cylindra korykalnego połączonego z błoną; zatrzymanie przepływu endoplazmy. B — odklejenie warstwy kurczliwej od błony plazmatycznej; progresja strefy wodącej. Ektoplazma (ek), endoplazma (en), front (F). Według A. GRĘBECKI 1990.

nowanie samego cytoszkieletu, a następnie rola jaką Ca^{2+} pełni w cyklicznych zjawiskach obserwowanych w strefach czołowych migrujących komórek.

W procesach żelifikacji biorą udział białka sieciujące F-aktynę. Żelifikacja natomiast jest konsekwencją dysocjacji tych białek i działania białek redukujących długość mikrofilamentów. Wykazano, że białka te przeprowadzają odwracalną transformację żol-żel w sposób zależny od stężenia w $[\text{Ca}^{2+}]_i$. W warunkach względnie wysokiego $[\text{Ca}^{2+}]_i$, to jest w uroidzie ameb działają białka rozluźniające strukturę żelu. Jedne z nich mogą ciąć mikrofilamenty, powodując rozpadanie się trójwymiarowej sieci na małe agregaty, inne wiążą się z jednym z końców filamentu aktywnego, zwanym po angielsku barbed-end czy monomerami aktywnymi determinując stopień polimeryzacji aktywy. Z komórek tkankowych wyizolowano bardzo wiele takich białek (SCHLIWA 1981, CRAIG i POLLARD 1982). U ameb zidentyfikowano dotychczas białka hamujące polimeryzację G-aktyny. Są to profilina i cytoplazmatyczna kinaza (REICHSTEIN i KORN 1979, MOCKRIN i KORN 1980, SONOBE i współaut. 1986). Jednocześnie, w warunkach wysokiego $[\text{Ca}^{2+}]_i$, które aktywuje kinazę i umożliwia fosforylację lekkiego łańcucha miozyny, formuje ona krótkie, grube filamente i wchodzi w interakcje z aktyną (CRAIG i współaut. 1983, TAYLOR 1986). Proces żelifikacji połączonej ze skurczem w tylnej strefie komórki jest stowarzyszony z przechodzeniem frakcji cytoszkieletalnej i białek regulujących do puli płynnej endoplazmy. W strefie frontalnej, gdzie $[\text{Ca}^{2+}]_i$ jest niższe, zdepolimeryzowana aktyna, która dociera tu wraz ze strumieniem endoplazmy, ulega repolimeryzacji (KORN 1982). Jest to możliwe dzięki uwalnianiu białek hamujących polimeryzację. Jednocześnie białka sieciujące, które nie wymagają obecności jonów wapnia formują z mikrofilamentów ektoplazmatyczny żel (rys. 3). Grube filamente miozyny ulegają dysocjacji.

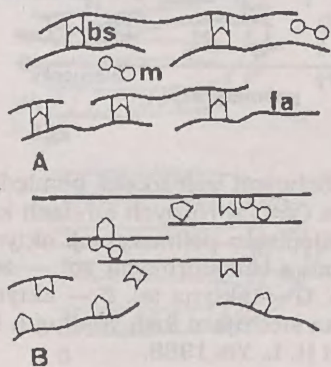
W komórkach mięśniowych, w przeciwieństwie do komórek mięśni, białka biorące udział w skurczu zmieniają miejsce w komórce. Podczas lokomocji stale przemieszczają się w strumieniu endoplazmy w kierunku frontu i wraz z warstwą korytkalną ku strefie uroidalnej (GRĘBECKI 1984, 1994). U *Dictyostelium discoideum* stwierdzono, że zmiana miejsca filamentów miozyny II w komórce jest kontrolowana przez poziom cytoplazmatycznego wapnia oraz wewnątrzkomórkowe pH. W migrującej amebie filamente te są skoncentrowane w tylnym rejonie komórki (YUMURA i współaut. 1984), gdzie $[\text{Ca}^{2+}]_i$ jest stale podwyższone, a w czasie podziału znajduje się je w rejonie bruzdy (KITANISHI-YUMURA i FUKUI 1989, YUMURA i FUKUI 1985). Gromadzą się także w ograniczonych rejonach korteksu pod skupieniami receptorów powierzchniowych (CONDEELIS 1979). Ostatnio wykazano, że uwalnianie miozyny II z korteksu *Dictyostelium* do endoplazmy jest hamowane przez jony wapnia i kalmodulinę (YUMURA i KITANISHI-YUMURA



Rys. 3. Schemat zależności pomiędzy stężeniem Ca^{2+} w różnych strefach komórki a stopniem polimeryzacji aktyny i odwracalną transformacją żol — żel. Front (F), G — aktyna (a), F — aktyna (fa), białka sieciujące (bs). Według I. H. HARTWIG i H. L. YIN 1988.

1993). Podczas chemotaktycznej stymulacji cAMP, to jest w stadium agregacji komórek amebowych, wzrasta czasowo poziom cytoplazmatycznego wapnia (MALCHOW i współaut. 1987), a filamenty miozyny II przechodzą z endoplazmy do rejonu kortykalnego. LIU i NEWELL (1991) sugerują, że cGMP reguluje fosforylację miozyny, a tym samym jej asocjacje z cytoszkieletem poprzez regulację napływu Ca^{2+} do komórki. Wzrost stężenia Ca^{2+} zaczyna się w 6 sek. po rozpoczęciu stymulacji i maksimum osiąga po 30 sek. (BUMANN i współaut. 1984). Przemieszczenie miozyny II z endoplazmy do korteksu zachodzi po około 30 sek. od momentu zadziałania cAMP (NACHMIAS i współaut. 1989), co ściśle odpowiada maksimum wzrostu u $[\text{Ca}^{2+}]_i$. W tym samym czasie ma miejsce kurczenie i zaokrąglenie się komórek (FUTRELLE i współaut. 1982).

Pierwsze badania dotyczące roli wapnia w regulacji struktury cytoplazmy były prowadzone w latach siedemdziesiątych i osiemdziesiątych na modelach glicerynowych wielkich ameb, takich jak *Chaos carolinensis* czy *Amoeba proteus*, izolowanej cytoplazmie tych ameb (lit. zob. STOCKEM i KŁOPOCKA 1988), a także ekstrakcie z *Dictyostelium discoideum* (CONDEELIS i TAYLOR 1977). Wykazano, że dla reaktywacji modeli glicerynowych oraz indukcji strumienia endoplazmatycznego w izolowanej cytoplazmie jest niezbędne stężenie Ca^{2+} równe temu, które powoduje skurcz mięśni, to jest około 10^{-6}M (EBASHI i ENDO 1968). Manipulując stężeniem Ca^{2+} i MgATP można zmieniać stan izolowanej cytoplazmy lub ekstraktu komórkowego. Stężeniem progowym dla skurczu połączonego z dezorganizacją cytoszkieletu, a przy braku miozyny dla przejścia ze stanu żelu w zol, jest $7,0 \times 10^{-7}\text{M}$. Optimum żelifikacji jest osiągane przy stężeniu około $3,0 \times 10^{-8}\text{M}$ (rys. 4) (TAYLOR i współaut. 1973, TAYLOR i współaut. 1976, HELLEWELL i TAYLOR 1979, TAYLOR i CONDEELIS 1979, SONOBE i współaut. 1985). Przypuszcza się, że jednym z mechanizmów kontrolujących transformację zol — żel jest fosforylacja kompleksu profilina/G-aktyna, katalizowana przez kinazę przy wysokim $[\text{Ca}^{2+}]_i$ i umożliwiająca tworzenie F-aktyny (SONOBE i współaut. 1986). Badania prowadzone na dużych amebach (*Chaos carolinensis* i *Amoeba proteus*) z użyciem fluorescencyjnych wskaźników Ca takich jak ekworyna, czy fura-2 wykazały przestrzenne zróżnicowanie $[\text{Ca}^{2+}]_i$ w migrujących komórkach i potwierdziły znaczenie tego jonu w ruchu ameboidalnym i niektórych zjawiskach z nim związanych (TAYLOR i współaut. 1980, KURODA i współaut. 1988, GOLNICK i współaut. 1991). Podczas lokomocji komórek *Amoeba proteus* $[\text{Ca}^{2+}]_i$ w rejonie uroidalnym utrzymuje się zawsze na poziomie około 10^{-7}M , podczas gdy w strefie



Rys. 4. Schemat pokazujący związek pomiędzy skurczem i żelifikacją żelu aktynowego: A — żel aktynowy; brak interakcji aktyny z miozyna, $[\text{Ca}^{2+}]_i$ równe $3,0 \times 10^{-8}\text{M}$; B — żelifikacja żelu aktynowego, interakcja białek biorących udział w skurczu, $[\text{Ca}^{2+}]_i$ równe $7,0 \times 10^{-7}\text{M}$. Filamenty aktynowe (fa), miozyna (m), białka sieciujące (bs). Według S. B. HELLEWELL i D. L. TAYLOR 1979.

frontalnej wynosi około 10^{-8} M. Ten stale utrzymujący się gradient wapniowy jest skorelowany z rozkładem przepływu strumienia cytoplazmy i kierunkiem lokomocji.

Uważa się, że źródłem Ca^{2+} kontrolującego funkcjonowanie warstwy kortalnej (COHEN i DE VRIES 1973, STOCKEM i KLEIN 1979) mogą być złogi wapniowe związane z błoną plazmatyczną. Wykryto je u *Amoeba proteus* (STOCKEM i KLEIN 1979), *Acanthamoeba castellanii* (SOBOTA 1985, SOBOTA i współaut. 1977, 1978), a także u *Dictyostelium discoideum* (DE CHASTELLIER i RYTER 1981, 1982). U *Dictyostelium* te lokalnie ograniczone miejsca wiązania Ca^{2+} są szczególnie liczne w rejonach komórki, w których błona podścielona jest siecią mikrofilamentów, a więc w filopodiach i kubkach fagocytarnych (DE CHASTELLIER i RYTER 1981). U *Amoeba proteus* są obecne w tylnym rejonie komórki, a więc tam gdzie poziom wolnego wapnia jest stale podwyższony. Sugeruje się, że magazyny te są formowane w rejonach ze zwiększoną przepuszczalnością błony komórkowej dla Ca^{2+} (STOCKEM i KLEIN 1979). Być może są one związane z domenami błony plazmatycznej, w których zbierają się kanały wapniowe. Badania elektrofizjologiczne wykazały ciągły napływ jonów Ca^{2+} w tylnej strefie komórki i ich usuwanie w rejonie przednim (KÜHTREIBER i JAFFE 1990, NUCCITELLI i współaut. 1977).

Oprócz utrzymującego się stale przestrzennego zróżnicowania stężenia wolnego wapnia, w migrujących komórkach obserwuje się również lokalne, spontaniczne zmiany poziomu tego jonu. Wykazano, że podczas ruchu dużych ameb $[\text{Ca}^{2+}]_i$ w ich strefach czołowych wzrasta rytmicznie co 1–4 sek. (TAYLOR i współaut. 1980). Ponieważ odrywanie się kolejnych warstw aktywnych spod błony powtarza się co około 2 sek., sugeruje się, że wzrost $[\text{Ca}^{2+}]_i$ bezpośrednio pod błoną frontálną powoduje rozdzielenie kompleksu błona-cytoszkielek (GRĘBECKI 1994). Powstaje w ten sposób gradient ciśnienia hydrostatycznego, kontrolujący zarówno kierunek, jak i tempo lokomocji. Gdy stężenie wapnia spada jest możliwa reorganizacja cytoszkieletu pod błoną frontu. Różnice ciśnienia zmniejszają się wówczas lub zanikają, endoplazma płynie wolniej lub zatrzymuje się, front przestaje się posuwać i może rozpocząć się jego wycofywanie (rys. 2). Na lokomocję ameb mogą mieć wpływ rozmaite bodźce zarówno fizyczne, jak i chemiczne. Za pomocą pozytywnych bodźców chemicznych (KOROHODA 1977) czy świetlnych (GRĘBECKI 1981), działających lokalnie na powierzchnię *Amoeba proteus* możliwe jest formowanie nowych frontów w dowolnym rejonie komórki. Czynniki te powodują bowiem destabilizację połączeń błona-cytoszkielek, poprzez wzrost $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ograniczony do strefy stymulacji i formowanie w tym miejscu nowego frontu. Powstanie nowego frontu z kolei reorientuje polaryzację ameby, a tym samym zmienia kierunek jej migracji (Grębecka 1988). Wzrost $[\text{Ca}^{2+}]_i$ obserwowano również pod wpływem chemotaktycznie pozytywnych bodźców przy krawędzi lamellipodiów komórek nabłonkowych (STROHMEIER i BEREITER-HAHN 1984, MITTAL i BEREITER-HAHN 1985) oraz w strefach czołowych granulocytów (Sewyer i współaut. 1985, TRUETT i współaut. 1988) i fibroblastów (ONUMA i HUI 1988). Pozytywny bodziec chemiczny powoduje wzrost poziomu cytoplazmatycznego wapnia u amebowych form *Dictyostelium* (WICK i współaut. 1978, MALCHOW i współaut. 1982, FUKUI i YUMURA 1986). Sugeruje się, że kontrola ruchu u ameb bazuje właśnie na lokalnych zmianach $[\text{Ca}^{2+}]_i$ i związanej z nimi cyklicznej dezintegracji połączeń błona-cytoszkielek (GRĘBECKI 1992).

WAPŃ JAKO WTÓRNY PRZEKAŹNIK W REAKCJACH AMEB
NA BODŹCE ZEWNĘTRZNE

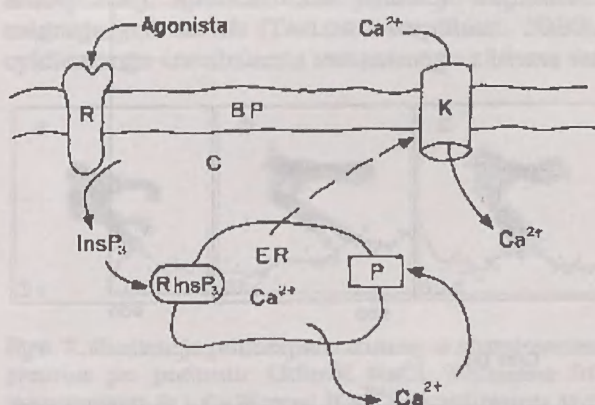
Nie tylko migracja ameb jest kontrolowana w sposób zależny od stężenia wolnego wapnia. Jest on zaangażowany w regulację wszystkich zjawisk związanych z aktywnością kurczliwą cytoszkieletu ameb, to jest endo- i egzocytozy, cytokinezy, transportu receptorów powierzchniowych, czy kontaktów międzykomórkowych. Wapń jest również wtórnym przekaźnikiem w reakcjach ameb wywoływanych przez rozmaite bodźce, zarówno czynniki chemotaktyczne, jak światło (UV), czy induktory pinocytotyczne. Dla tych komórek bowiem reakcją jest zwykle zmiana kierunku lub szybkości ruchu, zahamowanie lub podjęcie lokomocji, czy pinocytoza. Związane z Ca^{2+} reakcje na bodźce są badane od ponad stu lat. Wyniki dotyczące biochemicznej strony tych zjawisk pochodzą głównie z badań na komórkach tkankowych. Ameby pozostają przede wszystkim obiektem eksperymentów fizjologicznych.

Działanie bodźca powoduje zwykle przejściowy wzrost poziomu cytoplazmatycznego wapnia. Jest on wynikiem uwalniania Ca^{2+} z wewnątrzkomórkowych magazynów do cytoplazmy oraz napływu tego jonu do komórki przez kanały wapniowe w błonie plazmatycznej. Mobilizacja wapnia we wszystkich typach komórek jest związana z działaniem trisfosfoinozytolu (inozytolo (1,4,5)trisfosforan, w skrócie InsP_3) będącego produktem rozpadu fosfolipidów inozytolowych (według BARAŃSKA 1992, PUTNEY 1993). Ten wtórny przekaźnik informacji pojawia się w cytoplazmie w wyniku aktywacji określonej grupy receptorów powierzchniowych. Wzrostowi stężenia trisfosfoinozytolu towarzyszy zawsze wzrost poziomu wolnych jonów wapnia w cytoplazmie ponieważ InsP_3 uwalnia wapń z cystern endoplazmatycznego retikulum (ER) poprzez wiązanie się do specyficznych receptorów w błonie tej organelli (według KWIATKOWSKA 1986, BERRIDGE i IRVINE 1989, PODDANA i BARAŃSKA 1991). Receptor InsP_3 jest jednocześnie kanałem wapniowym (FERRIS 1989, PODDANA i BARAŃSKA 1991). W wyniku konformacyjnych zmian, powodowanych przyłączeniem cząsteczki przekaźnika (GILL 1989), otwiera się i uwalnia Ca^{2+} do cytosolu (rys. 5).

Opróżnianie organelli magazynujących wapń jest sygnałem, który inicjuje napływ zewnątrzkomórkowego Ca^{2+} do cytoplazmy. W komórkach pobudliwych wapń napływa zarówno przez kanały napięciowo-zależne, jak i receptorowe; w komórkach niepobudliwych, które nie posiadają kanałów wapniowych, regulowanych przez zmiany potencjału błonowego — przez jonowe kanały receptorowe (TSIEN i TSIEN 1990).

Mechanizm kontrolowania przepuszczalności błony plazmatycznej dla jonów wapnia pozostaje nadal kontrowersyjny. Badania prowadzone na limfocytach (KHAN i współaut. 1992) i zakończeniach nerwowych komórek węchowych (RESTREPO i współaut. 1990, KALINOSKI i współaut. 1992) wykazały, że InsP_3 stymuluje napływ Ca^{2+} do komórki przez interakcję ze specyficznymi receptorami zlokalizowanymi w błonie plazmatycznej. W 1990 roku PUTNEY sugerował istnienie dyfundującego przekaźnika, uwalnianego z opróżnionych magazynów wapniowych, który inicjowałby napływ Ca^{2+} do komórki. Taki przekaźnik wyizo-

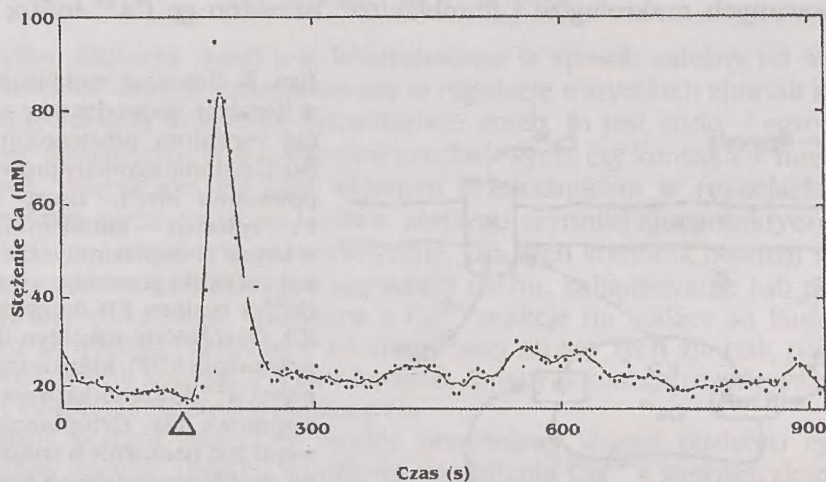
lowano ostatnio z limfocytów (RANDRIAMAMPITA i TSIEN 1993). Jest on uwalniany do cytoplazmy i w mniejszym stopniu do środowiska (rys. 5). Ponieważ powoduje napływ Ca^{2+} nie tylko do komórek, w których jest produkowany, ale również do nieaktywowanych makrofałów i fibroblastów, nazwano go Ca^{2+} -influx factor (CIF).



Rys. 5. Schemat mobilizacji Ca^{2+} w komórce spowodowany aktywacją receptora powierzchniowego (R). Działanie agonisty prowadzi do powstania InsP_3 . Łączy się on z receptorem — kanałem (R InsP_3) w błonie endoplazmatycznego retikulum (ER) i powoduje uwolnienie Ca^{2+} z cystern ER do cytoplazmy (C). Opróżniony magazyn uwalnia przekaznik (CIF), który inicjuje napływ Ca^{2+} do komórki przez kanały wapniowe (K). Cytoplazmatyczny wapń jest ponownie transportowany do ER przez pompę wapniową (P). Błona plazmatyczna (BP). Według J. W. PUTNEY 1990.

U *Dictyostelium discoideum* stymulowanego cAMP $[\text{Ca}^{2+}]_i$ wzrasta 2,6× (SARAN i współaut. 1994). Ze stymulacją cyklicznym AMP jest związane przechodzenie komórek ze stanu wegetatywnego do stanu agregacji, wapń jest więc zaangażowany prawdopodobnie zarówno w adhezję, jak i lokomocję małych ameb, konieczną dla uformowania pseudoplazmodium. Ponieważ opisane doświadczenia prowadzono w środowisku pozbawionym Ca^{2+} , wzrost poziomu tego jonu w cytoplazmie musiał odbywać się dzięki uwalnianiu go z magazynów wewnątrzkomórkowych (SARAN i współaut. 1994). Jednocześnie wykazano, że wzrost $[\text{Ca}^{2+}]_i$ rozpoczyna się wcześniej niż napływ tego jonu do komórek. U *Amoeba proteus* gwałtowny, przejściowy wzrost poziomu cytoplazmatycznego Ca^{2+} wywołują induktory pinocytotyczne, takie jak jony sodu (rys. 6) i potasu oraz czynniki powodujące powstawanie rozet: acetylcholina i chlorek choliny (KŁOPOCKA i POMORSKI w przygotowaniu). Wzrost $[\text{Ca}^{2+}]_i$ jest zawsze skorelowany w czasie z zahamowaniem lokomocji, utratą adhezji i stopniowym zaokrągleniem się komórki (rys. 7). Zmiany te są spowodowane silnym kurczeniem się całej warstwy korykalnej. Ponieważ pinocytoza u wielkich ameb może zachodzić w środowisku bezwapniowym (JOHANSSON i JOSEFSSON 1978, STOCKEM i KLEIN 1988, KŁOPOCKA i Grębecka 1985), wydaje się, że podobnie jak u stymulowanego cAMP *Dictyostelium* i tutaj sygnał wapniowy jest wynikiem uwalniania Ca^{2+} z wewnątrzkomórkowych magazynów. Sugeruje się, że spadek $[\text{Ca}^{2+}]_i$ do poziomu sprzed stymulacji jest wynikiem ponownej sekwestracji wapnia. W wielu typach komórek niepodobudliwych wykazano, że przejściowy wzrost $[\text{Ca}^{2+}]_i$ może zachodzić niezależnie od napływu Ca^{2+} (ROONEY i współaut. 1990, LECHLEITER i współaut. 1991, MIYAZAKI 1991, DELISLE i WELSH 1992). Natomiast przy braku InsP_3 , sam napływ Ca^{2+} do cytoplazmy nie generuje

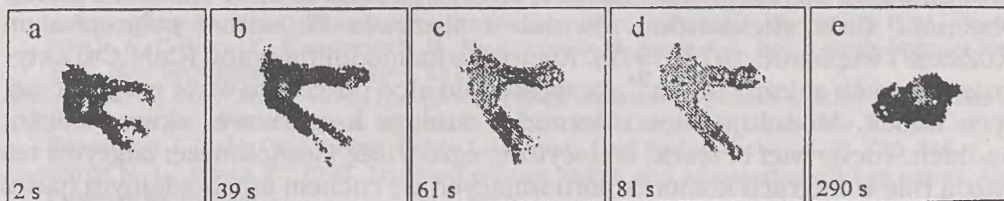
sygnału wapniowego (GIRARD i CLAPHAM 1993). Okazało się jednak, że wewnątrzkomórkowe sygnały wapniowe, które trwają dłużej niż kilka minut od momentu stymulacji zależą właśnie od napływu Ca^{2+} (RANDRIAMAMPITA i TSIEN 1993).



Rys. 6. Wykres zmian stężenia cytoplazmatycznego wapnia w komórce *Amoeba proteus* wywołanych 125mM NaCl. Grot strzałki pokazuje moment podania induktora.

Klasyczną reakcją komórek niepobudliwych na wiele bodźców jest czasowy, gwałtowny wzrost $[\text{Ca}^{2+}]_i$, po którym przez czas jakiś utrzymuje się podwyższony nieco poziom cytoplazmatycznego wapnia. Reakcja jest więc dwufazowa — za pik są odpowiedzialne jony wapnia, uwalniane z magazynów wewnątrzkomórkowych, utrzymujące się plateau to wynik napływu Ca^{2+} do komórki (JACOB 1990a) spowodowany wzrostem przepuszczalności błony plazmatycznej dla tego jonu. Taki przebieg ma reakcja *Amoeba proteus* na induktory pinocytotyczne (Na^+ i K^+) (rys. 6). Utrzymujący się bardzo długo po indukcji podwyższony poziom wolnego wapnia w amebie jest prawdopodobnie odpowiedzialny za formowanie pinocytotycznych pseudopodiów. W niektórych komórkach efektem działania pewnych agonistów na receptory powierzchniowe jest lokalny wzrost $[\text{Ca}^{2+}]_i$, falowo rozprzestrzeniający się w komórce. Uważa się, że lokalne zmiany poziomu wolnego Ca są ograniczone do obszarów cytoplazmy sąsiadujących z kanałami wapniowymi w błonie plazmatycznej i ER (JACOB 1990a, TSIEN i TSIEN 1990). Zjawisko falowego rozprzestrzeniania się sygnału wapniowego obserwowano po raz pierwszy w komórkach jajowych szkarłupni (JAFFE 1983). Występuje również w komórkach tkankowych (TSIEN i POENIE 1986, JACOB 1990b), a także u *Amoeba proteus* (KŁOPOCKA i POMORSKI w przygotowaniu) jako efekt działania jonów sodu (rys. 7) i chlorku choliny. Fale wapniowe mogą być poprzedzane przez lokalny wzrost $[\text{Ca}^{2+}]_i$ w jednym lub kilku miejscach inicjacji (ROONEY i Thomas 1993). Obecnie wiadomo, że rozprzestrzenianie się fal wapniowych nie jest wynikiem dyfuzji Ca^{2+} w cytoplazmie (współczynnik dyfuzji tego jonu jest zbyt niski). Ich przenoszenie jest raczej wynikiem dyfuzji InsP_3 (ALLBRITTON i MEYER 1993). Wydaje się, że najbardziej prawdopodobnym mechanizmem propagowania fal jest indukowane przez Ca^{2+} uwalnianie wapnia (WILLIAMS 1993, JAFFE 1993).

Wiele agonistów może w komórkach niebudliwych, takich jak: hepatocyty (WOODS i współaut. 1986, 1987), komórki endotelialne (JACOB i współaut. 1988), makrofagi (KRUSKAL i MAXFIELD 1987), czy oocyty (CUTHBERSON i COBBOLD 1985, MIYAZAKI i współaut. 1987) indukować oscylacje wapniowe. Są one w tym przypadku konsekwencją zjawisk zachodzących w samej komórce, a nie jak w komórkach pobudliwych wynikiem periodycznych depolaryzacji błony plazmatycznej. Spontaniczne pulsacje wapniowe występują w strefach czołowych migrujących ameb (TAYLOR i współaut. 1980). Uważa się, że są one wynikiem cyklicznego uwalniania związanego z błoną wapnia.



Rys. 7. Ilustracje pokazujące zmiany w rozmieszczeniu cytoplazmatycznego Ca u *Amoeba proteus* po podaniu 125mM NaCl. Widoczne falowe rozprzestrzenianie się sygnału wapniowego (c i d). Wzrost $[Ca^{2+}]_i$ skorelowany w czasie ze zmianą kształtu komórki.

Mechanizmy związane z powrotem poziomu Ca do stanu sprzed zadziałania bodźca są automatycznie uruchamiane przez podwyższenie $[Ca^{2+}]_i$. Obejmują one usuwanie Ca^{2+} przez błonę plazmatyczną na zewnątrz i zamykanie tego jonu w magazynach wewnątrzkomórkowych. Transport wapnia do wnętrza magazynów i na zewnątrz komórek jest regulowany przez zależną od jonów Mg ATP-azę (Ca^{2+} -Mg $^{2+}$ -ATPazę), zwaną pompą wapniową. U ameb wapń jest akumulowany w gładkim ER przy $[Ca^{2+}]_e$ równym 10^{-6} M (REINOLD i STOCKEM 1972) oraz w magazynach zlokalizowanych na cytoplazmatycznej stronie błony komórkowej.

Odebranie sygnału wapniowego i uruchomienie procesów odpowiedzialnych za reakcję komórki jest funkcją wiążących wapń białek regulujących. Wykryto około 200 rodzajów takich białek (HEIZMANN 1991). Podzielono je na grupy w zależności od struktury i funkcjonowania (KUŹNICKI i KORDOWSKA 1992). Wszystkie one wiążą Ca^{2+} w granicach stężeń fizjologicznych i inicjują różnorodne reakcje komórek. Czytelników zainteresowanych działaniem tych białek odsyłam do książki A. TRETNYA (1994).

Reakcje komórek, których podstawą jest skurcz, są związane zawsze z aktywnością aktyny i miozyny. Znane są dwa mechanizmy, za pośrednictwem których Ca^{2+} reguluje interakcję tych białek. W mięśniach szkieletowych i komórkach mięśnia serca Ca^{2+} inicjuje skurcz przez wiązanie się do białka regulującego — tropomiozyny C, znosząc hamujący wpływ kompleksu troponina-tropomiozyna na interakcję aktyny z miozyną (GREASER i GERGELY 1971). W komórkach mięśni gładkich i komórkach niemięśniowych regulacja ta jest związana z odwracalną fosforylacją lekkiego łańcucha miozyny (SZENT-GYORGYI i współaut. 1973), katalizowaną przez specyficzne enzymy: kinazę i fosfatazę lekkiego łańcucha (ADELSTEIN i CONTI 1976). Niezależnie od mechanizmu regu-

lacji, interakcja aktyny z miozyną jest inicjowana przez $[Ca^{2+}]_i$ w granicach od 10^{-7} do $10^{-6}M$ w obecności MgATP (ADELSTEIN i współaut. 1977).

Od około 25 lat są identyfikowane i badane białka, które pośredniczą w zależnej od Ca^{2+} regulacji interakcji aktyny z miozyną. Grupę takich białek, bardzo podobnych w strukturze i funkcjonowaniu, określa się wspólną nazwą kalmoduliny (CaM). Kalmodulina jest najpowszechniej występującym białkiem wiążącym wapń. Zidentyfikowano ją w wielu zwierzęcych komórkach tkankowych i komórkach roślinnych (według TRETYN 1994). Od lat prowadzi się badania nad specyfiką działania tego białka w komórkach różnych gatunków pierwotniaków. Są wśród nich zarówno wiciowce, orzęski, jak i zarodkowe (KUŹNICKI 1986). Obecność CaM stwierdzono również u śluzowca *Physarum polycephalum* (KUŹNICKI i współaut. 1977, 1979). Kompleks kalmodulina-wapń (CaM.Ca) aktywuje w sposób zależny od Ca^{2+} , bezpośrednio albo pośrednio wiele enzymatycznych białek. Moduluje więc różnorodne funkcje komórkowe: skurcz mięśni gładkich, ruchy wici i rzęsek, endocytozę, egzocytozę i kariokinezę; odgrywa też ważną rolę w migracji komórek poruszających się ruchem ameboidalnym (patrz u HINRICHSSEN 1993). Kalmodulina jest włączona w zależną od Ca^{2+} regulację ruchliwości polimorfonuklearnych neutrofilów (MARKS i współaut. 1991, CHATIŁA i współaut. 1989) i fibroblastów (HAHN i współaut. 1992). Jest białkowym pośrednikiem włączonym w regulację interakcji aktyny z miozyną u *Amoeba proteus* (KUŹNICKI i współaut. 1977, 1979) i *Acanthamoeba castellanii* (BRZESKA i współaut. 1992) co sugeruje, że ma wpływ na zjawiska ruchowe w tych komórkach. U *Dictyostelium discoideum* wykazano jednak ostatnio, że obniżenie poziomu CaM powoduje zaburzenia w cytokinezie, ale nie hamuje lokomocji (LIU i współaut. 1992). Może to oznaczać, że w tych komórkach kalmodulina nie jest bezpośrednio włączona w procesy związane z migracją. Z drugiej strony jednak wiadomo, że w komórkach *Dictyostelium*, podobnie jak w zwierzęcych komórkach tkankowych, znajdują się liczne białka, które wchodzą w interakcję z CaM (MARUTA i współaut. 1983, BENNETT i CONDEELIS 1988, FUKUI i współaut. 1989, STULL 1988). Obecnie uważa się, że CaM.Ca reguluje aktywność każdej komórki eukariotycznej. Sugeruje się również, że najwcześniejszą funkcją kalmoduliny w ewolucji *Eukaryota* była regulacja ruchliwości (MEANS i współaut. 1982). Ta z kolei jest, jak wiadomo, integrującym komponentem wielu zjawisk biologicznych od rozwoju do onkogenezy.

THE ROLE OF INTRACELLULAR CALCIUM IN AMEBOID MOVEMENT AND RELATED PHENOMENA

Summary

It is generally accepted that calcium is an essential factor in complicated movement phenomena in amoebae, and that it controls sol-gel-sol transformations and triggers contraction. The internal concentration of Ca^{2+} above $10^{-7}M$ induces contraction and transformation of ectoplasmic gel into endoplasmic sol at the uroid and in retracting pseudopodia. In the frontal area where $[Ca^{2+}]_i$ is below $10^{-8}M$ the reconstruction of the rigid gel occurs. The intracellular $[Ca^{2+}]_i$ gradients always correspond to the direction of cytoplasmic streaming and to the characteristic pattern of ameboid movement. In large amoebae, calcium ions are involved in controlling the reversible equilibrium between G- and F-actin via profilin and cytoplasmic kinase.

External application of different stimuli abolishes the intracellular Ca^{2+} gradients existing previously and, in consequence, influences the motor behaviour of amoeba. The stimulation usually

leads to a transient increase in cytoplasmic calcium level which triggers different responses of amoebae.

Elevation of $[Ca^{2+}]_i$ automatically actuates the mechanisms that pump Ca^{2+} out of the cytosol, either out of the cell across the plasma membrane or into intracellular stores. In giant amoebae two Ca^{2+} stores have been described: internal plasma membrane-attached binding sites and elements of the smooth endoplasmic reticulum.

LITERATURA

- ADELSTEIN R. S., CHACKO S., STYLIANOS P., SCORDILIS P., BARYLKO B., CONTI M. A., TROTTER J. A., 1977. *The role of Ca^{2+} and myosin phosphorylation in regulating actomyosin in smooth muscle and non-muscle cells.* [W:] *Calcium-binding Proteins and Calcium Function*. WASSERMAN R. H., CORRADINO R. A., CARAFOLI E., KRETSINGER R. H., MACLENNAN D. H., SIEGEL F. L. (red.). North-Holland-New York, New York-Amsterdam-Oxford, 251-261.
- ADELSTEIN R. S., CONTI M. A., 1976. *The effect of phosphorylation on platelet myosin and studies on substrates for platelet myosin light-chain kinase.* [W:] *Cell Motility*. GOLDMAN R., POLLARD T., ROSENBAUM J. (red.). Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor-N. Y., 725-738.
- ALLBRITTON N. L., MEYER T., 1993. *Localized calcium spikes and propagating calcium waves.* *Cell Calcium* 14, 691-697.
- BARAŃSKA J., 1992. *Rozpad fosfolipidów a przekazywanie informacji w komórce.* Polskie Towarzystwo Biochemiczne, Warszawa.
- BENNETT H., CONDEELIS J., 1988. *Isolation of an immunoreactive analogue of brain fodrin that is associated with the cell cortex of Dictyostelium amoebae.* *Cell Motil. Cytoskeleton* 11, 303-317.
- BERRIDGE M.J., IRVINE R.F., 1989. *Inositol phosphates and cell signalling.* *Nature* 341, 197-204.
- BERSHADSKY A. D., VASILIEV J. M., 1988. *Cytoskeleton.* Plenum Press., New York-London.
- BRZESKA H., KULESZA-LIPKA D., KORN E., 1992. *Inhibition of Acanthamoeba myosin I heavy chain kinase by Ca^{2+} -calmodulin.* *J. Biol. Chem.* 267, 23870-23875.
- BUMANN J., WURSTER B., MALCHOW D., 1984. *Attractant-induced changes and oscillations of the extracellular Ca^{2+} concentration in suspensions of differentiating Dictyostelium cells.* *J. Cell Biol.* 98, 173-178.
- CHATILA T., GEHA R., ARNAOUT M., 1989. *Constitutive and stimulus-induced phosphorylation of CD11/CD18 leukocyte adhesion molecules.* *J. Cell Biol.* 109, 3435-3444.
- COHEN I., DE VRIES A., 1973. *Platelet contractile regulation in an isometric system.* *Nature* 246, 36-37.
- CONDEELIS J., 1979. *Isolation of concanavalin A caps during various stages of formation and their association with actin and myosin.* *J. Cell Biol.* 80, 751-758.
- CONDEELIS J. S., TAYLOR D. L., 1977. *The contractile basis of ameboid movement. V. The control of solution, gelation, and contraction in extracts from Dictyostelium discoideum.* *J. Cell Biol.* 74, 901-927.
- CRAIG S. W., POLLARD T. D., 1982. *Actin binding proteins.* *Trends Biochem. Sci.* 7, 88-92.
- CRAIG R., SMITH R., KENDRICK-JONES J., 1983. *Light-chain phosphorylation controls the conformation of vertebrate non-muscle and smooth muscle myosin molecules.* *Nature (London)* 302, 436-439.
- CUTHBERTSON K. S. R., COBBOLD P. H., 1985. *Phorbol ester and sperm activate mouse oocytes by inducing sustained oscillations in cell Ca^{2+} .* *Nature* 316, 541-542.
- DE CHASTELLIER C., RYTER A., 1981. *Calcium-dependent deposits at the plasma membrane of Dictyostelium discoideum and their possible relation with contractile proteins.* *Biol. Cell* 40, 103-113.
- DE CHASTELLIER C., RYTER A., 1982. *Calcium deposits at the plasma membrane of Dictyostelium discoideum during phagocytosis and cell motility.* *Biol. Cell* 43, 121-128.
- DELISLE S., WELSH M. J., 1992. *Inositol trisphosphate is required for the propagation of calcium waves in Xenopus oocytes.* *J. Biol. Chem.* 267, 7963-7966.
- EBASHI S., ENDO M., 1968. *Calcium ion and muscle contraction.* *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 18, 123-183.
- FERRIS D. C., HUGANIR R. L., SUPATTAPONE S., SNYDER S. H., 1989. *Purified inositol 1,4,5-trisphosphate receptor mediates calcium flux in reconstituted lipid vesicles.* *Nature* 342, 87-89.
- FUKUI Y., LYNCH T., BRZESKA H., KORN E., 1989. *Myosin I is located at the leading edges of locomoting Dictyostelium amoebae.* *Nature* 341, 328-331.
- FUKUI Y., YUMURA S., 1986. *Actomyosin dynamics in chemotactic amoeboid movement of Dictyostelium.* *Cell Motil. Cytosk.* 6, 662-673.

- FUTRELLE R. P., TRAUT J., MCKEE W. G., 1982. *Cell behavior in Dictyostelium discoideum: Preaggregation response to localized cyclic AMP pulses*. J. Cell Biol. 92, 807-821.
- GILL D. L., 1989. *Receptor kinships revealed*. Nature 342, 16-18.
- GIRARD S., CLAPHAM D., 1993. *Acceleration of intracellular calcium waves in Xenopus oocytes by calcium influx*. Science 260, 229-232.
- GOLLNICK F., MEYER R., STOCKEM W., 1991. *Visualization and measurement of calcium transients in Amoeba proteus by fura-2 fluorescence*. Eur. J. Cell Biol. 55, 262-271.
- GREASER M. L., GERGELY J., 1971. *Reconstitution of troponin activity from three protein components*. J. Biol. Chem. 246, 4226-4233.
- GRĘBECKA L., 1988. *Polarity of the motor functions in Amoeba proteus. I. Locomotory behaviour*. Acta Protozool. 27, 83-96.
- GRĘBECKI A., 1981. *Effects of localized photic stimulation on amoeboid movement and their theoretical implications*. Eur. J. Cell Biol. 24, 163-175.
- GRĘBECKI A., 1982. *Supramolecular aspects of amoeboid movement. Progress in Protozoology. Proceedings of the VI International Congress on Protozoology, part 1*, 117-130.
- GRĘBECKI A., 1984. *Relative motion in Amoeba proteus in respect to the adhesion sites. I. Behaviour of monotactic forms and the mechanism of fountain phenomenon*. Protoplasma 123, 116-134.
- GRĘBECKI A., 1986. *Relationship between cytoskeleton and motility*. Insect Sci. Applic. 7, 379-386.
- GRĘBECKI A., 1986. *Organizacja przestrzenna mechanizmów napędowych i sterujących w ruchu amebowym*. Postępy Biologii Komórki 13, 175-194.
- GRĘBECKI A., 1987. *Mechanizmy ruchów amebowych*. [W:] Komórka — jej budowa i ruch. KUŹNICKI L. (red.). Wszechnica Polskiej Akademii Nauk (Ossolineum), Wrocław-Warszawa, 133-186.
- GRĘBECKI A., 1990. *Dynamics of the contractile system in the pseudopodial tips of normally locomoting amoebae, demonstrated in vivo by video-enhancement*. Protoplasma 154, 98-111.
- GRĘBECKI A., 1991. *Participation of the contractile system in endocytosis demonstrated in vivo by video-enhancement in heat-pretreated amoebae*. Protoplasma 160, 144-158.
- GRĘBECKI A., 1992. *Ruchy błony i cytoszkieletu w komórkach ameboidalnych*. Kosmos, 41, 7-38.
- GRĘBECKI A., 1994. *Membrane and cytoskeleton flow in motile cells with emphasis on the contribution of free-living amoebae*. Int. Rev. Cytol. 148, 37-80.
- GRĘBECKI A., GRĘBECKA L., KŁOPOCKA W., 1981. *Testing steering functions of the frontal zone in the locomotion of Amoeba proteus*. Cell Biol. Int. Rep. 5, 595-599.
- HAHN K., DEBIASIO R., TAYLOR D. L., 1992. *Patterns of elevated free calcium and calmodulin in living cells*. Nature 359, 736-738.
- HARTWIG J. H., YIN H. L., 1988. *The organization and regulation of the macrophage actin skeleton*. Cell Motil. Cytosk. 10, 117-126.
- HEATH J.P., 1983. *Behaviour and structure of the leading lamella in moving fibroblasts. I. Occurrence and centripetal movement of arc-shape microfilament bundles beneath the dorsal cell surface*. J. Cell Sci. 60, 331-354.
- HEIZMANN C. W., 1991. *Calcium-binding proteins of the EF-hand-type and of the annexin family: a survey*. [W:] Novel Calcium-Binding Proteins. HEIZMANN C. W. (red.). Springer-Verlag, Berlin, 39-49.
- HELLEWELL S. B., TAYLOR D. L., 1979. *The contractile basis of ameboid movement*. J. Cell Biol. 83, 633-648.
- HINRICHSEN R. D., 1993. *Calcium and calmodulin in the control of cellular behavior and motility*. Biochem. Biophys. Acta 1155, 277-293.
- JACOB R., 1990a. *Calcium oscillations in electrically non-excitable cells*. Biochem. Biophys. Acta 1052, 427-438.
- JACOB R., 1990b. *Imaging cytoplasmic free calcium in histamine stimulated endothelial cells and in fMet-Leu-Phe stimulated neutrophils*. Cell Calcium 11, 241-249.
- JACOB R., MERRITT J. E., HALLAM T. J., RINK T. J., 1988. *Repetitive spikes in cytoplasmic calcium evoked by histamine in human endothelial cells*. Nature 335, 40-45.
- JAFFE L. F., 1983. *Source of calcium in egg activation: A review and hypothesis*. Dev. Biol. 99, 265-276.
- JAFFE L.F., 1993. *Classes and mechanisms of calcium waves*. Cell Calcium 14, 736-745.
- JOHANSSON P., JOSEFSSON J.-O., 1978. *Evidence for a dual effect of intracellular Ca⁺⁺ on pinocytosis*. Acta Physiol. Scand. 102, 71A-72A.
- KALINOSKI D. L., ALDINGER S. B., BOYLE A. G. i współaut., 1992. *Characterization of a novel inositol 1,4,5-trisphosphate receptor in isolated olfactory cilia*. Biochem. J. 281, 449-456.
- KHAN A. A., STEINER J. P., KLEIN M. G., SCHNEIDER M. F., SNYDER S. H., 1992. *IP₃ receptor: localization to plasma membrane of T cells and cocapping with the T cell receptor*. Science 257, 815-818.

- KITANISHI-YUMURA T., FUKUI Y., 1989. *Actomyosin organization during cytokinesis: reversible translocation and differential redistribution in Dictyostelium*. Cell Motil. Cytoskel. 12, 78-89.
- KŁOPOCKA W., GRĘBECKA L., 1985. *Effects of bivalent cations on the initiation of Na-induced pinocytosis in Amoeba proteus*. Protoplasma 126, 207-214.
- KŁOPOCKA W. T., POMORSKI P., 1995. *Cytoplasmic calcium transients in Amoeba proteus during induction of pinocytotic and non-pinocytotic pinocytosis*. Eur. J. Cell Biol.
- KORN E. D., 1982. *Actin polymerization and its regulation by proteins from nonmuscle cells*. Physiol. Rev. 62, 672-736.
- KOROHODA W., 1977. *Experimental induction of locomotion in enucleated fragments of Amoeba proteus and its bearing on the theories of amoeboid movement*. Cytobiologie 14, 338-349.
- KRUSKAL B. A., MAXFIELD F. R., 1987. *Cytosolic free calcium increases before and oscillates during frustrated phagocytosis in macrophages*. J. Cell Biol. 105, 2685-2693.
- KÜHNTREIBER M., JAFFE L. F., 1990. *Detection of extracellular calcium gradients with a calcium-specific vibrating electrode*. J. Cell. Biol. 110, 1565-1573.
- KURODA K., YOSHIMOTO Y., HIRAMOTO Y., 1988. *Temporal and spatial localization of Ca²⁺ in moving Amoeba proteus visualized with aequorin*. Protoplasma 144, 64-67.
- KUŹNICKI L., 1986. *Calmodulin regulated processes in protistan motility*. Acta Protozool. 25, 295-304.
- KUŹNICKI J., KORDOWSKA J., 1992. *Białka wiążące wapń jako markery stanów patologicznych*. Kosmos 41, 105-121.
- KUŹNICKI J., KUŹNICKI L., DRABIKOWSKI W., 1977. *Ca²⁺-regulation of motility and troponin C-like proteins in Protozoa and Myxomycete*. Proceedings of the 6th Meeting of the European Muscle Club, Saclay, 29-30 September, 67-68.
- KUŹNICKI J., KUŹNICKI L., DRABIKOWSKI W., 1979. *Ca²⁺-binding modulator protein in Protozoa and Myxomycete*. Cell Biol. Int. Rep. 3, 17-23.
- KWIATKOWSKA J., 1986. *Fosfolipidy inozytolowe w przetwarzaniu informacji w komórkach*. Post. Biochem. 32, 329-334.
- LECHLEITER J., GIRARD S., PERALTA E., CLAPHAM D., 1991. *Spiral calcium wave propagation and annihilation in Xenopus laevis oocytes*. Science 252, 123-126.
- LIU G., NEWELL P. C., 1991. *Evidence that cyclic GMP may regulate the association of myosin II heavy chain with the cytoskeleton by inhibiting its phosphorylation*. J. Cell Sci. 98, 483-490.
- LIU T., WILLIAMS J., CLARKE M., 1992. *Inducible expression of calmodulin antisense RNA in Dictyostelium cells inhibits the completion of cytokinesis*. Mol. Biol. Cell 3, 1403-1413.
- MALCHOW D., BOHME R., GRAS U., 1982. *On the role of calcium in chemotaxis and oscillations of Dictyostelium cells*. Biophys. Struct. Mech. 9, 131-136.
- MALCHOW D., NANJUNDIAH V., WURSTER B., ECKSTEIN F., GERISH G., 1987. *Cyclic AMP-induced pH changes in Dictyostelium discoideum and their control by calcium*. Biochim. Biophys. Acta 538, 473-480.
- MARCS P., HENDEY B., MAXFIELD F., 1991. *Attachment to fibronectin or vitronectin makes human neutrophil migration sensitive to alterations in cytosolic free calcium concentration*. J. Cell Biol. 112, 149-158.
- MARUTA H., BALTES W., DIETER P., MARME D., GERISCH G., 1983. *Myosin heavy chain kinase inactivated by Ca²⁺/calmodulin from aggregating cells of Dictyostelium discoideum*. EMBO J. 2, 535-542.
- MEANS A. R., TASH J. S., CHAFOULEAS J. G., 1982. *Physiological implications of the presence, distribution and regulation of calmodulin in eukaryotic cells*. Physiol. Rev. 62, 1-39.
- MITTAL A. K., BEREITER-HAHN J., 1985. *Ionic control of locomotion and shape of epithelial cells*. Cell Motil. 5, 123-136.
- MIZAZAKI S., 1991. *Repetitive calcium transients in hamster oocytes*. Cell Calcium 12, 205-216.
- MIZAZAKI S.-I., HASHIMOTO N., YOSHIMOTO Y., KISHIMOTO T., IGUSA Y., HIRAMOTO Y., 1987. *Temporal and spatial dynamics of the periodic increase in intracellular free calcium at fertilization of golden hamster eggs*. Dev. Biol. 118, 259-267.
- MOCKRIN S. C., KORN E. D., 1980. *Acanthamoeba profilin interacts with G-actin to increase the rate of exchange of actin-bound adenosine 5'-Triphosphate*. Biochemistry 19, 5359-5362.
- NACHMIAS V. T., FUKUI Y., SPUDICH J. A., 1989. *Chemoattractant-elicited translocation of myosin in motile Dictyostelium*. Cell Motil. Cytoskel. 13, 158-169.
- NUCCITELLI R., POO M.-M., JAFFE L. F., 1977. *Relations between amoeboid movement and membrane-controlled electrical currents*. J. Gen. Physiol. 69, 743-763.
- ONUMA E. K., HUI S. W., 1988. *Electric field-directed cell shape changes, displacement and cytoskeletal reorganization are calcium dependent*. J. Cell Biol. 106, 2067-2075.
- PODDANA H., BARAŃSKA J., 1991. *Udział polifosfoinozytoli w przetwarzaniu informacji w komórkach*. Post. Biochem. 37, 2-5.

- POLLARD T. D., KORN T. D., 1973. *Acanthamoeba myosin*. J. Biol. Chem. 248, 4682-4690.
- PUTNEY J. W. (Jr), 1990. *Capacitative calcium entry revisited*. Cell Calcium 11, 611-624.
- PUTNEY J. W. (Jr), 1993. *Excitement about calcium signaling in inexcitable cells*. Science 262, 676-678.
- RANDRIAMAMPITA C., TSIEN R. Y., 1993. *Emptying of intracellular Ca²⁺ stores releases a novel small messenger that stimulates Ca²⁺ influx*. Nature 364, 809-814.
- REICHSTEIN E., KORN E. D., 1979. *Acanthamoeba profilin: protein of low molecular weight from Acanthamoeba castellanii that inhibits actin nucleation*. J. Biol. Chem. 254, 6174-6179.
- REINOLD M., STOCKEM W., 1972. *Darstellung eines ATP-sensitiven Membransystems mit Ca²⁺-transportierender Funktion bei Amöben*. Cytobiologie 6, 182-194.
- RESTREPO D., MIYAMOTO T., BRYANT B.P., TEETER J. H., 1990. *Odor stimulus tigger influx of calcium into olfactory neurons of the channel cat fish*. Science 249, 1166-1168.
- ROONEY T. A., SASS E., THOMAS A. P., 1990. *Agonist-induced cytosolic calcium oscillations originate from a specific locus in single hepatocytes*. J. Biol. Chem. 265, 10792-10796.
- ROONEY T. A., THOMAS A. P., 1993. *Intracellular calcium waves generated by Ins(1,4,5)P3-dependent mechanisms*. Cell Calcium 14, 674-690.
- SARAN S., NAKAO H., TASAKA M., IIDA H., TSUJI F.I., NANJUNDIAH V., TAKEUCHI I., 1994. *Intracellular free calcium level and its response to cAMP stimulation in developing Dictyostelium cells transformed with jellyfish apoaequorin cDNA*. FEBS Letters 337, 43-47.
- SCHLIWA M., 1981. *Proteins associated with cytoplasmic actin*. Cell 25, 587-590.
- SEWYER D. W., SULLIVAN J. A., MANDELL G. L., 1985. *Intracellular free calcium localization in neutrophils during phagocytosis*. Science 230, 663-666.
- SOBOTA A., 1985. *Subplasmalemmal calcium-binding microregions in Acanthamoeba*. J. Cell Sci. 79, 217-235.
- SOBOTA A., HREBENDA B., PRZEŁĘCKA A., 1977. *Formation of calcium-dependent deposits at the plasma membrane of Acanthamoeba castellanii*. Cytobiol. 15, 259-268.
- SOBOTA A., PRZEŁĘCKA A., JANOSSY A. G. S., 1978. *X-ray microanalysis of calcium-dependent deposits at the plasma membrane of Acanthamoeba castellanii*. Cytobiol. 17, 464-469.
- SONOBE S., HATANO S., KURODA K., 1985. *Cytoplasmic movement in a glycerinated model of Amoeba proteus*. [W:] *Cell motility: Mechanism and Regulation*. ISHIKAWA H., HATANO S., SATO H. (red.). University of Tokyo Press, Tokyo, 271-282.
- SONOBE S., TAKAHASHI S., HATANO S., KURODA K., 1986. *Phosphorylation of Amoeba G-actin and its effect on actin polymerization*. J. Biol. Chem. 261, 14837-14843.
- SPUDICH J. A., 1989. *In pursuit of myosin function*. Cell Regln. 1, 1-11.
- STOCKEM W., HOFFMANN H. U., 1986. *Microfilament organization and function in Amoeba proteus*. Acta Protozool. 25, 245-254.
- STOCKEM W., KLEIN H-P., 1979. *Pinocytosis and locomotion in amoebae. XV. Demonstration of Ca⁺⁺-binding sites during induced pinocytosis in Amoeba proteus*. Protoplasma 100, 33-43.
- STOCKEM W., KLEIN H. P., 1988. *Pinocytosis and Locomotion of Amoebae XVII. Influence of different cations on induced pinocytosis in Amoeba proteus*. Europ. J. Protisol. 23, 317-326.
- STOCKEM W., KŁOPOCKA W., 1988. *Ameboid movement and related phenomena*. Int. Rev. Cyt. 112, 137-183.
- STROHMEIER R., BEREITER-HAHN J., 1984. *Control of cell shape and locomotion by external calcium*. Exp. Cell Res. 154, 412-420.
- STULL J., 1988. *Myosin light chain kinase and caldesmon: biochemical properties and roles in skeletal and smooth muscle*. [W:] *Calmodulin*. COHEN P, KLEE C. (red.), Elsevier, New York, 91-122.
- SZENT-GYORGYI A. G., SZENTKIRALEY E. M., KENDRICK-JONES J., 1973. *The light chains of scallop myosin as regulatory subunits*. J. Mol. Biol. 74, 179-203.
- TAYLOR D. L., BLINKS J. R., REYNOLDS G., 1980. *Contractile basis of ameboid movement. VIII. Aequorin luminescence during ameboid movement, endocytosis, and capping*. J. Cell Biol. 86, 599-607.
- TAYLOR D. L., CONDEELIS J. S., 1979. *Cytoplasmic structure and contractility in ameboid cells*. Int. Rev. Cytol. 56, 57-144.
- TAYLOR D. L., CONDEELIS J. S., MOORE P. L., ALLEN R. D., 1973. *The contractile basis of ameboid movement. I. The chemical control of motility in isolated cytoplasm*. J. Cell Biol. 59, 378-394.
- TAYLOR D. L., FECHHEIMER M., 1982. *Cytoplasmic structure and contractility: the solation-contraction coupling hypothesis*. Ohil. Trans. R. Soc. Lond. B299, 185-197.
- TAYLOR D. L., HELLEWELL S. B., VIRGIN H. W., HEIPLE J., 1979. *The solation-contraction coupling hypothesis of cell movement*. [W:] *Cell Motility: Molecules and Organization*. HATANO S., ISHIKAWA H., SATO H., (red.), Unlversity of Tokyo Press, Tokyo, 363-367.

- TAYLOR D. L., MOORE P. L., CONDEELIS J. S., ALLEN R. D., 1976. *The mechanochemical basis of amoeboid movement. I. Ionic requirements for maintaining viscoelasticity and contractility of amoeba cytoplasm.* Exp. Cell Res. 101, 127-133.
- TAYLOR E. W., 1986. *Cell motility.* J. Cell Sci. Suppl. 4, 89-102.
- THERIOT J. A., METCHISON T. J., 1991. *Actin microfilament dynamics in locomoting cells.* Nature 352, 126-131.
- TRETYN A., 1994. *Wapń w komórkach eukariotycznych występowanie, transport i komórkowy mechanizm działania.* SKUPIŃSKA M. (red). Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa.
- TRUETT A. P., VERGHESE M. V., DILLON R. B., SNYDERMAN R., 1988. *Calcium influx stimulates a second pathway for sustained diacylglycerol production in leukocytes activated by chemoattractants.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 1549-1553.
- TSIEN R. W., TSIEN R. Y., 1990. *Calcium channels, stores, and oscillations.* Annu. Rev. Cell Biol. 6, 715-760.
- TSIEN R. Y., POENIE M., 1986. *Fluorescence ratio imaging: a new window into intracellular ionic signaling.* Trends Biochem. Sci. 11, 450-455.
- WICK U., MALCHOW D., GERISCH G., 1978. *Cyclic-AMP stimulated calcium influx into aggregating cells of Dictyostelium discoideum.* Cell Biol. Int. Rep. 2, 71-79.
- WILLIAMS D. A., 1993. *Mechanisms of calcium release and propagation in cardiac cells. Do studies with confocal microscopy add to our understanding?* Cell Calcium 14, 724-735.
- WOODS N. M., CUTHBERSON K. S. R., COBBOLD P. H., 1987. *Agonist-induced oscillations in cytoplasmic free calcium concentration in single rat hepatocytes.* Cell Calcium 8, 79-100.
- WOODS N. M., CUTHBERSON K. S. R., COBBOLD P. H., 1986. *Repetitive transient rises in cytoplasmic free calcium in hormone-stimulated hepatocytes.* Nature 319, 600-602.
- YUMURA S., FUKUI Y., 1985. *Reversible cyclic AMP-dependent change in distribution of myosin thick filaments in Dictyostelium.* Nature 314, 194-196.
- YUMURA S., KITANISHI-YUMURA T., 1993. *A mechanism for the intracellular localization of myosin II filaments in the Dictyostelium amoeba.* J. Cell Sci. 105, 233-242.
- YUMURA S., MORI H., FUKUI Y., 1984. *Localization of actin and myosin for the study of amoeboid movement in Dictyostelium using improved immunofluorescence.* J. Cell Biol. 99, 894-899.

ANDRZEJ WÓJCIK

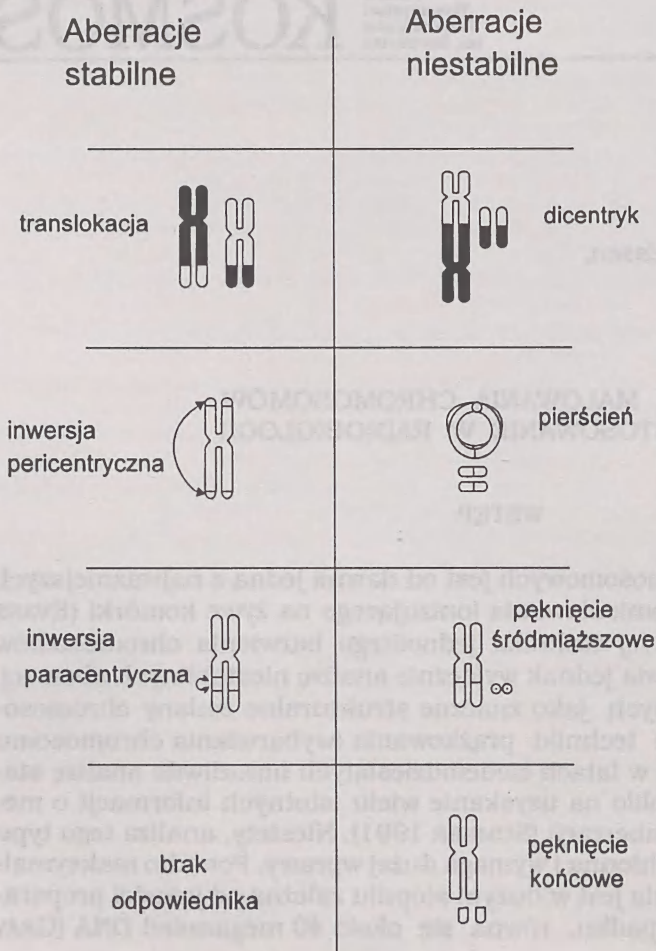
Institut fuer Medizinische
Strahlenbiologie, Klinikum Essen,
D-45122 Essen, Niemcy

TECHNIKA MALOWANIA CHROMOSOMÓW I JEJ ZASTOSOWANIE W RADIOBIOLOGII

WSTĘP

Analiza aberracji chromosomowych jest od dawna jedną z najważniejszych metod badania wpływu promieniowania jonizującego na żywe komórki (EVANS 1962). Stosowana najczęściej technika jednolitego barwienia chromosomów barwnikiem giemsy umożliwia jednak wyłącznie analizę niestabilnych aberracji chromosomowych, widocznych jako znaczne strukturalne zmiany chromosomów (rys. 1). Opracowanie techniki prążkowania (wybarwiania chromosomu w charakterystyczne paski) w latach siedemdziesiątych umożliwiło analizę stabilnych aberracji, co pozwoliło na uzyskanie wielu istotnych informacji o mechanizmach powstawania aberracji (SUMNER 1991). Niestety, analiza tego typu aberracji jest bardzo pracochłonna i wymaga dużej wprawy. Ponadto maksymalna rozdzielczość prążkowania jest w dużym stopniu zależna od jakości preparatów, i w najlepszym przypadku, równa się około 40 megazasad DNA (GRAY i PINKEL 1992).

W roku 1969 PARDUE i GALL opisali technikę zwaną hybrydyzacją *in situ* (ISH). Polega ona na denaturacji radioaktywnie wyznakowanego, krótkiego fragmentu DNA o znanej sekwencji (sondy) i DNA chromosomów utrwalonych na szkiełku. Po nałożeniu sondy na szkiełko, następuje powolna renaturacja obu DNA, podczas której sonda hybryduje z homologicznymi, docelowymi fragmentami DNA chromosomowego. Ponieważ sonda była znakowana trytem, wykrycie jej jest możliwe autoradiografią. Hybrydyzacja *in situ* umożliwiła dokładną lokalizację swoistych sekwencji DNA na chromosomach i ich ewentualnych zmian popromiennych. Wadą jej jednak był wysoki poziom szumów wynikających z autoradiografii i konieczność pracy z izotopami. Rozdzielczość i prostotę techniki znacznie poprawiono przez wprowadzone na początku lat 80-tych nieradioaktywne wyznakowanie sond biotyną, która mogła być wykrywana awidyną związaną z dowolnym fluorochromem, na przykład izotiocyjanianem fluoresceiny. Metoda ta została nazwana FISH (fluorescence *in situ* hybridization). Ponieważ około 90% chromosomowego DNA składa się z powtarzających się sekwencji rozrzuconych po całym genomie (interspersed repetitive sequences),



Rys. 1. Stabilne i niestabilne aberracje chromosomowe.

W niniejszym artykule zostanie omówiona technika malowania chromosomów oraz możliwości jej stosowania w radiobiologii.

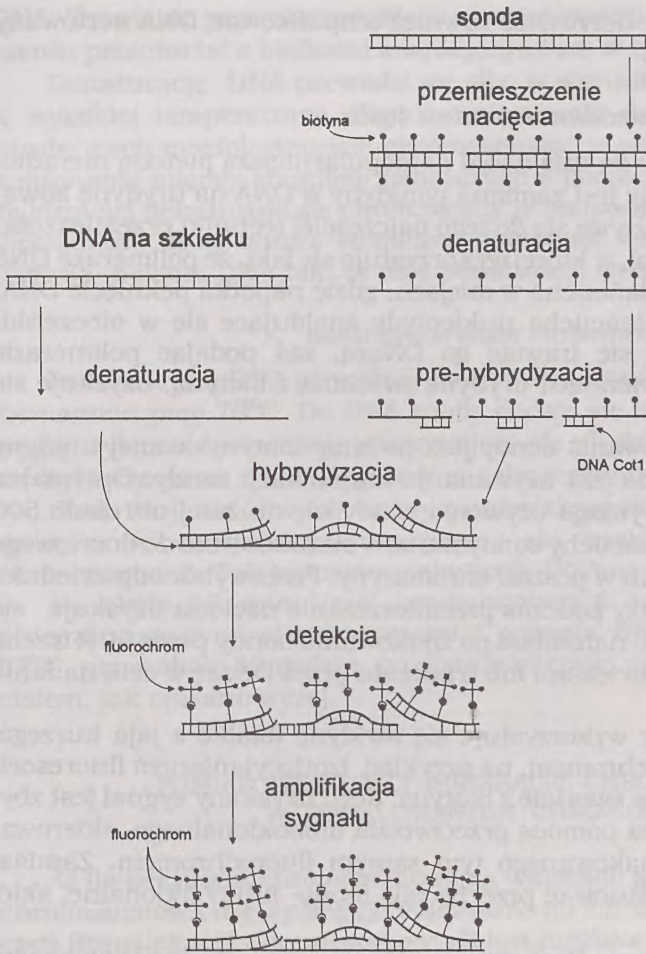
W niniejszym artykule zostanie omówiona technika malowania chromosomów oraz możliwości jej stosowania w radiobiologii.

METODA MALOWANIA CHROMOSOMÓW

OTRZYMYWANIE DNA POSZCZEGÓLNYCH CHROMOSOMÓW

Do malowania chromosomów jest konieczne wyizolowanie DNA poszczególnych chromosomów. Obecnie istnieją dwie metody uzyskiwania DNA chromosomowego. Historycznie starsza metoda wykorzystuje możliwości sortowania chromosomów w cytometrze przepływowym (GRAY i LANGLOIS 1986). Zawieszoną

pierwotnie było możliwe tylko dostrzeganie bardzo krótkich docelowych sekwencji DNA, nie zawierających obszarów z powtórzeniami. W przeciwnym przypadku bowiem sonda hybrydowała z sekwencjami powtarzającymi się, znajdującymi się na wszystkich chromosomach. Problem ten rozwiązano w drugiej połowie lat 80-tych przez wprowadzenie etapu pre-hybrydyzacji sondy z DNA Cot-1, zawierającym wyłącznie sekwencje powtarzające się. Równocześnie opracowano technikę izolowania DNA poszczególnych chromosomów za pomocą cytometrii przepływowej. Połączenie obu metod umożliwiło wysoce swoiste zabarwienie fluorochromem pojedynczych chromosomów (rys. 2). Technika ta, zwana malowaniem chromosomów (chromosome painting lub chromosomal *in situ* suppressive hybridization CISS), pozwoliła na bardzo szybkie i dokładne dostrzeganie wszelkich popromiennych międzychromosomowych przemieszczeń, które do tej pory albo pozostawały niewidoczne, albo ich wykrycie wymagało ogromnego nakładu pracy.



Rys. 2. Zasada malowania chromosomów. Objasnienie poszczególnych kroków w tekście.

dzięki metodzie mikrosekcji chromosomów. Polega ona na zeszkrobieniu ze szkiełka poszczególnych, utrwalonych chromosomów za pomocą mikromanipulatora. Chromosomy rozróżnia się według ich charakterystycznych prążków. DNA pochodzące z około dwudziestu chromosomów wystarcza, aby poddać je zwielokrotnieniu przez łańcuchową reakcję polimerazy (PCR). DNA całego chromosomu jest za długie, aby można go amplifikować w jednym kawałku. Dlatego stosuje się linker — adapter (łącznik — adaptor) PCR lub inter-Alu PCR. Metoda łącznik — adaptor polega na trawieniu DNA enzymem restrykcyjnym rozpoznającym sekwencje często występujące, ligacji uzyskanych fragmentów DNA z oligonukleotydami o znanej sekwencji (adaptorami) i amplifikacji fragmentów za pomocą primerów komplementarnych do adapterów. Przy inter-Alu PCR wykorzystuje się fakt, że sekwencje Alu występują z dużą częstotliwością na wszystkich chromosomach. Stosując primery homologiczne do końcówek sekwencji Alu, uzyskuje się amplifikację DNA leżącego pomiędzy sekwencjami Alu.

wolnych chromosomów uzyskuje się przez rozrywanie błon komórek zatrzymanych w fazie mitozy. Chromosomy stabilizuje się interkalującym barwnikiem fluorescencyjnym, na przykład bromkiem etydyny, i przepuszcza przez cytometr przepływowy, który sortuje je na podstawie intensywności zabarwienia, odpowiadającemu zawartości w nich DNA. Duże ilości tak uzyskanego DNA chromosomowego produkuje się klonując go w szczepach bakteryjnych. DNA poszczególnych chromosomów ludzkich oferuje już szereg firm.

Rozdzielanie chromosomów za pomocą cytometrii przepływowej jest możliwe tylko u tych gatunków, których chromosomy wyraźnie różnią się od siebie zawartością DNA, jak na przykład u człowieka. W przypadku chromosomów mysich sortowanie nie jest możliwe. Problem ten rozwiązano ostatnio

Za pomocą PCR można oczywiście również amplifikować DNA sortowany przez cytometr przepływowy.

ZNAKOWANIE I DETEKcja SONDY

Historycznie najstarszą i do dziś nadal najpopularniejszą metodą nieradioaktywnego znakowania sondy jest zamiana tymidyny w DNA na urydynę kowalennie związaną z biotyną. Używa się do tego najczęściej techniki przemieszczania nacięcia (nick-translation), w której wykorzystuje się fakt, że polimeraza DNA rozpoczyna syntezę nowego łańcucha w miejscu, gdzie napotka pęknięcie DNA, wbudowując do nowego łańcucha nukleotydy znajdujące się w otoczeniu. Pęknięcia DNA wprowadza się trawiąc go DNazą, zaś podając polimerazie mieszanekę nukleotydów zawierającą urydynę związaną z biotyną, uzyskuje się znakowany DNA sondy.

Inną możliwością znakowania sondy jest podanie biotynylowanej urydyny podczas PCR, o ile ta metoda jest używana do amplifikacji sondy. Optymalne malowanie chromosomów wymaga używania sondy nie dłuższej niż około 500 par zasad, gdyż zbyt długie łańcuchy sondy nie są w stanie dotrzeć do docelowego DNA, utrwalonego na szkiełku w postaci chromatyny. Przez wybór odpowiedniego stężenia DNazy i polimerazy podczas przemieszczania nacięcia uzyskuje się sondy odpowiedniej długości, natomiast po znakowaniu sondy przez PCR trzeba DNA poddać rozbiciu ultradźwiękami lub trawieniu przez DNazę w celu nadania jej odpowiedniej długości.

Do wykrywania biotyny wykorzystuje się awidynę (białko z jaja kurzego) związaną z dowolnym fluorochromem, na przykład izotiocyanianem fluoresceiny. Awidyna wiąże się wysoce swoiście z biotyną. Jeśli uzyskany sygnał jest zbyt słaby, można go wzmocnić za pomocą przeciwciała monoklonalnego, skierowanego przeciw awidynie i znakowanego tym samym fluorochromem. Zamiast awidyny można również zastosować przeciwciała mono- lub poliklonalne, skierowane przeciw biotynie.

Pod koniec lat 80-tych firma Boehringer opatentowała technikę znakowania DNA urydyną związaną z digoksygeniną, sterydem uzyskiwanym z liści i kwiatów naparstnicy purpurowej (*Digitalis purpurea*). Ponieważ digoksygenina nie występuje w żadnym innym organizmie poza liśćmi i kwiatami naparstnicy, możliwe jest jej wysoce swoiste wykrycie za pomocą przeciwciał monoklonalnych.

Ostatnio wiele firm oferuje również urydynę znakowaną bezpośrednio różnymi fluorochromami. Jeśli sygnał uzyskany po hybrydyzacji jest dość silny, zbyteczne jest wykrywanie przeciwciałem. W przypadku słabego sygnału można go wzmocnić przeciwciałem skierowanym przeciw używanemu fluorochromowi.

PREPARATYKA I DENATURACJA CHROMOSOMÓW NA SZKIEŁKU

Hybrydyzacja *in situ* praktycznie jest możliwa do przeprowadzenia z dowolnie utrwalonym DNA. Do malowania chromosomów najczęściej utrzuwa się komórki w mieszaninie metanolu i kwasu octowego i następnie nanosi na szkiełka. Wysuszone preparaty trawi się najpierw RNazą w celu zmniejszenia możliwego tła spowodowanego hybrydyzacją sondy z cząsteczkami RNA, a następnie pepsyną, by usunąć resztki cytoplazmy utrudniającej dostęp sondy do utrwalonego

DNA. Trawienie pepsyną zapobiega również ewentualnemu nieswoistemu połączeniu przeciwciał z białkami znajdującymi się w cytoplazmie.

Denaturację DNA prowadzi się albo w warunkach ekstremalnego pH albo w wysokiej temperaturze. Zbyt ostre warunki denaturacji powodują jednak utratę cech morfologicznych chromosomów, w praktyce zatem jest konieczny kompromis między stopniem denaturacji a jakością preparatu chromosomów. Najczęściej denaturuje się chromosomy w temperaturze 70°C w 50% roztworze formamidu, który obniża termiczną stabilność wiązań wodorowych pomiędzy dwiema niciami DNA tak, że czas denaturacji wynosi około 10 minut.

DENATURACJA SONDY I HYBRYDYZACJA

Podobnie jak DNA utrwalony na szkiełku, sondę denaturuje się w roztworze formamidu przy 70°C. Do DNA sondy dodaje się następnie DNA Cot-1, zawierający wyłącznie sekwencje powtarzające się z ludzkiego DNA, któremu pozwala się hybrydyzować z homologicznymi sekwencjami DNA sondy (pre-hybrydyzacja). Krok ten jest niezwykle ważny, ponieważ zapobiega nieswoistej hybrydyzacji sondy z sekwencjami powtarzającymi się, znajdującymi się na wszystkich chromosomach. Tak izolowane sekwencje DNA są oferowane przez wiele firm.

Po około 15 minutowej pre-hybrydyzacji sondę nakłada się na szkiełko z denaturowanymi chromosomami i pozwala hybrydyzować w temperaturze 37°C przez około 12 godzin, po czym następuje wykrycie awidyną lub przeciwciałem, jak opisano wyżej.

POMIAR CZĘSTOŚCI ABERRACJI CHROMOSOMOWYCH W POMALOWANYCH CHROMOSOMACH

O ile pęknięcia chromosomowe są widoczne jako strukturalne nieciągłości chromosomów i nie wymagają malowania do ich wykrycia, wykrycie przemieszczeń (translokacji) chromosomowych jest możliwe tylko między chromosomami pomalowanymi na różne kolory. Teoretycznie jest możliwe pomalowanie każdej homologicznej pary chromosomów na inny kolor. W praktyce jednak nie jest to stosowane, ponieważ wymagałoby zastosowania wielu różnych fluorochromów. Oznaczałoby to ogromny wzrost kosztów eksperymentu. Ponadto, dostępne obecnie filtry fluorescencyjne nie pozwalają na równoczesne oglądanie więcej niż dwóch kolorów znacznie różniących się od siebie długością fal. Trzeba by więc wielokrotnie fotografować lub zapisywać komputerowo obraz tego samego preparatu oglądanego przez różne filtry, co bardzo komplikowałoby uzyskiwanie wyników. Najczęściej stosuje się więc jeden fluorochrom, na przykład izotiocyanian fluoresceiny, który emituje światło żółte. Niemalowane chromosomy są barwione jodkiem propidyny świecącym czerwono, dzięki czemu preparat można oglądać przez jeden filtr, a przegrupowania chromosomowe są widoczne jako niejednolicie zabarwione chromosomy żółte lub czerwone.

Przy zastosowaniu jednego fluorochromu, najskuteczniejsze wykrycie translokacji osiągałoby się barwiąc połowę zestawu chromosomowego. W praktyce barwi się tylko dwie lub trzy pary chromosomów, zaś uzyskana liczba

translokacji jest przeliczana na oczekiwaną wartość, którą uzyskaliby się, gdyby wszystkie translokacje w komórce były widoczne. Poprawny wzór:

$$F = t / 2f(1 - f)$$

gdzie: F oznacza liczbę aberracji we wszystkich chromosomach komórki, t — uzyskaną liczbę aberracji, f — pomalowany ułamek genomu. Wzór ten wywodzi się z kombinatorycznego obliczenia maksymalnej — możliwej liczby translokacji występującej w zestawie chromosomów, którego ułamek f jest pomalowany. Maksymalną liczbę aberracji można opisać wzorem:

$$1 = f^2 + 2f(1 - f) + (1 - f)^2$$

Translokacje f^2 i $(1 - f)^2$ nie są widoczne ponieważ zachodzą pomiędzy identycznie zabarwionymi chromosomami. Dlatego do przeliczania częstości aberracji na cały genom używa się wartości $2f(1 - f)$. Ta metoda przeliczania, po raz pierwszy opisana przez ¹UCASA i współautorów (1989b), zakłada, że prawdopodobieństwo wystąpienia aberracji popromiennych jest wprost proporcjonalne do zawartości DNA w poszczególnych chromosomach. Niestety, wyniki eksperymentów nie potwierdzają tego założenia. Większość autorów zgodnie stwierdza, że rozkład aberracji nie jest przypadkowy. Nie ma zgody natomiast co do tego, w których chromosomach aberracje występują najczęściej. Chcąc więc przeliczać liczbę aberracji, uzyskanych w pomalowanych chromosomach na cały genom, dobrze jest malować kilka chromosomów różnej wielkości, aby otrzymać jak najbardziej reprezentatywną częstość aberracji.

Wyniki analiz aberracji w pomalowanych chromosomach wykazały, że przemieszczenia chromosomowe potrafią przybierać bardzo skomplikowane formy, dla których zabrakło odpowiedniego nazewnictwa. Nowa terminologia aberracji, ustalona specjalnie dla malowania chromosomów, została niedawno zaproponowana przez grupę czołowych naukowców z tej dziedziny (TUCKER i współaut. 1995).

ZASTOSOWANIE MALOWANIA CHROMOSOMÓW W CYTOGENETYCE POPROMIENNEJ

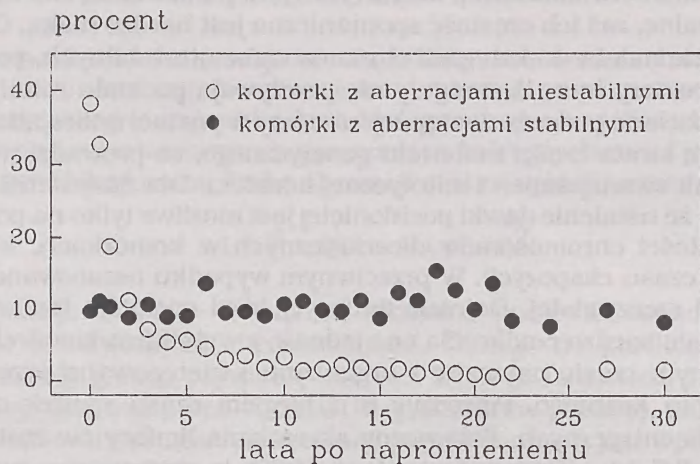
DOZYMETRIA BIOLOGICZNA

Celem dozymetrii biologicznej jest oszacowanie, na podstawie badania uszkodzeń tkanek lub komórek, wysokości dawki pochłoniętej. Znając aktywność źródła promieniowania często można wprawdzie obliczeniowo zrekonstruować wysokość dawki, jednak takie obliczenia zawsze zawierają pewien margines niepewności. Istnieje szereg metod, za pomocą których przeprowadzenie dozymetrii biologicznej jest możliwe (MUELLER i STREFFER 1991). Zdecydowanie najszerzej stosowaną techniką jest analiza aberracji chromosomowych w limfocytach krwi. Pobrane limfocyty pobudza się do podziału w hodowli, zaś dawkę pochłoniętą szacuje, porównując otrzymaną częstość aberracji z wynikami oznaczeń częstości aberracji w limfocytach napromienionych różnymi dawkami

in vitro. Taką krzywą kalibracyjną ustala się poprzednio na podstawie wyników z limfocytami wielu dawców, w ten sposób wyrównując istniejące, indywidualne różnice promienioczułości limfocytów. Doświadczalnie ustalono, że najdokładniej jest obliczyć ilość chromosomów dicentrycznych, ponieważ są one względnie łatwo rozpoznawalne, zaś ich częstość spontaniczna jest bardzo niska. Chromosomy dicentryczne należą do kategorii chromosomów niestabilnych, ponieważ, mając dwa centromery (rys. 1), z reguły nie przeżywiają podziału mitotycznego komórki i są oddzielane podczas następnej interfazy w postaci mikrojąder. W ten sposób następuje strata części materiału genetycznego, co prowadzi wcześniej czy później do tak zwanej śmierci mitotycznej komórki. Dla dozymetrii biologicznej oznacza to, że ustalenie dawki pochłoniętej jest możliwe tylko na podstawie oznaczania częstości chromosomów dicentrycznych w komórkach, które nie podzieliły się od czasu ekspozycji. W przeciwnym wypadku oszacowana dawka będzie niższa od rzeczywistej. Dojrzałe limfocyty krwi spełniają ten warunek, ponieważ dzielą się bardzo rzadko. Są one jednak, z wyjątkiem komórek długoletnich, po pewnym czasie usuwane z organizmu i zastępowane przez młode komórki ze szpiku kostnego. Powoduje to z biegiem czasu spadek częstości chromosomów dicentrycznych. Połowiczny okres życia limfocytów został oszacowany na około 3,5 roku (BENDER i współaut. 1988); to znaczy, że po tym czasie średnio połowa limfocytów zostanie zastąpiona przez nowe komórki. Wartość ta została ustalona na podstawie okresowej analizy aberracji w limfocytach osób, które otrzymały znaną dawkę promieniowania, na przykład w wyniku radioterapii. Wyniki kilku takich badań dosyć zgodnie wykazują spadek liczby dicentryków do około 50 procent po upływie dwóch do trzech lat (rys. 3). Po tym okresie spadek staje się dużo mniejszy i wreszcie osiąga swego rodzaju stały poziom. Podwyższone częstości chromosomów dicentrycznych nadal są zauważalne u ofiar z Hiroszimy i Nagasaki, co wskazuje na ogromną długowieczność pewnej populacji limfocytów. W oparciu o wartość połowicznego okresu życia limfocytów jest możliwa matematyczna korekta oznaczonej częstości chromosomów dicentrycznych, pozwalająca na oszacowanie wysokości dawki nawet wiele lat po ekspozycji. Tego typu analiza wymaga jednak zbadania bardzo dużej liczby komórek i jest obciążona sporym marginesem niepewności, spowodowanym istniejącymi indywidualnymi różnicami połowicznego okresu życia limfocytów.

Obok aberracji niestabilnych, promieniowanie jonizujące wywołuje również aberracje stabilne (rys. 1). Ponieważ nie zaburzają one podziału komórkowego, aberracje tego typu mogą przetrwać w komórce przez wiele pokoleń. Częstość ich występowania w populacji komórek dzielących się nie powinna więc, w przeciwieństwie do aberracji niestabilnych, ulegać zmianie. Wyniki badań aberracji powstałych na skutek radioterapii w limfocytach pacjentów chorych na artropatię wiądową wykazały, że tak jest istotnie (rys. 3). Teoretycznie więc, badanie aberracji tego typu umożliwiłoby bardziej precyzyjne ustalenie dawki pochłoniętej, zwłaszcza w przypadku, kiedy od ekspozycji upłynęło kilka lat. W praktyce, dokładne oznaczanie częstości aberracji stabilnych było przez długie lata możliwe tylko za pomocą techniki prążkowania chromosomów. Duży nakład pracy, związany z tego typu badaniami powodował, że oznaczanie aberracji stabilnych w zastosowaniu do dozymetrii biologicznej nie było nigdy poważnie brane pod uwagę. Zmieniło się to dopiero po opracowaniu techniki malowania

chromosomów. Różnego rodzaju przemieszczenia chromosomowe są widoczne jako kolorowe wzory, co pozwala na bardzo szybkie ich liczenie, nawet wtedy, kiedy jakość preparatów nie jest najlepsza.



Rys. 3. Spadek ilości limfocytów z aberracjami stabilnymi i niestabilnymi w krwi pacjentów napromienionych w trakcie terapii artropatii wędrowej. Według BUCKTON, 1983.

LUCAS i współautorzy (1992) jako jedni z pierwszych zbadali przydatność malowania chromosomów dla analizy translokacji chromosomowych w limfocytach dwudziestu osób eksponowanych na różne dawki promieniowania jonizującego podczas wybuchu bomb atomowych w Hiroszynie i Nagasaki w 1945 roku. Częstość translokacji ustaloną na podstawie malowania chromosomów 1, 2 i 4, których DNA stanowi 23,8 procent genomu, została porównana z częstością translokacji ustaloną za pomocą prążkowania chromosomów. Wyniki obu technik dały bardzo zbliżone do siebie wyniki. Z wyjątkiem kilku osobników, została uzyskana też niezła zbieżność z krzywą kalibracyjną, ustaloną na podstawie translokacji w komórkach napromienionych *in vitro*.

Również SALASSIDIS i współautorzy (1994) uzyskali dobrą korelację między dawkami oszacowanymi na podstawie częstości dicentryków i translokacji w limfocytach piętnastu ofiar Czarnobyla. Częstości translokacji, obliczone na podstawie pomalowanych chromosomów 1, 2 i 12, były od 2,8 do 21 razy wyższe niż częstości dicentryków. Analizę wykonano sześć lat po katastrofie.

Pomimo ciekawych wyników opublikowanych przez obie wspomniane grupy badaczy, są konieczne dalsze badania, zanim analiza translokacji będzie mogła rutynowo być używana w dozymetrii biologicznej. Otwartym nadal pozostaje pytanie, jak wyznaczyć znaczącą krzywą kalibracyjną. Czy częstość translokacji, ustaloną w limfocytach w jakiś czas po ekspozycji, rzeczywiście można porównywać z częstością translokacji uzyskaną w limfocytach *in vitro*? Problem leży w kinetyce podziału limfocytów i tak zwanej regule Bergonié i Tribondeaux, według której komórki szybko dzielące się są bardziej promienioczułe niż komórki nie dzielące się. W przypadku analizy dicentryków po ekspozycji można

założyć, że zdecydowana większość limfocytów zawierających dicentryki nie podzieliła się od czasu napromienienia. W przeciwnym wypadku, jak to zostało wyżej powiedziane, istnieje duże prawdopodobieństwo, że dicentryk „zaginie” podczas mitozy. Dlatego porównując częstości tego typu aberracji w limfocytach napromienionych *in vivo* z krzywą kalibracyjną można założyć, że zostały oznaczone w porównywalnych populacjach komórek. Inaczej sprawa wygląda z ustalaniem krzywej kalibracyjnej dla translokacji. Fakt, że translokacje nie giną podczas podziału komórkowego z jednej strony powoduje, że ich ilość w populacji komórek dzielących się jest względnie stała, co jest z punktu widzenia dozymetrii biologicznej korzystne. Z drugiej jednak strony oznacza to, że z powodu repopulacji limfocytów, po upływie pewnego czasu od ekspozycji, jakaś część dojrzałych limfocytów krwi, zawierająca translokacje, faktycznie została napromieniona w stadium niedojrzałych, szybko dzielących się komórek szpiku kostnego, które według wyżej wymienionej reguły Bergonié i Tribondeaux są bardziej promienioczułe niż dojrzałe limfocyty. Dodatkowo, proliferujące komórki szpiku kostnego stanowią niezsynchronizowaną populację, tak więc napromienienie „trafia” komórki w różnych fazach cyklu komórkowego. Wiadomo, że promienioczułość komórki, a zatem również liczba wywoływanych aberracji, zmienia się podczas przechodzenia komórki przez cykl komórkowy. Przeciwnie, dojrzałe limfocyty krwi znajdują się w ponad dziewięćdziesięciu procentach w tej samej fazie cyklu komórkowego, G₀. Poniekąd więc fakty te stawiają pod znakiem zapytania porównywalność częstości translokacji powstałych na skutek ekspozycji *in vivo* z krzywą kalibracyjną uzyskaną w limfocytach napromienionych *in vitro*, jeżeli po ekspozycji upłynął dłuższy czas. Dalsze eksperymenty mogą wykazać, czy wątpliwości te są uzasadnione.

Innym czynnikiem wymagającym zbadania jest możliwy wpływ na oszacowanie dawki klonowo rozmnażających się komórek z translokacją. Powstanie klonu z jednego limfocyty jest przynajmniej teoretycznie możliwe na skutek odpowiedzi immunologicznej organizmu na dowolny alergen. W takiej sytuacji oszacowana dawka promieniowania mogłaby być dużo wyższa niż rzeczywista. Wyniki analiz przeprowadzonych do tej pory wskazują jednak, że klonowy rozrost limfocytów nie jest zjawiskiem częstym. Wśród dwudziestu zbadanych ofiar z Hiroszimy i Nagasaki LUCAS i współautorzy (1992) wykryli klony komórek z taką samą translokacją tylko w limfocytach dwóch dawców. U żadnego z nich liczba tego typu komórek nie przekraczała pięciu procent. Z drugiej strony, SALASSIDIS i współautorzy (1994) wykryli klonowe aberracje w limfocytach wszystkich piętnastu zbadanych ofiar Czarnobyli. Według wskazówek Międzynarodowej Komisji Nazewnictwa Chromosomów (ISCN), identyczna aberracja wykryta w co najmniej dwóch komórkach była klasyfikowana jako klonowa. Jednak, podobnie jak w limfocytach ofiar z Hiroszimy i Nagasaki, liczba komórek klonowych u żadnego dawcy nie była wyższa niż cztery procent.

Rozważając użyteczność malowania chromosomów dla dozymetrii biologicznej nie należy zapominać także o tym, że translokacje powstają nie tylko na skutek napromienienia komórek, lecz również w wyniku działania wielu substancji chemicznych. Teoretycznie oznacza to, że nie sposób stwierdzić, czy ewentualnie podwyższona częstość translokacji jest skutkiem napromienienia, czy też, na przykład, chronicznego działania chemicznych mutagenów zatrująca-

jących środowisko. Problem ten może być szczególnie istotny przy oszacowaniu niskiej dawki ekspozycji. W odróżnieniu od translokacji, chromosomy dicentryczne są indukowane tylko przez czynniki, które bezpośrednio wywołują pęknięcia obu nici DNA. Do takich, oprócz promieniowania jonizującego, należy tylko garstka substancji chemicznych, tak zwanych radiomimetyków, jak na przykład bleomycyna, więc możliwość kontaminacji dicentryków popromiennych dicentrykami wywołanymi przez mutageny chemiczne jest znikoma. W praktyce oznacza to, że są potrzebne dokładne analizy częstości translokacji u dawców nie ekspozowanych. Jak dotąd, największą liczbę danych na ten temat zebrała grupa prof. Bauchingera z Monachium. W ponad jedenastu tysiącach limfocytów pochodzących od jedenastu dawców, których chromosomy numer 1, 4 i 12 zostały pomalowane, znaleziono 18 translokacji zaś tylko jeden dicentryk (BAUCHINGER i współaut. 1993).

BADANIA MECHANIZMÓW POWSTAWANIA ABERRACJI CHROMOSOMOWYCH

Pomimo że aberracje chromosomowe są badane od bardzo dawna, mechanizmy ich powstawania nadal nie są znane. Większość badaczy jest zgodna co do tego, że aby jakiegokolwiek zaburzenie DNA doprowadziło do powstania aberracji chromosomowej, musi ono zostać przetworzone w podwójne pęknięcie DNA. Nie jest natomiast jasne, czy każde nienaprawione podwójne pęknięcie DNA może być jako takie widoczne na poziomie chromosomu, czy też musi uprzednio być w jakiś sposób enzymatycznie przetworzone. Nie jest również jasne czy, jak to głosiła pierwsza „klasyczna” teoria powstawania aberracji chromosomowych według KARLA SAXA (1940), przegrupowania chromosomowe powstają wskutek łączenia się pęknięć chromosomowych, czy też oba typy aberracji są odzwierciedleniem „utrwalonych” zaburzeń DNA, które nie są już w stanie ze sobą reagować. Inną otwartą kwestią pozostaje, czy dicentryki i translokacje powstają z taką samą frekwencją. Wyniki badań przeprowadzonych na chromosomach prążkowanych wskazywały, że tak jest istotnie (SAVAGE i PAPWORTH 1982). Oznaczałoby to, że oba typy aberracji powstają z tych samych uszkodzeń DNA, które z równym prawdopodobieństwem mogą zostać przemienione w dicentryki, jak też w translokacje. Stosując technikę malowania chromosomów LUCAS i współautorzy (1989a) jako jedni z pierwszych stwierdzili, że w limfocytach ludzkich translokacje pōpromienne występują kilkakrotnie częściej niż dicentryki. Podobne wyniki zostały opublikowane również przez innych. Oznaczałoby to, że oba typy aberracji mają różną genezę. Niestety, wysoka temperatura, na jaką wystawiane są chromosomy podczas denaturacji poprzedzającej hybrydyzację, nie pozostaje bez wpływu na morfologię chromosomów, dlatego rozróżnienie translokacji i dicentryków w pomalowanych chromosomach jest często trudne. Aby sytuację tę poprawić, STRAUME i LUCAS (1993) jako pierwsi zastosowali sondy pancentromeryczne, czyli specyficznie naznaczające centromery wszystkich chromosomów. Teraz translokacje były widoczne jako dwukolorowe chromosomy z jednym centromerem a dicentryki jako dwukolorowe chromosomy z dwoma dicentrykami (porównaj rys. 1). W tak pomalowanych preparatach frekwencja translokacji okazała się równa frekwencji dicentryków. Autorzy wnioskowali, że dotychczasowe doniesienia wskazujące na wyższy poziom trans-

lokacji były spowodowane mylnym rozpoznaniem niektórych dicentryków jako translokacji. Wynik ten został potwierdzony przez NAKANO i współautorów (1993). Z drugiej strony, BAUCHINGER i współautorzy (1993), pomimo zastosowania sond pancentromerycznych, nadal uzyskali około półtorakrotną przewagę translokacji nad dicentrykami. NATARAJAN i współautorzy (1994) zbadali wpływ arabinianu cytozyny (ara-C), inhibitora naprawy DNA, na częstość popromiennych aberracji. Okazało się, że ara-C nie ma wpływu na częstość translokacji, za to powoduje około dwukrotny wzrost ilości dicentryków. Oznaczałoby to, że mechanizmy powstawania obu typu aberracji są różne. Na razie nie wiadomo, dlaczego wyniki badań z różnych laboratoriów są sprzeczne.

Technika malowania chromosomów może również okazać się przydatna w szukaniu odpowiedzi na pytanie, czy pęknięcia chromosomowe są pierwotnym uszkodzeniem popromiennym DNA. Według klasycznej teorii powstawania aberracji chromosomowych (SAX 1940), pęknięcia mogą zostać naprawione (restytucja), pozostać otwarte (brak naprawy) lub złączyć się błędnie powodując powstanie przegrupowań (misrepair — błędna reperacja). Niektóre nowsze wyniki badań wskazują jednak, że sprawa nie wygląda tak prosto. Do analizy tej kwestii stosuje się technikę przedwczesnej kondensacji chromosomów (PCC — premature chromosome condensation). Polega ona na fuzji komórek znajdujących się w mitozie z komórkami, których aberracje chce się analizować. Czynniki komórek mitotycznych wyzwalają kondensację chromosomów w komórkach „docelowych”, znajdujących się w różnych fazach cyklu komórkowego. Przeprowadzając taką fuzję komórek w różnych odstępach czasu po napromienieniu można analizować kinetykę powstawania i zanikania aberracji bez konieczności czekania aż komórka dotrze do mitozy. Niestety, morfologia chromosomów PCC jest z reguły niezbyt dobra, tak że rozpoznanie dicentryków jest trudne. Dobrze widoczne są tylko pęknięcia chromosomowe. Tutaj właśnie ogromnie pomocnym okazało się malowanie chromosomów. Według klasycznej teorii powstawania aberracji chromosomowych należałoby się spodziewać, że w miarę upływu czasu po napromienieniu liczba pęknięć będzie malała a liczba przegrupowań, które powstają wskutek błędnego łączenia się pęknięć, rosła. Taki wynik uzyskali BROWN i współautorzy (1992). Natomiast HITTLEMAN i współautorzy (1994) oraz NATARAJAN i współautorzy (1994) uzyskali wyniki zgoła inne. Wprawdzie liczba pęknięć chromosomowych w ich eksperymentach również malała z upływem czasu po napromienieniu, ale częstość przegrupowań nie ulegała żadnej zmianie. Oznaczałoby to, że wbrew klasycznej teorii, pęknięcia i przegrupowania powstają zupełnie niezależnie od siebie. Jest jasne, że dalsze badania są konieczne, aby tę kwestię rozwiązać.

Kolejną dziedziną, w której malowanie chromosomów okazać się może bardzo przydatne, jest analiza promienioczułości komórek rakowych w celu przepowiedzenia rokowania radioterapii i ewentualnego, indywidualnego dostosowania planu napromieniowań. Wiadomo, że guzy należące nawet do tej samej kategorii, bardzo potrafią różnić się promienioczułością. Stosowanie jednolitego schematu radioterapii może w niektórych przypadkach okazać się niewystarczająco skuteczne, zaś w innych przypadkach „nadskuteczne”, prowadząc do niepotrzebnej ekspozycji zdrowej tkanki. Ideą tak zwaną „predictive assay” jest, aby przed rozpoczęciem radioterapii pobrać próbkę guza, napromienić *in vitro*,

i oszacować reakcję komórek. Ponieważ celem radioterapii jest zabicie komórek rakowych, najlepiej byłoby analizować ich przeżywalność. Wiadomo, że komórki napromienione dawkami promieniowania stosowanymi w radioterapii mogą wielokrotnie się podzielić, zanim zginą na skutek utraty materiału genetycznego podczas kolejnych podziałów (tzw. śmierć mitotyczna). Dla analizy przeżywalności oznacza to konieczność długotrwałej (z reguły około czternastodniowej) hodowli. Szanse terapii guza są tym lepsze, im wcześniej ona nastąpi, taki okres czekania na wyniki jest więc ze względów humanitarnych, niedopuszczalny. Konieczna jest analiza takich parametrów, które dadzą szybkie wyniki i będą korelowały z przeżywalnością. Do takich należy badanie proliferacji komórek, oznaczenie podwójnych pęknięć DNA i analiza aberracji chromosomowych lub mikrojąder. Ze względu na częstą aneuploidalność komórek rakowych (mają one nierzadko aż sto chromosomów, obliczanie niestabilnych aberracji chromosomowych jest bardzo pracochłonne. Innym kłopotem jest często zła morfologia chromosomów na preparatach komórek rakowych, co bardzo utrudnia rozpoznawanie aberracji. Problemy te można ominąć, stosując technikę malowania chromosomów, która jest względnie niezależna od jakości preparatów (oblicza się ilość kolorowych plam) i która ogranicza się do analizy kilku chromosomów. Przynajmniej teoretycznie istnieje też możliwość badania pomalowanych chromosomów w jądrach komórek znajdujących się w interfazie cyklu komórkowego za pomocą mikroskopu skaningowo-laserowego. Mikroskopy tego typu umożliwiają trójwymiarową analizę obiektów utrwalonych na szkiełku. Badanie aberracji sprowadzałoby się do ustalenia liczby kolorowych plam i miałyby tę ogromną zaletę, że praktycznie nie wymagałoby hodowli komórek rakowych. Na razie jednak ilość opublikowanych wyników jest za mała, aby móc ocenić rzeczywistą przydatność malowania chromosomów w tej dziedzinie (BROWN i współaut. 1992, COCO-MARTIN i współaut. 1994).

ZAKOŃCZENIE

Malowanie chromosomów umożliwia szybką i precyzyjną analizę aberracji chromosomowych, szczególnie przegrupowań, których badanie do tej pory wymagało bardzo dużego nakładu pracy. W radiobiologii technika ta znajduje szczególne zastosowanie w badaniu mechanizmów powstawania popromiennych aberracji chromosomowych i dozymetrii biologicznej. Kombinacja malowania chromosomów z mikroskopią skaningowo-laserową i komputerową metodą analizy obrazu umożliwia badanie aberracji w interfazie komórki. Otwiera to możliwość obserwacji wydarzeń zachodzących w krótkim czasie po ekspozycji oraz obliczania aberracji bez konieczności czekania aż komórka dotrze do mitozy:

Przy panującej obecnie pewnego rodzaju modzie na malowanie chromosomów nie należy jednak zapominać, że technika ta nie jest pozbawiona pewnych mankamentów: możliwa jest zawsze tylko analiza aberracji pewnej części genomu, a do dziś nie jest jasne, czy częstości aberracji ustalone w poszczególnych chromosomach są reprezentatywne dla całego genomu. Denaturacja chromosomów często prowadzi do pogorszenia ich morfologii, co uniemożliwia precyzyjną

analizę aberracji niestabilnych. Pomimo to jest rzeczą pewną, że technika ta będzie w przyszłości odgrywała coraz większą rolę w cytogenetyce popromiennej.

Bardzo dziękuję Pani Profesor Irenie Szumiel za cenne uwagi podczas pisania tekstu.

THE TECHNIQUE OF CHROMOSOME PAINTING AND ITS APPLICATION IN RADIATION BIOLOGY

Summary

The analysis of chromosomal aberrations is one of the most important methods of investigating the effects of ionizing radiation on living cells. For a long time only structural, unstable-type aberrations, like dicentrics, could be identified in uniformly stained chromosomes. The introduction of chromosome banding in the seventies allowed for the first time to analyse stable-type aberrations, such as translocations, however, the technical difficulties associated with this technique prevented its wide application in radiation biology. At the end of the eighties, the technique of chromosome painting was invented. With its help it is possible to hybridize *in situ* fluorochrome-labelled DNA of individual chromosomes, so that any interchromosomal rearrangements are easily detectable as color discontinuities. The analysis of radiation-induced translocations in painted chromosomes is presently being introduced in biodosimetry of human peripheral lymphocytes. The advantage of this system lies in the fact that, unlike unstable-type aberrations, the frequency of translocations in a proliferating cell population remains constant with time. This could allow a precise, retrospective estimation of the dose applied a long time after exposure to radiation. Chromosome painting has also been used to investigate the mechanisms underlying the formation of radiation-induced chromosomal aberrations, and may play a role in estimation of radiosensitivity of tumors prior to radiotherapy.

LITERATURA

- BAUCHINGER M., SCHMID E., ZITZELBERGER H., BRASELMAN H., NAHRSTEDT U., 1993. *Radiation-induced chromosome aberrations analysed by two-color fluorescence in situ hybridisation with composite whole chromosome-specific DNA probes and a pancentromeric DNA probe*. Int. J. Radiat. Biol. 64, 179-184.
- BENDER M. A., AWA A. A., BROOKS A. L., EVANS H. J., GROER P. G., LITTLEFIELD L. G., PEREIRA C., PRESTON R. J., WACHHOLZ B. W., 1988. *Current status of cytogenetic procedures to detect and quantify previous exposures to radiation*. Mutat. Res. 196, 103-159.
- BROWN J. M., EVANS J. W., KOVACS M. S., 1992. *The prediction of human radiosensitivity in situ: an approach using chromosome aberrations detected by fluorescence in situ hybridization*. Int. J. Radiation Oncology Biol. Phys. 24, 279-286.
- BUCKTON K. E., 1983. *Chromosome aberrations in patients treated with X-irradiation for ankylosing spondylitis*. [W:] *Radiation-Induced Chromosome Damage in Man*. T. ISHIHARA, M. S. SASAKI (red.) A. R. Liss, New York, 491-511.
- COCO-MARTIN J. M., SMEETS M. F. M. A., POGGENSEE M., MOOREN E., HOFLAND I., VAN DEN BRUG M., OTTENHEIM C., BARTELINK H., BEGG A. C., 1994. *Use of fluorescence in situ hybridization to measure chromosome aberrations as a predictor of radiosensitivity in human tumour cells*. Int. J. Radiat. Biol. 66, 297-307.
- EVANS H. J. 1962., *Chromosome aberrations induced by ionizing radiations*. Int. Rev. Cytol. 13, 221-321.
- GRAY J. W., PINKEL D., 1992. *Molecular cytogenetics in human cancer diagnosis*. Cancer 69, 1536-1542.
- GRAY J. W., PINKEL D., BROWN J. M., 1994. *Fluorescence in situ hybridization in cancer and radiation biology*. Radiat. Res. 137, 275-289.
- GRAY J. W., LANGLOIS R. G., 1986. *Chromosome classification and purification using flow cytometry and sorting*. Ann. Rev. Biophys. Chem. 15, 195-235.

- HITTLEMAN W. N., WLODEK D., GREGOIRE V. and PANDITA T. K., 1994. *The use of premature chromosome condensation and chromosome painting to understand chromosome exchange formation*. [W:] *Chromosome Alterations. Origin and significance*. G. OBE, A. T. Natarajan (red.). Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York. 57-63.
- LUCAS J. N., TENJIN T., STRAUME T., PINKEL D., MOORE II D., LITT M., GRAY J. W., 1989a. *Rapid human chromosome aberration analysis using fluorescence in situ hybridization*. *Int. J. Radiat. Biol.* 56, 35-44.
- LUCAS J. N., TENJIN T., STRAUME T., PINKEL D., MOORE II D., LITT M., GRAY J. W. 1989b. *Erratum*. *Int. J. Radiat. Biol.* 56, 201.
- LUCAS J. N., AWA A. A., STRAUME T., POGGENSEE M., KODAMA Y., NAKAMO M., OHTAKI K., WEIER H.-U., PINKEL D., GRAY J. W., LITTLEFIELD L. G. 1992. *Rapid translocation frequency analysis in human decades after exposure to ionizing radiation*. *Int. J. Radiat. Biol.* 62, 53-63.
- MUELLER W.-U., STREFFER C., 1991. *Biological indicators for radiation damage*. *Int. J. Radiat. Biol.* 59, 863-873.
- NAKANO M., NAKASHIMA E., PAWEL D. J., KODAMA Y., AWA A. A., 1993. *Frequency of reciprocal translocations and dicentrics induced in human blood lymphocytes by X-irradiation as determined by fluorescence in situ hybridisation*. *Int. J. Radiat. Biol.* 64, 565-569.
- NATARAJAN A. T., BALAJEE A. S., BOEI J. J. W. A., CHATTERJEE S., DARROUDI F., GRIGOROVA M., NODITI M., OH H. J., SLIJEPCEVIC P., VERMEULEN S., 1994. *Recent developments in the assessment of chromosomal damage*. *Int. J. Radiat. Biol.* 66, 615-623.
- PARDUE M. L., GALL J. G., 1969. *Molecular hybridization of radioactive DNA to the DNA of cytological preparations*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 64, 600-604.
- SALASSIDIS K., SCHMID E., PETER R. U., BRASELMANN H., BAUCHINGER M., 1994. *Dicentric and translocation analysis for retrospective dose estimation in humans exposed to ionising radiation during the Chernobyl nuclear power plant accident*. *Mutat. Res.* 311, 39-48.
- SAVAGE J. R. K., PAPWORTH D. G., 1982. *Frequency and distribution studies of asymmetrical versus symmetrical chromosome aberrations*. *Mutat. Res.* 95, 7-18.
- SAX K., 1940. *An analysis of X-ray induced chromosomal aberrations in Tradescantia*. *Genetics* 25, 41-68.
- STRAUME T., LUCAS J. N., 1993. *A comparison of the yields of translocations and dicentrics measured using fluorescence in situ hybridization*. *Int. J. Radiat. Biol.* 64, 185-187.
- SUMNER A. T., 1991. *Chromosome banding*. Unwin Hyman, Boston, Sydney, Wellington.
- TUCKER J. D., MORGAN W. F., AWA A. A., BAUCHINGER M., BLAKEY D., CORNFORTH M. N., LITTLEFIELD L. G., NATARAJAN A. T., SHASSERRE C., 1995. *A proposed system for scoring structural aberrations detected by chromosome painting*. *Cytogenet. Cell. Genet.* 68, 211-221.

ANDRZEJ BAJGUZ, ROMUALD CZERPAK

*Instytut Biologii filia UW w Białymstoku
Świerkowa 20B, 15-950 Białystok*

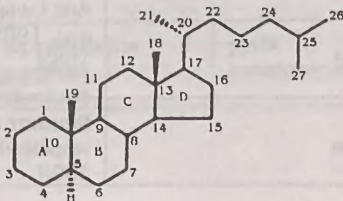
WYSTĘPOWANIE I AKTYWNOŚĆ BIOLOGICZNA BRASSINOSTEROIDÓW — NOWYCH HORMONÓW ROŚLIN

WSTĘP

Odkrycie brassinolidu w roku 1979 dało początek nowej grupie steroidowych związków posiadających zdolność inicjowania wzrostu roślin. Dotychczas wyizolowane z roślin związki tej grupy nazwano brassinosteroidami (BR). Obecnie jest znanych ponad trzydzieści BR, które u roślin wykazują charakterystyczną aktywność metaboliczną typu hormonalnego i dlatego wielu fizjologów i biochemików uważa je za nową grupę hormonów roślinnych obok auksyn, giberelin, cytokinin, abscysyn i etylenu.

WYSTĘPOWANIE BRASSINOSTEROIDÓW

Pierwszym BR, wyizolowanym z pyłku kwiatowego rzepaku (*Brassica napus* L.) był brassinolid. Strukturę chemiczną brassinolidu stanowi steroidalny szkielet 5 α -cholestanu, który charakteryzuje się występowaniem 7-oksylaktonowego pierścienia B i dwóch sąsiadujących ze sobą hydroksyli w pierścieniu A oraz w łańcuchu bocznym (C22R i C23R) (ryc. 1) (GROVE i współaut. 1979). Pozostałe związki BR zostały wyizolowane nie tylko z pyłków kwiatowych, ale również z niedojrzałych nasion, pędów i liści różnorodnych taksonomicznie gatunków roślin naczyniowych, a ostatnio nawet z glonów i grzybów. Konkretnie przykłady roślin zawierających BR przedstawia tabela 1.



Ryc. 1. Steroidalny szkielet 5 α -cholestanu

Tabela 1

Występowanie brassinosteroidów u roślin

Gatunek	Organ roślinny	Brassinosteroid	Piśmiennictwo
Zielone glony (<i>Algae</i>)			
Sieńc wodna (<i>Hydrodictyon reticulatum</i>)		24-epikastasteron 24-etylobrassinon	YOKOTA i współaut. 1987
Skrzypy (<i>Equisetinae</i>)			
Skrzyp polny (<i>Equisetum arvense</i>)		kastasteron 28-norbrassinolid brassinon dolichosteron	TAKATSUTO i współaut. 1990a
Nagozalażkowe (<i>Gymnospermae</i>)			
Sosna zwyczajna (<i>Pinus silvestris</i>)	kambium	brassinolid kastasteron tyfasterol	KIM i współ- aut. 1990, YOKOTA i współaut. 1983
Świerk sitkajski (<i>Picea sitchensis</i>)	pędy	kastasteron tyfasteron	YOKOTA i współaut. 1985
Jednoliścienne (<i>Monocotyledones</i>)			
Pałka szerokolistna (<i>Typha latifolia</i>)	pyłek kwiatowy	tyfasterol teasteron	SCHNEIDER i współaut. 1983
Ryż siewny (<i>Oryza sativa</i>)	pędy	kastasteron dolichosteron	ABE i współ- aut. 1984
Kukurydza zwyczajna (<i>Zea mays</i>)	pyłek kwiatowy	kastasteron tyfasterol teasteron	SUZUKI i współaut. 1986
Lilla (<i>Lilium longiflorum</i>)	pyłek kwiatowy	brassinolid kastasteron tyfasterol teasteron	ASAKAWA i współaut. 1994
Dwuliścienne (<i>Dicotyledones</i>)			
Rzepak (<i>Brassica napus</i>)	pyłek kwiatowy	brassinolid	GROVE i współaut. 1979
Rzepa (<i>Brassica campestris</i>)	nasiona	brassinolid kastasteron 28-norbrassinolid brassinon	ABE i współ- aut. 1982, 1983
Seradela pastewna (<i>Ornithopus sativus</i>)	nasiona	kastasteron 24-epikastasteron	SCHMIDT i współaut. 1993

Gatunek	Organ roślinny	Brassinosteroid	Piśmiennictwo
Rzodkiew zwyczajna (<i>Raphanus sativus</i>)	nasiona	brassinolid kastasteron 28-homoteasteron	SCHMIDT i współaut. 1991
Żylica trwała (<i>Lolium perenne</i>)	pyłek kwiatowy	25-metylokastasteron	TAYLOR i współaut. 1993
<i>Distylium racemosum</i>	galas liście	brassinolid kastasteron 28-norbrassinolid brassinon	ABE i współaut. 1982, IKEKAWA i współaut. 1984
Wyka bób (<i>Vicia faba</i>)	nasiona pyłek kwiatowy	brassinolid kastasteron 28-norbrassinolid brassinon	IKEKAWA i współaut. 1988
Barwinek różyczkowy (<i>Catharanthus roseus</i>)	komórka	brassinolid kastasteron	CHOI i współaut. 1993, PARK i współaut. 1989
Wspłęga pospolita (<i>Dolichos lablab</i>)	nasiona	brassinolid kastasteron 6-deoksodolicholid dolichoosteron 6-deoksodolichoosteron homodolicholid homodolichoosteron	BABA i współaut. 1983, YOKOTA i współaut. 1982, 1983, 1984
Burak zwyczajny (<i>Beta vulgaris</i>)	nasiona	kastasteron 24-epikastasteron	SCHMIDT i współaut. 1994
Słonecznik zwyczajny (<i>Helianthus annuus</i>)	pyłek kwiatowy	brassinolid kastasteron brassinon	TAKATSUTO i współaut. 1989
Kasztan japoński (<i>Castanea crenata</i>)	galas tkanka	brassinolid kastasteron 6-deoksokastasteron brassinon	ABE i współaut. 1982, ARIMA i współaut. 1984, IKEDA i współaut. 1983, YOKOTA i współaut. 1982
Olsza czarna (<i>Alnus glutinosa</i>)	pyłek kwiatowy	brassinolid kastasteron	PLATTNER i współaut. 1986
Gryka zwyczajna (<i>Fagopyrum esculentum</i>)	pyłek kwiatowy	brassinolid kastasteron	TAKATSUTO i współaut. 1990b

Gatunek	Organ roślinny	Brassinosteroid	Piśmiennictwo
Fasola zwykła (<i>Phaseolus vulgaris</i>)	nasiona	brassinolid 1- β -hydroksykastasteron 3-epi-1 α -hydroksykastasteron kastasteron 2-epikastasteron 3-epikastasteron 2,3-dieplikastasteron tyfasterol teasteron 6-deoksokastasteron 3-epi-6-deoksokastasteron 24-epikastasteron 3,24-dieplikastasteron dolicholid dolichostron 6-deoksodolichostron 6-deoksohomodolichostron 25-metylodolichostron 2-epi-25-metylodolichostron 2,3-diepi-25-metylodolichostron 2-deoksy-25-metylodolichostron 3-epi-2-deoksy-25-metylodolichostron 6-deokso-25-metylodolichostron 23-O- β -D-glukopiranozylo- -25-metylodolichostron 23-O- β -D-glukopiranozylo- -2-epi-metylodolichostron	KIM i współaut. 1987, 1988, YOKOTA i współaut. 1983, 1987b
Herbata chińska (<i>Thea sinensis</i>)	liście	brassinolid kastasteron tyfasterol teasteron brassinon	ABE i współaut. 1982, IKEKAWA i współaut. 1984, MORISHITA i współaut. 1983, SCHNEIDER i współaut. 1983

PODZIAŁ BRASSINOSTEROIDÓW

Pod względem struktury chemicznej BR można podzielić na dwie zasadnicze grupy. Pierwszą z nich stanowią związki posiadające tlen w steroidálním szkielecie w postaci laktonu, ketonu lub hydroksylu, na przykład 7-oksylakton; 6-keton; pentahydroksyle przy C1, C2, C3, C22 i C23; tetrahydroksyle przy C2, C3, C22 i C23 oraz trihydroksyle przy C3, C22 i C23. Natomiast do drugiej grupy należą związki zawierające boczny łańcuch alifatyczny w szkielecie w postaci rodników metylowych, metylenowych, etylowych lub etylenowych, na przykład C24S-metylo (1-11), C24R-metylo (12-14), C24-normetylo (15-16), C24-metyleno (17-19), C24S-etylo (20), C24-etylideno (21-23) oraz C24-etyleno-C25-metylo (24-29) (KIM 1991).

Wzory strukturalne zidentyfikowanych BR przedstawia rycina 2, która uwzględnia rodzaj łańcucha bocznego w szkielecie, zaś analogi chemiczne BR są zgrupowane według ich chemicznego charakteru utlenienia.

BIOSYNTENZA BRASSINOSTEROIDÓW

Hipotetyczny szlak biosyntezy brassinolidu jest przedstawiony na rycinie 3. Kampesterol, bądź jakiś inny bliżej nieokreślony jego analog chemiczny, prawdopodobnie jest bezpośrednim prekursorem w biosyntezie BR, ponieważ nie wykazuje żadnej biologicznej aktywności brassinosteroidowej. Również sterole, które pospolicie występują w tkankach roślinnych mogą być stopniowo utleniane aż do wytworzenia różnorodnych związków BR (YOKOTA i współaut. 1990, 1991).

Nasiona fasoli zawierają mnóstwo różnorodnych związków BR, różniących się chemicznym charakterem bocznego łańcucha szkieletu, oraz sporo fitosteroli, z których na przykład 24-metyleno-25-metylo-cholesterol jest prekursorem 25-metylodolichosteronu — jednego z głównych przedstawicieli BR. Ten przykład wskazuje na wybiórczy charakter reakcji utleniania węgla rodnika C-24 metylowego lub metylenowego w sterolach roślinnych, który w efekcie prowadzi do biosyntezy BR. Biologiczna konwersja fitosteroli, jako hipotetycznych prekursorów BR, jest trudna do empirycznego potwierdzenia z powodu niewielkiej zawartości brassinosteroidów w komórkach roślinnych (KIM i współaut. 1988).

AKTYWNOŚĆ METABOLICZNA BRASSINOSTEROIDÓW

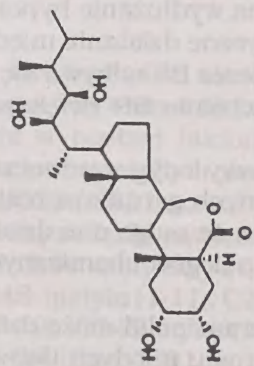
Z dotychczasowych informacji naukowych wiadomo, że BR wykazują znaczną aktywność fizjologiczną, zwłaszcza we wzroście i rozwoju roślin w korelacyjnym powiązaniu z typowymi fitohormonami w różnorodnych warunkach środowiska.

EFEKT ELONGACYJNY

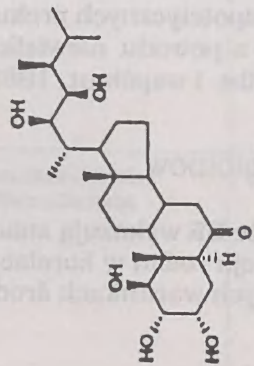
Brassinosteroidy wywierają stymulujący wpływ na wydłużanie epikotyłu w kiełkujących nasionach grochu, fasoli, ogórka i słonecznika (MANDAVA 1988). KATSUMI (1991) potwierdził także indukujący wpływ BR na wydłużanie hypokotyłu ogórka (*Cucumis sativus* L.) oraz wykazał synergistyczne działanie między BR a IAA. Prawdopodobnie efekt elongacyjny wywołany przez BR odbywa się za pośrednictwem auksyn. Istnieje przypuszczenie, że to właśnie BR zwiększają wrażliwość rosnących tkanek na endogenne auksyny.

Brassinosteroidy stymulują również wzrost wydłużeniowy łodyg, a jednocześnie hamują wydłużanie się systemu korzeniowego u licznych gatunków roślin. Zahamowanie wzrostu korzeniowego przez BR sugeruje, że mogą one działać w tym przypadku niezależnie od wpływu auksyn i ich analogów chemicznych, na przykład 2,4-D (CLOUSE i współaut. 1993).

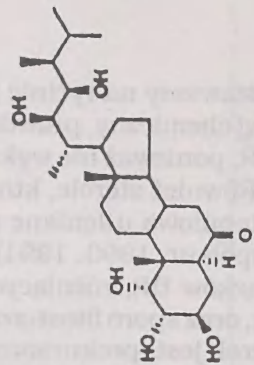
Z kolei badania SASSE'A (1990, 1991) wykazały, że brassinolid może działać niezależnie od auksyn jako mediator w inicjowaniu wzrostu młodych tkanek, a także może współdziałać w sposób kompleksowy z auksynami. W czasie



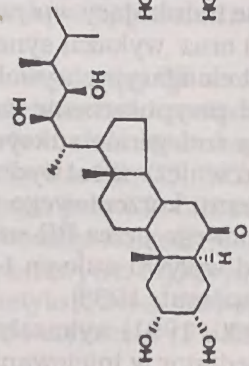
1. Brassinolid



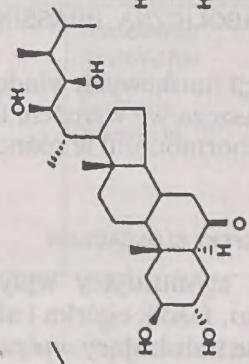
2. 1β-Hydroxykastasteron



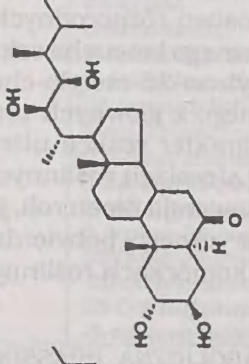
3. 3-Epi-1α-hydroxykastasteron



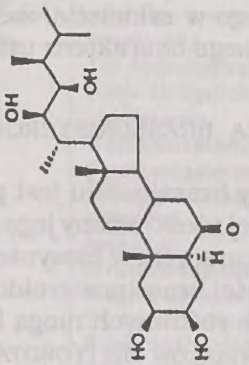
4. Kastasteron



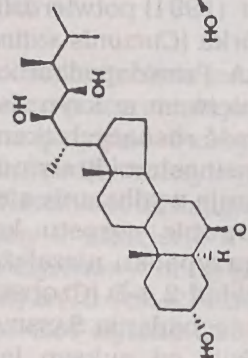
5. 2-Epikastasteron



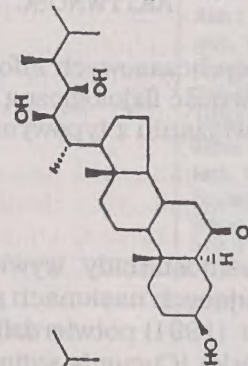
6. 3-Epikastasteron



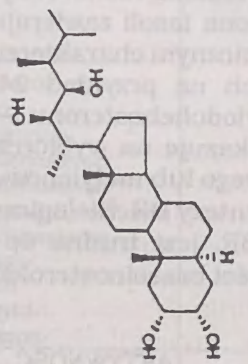
7. 2,3-Diepikastasteron



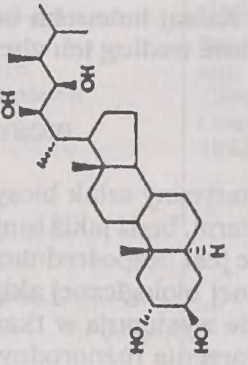
8. Tyfafterol



9. Teasteron

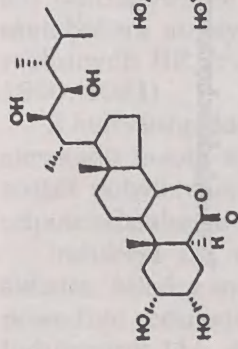


10. 6-Deoksokastasteron

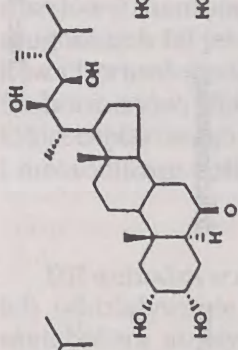


11. 3-Epi-6-deoksokastasteron

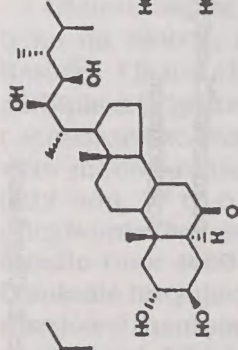
Ryc. 2. Struktura brassinosteroidów zidentyfikowanych w roślinach.



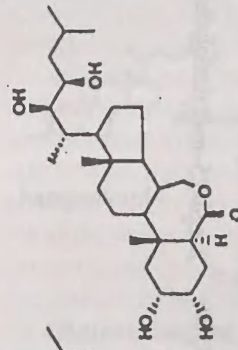
12. 24-Epibrassinolid



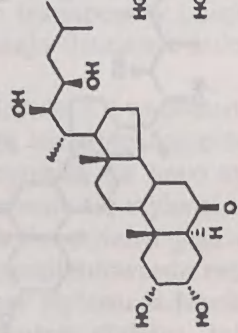
13. 24-Epikasteron



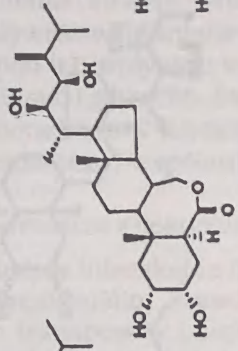
14. 3, 24-Diepikasteron



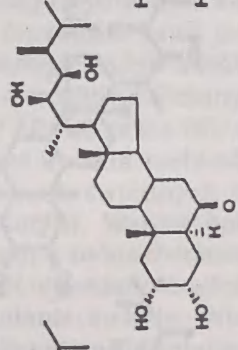
15. 28-Norbrassinolid



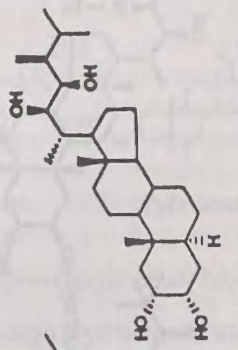
16. Brassinolid



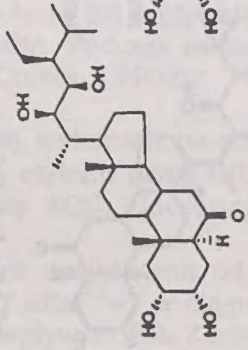
17. Dolicholid



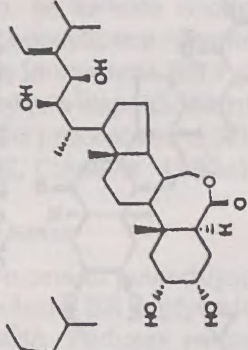
18. Dolichostron



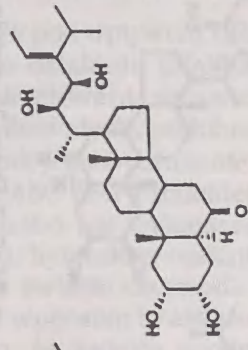
19. 6-Deoksodolicholid



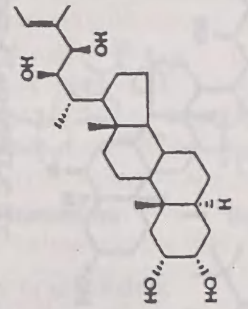
20. 24-Etylobrassinon



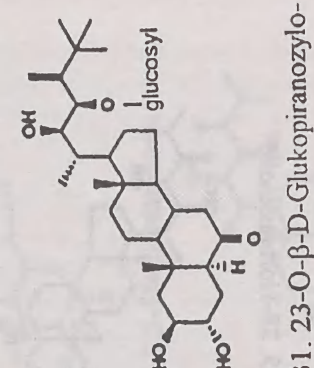
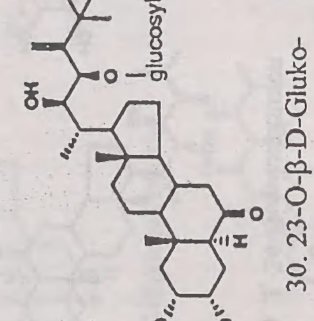
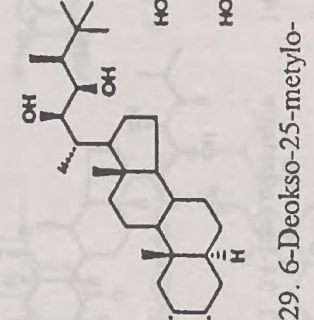
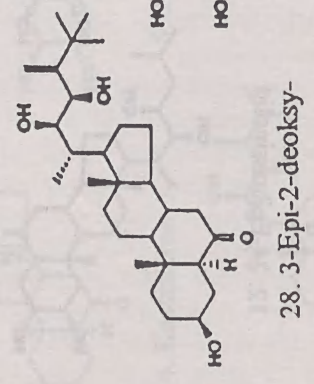
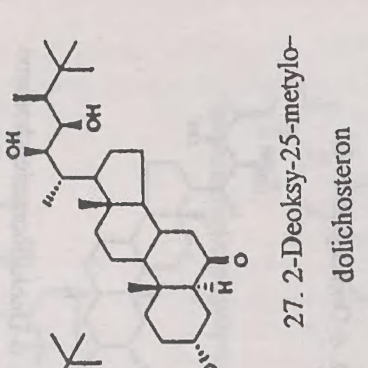
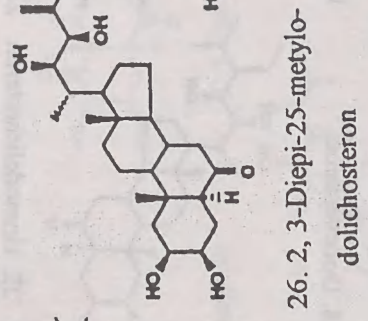
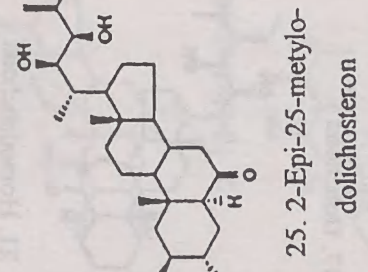
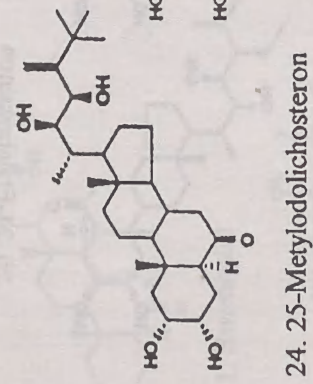
21. Homodolicholid



22. Homodolichostron

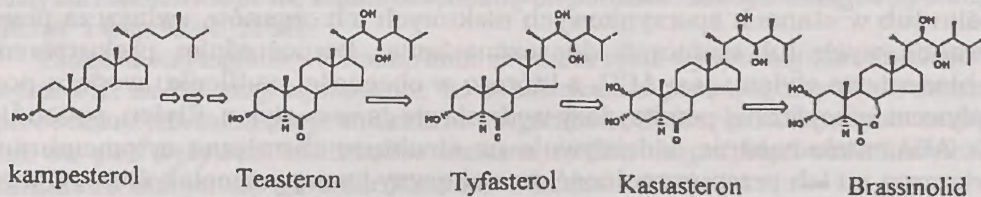


23. 6-Deoksohomodolichostron



Ryc. 2. Ciąg dalszy.

wzrostu elongacyjnego u większości tkanek roślinnych prawdopodobnie BR przyspieszają działanie auksyn.



Ryc. 3. Hipotetyczny szlak biosyntezy brassinolidu.

Okazało się, że stymulacja wydłużania się pędów pod wpływem BR występuje tylko na świetle, zaś w ciemności brak jest tego działania (MANDAVA 1988). KAMURO i INADA (1991) badając wpływ światła na inicjowanie wzrostu epikotyłu garbipiłata (*Vigna radiata* — roślina z rodziny motylkowatych, podobna do fasoli, pochodząca ze środkowej Afryki) przez BR, wykazali jego wydłużanie pod wpływem monochromatycznego światła niebieskiego (452 nm) i dalekiej czerwieni (722 nm). W tych warunkach świetlnych brassinolid nie wykazywał żadnego inicjowania wzrostu epikotyłu. Wzrost epikotyłu był także opóźniany przez światło białe (400–700 nm) i monochromatyczne światło czerwone (660 nm). Działanie inicjujące wzrost wykazano dopiero pod wpływem brassinolidu, który niwelował hamujące działanie światła. Wiadomo, że światło o odpowiednich długościach fal jest selektywnie wchłaniane przez specyficzne receptory komórkowe i prawdopodobnie pod ich wpływem wzrasta biosynteza BR i pozostałych fitohormonów, głównie auksyn i giberelin. Świadczy to o współdziałaniu systemu fotoreceptorowego z hormonalnym w kształtowaniu procesów wzrostu, rozwoju i metabolizmu roślin (KOPCEWICZ i współaut. 1992, CZERPAK 1993a).

INTERAKCJE Z HORMONAMI ROŚLINNYMI

BR wchodzą w odpowiednie interakcje z fitohormonami powodując wzajemne ich oddziaływanie na wzrost roślin. Prawdopodobnie BR wpływają także na metabolizm auksyn i ich transport w obrębie roślin. Podczas wzrostu tkanek roślinnych BR przyspieszają działanie auksyn (COHEN i MENDT 1983, SASSE 1990, 1991).

Z kolei inne badania (ARTECA i współaut. 1988), wykonane na etiolowanych siewkach fasoli, wskazują na stymulację syntezy etylenu przez BR. Efekt ten został potwierdzony biosyntezą *de novo* syntetazy ACC, kluczowego enzymu odpowiedzialnego za tworzenie się etylenu.

Indukcja BR w syntezie etylenu jest również uzależniona od obecności światła. Między innymi promieniowanie rzędu $3,7 \mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$ w ciągu 15 minut powoduje redukcję syntezy etylenu w fasoli pod wpływem BR. Zarówno wpływ indukcyjny IAA na biosyntezę etylenu, jak również synergistyczny wpływ BR i IAA odznaczają się niewielkim wzajemnym oddziaływaniem. Zmniejszenie wpływu indukcyjnego BR na syntezę etylenu poprzez ekspozycję roślin na świetle może być tłumaczone spadkiem endogennego poziomu IAA pod wpływem świat-

ła. W ten sposób jest redukowana aktywność metaboliczna BR w stymulacji poziomu etylenu u roślin (ARTECA i BACHMAN 1987, ARTECA i współaut. 1988).

Jak wiadomo etylen współdziała z ABA głównie w procesach starzenia się roślin lub w stanach spoczynkowych niektórych ich organów, zwłaszcza przetrwalnikowych lub służących do rozmnażania. Bezpośrednim prekursorem w biosyntezie etylenu jest ACC, z którego w obecności nadtlenku wodoru pod wpływem specyficznej peroksydazy wydziela się gazowy etylen. Etylen, podobnie jak ABA, niekorzystnie oddziałuje na strukturę chemiczną cytomembran, zwłaszcza na ich przepuszczalność oraz aktywny transport metabolitów. Z tego wynika, że biosyntezę etylenu indukują nie tylko auksyny, zwłaszcza IAA, ale również BR (COHEN i MENDT 1983).

Okazało się, że BR bardziej stymulują wydłużanie epikotylu grochu i hypokotyli fasoli aniżeli analogi chemiczne auksyn, na przykład 2,4-D, który bardziej zwiększa zawartość świeżej masy u badanych roślin w porównaniu do BR (YOPP i współaut. 1981). Ponadto elongacja hypokotyli ogórka, wywołana przez BR i GA₃, była mniej intensywna niż pod wpływem IAA. Stwierdzono także, że BR, podobnie jak GA₃, osłabiają akumulację betacyjaniny w nasionach szarłat (*Amaranthus* sp.) (MANDAVA i współaut. 1981). W przeciwieństwie do IAA, BR nie współdziałają synergistycznie z GA₃. Dotychczasowe badania wykazały, że BR są aktywniejsze w inicjacji wydłużania łodyg u roślin bardziej wrażliwych na IAA niż GA₃. Właściwości te kwalifikują BR do grupy specyficznych, o unikalnym charakterze, roślinnych substancji wzrostowych (MANDAVA i współaut. 1981, YOPP i współaut. 1981)

W etiolowanych hypokotylach dyni olbrzymiej (*Cucurbita maxima*) stwierdzono, że BR zwiększają poziom IAA, a zmniejszają ABA. Prawdopodobnie BR modulują endogenne poziomy auksyn albo poprzez regulację aktywności genów szlaku biosyntezy auksyn, bądź przez interferencję w katabolizmie IAA (KULAEVA i współaut. 1991).

BR wykazują prawdopodobnie także inhibicyjne działanie na procesy opadania liści i owoców, indukcję spoczynku pąków i nasion oraz starzenie się roślin (EUN i współaut. 1989).

MOLEKULARNY ASPEKT DZIAŁANIA BRASSINOSTEROIDÓW

BR oddziałują przede wszystkim na rośliny przystosowane do życia w różnorodnych, często ekstremalnych warunkach środowiska, a ich hamujący wpływ na niektóre procesy metaboliczne nie jest podstawowym działaniem tej grupy związków (RODDICK i IKEKAWA 1992). Na przykład stwierdzono, że pod wpływem niskiej temperatury (około 4 °C), rośliny potraktowane homobrassinolidem zwiększały swą masę korzeniową oraz zawartość w niej cukrów (EUN i współaut. 1989). Natomiast u roślin w warunkach wysokiej temperatury (40 °C) powodującej szok termiczny, BR stymulowały syntezę odpowiednich polipeptydów i białek o charakterze adaptacyjnym (SCHILLING i współaut. 1991).

Ponadto wykazano, że brassinolid stymuluje tworzenie się ksylemu, na przykład w komórkach bulwy topinambura (*Helianthus tuberosus*). W warunkach normalnych ksylem różnicuje się w ciągu 3–4 dni, zaś po dodaniu brassi-

nolidu w stężeniu $6,8 \times 10^{-9}$ M następuje pojawienie się ksylemu już po 24 godzinach. Przypuszcza się, że BR wpływają indukująco poprzez aparat genetyczny na różnicowanie się komórek roślinnych podczas rozwoju ontogenetycznego (ROTH i współaut. 1989).

Badania ksylogenezy w komórkach mezofilu cynii wytwornej (*Zinnia elegans*) wykazały, że BR przyczyniają się do różnicowania poszczególnych elementów przewodzących substancje mineralne i organiczne. Stężenie BR znacznie zmniejsza się pod wpływem inhibitorów wzrostu roślin, na przykład unikonazolu — inhibitora biosyntezy giberelin (CLOUSE i ZUREK 1991).

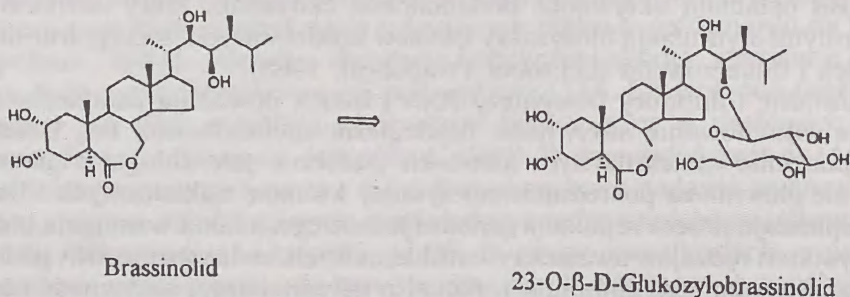
Prócz tego BR charakteryzują się antyekdysonową aktywnością u owadów, która cechuje się zahamowaniem właściwego działania steroidального hormonu linienia — ekdysonu oraz hormonu młodzieńczego — juwenilnego (JH). Jednocześnie BR osłabiają aktywność metaboliczną ekdysonu, który odznacza się między innymi stymulacją biosyntezy kwasów nukleinowych, szczególnie mRNA oraz białek i tłuszczowców (LEHMANN i współaut. 1988).

Różnorodne inhibitory biosyntezy RNA i białek powodują osłabienie bądź całkowite zahamowanie aktywności fizjologiczno-metabolicznej BR. Działanie BR na poziomie molekularnym komórki, podobnie jak auksyn i giberelin, odbywa się głównie za pośrednictwem syntezy kwasów nukleinowych i białek. BR przyspieszają proces replikacji genomu jądrowego, a także wzmagają biosyntezę wszystkich rodzajów kwasów rybonukleinowych, zwłaszcza mRNA powodując znaczny wzrost jego stabilności. Ponadto BR zwiększają aktywność niektórych enzymów, na przykład polimeraz RNA i DNA, ATPaz. Znaczny wzrost aktywności tych enzymów wskazuje na wpływ regulacyjny BR w ekspresji genów. Dotychczasowe badania w tym zakresie są skromne i wymagają w najbliższej przyszłości bardziej szczegółowych wyjaśnień (CERANA i współaut. 1983, KALINICH i współaut. 1986, IWASAKI i SCHIBAOKA 1991, CLOUSE i współaut. 1993, ZUREK i CLOUSE 1994, ZUREK i współaut. 1994).

METABOLIZM BRASSINOSTEROIDÓW

Obecnie jest poznanych u roślin ponad trzydzieści naturalnie występujących BR, włącznie z ich bezpośrednimi prekursorami bądź metabolitami. Ważną rzeczą jest ustalenie, które z nich są formami aktywnymi biologicznie, a które należą do pasywnych metabolitów. Przykładem ich przemian biochemicznych może być kastasteron (forma 6-ketonowa), który jest utleniany enzymatycznie do brassinolidu (forma 7-oksylaktonowa) (ryc. 3). Empirycznie wykazano, że brassinolid posiada wyższą aktywność metaboliczną aniżeli kastasteron (YOKOTA i współaut. 1991). Okazało się, że niektóre rośliny, na przykład ryż (*Oryza sativa*), nie potrafią przetwarzać kastasteronu w brassinolid. W przypadku ryżu brak konwersji kastasteronu w brassinolid wydaje się być wyjątkiem, gdyż oba BR są związkami endogennymi. Prawdopodobnie kastasteron ulega przemianom do nie poznanego dotąd rozpuszczalnego w wodzie metabolitu, który jest połączeniem glikozydowym. Chemiczna struktura i aktywność biologiczna metabolitów kastasteronu nie została dotychczas jednoznacznie określona. Brassinolid, w przeciwieństwie do kastasteronu, może przekształcać się w 23-O-β-D-glikozyd

(ryc. 4). Aktywność biologiczna formy glikozydowej jest podobna, lecz znacznie słabsza w stosunku do wolnego brassinolidu. Z badań nad zależnością między strukturą i aktywnością biologiczną BR wynika, że nawet niewielka modyfikacja chemiczna łańcucha bocznego powoduje drastyczny spadek ich aktywności metabolicznej. Dlatego też przypuszcza się, że 23-O- β -D-glikozylobrassinolid znacznie obniża swą aktywność biologiczną z powodu zajmującego wiele przestrzeni rodnika glukopiranozylowego w łańcuchu bocznym. Najprawdopodobniej glikozylacja 23-hydroksylu w BR jest głównym procesem biochemicznym ich dezaktywacji u roślin, co zostało wykazane na przykładzie fasoli. Potwierdzeniem tego jest występowanie form glikozydowych BR w nasionach fasoli, to jest dwóch izomerów 23-O-glikozydów (23-O- β -D-glukopiranozylo-25-metylodolichosteronu i jego epimeru) (ABE 1991).



Ryc. 4. Przemiana brassinolidu w 23-O- β -D-glikozyd.

Ogólnie wiadomo, że formy 6-ketonowe, takie jak kastasteron, brassinon czy 24-etylobrassinon wykazują największą aktywność biologiczną *per se*, przy czym nie zauważono istotnych różnic czasowych w działaniu pomiędzy tą formą a 7-oksylaktonową, czyli brassinolidem (SUZUKI i współaut. 1993).

PODSUMOWANIE

Od ponad 60 lat wiadomo o istnieniu i aktywności biologicznej steroidów u roślin, zwłaszcza z grupy hormonów płciowych. W następnych latach wykryto u roślin: kortykosteroidy, fitoekdysony i związki steroidopodobne, które wywierają, wspólnie z typowymi fitohormonami, istotny wpływ na kształtowanie wzrostu, rozwoju i metabolizmu roślin (CZERPAK 1993).

Brassinosteroidy, jako nowa i odrębna grupa steroidowych hormonów roślinnych, wykazują znaczną aktywność metaboliczną oraz interakcje z auksynami i etylenem. Wskazuje to na ich powiązanie z endogennymi systemami regulującymi wzrost, rozwój i metabolizm roślin.

Odkrycie BR u roślin i stwierdzenie ich aktywności biologicznej o charakterze hormonalnym będzie wymagało dalszych badań nad ich funkcją regulacyjną. Dotyczy to głównie ekspresji specyficznych genów za pośrednictwem BR, ich receptorów komórkowych oraz dokładne poznanie ich metabolizmu w powiązaniu z pozostałymi fitohormonami.

Prawdopodobnie, w niedalekiej przyszłości, poznamy dokładnie molekularne mechanizmy działania BR, tej specyficznej grupy steroidowych związków roślinnych, które także występują u zwierząt należących do stawonogów, na przykład, u owadów wykazują aktywność antyekdysonową.

THE OCCURRENCE AND BIOLOGICAL ACTIVITY OF BRASSINOSTEROIDS — A NEW TYPE OF PLANT HORMONES

Summary

For over 60 years it has been known that steroids especially from the sex hormones group exist and are biologically active in plants. The following years brought the discovery of the presence in plants of corticosteroids, phytoecdysones and steroid-like substances, which together with typical phytohormones, have a fundamental influence on plant growth, development and metabolism.

Brassinosteroids (BR), as a new and distinct group of plant steroid hormones, show considerable physiological-metabolic activity and interactions with auxins and ethylene. This is indicative of their connection with the endogenous systems regulating plant growth, development and metabolism.

Further research is required on the regulatory function of BR's in plant, especially the expression of specific genes through the intervention of BR, and their metabolism in relation to that of others phytohormones.

Probably, in the near future, we will come to know precisely the molecular mechanisms of action of BR's, this specific group of plants steroid which can also be found in animal organisms belonging to arthropods, for example: in the case of insects BR's show antiecdysteroid activity.

LITERATURA

- ABE H., 1991. *Rice-lamina inclination, endogenous levels in plant tissues and accumulation during pollen development of brassinosteroids*. [W:] *Brassinosteroids: Chemistry, Bioactivity and Applications*. Cutler H.G., YOKOTA T., Adam G. (red). ACS Symposium Series No. 474, American Chemical Society, Washington DC, 200-207.
- ABE H., MORISHITA T., UCHIYAMA M., MARUMO S., MUNAKATA K., TAKATSUTO S., IKEKAWA N., 1982. *Identification of brassinolide-like substances in Chinese cabbage*. *Agric. Biol. Chem.* 46, 2609-2611.
- ABE H., MORISHITA T., UCHIYAMA M., TAKATSUTO S., IKEKAWA N., 1984. *A new brassinolide-related steroid in the leaves of Thea sinensis*. *Agric. Biol. Chem.* 48, 2171-2172.
- ABE H., MORISHITA T., UCHIYAMA M., TAKATSUTO S., IKEKAWA N., IKEDA M., SASSA T., KITSUWA T., MARUMO S., 1983. *Occurrence of three new brassinosteroids: brassinone, (24S)-24-ethylbrassinone and 28-norbrassinolide, in higher plants*. *Experientia*, 39, 351-353.
- ARIMA M., YOKOTA T., TAKAHASHI N., 1984. *Identification and quantification of brassinolide-related steroids in the insect gall healthy tissues of the chestnut plant*. *Phytochemistry* 23, 1587-1591.
- ARTECA R. N., BACHMAN J. M., 1987. *Light inhibition of brassinosteroid-induced ethylene production*. *J. Plant Physiol.*, 129, 13-18.
- ARTECA R. N., BACHMAN J. M., MANDAVA N. B., 1988. *Effects of indole-3-acetic acid and brassinosteroid on ethylene biosynthesis in etiolated mung bean hypocotyl segments*. *J. Plant Physiol.*, 133, 430-435.
- ASAKAWA S., ABE H., KYOKAWA Y., NAKAMURA S., 1994. *Teasterone 3-miristate: a new type of brassinosteroid derivative in Lillium longiflorum anthers*. *Biosci. Biotech. Biochem.* 58, 219-220.
- BABA J., YOKOTA T., TAKAHASHI N., 1983. *Brassinolide-related new bioactive steroids from Dolichos lablab seed*. *Agric. Biol. chem.* 47, 659-661.
- CERANA R., BONETTI A., MARRE M. T., ROMANI G., LADO P., MARRE E., 1983. *Effects of brassinosteroid on growth and electrogenic proton extrusion in Azuki bean epicotyls*. *Physiol. Plant.* 59, 23-27.
- CHOI Y. H., INOUE T., FUJIOKA S., SAIMOTO H., SAKURAI A., 1993. *Identification of brassinosteroid-like active substances in plant-cell cultures*. *Biosci. Biotech. Biochem.* 57, 860-861.
- CLOUSE S. D., HALL A. F., LANGFORD M., McMORRIS T. C., BAKER M. E., 1993. *Physiological and molecular effects of brassinosteroids on Arabidopsis thaliana*. *Plant Growth Regul.* 12, 61-66.

- CLOUSE S. D., ZUREK D. M., 1991. *Molecular analysis of brassinolide action in plant growth and development*. [W:] *Brassinosteroids: Chemistry, Bioactivity and Applications*. CUTLER H.G., YOKOTA T., ADAM G. (red). ACS Symposium Series No. 474, American Chemical Society, Washington DC, 122-140.
- COHEN J. D., MENDT W. J., 1983. *Investigations on the mechanism of the brassinosteroid response. I. Indole-3-acetic acid — metabolism and transport*. *Plant Physiol.* 72, 691-694.
- CZERPAK R., 1993a. *Fotokontrola wzrostu, rozwoju i metabolizmu u glonów*. *Kosmos* 42, 599-612.
- CZERPAK R., 1993b. *Występowanie i aktywność biologiczna hormonów zwierzęcych i związków pokrewnych u roślin*. *Kosmos* 42, 613-636.
- EUN J. S., KURAIISHI S., SAKURAI N., 1989. *Changes in levels of auxin and abscisic acid and the evolution of ethylene in squash hypocotyls after treatment with brassinolide*. *Plant Cell Physiol.* 30, 807-810.
- GROVE M. D., SPENCER G. F., ROHWEDDER W. K., MANDAVA N. B., WORLEY J. F., WARTHEN Jr J. D., STEFFENS G. L., FLIPPEN-ANDERSON J. L., COOK Jr J. C., 1979. *Brassinolide, a plant growth-promoting steroid isolated from Brassica napus pollen*. *Nature* 281, 216-217.
- IKEDA M., TAKATSUTO S., SASSA T., IKEKAWA N., NUKINA M., 1983. *Identification of brassinolide and its analogues in chestnut gall tissue*. *Agric. Biol. Chem.* 47, 655-657.
- IKEKAWA N., NISHIYAMA F., FUJIMOTO Y., 1988. *Identification of 24-epibrassinolide in bee pollen of the broad bean, Vicia faba L.* *Chem. Pharm. Bull.* 36, 405-407.
- IKEKAWA N., TAKATSUTO S., KITSUWA T., SAITO H., MORISHITA T., ABE H., 1984. *Analysis of natural brassinosteroids by gas chromatography and gas chromatography-mass spectrometry*. *J. Chromatogr.* 290, 289-302.
- IWASAKI T., SHIBAOKA H., 1991. *Brassinosteroids act as regulators of tracheary element differentiation in isolated Zinnia mesophyll cell*. *Plant Cell Physiol.* 32, 1007-1014.
- KALINICH J. F., MANDAVA N. B., TODHUNTER J. A., 1986. *Relationship of nucleic acid metabolism to brassinolide-induced response in beans*. *J. Plant Physiol.* 125, 345-353.
- KAMURO Y., INADA K., 1991. *The effect of brassinolide on the light-induced growth inhibition in mung bean epicotyl*. *Plant Growth Regul.* 10, 37-43.
- KATSUMI M., 1991. *Physiological modes of brassinolide action in cucumber hypocotyl growth*. [W:] *Brassinosteroids: Chemistry, Bioactivity and Applications*. CUTLER H.G., YOKOTA T., ADAM G. (red). ACS Symposium Series No. 474, American Chemical Society, Washington DC, 246-254.
- KIM S. K., 1991. *Natural occurrences of brassinosteroids*. [W:] *Brassinosteroids: Chemistry, Bioactivity and applications*. CUTLER H. G., YOKOTA T., ADAM G. (red). ACS Symposium Series No. 474, American Chemical Society, Washington DC, 26-35.
- KIM S. K., ABE H., LITTLE C. H. A., PHARIS R. P., 1990. *Identification of two brassinosteroids from the cambial region Scots pine (Pinus silvestris) by gas chromatography-mass spectrometry, after detection using a dwarf rice lamina inclination bioassay*. *Plant Physiol.* 94, 1709-1713.
- KIM S. K., AKIHISA T., TAMURA T., MATSUMOTO T., YOKOTA T., TAKAHASHI N., 1988. *24-Methylene-methyl-cholesterol in Phaseolus vulgaris seed; Structural relation to brassinosteroids*. *Phytochemistry* 27, 629-631.
- KIM S. K., YOKOTA T., TAKAHASHI N., 1987. *25-Methyl-dolichosterone, a new brassinosteroid with a tertiary butyl group from immature seed of Phaseolus vulgaris*. *Agric. Biol. Chem.* 51, 2303-2305.
- KOPCEWICZ J., TRETYN A., CYMERSKI M., 1992. *Fitochrom i morfogeneza roślin*. PWN, Warszawa.
- KULAEVA O. N., BURKHANOVA E. A., FEDINA A. B., KHOKHLOVA V. A., BOKOBAYEVA G. A., VORBRÖDT H. M., ADAM G., 1991. *Effect of brassinosteroids on protein synthesis and plant-cell ultrastructure under stress conditions*. [W:] *Brassinosteroids: Chemistry, Bioactivity and Applications*. CUTLER H.G., YOKOTA T., ADAM G. (red.). ACS Symposium Series No. 474, American Chemical Society, Washington DC, 141-155.
- LEHMAN M., VORBRÖDT H. M., ADAM G., KOOLMAN J., 1988. *Anticdysteroid activity of brassinosteroids*. *Experientia* 44, 355-356.
- MANDAVA N. B., 1988. *Plant growth-promoting brassinosteroids*. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 39, 23-52.
- MANDAVA N. B., SASSE J. M., YOPP J. H., 1981. *Brassinolide, a growth-promoting steroidal lactone. II. Activity in selected gibberellin and cytokinin bioassays*. *Physiol. Plant.* 53, 453-461.
- MORISHITA T., ABE H., UCHIYAMA M., MARUMO S., TAKATSUTO S., IKEKAWA N., 1983. *Evidence for plant growth promoting brassinosteroids in leaves of Thea sinensis*. *Phytochemistry* 22, 1051-1053.

- PARK K. H., SAIMOTO H., NAKAGAWA S., SAKURAI A., YOKOTA T., TAKAHASHI N., SYONO K., 1989. Occurrence of brassinolide and castasterone in crown gall cell of *catharanthus rosues*. *Agric. Biol. Chem.* 53, 805-811.
- PLATTNER R. D., TAYLOR S. L., GROVE M. D., 1986. Detection of brassinolide and castasterone in *Alnus glutinosa* (European alder) pollen by mass spectrometry. *J. Nat. Prod.* 49, 540-545.
- RODDICK J. G., IKEKAWA N., 1992. Modification of root and shoot development in monocotyledon and dicotyledon seedlings by 24-epibrassinolide. *J. Plant Physiol.* 140, 70-74.
- ROTH P. S., BACH T. J., THOMPSON M. J., 1989. Brassinosteroids: Potent inhibitors of growth of transformed tobacco callus cultures. *Plant Science* 59, 63-70.
- SASSE J. M., 1990. Brassinolide-induced elongation and auxin. *Physiol. Plant.* 80, 401-408.
- SASSE J. M., 1991. The case for brassinosteroids as endogenous plant hormones. [W:] *Brassinosteroids: Chemistry, Bioactivity and Applications*. CUTLER H. G., YOKOTA T., ADAM G. (red). ACS Symposium Series No. 474, American Chemical Society, Washington DC, 158-166.
- SCHILLING G., SCHILLER C., OTTO S., 1991. Influence of brassinosteroids on organ relations and enzyme activities of sugar-beet plant. [W:] *Brassinosteroids: Chemistry, Bioactivity and Applications*. CUTLER H. G., YOKOTA T., ADAM G. (red). ACS Symposium Series No. 474, American Chemical Society, Washington DC, 208-219.
- SCHMIDT J., KNUDT C., ADAM G., 1994. Brassinosteroids and sterol from seeds of *Beta vulgaris*. *Phytochemistry* 36, 175-177.
- SCHMIDT J., SPENGLER B., YOKOTA T., ADAM G., 1993. The co-occurrence of 24-epi-castasterone and castasterone in seeds of *Ornithopus sativus*. *Phytochemistry* 32, 1614-1645.
- SCHMIDT J., YOKOTA T., ADAM G., TAKAHASHI N., 1991. Castasterone and brassinolide in *Raphanus sativus* seeds. *Phytochemistry* 30, 364-365.
- SCHNEIDER J. A., YOSHIHARA K., NAKANISHI K., KATO N., 1983. Typhasterol (2-deoxycastasterone): a new plant growth regulators from cat-tail pollen. *Tetrahedron Letters* 24, 3859-3860.
- SUZUKI H., KIM S. K., TAKAHASHI N., YOKOTA T., 1993. Metabolism of castasterone and brassinolide in mung bean explant. *Phytochemistry* 33, 1361-1367.
- SUZUKI H., Yamaguchi I., YOKOTA T., TAKAHASHI N., 1986. Identification of castasterone, typhasterol and castasterone from the pollen of *Zea mays*. *Agric. Biol. Chem.* 50, 3133-3138.
- TAKATSUTO S., ABE H., GAMOH K., 1990a. Evidence for brassinosteroids in strobilus of *Equisetum arvense* L. *Agric. Biol. Chem.* 54, 1057-1059.
- TAKATSUTO S., OMOTE K., GAMOH K., ISHIBASHI M., 1990b. Identification of brassinolide and castasterone in buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) pollen. *Agric. Biol. Chem.* 54, 757-762.
- TAKATSUTO S., YOKOTA T., OMOTE K., GAMOH K., TAKAHASHI N., 1989. Identification of brassinolide, castasterone and norcastasterone (brassinone) in sunflower (*Helianthus annuus* L.) pollen. *Agric. Biol. Chem.* 53, 2177-2180.
- TAYLOR P. E., SPUCK K., SMITH P. M., SASSE J. M., YOKOTA T., GRIFFITHS P. G., CAMERON D. W., 1993. Detection of brassinosteroids in pollen of *Lolium perenne* L. by immunocytochemistry. *Planta* 189, 91-100.
- YOKOTA T., ARIMA M., TAKAHASHI N., 1982. Castasterone, a new phytosterol with plant-hormone potency, from chestnut insect gall. *Tetrahedron Letters* 23, 1275-1278.
- YOKOTA T., ARIMA M., TAKAHASHI N., CROZIER A., 1985. Steroidal plant growth regulators, castasterone and typhasterol (2-deoxycastasterone) from the shoots of Sitka spruce (*Picea sitchensis*). *Phytochemistry* 24, 1333-1335.
- YOKOTA T., ARIMA M., TAKAHASHI N., TAKATSUTO S., IKEKAWA N., TAKEMATSU T., 1983. 2-Deoxycastasterone, a new brassinolide-related bioactive steroid from Pinus pollen. *Agric. Biol. Chem.* 47, 2419-2420.
- YOKOTA T., BABA J., Koba S., TAKAHASHI N., 1984. Purification and separation of eight steroidal plant-growth regulators from *Dolichos lablab* seed. *Agric. Biol. Chem.* 48, 2529-2534.
- YOKOTA T., KIM S. K., FUKUI Y., TAKAHASHI N., TAKEUCHI Y., TAKEMATSU T., 1987. Brassinosteroids and sterols from a green alga, *Hydrodictyon reticulatum*: configuration at C-24. *Phytochemistry* 26, 503-506.
- YOKOTA T., Koba S., KIM S.K., TAKATSUTO S., IKEKAWA N., SAKAKIBARA M., OKADA K., MORI K., TAKAHASHI N., 1987. Diverse structural variations of the brassinosteroids in *Phaseolus vulgaris* seed. *Agric. Biol. Chem.* 51, 1625-1631.
- YOKOTA T., OGINO Y., SUZUKI H., TAKAHASHI N., SAIMOTO H., FUJIOKA S., SAKURAI A., 1991. Metabolism and biosynthesis of brassinosteroids. [W:] *Brassinosteroids: Chemistry, Bioactivity and Applications*. CUTLER H. G., YOKOTA T., ADAM G. (red). ACS Symposium Series No. 474, American Chemical Society, Washington DC, 86-96.

- YOKOTA T., OGINO Y., TAKAHASHI N., SAIMOTO H., FUJIOKA S., SAKURAI A., 1990. *Brassinolide is biosynthesized from castasterone in Catharanthus roseus crown gall cells*. *Agric. Biol. Chem.* 54, 1107-1108.
- YOPP J.H., MANDAVA N. B., SASSE J. M., 1981. *Brassinolide, a growth-promoting steroidal lactone. I. Activity in selected auxin bioassays*. *Physiol. Plant.* 53, 445-452.
- ZUREK D. M., CLOUSE S. D., 1994. *Molecular cloning and characterization of brassinosteroid-regulated gene from elongating soybean (*Glycine max L.*) epicotyls*. *Plant Physiol.* 104, 161-170.
- ZUREK D. M., RAYLE D. L., McMORRIS T. C., CLOUSE S. D., 1994. *Investigation of gene expression, growth kinetics, and wall extensibility during brassinosteroid-regulated stem elongation*. *Plant Physiol.* 104, 505-513.

PIOTR KAMIŃSKI

*Instytut Biologii, filia UW w Białymstoku
Świerkowa 20B, 15-950 Białystok*

WPLYW ŚRODOWISKA MIEJSKIEGO NA ROZWÓJ PTAKÓW SYNANTROPIJNYCH (PRZEGLĄD BADAŃ)

WSTĘP

Oddziaływanie pierwiastków toksycznych wraz z innymi zanieczyszczeniami środowiska miejskiego na ptaki synantropijne prowadzi do zmian patofizjologicznych organów akumulujących: wątroby, nerek, serca, mózgu, płuc, kości oraz wpływa na pióra i na ogólną kondycję fizyczną (UNDERWOOD 1971). Równocześnie metale implikują wzrost śmiertelności piskląt i ptaków dorosłych oraz obniżają produktywność ich populacji (BELL i FREEMAN 1971, CAIN i PAFFORD 1981), powodują anemię (DIETER i FINLEY 1979) i nieprawidłowości neurobehawioralne (CARY-SLECHTA i współaut. 1983, BURGER i GOCHFELD 1985). Redystrybucja pierwiastków śladowych w organach rosnących ptaków jest uwarunkowana skutecznością mechanizmów homeostazy tych pierwiastków i ich wzajemnymi interakcjami. Ptaki synantropijne mogą służyć jako organizmy testowe przy określaniu zanieczyszczenia środowiska miejskiego (GILBERT 1991).

W celu zbadania potencjalnego ekotoksykologicznego znaczenia akumulowanych pierwiastków w ciałach piskląt, konieczne jest ustalenie ich rozmieszczenia w organach oraz zmian ich stężeń związanych z wiekiem rosnących ptaków. Koncentracja metali w organach jest zaś uwarunkowana procesami fizjologicznymi, jak: żerowanie (źródło pokarmu), wzrost (wiek), rozmnażanie, pierzenie. Szczególnie wzrost piskląt (wiek) jest przyczyną istotnych różnic w kumulacji pierwiastków. Stwierdzono, na przykład, że ołów, rtęć, kadm, cynk i miedź są akumulowane w określonych tkankach ptaków podczas ich wzrostu (HAARAKAN-GAS i współaut. 1974, OJANEN i współaut. 1975, HUTTON i GOODMAN 1980), co ma znaczenie w interpretacji bioakumulacji zanieczyszczeń.

Zmiany w środowisku spowodowane jego zanieczyszczeniem są skorelowane ze śmiertelnością piskląt i ptaków dorosłych, zmniejszeniem liczebności ptaków i ich chorobami (STICKEL 1975).

Zmiany w populacjach ptaków podczas ich rozwoju gniazdowego odgrywają istotną rolę w monitoringu pierwiastków toksycznych. Notowany spadek liczebności populacji ptaków i wzrost śmiertelności piskląt jest wynikiem zanieczyszczenia ich siedlisk metalami ciężkimi (RATCLIFFE 1967, FIMREITE 1979, PATTEE i HENNES 1983). Badania koncentracji metali toksycznych w organach ptaków

(HAARAKANGAS i współaut. 1974, OJANEN i współaut. 1975, OSBORN 1979) i związanej z nią wyższej śmiertelności piskląt wraz ze spadkiem rozrodczości wskazują na konieczność poznania etapów i mechanizmów dopływu zanieczyszczeń do ptaków już podczas ich rozwoju gniazdowego. Dlatego zbadano zmiany stężeń pierwiastków: Mg, Ca, Fe, Zn, Cu, Mn, Co, Cd, Pb należących do grup o specyficznym sposobie działania na młody organizm, w różnych organach piskląt mazurka (*Passer montanus*) gnieźdzących się w środowiskach miejskich o różnym stopniu skażenia (KAMIŃSKI 1995a). Badania te prowadzono w mieście średniej wielkości (w Białymstoku; 300 tys. mieszkańców). Badano zarówno środowiska mało skażone — na osiedlach o braku lub małym natężeniu ruchu samochodowego, jak i intensywnie skażone wzdłuż przelotowych arterii komunikacyjnych. Pierwsze z nich nazwano dalej nieskażonymi, drugie — skażonymi. Na obszarach tych przeanalizowano wzrost piskląt i niektóre parametry ich biologii lęgowej: sukces klucia, sukces lęgowy, śmiertelność (KAMIŃSKI 1995b). Zbadano różnice dopływu pierwiastków do młodych mazurków, czyli różnice stężeń pierwiastków w glebie, roślinach, bezkręgowcach i próbach pokarmowych piskląt (KAMIŃSKI 1995c). Zbadano też zależność wielkości zniesienia mazurka od stężenia pierwiastków u samic składających jaja (KAMIŃSKI 1995d). Mazurek jest dobrym obiektem badań ekotoksykologicznych, gdyż jest gatunkiem osiadłym, o stałej niszy ekologicznej, a w mieście zalicza się do dominantów awifauny. Dla człowieka jest ważny z powodu gnieźdzenia się w bezpośrednim jego sąsiedztwie, a jego arealy żerowania są ściśle związane z gospodarką ludzką (SUMMERS-SMITH 1989).

DYNAMIKA STĘŻEŃ PIERWIASTKÓW W ORGANACH PISKŁAŁ

Głównym czynnikiem warunkującym stężenie pierwiastków w organach piskląt na początku rozwoju gniazdowego jest koncentracja tych pierwiastków w pokarmie samic składających jaja, a także ich stężenie w jajach i w pokarmie piskląt wykłutych (KIENHOLZ i współaut. 1964, SAVAGE 1968, GARCIA i współaut. 1986, LEONZIO i MASSI 1989). Poszczególne metale charakteryzują się różnym stopniem przechodzenia od samic do jaj. Pierwiastki fizjologiczne (Fe, Ca, Mg, Zn, Cu) przechodzą tę drogę w dość szczegółowo określonych ilościach bez względu na to, w jakich stężeniach występują w środowisku (KIENHOLZ i współaut. 1964, SAVAGE 1968, GARCIA i współaut. 1986). Metale toksyczne zaś przechodzą od samic do jaj według innych mechanizmów. Stwierdzono, że stężenia kadmu i ołowiu są wielokrotnie niższe w jajach niż w pokarmie samic, które je znoszą. Jednak dłuższe pobieranie skażonego pokarmu przez samice powoduje wzrost stężenia toksycznych metali w jajach (LEONZIO i MASSI 1989). Innym czynnikiem warunkującym zmiany stężenia pierwiastków w organach rosnących piskląt jest nierównomierność rozwoju poszczególnych organów u różnych gatunków ptaków. U różnych gatunków tempo wzrostu masy ciała i rozwoju poszczególnych organów jest inne (KAUFMAN 1926, 1962, LILJA 1981, 1982a, b, 1983, ASNANI 1984), a wzrost piskląt zależy w dużej mierze od tempa rozwoju poszczególnych ich organów (LILJA 1983). U gniazdowników właściwych występuje późny rozwój mięśni piersiowych i piór oraz intensywny wczesny

rozwój organów trawiennych i wątroby. Wzrost ten nie jest równomierny podczas rozwoju gniazdowego (KAUFMAN 1926, LILJA 1981, 1982a, b, 1983, ASNANI 1984). U wróbla domowego, na przykład, średnia masa wątroby w dniu wyklucia wynosi 0,067 g i rośnie intensywnie do 11 dnia życia (0,642 g), a w 14 dniu osiąga 0,684 g (ASNANI 1984). Zatem w okresie pomiędzy pierwszym i 11 dniem życia masa wątroby wzrasta 10-krotnie, zaś od 11 dnia prawie się nie zmienia. W tym okresie więc sam rozwój wątroby nie ma już prawie żadnego znaczenia dla stężenia w niej pierwiastków (ASNANI 1984). Podobne tempo rozwoju wykazują u gniazdowników: przewód pokarmowy, trzustka, nerki, nadnercza i śledziona. Organy te wzrastają intensywnie w pierwszym okresie stanowiącym mniej więcej 3/4 rozwoju gniazdowego, potem ich wzrost ulega zahamowaniu, a nawet nieco tracą na masie. Jednocześnie w tym czasie odbywa się intensywny rozwój mięśni (KAUFMAN 1926, 1962, LILJA 1981, 1982a, b, 1983). Natomiast krzywe wzrostu masy ciała, serca, mózgu i oczu mają mniej więcej równomierny przebieg w ciągu całego okresu wzrostu piskląt (KAUFMAN 1926, 1962). W związku z tymi prawidłowościami zmiany stężeń pierwiastków w organach piskląt są zależne nie tylko od zawartości tych pierwiastków w ich pokarmie, ale też od tempa wzrostu masy poszczególnych organów i od zdolności utrzymania homeostazy pierwiastków.

Spośród makroelementów analizowano w organach piskląt mazurka stężenie Mg i Ca (KAMIŃSKI 1995a). Występują one w największych ilościach w szkieletcie, w którym jest gromadzone około 99% Ca i około 70% Mg występujących u ptaków (UNDERWOOD 1971, FILIPOWICZ i WIĘCKOWSKI 1986). U piskląt mazurka stężenie Ca i Mg w kościach wzrastało z wiekiem (KAMIŃSKI 1995a). Zjawisko to występuje u innych gatunków ptaków (BAUMAN 1968, BILBY i WIDDOWSON 1971, SIMKISS 1975, BIESZCZAD-KOSCH 1979, PINOWSKI i współaut. 1983). Wzrost ten jest związany ze stopniem rozwoju i kostnienia szkieletu (ŽEREBCOV i FILATOV 1959). U mazurków największy wzrost stężenia wapnia w kościach występował od 6–7 dnia rozwoju (KAMIŃSKI 1995a). Było to prawdopodobnie związane z tym, że w pierwszym tygodniu życia następuje głównie rozwój narządów wewnętrznych (przewodu pokarmowego, wątroby, serca), a rozwój szkieletu jest w tym czasie powolny (KAUFMAN 1962, KESKPAIK i DAVYDOV 1967, ŠURAKOV i SOKOLOVA 1975). W tym czasie stężenie Ca w sercu mazurków było najwyższe, po czym miało (KAMIŃSKI 1995a), w miarę gdy kostnienie szkieletu stawało się szybsze i niezbędne jony Ca były transportowane z serca przez krew do szkieletu (ŽEREBCOV i FILATOV 1959). Pisklęta wróbla domowego zwiększają dwukrotnie długość elementów układu szkieletowego podczas rozwoju gniazdowego. Jednak tempo wzrostu szkieletu nie jest jednakowe w tym czasie. Najwyższe tempo przyrostu długości elementów szkieletu występuje w pierwszych 3 dniach życia piskląt, podczas których osiągają niemal połowę długości końcowej (notowanej przed wylotem z gniazda). Od 4 do 8 dnia tempo przyrostu długości kości jest prawie o połowę niższe w stosunku do okresu wcześniejszego. W 8 dniu życia pisklęta osiągają więc 90% długości końcowej kości. W ostatnich 5 dniach pobytu w gnieździe tempo przyrostu długości kości jest wielokrotnie wolniejsze, w porównaniu z okresem wcześniejszym (INDYKIEWICZ 1993). Wzrost stężenia Ca w kościach piskląt mazurka (KAMIŃSKI 1995a) wiąże się więc z rozwojem szkieletu.

Stwierdzone znaczne różnice stężeń Mg i Ca u piskląt mazurków z miejskich terenów skażonych i nieskażonych mogły być spowodowane różnym stężeniem tych pierwiastków w pokarmie piskląt z tych obszarów (KAMIŃSKI 1995a, c). Można sądzić, że na terenie skażonym istnieją czynniki hamujące pobieranie w dostatecznej ilości magnezu i wapnia z pokarmu (KAMIŃSKI 1995c). Badania wykazały, na przykład, że ołów przy stosunkowo niskiej koncentracji zakłóca homeostazę wapniową i fizjologiczną rolę tego pierwiastka w kościach (ROSEN 1983). Ołów ma większe powinowactwo do białek wiążących wapń w kościach i w ten sposób może go wypierać z tych połączeń (FULLMER i współaut. 1985). Również kadm może ograniczać pobieranie wapnia i magnezu (KOBAYASHI 1973). Koncentracje Pb i Cd w kościach piskląt mazurków z miejskiego terenu skażonego były wysokie (KAMIŃSKI 1995a).

Wapń i magnez uczestniczą też w budowie piór, a ich wyższe stężenie powoduje lepszy rozwój upierzenia (UNDERWOOD 1971, OSBORN 1978, 1979, FILIPOWICZ i WIĘCKOWSKI 1986). Wyższe stężenie Mg i Ca w piórach piskląt mazurków z miejskiego terenu nieskażonego (KAMIŃSKI 1995a) można tłumaczyć intensywniejszym wzrostem i rozwojem piskląt (lepszy rozwój szkieletu) (KAMIŃSKI 1995b) i niższym stężeniem toksycznych metali (działających antagonistycznie) na tym terenie (KAMIŃSKI 1995c).

Stężenie magnezu w wątrobie i sercu piskląt mazurka było na początku rozwoju gniazdowego 2–3-krotnie niższe niż w jajach. Natomiast w kościach na początku rozwoju stężenie Mg było takie samo, jak w jajach lub nieco wyższe (KAMIŃSKI 1995d). Koncentracja wapnia w wątrobie i sercu piskląt mazurka na początku rozwoju była 2–3-krotnie niższa niż w jajach. W kościach zaś stężenie Ca było w tym czasie 5-krotnie wyższe, niż w jajach (KAMIŃSKI 1995d). Wynika stąd, że magnez i wapń, zdeponowane w jajach, są w znacznych ilościach gromadzone w kościach najmłodszych piskląt, a u piskląt starszych głównym źródłem ich dopływu do szkieletu jest pokarm.

Żelazo występuje u ptaków jako składnik mioglobiny i hemoglobiny (UNDERWOOD 1971). Stężenie Fe w sercu i wątrobie piskląt mazurków z miejskiego terenu skażonego i nieskażonego wzrastało z wiekiem było wyższe u piskląt z obszaru nieskażonego. Podobnie zmieniało się stężenie Fe w kościach i piórach (KAMIŃSKI 1995a). Świadczy to o lepszym rozwoju mazurków pochodzących z terenu nieskażonego (piskląta relatywnie większe) (KAMIŃSKI 1995b). Wzrost stężenia Fe u piskląt wraz z wiekiem można wiązać ze wzrostem w tym czasie zawartości hemoglobiny i hematokrytu (KOSTELECKA-MYRCHA i współaut. 1970). Wyższe stężenie żelaza u piskląt pochodzących z terenu nieskażonego, w porównaniu z mazurkami rozwijającymi się na obszarze skażonym, wiązało się prawdopodobnie z wyższym stężeniem toksycznych metali ciężkich na terenie skażonym (KAMIŃSKI 1995c). Ołów i kadm działają antagonistycznie na wchłanianie i przyswajanie żelaza i na jego aktywność metaboliczną, głównie w wyniku wypierania go z połączeń metaloproteinowych (FRIEDEN 1974).

Stężenie żelaza w wątrobie i sercu na początku rozwoju gniazdowego piskląt mazurka było 2–3-krotnie wyższe niż w jajach, natomiast stężenie żelaza w kościach było u jednodniowych piskląt podobne lub nieco niższe niż w jajach (KAMIŃSKI 1995a, d). Zatem żelazo zawarte w jajach jest oś kładane przez piskląta jednodniowe w ich wątrobie i sercu.

Pierwiastki śladowe są niezbędne w procesach wzrostu i rozwoju piskląt, jednak w nadmiernych ilościach mogą powodować zaburzenia metabolizmu (UNDERWOOD 1971). Te nadmierne ilości mogą być odkładane w postaci mało aktywnych związków w tkankach nie biorących dużego udziału w metabolizmie. Taki magazyn nadmiaru pierwiastków śladowych stanowią, między innymi, kości i pióra (POPOVA 1972). W piórach piskląt mazurków występował w dużych ilościach mangan (KAMIŃSKI 1995a). Stężenie miedzi, manganu i kobaltu różniło się w organach piskląt mazurka z terenów skażonych i nieskażonych (KAMIŃSKI 1995a). Było to prawdopodobnie spowodowane wyższym stężeniem tych pierwiastków w pokarmie piskląt żyjących na obszarze skażonym. Tereny żerowania mazurków w środowisku skażonym stanowiła roślinność na poboczach szosy i ogrody działkowe, gdzie stosuje się nawozy mineralne i środki ochrony roślin (KAMIŃSKI 1995c), które są źródłem pierwiastków śladowych (WILLIAMS i DAVID 1973, STENSTRÖM i VAHTER 1974).

Absorpcja tych pierwiastków i ich wiązanie w tkankach zależą też od ilości danego pierwiastka w pokarmie (ROTH i KIRCHGESSNER 1983), stężenia metali toksycznych (Pb, Cd) hamujących absorpcję pierwiastków śladowych (DAVIES i NIGHTINGALE 1975), źródła i ilości białka w pokarmie (ROTH i KIRCHGESSNER 1985).

W czasie pierzenia rośnie aktywność tarczycy, w wyniku czego wzrasta poziom miedzi we krwi (wzrost aktywności oksydazy cytochromowej), co pozwala na rozwinięcie procesu pierzenia. Równocześnie odbywają się procesy pigmentacji i keratynizacji, w których miedź jest niezbędna (KING i FARNER 1967, FRIEDEN 1968). Dlatego w związku z tymi procesami, zachodzącymi u rosnących piskląt, zanotowany stosunkowo wysoki poziom miedzi w ich wątrobach (KAMIŃSKI 1995a) jest fizjologicznie uzasadniony (UNDERWOOD 1971). Koncentracja miedzi w wątrobie i sercu piskląt mazurka na początku rozwoju gniazdowego była 2-krotnie wyższa niż w jajach, a w kościach była zbliżona do stężenia w jajach. Stężenie manganu w tkankach miękkich u piskląt mazurka na początku rozwoju gniazdowego było podobne do stężenia w jajach, a w kościach było ono zbliżone lub nieco wyższe. Koncentracja kobaltu w tkankach miękkich i kościach u piskląt mazurka na początku ich rozwoju kształtowała się w podobnych granicach, jak w jajach (KAMIŃSKI 1995d). Można sądzić, że pisklęta zaraz po wykluciu gromadzą miedź w wątrobie i sercu, zaś mangan i kobalt mogą gromadzić się w jajach poza zarodkiem lub mogą być wydalone przez pisklęta najmłodsze w ilościach większych niż wcześniej omawiane pierwiastki: Cu, Fe, Mg, Ca.

Zmiany stężeń cynku u piskląt mazurka z miejskich terenów skażonych i nieskażonych nie różniły się tak, jak w przypadku innych badanych pierwiastków śladowych. Stężenia Zn w wątrobie, sercu i kościach piskląt z obydwu terenów miejskich były podobne. Koncentracja cynku w wątrobie i sercu była dwukrotnie większa, niż w kościach i piórach (KAMIŃSKI 1995a). Było to związane z fizjologiczną funkcją cynku w metabolizmie białek i węglowodanów, gdyż wchodzi on w skład wielu metaloenzymów aktywnych w tych procesach (RIORDAN i VALLEE 1974). Dlatego cynk zaabsorbowany z przewodu pokarmowego jest wykorzystywany w pierwszej kolejności w aktywnych metabolicznie tkankach miękkich, w których jest niezbędny w procesach produkcji i aktywacji enzymów.

Dopiero jego nadmiar jest wiązany w kościach (STUART i współaut. 1986). Zgodnie z tym należałoby się spodziewać, że stężenie cynku w wątrobie i sercu piskląt najmłodszych (jednodniowych) nie powinno być wyższe niż w jajach, a w kościach tych piskląt stężenie Zn powinno być nawet nieco niższe niż w ich tkankach miękkich i w jajach. Rzeczywiście stężenie cynku w wątrobie i sercu badanych piskląt mazurka na początku rozwoju gniazdowego było podobne, jak w jajach, a w kościach było ono w tym czasie nieco niższe (KAMIŃSKI 1995d).

Wyniki badań wskazują, że koncentracja toksycznych metali ciężkich w ciałach piskląt stopniowo rosła podczas ich rozwoju i była w przybliżeniu dwukrotnie wyższa u piskląt z terenu skażonego w porównaniu do nieskażonego (KAMIŃSKI 1995a). Również w pokarmie piskląt z terenu skażonego stwierdzono znacznie wyższe stężenia Pb i Cd w stosunku do pokarmu z terenu nieskażonego. Było to prawdopodobnie związane z wyższym skażeniem powietrza i gleby tymi pierwiastkami na terenie skażonym (KAMIŃSKI 1995c). Powodem tego mogło być duże natężenie ruchu pojazdów mechanicznych na tym terenie oraz stosowanie nawozów rolniczych i pestycydów na terenach żerowania mazurków. Metale ciężkie są stale akumulowane przez pisklęta w miarę ich wzrostu, głównie w kościach i piórach (FRIEDEN 1974). Wówczas ich działanie toksyczne na organizm się nasila. Metale te (głównie Pb i Cd) wywołują zaburzenia wzrostu, zmniejszenie ilości hemoglobiny i wypierają pierwiastki biologicznie niezbędne z połączeń cząsteczkowych oraz oddziałują antagonistycznie na metabolizm tych pierwiastków (KOBAYASHI 1973, PETERING 1974, FULLMER i współaut. 1985). Procesy te spowodowały prawdopodobnie znaczne różnice w rozwoju mazurka z różnych terenów miejskich (KAMIŃSKI 1995b).

Stężenie kadmu w wątrobie, sercu i kościach piskląt mazurka na początku rozwoju gniazdowego było nieco wyższe niż w jajach. Natomiast stężenie ołowiu w tkankach miękkich na początku rozwoju piskląt było 2–3-krotnie niższe niż w jajach a w kościach — 2–3-krotnie wyższe (KAMIŃSKI 1995d). Można więc wnioskować, że pisklęta najmłodsze odkładają kadm w tkankach miękkich, jak i w kościach, a ołów kumulują w kościach.

Z powyższej dyskusji wynika, że tkanki miękkie oraz kości i pióra są organami, z pomocą których zachodzi regulacja homeostazy pierwiastków w ciałach piskląt już od początku ich wyklucia. Zmiany stężeń pierwiastków związane z wiekiem ptaków zależą od chemicznego skażenia środowiska. W organach piskląt, żyjących w środowisku skażonym, obserwuje się inne tempo zmian stężeń pierwiastków zależne od wieku piskląt, niż u piskląt ze środowiska mniej skażonego. Stężenie fizjologicznych pierwiastków wzrasta wolniej w organach piskląt żyjących w środowisku skażonym, niż w nieskażonym, przy czym wzrost stężeń jest normalnym zjawiskiem fizjologicznym. Stężenia pierwiastków tak zwanych нефизјоlogicznych w organach piskląt żyjących w środowisku skażonym mogą wykazywać większe tempo wzrostu w porównaniu ze stężeniami pierwiastków w organach piskląt ze środowiska nieskażonego, a czasem wzrost tych stężeń można obserwować wcześniej u piskląt z terenu skażonego (KAMIŃSKI 1995a). Na obszarze nieskażonym istnieją lepsze warunki rozwoju i reprodukcji mazurków. Wyniki badań wskazują, że poznanie etapów wzrostu organów piskląt jest konieczne dla zrozumienia procesów bioakumulacyjnych pierwiastków. Różnice stężeń pierwiastków w organach piskląt w róż-

nych środowiskach świadczą o istotnej roli poszczególnych metali u rosnących ptaków. Można wnioskować, że dynamika stężeń pierwiastków u piskląt zależy od ich zawartości w środowisku i od rozwoju poszczególnych organów. Pisklęta mazurek, jako gatunku osiadłego i stale żyjącego w najbliższym sąsiedztwie człowieka, mogą być wskaźnikiem informującym o stopniu skażenia środowiska (KAMIŃSKI 1995a).

WZROST, SUKCES KLUCIA, SUKCES LĘGOWY I ŚMIERTELNOŚĆ PISKŁĄT

Różnice we wzroście i rozwoju piskląt z terenów miejskich o różnym stopniu skażenia można tłumaczyć stężeniem toksycznych metali ciężkich w środowisku skażonym. Analizując krzywe wzrostu mazureków stwierdzono, że średnie masy ciała piskląt z obszarów nieskażonych w poszczególnych dniach rozwoju były wyższe w porównaniu z pisklętami z terenów skażonych (KAMIŃSKI 1995b). Wyższe były też wskaźniki tempa wzrostu piskląt z terenów nieskażonych. Przebieg krzywych wzrostu był związany z etapami rozwoju gniazdowego: przez pierwsze dni dominował rozwój narządów wewnętrznych, a dopiero później gwałtowny wzrost masy ciała (rozwój mięśni), zaś na 2–3 dni przed wylotem z gniazda nastąpiło zahamowanie tempa wzrostu, a nawet spadek masy ciała (KAUFMAN 1962, KESKPAIK i DAVYDOV 1967, ŠURAKOV i SOKOLOVA 1975). Takie okresy można obserwować analizując krzywe wzrostu piskląt z terenu nieskażonego. Natomiast u piskląt z terenu skażonego najintensywniejszy wzrost masy ciała rozpoczynał się dopiero od 6–7 dnia rozwoju i trwał aż do wylotu z gniazda. Nie występował więc u nich ostatni etap (KAMIŃSKI 1995b). Można przypuszczać, że pisklęta z obydwu terenów, mimo, że osiągały podobne masy ciała w czasie wylotu z gniazda, nie były równocenne pod względem fizjologicznym.

Niekorzystny wpływ toksycznych metali ciężkich na wzrost i reprodukcję piskląt gniazdowników stwierdzili także inni autorzy. GRUE i współpracownicy (1986) wykazali słabszy wzrost i rozwój piskląt szpaka (*Sturnus vulgaris*) w miejskim środowisku skażonym o dużym ruchu samochodowym od piskląt z obszaru kontrolnego. Stwierdzili też wolniejsze tempo wzrostu wskaźników krwi (hemoglobiny, haematokrytu, kwasu delta-amino-lewulinowego) i mniejszą ich zawartość u młodych szpaków z terenu skażonego. Podobne wyniki uzyskali GRUE i współpracownicy (1984) badając pisklęta jaskółek dymówek (*Hirundo rustica*) gnieźdzące się wzdłuż szosy o dużym ruchu samochodowym i pisklęta z terenów wiejskich.

Badania NYHOLMA (1990, 1993) wykazały natomiast nieprawidłowy wzrost skorupki jaj, wyższą śmiertelność zarodków i piskląt, powiększenie wątroby, zmniejszenie rozmiarów masy mięśni i mózgu (słabszy ich rozwój), redukcję poziomu hemoglobiny i odwapnienie szkieletu u piskląt muchołówki żalobnej (*Ficedula hypoleuca*) gnieźdzących się na terenie skażonym metalami ciężkimi w pobliżu źródła zanieczyszczeń przemysłowych. U piskląt mazurek (*Passer montanus*) i wróbla domowego (*P. domesticus*) stwierdzono zaś niekorzystny wpływ kadmu i ołowiu na wzrost i rozwój: opóźniony rozwój fizyczny, zredukowany przyrost masy ciała, choroby i zgony piskląt (ROMANOWSKI i współaut. 1991). Autorzy ci zanotowali nawet wolniejsze tempo wzrostu od 9 dnia u piskląt

z wyższą koncentracją żelaza (ponad 2000 ppm sm) (1 ppm oznacza jedną milionową z liczby cząsteczek) lub cynku (ponad 120 ppm sm) w wątrobie.

Badania biologii lęgowej mazurka w różnych środowiskach miejskich (KAMIŃSKI 1995b) wykazały, że pisklęta z terenów nieskażonych osiągały maksymalną masę ciała około 11 dnia życia, a przyrost biomasy był u nich intensywniejszy w porównaniu do piskląt z terenów skażonych, które osiągały maksymalną masę tuż przed wylotem z gniazda i rosły wolniej, a przyrost masy postępował aż do wylotu z gniazda. Populacja mazurków z terenów nieskażonych charakteryzowała się wyższym sukcesem klucia i lęgowym w porównaniu z mazurkami z terenów skażonych. Zarówno u mazurków żyjących na terenach skażonych, jak i nieskażonych wykazano istotną, odwrotnie proporcjonalną zależność sukcesu klucia i sukcesu lęgowego od wielkości zniesienia (KAMIŃSKI 1995b).

WPLYW ŚRODOWISKA MIEJSKIEGO NA WIELKOŚĆ ZNIESIENIA

Liczba samic biorących udział w rozrodzie jest głównym czynnikiem określającym produkcję populacji (PINOWSKA 1979). Liczba ta jest uwarunkowana kondycją tych samic, a szczególnie ich gospodarką tłuszczową. Wzrost otluszczenia samic powoduje wzrost produkcji populacji przez zwiększenie liczby rozmnażających się samic, większą liczbę lęgów odbywanych przez samicę i wyższą wielkość zniesienia. Natomiast samice nie biorące udziału w rozrodzie mają niższą zawartość tłuszczu i składników suchej masy beztłuszczowej w porównaniu z samicami składającymi jaja. W sezonie lęgowym, w czasie którego stwierdzono wyższe otluszczenie samic, jest też wyższa liczba zajętych gniazd (PINOWSKA 1979). Ponadto główne czynniki warunkujące podstawowe parametry rozrodczości, to jest wielkość zniesienia, liczba lęgów odbywanych przez samicę w sezonie, liczba samic biorących udział w lęgach, zależą przede wszystkim od zasobów energetycznych i budulcowych samic przystępujących do składania jaj, wśród których wymienia się zawartość wody, białka, tłuszczu i składników suchej masy beztłuszczowej (JONES i WARD 1976, PINOWSKA 1976, 1979). Autorzy ci wskazują na związek produkcji populacji wróbla z warunkami troficzno-siedliskowymi. Wysokość produkcji populacji wróbla jest więc wyrazem tych warunków. PINOWSKA (1979) podaje, że wielkość zniesienia wróbla domowych jest określona zapasem tłuszczu, a liczba lęgów odbywanych przez samicę w sezonie lęgowym jest determinowana zasobami suchej masy beztłuszczowej i poziomem odtwarzanych zapasów tłuszczowych. Ponadto różnicowanie wielkości lęgu i różnicowanie terminów pierwszych lęgów jest w 40% zdeterminowane genetycznie (VAN NOORDWIJK i współaut. 1981a, b, c), a różnicowanie w rozmiarach jaj — aż w 60%–80% (OJANEN i współaut. 1979, VAN NOORDWIJK i współaut. 1980). Wielkość lęgu ptaków jest też determinowana czynnikami atmosferycznymi (HAARTMAN 1967). Nie wiadomo jednak, czy zdolność rozrodcza samic, a więc wielkość zniesienia i liczba lęgów, zależy od stężenia określonych pierwiastków w środowisku. Dlatego zbadano, czy wielkość zniesienia mazurka (tj. liczba jaj w zniesieniu), a więc także produkcja populacji, jest zależna od stężenia pierwiastków w ciele samic składających jaja (bezpośrednio po złożeniu jaj); czy stężenie to zmienia się w kolejnych lęgach i jeżeli tak — czy ma to wpływ

na wielkość zniesień w tych lęgach; czy stężenie pierwiastków w jajach zależy od ich stężenia w ciele samic, które je składają oraz czy stężenia pierwiastków w jajach i wielkości zniesienia są skorelowane (KAMIŃSKI 1995d). W wyniku przeprowadzonych badań nad wpływem środowisk miejskich na wielkość zniesienia mazurka stwierdzono, że:

1. Wielkość zniesienia zależy od poziomu stężenia pierwiastków w ciele samic. Pierwiastki o ważnym znaczeniu fizjologicznym: Fe, Mg, Ca, Zn wykazywały istotny wzrost stężenia w ciele samic w miarę wzrostu wielkości zniesienia w środowisku skażonym i nieskażonym. Stężenie tych pierwiastków u samic z terenów nieskażonych było wyższe. Wyższe ich stężenia notowano u tych samic, u których stężenie Pb i Cd było niskie.

2. Nie stwierdzono korelacji pomiędzy wielkością zniesienia na terenie nieskażonym, a stężeniem Fe, Mg, Ca, Zn i Cu w jajach. Brak też zależności pomiędzy stężeniem tych pierwiastków w ciele samic i w jajach. Pierwiastki te były więc prawdopodobnie akumulowane w jajach na określonym poziomie, niezależnie od tego, jakie było ich stężenie u samic.

3. Wielkość zniesienia wzrastała w miarę obniżania stężeń Cu, Mn, Cd i Pb u samic. Na terenie skażonym stężenie tych metali było istotnie wyższe, niż na nieskażonym. Na obydwu terenach stwierdzono zmniejszanie się wielkości zniesienia w miarę wzrostu stężenia Cu, Mn, Cd i Pb u samic. Również na obydwu terenach wielkość zniesienia malała wraz ze wzrostem stężenia Cd i Pb w jajach, zatem pierwiastki te wpływają ograniczająco na wielkość zniesienia.

4. Wielkość zniesienia nie zależała od stężenia kobaltu u samic. Pomędzy samicami i jajami nie stwierdzono istotnych korelacji w stężeniach tego pierwiastka. Nie stwierdzono korelacji pomiędzy wielkością zniesienia, a stężeniem Co w jajach, ale tylko na terenie skażonym.

5. Na terenie nieskażonym przeważały zniesienia 6-, 5- i 4-jajowe, a na obszarze skażonym — 3- i 4-jajowe. Można przypuszczać, że było to związane z tym, że w ciele samic żyjących na terenie nieskażonym było wyższe stężenie pierwiastków fizjologicznych: Fe, Mg, Ca, Zn sprzyjające składaniu zniesień o większej liczbie jaj i niższe stężenie pierwiastków, których wyższe stężenie u samic wiązało się ze składaniem przez nie mniejszej liczby jaj w zniesieniu (Cd, Pb, Mn, Cu). Ponieważ wykazano korelację pomiędzy wielkością zniesienia, a stężeniem tych pierwiastków u samic i stężeniem niektórych z nich (Pb, Cd) w jajach, a stężenie tych pierwiastków w jajach było przeważnie niezależne od ich stężenia u samic, a także biorąc pod uwagę interakcje antagonistyczne Cd i Pb z pierwiastkami fizjologicznymi, można wnioskować, że o wielkości zniesienia decyduje nie tylko stężenie u samic pierwiastków o ważnym znaczeniu podczas produkcji jaj (Mg, Ca, Fe, Zn), ale także stężenie toksycznych metali ciężkich (Pb, Cd) w jajach (tj. już podczas ich rozwoju u samic), które zależy od ich stężenia w środowisku.

W literaturze znaleziono niewiele prac zajmujących się wpływem pierwiastków na zdolność rozrodczą samic ptaków synantropijnych. Wiadomo, że magnez odgrywa istotną rolę u samic wróbla w czasie poprzedzającym owulację i w okresie formowania się jaja. PINOWSKA i KRAŚNICKI (1985a) stwierdzili, że zawartość absolutna i stężenie Mg w ciele samic wróbla domowego wzrasta przed owulacją, po czym maleje w kolejnych dniach. Ten początkowy wzrost jest

związany ze spadkiem koncentracji magnezu po okresie składania jaj. Równocześnie stwierdzono niższe stężenie Mg w ciele samic nie przystępujących do rozrodu w tym samym czasie. Natomiast nie znaleziono różnic w stężeniach tego pierwiastka w ciele pomiędzy samicami wysiadującymi, a karmiącymi młode. W okresie poprzedzającym składanie jaj samice pobierają więcej magnezu i wapnia, gdyż pierwiastki te potrzebne są do produkcji jaj (KOPISCHKE 1966, PINOWSKA i KRAŚNICKI 1985b). Ilość Mg w ciele samic wróble domowych rozpoczynających składanie jaj jest różna zależnie od wielkości zniesienia i w czasie kolejnych owulacji maleje. Im niższa koncentracja magnezu w ciele samic, tym mniejsza liczba jaj w zniesieniu (PINOWSKA i KRAŚNICKI 1985b). Taką zależność zanotowano także u samic mazurków (KAMIŃSKI 1995d). PINOWSKA i KRAŚNICKI (1985b) badali również zmiany stężenia wapnia u wróble domowych w okresie składania jaj. Stwierdzili, że stężenie Ca w ciele samic jest stałe do czasu złożenia pierwszego jaja. Po drugiej owulacji następuje obniżenie, a po trzeciej — ponowny wzrost zawartości wapnia. Zmiany stężenia Ca dotyczą głównie samic składających duże zniesienia. Liczba jaj, które może złożyć samica (co jest określone w pierwszych dniach owulacji) (PINOWSKA 1979), nie zależy od koncentracji wapnia (PINOWSKA i KRAŚNICKI 1985a), chociaż BIAŁECKA (1979) stwierdziła wyższe stężenie Ca w ciele samic sikory bogatki podczas składania jaj w porównaniu z innymi okresami sezonu lęgowego. PINOWSKA i KRAŚNICKI (1985a) podają też, że istnieją duże różnice indywidualne w koncentracji wapnia u wróble domowych.

Podobnie jak u mazurków badanych przez KAMIŃSKIEGO (1995d), wyższą zdolność rozrodczą u samic w miarę wzrostu stężenia wapnia w ciele stwierdziła HANNON (1979) u amerykańskiego kuraka borowca złotobrewego (*Dendragapus obscurus fuliginosus*). W ciele samic mazurków stężenie Fe, Mg, Ca i Zn było wyższe w środowisku nieskażonym, niż w skażonym (KAMIŃSKI 1995d). Było to prawdopodobnie związane z tym, że na terenie skażonym istnieją czynniki zmniejszające i hamujące przyswajanie tych pierwiastków z pokarmu. Czynnikiem tym mogło być wysokie stężenie Pb i Cd na obszarze skażonym (KAMIŃSKI 1995c). Wiadomo zaś, że wróble w okresie składania jaj oraz wiosną, jesienią i zimą pobierają pokarm z powierzchni gleby. Jest to głównie pokarm roślinny i odpadki pochodzenia antropogenicznego (PINOWSKA 1975, NOSKOV i współaut. 1981). W tym długim okresie czasu samice pobierają więc pokarm, w którym kumulują się toksyczne metale ciężkie, pochodzące ze spalin samochodowych, deszczu, dymów i pyłów przemysłowych, szczególnie na terenach skażonych. W okresie składania jaj większy udział w diecie samic mają dopiero owady i ziarna piasku (PINOWSKA 1975), które na terenie skażonym, badanym przez KAMIŃSKIEGO (1995c), były także silnie skażone ołowiem i kadm. Można więc przypuszczać, że ołów i kadm, których stężenie w ciele samic mazurków w miejskim terenie skażonym było znacznie wyższe niż samic z terenu nieskażonego (KAMIŃSKI 1995d), pochodzą z roślin i bezkręgowców również znacznie skażonych na tym terenie (KAMIŃSKI 1995c) i kumulują się u samic daleko wcześniej niż w czasie składania jaj, a dopiero wtedy zostają uruchomione. Badania wykazały, że ołów i kadm, nawet przy stosunkowo niskiej koncentracji, zakłócają homeostazę wapniową i magnezową oraz fizjologiczną rolę tych pierwiastków w organizmie (ROSEN 1983). Pierwiastki te mają większe powinowactwo do białek wiążących wapń i magnez i mogą je wypierać z tych połączeń (KOBAYASHI

1973, FULLMER i współaut. 1985). Kadm i ołów działają też antagonistycznie na wchłanianie i przyswajanie żelaza i jego aktywność metaboliczną, głównie w wyniku wypierania go z połączeń metaloproteinowych (FRIEDEN 1974). Na terenie skażonym badanym przez KAMIŃSKIEGO (1995d) stężenie Fe, Mg, Ca i Zn w glebie i roślinach było wyższe niż na obszarze nieskażonym, a mimo to stężenia tych metali w ciele samic z terenów nieskażonych były wyższe. Wysokie stężenia Fe, Mg i Ca notowano w ciele tych samic, u których jednocześnie stężenie Pb i Cd było niskie (KAMIŃSKI 1995d). Także w organach piskląt stężenie Fe, Mg i Ca było wyższe na terenie nieskażonym (KAMIŃSKI 1995a).

Stężenie Mg i Ca u samic mazurków pochodzących z miejskiego terenu skażonego było podobne, jak u samic wróbli domowych (PINOWSKA i KRAŚNICKI 1985a), a w miejskich obszarach skażonych badanym przez KAMIŃSKIEGO (1995d) było wyższe. U samic wróbli domowych (PINOWSKA i KRAŚNICKI 1985a), podobnie jak u samic mazurków, stężenie Mg malało podczas kolejnych lęgów, lecz nie zachodziły u nich zmiany stężenia Ca podczas sezonu rozrodczego, w przeciwieństwie do mazurków (KAMIŃSKI 1995d).

Wielkość zniesienia mazurka nie zależała od stężenia Fe, Mg, Ca i Zn w jajach w środowisku nieskażonym (KAMIŃSKI 1995d). Może to świadczyć, że pierwiastki te są akumulowane w jajach na określonym poziomie, prawdopodobnie wymaganym fizjologicznie, niezależnie od tego, jaki jest ich poziom w ciele samic, co byłoby zgodne z wynikami wcześniejszych badań (KIENHOLZ i współaut. 1964, GARCIA i współaut. 1986). Stężenia Cu, Mn, Cd i Pb zmniejszały się w ciele samic mazurków badanym przez KAMIŃSKIEGO (1995d) w miarę wzrostu wielkości zniesienia. Może to świadczyć, że samice, u których stężenie tych pierwiastków jest niższe, są w stanie złożyć więcej jaj w lęgu, bądź też, że składanie jaj wyczerpuje rezerwy tych pierwiastków w organizmie samicy. Poziom tych metali w ciele samic z terenu skażonego był przy tym istotnie wyższy, niż z nieskażonego (KAMIŃSKI 1995d). Stężenie tych pierwiastków było też wyższe w glebie, roślinach i bezkręgowcach na terenie skażonym w porównaniu do nieskażonego (KAMIŃSKI 1995c). U samic wróbli domowych, badanym przez PINOWSKĄ i KRAŚNICKIEGO (1985a), stężenie Cu było najwyższe przed owulacją i zmniejszało się podczas kolejnych dni cyklu rozrodczego. Było ono też niższe u samic wysiadujących, niż składających jaja. Natomiast liczba jaj, które mogła złożyć samica, nie zależała od stężenia Cu w jej ciele (PINOWSKA i KRAŚNICKI 1985a). Autorzy ci podają, że miedź gromadzona przez samice wróbli w okresie poprzedzającym składanie jaj jest potem zużywana w procesach związanych z aktywnością jajowodów. Stężenie Cu w ciele samic mazurków z terenu nieskażonego (KAMIŃSKI 1995d) było podobne, jak u samic wróbli (PINOWSKA i KRAŚNICKI 1985a), a w ciele samic mazurków z terenu skażonego było wyższe.

Stężenia kadmu i ołowiu u samic mazurków badanym przez KAMIŃSKIEGO (1995d) były stosunkowo wysokie, szczególnie u tych, które składały 1–3 jaja w zniesieniu. Część autorów również podaje, że ptaki miejskie mogą akumulować duże ilości tych metali. Na przykład badania HUTTONA i GOODMANA (1980) wykazały, że gołębie miejskie (*Columba livia*), gnieźdzące się na terenie Londynu gromadzą kadm w ilości 20 ppm sm, na terenach pozamiejskich (18 km od Londynu) — 5 ppm sm, a w dzielnicach podmiejskich — tylko 0,7 ppm sm. Stężenia ołowiu u tych ptaków były również wysokie i wynosiły u gołębi miejskich

przeciętnie 300 ppm sm, u gołębi z dzielnic podmiejskich — 105 ppm sm, a z terenów pozamiejskich — 50 ppm sm (HUTTON i GOODMAN 1980). Inni autorzy także podają wysokie wartości stężeń stężeń Cd i Pb u ptaków miejskich i zwracają uwagę na duży zakres zmienności (BOGGES i WIXON 1977, GETZ i współaut. 1977, DMOWSKI i KAROLEWSKI 1979, TATARUCH i LIDAUER 1984, DEMENT i współaut. 1987).

Wielkość zniesienia mazurka w miejskich terenach skażonych i nieskażonych zależała od stężenia Cu, Mn, Cd i Pb w ciele samic. Stwierdzono istotne korelacje wielkości zniesienia ze stężeniem Pb i Cd w jajach (KAMIŃSKI 1995d). Można wnioskować, że pierwiastki te nie odkładają się w jajach na określonym poziomie, tak jak Fe, Mg, Ca, Zn lecz ich stężenie w jajach zależy głównie od ich koncentracji w środowisku i w ciele samicy. Byłoby to zgodne z wynikami badań LEONZIO i MASSI (1989), którzy stwierdzili, że przy dłuższym pobieraniu przez samicę pokarmu skażonego kadmem i ołowiem, ich stężenie w jajach wzrasta. Na podstawie tych wyników można przypuszczać, że o wielkości zniesienia decyduje określony poziom stężeń toksycznych metali ciężkich w ciele samic, oraz że wielkość zniesienia jest zależna od stężenia tych metali w środowisku. BURGER i GOCHFELD (1993) wykazali, że koncentracja Cd i Pb w jajach ptaków jest związana z akumulacją tych pierwiastków w pokarmie, który zdobywają samice. Następnie metale te są gromadzone w piórach piskląt i ich stężenie jest tam jeszcze wyższe niż w jajach. Wyniki badań BURGER i GOCHFELDA (1988) wykazały też, że stężenia metali ciężkich w jajach ptaków zależą nie tylko od ich koncentracji w środowisku i ciele samic, ale w dużej mierze od interakcji wzajemnych i z innymi metalami. Znacznie niższe stężenia Cd (4 ppb sm) (1 ppb oznacza jedną bilionową z liczby czasteczek) i Pb (89 ppb sm) w jajach w stosunku do poziomów w piórach dorosłych rodziców (odpowiednio 50 i 500 ppb sm) stwierdzili BURGER i GOCHFELD (1991) u rybitwy zwyczajnej (*Sterna hirundo*), podobnie jak u mazurków badanych przez KAMIŃSKIEGO (1995d). Wykazali oni, że stężenia Cd w jajach i u samic tych ptaków nie są skorelowane, w przeciwieństwie do ołowiu.

Jedynym z mikroelementów, którego stężenie nie zależało u samic mazurków od zniesień różnej wielkości, był kobalt. Można przypuszczać, że wielkość zniesienia mazurka nie zależy od stężenia Co u samic (KAMIŃSKI 1995d). Stężenie Co w ciele samic mazurków było niższe, niż u samic wróbla domowych badanych przez PINOWSKIEGO i współpracowników (1981) w Rybnickim Okręgu Węglowym (0,9–3,6 ppm sm, średnio 1,9 ppm sm). W miejskim terenie skażonym nie zanotowano korelacji pomiędzy wielkością zniesienia, a stężeniem Co w jajach (KAMIŃSKI 1995d). Na obszarze nieskażonym zaś korelacja ta była istotna. Wydaje się, że przyczyną tych różnic mogła być różna biodostępność kobaltu, w szczególności sposób uwarunkowana metabolicznie i przez interakcje z innymi pierwiastkami, takimi jak: Ca, Mg, K, Cr, Se (UNDERWOOD 1975, SCHRAUZER 1991).

Z przeprowadzonych badań wynika, że stężenia pierwiastków w ciele samic mogą decydować o liczbie składanych przez nie jaj. Większe zniesienia wiążą się z wyższymi stężeniami u samic żelaza, magnezu, wapnia i cynku oraz niższymi stężeniami miedzi, manganu, kobaltu, kadmu i ołowiu. Małe zniesienia mazurków mogą świadczyć o zbyt niskich stężeniach żelaza, magnezu, wapnia i cynku lub zbyt wysokich stężeniach pozostałych pierwiastków, co może świadczyć

o skażeniu środowiska. Stężenia tych pierwiastków w jajach zależą od liczby jaj w zniesieniu, podobnie jak ich stężenia u samic, chociaż zależność ta nie musi być wprost proporcjonalna (KAMIŃSKI 1995d).

Niewiele jest danych porównawczych dotyczących oddziaływania środowisk miejskich na kształtowanie się procesów populacyjnych i fizjologicznych u ptaków synantropijnych. Mało jest też badań na temat wpływu czynników środowiskowych na choroby. Nie jest znany też mechanizm oddziaływania pierwiastków, które wpływają na zdolność rozrodczą samic poprzez zmiany w strukturze i funkcjonowaniu ich organów rozrodczych. Dlatego kolejne etapy wymagają zbadania przyczyn tych zmian.

PODSUMOWANIE

Pierwiastki charakteryzują się różnym stopniem przenikania z ciał samic do jaj. Pierwiastki fizjologiczne: Fe, Ca, Mg, Zn, Cu przemieszczają się tą drogą w dość szczegółowo określonych ilościach, bez względu na to, w jakich stężeniach występują w środowisku (KIENHOLZ i współaut. 1964, SAVAGE 1968, GARCIA i współaut. 1986). Przechodzenie zaś metali toksycznych odbywa się prawdopodobnie według innych prawidłowości. Stwierdzono, że stężenia Cd i Pb są wielokrotnie niższe w jajach, niż w pokarmie samic, które znoszą te jaja. Jednak dłuższe pobieranie skażonego pokarmu przez samicę powoduje wzrost stężenia toksycznych metali w jajach (LEONZIO i MASSI 1989). Tkanki miękkie oraz kości są organami, z pomocą których zachodzi regulacja homeostazy pierwiastków w ciałach piskląt już od początku ich wyklucia. Dotyczy to również piór. Zmiany stężeń pierwiastków związane z wiekiem zależą od chemicznego skażenia środowiska. W organach piskląt żyjących w środowisku skażonym można obserwować inne tempo zmian i różne stężenia pierwiastków związane z ich z wiekiem w porównaniu z pisklętami ze środowiska mniej skażonego. Stężenia pierwiastków fizjologicznych: Fe, Mg, Ca wzrastają wolniej w organach piskląt żyjących w środowisku skażonym niż w nieskażonym, przy czym wzrost tych stężeń u piskląt jest normalnym zjawiskiem fizjologicznym. Stężenia pierwiastków tak zwanych niefizjologicznych w organach piskląt ze środowiska skażonego mogą wykazywać większe tempo wzrostu w porównaniu z pisklętami ze środowiska nieskażonego, a czasem wzrost tych stężeń można obserwować wcześniej u piskląt z terenu skażonego, niż z nieskażonego. Na obszarze nieskażonym istnieją lepsze warunki rozwoju i reprodukcji ptaków. Wyniki badań wskazują, że poznanie etapów wzrostu organów piskląt jest konieczne dla zrozumienia procesów bioakumulacyjnych pierwiastków. Różnice stężeń pierwiastków w organach piskląt świadczą o istotnej roli poszczególnych metali u rosnących ptaków. Można wnioskować, że zmiany stężeń pierwiastków u piskląt zależą od ich zawartości w środowisku i od sposobu i tempa rozwoju organów. Pisklęta mazurka, gatunku osiadłego i stale żyjącego w najbliższym sąsiedztwie człowieka, mogą być wskaźnikiem informującym o skażeniu środowiska (KAMIŃSKI 1995a).

Pisklęta mazurka z terenów miejskich różniących się stopniem skażenia, mimo że osiągają podobne masy ciała w dniu wylotu z gniazda, nie są równo-

cenne pod względem fizjologicznym. Populacja mazurków z terenu nieskażonego charakteryzuje się wyższym sukcesem klucia i wyższym sukcesem lęgowym w porównaniu z populacją żyjącą na terenach skażonych. Różnice we wzroście i rozwoju piskląt z terenów miejskich o różnym stopniu skażenia można tłumaczyć stężeniem toksycznych metali ciężkich w środowisku skażonym (KAMIŃSKI 1995b).

Czynniki warunkujące podstawowe parametry rozrodczości, to jest wielkość zniesienia, liczba lęgów odbywanych przez samicę w sezonie, liczba samic biorących udział w lęgach, zależą od zasobów energetycznych i budulcowych samic przystępujących do składania jaj, — takich jak zawartość wody, białka, tłuszczu i składników suchej masy beztłuszczowej (JONES i WARD 1976, PINOWSKA 1976, 1979). Ponadto zróżnicowanie wielkości lęgu i terminów pierwszych lęgów są w 40% uwarunkowane genetycznie (VAN NOORDWIJK i współaut. 1981a, b, c), a zróżnicowanie w rozmiarach jaj — aż w 60%–80% (OJANEN i współaut. 1979, VAN NOORDWIJK i współaut. 1980). Wielkość lęgu jest też zależna od czynników atmosferycznych (HAARTMAN 1967). W miejskim terenie nieskażonym przeważały u mazurków zniesienia 6-, 5- i 4-jajowe, a na obszarze skażonym — 3- i 4-jajowe. Można przypuszczać, że było to związane z tym, że w ciele samic z terenów nieskażonych było wyższe stężenie pierwiastków o ważnym znaczeniu fizjologicznym, takich jak: Fe, Mg, Ca, Zn sprzyjające składaniu zniesień o większej liczbie jaj i niższe stężenie pierwiastków (Pb, Cd, Mn, Cu), których wyższe stężenie u samic wiązało się ze składaniem przez nie mniejszej liczby jaj w zniesieniu. Ponieważ wykazano korelację pomiędzy wielkością zniesienia, a stężeniem tych pierwiastków u samic i stężeniem niektórych z nich (Pb, Cd) w jajach, a stężenie tych pierwiastków w jajach było przeważnie niezależne od ich stężenia u samic, a także biorąc pod uwagę interakcje antagonistyczne Cd i Pb z pierwiastkami fizjologicznymi, można wnioskować, że o wielkości zniesienia decyduje nie tylko stężenie u samic pierwiastków o ważnym znaczeniu dla produkcji jaj, ale także stężenie toksycznych metali ciężkich (Pb, Cd) w jajach (tj. już podczas ich rozwoju u samic), a to jest zależne od koncentracji tych metali w środowisku. Większe zniesienia wiążą się z wyższymi stężeniami w ciele samic żelaza, magnezu, wapnia i cynku i niższymi stężeniami miedzi, manganu, kobaltu, kadmu i ołowiu. Małe zniesienia mogą świadczyć o zbyt niskich stężeniach Fe, Mg, Ca i Zn w środowisku lub zbyt wysokich stężeniach pozostałych pierwiastków, co może informować o stopniu skażenia środowiska. Stężenia pierwiastków w jajach zależą od liczby jaj w zniesieniu, podobnie jak stężenia tych pierwiastków u samic, choć zależność ta nie musi być wprost proporcjonalna.

THE IMPACT OF URBAN ENVIRONMENT UPON THE DEVELOPMENT OF SYNANTHROPIC BIRDS (A REVIEW)

Summary

Over the last 40 years, populations of many birds have declined due to reduced hatching success and increased nestling mortality as a consequence of habitat pollution with heavy metals. Results of studies on the concentration of toxic metals in different organs of birds and on the associated reproductive failure show that it is important to know the mechanisms of pollution input to birds during their nesting development. The dynamics of element concentration in organs of growing

nestlings depends not only on the content of these elements in the food of nestlings and on their absorption, but to a large extent also on the growth rate of particular organs.

The rate of change and the pattern of age-related changes in concentrations of elements in different organs of tree sparrow nestlings showed differences between the urban polluted and unpolluted areas. Concentrations of the important physiological elements increased with age at a lower rate in the polluted than in the unpolluted area. Concentration of the so-called nonphysiological elements in organs increased with age at a higher rate in the polluted than in the unpolluted area, and in some cases this increase occurred earlier in nestlings from the polluted area.

Clutch size was related to the concentrations of most of the studied elements in the bodies of females and there were significant negative correlations between clutch size and the concentrations of Pb and Cd in eggs.

LITERATURA

- ASNANI M. V., 1984. *Comparative study on growth and metabolic functions of the liver of House Sparrow and House Swift during post-hatching period.* Pavo 22, 1-2, 45-52.
- BAUMAN V. K., 1968. *Calcium and phosphorus metabolism and regulations in birds.* Zinathe, Riga, 237 pp.
- BELL D. J., FREEMAN B. M., 1971. *Physiology and Biochemistry of the Domestic Fowl.* Acad. Press, London. -N. York, v. 1, 426 pp.
- BIAŁECKA Z. 1979. *Changes in the contents of fat and nutrients (N,P,K,Ca) in the breeding cycle of the Great Tit (Parus major L.).* M. S. Thesis Jagiell. Univ. 15 pp.
- BIESZCZAD-KOSCH M. 1979. *Variations in elemental composition (Ca,K,N,P,Mg) during postnatal development of the Great Tit (Parus major L.).* M. S. Thesis Jagiell. Univ. 16 pp.
- BILBY L. W., WIDDOWSON E. M., 1971. *Chemical composition of growth in nestling blackbirds and thrushes.* Br. J. Nutr. 25, 127-134.
- BOGGS W. R., WIXON B. G. 1977. *Lead in the environment.* Nat. Sci. Found., Washington, 272 pp.
- BURGER J., GOCHFELD M. 1985. *Early postnatal lead exposure, behavioral effects in Common Tern chicks (Sterna hirundo).* J. Toxicol. Environ. Health 16, 869-886.
- BURGER J., GOCHFELD M., 1988. *Metals in Tern Eggs in a New Jersey Estuary, a decade of change.* Environ. Monit. Assess. 11, 127-135.
- BURGER J., GOCHFELD M., 1991. *Cadmium and Lead in Common Terns (Aves, Sterna hirundo), Relationship between levels in parents and eggs.* Environ. Monit. Assess., 16, 253-258.
- BURGER J., GOCHFELD M., 1993. *Lead and Cadmium Accumulation in Eggs and Fledgling Seabirds in the New York Bight.* Environ. Toxicol. Chem. 12, 261-267.
- CAIN B. W., PAFFORD E. A., 1981. *Effects of dietary nickel on survival and growth of mallard ducklings.* Arch. Environ. Contam. Toxicol. 10, 737-745.
- CARY-SLECHTA D. A., WEISS B., COX C., 1983. *Delayed behavioral toxicity of lead with increasing exposure concentration.* Toxicol. Appl. Pharm. 71, 342-352.
- DAVIES B. E., LEAR J. M. 1984. *Heavy metal uptake by radish in relation to soil fertility and chemical extractability of metals.* [W:] Being Alive on Land. MARGARIS N. S., FARRAGITAKI M. A., OECHEL W. (red.), W. Junk, Holland, pp. 389.
- DAVIES N. T., NIGHTINGALE R. 1975. *The effects of phytate on intestinal absorption and secretion of zinc and whole body retention of Zn,Cu,Fe and Mn in rats.* Br. J. Nutr. 34, 243-258.
- DEMENT S. H., CHISOLM J. J., ECKHAUS M. A., STRANDBERG J. D., 1987. *Toxic lead exposure in the urban rock dove.* J. Wildl. Dis. 23, 2, 273-278.
- DIETER M. P., FINLEY M. T. 1979. *Delta-aminolevulinic acid dehydratase enzyme activity in blood, brain and liver of lead-dosed ducks.* Environ. Res. 19, 127-135.
- DMOWSKI K., KAROLEWSKI M. A., 1979. *Cumulation of zinc, cadmium and lead in invertebrates and in some vertebrates according to the degree of an area contamination.* Ekol. pol. 27, 333-349.
- FILIPOWICZ B., WIĘCKOWSKI W. 1986. *Biochemia.* PWN, Warszawa, t. I, 479 pp, t. II, 618 pp.
- FIMREITE N., 1979. *Accumulation and effects of mercury on birds.* [W:] *The biogeochemistry of mercury in the environment.* Red. J. O. Nriagu. Elsevier N. Holland Blomed. Press, Amsterdam, pp. 601-627.
- FRIEDEN E., 1968. *The biochemistry of copper.* Sci. Am. 218, 103-114.
- FRIEDEN E., 1974. *The evolution of metals as essential elements.* Adv. Exp. Med. 48, 1-32.

- FULLMER C. S., EDELSTEIN S., WASSERMAN R. H., 1985. *Lead-binding properties of intestinal calcium-binding proteins*. J. Biol. Chem. 260, 6816-6819.
- GARCIA F., SANCHEZ J., PLANAS J., 1986. *Influence of laying on iron metabolism in quail*. Br. Poul. Sci. 27, 582-592.
- GETZ L. L., BEST L. B., PTATHER M., 1977. *Lead in urban and rural song birds*. Environ. Pollut., 12, 235-238.
- GILBERT O. L. 1991. *The Ecology of Urban Habitats*. Chapman & Hall, London-N. York-Tokyo-Melbourne-Madras, 369 pp.
- GOODMAN G. T. 1974. *How do chemical substances affect the environment?* Proc. Roy. Soc. Lond. 185, 127-148.
- GRUE C. E., O'SHEA T. J., HOFFMAN D. J., 1984. *Lead concentrations and reproduction in highway-nesting Barn Swallow*. Condor 86, 383-389.
- GRUE C. E., HOFFMAN D. J., BEYER W. N., FRANSON L. P., 1986. *Lead concentrations and reproductive success in European Starlings *Sturnus vulgaris* nesting within highway roadside verges*. Environ. Pollut. A, 42, 157-182.
- HAARAKANGAS H., HYVARINEN H., OJANEN M. 1974. *Seasonal variations and the effects of nestling and moulting on liver mineral content in the house sparrow (*Passer domesticus* L.)*. Comp. Biochem. Physiol. 47A, 153-163.
- Haartman L., 1967. *Clutch-size in the Pied Flycatcher*. Proc. XIV Int. Orn. Congr., pp., 155-164.
- Hannon S. J., 1979. *Plasma calcium as an indicator of reproductive condition in female blue grouse*. Can. J. Zool. 57, 463-465.
- HUISINGH D. 1974. *Heavy metal implications for agriculture*. Ann. Rev. Phytopath., 12, 375-388.
- HUTTON M., GOODMAN G. T. 1980. *Metal contamination of feral pigeons *Columba livia* from the London area, I - Tissue accumulation of lead, cadmium and zinc*. Environ. Pollut. A, 22, 207-217.
- INDYKIEWICZ P. 1993. *The influence of food deficiency on the course of growth, development and mortality of House Sparrow (*Passer domesticus* L.) nestlings*. Manuscript, Inst. Ecol. PAS, Dziekanów Leśny, 132 pp.
- JONES P. J., WARD P., 1976. *The level of reserve protein as the proximate factor controlling the timing of breeding and clutch-size in the Red-billed Quelea, *Quelea quelea**. Ibis 118, 547-574.
- KAMIŃSKI P. 1995a. *Age-related changes of selected elements in nestling Tree Sparrows (*Passer montanus*) in polluted (highway) and control urban environment*. [W:] *Nestling mortality of granivorous birds due to microorganisms and toxic substances; a synthesis*. J. PINOWSKI, B. P. KAVANAGH i B. PINOWSKA (red.). PWN, Warszawa, pp.
- KAMIŃSKI P., 1995b. *Breeding biology of the Tree Sparrow (*Passer montanus*) in polluted (highway) and control urban habitats*. [W:] *Nestling mortality of granivorous birds due to microorganisms and toxic substances; a synthesis*. Red. J. PINOWSKI, B. P. KAVANAGH i B. PINOWSKA. PWN, Warszawa, pp.
- KAMIŃSKI P. 1995c. *The concentrations of calcium and heavy metals in soils, plants, invertebrates and in food and organs of nestling Tree Sparrows (*Passer montanus*) in urban environments*. [W:] *Nestling mortality of granivorous birds due to microorganisms and toxic substances, a synthesis*. J. PINOWSKI, B. P. KAVANAGH i B. PINOWSKA. (red.) PWN, Warszawa, pp.
- KAMIŃSKI P., 1995d. *Does pollution of urban environment influence clutch sizes in Tree Sparrow (*Passer montanus*)?* [W:] *Nestling mortality of granivorous birds due to microorganisms and toxic substances, a synthesis*. J. PINOWSKI, B. P. KAVANAGH i B. PINOWSKA (red.). PWN, Warszawa, pp.
- KAUFMAN L. 1926. *Wzrost ciała a wzrost narządów u gołębi*. Pam. Inst. Nauk Gosp. Wiejsk. w Puławach, 7A, 92-123.
- KAUFMAN L., 1962. *„Metamorphosis” in pigeons*. Acta Biol. Cracov. Ser. Zool. 5, 317-326.
- KESKPAIK J. E., DAVYDOV A. F. 1967. *Development of chemical thermoregulation in the ontogenesis of altricial birds*. [W:] *Physiology of Birds*. Valgus, Tallin pp., 139-147.
- KIENHOLZ E. W., SUNDE M. L., HOEKSTRA W. G., 1964. *Influence on dietary zinc, calcium and vitamin D for hens on zinc content of tissues and eggs and on bone composition*. Poul. Sci. 43, 667-675.
- KING J. R., FARNER D. S. 1967. *Energy metabolism, thermoregulation, and body temperature*. [W:] *Biology and comparative physiology of birds*. J. A. Marshall (red.), Ed. J. A. Marshall. Acad. Press, N. York, pp. 215.
- KOBAYASHI J. 1973. *Effect of cadmium on calcium metabolism of rats*. Trace Subst. Environ. Health 7, 295-304.
- KOPISCHKE E. D., 1966. *Selection of calcium and magnesium bearing grit by pheasants in Minnesota*. J. Wildl. Manage. 30, 276-279.

- KOSTELECKA-MYRCHA A., PINOWSKI J., TOMEK T., 1970. Changes of respiratory function of the blood of nestling Tree Sparrows (*Passer m. montanus* L.) during their development. Bull. Acad. Pol. Sci. Cl. II, 18, 717-722.
- LEONZIO C., MASSI A., 1989. Metal Biomonitoring in Bird Eggs, a critical experiment. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 43, 402-406.
- LILJA C. 1981. Postnatal growth and organ development in the goose (*Anser anser*). Growth, 45, 329-341.
- LILJA C. 1982a. Postnatal growth and organ development in the quail (*Coturnix coturnix japonica*). Growth, 46, 88-99.
- LILJA C. 1982b. Postnatal growth and organ development in the fieldfare and the jackdaw (*Turdus pilaris* and *Corvus monedula*). Growth, 46, 367-387.
- LILJA C., 1983. A comparative study of postnatal growth and organ development in some species of birds. Growth, 47, 317-339.
- LITTLE P., MARTIN M. H. 1974. Biological monitoring of heavy metal pollutants. Environ. Pollut. 6, 1-19.
- NOSKOV G. A., RAVKIN J. S., SOLOVIEVA N. V., JOVČENKO N. P., KOTOV A. A., NEČAEV V. A., ZONOV G. B., ŠEGOLEV V. I., SKRYLKOV L. I., Vahrušev A. A., Švecov A. N., 1981. Sreda obitaniĵa. [W:] Polevoj vorobej, *Passer montanus* L.G. A. NOSKOV (red.). Izd. Lenln. Univ., Leningrad, 1981, pp. 94-109.
- NYHOLM N. E. I. 1990. Bio-indication of heavy metal pollution in the terrestrial environment, by means of insectivorous birds. Proc. Int. Symp. Ecotox., Mnich, pp. 213-228.
- NYHOLM N. E. I. 1993. Heavy metal tissue levels, impact on breeding and nestling development in natural populations of Pied Flycatcher (*Aves*) in the pollution gradient from a smelter. [W:] Ecotoxicology of Soil Organisms.. H. EJSACKERS, F. HEINBACH, M. DONKER (red). Lewis Pub., Chelsea, pp., 1-16.
- OJANEN M., HAARAKANGAS H., HYVARINEN H., 1975. Seasonal changes in bone mineral content and alkaline phosphatase activity in the house sparrow (*Passer domesticus* L.). Comp. Biochem. Physiol. 50A, 581-585.
- OJANEN M., ORELL M., VIASANEN R. A., 1979. Role of heredity in egg size variation in the Great Tit *Parus major* and the Pied Flycatcher *Ficedula hypoleuca*. Ornith. Scand. 10, 22-28.
- OSBORN D. 1978. Toxic and essential heavy metals in birds. Inst. Terr. Ecol., Nat. Environ. Res. Council, Ann. Rep., pp. 53-56.
- OSBORN D. 1979. Seasonal changes in the fat, protein and metal content of the liver of the Starling, *Sturnus vulgaris*. Environ. Pollut. 19, 145-155.
- PATTEE O. H., HENNES S. K., 1983. Bald Eagles and waterfowl, The lead shot connection. Trans. N. Am. Wildl. Nat. Res. Conf. 48, 230-237
- PETERING H. G. 1974. Trace Element Metabolism in Animals. Univ. Park Press, Baltimore, v., 1, 2.
- PINOWSKA B. 1975. Food of female House Sparrows (*Passer domesticus* L.) in relation to stages of the nesting cycle. Pol. Ecol. Stud. 1, 3, 211-225.
- PINOWSKA B., 1976. The effect of body composition of female House Sparrows, *Passer domesticus* (L.), on the clutch size and the number of broods (Preliminary report). [W:] PINOWSKI J. (red.). Int. Stud. on Sparrows, INTECOL, 9, 2, 55-71.
- PINOWSKA B., 1979. The effect of energy and building resources of females on the production of House Sparrow (*Passer domesticus* (L.)) populations. Ekol. pol. 27,3, 363-396.
- PINOWSKA B., KRAŚNICKI K., PINOWSKI J., 1981. Estimation of the degree of contamination of granivorous birds with heavy metals in agricultural and industrial landscape. Ekol. pol. 29, 137-149.
- PINOWSKA B., KRAŚNICKI K. 1985a. Changes in the content of magnesium, copper, calcium, nitrogen and phosphorus in female House Sparrows during the breeding cycle. Ardea 73, 175-182.
- PINOWSKA B., KRAŚNICKI K. 1985b. Quantity of gastroliths and magnesium and calcium contents in the body of females house sparrows during their egg-laying period. Zesz. nauk. Filii UW 48, Biol., 10, 125-130.
- PINOWSKI J., PINOWSKA B., KRAŚNICKI K., TOMEK T., 1983. Chemical composition of growth in nestling Rooks *Corvus frugilegus*. Ornith. Scand., 14, 289-298.
- POPOVA L. V. 1972. Mikroelementy v sostavnyh castlah kostnogo mozga pri lejkozah. Mikroelementy v biosfere, ANCCCP, 292-294.
- RATCLIFFE D. A. 1967. Decrease in eggshell weight in certain birds of prey. Nature 215, 208-210.
- RICHARDS B. N., 1979. Wstęp do ekologii gleby. PWN, Warszawa, 326 pp. RIORDAN J. F., VALLEE B. L., 1974. The functional roles of metals in metalloenzymes. Adv. Exp. Med. Biol. 48, 33-58.
- ROMANOWSKI J., PINOWSKI J., SAWICKA-KAPUSTA K., WOSTOWSKI T., 1991. The effect of heavy metals upon development and mortality of *Passer domesticus* and *Passer montanus* nestlings. Preliminary

- report. [W:] Nestling mortality of granivorous birds due to microorganisms and toxic substances. J. PINOWSKI, B. P. KAVANAGH i W. GÓRSKI (red.). PWN, Warszawa, pp., 197-204.
- ROSEN J. F. 1983. *The metabolism of lead in isolated bone cell populations, Interactions between lead and calcium*. Toxicol. Appl. Pharmacol. 71, 101-112.
- ROTH H. P., KIRCHGESSNER M., 1983. *Der Einfluss unterschiedlicher Konzentration an Verschiedenen Zinkkomplexen im Vergleich Zn Sulfat auf Parameter des Zn-Versorgungsstatus von Ratten*. Z. Ernährungswiss 22, 34-44.
- ROTH H. P., KIRCHGESSNER M. 1985. *Utilization of zinc from picolinic or citric acid complexes in relation to dietary protein source in rats*. J. Nutr. 115, 1641-1649.
- SAVAGE J. E. 1968. *Trace minerals and avian reproduction*. Fed. Proc. 27, 927-931.
- SCHRAUZER G. N., 1991. *Cobalt. [W:] Metals and Their Compounds in the Environment*. E. MERIAN., VCH. WEINHEIM (red.). N. York, Basel, Cambridge, pp. 879-892.
- SIMKISS K. 1975. *Calcium and avian reproduction*. Symp. Zool. Soc. Lond. 35, 307-337.
- STENSTRÖM T., VAHTER M. 1974. *Cadmium and lead in Swedish commercial fertilizers*. Ambio, 3, 91-92.
- STICKEL W. H. 1975. *Some effects of pollutants in terrestrial ecosystems*. [W:] *Ecological Toxicology Research*. D. MCINTYRE, C. F. MILLS (red.). Plenum Press, N. York, pp. 25-74.
- Stuart S. M., KETELSEN S. M., WEAVER C. M., ERDMAN J. W., 1986. *Bioavailability of zinc to rats as affected by protein source and previous dietary intake*. J. Nutr. 116, 1423-1431.
- SUMMERS-SMITH J. D. 1989. *The Sparrows. A study of the genus Passer*. T. & A. Poyser, Calton, London, 342 pp.
- ŠURAKOV A. I., SOKOLOVA T. I., 1975. *Growth dynamics of some organs in embryonic and nestling development of the Rook*. Kat. Zool. Perms. Gos. Ped. Inst. 146, 17-28.
- TATARUCH F., LIDAUER R., 1984. *Die Amsel (Turdus merula L.) als Bioindikator fr die Umweltbelastung mit Blei, Cadmium und Quecksilber*. Škol. Všgel 6, 185-194.
- UNDERWOOD E. J., 1975. *Cobalt*. Nut. Rev. 33, 3, 65-69.
- UNDERWOOD E. J. 1971. *Trace elements in human and animal nutrition*. Acad. Press, N. York, 491 pp.
- VAN NOORDWIJK A. J., VAN BALEN J. H., SCHARLOO W. 1980. *Heritability of ecologically important traits in the Great Tit*. Ardea 68, 193-203.
- VAN NOORDWIJK A. J., KEIZER L. C. P., VAN BALEN J. H., SCHARLOO W., 1981a. *Genetic variation in egg dimensions in natural populations of Great Tit*. Genetica 55, 221-232.
- VAN NOORDWIJK A. J., VAN BALEN J. H., SCHARLOO W., 1981b. *Genetic variation in the timing of reproduction in the Great Tit*. Oecologia (Berl.) 49, 158-166.
- VAN NOORDWIJK A. J., VAN BALEN J. H., SCHARLOO W., 1981c. *Genetic and environmental variation in clutch size of the Great Tit*. Neth. J. Zool. 31, 342-372.
- WILLIAMS C. H., DAVID D. J. 1973. *The effect of superphosphate on the cadmium content of soils and plants*. Austr. J. Soil. Res. 11, 43-56.
- ŽEREBCOV P. J., FILATOV G. V. 1959. *Calcium metabolism in the ontogenesis of birds*. Zootehnija.. Izvestija TSCHA,4, 134-154.

Hanna JAŚKOWSKA

Katedra Mikrobiologii Rolniczej
Szkola Główna Gospodarstwa Wiejskiego
Rakowiecka 26/30, 02-528 Warszawa

PARA-BRODAWKI JAKO NOWY MODEL SYMBIOZY

Powszechnie jest znane zjawisko symbiozy pomiędzy roślinami z rodziny motylkowatych (*Fabaceae*) i bakteriami z rodzaju *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* i *Azorhizobium*. W wyniku symbiozy na korzeniach czy łodygach roślin rozwijają się brodawki, w których wewnątrzkomórkowo usytuowane bakterie przeprowadzają proces wiązania azotu atmosferycznego. Związany azot wydzielają do komórek gospodarza co sprawia, że roślina staje się niezależna od azotu glebowego. Jednak uprawa większości roślin — w tym ważnych z ekonomicznego punktu widzenia zbóż — wymaga bardzo kosztownego nawożenia azotowego.

Odkrycie symbiozy pomiędzy niemotylkowatymi roślinami z *Parasponia* i *Rhizobium* (TRINICK 1973) oraz kilkudziesięcioma roślinami niemotylkowatymi i promieniowcami z rodzaju *Frankia* (BECKING 1970), a także stwierdzenie znacznych różnic w szczegółach interakcji symbiotycznej i morfologii brodawek u różnych gatunków roślin motylkowatych zasugerowało, że symbiotyczne wiązanie N_2 może być rozszerzone na rośliny niemotylkowate. Z oceny możliwości wykonania tego zadania wynikało, że najlepszym wariantem będzie przeniesienie genów *nif* wraz z innymi, koniecznymi do wiązania azotu, do chloroplastów roślinnych (POSTGATE 1987). Niestety, do tej pory nie udało się wyposażyć roślin za pomocą inżynierii genetycznej w działający, transgeniczny układ symbiotyczny, wiążący N_2 . Główną przeszkodą jest złożoność genetycznej regulacji tego procesu (QUISPEL 1991).

W ostatnich latach obserwuje się nowe, niegenetyczne podejście do rozszerzenia symbiozy na inne rośliny. ALOYSIUS i PATON (1984) stosowali do zakażenia roślin protoplasty bakterii. Powszechnie uważa się, że protoplasty mogą penetrować ścianę komórkową i błonę cytoplazmatyczną żywych komórek. Po zastosowaniu protoplastów *Azotobacter*, *Pseudomonas syringae*, *Bacillus polymyxa* i *Beijerinckia* autorzy uzyskali dowody na aktywność bakterii w tkankach roślinnych, niestety aktywności nitrogenazy — kompleksu enzymatycznego odpowiedzialnego za wiązanie N_2 — nie badali.

Inną możliwość stworzyło wykorzystanie enzymów hydrolitycznych do degradacji ściany komórkowej roślin. COCKING i współpracownicy (za KENNEDY i TCHAN 1992) doprowadzili do powstania asocjacji pomiędzy zbożami a *Rhizobium* spp. niszcząc enzymatycznie bariery uniemożliwiające wniknięcie bakterii do roślin.

Po zastosowaniu celulaz i pektynaz autorzy obserwowali gwałtowną degradację ścian komórkowych wierzchołka wzrostu włóśników u roślin motylkowatych i zbóż. Brodawki powstawały na 10% siewek ryżu potraktowanych enzymami i *Rhizobiami*. Gdy nie stosowano enzymów, brodawki nie tworzyły się.

Lepsze wyniki — wzrost liczby brodawek — uzyskali ALL-MALLAH i współautorzy (1989) łącząc działanie enzymów z glikolem polietylenowym. Doświadczenia przeprowadzali na siewkach ryżu szczepionych *Rhizobium*. Obserwowali powstawanie brodawek, w których bakterie zasiedlały głównie przestrzenie międzykomórkowe. Podobne badania były prowadzone na siewkach pszenicy i rzepaku. We wszystkich przypadkach aktywność redukcji acetylenu (ARA) była ledwie wykrywalna.

Jeszcze inną metodę uzyskiwania brodawek opisali JING i współautorzy (1990). Obserwowali powstawanie struktur brodawkopodobnych na korzeniach jęczmienia szczepionego *Rhizobium* w efekcie działania pola magnetycznego. W obserwowanych strukturach była obecna nić infekcyjna i bakteroidy otoczone błoną peribakteroidalną; nie stwierdzili w nich jednak ARA. Ponieważ doświadczenie nie było obwarowane odpowiednimi kontrolami inni autorzy podchodzą do wyników uzyskanych przez JINGA i współpracowników bardzo krytycznie.

Na początku lat osiemdziesiątych NIE i współpracownicy (za KENNEDY i TCHAN 1992) z Uniwersytetu Shandong w Chinach opublikowali szereg prac donoszących o indukowaniu kwasem 2,4-dichlorofenoksyoctowym (2,4-D) brodawek na korzeniach wielu roślin. Wcześniej, w latach czterdziestych i pięćdziesiątych, opisano powstawanie takich struktur u roślin po traktowaniu herbicydami, bez rozpatrywania, czy struktury te są zasiedlone przez bakterie i jakie jest ich znaczenie dla roślin. NIE i współpracownicy udowodnili, że są one odpowiedzią na działanie herbicydu i powstają niezależnie od szczepienia roślin bakteriami.

Inny badacz chiński — CHEN — (za KENNEDY i TCHAN 1992) potwierdził rezultaty NIE i opisał wiązanie N_2 (na niskim poziomie) w strukturach indukowanych 2,4-D u pszenicy szczepionej *Azorhizobium caulinodans*.

Prace Chińczyków były publikowane w czasopiśmie chińskich, niedostępnych dla większości badaczy, w związku z tym przez pewien okres czasu nie były znane.

W 1989 roku KENNEDY i TCHAN opublikowali artykuł przeglądowy na temat indukcji struktur brodawkopodobnych przez 2,4-D. Zawarli w nim opis osiągnięć badaczy chińskich i przedstawili własne wyniki. W pracy tej po raz pierwszy struktury brodawkopodobne indukowane chemicznie zostały nazwane para-nodules (para-brodawki) dla odróżnienia od brodawek powstających naturalnie na korzeniach roślin motylkowatych. Opublikowanie wyników prac Chińczyków w bardziej dostępnych czasopiśmie dało początek szeregu badań zmierzających w dwu kierunkach. Pierwszy kierunek to próby rozszerzenia symbiozy *Rhizobium* na rośliny nie dające w naturalnych warunkach brodawek z tymi bakteriami. Większość z tych prac była prowadzona na pszenicy. BENDER, NIE i KENNEDY (za KENNEDY i TCHAN 1992) stwierdzili niezależnie, że u wszystkich roślin poddanych działaniu 2,4-D powstawały p-brodawki zasiedlone w 10%–20% przez szczepionkowe bakterie z rodzaju *Rhizobium*. Bakterie można było znaleźć w przestrzeniach międzykomórkowych i w komórkach bez normalnej cytoplazmy. P-brodawki nie miały organizacji wewnętrznej i nie stwierdzano

w nich redukcji C_2H_2 , choć autorzy przebadali wiele szczepów i oznaczenia prowadzili przy kontrolowanym ciśnieniu O_2 .

AKAO i współpracownicy (1991) podjęli próbę uzyskania p-brodawek indukowanych 2,4-D na odmianie soi nie tworzącej brodawek. Do szczepienia roślin zastosowali mieszanę szczepów *Bradyrhizobium japonicum*. Powstałe brodawki miały normalną wewnętrzną strukturę i były zabarwione na kolor czerwony, wewnątrzkomórkowo występowały w nich bakteroidy. Natomiast inny od naturalnego był ich kształt — tykwopodobny — i często występowały parami. Obserwowano w tych brodawkach wysoki poziom wiązania N_2 .

Drugi kierunek badań to próby ustanowienia nowego rodzaju symbiozy. Wywodzi się on ze znajomości faktu, że bakterie dwuazotoficzne z rodzaju *Azotobacter*, *Xantobacter*, *Bacillus* i *Azospirillum* w naturalnych warunkach wchodzi w układy asocjacyjne z roślinami i mogą kolonizować wnętrze korzeni. Bakterie z rodzaju *Azospirillum* żyją w asocjacji między innymi z roślinami zbożowymi i właśnie z zastosowaniem ich wiąże się nadzieję na wzrost plonów. Wielokrotnie podejmowano próby szczepienia roślin tymi bakteriami i w większości przypadków uzyskiwano pozytywne wyniki. Badacze sugerują, że korzystny wpływ *Azospirillum* na rośliny jest powodowany przez wydzielanie substancji biologicznie czynnych, usprawnienie pobierania wody i soli mineralnych, a także wiązanie N_2 . ZEMAN i współpracownicy (1991) stwierdzili, że właśnie p-nodule z *Azospirillum* mogą dostarczyć nowego modelu wiązania azotu atmosferycznego w symbiozie z roślinami niemożytkowatymi.

TCHAN, ZEMAN i KENNEDY prowadzą od początku lat dziewięćdziesiątych niezależne badania nad indukcją 2,4-D p-brodawek i szczepieniem roślin niemożytkowatych bakteriami z rodzaju *Azospirillum*. W przeciwieństwie do doświadczeń z roślinami szczepionymi *Rhizobium* u pszenicy w p-brodawkach zasiedlonych przez *Azospirillum* obserwowali redukcję acetylenu. U roślin szczepionych bakteriami ale nie traktowanych 2,4-D poziom redukcji acetylenu był 5-krotnie niższy, dużo gorsza była też powtarzalność wyników. Wstępne badania wykazały bezpośrednie powiązanie fotosyntezy i redukcji acetylenu w p-brodawkach. Zastosowanie inhibitorów fotosyntezy hamowało redukcję C_2H_2 . Może to świadczyć o spełnieniu w tym układzie pierwszego warunku symbiozy, jakim jest czerpanie korzyści przez mikrosymbionta.

Bakterie dwuazotoficzne kolonizujące korzenie w przeciwieństwie do symbiotycznych nie wydzielają do środowiska azotu związanego, dlatego też tylko w niewielkim stopniu zaspakajają zapotrzebowanie rośliny na ten pierwiastek. Azot związany przez bakterie asocjacyjne pozostaje głównie w ich komórkach i dostępny staje się dla roślin dopiero po obumarciu bakterii i mineralizacji substancji organicznej w nich zawartej.

CHRISTIANSEN-WENIGER i VAN VEEN (1991) uzyskali spontaniczne mutanty *Azospirillum brasilense*, które wydzielają do środowiska jony amonowe. Mutanty te wiązały azot nawet w obecności jonów amonowych, a w podłożu bezazotowym wiązały 2-krotnie więcej azotu niż szczepy dzikie. Bakterie te zastosowali do szczepienia siewek pszenicy i kukurydzy (CHRISTIANSEN-WENIGER i VANDERLEYDEN 1994) po indukcji 2,4-D brodawek. Uzyskali brodawki zasiedlone przez stabilną populację *Azospirillum*. U kukurydzy tworzyły się one na korzeniu głównym, zniekształceniu ulegał też wierzchołek korzenia. Jednocześnie obserwowano

zahamowanie elongacji korzenia głównego i tworzenia korzeni bocznych. Po przeniesieniu roślin do podłoża bez 2,4-D młode p-brodawki rosły i rozwijały się w dojrzałe organy. W czasie 5-tygodniowej obserwacji nie wykazywały oznak starzenia się czy obumierania. Rośliny w tym czasie wykształciły drugi, działający równolegle system korzeniowy.

P-brodawki różniły się strukturą i pochodzeniem od brodawek u roślin motylkowatych przede wszystkim centralnie umieszczoną wiązką przewodzącą. Histologicznie porównywalne były do brodawek na pędach *Sesbania*. Bakterie kolonizujące p-brodawki były przytwierdzone do błon komórkowych i połączone ze sobą substancją fibrylarną niewiadomego pochodzenia. Zasiadlały komórki roślinne bez ich widocznego uszkodzenia.

Wstępne badania ze znakowanym $^{15}\text{N}_2$ wykazały, że wydzielające jony amonowe mutanty *Azospirillum brasilense*, obecne w p-brodawkach pszenicy i kukurydzy, przekazują znaczne ilości związanego N_2 roślinie-gospodarzowi.

Powyższe obserwacje były poczynione na siewkach i roślinach zaledwie kilkutygodniowych, nie wiadomo czy uzyskane wyniki można odnieść do starszych roślin. Czy populacja bakterii wewnątrz p-brodawek będzie stabilna w późniejszym okresie życia rośliny i czy roślina przez cały czas będzie czerpać korzyści z tego typu współżycia wykażą późniejsze badania.

Obecnie wiadomo, że stosując 2,4-D bardzo łatwo można uzyskać p-brodawki. Proces powstawania ich nie jest zależny od obecności bakterii. Jakkolwiek bakterie szczepionkowe mogą wpływać na liczbę p-brodawek i mogą modyfikować ich kształt. Mechanizm, poprzez który 2,4-D indukuje powstawanie tych struktur nie jest znany. Nie może być wynikiem prostej aktywności auksynopodobnej tej substancji. Być może 2,4-D inicjuje proces/procesy porównywalne z tymi, które indukują *Rhizobia* podczas normalnego brodawkowania. Dodatkowo może ułatwiać bakteriom penetrowanie tkanek roślinnych przez stymulację produkcji celulaz bakteryjnych (za AKAO i współaut. 1991). Wiązanie azotu atmosferycznego w p-brodawkach zależy głównie od stopnia ich zasiedlenia przez *Azospirillum* i wydaje się, że zachodzi nawet intensywniej niż w brodawkach normalnych. Pewne wątpliwości budzi to, czy aktywność redukcji acetyleny jest wynikiem tylko działalności bakterii zasiedlających p-brodawki, czy pochodzi także od bakterii bytujących na powierzchni korzeni.

Opisane doświadczenia są prowadzone zaledwie od kilku lat. Trudno jest w tej chwili określić, czy uzyskany model symbiozy pomiędzy roślinami zbożowymi i *Azospirillum* można faktycznie uznać za prawdziwą symbiozę. Obserwacje były poczynione na siewkach i kilkutygodniowych roślinach, nie wiadomo czy uzyskane wyniki można odnieść do starszych roślin. Wyjaśnienia wymaga mechanizm ewentualnego przekazywania związanego przez bakterie N_2 roślinom. Na podstawie dotychczasowych wyników nie można też stwierdzić, czy p-brodawki i populacja bakterii zasiedlających je będą stabilne i czy roślina będzie czerpać z tego typu współżycia korzyści także w późniejszym okresie życia.

Odległe jeszcze ale wielce prawdopodobne wydaje się zastosowanie technologii uzyskiwania p-brodawek w rolnictwie. Możliwe, że wcześniej powinna być ona zastosowana w ogrodniczych uprawach hydroponicznych. Przedtem jednak należy znacznie lepiej poznać ten problem i odpowiedzieć na pytania, które zrodziły się w trakcie prowadzonych dotychczas badań.

PARA-NODULES AS A NEW MODEL OF SYMBIOSIS

Summary

A N₂-fixing symbiosis is a specific of plants of the *Fabaceae* family. Within this relationship the plant develops, along roots or stems nodules in which the symbiotic bacteria fix atmospheric nitrogen. This proces is very efficient, and makes the plant independent of mineral nitrogen.

Most of the plants, including important crops, do not form nodules, and their productivity depends on N^o fertilization. Recent technical advances concerning the induction of nodular structures (para-nodules) on the roots of cereal crops offer the prospect that dependable symbiosis with free-living diazotrops, such as *Azospirillum*, or with *Rhizobium* may eventually be achieved.

LITERATURA

- AKAO S., NAKATA S., YONEYAMA T., 1991. *Formation of nodules on non-nodulating soybean T201 after treatment with 2,4-dichlorophenoxyacetate*. Plant and Soil 138, 207-212.
- ALL-MALLAH M. K., DAVEY M. R., COCKING E. C., 1989. *Formation of nodular structures on rice seedlings by rhizobia*. J. Exp. Bot. 40, 473-478.
- ALOYSIUS S. K. D., PATON A. M., 1984. *Artificially induced symbiotic associations of L-form bacteria and plants*. J. Appl. Bacteriol. 56, 465-477.
- BECKING H. J., 1970. *Plant-endophyte symbiosis in non-leguminous plants*. Plant and Soil 32, 611-654.
- CHRISTIANSEN-WENIGER C., VANDERLEYDEN J., 1994. *Ammonium-excreting Azospirillum sp. become intracellularly established in maize (Zea mays) para-nodules*. Biol. Fertil. Soils 17, 1-8.
- CHRISTIANSEN-WENIGER C., VAN VEEN J. A., 1991. *NH₄⁺-excreting Azospirillum brasilense mutants enhance the nitrogen supply of a wheat host*. Appl. Environ Microbiol. 57, 3006-3012.
- JING Y., ZHANG B. T., SHAN X. Q., 1990. *Pseudonodules formation on barley roots induced by Rhizobium astragali*. FEMS Microbiol. Lett. 69, 123-127.
- KENNEDY I. R., TCHAN Y. T., 1992. *Biological nitrogen fixation in non-leguminous field crops. Recent advances*. Plant and Soil 141, 93-118.
- POSTGATE J., 1987. *Prospects for the improvement of biological nitrogen fixation*. J. Appl. Bacteriol. Symposium Supplement 85s-91s.
- QUISPEL A., 1991. *A critical evaluation of the prospects for nitrogen fixation with non-legumes*. Plant and Soil 137, 1-11.
- TRINICK M. J. 1973. *Symbiosis between Rhizobium and the non-legume Trema aspera*. Nature 144, 459.
- ZEMAN A., TCHAN Y. T., KENNEDY I. R. 1991. *The para-nodule on wheat as a model of N₂-fixing symbiosis on a non-legume*. Proc. 9th Aust. Nitrogen Fixation Conf. 9, 80-81.

VALERY ISIDOROV, EWA PIROŹNIKOW*, JADWIGA JAROSZYŃSKA
*Instytut Chemii filii Uniwersytetu Warszawskiego w Białymstoku,
al. Piłsudskiego 11/4, 15-443 Białystok*
* *Instytut Biologii filii Uniwersytetu Warszawskiego w Białymstoku
Świerkowa 20 B, 15-950 Białystok*

EMISJA ROŚLINNA LOTNYCH ZWIĄZKÓW ORGANICZNYCH (LZO) ORAZ ICH ZNACZENIE EKOLOGICZNE

WSTĘP

Wydzielanie do otoczenia lotnych związków organicznych (LZO) jest zjawiskiem powszechnym, charakterystycznym dla wszystkich organizmów żywych, od bakterii do roślin wyższych i zwierząt. Wiadomo, że podstawowa część biomasy naszej planety stanowi roślinność kontynentalna, dlatego można założyć, że jest głównym źródłem węgla organicznego w atmosferze.

Pierwsze wyniki pomiarów szybkości emisji izoprenu opublikował W. I. NIŁOV w 1928 r. Kilkanaście lat później wysunięto przypuszczenia o znaczeniu LZO dla życia roślin oraz o roli w międzygatunkowych oddziaływaniach roślina — roślina, roślina — mikroorganizmy — owady (CHOŁODNYJ 1943, 1944, TOKIN 1946). Obecnie fitogenna emisja LZO znajduje się w centrum uwagi wszystkich międzynarodowych i ważniejszych krajowych programów badawczych, poświęconych globalnym zmianom atmosfery. Są to, na przykład, programy IGBP, EUROTRAC, czy program dotyczący globalnych zmian w środowisku naturalnym (Rosja).

Jednakże daje się zauważyć, że nasze wiadomości o udziale LZO w procesach geofizycznych oraz zrozumienie roli tych związków w wewnątrz- i międzygatunkowych oddziaływaniach są fragmentaryczne. Celem tej pracy jest przedstawienie stanu wiedzy o tych problemach oraz zwrócenie na nie uwagi szerszego grona naukowców — fitopatologów, fizjologów i ekologów roślin oraz geofizyków i chemików badających atmosferę.

SKŁAD I SKALA EMISJI FITOGENNYCH LZO

Substancje emitowane przez roślinność stanowią bogatą mieszaninę związków różnych klas. Do tej pory przebadano i zidentyfikowano ponad 150 związków C₁-C₁₅ wyizolowanych z zaledwie kilkudziesięciu gatunków drzew, krzewów i roślin uprawnych. Niektóre z tych związków wymieniono w tabeli 1.

Tabela 1

Skład jakościowy LZO emitowanych przez niektóre gatunki roślin leśnych (RASMUSSEN 1972, CLEMENT i współaut. 1990, ČURKIN i współaut. 1976, ISIDOROV i współaut. 1985)

Substancja	Rośliny	Substancja	Rośliny
Metan	1	Butylen	1-12, 15, 16, 18
Etan	1	Penten	1, 2, 5-9, 13-15
Propan	1	β -Felandren	8-11, 14, 18, 19
<i>n</i> -Butan	1	Etanol	3-5, 10, 12-19
2-Metylobutan	1-8, 12, 18	Aldehyd octowy	1, 3, 18
2-Pentan	1-9	α -Metyloakroleina	1-4, 7, 9, 18
Etylen	1	2-Butanon	8, 13-15, 18
Propylen	1, 8, 9	2-Pentanon	6, 8, 15, 19
Limonen	3, 7-19	3-Pentanon	5, 7-10, 15-19
Terpinolen	9-17	Octan 3-heksanilu	1, 4-8
Nonen	1, 6, 11, 16	2-Metylofuran	1-5, 12, 13, 18
Izopren	1-17	3-Metylofuran	1-5, 12, 13, 18
<i>p</i> -Cymen	7-17	Terpinenol	9
Metanol	15, 19	Octan bornylu	7-11
3-Karen	7-18	Octan terpenylu	9
Propanol	3, 4	α -Tujen	9, 10, 13, 17
3-Heksen-1-ol	1, 2, 5, 7, 8	α -Pinen	9-13, 18, 19
Borneol	7-11	β -Pinen	3-11, 15, 18, 19
Propanal	2, 22	δ -Fenchen	8, 10, 12
Izobutanal	16	ϵ -Fenchen	9-12
Krotonal	17, 18	α -Fenchen	7-17
Benzaldehyd	16, 18	β -Fenchen	7, 10, 12
Aceton	1-19	α -Felandren	3, 8-11
Kamfora	8	α -Terpinen	8-10, 17
3-Buten-2-on	6, 18	β -Terpinen	3, 8-10, 13-15
Longifolen	9	γ -Terpinen	9, 13-15, 17
Kariofyllen	9	α -Murolen	9
Octan etylu	9	ϵ -Murolen	9
1,8-Cyneol	3, 8, 14	β -Humolen	9
Furan	6, 18	β -Bisabolen	9
Winylofuran	1, 2, 4, 8	Izofenchon	9, 16
Mentan	14	Fenchon	9, 16
Izoborneol	9	Fenchol	9
Chloroform	16	γ -Terpineol	9
Oktanon	19	Dimetylodisarczek	15
Santen	8, 11	Chlorek metylu	14-16

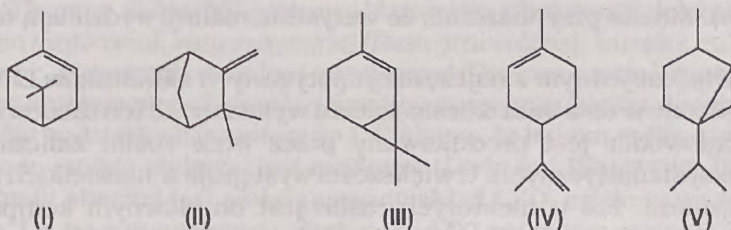
Cyklofenchen	8-10, 15	2-Metylobutan-3-on	18
Tricyklen	7-10	Acetylofuran	18
Kamfen	3-17, 19	2-Metylo-1-buten-3-on	18
Sabinen	12	2,3-Dimetylobutadien	8, 13, 14
Mircen	7-19	Metylo(α -metylo)maślan	14
Bornylen	8-17	Metylo(α -metylo)kapronal	14

1 — wierzba pięciopęcikowa, 2 — topola osika, 3 — topola balsamiczna, 4 — dąb szypułkowy, 5 — brzoza brodawkowata, 6 — jarzębina, 7 — modrzew syberyjski, 8 — świerk pospolity, 9 — sosna zwyczajna, 10 — limba syberyjska, 11 — jodła syberyjska, 12 — jałowiec pospolity, 13 — jałowiec, 14 — jałowiec wirginijski, 15 — cyprys wiecznie zielony, 16 — żywotnik, 17 — żywotnik wschodni, 18 — klon biały, 19 — jesion.

W przyziemnej warstwie powietrza stwierdzono również obecność wielu o wyższej masie cząsteczkowej składników — alkany C_{15} – C_{35} , alkohole alifatyczne C_{21} – C_{33} , kwasy tłuszczowe C_{14} – C_{34} i złożone etery (ARPINO i współaut. 1972, WILS i współaut. 1982, SIMONEIT 1986, 1989), jak również di- i triterpeny i terpenoidy. W aerozolach z rejonów tła (poza rejonami zurbanizowanymi, z daleka od ośrodków przemysłowych) stwierdzono kwas abietynowy i dehydrabietynowy, α -amiron (12-ursen-3-on), β -amiron (12-aleanon-3-on, $C_{30}H_{48}O$), α - i β -amiryny ($C_{30}H_{50}O$), fridelin ($C_{30}H_{50}O$) i inne (SIMONEIT i współaut. 1991).

Jeszcze niedawno prawie wszystkie zidentyfikowane substancje, oprócz terpenów i terpenoidów, zaliczano do antropogennych zanieczyszczeń powietrza. Dane zawarte w tabeli 1 dowodzą, że związki te są naturalnymi składnikami atmosfery ziemskiej. Z tabeli tej wynika również, że emisja określonych LZO jest charakterystyczna dla poszczególnych gatunków i dlatego skład wydzielin można potraktować jako jedną z cech taksonomicznych (ISIDOROV 1990). W związku z tym można określić niektóre emisje jako charakterystyczne dla poszczególnych grup roślinności. Na przykład, szczególną cechą gatunków należących do rzędu szpilkowców (*Coniferales*) jest emisja monoterpenu węglowodorów. Stanowią one ponad 75% ogólnej liczby związków emitowanych do atmosfery — oraz ich pochodnych zawierających tlen (terpenoidów).

Terpeny $C_{10}H_{16}$ i terpenoidy są biologicznie aktywnymi związkami przejściowymi. Są głównymi składnikami olejków eterycznych i terpentyny, otrzymywanymi z roślin iglastych. Pod względem budowy chemicznej terpeny są wielokrotnościami C_5H_8 (izoprenu). Terpeny $C_{10}H_{16}$ to najprostsze z tej grupy węglowodorów (zawierają tylko dwie jednostki izoprenowe). Przykładami terpenów $C_{10}H_{16}$ są: α -pinen (I), kamfen (II), 3-karen (III), limonen (IV) i sabinen (V) (schemat 1).



Schemat 1

Wielu autorów znalazło ścisłą korelację pomiędzy składem terpenów, wydzielanych przez drzewa z rodziny sosnowatych do atmosfery, a ich obecnością w olejkach eterycznych wyizolowanych z tych roślin. Jednakże rośliny, nawet tego samego gatunku, mogą produkować terpeny różniące się znacznie pod względem składu. Na przykład, rosnącą na terenie Rosji, Białorusi i Ukrainy sosnę zwyczajną (*Pinus sylvestris*) można podzielić na kilka ras (BARDYŠEV i współaut. 1969). Północna wyróżnia się wysoką zawartością α - i β -pinenu i prawie zupełnym brakiem 3-karenu. U sosny strefy środkowej zawartość 3-karenu wzrasta do 6%–14%, a z europejskiej strefy borów mieszanych jego ilość dochodzi do maksymalnego poziomu — 30%–35%. Niestety, wiemy niewiele o składzie olejków eterycznych sosny z polskich lasów. Według danych BUGAŁY i KUCZYŃSKIEGO (1952) zawiera znaczne ilości 3-karenu (36,2%), podobne do obecnych w drzewach z południowej Białorusi i z Ukrainy.

Jednym z głównych składników LZO w olejkach eterycznych jodeł (*Abies*) jest β -pinen. Jego wyjątkowość jest związana z biosyntezą dużych ilości kamfenu i terpenoidów szeregu kamfanu: borneolu i octanu bornyłu. W olejkach eterycznych jodły pospolitej (*A. alba*) średnia zawartość kamfenu i octanu bornyłu wynosi odpowiednio 14% i 11% (KINTIA i współaut. 1990). Świerk (*Picea*) charakteryzuje się również wysoką zawartością związków z grupy kamfanu — u prawie wszystkich gatunków świerka głównym składnikiem olejków eterycznych jest kamfen oraz octan bornyłu.

Różne odmiany modrzewia produkują przede wszystkim terpeny bicykliczne, takie jak 3-karen oraz α - i β -pineny. W przypadku modrzewia europejskiego (*Larix decidua*), spotykanego na południu Polski, udział tych substancji wynosi około 36% ogólnej ilości terpenów (KINTIA i współaut. 1990).

U większości roślin z rodziny cyprysowatych (*Cupressaceae*) zachodzi biosynteza sabinenu i jego pochodnych: sabinolu i octanu sabinolu, których praktycznie nie spotyka się u innych roślin iglastych.

Skład olejków eterycznych i ich zasobność w igłach tego samego osobnika sosny podlegają dużym wahaniom sezonowym. Z doniesień AKIMOVA i współpracowników (1973) wynika, że maksymalne ilości olejków i monoterenów w igłach sosny zwyczajnej i sosny krymskiej (*P. pallasiana*) na południu Ukrainy przypadają na lipiec. Jesienią wzrasta zawartość trudno lotnych terpenoidów i seskwiterpenów. Zmiany sezonowe w składzie olejków eterycznych wpływają na skład LZO w powietrzu lasów iglastych, jednakże dynamiki tych zmian na kontynencie europejskim nie badano.

Terpeny oraz terpenoidy są produkowane nie tylko przez rośliny iglaste. Według GENDERSA (1977) ich obecność stwierdzono w organach ponad 800 rodzajów roślin. Można przypuszczać, że wszystkie rośliny wydzielają te związki do otoczenia.

Izopren C_5H_8 jest jednym z najczęściej spotykanych składników LZO. Badania przeprowadzone w ostatnim dziesięcioleciu wykazały, że ten dienowy, bardzo reaktywny węglowodór jest produkowany przez wiele roślin zaliczanych do odległych grup systematycznych. U większości występuje w niewielkich ilościach z innymi związkami, zaś u niektórych roślin jest on głównym komponentem produkowanych gazów. Identyfikacji izoprenu pierwszy dokonał SANADZE (1960) oraz SANADZE i DOLIDZE (1958, 1961) badając LZO emitowane przez liście wierzby

białej (*Salix alba*), topoli chińskiej (*Populus Simonii*) i topoli Sosnowskiego (*P. Sosnowskyi*), bukszpanu (*Buxus* sp.) i amorfy krzewiastej (*Amorpha fruticosa*). Wykazano później (RASMUSSEN 1970), że izopren jest głównym składnikiem LZO emitowanych do atmosfery przez liście ponad 70 gatunków drzew rosnących w lasach Ameryki Północnej (przede wszystkim z rodziny wierzbowatych i bukowatych), jak również przez przedstawicieli flory z obszarów równikowych i subtropikalnych: z rodziny palm (*Palmae*) palma kokosowa (*Cocos nucifera*), rodzaju figowiec (*Ficus*) mango (*Magnifera indica*) i wielu gatunków z rodzaju eukaliptusa (*Eucalyptus*). Podana liczba producentów izoprenu dotyczy roślin nagonasiennych. Wśród przedstawicieli rzędu szpilkowców tylko u gatunków z rodzaju świerk (*Picea*) udział izoprenu w emitowanych związkach jest znaczny. U niektórych północno-amerykańskich gatunków świerka (*P. sitchensis*, *P. engelmannii*) emisja izoprenu przewyższa sumaryczną emisję wszystkich monoterpenu (EVANS i współaut. 1982), takich właściwości nie posiadają te same gatunki rosnące w strefie borealnej Euroazji. Według badań ISIDOROVA (1990) niewielkie ilości izoprenu wytwarzają również inne rośliny z rodziny sosnowatych. Charakterystyczne, że ten węglowodór emitują nie tylko drzewa i krzewy, lecz również wiele roślin zielnych: paprocie (np. narecznica samcza *Dryopteris filixmas*) (ISIDOROV i współaut. 1985), liczne dwuliścienne z rodziny jasnowiątych (*Labiatae*) i strączkowców (*Fabales*) i jednoliścienne łącznie z pszenicą i kukurydzą (EVANS i współaut. 1982). W ten sposób izopren łącznie z monoterpenu jest głównym związkiem wprowadzającym do atmosfery węgiel organiczny. Zatem są zupełnie zrozumiałe działania mające określić źródła wydzielania izoprenu, skalę tej emisji oraz dalsze losy izoprenu w atmosferze.

Etylen C_2H_4 jest substancją wydzielaną przez wiele gatunków roślin, chociaż zainteresowanie jego fitogennymi źródłami jest do tej pory niewielkie. Pierwotnie etylen stwierdzono w gazowych wydzielinach jabłek, a później w innych owocach — na przykład gruszy (*Pyrus*), bakłażana (*Solanum*), dyni (*Cucurbita*), tytkwy (*Lagenaria siceraria*), awokado (*Persea americana*), banana (*Musa*). Jednakże emisja C_2H_4 nie jest ograniczona tylko do dojrzewających owoców. Znaczne ilości tej substancji stwierdzono w składzie LZO emitowanych przez liście jabłoni (*Malus*), miechunki (*Physalis*), ślázówki (*Lavatera*) i bawełny (*Gossypium*) (PORUCKIJ i współaut. 1962). Później znaleziono C_2H_4 jeszcze w wielu drzewiastych, krzewiastych i zielnych roślinach (SPACHOVA 1972, PEHÁK 1973) na przykład w liściach jesionu (*Fraxinus* sp.), olchy czarnej (*Alnus glutinosa*), robinii akacjowej (*Robinia pseudoacacia*), pomidora jadalnego (*Lycopersicon esculentum*), ziemniaka (*Solanum tuberosum*), perzu właściwego (*Agropyron repens*), szafwii lekarskiej (*Salvia officinalis*), mięty pieprzowej (*Mentha piperita*), tymianku właściwego (*Thymus vulgaris*), piołunu (*Artemisia absintium*), lebiodka majeranek (*Origanum majorana*), ruty zwyczajnej (*Ruta graveolens*), buraka cukrowego (*Beta vulgaris* var. *altissima*), marchwi zwyczajnej (*Daucus carota*), tysiącznika pospolitego (*Centaureum umbellatum*), pokrzywy zwyczajnej (*Urtica dioica*) oraz jednego z gatunków bodziszka (*Geranium* sp.). Ciekawe, że jedyną rośliną iglastą, u której stwierdzono emisję etylenu, jest modrzew (*Larix* sp.) (SPACHOVA 1972).

Do chwili obecnej jest słabo poznany skład LZO, emitowanych przez rośliny uprawne. Do tej pory wykryto u nich ponad 60 związków różnych grup (ISIDOROV 1994). Jak wyżej wspomniano, emisja niektórych związków jest cechą chara-

kterystyczną wielu roślin, należących do różnych taksonów. Najczęściej spotyka się terpeny, izopren, etylen, etanol, aceton oraz 3-heksen-1-ol (lub jego octan). Ostatni związek, znacznie rozprzestrzeniony w aparacie fotosyntetyzującym różnych roślin otrzymał nazwę „alkoholu liściowego”; prawdopodobnie tak samo szeroko jest rozprzestrzeniony tak zwany „aldehyd liściowy” 2-heksenal, zaliczony ostatnio do LZO niektórych gatunków — winorośli (*Vitis* sp.) (AREY i współaut. 1991).

Na szczególną uwagę zasługuje triada — izopren, etanol i aceton. Naszym zdaniem są podstawy, aby przypuszczać, że biosynteza tych trzech związków zachodzi we wszystkich organizmach żywych: ich obecność stwierdzono w wydzielinach zarówno roślin wyższych, jak i grzybów (ISIDOROV 1990), a także u zwierząt (np. w powietrzu wydechowym człowieka głównym związkiem organicznym jest izopren, ponadto etanol i aceton).

Wielokrotne pomiary laboratoryjne i polowe emisji z drzew na obszarze półkuli północnej wykazały, że emisja LZO przebiega ze znaczną intensywnością (tab. 2). Szybkość wydzielania terpenów zależy od temperatury powietrza a na szybkość wydzielania izoprenu wpływa również natężenie światła.

Tabela 2

Emisja monoterpenów lub izoprenu przez niektóre gatunki roślin (AREY i współaut. 1991)

Gatunek i miejsce występowania	Temperatura (°C)	Szybkość emisji [$\mu\text{g}/(\text{g} \times \text{h})$ s.m.] ¹
Rosja:		
Sosna zwyczajna	14	1,6 ± 0,2
Sosna zwyczajna	18	3,0 ± 0,2
Sosna zwyczajna	20	4,1 ± 0,3
Sosna zwyczajna	24	8,9 ± 0,9
Sosna zwyczajna	28	18,8 ± 1,9
Sosna syberyjska	11-32	1,8-26,5
Świerk pospolity	16	0,8
Świerk pospolity	20	1,6
Świerk pospolity	27	5,8
Modrzew syberyjski	22-27	2,9-6,4
Jodła syberyjska	20-25	2,1-9,9
Dąb szypułkowy	15-26	1,3-36,2 (0,2-4,7)
Osika	20-26	1,8-32,5
Wierzba	20-26	2,2-8,6
Litwa:		
Świerk pospolity	21	1,12 (0,78)
Dąb szypułkowy	18-32	2,4-50,4 (0,8-12,7)
Osika	18-40	0,7-51,7 (0,2-15,5)
Niemcy: świerk pospolity		(0,07)
USA:		
Sosna karaibska	30	6,6

Sosna terpentynowa	20	2,3
Drzewa szpilkowe (5 gatunków)	15-30	1,1-26,5
Daglezja	19-32	5,4-15,6
Świerk pospolity	30	4,8
Sosna zwyczajna	22-28	0,4-5,1
Japonia: sosna czerwona		
maj	17	0,048
lipiec	27	0,110
wrzesień	22	0,076
listopad	15	0,024
styczeń	8,5	0,007
Kuba:		
Sosna karaibska	23-26	23,4-37,4
Sosna tropikalna	26	5,1
Malezja: ²		
<i>Mallotus paniculatis</i>		1,02
<i>Hevea brasiliensis</i>		7,85
<i>Eugenia grandis</i>		11,02
<i>Macaraunga triloba</i>		45,30
<i>Elaeis guineensis</i>		166,71

¹Wnawiasach podano szybkość/powierzchnia liści [$\text{mg}/(\text{m}^2 \times \text{h})$]; ²Emisja izoprenu

Rośliny uprawne również wykazują znaczną szybkość emisji LZO (AREY i współaut. 1991). W ostatnim czasie dokonano oceny emisji LZO w poszczególnych rejonach oraz w skali globalnej.

Okazuje się, że roślinność kontynentalna emituje rocznie 360 mln ton terpenów i 480 mln ton izoprenu (ZIMMERMAN i współaut. 1978). Podobną wielkość emisji izoprenu (450 mln ton/rok) podają również RASMUSSEN i KHALL (1988). Globalna emisja C_{org} przez rośliny w ciągu roku może dochodzić do 1550 mln ton i więcej (IOFFE i ISIDOROV 1982). Te wielkości wielokrotnie przewyższają wartość antropogennego zrzutu do atmosfery organicznych niemetanowych związków — obecnie oszacowanego na 103 mln ton/rok (SINGH i ZIMMERMAN 1992).

Należy jednakże zauważyć, że dostępne nam dzisiaj wszystkie oszacowania naturalnej emisji LZO są niedokładne. Wynika to z niedoskonałości obliczeń biomasy aparatu fotosyntetyzującego oraz z niedostatecznego poznania wpływu parametrów środowiska (temperatura powietrza, wilgotność, oświetlenie i tym podobne) na szybkość wydzielania LZO. Dodatkowo, szacunki dla krajów europejskich oparto na współczynnikach przeniesionych z badań prowadzonych w Ameryce (ZIMMERMAN i współaut. 1978, LAMB i współaut. 1987). Różnice w metodyce oraz w sposobie uwzględniania parametrów środowiska spowodowały znaczny rozrzut otrzymanych wyników obliczeń emisji LZO (tab. 3).

Tabela 3

Ocena emisji LZO (tyś. ton/rok) przez rośliny kontynentu europejskiego.
Dane pochodzą z: 1 — LÜBKERT i TILLY 1989; 2 — LÜBKERT i SCHÖPP 1989; 3 — ANDRUKOV i TIMOFEEV 1989; 4 — SIMPSON i ARNTS 1990.

Kraj	1	2	3	4
Austria	140	109	140	188
Albania	–	45	–	70
Belgia	–	15	35	34
Bułgaria	–	118	–	181
Wielka Brytania ^{*1}	71	39	50	64
Węgry ^{*2}	–	21	70	74
Niemcy Wschodnie	–	118	290	229
Grecja	–	115	2300	276
Irlandia	–	3	–	11
Hiszpania	–	1115	–	1712
Włochy	550	170	1300	300
Luksemburg	–	3	–	4
Holandia	–	28	8	17
Norwegia	180	299	200	378
Polska	–	309	720	558
Portugalia	266	257	850	372
Rumunia	–	157	630	291
ZSRR (cz. europejska)	–	1912	9800	8321
Turcja	–	–	–	987
Finlandia	522	601	480	903
Francja	998	524	1800	951
Niemcy Zachodnie	229	224	680	406
Czechosłowacja	–	144	–	281
Szwajcaria	45	40	100	50
Szwecja	750	890	600	1196
Jugosławia	–	164	1200	312

*Szacunki krajowe: ¹210 tyś. ton/rok; ²195 tyś. ton/rok

EKOLOGICZNA ROLA PRODUKTÓW UTLENIEŃ LZO W ATMOSFERZE

Zgromadzone w literaturze światowej dane pozwalają przypuszczać, że lotne związki organiczne, wydzielane przez rośliny do atmosfery, są ważnym czynnikiem formowania składu biocenozy. Wszystkie fitogenne LZO są reaktywne i łatwo ulegają przemianom pod wpływem tlenu atmosferycznego. Reakcje takie są inicjowane przez rodniki hydroksylowe HO[•] albo, jak w przypadku etylenu,

izoprenu i terpenów, rozpoczynają się przyłączeniem cząsteczki ozonu (FINLAYSON-PITTS i PITTS JR. 1986, ISIDOROV 1990, 1994).

Dalsze przemiany tych związków prowadzą do mieszaniny produktów, których skład zależy od chemicznej budowy wyjściowych cząsteczek oraz od konkretnych warunków środowiska zewnętrznego: składu atmosfery, nasłonecznienia, obecności w powietrzu gazowych, antropogennych zanieczyszczeń (NO, NO_x, SO₂) oraz zapylenia atmosfery (ISIDOROV 1994).

Niektóre produkty utleniania LZO oraz liczne nieorganiczne substancje, które przy tym powstają, są aktywnymi truciznami dla konkurentów (RICE 1984). Pojawienie się tych substancji oraz dalszy wzrost ich stężenia w atmosferze jest ważnym czynnikiem wpływającym na stan ekosystemów naziemnych.

Przemysłowa działalność człowieka może doprowadzić do zmiany naturalnych procesów utleniania LZO w atmosferze, wywołując tym samym zmiany w geofizycznym i chemicznym charakterze atmosfery.

Badanie wpływu, jaki wywierają produkty niepełnego utlenienia węglodorów na rośliny rozpoczęto w latach 1950-tych. Zaobserwowano wówczas, że „syntetyczny smog” wywołuje zmniejszenie szybkości transpiracji oraz zatrzymanie wzrostu pomidorów (KORITZ i WENT 1953). Stwierdzono również, że 24-godzinne przebywanie rzęsy (*Lemna minor*) w ozonowanym 1-heksenie zmniejsza szybkość fotosyntezy o 70%, a zawartość chlorofilu w tkankach spada o 50%. Równoważna ilość samego ozonu wywoływała mniejsze zmiany, przy 24-godzinnym kontakcie szybkość fotosyntezy i zawartość chlorofilu zmalały o 40% (ERICKSON i WEDDING 1956). Taki sam efekt zaobserwowano w doświadczeniu z bobem i pomidorami (TODD i PROPST 1963). Fumigacja czystym 1-hekseniem nie wykazała istotnego wpływu na fotosyntezę i respirację. Zatem najsilniejsze działanie niszczące dla roślin mają produkty utlenienia alkenów, sam ozon jest mniej groźny.

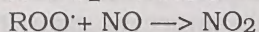
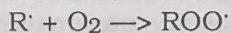
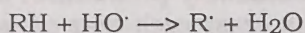
Bliskimi analogami strukturalnymi 1-heksenu jest izopren oraz monoterpeny. Podczas ich utlenienia, pod wpływem ozonu i tlenków azotu powstają fitotoksyczne nadtlutki organiczne ROOH, nadkwasy RC(O)OOH i PAN-peroksyacyloazotany RC(O)OONO₂ (R oznacza rodnik alkilowy, np. CH₃) (HATAKEYAMA i współaut. 1989). Na przykład, utlenienie α -pinenu w obecności tlenków azotu prowadzi do powstania związków peroksyacyloazotanu, pochodnych nadtlutku wodoru i aerozoli, co ilustruje schemat 2.

Ostatnio coraz częściej twierdzi się, że produkty reakcji antropogennych tlenków azotu z fitogennymi LZO stają się wtórnymi zanieczyszczeniami atmosfery. Wywołują one katastrofalną degradację ekosystemów leśnych w niektórych rejonach Ameryki Północnej i Europy. Uwagę skupia tak zwany syndrom „Waldschäden” objawiający się żółknięciem igieł, przedwczesnym ich opadaniem i deficytem magnezu (SCHÜTT i COWLING 1985, WENTZEL 1985).

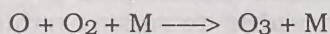
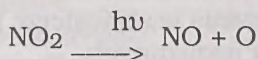
Wyniki doświadczeń w komorach smogowych oraz obserwacje przyrodnicze wykazały, że na skutek obecności tlenków azotu w stężeniach przewyższających tło, w troposferze zachodzą fotochemiczne procesy tworzenia znacznych ilości ozonu (ZWOŹDZIAK i współaut. 1994).

Szybkość powstawania tego wtórnego zanieczyszczenia atmosfery zależy nieliniowo od stężenia tlenków azotu i związków organicznych w troposferze.

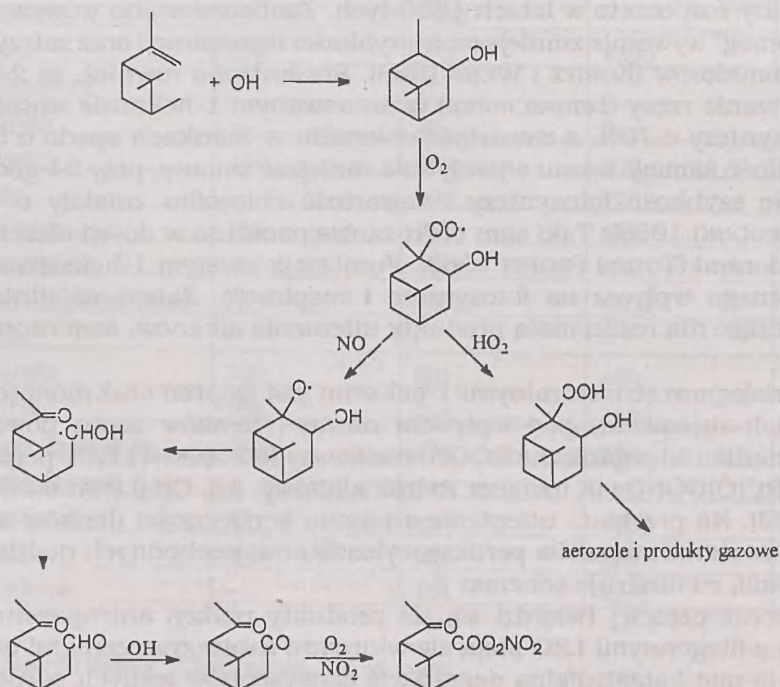
Podczas utleniania powstają bardzo reaktywne formy przejściowe $\text{HO}\cdot_2$ i $\text{RO}\cdot_2$, które energeticznie utleniają NO do dwutlenku azotu:



Następnie dwutlenek azotu rozpada się wywołując reakcję powstania ozonu:



Takie procesy zachodzą w smudze miejskich zanieczyszczeń zawierających tlenki azotu i węglowodory.



Schemat 2

W okresie podwyższonej fotochemicznej aktywności stężenie ozonu w miejskiej smudze przekracza 100 ppb (1 ppb oznacza jedną bilionową z liczby cząsteczek), a niekiedy 200 ppb. Należy zaznaczyć, że w okręgach wiejskich obserwuje się niekiedy obniżoną w stosunku do tła zawartość ozonu, jednakże może tak być tylko w przypadku niskich stężeń tlenków azotu, gdyż wówczas „odpływ” ozonu (również przez reakcje z biogennymi węglowodorami) jest intensywniejszy niż jego tworzenie w przedstawionej powyżej reakcji fotochemicznej. Ogólnie, napływ do obszarów leśnych antropogennych zanieczyszczeń z terenów miejskich może być przyczyną znacznego podwyższenia zawartości ozonu.

Z takimi zjawiskami są związane obserwowane niekiedy, bardzo wysokie zawartości ozonu pod pułapem lasu, niekiedy nawet przewyższające ilości charakterystyczne dla procesów smogowych w silnie zanieczyszczonej atmosferze miast. Na przykład praca EDMONDSA i BASABE (1989) donosi, że maksymalne średnie godzinowe stężenie O_3 pod okapem boru na zachodzie USA niekiedy przewyższa 120 ppb. Maksymalne godzinowe stężenie ozonu (50 ppb) mierzone na stacjach pomiarowych, zlokalizowanych na wsiach w Kanadzie 11-krotnie przewyższa wyniki analogicznych pomiarów wykonanych w mieście!

Według przypuszczeń, w wiejskich okręgach Kalifornii (Central Valley) zawartość fotoutleniaczy w powietrzu częstokroć jest wyższa niż w takich miastach jak New York, Houston, Filadelfia i Chicago (WINER i współaut. 1992). Powoduje to wiele strat w płonach. Zgodnie z dostępnymi szacunkami, w USA straty ekonomiczne, spowodowane samym tylko wpływem znacznych ilości ozonu wynoszą około 2 mld dolarów w ciągu roku (HECK i współaut. 1982).

Negatywny wpływ ozonu na rośliny przejawia się przede wszystkim we wzroście rozwarcia aparatów szparkowych (to prowadzi do zaburzenia wymiany CO_2) oraz w zmianach zdolności przenikania przez błony komórkowe, a w konsekwencji do zaburzeń funkcjonowania komórki (HILL i współaut. 1970). Bezpośrednia ingerencja ozonu w procesy wewnątrzkomórkowego metabolizmu polega na utlenianiu grupy -SH w apoenzymie (MUDD 1979)

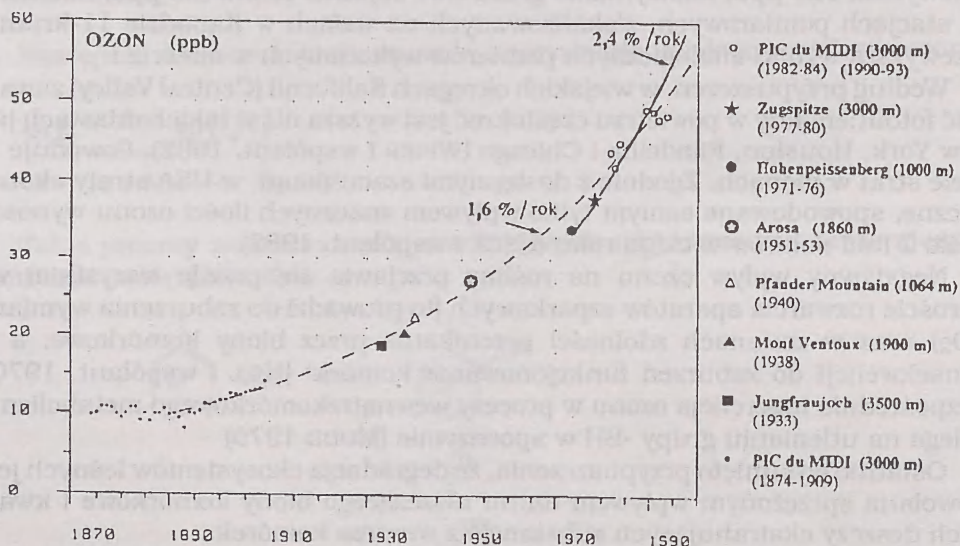
Ostatnio wysunięto przypuszczenia, że degradacja ekosystemów leśnych jest wywołana sprzężonym wpływem ozonu niszczącego błony komórkowe i kwaśnych deszczy ekstrahujących substancje z wnętrza komórek.

Należy podkreślić, że obecność w atmosferze znacznych ilości fotoutleniaczy, może nasilić negatywny wpływ zanieczyszczeń pierwotnych, takich jak SO_2 . Zostało to dowiedzione w doświadczeniach przeprowadzonych z różnymi gatunkami roślin (HAFSTRA i BECKERSON 1981, MEUSER i HEGGESTAD 1986).

Otrzymane ostatnio dane wykazały wzrost zawartości ozonu w dolnej warstwie atmosfery nad terenami Europy Zachodniej i Środkowej. Na przykład, poddano powtórnej analizie wyniki zebrane przez stacje pomiarowe Francji (1876–1910 r.) oraz północnych Włoch (1868–1893 r.) i stwierdzono, że w okresie od końca wieku XIX do lat 1980 ilość ozonu wzrosła ponad dwukrotnie (VOLZ i KLEY 1988, ANFOSSI i współaut. 1991). Podobnie analiza wyników obserwacji, przeprowadzonych na stacji we wschodniej części Niemiec (1956–1988 r.) oraz w zachodniej części Niemiec (1971–1978 r.) wykazała wzrastający o 1% rocznie trend zawartości tego niebezpiecznego zanieczyszczenia. Na rysunku 1 graficznie przedstawiono wyniki najnowszych obliczeń (MARENCO i współaut. 1994) obejmujących okres od 1870 do 1993 roku.

W celu określenia roli jaką w tworzeniu ozonu spełniają węglowodory fitogenne wykorzystuje się jednowymiarowe i przestrzenne modele, uwzględniające mechanizmy utlenienia głównych składników LZO (LLOYD i współaut. 1983, KILLUS i WHITTEN 1984, TRAINER i współaut. 1987, 199, MACKENZIE i współaut. 1991). Rezultaty takich obliczeń ilustruje rysunek 2, na którym graficznie przedstawiono wyniki modelowania pionowego rozkładu ozonu w atmosferze na średnich szerokościach półkuli północnej (FEHSENFELD i współaut. 1992). Jeżeli stężenia metanu, CO, NO i NO_2 odpowiadały zawartości tych substancji w pierwszej połowie XIX wieku, to wprowadzenie do modelu izoprenu powoduje

zmniejszenie obliczonego stężenia ozonu (rys. 2a). To znaczy, że izopren stał się „pułapką” ozonu. Jednakże, jeżeli te substancje występowały w stężeniach obserwowanych współcześnie, to wprowadzenie izoprenu wywołało skutek odwrotny — izopren przyczynił się do tworzenia dodatkowych ilości ozonu (rys. 2b).



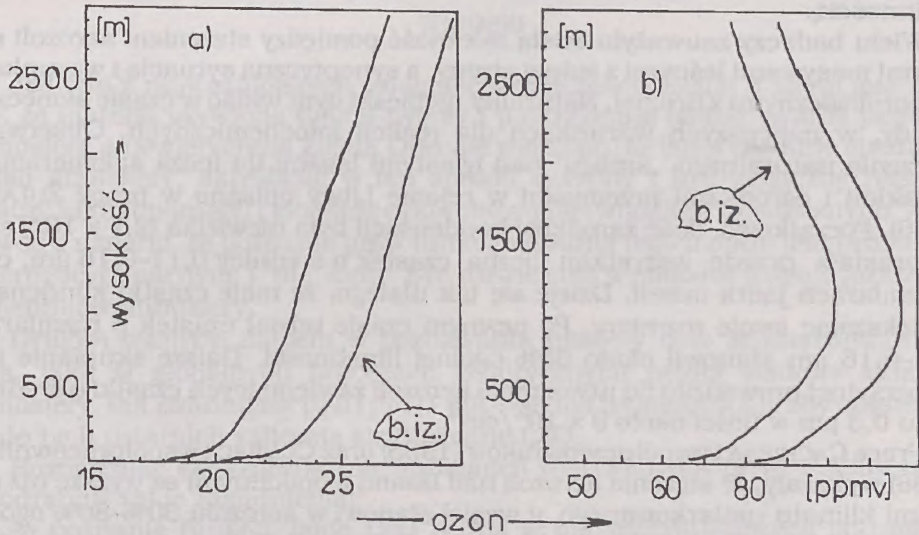
Rys. 1. Zmiany zawartości ozonu w atmosferze Europy Zachodniej zarejestrowane na Pic du Midi i innych górskich stacjach pomiarowych.

Prace związane z modelowaniem procesów tworzenia ozonu w powietrzu nad miastami wykazały dramatyczny niedostatek danych o biomacie roślinnej a także o szybkości emisji i składzie wydzielanych związków. Na niedokładność otrzymanych wyników obliczeń tworzenia ozonu znaczny wpływ mają również braki w wiadomościach o mechanizmach (w tym heterogennych) utleniania LZO i składzie powstających produktów utleniania. Nie można nie wspomnieć również o dodatkowym ograniczeniu wynikającym z wprowadzenia do modeli tylko najmniej reaktywnych (i z tej przyczyny najdłużej żyjących, więc najczęściej oznaczanych w powietrzu nad lasami) składników fitogennych LZO, α -pinenu oraz izoprenu. Jednakże obserwacje przyrodnicze potwierdzają możliwość masowego tworzenia ozonu, pod wpływem działalności człowieka, z innych biogenych związków organicznych.

Oceniając udział fitogennych LZO w globalnych zmianach środowiska należy uwzględnić powstawanie w niższej atmosferze znacznych ilości ozonu. Skutkiem jego nagromadzenia w troposferze wystąpić mogą zmiany równowagi radiacyjnej, ponieważ O_3 pochłania promieniowanie IR w „oknie” absorpcji pary wodnej.

Wpływ ozonu na funkcjonowanie drzew badał METZNER (1987) na przykładzie przyrostów jodły. Zaobserwował on 50% spadek aktywności peroksydazy, 30% wzrost aktywności katalazy i wielokrotny wzrost emisji etylenu, charakterysty-

czny dla warunków stresowych, w jakich znalazła się roślina. Efekty te pojawiały się przy wysokich stężeniach ozonu ($800 \mu\text{g}/\text{m}^3$) i nie występowały przy stężeniach na poziomie $200 \mu\text{g}/\text{m}^3$.



Rys. 2. Teoretycznie obliczone zawartości ozonu w atmosferze czystej (a) i zanieczyszczonej (b) w obecności (lub przy braku — b.iz.) izoprenu. Strumień NO_x wynosi: a — 2×10^{10} cząsteczek/ $(\text{cm}^2 \times \text{sek})$, b — 5×10^{11} cząsteczek/ $(\text{cm}^2 \times \text{sek})$.

Ostatnio dużo uwagi poświęca się także nadtlenukom, na przykład H_2O_2 , powstającym w atmosferze. BECKER i współpracownicy (1990) donieśli, że stężenie H_2O_2 jest znacznie większe wewnątrz lasu niż na obrzeżach. Z pomiarów wykonanych w borze sosnowym Szwecji wynika, że maksymalne ilości nadtlenu wodoru występują w ciągu dnia; w południe latem oznaczono 0,05 — 2 ppbv (1 ppbv oznacza jedną bilionową część objętości) (ROSS i współaut. 1992). Naturalne lasy i nasadzenia mogą znacznie ucierpieć w wyniku tworzenia się takich fototoksykantów. Według MÖLLERA (1989), podstawowym czynnikiem odpowiedzialnym za porażenie liści są rodniki OH^\cdot i HO_2^\cdot , powstające podczas rozkładu H_2O_2 w kroplach mgły.

Zbadanie składu, szybkości emisji i przemian chemicznych LZO pochodzenia roślinnego jest konieczne dla poznania ogólnych prawideł rządzących składem atmosfery i jej geofizycznymi cechami.

Czy prawdziwe jest przypuszczenie, że utlenienie niektórych fitogennych związków organicznych prowadzi do powstania aerozoli atmosferycznych? Niektórzy autorzy badań twierdzą, że niebieski dym nad lasami iglastymi, rosnącymi na zboczach Gór Skalistych, jest wywołany takimi aerozolami (WENT 1960). Zostało to potwierdzone w badaniach laboratoryjnych (HATAKEYAMA i współaut. 1989, KAMENS i współaut. 1982, YOKOUCHI i AMBE 1985) oraz obserwacjami przyrodniczymi (GOLOVINA i współaut. 1985, ŽULANOV 1986, LOPEZ i współaut. 1985, CACHIER i współaut. 1985, CLAIRAC i współaut. 1988). Mechanizm powsta-

wania tych aerozoli nie jest znany. Dlatego na razie nie można ocenić wkładu tych procesów w tworzenie aerozoli atmosferycznych, chociaż wyniki doświadczeń pozwalają przypuszczać, że fotoutlenienie terpenów jest ważnym źródłem aerozoli zarówno w obszarach wiejskich, jak i w miejskich z dostatecznie bujną roślinnością.

Wielu badaczy zauważyło ścisłą zależność pomiędzy stężeniem aerozoli nad dużymi masywami leśnymi z jednej strony, a synoptyczną sytuacją i warunkami meteorologicznymi z drugiej. Naturalny niebieski dym widać w czasie słonecznej pogody, w najlepszych warunkach dla reakcji fotochemicznych. Obserwacje tworzenia naturalnego, „smogu” nad iglastymi lasami tła (poza aglomeracjami miejskimi i ośrodkami przemysłu) w rejonie Litwy opisano w pracy ŻULANOV (1986). Początkowo, ilość zarodków kondensacji była niewielka ($2,7 \times 10^2/\text{cm}^3$) a wzrastała przede wszystkim liczba cząstek o średnicy 0,11–0,16 μm , czyli o rozmiarach jądra miceli. Dzieje się tak dlatego, że małe cząstki kondensują powiększając swoje rozmiary. Po pewnym czasie udział cząstek o rozmiarach 0,11–0,16 μm stanowił około 65% ogólnej liczebności. Dalsze skupianie fazy dyspersyjnej prowadziło do utworzenia aerozoli zawierających cząstki o średnicy rzędu 0,3 μm w ilości około $9 \times 10^2/\text{cm}^3$.

Prace CACHIERA i współpracowników (1985) oraz CLAIRAC i współpracowników (1988) wykazały, że stężenia aerozoli nad lasami tropikalnymi są wyższe niż nad lasami klimatu umiarkowanego, a węgiel stanowi w aerozolu 50%–80% ogólnej masy cząstek. Podczas wilgotnych okresów lasy tropikalne są głównym źródłem węgla w aerozolu atmosferycznym. Strumień aerozoli pochodzący z lasów tropikalnych wynosi $(10\text{--}20) \times 10^6$ ton czystego węgla/rok, co jest równoważne sumie strumieni ze źródeł przemysłowych.

Aerozole pełnią ważną rolę w procesach optycznych i hydrologicznych. Pochłaniają i rozpraszają promieniowanie słoneczne; pochłaniają wtórne promieniowanie podczerwone wysyłane przez powierzchnię Ziemi; niektóre frakcje aerozolu spełniają rolę jąder kondensacji dla obecnej w atmosferze pary wodnej. Dzięki aerozolom, powstającym przy udziale biogennych LZO, jest utrzymywany odpowiedni reżim klimatu oraz ciepłoty atmosfery i powierzchni ziemi, a także są wspomagane procesy usuwania osadów z atmosfery.

Inny problem związany z homogenicznym utlenianiem fitogennych LZO dotyczy powstawania nie tylko aerozoli lecz również CO. Tlenek węgla jest gazem aktywnym fizjologicznie oraz „szklarniowym”. Z powodu wyjątkowej aktywności spektralnej globalny bilans CO w atmosferze wzbudza zainteresowanie a badaniem jego źródeł i trendu zajmuje się wiele międzynarodowych programów naukowych z dziedziny biosfero-geosferycznej. Przypuszcza się również, że obecność CO w atmosferze wpływa na zawartość w niej rodników hydroksylowych. Emisja LZO wprost (przez reakcje związków z rodnikami HO \cdot) oraz pośrednio (przez tworzenie CO jako produktu wtórnego) wpływa na obecność różnych gazów w troposferze łącznie z metanem oraz halogenometanem, zaliczonym do niszczylieli ozonu. Wszystko to powoduje, że badanie strumieni CO stało się ważnym, teoretycznym i eksperymentalnym zadaniem.

Badając procesy fotochemicznego utleniania LZO należy uwzględnić również reakcje zachodzące na powierzchni aerozoli. Ten konkurencyjny kierunek reakcji prowadzi do pełniejszego utlenienia związków, skutkiem czego do fazy

gazowej jest wydzielany nie CO ale CO₂ (ISIDOROV 1994). Uwzględnienie tego uściśliłoby wyniki obliczeń splywu do atmosfery CO powstającego w wyniku utlenienia biogenych składników.

WNIOSKI

Jednym z najważniejszych osiągnięć współczesnej nauki o Ziemi jest uznanie, że materia ożywiona (biota) tworzy i podtrzymuje oddziaływania pomiędzy atmosferą a powierzchnią Ziemi. Obecnie wiadomo, że biota reguluje chemiczny skład atmosfery, określając w ten sposób świetlny i hydrologiczny reżim (to znaczy klimat planety) i globalne cykle obiegu pierwiastków chemicznych. Z tego powodu uznano, że poznanie praw funkcjonowania tego układu jest problemem interdyscyplinarnym i nie może być rozwiązane wysiłkami jedynie geofizyków i chemików atmosfery.

Drugim ważnym etapem w poznawaniu biosfery było zainteresowanie się rolą, jaką w globalnych procesach geofizycznych pełnią śladowe składniki atmosfery, tak zwane gazy ppb i ppt (1 ppt — jedna trylionowa z liczby cząsteczek) — do tych ostatnich zaliczają się fitogenne LZO.

Rozpatrując ekologiczną rolę substancji wydzielanych przez rośliny należy wyodrębnić takie zagadnienia:

— poznanie funkcji, jakie LZO pełnią w międzygatunkowych oddziałyvaniach;

— znalezienie odpowiedzi na pytanie o wpływ wywierany na biotę przez produkty chemicznej transformacji LZO w atmosferze. Zasadniczo należałoby rozpatrzyć dwa aspekty: działanie na biotę produktów utlenienia LZO w „czystej” atmosferze i produktów powstających w reakcjach przebiegających w obecności zanieczyszczeń atmosferycznych;

— należy wyjaśnić jak wielką rolę odgrywają fitogenne LZO w ważnych procesach atmosferycznych: tworzeniu świetlnego i hydrologicznego reżimu atmosfery oraz w jej właściwościach utleniających. Jest oczywistym, że te czynniki również wykazują decydujący wpływ na biotę i na jej trwałość.

EMISSION OF VOLATILE ORGANIC COMPOUNDS FROM LIVING PLANTS AND THEIR ECOLOGICAL SIGNIFICANCE

Summary

The paper reviews the role of phytogenic volatile organic compounds (VOC) in formation of ecosystems as one of numerous relationships which have been formed in the course of evolution within the biosphere and which determine its stability. Plants have a mechanism regulating VOC evaporation which is characteristic of each species, thus the existence of a genetic and physiological control of organic compounds emission may be assumed.

Phytogenic VOC participate in formation of tropospheric ozone in a pronounced degree: it may be assumed that the emission of organic compounds is genetically and physiologically controlled. It has been established that O₃ content in the troposphere is a nonlinear function of hydrocarbons and NO_x concentrations.

It is suggested that although lower carboxylic acids contribute considerably to the total acidity of atmospheric precipitation, they do not by themselves exert a negative effect on ecosystems.

The damages observed in forest ecosystems of many densely populated regions of Europe and North America can be explained only by combination of two unfavourable factors: (i) the increased concentration in the atmosphere of peroxides and ozone which destroy cell membranes and enzymes; (ii) nutrient erosion from damaged tissues enhanced by acid precipitation.

LITERATURA

- AKIMOV YU. A., NILOV J., LIŠTVANOVA N. L., 1973. Količestviennoje sodierzanie komponientov efirnych masiel sosny obyknoviennoj i sosny krymskoj v tečenie vegetacii. Rastit. Resursy 9, 562-566.
- ANDRYUKOV V. P., TIMOFEEV A. B., 1989. Assessment of volatile organic components emission from natural sources in Europe. [W:] Contrib. 4th ECE Task Force on Volatile Organic Compounds. Schwetzingen, RFN, 30 May-2 June 1989.
- ANFOSSI D., SANDRONI S., VIARENGO S., 1991. Tropospheric ozone in the nineteenth century: The Moncalieri Series. J. Geophys. Res. 96, 17349-17352.
- AREY J., CORCHNOY S. B., ATKINSON R., 1991. The emission of (z)-3-hexene-1-ol, (z)-3-hexenylacetate and other oxygenated hydrocarbons from agricultural plant species. Atmos. Environ. 25A, 1063-1075.
- ARPINO P., van DORSSELAER A., SEVIER K. D., OURISSON G., 1972. Cires aériennes dans une forêt de Pins. Compt. Rend. Akad. Sci. 275D, 2837-2840.
- BARDYŠEV I. I., ZENKO R. I., GORBACEVA I. V., VASILKOVA G. I., KARAGUN T. P., 1969. Svojstva i chimičeskij sostav skupidarov vydienennyh iz živicy sosny obyknoviennoj proizrastajuščej v različnyh rajonach Sovjetskogo Sojuza. Gidrolizn. Lesochim. Prom. 7, 17-18.
- BECKER K. H., BROKMAN K. J., BECHARA J., 1990. Production of hydrogen peroxide in forest air by reaction of ozone with terpenes. Nature 346, 256-258.
- BUGAŁA M., KUCZYŃSKI H., 1952. Badania nad składem polskich terpentyn z Pinus silvestris L. Roczn. Chem. 26, 54-86.
- CACHIER H., BUAT-MENARD P., FONTUGNE M., RANCHER J., 1985. Source terms and source strengths of the carbonaceous aerosol in the tropics. J. Atmos. Chem. 3, 469-489.
- CLAIRAC B., DELMAS R., CROS B., CACHIER H., BUAT-MENARD P., SERVANT J., 1988. Formation and chemical composition of atmospheric aerosols in an equatorial forest area. J. Atmos. Chem. 6, 301-322.
- CHOLODNVY N. G., 1943. O vydelenii letučich organičeskich sojedinjenij živymi organizmami i ob usvojenii ich mikrobnami počvy. DAN 41, 416-418.
- CHOLODNVY N. G., 1944. Letučie vydelenia zvietkov i listiev kak istočnik pitania mikroorganizmov. DAN 43, 75-78.
- CLEMENT B., RIBA M. L., LEDUC R., HAZIZA M., TORRES L., 1990. Concentration of monoterpenes in a maple forest in Quebec. Atmos. Environ., 24A, 2513-2516.
- ČURKIN S. M., BARAKOV T. W., STEPEN R. A., ČERNIAKOVA G. N., 1976. Metodika issledovanija kacestviennovo sostava letučich vydienienij dreviesnyh rastienij. Chimia Prirodn. Sojed. 2, 260-261.
- EDMONDS E., BASABE J., 1989. Ozone concentrations above a Douglas fir forest canopy in western Washington, USA. Atmos. Environ. 23, 625-629.
- ERICKSON L. C., WEDDING T. R., 1956. Effects of ozonated hexene on photosynthesis and respiration of Lemna minor. Amer. J. Bot. 43, 32-36.
- EVANS R. C., TINGEY D. T., GUMPERTZ M. L., BURNS W. F., 1982. Estimates of isoprene and monoterpene emission rates in plants. Bot. Gazette 134, 304-310.
- FEHSENFELD F., CALVERT J., FALL R., GORDAN P., GUENTHER A. B., HEWITT C. H., LAMB B., LIU S., TRAINER M., WESTBERG H., ZIMMERMAN P., 1992. Emissions of volatile organic compounds from vegetation and the implication for atmospheric chemistry. Global. Biogeochem. Cycles 6, 389-480.
- FINLAYSON-PITTS B. J., PITTS J. N. Jr., 1986. Atmospheric Chemistry. J. Wiley, New York, 1097 pp.
- GENDERS R., 1977. Scented Flora of World. London, New York, 560 pp.
- GOLOVINA E. G., IVLEV L. S., SIROTA V. E., KLIMOŠEVSKA E. I., 1985. Nabludenia fotochimičeskoi dymki v dolinie r. Ob. Meteorol. Gidrol. 11, 107-109.
- HAFSTRA G., BECKERSON D. W., 1981. Folliar responses of five plant species to ozone and sulfur dioxide mixture after a sulfur dioxide pre-exposure. Atmos. Environ., 15, 383-389.
- HATAKEYAMA Sh., IZUMI K., FUKUYAMA T., AKIMOTO H., 1989. Reactions of ozone with α -pinene and β -pinene in air: yields of gaseous and particulate products. J. Geophys. Res. 94D, 13013-13024.
- HECK W. W., TAYLOR O. C., ADAMS R. et al., 1982. Assessment of crop loss from ozone. J. Air Pollut. Contr. Assoc. 32, 353-361.

- HILL A., HEGGERSTAD A. E., LENSON S. N., 1970. *Recognition of air pollution injury to vegetation*. J. Air Pollut. Contr. Assoc. 14, 49-71.
- IOFFE B. V., ISIDOROV V. A., 1982. *Organičeskie sojedinienia v atmosfere Zemli*. Priroda 7, 68-77.
- ISIDOROV V. A., 1990. *Organic Chemistry of the Earth's Atmosphere*. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 218 pp.
- ISIDOROV V. A., 1994. *Letuščie vydelenia rastienij: Sostav, skorost emissii i ekologičeskaia rol*. Alga-Fond, S. Peterburg, 190 pp.
- ISIDOROV V. A., ZENKEVICH I. G., IOFFE B. V., 1985. *Volatile organic compounds in the atmosphere of forests*. Atmos. Environ. 17, 1-8.
- KAMENS R. M., GERY M. W., JEFFRIES H. E., JACKSON M., COLE E. J., 1982. *Ozone-isoprene reactions: Product formation and aerosol potential*. Int. J. Chem. Kinet. 14, 955-975.
- KILLUS J. P., WHITTEN G. Z., 1984. *Isoprene: A photochemical kinetic mechanism*. Environ. Sci. Technol. 18, 142-148.
- KINTIA P. K., FADEEV YU. M., AKIMOV YU. A., 1990. *Terpenoidy rastienij*. Štlinza, Kišinev.
- KORITZ H. G., WENT F. W., 1953. *The physiological action of smog on plants. I. Initial and transpiration studies*. Plant Physiol. 28, 50-62.
- LAMB B., GUENTHER A., GAY D., WESTBERG H., 1987. *A national inventory of biogenic hydrocarbon emission*. Atmos. Environ. 21, 1695-1705.
- LOYD A. C., ATKINSON R., LURMANN F. W., NITTA B., 1983. *Modeling potential ozone impacts from natural hydrocarbons. I. Development of a chemical mechanism for the NO_x-air photooxidations of isoprene and α -pinene under ambient conditions*. Atmos. Environ. 17, 1931-1950.
- LOPEZ A., FONTAN J., BARTHMEUF M. O., 1985. *Study of the formation of particles from natural hydrocarbons released by vegetation*. J. Rech. Atmos. 19, 295-307.
- LÜBKERT B., SCHÖPP W., 1989. *A model to calculate natural VOC emission from forests in Europe*. IIASA WP-89-082.
- LÜBKERT B., DE TILLY S., 1989. *The OECD-map emission inventory for SO₂, NO_x and VOC in Western Europe*. Atmos. Environ., 23, 3-15.
- MARENCO A., GOUGET H., NEDELEC Ph., PAGES J. -P., 1994. *Evidence of a long-term increase in atmospheric ozone from Pic du Midi data series. Consequences: Positive radiative forcing*. J. Geophys. Res. 99 8D, 16617-16632.
- MACKENZIE A. R., HARRISON R. M., COLBECK I., HEWITT C. N., 1991. *Atmos. Environ.* 25A, p. 351.
- METZNER H., 1987. *Beeinflussung des Zellschtoffwechsels von Coniferennadeln durch Peroxide und saurebildende Ionen*. [W:] 8 Seminar-Bericht „Waldschaden/ Luftverunreinigungen“, Schmollenberg-Grafschaft (RFN) 15-16 October 1987, p243-255.
- MEUSER H. A., HEGGESTAD H. E., 1986. *Ozone and Sulfur dioxide synergism: Injury to tobacco plants*. Science, 153, 424-425.
- MÖLLER D., 1989. *The possible role of H₂O₂ in new type forest decline*. Atmos. Environ. 23, 1625-1627.
- MUDD J. B., 1979. *Oxidation of hydrosulfide groups by the nitrogen oxides and ozone*. [W:] Proc. 1st Europ. Congr. on Influence of Air Pollut. on Plant and Animals, Washington, 1979, p. 161.
- NILOV V. I., 1928. *O količestvienných opriedelenijach efirnych masiel, isparijajemych rastienijami na vozduch, v sviazii s vyjasnienijem roli etich vieščestv*. Nauczno-Agronomicz. Zurn. N4, 810-818.
- PEHÁK F., 1973. *Studium fziologicke útnosti volatílñich látek vyssich rostlin*. Folia Prirodoved. Fak. UJEP Brno 12, 101pp.
- PORUCKIJ G. V., LUČKO A. S., MATKOVSKIJ K. I., 1962. *O sodieržanii etilenovych uglevodorodov v letučych vydeleniach rastenii*. Fiziol. Rast. 9, 482-485.
- RASMUSSEN R. A., 1970. *Isoprene: Identification as a forest-type emission to the atmosphere*. Environ. Sci. Technol. 4, 667-671.
- RASMUSSEN R. A., 1972. *What do the hydrocarbons from trees contribute to air pollution?*. J. Air Pollut. Contr. Assoc. 22, 537-543.
- RASMUSSEN R. A., KHALIL M. A. K., 1988. *Isoprene over the Amazon basin*. J. Geophys. Res. 93 D, 1417-1421.
- RICE E. L., 1984. *Allelopathy*. Orlando et. al., Acad. Press, 422pp.
- ROSS H. B., JOHANSSON Ch., DE SERVES C., LIND J., 1992. *Summertime diurnal variations of atmospheric peroxides and formaldehyde in Sweden*. J. Atmos. Chem. 14, 411-423.
- SANADZE G. A., 1960. *Vydelenie rasteniami letučych organičeskich veščestv*. Izd. A. N. Gruz. SSR., Tbilisi.
- SANADZE G. A., DOLIDZE G. M., 1958. *Mass-spekrometričeskij analiz letučych fitogennyh veščestv*. Soobšč. A. N. Gr. SSR 21, 183-186.

- SANADZE G. A., DOLIDZE G. M., 1961. *Mass-spekrometričeskaja identifikacija soedinenij tyra C₅H₈ (izoprena) v letučych vydeleniach listiev rastenij*. Soobšč. A. N. Gr. SSR27, 747-750.
- SCHÜTT P., COWLING E. B., 1985. *Waldsterben, a general decline of forests in Central Europe: Symptoms, development and possible causes*. Plant Disease 69, 548-588.
- SIMONET B. R. T., 1986. *Characterization of organic constituents in aerosols in relation to their origin and transport*. Int. J. Environ. Analyt. Chem. 23, 207-237.
- SIMONET B. R. T., 1989. *Organic matter of the thoposphere. V. Application of molecular marker analysis to biogenic emissions into to troposphere for source reconstructions*. J. Atmos. Chem. 8, 251-275.
- SIMONET B. R. T., GUOYING SHENG, XIAOJING CHEN, JIAMO FU, JIAN ZHANG, JUPIN XU, 1991. *Molecular marker study of extractable organic matter in aerosols from urban areas of China*. Atmos. Environ. 25A, 2111-2129.
- SIMPSON D., ARNTS R. R., 1990. *Natural hydrocarbon emission in Europe*. [W:] Proc. 2-nd US/RFN Workshop on Photochemical Ozone Problem and its Control. June 5-8. 1990, Carolina Inn Chapel Hill, NC. USA.
- SINGH H. B., ZIMMERMAN P., 1992. *Atmospheric distribution and sources of nonmethane hydrocarbons*. [W:] Gaseous Pollutants. Characterization and Cycling. Ed. by J. O. Nriagu. J. Wiley and Sons Inc., pp177-235.
- SPACHOVA A. S., 1972. *O chemičeskom sostavie letučych vydelenij drevesnych rastenij*. [W:] Osnovy chimč. vzalmod. rastenij v fitocenozach. Naukova Dumka, Kijev.
- TODD G. W., PROPST B., 1963. *Changes in transpiration and photosynthetic rates of various leaves during treatment with ozonated hexene*. Physiol. Plant. 16, 57-65.
- TOKIN B. P., 1946. *Verojatnaia rol fitoncidov v prirode*. Priroda 4, 29-38.
- TRAINER M., HSIE E. Y., MCKENN S. A., TALLAMRAJU R., PARRISH D. D., FEHSENFELD F. C., LIU S. C. 1987. *Impact of natural hydrocarbons on hydroxyl and peroxy radicals at a remote site*. J. Geophys. Res. 92 D, 11879-11894.
- TRAINER M., BUHR M. P., CURRAN C. M., FEHSENFELD F. C., HSIE E. Y., LIU S. C., NORTON R. B., PARRISH D. D., WILLIAMS E. J., GANDRUD B. W., RIDLEY B. A., SHETTER J. D., ALLWINE E. J., WESTBERG H. H., 1991. *Observation and modeling of the reactive nitrogen photochemistry at a rural site*. J. Geophys. Res. 96D, 3045-3063.
- VOLZ A., KLEY D. 1988. *Evaluation of the Montsouris series of ozone measurements made in the hineteenth century*. Nature, 332, 240-242.
- WENT F. W. 1960. *Blue haze in the atmosphere*. Nature 187, 641-643.
- WENTZEL V. F, 1985. *Hypothesen und Theorien zum Waldsterben*. Forstarchiv. 56, 51-56.
- WILS E. R. J., HULST A. G., den HARTOG J. C., 1982. *The occurence of plant wax constituents in airborne particulate matter in an urbanized area chemosphere*. Chemosphere 11, 1087-1096.
- WINER A. M., AREY J., ATKINSON R., ASCHMANN S. M., LONG W. D., MORRISON C. L., OLSZYK D. M., 1992. *Emission rates of organics from vegetation in California's Central Valley*. Atmos. Environ. 24A, 2647-2659.
- YOKOUCHI Y., AMBE Y., 1985. *Aerosol formed from the chemical reaction of monoterpens and ozone*. Atmos. Environ. 19, 1271-1276.
- ZIMMERMAN P. R., CHATFIELD R. B., FISHMAN J., CRUTZEN P., HANST P. L., 1978. *Estimates on the production of CO and H₂ from the oxidation of hydrocarbon emission from vegetation*. Geophys. Res. Lett. 5, 679-682.
- ZWOŹDZIAK J., ZWOŹDZIAK A., KMIĘC G., 1994. *Analiza stężeń ozonu w powietrzu w Worku Żytauskim i w Górach Izerskich*. Ochrona Powietrza, 5, 125-130.
- ŽULANOV YU. V., 1986. *Izsledovanie fiziko-chemičeskich procesov formirovania prirodnoj dymki*. Izv. AN SSSR FAO 22, 616-625.

SŁAWOMIR KOZIEŁ

Zakład Antropologii PAN

Kuźnicza 35, 50-951 Wrocław

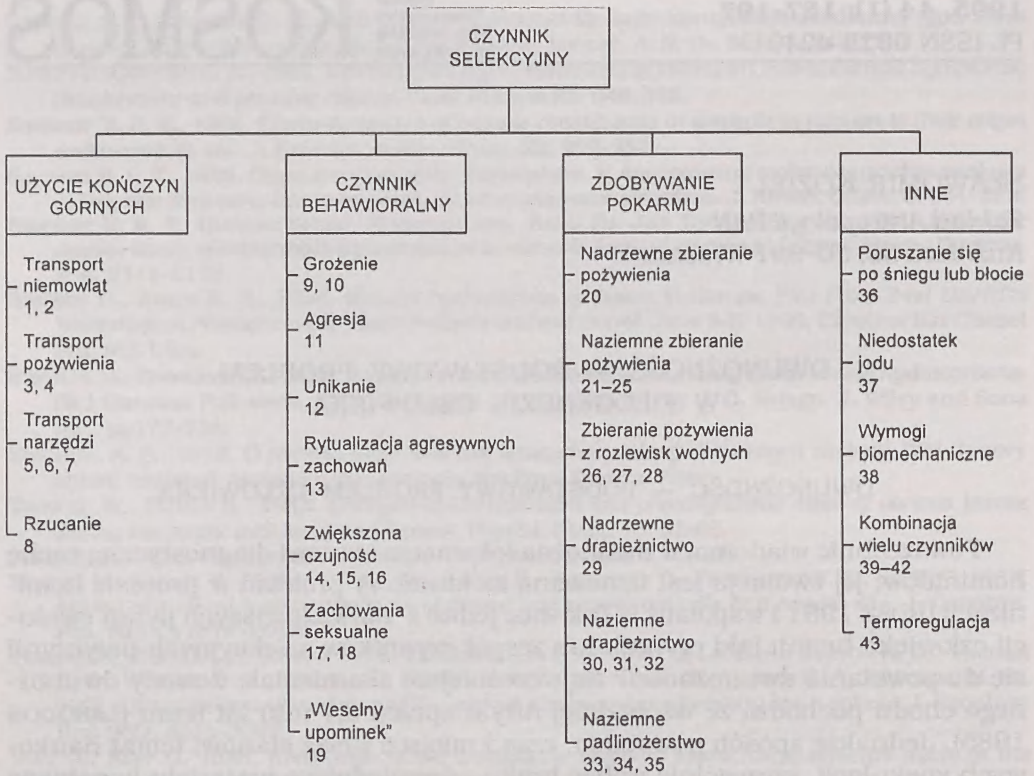
DWUNOŻNOŚĆ — PODSTAWOWY PROBLEM
W FILOGENEZIE CZŁOWIEKA

DWUNOŻNOŚĆ — PODSTAWOWY PROBLEM CZŁOWIEKA

Powszechnie wiadomo, iż dwunożna lokomocja stanowi diagnostyczną cechę hominidów, jej ewolucja jest uznawana za kluczowy problem w procesie hominizacji (ROSE 1991 i współaut.). Tak więc jedno z najważniejszych pytań ewolucji człowieka brzmi: jaki czynnik lub zespół czynników selekcyjnych przyczynił się do powstania dwunożności? Najwcześniejsze skamieniałe dowody dwunożnego chodu pochodzą ze wschodniej Afryki sprzed 3,7 mln lat temu (LANGDON 1985). Jednakże sposób powstania, czas i miejsce wciąż stanowi temat naukowych spekulacji, szczególnie wobec braku odpowiedniego materiału kopalnego z okresu 14-5 mln lat. Historia naukowej myśli próbującej wyjaśnić powstanie dwunożności zawiera wiele teorii opartych na dorobku różnych dziedzin nauki, które w sposób ogólny opisują ów proces, ale nie wyjaśniają go w pełni. Spekulatywny charakter nadaje im brak wielu nie znanych bezpośrednio faktów, dotyczących szczególnie morfologii, etologii i ekologii ostatniego wspólnego przodka *Panidae* i *Hominidae* (MCHENRY 1982). Wydaje się bardzo mało prawdopodobne, aby dwunożny chód był wynikiem pojedynczej lub nawet kilku mutacji genetycznych, czy dryfu genetycznego małej, izolowanej populacji. Różnorodność proponowanych hipotez, próbujących rozwickłać przyczynę powstania dwunożności przedstawia rys. 1. Niektóre z nich omówię w dalszej części pracy.

UŻYWANIE PRZEDMIOTÓW JAKO NARZĘDZI LUB BRONI

Rozwijając myśl podjętą już przez Darwina wielu autorów było przekonanych, że zwolnienie kończyn górnych z funkcji lokomotorycznej w celu posługiwania się prostymi przedmiotami jako narzędziami, bronią, czy też w celu wykonywania innych czynności było głównym czynnikiem, który spowodował wykształcenie dwunożnego chodu (BARTHLOMEW i BIRDSEL 1953, CARTER 1953, HILL 1954, SHARPIO 1956, WASHBURN 1960 cytuje według HEWES 1961 oraz DeVORE 1964 cytuje według JOLLY 1970). Jedni badacze podkreślali ważność posługiwania się narzędziami, inni koncentrowali się na problemie używania broni. Należy zauważyć, że użyte tutaj określenie „narzędzie”, czy „broń” oznacza kamień, kość zwierzęcą lub fragment drzewca. Tak więc różnica pomiędzy tymi określeniami



Rys. 1. Schemat przedstawiający spektrum czynników selekcyjnych proponowanych przez różnych autorów w celu wyjaśnienia powstania dwunożności; cytuję według ROSE 1991 (1 — ETKIN 1954; 2 — IWAMOTO 1985; 3 — HEWES 1961; 4 — LOVEJOY 1981; 5 — BARTHOLEMEW i BIRDELL 1953; 6 — WASHBURN 1967; 7 — MARZKE 1986; 8 — FIFER 1987; 9 — LIVINGSTONE 1962; 10 — WESCOTT 1967; 11 — KORTLANDT 1980; 12 — REYNOLDS 1931; 14 — DART 1959; 15 — DAY 1977; 16 — RAVEY 1978; 17 — GUTHRIE 1970; 18 — MONTGOMERY 1988; 19 — PARKER 1987; 20 — HUNT 1990; 21 — DE BRUL 1962; 22 — JOLLY 1970; 23 — WRANGHAM 1980; 24 — ROSE 1984; 25 — WUNDRAM 1986; 26 — HARDY 1960; 27 — MORGAN 1982; 28 — VEERHAEGEN 1985; 29 — EICKHOFF 1988; 30 — GEIST 1978; 31 — MERKER 1984; 32 — CARRIER 1984; 33 — SZALAY 1975; 34 — SHIPMAN 1986; 35 — SINCLAIR i współaut. 1986; 36 — KHOLER 1959; 37 — MARETT 1936; 38 — REYNOLDS 1985; 39 — NAPIER 1963; 40 — SIGMON 1971; 41 — ROSE 1984; 42 — DAY 1986;). Także uzupełniono: 13 — JABLONSKI i CHAPLIN 1993; 43 — WHEELER 1984.

zawiera się w ich wykorzystaniu, a nie w ich budowie. Mogły być przecież używane zamiennie w zależności od potrzeby, wpływając tak samo na przyjmowaną postawę ciała (HOLLOWAY 1967). Powyższe teorie niezbyt jasno precyzują co było skutkiem, a co przyczyną. Najwcześniejsze dane paleoantropologiczne, na podstawie których można stwierdzić używanie narzędzi, pochodzą sprzed 2 mln lat (LOVEJOY 1981), a ślady dwunożności — sprzed 3,7 mln lat. Ponadto przeciwko opisanym modelom można przytoczyć następujące argumenty: 1) prymaty posiadają duże zdolności manualne, niektóre, jak na przykład szympansy, posługują się prostymi narzędziami (GOODALL 1974), lecz nie poruszają się stale dwunożnie; 2) zachowania łowieckie nie są uwarunkowane użyciem

broni (LOVEJOY 1981); 3) odpowiednia struktura socjalna grupy zapewnia taki poziom bezpieczeństwa, że użycie przedmiotów do obrony nie było konieczne (BIELICKI 1969). Słusznym wydaje się twierdzenie, że najpierw powstała dwunożność stwarzając możliwości do późniejszego używania przedmiotów jako narzędzi lub broni. W 1987 roku FIFER przedstawił „hipotezę rzucania”. Autor dowodzi, iż dwunożność rozwinęła się jako strukturalne i funkcjonalne przystosowanie do rzucania pociskami, co miało decydujące znaczenie dla przeżycia prehominidów. Fifer opiera swoją argumentację na kilku nietypowych cechach układu kostno-mięśniowego człowieka wymuszonych poprzez rozwijający się mechanizm miotania pociskami, podkreślając specyficzną sytuację ekologiczną wczesnych hominidów faworyzującą takie zachowania oraz pewną analogię takich zachowań u współczesnych szympansov. Otóż, bezsprzecznie pierwszymi bipedami były australopiteki i to właśnie ich „anomalia” budowy układu kostno-szkieletowego (a te nie były analizowane przez Fifer’a w odniesieniu do tej hipotezy) byłyby odpowiednimi argumentami, a nie budowa anatomiczna *Homo sapiens*, który pojawił się zaledwie 100–200 tys. lat temu. Fakt, iż wiele innych naczelnych okazjonalnie rzuca przedmiotami w celu odstraszenia drapieżnika, a nie porusza się stale dwunożnie można zinterpretować następująco: zagrożenie drapieżnikami nie stanowi kluczowego problemu dla przeżycia tych naczelnych, tak więc nie ma wyraźnej presji w kierunku doskonalenia takiego zachowania. Inaczej mówiąc, koszty ewolucyjne takiego zachowania przewyższyłyby płynące z tego korzyści.

ROZSZERZONE POLE WIDZENIA

Dla wielu autorów czynnikiem faworyzującym wyprostowaną postawę jest zwiększenie pola widzenia (COON 1954, OAKLEY 1954, DART 1959 cytując według HEWES’A 1961). Teoria zakłada, że przyjmowanie wyprostowanej postawy w mało bezpiecznym środowisku ułatwiało poszukiwanie pokarmu i kontrolę nad drapieżnikami. Wcześniej dostrzeżony drapieżnik nie stwarza wysokiego zagrożenia i pozostaje czas na ucieczkę lub bezpieczne schronienie. Słabość tej teorii leży w sporadyczności takich zachowań u naczelnych. Żyjące dziś małpiatki i małpy przyjmują wyprostowaną postawę w celu skontrolowania otoczenia, a nie są dwunożnymi istotami. Istnieją także pewne dane anatomiczne przemawiające przeciw tej hipotezie, otóż dwunożność utrudnia szybką ucieczkę przed dostrzeżonym drapieżnikiem, a wyeliminowana u australopiteków przeciwstawność palucha stopy, tym samym chwytność stopy, utrudnia ewentualną ucieczkę na drzewo. Tak więc powstałaby pewna sprzeczność: zwiększyłyby się możliwości dostrzeżenia drapieżnika, ale zmniejszyłyby się jednocześnie możliwości ucieczki przed nim (BIELICKI 1969).

DOSTĘPNOŚĆ POKARMU I SPOSÓB ODŻYWIANIA

Jedną z bardziej oryginalnych hipotez przedstawił JOLLY (1970), opierając się na analogii ewolucyjnej dyferencjacji *Hominidae* i *Pongidae* oraz *Theropithecus* i *Papio*. Obie linie *Hominidae* i *Theropithecus* odłączyły się od wspólnych przodków i wykazywały paralelizm adaptatywnego kompleksu cech pod wpływem działania tego samego środowiska. Hipoteza ta została zmieniona i uzupeł-

niona przez WRANGHAM'A (1980) i ROSE'A (1976, 1991), a streścić można ją następująco: bipedia pojawiła się jako naziemna behawioralna pozycja pozwalająca zdobywać pokarm umieszczony na drzewach lub krzewach, a jednocześnie ten sposób lokomocji pomiędzy źródłami pokarmu (drzewami, krzewami) redukował wydatek energetyczny. Znalazła ona poparcie w etologii naczelnych, jak i w danych dotyczących środowiska wczesnych homonidów.

MIGRACJA I TRANSPORT

Zakładając, iż dieta mięsna miała decydujące znaczenie w procesie hominizacji SINCLAIR i współautorzy (1986) przedstawili migracyjną teorię powstania dwunożności. W myśl tej hipotezy wczesne hominidy podążające za źródłem pokarmu, a więc za stadami migrujących ssaków kopytnych, zmuszone do przenoszenia potomstwa, poruszały się dwunożnie. W takim ujęciu bezpośrednim czynnikiem selekcyjnym prowadzącym do powstania dwunożnego chodu byłaby opieka nad potomstwem, angażująca kończyny górne. Jednak niektóre cechy budowy kończyn dolnych oraz uzębienia *Australopithecus* sp. wyraźnie przeczą tej hipotezie. Otóż poruszały się one w pełni dwunożnie, a jednocześnie ich uzębienie wskazuje na wysoki poziom diety roślinnej (MCHENRY 1982). Ponadto nie ma ani morfologicznych, ani archeologicznych dowodów na wyraźną mięsną dietę tych hominidów (LAUTENEGGER 1987). VEERHAEGEN (1987) uważa, że w tym okresie ewolucji przedstawiciele hienowatych (*Hyaenidae*), kotów (*Felidae*) i psów (*Canidae*) oraz sępów (*Gypaetinae*) były znacznie lepiej przystosowane do zajęcia takiej niszy ekologicznej niż *Hominidae*. Przyniesione fakty przeczą również teorii HEWES'A (1961). Autor uważa, iż transport ciężkich fragmentów mięsa lub innego rodzaju pożywienia, w celu uniknięcia drapieżników i konkurencji, stanowił czynnik selekcyjny prowadzący do powstania dwunożności. Bardziej wypracowany model oparty o demografię, ekologię i zachowania socjalne ssaków, który zakłada, podobnie jak w opisanych wyżej hipotezach, konieczność transportu dużych i ciężkich „ładunków” wymagających wyprostowanej postawy, przedstawił LEVEJOY (1981). Autor wykazał, iż aby zwiększyć sukces reprodukcyjny musiałoby się zwiększyć przeżywalność osobników i skrócić czas pomiędzy kolejnymi porodami. Jego zdaniem, u podłoża tej strategii rozrodczej leży monogamiczna struktura rodziny oraz dwunożny transport pożywienia. Jednak wszystkie dziś znane fakty wskazują na poligamię wczesnych hominidów. MCHENRY (1991) wykazał, że stopień dymorfizmu płciowego ciężaru ciała u *Australopithecus afarensis* (152%) jest mniejszy od *Gorilla gorilla* (209%) i *Pongo pygmeus* (203%), a nieco większy od *Pan paniscus* (144%). Opierając się na zależności stopnia dymorfizmu płciowego od stopnia poligamii można wykluczyć monogamię australopiteków. Ponadto u żadnego z gatunków naczelnych nie są znane zachowania samca, który by dostarczał pożywienia samicy z młodymi (WITTENBERGER i TILSON 1980 cytuje według MCHENRY 1982).

AGRESYWNE ZACHOWANIA SOCJALNE

LIVINGSTONE (1962) i WESCOTT (1967), a później GUTHRIE (1970) i SIMSONS (1972) wywodzili powstanie bipedii z analogicznych zachowań odstrasżających goryla górskiego u prehominidów (cytuje według JABLONSKI i CHAPLIN 1993). Ideę

tę rozwinęli i dopracowali JABLONSKI i CHAPLIN (1993). Ich zdaniem u prehomini-dów, które znalazły się w nowym naziemnym środowisku, zachowania agresywne były znacznie częstsze i intensywniejsze. Rytualizacja tych zachowań doprowadziła do powstania dwunożnego chodu. Poglądy jakie prezentują JABLONSKI i CHAPLIN (1993) wydają się być dużym uproszczeniem. Już JOLLY (1970) słusznie zauważył, że nielogicznym jest powoływać się na behavior żyjących małp Starego Świata w celu wyjaśnienia powstania czegoś, czego one same nie prezentują. W dużym uproszczeniu teoria ta nawiązuje do hipotezy „rozszerzonego pola widzenia”. Jeśli istniała nadmierna agresja osobników, to byłaby ona zredukowana przez odpowiednią strukturę socjalną, a nie poprzez niedoskonałą lokomocyjnie dwunożną postawę. Taka redukcja ma miejsce w przypadku prymatów prowadzących naziemny tryb życia (rodzaje *Papio*, *Theropithecus*). A jeśli nawet, to agresję, która jest uwarunkowana genetycznie, odziedziczyłyby po wspólnym przodku zarówno człowiek, jak i antropoidy. Skądinąd wiadomo, że goryl, jak i orangutan nie są agresywne, a szympansy, w porównaniu z pawianami czy makakami, przejawia umiarkowaną agresję.

SPÓSÓB LOKOMOCJI A WYDATKOWANA ENERGIA

Badania empiryczne dowiodły, iż dwunożna, jak i czworonożna lokomocja szympansa *Pan tryglodytes* i kapucyny *Cebus capucinus* zużywa tyle samo energii (TAYLOR i ROWNTREE 1973). Ten sam poziom kosztów energetycznych dwunożnej, jak i czworonożnej lokomocji hominoidów można zinterpretować jako brak energetycznej przeszkody w stosowaniu dwunożnego chodu. Inaczej mówiąc, wydajność energetyczna dwunożności musiała być ważnym czynnikiem prowadzącym do jej powstania (RODMAN i MCHENRY 1980). Można więc przyjąć, iż nie istniała energetyczna „bariera” przeciwna działaniu czynnika selekcyjnego prowadzącego do dwunożności.

ZABEZPIECZENIE MÓZGOWIA PRZED STRESEM TERMICZNYM

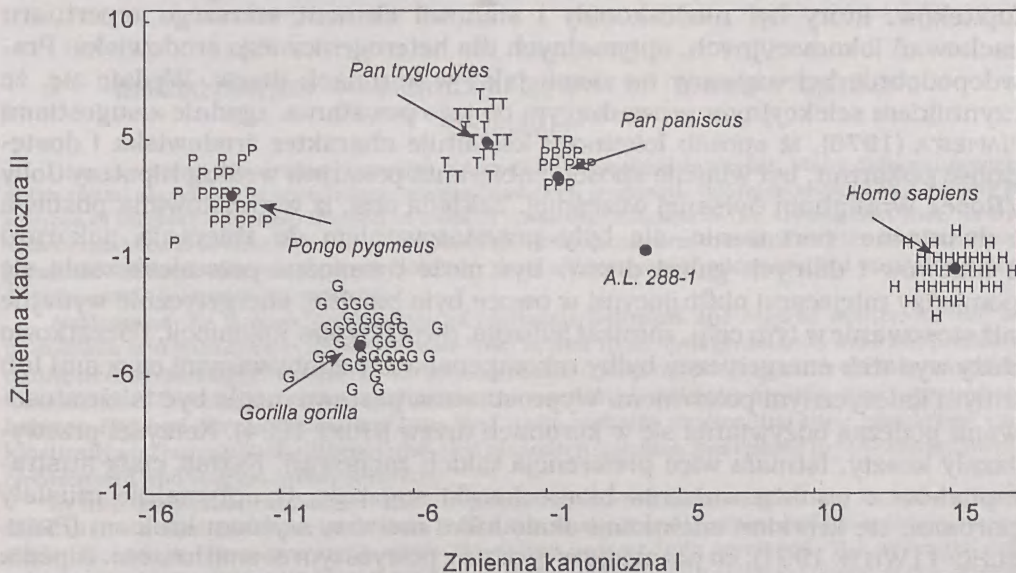
Termoregulacyjną teorię powstania bipedii zaproponował WHEELER (1984, 1985). Hypertermia w otwartej, równikowej sawannie stanowi poważny problem dla żyjących tam ssaków, stosunkowo łatwo upośledzając działanie ich ośrodkowego układu nerwowego. Większość dużych i średnich ssaków sawanny chroni mózgowie przed przegrzaniem poprzez utratę ciepła przez parowanie wilgotnej śluzówki w nozdrzach i kierowanie ochłodzonej krwi do zatoki szyjnej, gdzie żylna krew ochładza krew tętniczą idącą do mózgowia splotem szyjnym. Z powodu redukcji twarzoczaszki, a tym samym jamy nosowej oraz braku splotu szyjnego i stosunkowo dużego mózgowia względem ciężaru ciała prehominidy były szczególnie narażone na stres termiczny. W myśl teorii Wheeler'a, dwunożny sposób lokomocji stanowił zabezpieczenie przed hypertermią z co najmniej z dwóch powodów: po pierwsze, redukuje znacznie powierzchnie absorpcji bezpośrednich promieni słonecznych podczas największego nasłonecznienia dziennego, po drugie, większość powierzchni ciała jest umieszczona wyżej nad gruntem, gdzie występuje większa cyrkulacja powietrza, mniejsza wilgotność, niższa temperatura.

ŚRODOWISKO WCZESNYCH HOMINIDÓW

Większość przedstawionych hipotez powstania dwunożnego chodu zakłada, iż od środkowego do późnego miocenu, to jest około 15–5 mln lat temu, obszary lasu tropikalnego w Afryce uległy redukcji i zostały zastąpione obszarami suchego, rzadkiego lasu, a głównie sawanną z sezonowymi opadami (AXELROD i RAVEN 1978, LAPORTE i ZIHLMAN 1983 cytując według CERLING i współaut. 1991). Tak więc odwołują się one do warunków sawanny. Powyższe przesunięcie klimatu jest związane z globalną zmianą zarejestrowaną w dennych osadach oceanów i nie uwzględnia dużego wpływu na cyrkulację prądów atmosferycznych lokalnych czynników, takich jak: unoszenie skorupy, działalność wulkaniczną oraz zmiany wywołane działalnością ryftową (KINGSTON i współaut. 1994). Te czynniki mogły powodować lokalną stabilizację klimatu lub pewne jego anomalie. Analiza zawartości izotopu węgla δ^{13} w osadach węglanowych i materii organicznej daje wiarygodny obraz paleośrodowiska. Afryka Wschodnia podczas późnego miocenu prezentowała heterogeniczne, mozaikowe środowisko, gdzie otwarta sawanna nigdy nie stanowiła dominującego biomu (KINGSTON i współaut. 1994). Ekosystem jaki dzisiaj istnieje w Serengeti pojawił się dopiero w środkowym plejstocenie (CERLING i współaut. 1991). Podobne wyniki uzyskali RETALLACK i współautorzy (1990), którzy dokonali rekonstrukcji paleośrodowiska w Fort Ternan w południowo-zachodniej Kenii. Gęste i parkowe lasy były obecne w Afryce w środkowym i późnym miocenie i przetrwały po dzień dzisiejszy w wilgotniejszych obszarach. Struktura gleby i taksonomia traw wskazuje na mozaikowe środowisko, gdzie trawiastą roślinność od 10% do 40% pokrywały drzewa. Obraz ten potwierdza fauna kopalnych ślimaków z tego obszaru, na podstawie której oszacowano roczne opady na 660–1520 mm (PICKFORD 1983). Także VRBA (1985) w swych badaniach wskazuje na gęste środowisko roślinne w późnym miocenie w Afryce Wschodniej i Południowej. Stepowienie środowiska o łagodnym charakterze nastąpiło dopiero około 2,52–2,4 mln lat temu. HARRIS (1985) na podstawie badań fauny towarzyszącej szczątkom hominidów z Hadar i Laetoli wskazuje na otwartą sawannę z rozrzuconymi drzewami o rocznych opadach w granicach 600–1000 mm. Te dane pozostają w dużym kontraście z pozostałą przyrzeczną fauną plioceną rowu afrykańskiego, wskazując na heterogeniczność środowiska hominidów. Ciekawe wyniki otrzymali RAYNER i współautorzy (1993) rekonstruując środowisko doliny Makapansgat w Afryce Południowej, gdzie licznie występował *A. africanus*. Obszar ten w owym czasie charakteryzowały wysokie opady deszczu (200%–300% więcej niż dzisiaj), gruba, żyzna, alkaliczna gleba pokryta subtropikalnym lasem. W świetle powyższych danych powszechne przekonanie, iż dwunożność, jako podstawowa cecha rodziny *Hominidae*, powstała jako adaptatywne przystosowanie do otwartego środowiska sawanny wydaje się niezupełnie słuszny. Na tej też podstawie można więc kwestionować niektóre z wyżej przedstawionych hipotez powstania bipedii.

LOKOMOCJA WCZESNYCH HOMINIDÓW

Innym istotnym kryterium oceny słuszności wspomnianych teorii może być charakter lokomocji pierwszych hominidów (*A. afarensis* i *A. africanus*). Mimo iż nie wątpi się w dwunożność australopiteków, to jednak rosnąca lista cech prymitywnych (to jest zbliżonych do małpich lub poza zakresem zmienności cech ludzkich), związanych z ich lokomocją, skłania badaczy do twierdzenia, że bipedia tych zwierząt była jedynie zbliżona do ludzkiej, a nadrzewna lokomocja równie często stosowana (JUNGERS 1982, 1988, 1991, JUNGERS i STERN 1983, STERN i SUSMAN 1983, SUSMAN i współaut. 198, LATIMER 1991, MCHENRY 1991, SCHMID 1991, BERGE 1994). Są wymieniane następujące cechy: szeroki, płytki, stożkowaty tułów (SCHMID 1991), *fossa glenoidalis* zwrócona ku górze (STERN i SUSMAN 1983), duży zakres ruchów nadgarstka (MCHENRY 1991), paliczki ręki brzusznie wygięte (STERN i SUSMAN 1983), stosunek długości kończyn górnych i dolnych pośredni pomiędzy człowiekiem a szympansem (JUNGERS 1991), mała powierzchnia przekroju kręgosłupa (MCHENRY 1991), długie wygięte paliczki stopy (STERN i SUSMAN 1983; MCHENRY 1991), krótkie kończyny dolne (JUNGERS 1991), nienaturalnie szerokie biodra (RAK 1991), mała powierzchnia głowy kości udowej (MCHENRY i CORRUCINI 1978). Analiza 47 cech postkranialnych człowieka, *A. afarensis* (AL-288-1) i pongidów (rys. 2) potwierdza wyraźnie pośrednią morfologię, a zatem pośredni charakter lokomocji. Tomograficzna analiza porównawcza budowy błędnika ucha, czyli mechanizmu percepcji ruchu, potwier-



Rys. 2. Pośredni charakter morfologii cech postkranialnych *Australopithecus afarensis* (A.L. 288-1). Rysunek przedstawia wykres dwóch pierwszych zmiennych kanonicznych wielorakiej analizy dyskryminującej 47 cech pomiarowych szkieletu postkranialnego. Wszystkie pomiary zostały standaryzowane do jednej wielkości ciała. Pozycja A.L. 288-1 wyraźnie jest pośrednia pomiędzy wielkimi małpami a człowiekiem (według MCHENRY 1991 str. 136).

dza te wnioski. Przedni i tylny kanał półkolisty *A. africanus* jest proporcjonalnie mniejszy, a boczny większy niż u człowieka, co wyraźnie przypomina proporcje obserwowane u wielkich małp (SPOOR i współaut. 1994). Wczesne, gracylne australopiteki prawdopodobnie spędzały znaczną część czasu w koronach drzew, ale także poruszały się na dwóch kończynach dolnych po ziemi. Nadrzewna lokomocja tej grupy zwierząt nie wydaje się tak zaawansowana, jak współczesnych pongidów, a ich dwunożność nie osiągnęła poziomu dwunożnego chodu człowieka. Hominidy te specjalizowały się dopiero w kierunku pełnej, typu ludzkiego bipedii.

DWIE FAZY POWSTANIA BIPEDII

Wszelkie zmiany formy lokomocji *Hominidae* muszą być badane i rozpatrywane jako integralna część większego biomu, klimatu i rytmu zmian geologicznych. Przedstawiony obraz paleośrodowiska i lokomocji wczesnych hominidów stanowi poważny argument za odrzuceniem hipotez odwołujących się do warunków panujących w środowisku sawanny. Wynika z niego, iż dwunożność pojawiła się w środowisku heterogenicznym, gdzie sawanna nie stanowiła dominującego biomu, a drzewa były powszechnie dostępne. Mozaikowy charakter lokomocji australopiteków tworzy logicznie spójny z tymi faktami obraz. Na podstawie dostępnych nam dzisiaj informacji należy przyjąć, że proces powstania dwunożności przebiegał dwuetapowo, w ścisłym związku z charakterem środowiska. Pierwszy etap to powstanie dwunożnego chodu na poziomie australopiteków, który był niedoskonały i stanowił element szerszego repertuaru zachowań lokomocyjnych, optymalnych dla heterogenicznego środowiska. Prawdopodobnie był używany na ziemi, jak i w koronach drzew. Wydaje się, że czynnikiem selekcyjnym prowadzącym do jego powstania, zgodnie z sugestiami NAPIER'A (1976), iż sposób lokomocji kształtuje charakter środowiska i dostępność pokarmu, był właśnie sposób pobierania pokarmu według hipotezy Jolly/Rose/ Wrangham opisaną wcześniej. Zakłada ona, iż wyprostowana postawa i dwunożne poruszanie się były przystosowaniem do zbierania pokarmu z krzewów i dolnych gałęzi drzew. Być może dwunożne przemieszczanie się pomiędzy miejscami obfitującymi w owoce było bardziej energetycznie wydajne niż stosowanie w tym celu, zamiast jednego, dwóch typów lokomocji. Początkowo duży wydatek energetyczny byłby rekompensowany zdobywanymi owocami lub innym kalorycznym pokarmem. Wyprostowana postawa mogła być także stosowana podczas odżywiania się w koronach drzew (HUNT 1994). Korzyści przewyższały koszty. Istniała więc preferencja takich zachowań. Kształt ciała australopiteków z punktu widzenia biomechaniki sugeruje, iż optymalnie musiały poruszać się krótkimi odcinkami około kilku metrów, szybkim krokiem (PREUSCHOFFT i WITTE 1991), co pozostaje w zgodzie z powyższym scenariuszem. Bipedia wśród naczelnych jest rzadko obserwowana, ale najczęściej stosowana w celu zdobycia pokarmu (ROSE 1991). Wyprostowana postawa i dwunożny chód szympansov stanowią kilkanaście procent całości zachowań lokomocyjnych. HUNT (1994) podaje, że 80% dwunożnych zachowań szympansov występuje w kontekście pokarmowym, z tego dwunożna naziemna lokomocja pomiędzy

stanowiskami wynosi 4,1%. Drugi etap to powstanie pełnej, prawie ludzkiej, dwunożności, jaką prezentowały przedstawiciele *Homo*. Pojawienie się tej grupy naczelnych zostało wymuszone poprzez osuszenie klimatu. Ów kryzys klimatyczny został zarejestrowany wyraźnie w jedynym ciągłym profilu stratygraficznym w Afryce Wschodniej nad rzeką Omo i miał miejsce około 3,3–2,4 mln lat temu (HOWELL 1978, COPPENS 1994). Potwierdzają to także badania izotopu węgla w osadach dennych Oceanu Atlantyckiego (SHACKLETON i współautorzy 1984) oraz wyraźne zmiany fauny *Bovidae* (VRBA 1985) i mikrofauny ssaków (JAEGER 1976). Pierwsi przedstawiciele *Homo* byli potomkami australopiteków gracylnych, najprawdopodobniej *A. africanus*. Mimo iż ich morfologia odzwierciedla kompromisową formę lokomocji (to jest częściowo nadrzewną i częściowo naziemną) wiadomo, że *Homo erectus* przystosował się do poruszania w dwuwymiarowej przestrzeni sawanny. U tych osobników nastąpił wzrost powierzchni stawowych w kończynie dolnej względem ciężaru ciała (JUNGERS 1988). Wraz z zanikiem leśnego środowiska zniknęła konieczność „kompromisowej” budowy ciała i doszło do specjalizacji dwunożnego chodu. Nie jest koniecznym odwoływanie się do jakiegokolwiek hipotezy, by wyjaśnić owo „przejście”. Skoro „prawie” dwunożny australopitek znalazł się w środowisku pozbawionym drzew, zmuszony do długich wędrówek w poszukiwaniu pokarmu, to każde zmniejszenie kosztów energetycznych było preferowane przez dobór naturalny. Należy tu wspomnieć o hipotezie WHEELER'a, która nie tyle wyjaśnia powstanie bipeedii, ile powstanie innych specyficznie ludzkich cech jak: utrata owłosienia ciała, powstanie pigmentu skóry i rozwój gruczołów potowych.

BIPEDALISATION — A CRUCIAL EVENT IN HUMAN PHILOGENY

Summary

Direct evidence concerning the origin of bipedality is noticeably absent. Many different models of the initial stages of the bipedalism process have been proposed, taking advantage of a variety of sources of indirect evidence. Implicit in most of these explanations is the assumption that, as the area of the Middle to Late Miocene rain forests in Africa became restricted, the drier woodland and grassland became more widespread. However, most of these explanations are but speculative and do not provide a convincing scenario.

Analyses of the isotopic composition of carbonate paleosols and organic matter, as well as paleofauna and paleoflora evidence indicate that, at that time, open grasslands were not predominating but the existing environment was heterogeneous. On the other hand, in the earliest hominids' fossils known to date, i.e. australopithecine, the postcranial skeletons are of a type intermediate between *Pan* and *Homo*. The bulk of "ape like" traits probably implies that their bipedalism was kinetically and energetically different from that of modern humans, was related to the heterogeneous environment and suggest arborealism too.

In this essay it is emphasised that the process of bipedalisation might have had two stages. First, at the australopithecine level, when bipedalism was awkward and was not the sole locomotion mode; second, in *Homo erectus*, in whom bipedalism became fully developed. The terrestrial and arboreal feeding posture is the most convincing concept explaining the selection pressure responsible for the first stage. Upright walking became the bioenergetically efficient mode of terrestrial locomotion between the food providing trees. About 2,52–2,40 millions years ago, in the face of drastic habitat changes, when grasslands became predominating, the inevitability of arborealism disappeared and in this environment, the human mode of bipedalism fully evolved.

LITERATURA

- BERGE C., 1994. *How did the australopithecine walk? A biomechanical study of the hip and thigh of Australopithecus afarensis*. J. Hum. Evol. 26, 259-274.
- BIELICKI T., 1969. *Niektóre związki zwrotne w procesie ewolucji Hominidae*. Materiały i Prace Antropologiczne 77, 3-60.
- CERLING T. F., QUADE J., AMBOSE S. M. i SILAS N. E., 1991. *Fossil soils, grasses and carbon isotopes from Fort Ternan, Kenya: grassland or woodland*. J. Hum. Evol. 21, 295-306.
- COPPENS Y., 1994. *East Side Story: początki rodzaju ludzkiego*. Świat Nauki, 7, 62-69.
- FIFER F. C., 1987. *The adoption of bipedalism by the hominids: a new hypothesis*. Hum. Evol. 2, 135-147.
- GOODALL J. VAN, 1974. *W cieniu człowieka*. PWN, Warszawa.
- HARRIS J.M., 1985. *Age and Paleoecology of the Upper Laetoli Beds, Laetoli, Tanzania*. [W:] *Ancestors: the Hard Evidence*. E. DELSON, (red.). Alan R. Liss, Inc., New York, 76-85.
- HEWES C. W., 1961. *Food Transport and Origin of Hominid Bipedalism*. American Anthropologist 63, 687-709.
- HOLLOWAY R. L., 1967. *Tools and teeth. Some speculations regarding canine reduction*. American Anthropologist 69, 63-67.
- HOWELL F.C., 1978. *Hominidae*. [W:] *Evolution of African Mammals*. V. J. MAGLIO i H. B. S. COOKE, (red.). Harvard University Press, Cambridge, Massachusetts 154-248.
- HUNT K.D., 1994. *The evolution of human bipedality: ecology and functional morphology*. J. Hum. Evol. 26, 183-202.
- JABLONSKI N. G. i CHAPLIN G., 1993. *Origin of habitual terrestrial bipedalism in the ancestor of the Hominidae*. J. Hum. Evol. 24, 259-280.
- JAEGER J. J., 1976. *Les rongeurs (Mammalia, Rodentia) du Pléistocène Inférieur d'Olduvai Bed I(Tanzania). 1ère Partie: Les Muridés*. [W:] *Fossil Vertebrates of Africa*. R. J. G SAVAGE i S. C. CORYNDON, (red.), Vol. Four. Academic Press, London, 57-120.
- JOLLY C. J., 1970. *The Seed-Eaters — a New Model of Hominid Differentiation Based on Boboon Analogy*. Man 5/70, 5-26.
- JUNGERS W. L., 1982. *Lucy's limbs: skeletal allometry and locomotion in A. afarensis*. Nature 297, 676-678.
- JUNGERS W. L., 1988. *Relative Joins Size and Hominids Locomotion Adaptations*. J. Hum. Evol. 17, 247-265.
- JUNGERS W. L., 1991. *A pygmy perspective on body size and shape in Australopithecus afarensis (AL 288-1, „Lucy”)*. [W:] *Origine(s) de la Bipedie ches les Hominides*. Y. COPPENS i B. SENUT, (red.) Editions du CNRS, Paris, 222-224.
- JUNGERS W. L. i STERN J. T., 1983. *Body Proportion Skeletal Allometry and Locomotion in Hadar Hominids: a reply to Wolpoff*. J. Hum. Evol. 12, 673-684.
- KINGSTON J. D., MARINO B. D. i HILL A., 1994. *Isotopic Evidence for Neogene Hominid Paleoenvironments in the Kenya Rift Valley*. Science 264, 955-959.
- LANGDON J. M., 1985. *Fossils and Origin Of Bipedalism*. J. Hum. Evol. 14, 615-635.
- LATIMER B., 1991. *Locomotor adaptation in Australopithecus afarensis : the issue of arboreality*. [W:] *Origine(s) De la Bipedie ches les Hominides*. Y. COPPENS i B. SENUT, (red.), Editions du CNRS, Paris, 169-175.
- LEUTENEGGER W., 1987. *Origin of hominid bipedalism*. Nature 325, 305.
- LOVEJOY C. O., 1981. *The Origin of Man*. Science 211, 341-350.
- MCHEHRY H. M., 1982. *The Pattern of Human Evolution: Studies of Bipedalism, Mastication and Encephalisation*. Annual Review of Anthropology 11, 151-173.
- MCHEHRY H. M., 1991. *Sexual Dimorphism in Australopithecus afarensis*. J. Hum. Evol. 20, 21-32.
- MCHEHRY H. M., 1991. *First Steps? Analysis of the Postcranium of Early Hominids*. [W:] *Origine(s) de la Bipedie ches les Hominides*. Y. COPPENS i B. SENUT, (red.) Editions du CNRS, Paris, 133-141.
- MCHEHRY H. M., CORRUCINI R. S., 1978. *Relative femoral head size in early hominids*. Am. J. Phys. Anthro. 49, 145-149.
- NAPIER J., 1976. *Primate Locomotion*. Oxford University Press, Oxford.

- PICKFORD M., 1983. *Sequence and environments of the Lower and Middle Miocene hominoids of Western Kenya*. [W:] *New Interpretation of Ape and Human Ancestry*. R. L. CIOCHON i R. S. CARRUCCINI, (red.). Plenum Press, New York i London, 421-439.
- PREUSCHOFF H., i WITTE H., 1991. *Biomechanical reasons for the evolution of hominid body shape*. [W:] *Origine(s) de la Bipedie ches les Hominides*. Y. COPPENS i B. SENUT, (red.). Editions du CNRS, Paris, 59-77.
- PROST J. H., 1980. *Origin of Bipedalism*. *Am. J. Phys. Anthropol.* 52, 175-189.
- RAK Y., 1991. *Lucy's pelvis anatomy; its role in bipedal gait*. *J. Hum. Evol.* 20, 283-290.
- RAYNER R. J., MOON B. P. i MASTERS J.C., 1993. *The Makapansgat australopithecine environment*. *J. Hum. Evol.* 24, 219-232.
- RETALLACK G. J., DUGAS D. P. i BESTLAND E. A., 1990. *Fossil Soil and Grasses of a Middle Miocene East Africa Grassland*. *Science* 247, 1325-1328.
- RODMAN P. S., MCHENRY H. M., 1980. *Bioenergetics and the Origin of Hominid Bipedalism*. *Am. J. Phys. Anthropol.* 52, 103-106.
- ROSE M., 1976. *Bipedal behaviour of olive baboons (Papio anubis) and its relevance to an understanding of the evolution of human bipedalism*. *Am. J. Phys. Anthropol.* 44, 247-261.
- ROSE M. D., 1991. *The Process of Bipedalization in Hominids*. [W:] *Origine(s) de la Bipedie ches les Hominides*. Y. COPPENS i B. SENT (red.). Editions du CNRS, Paris, 37-48.
- SCHMID P., 1991. *The trunk of the australopithecines*. [W:] *Origine(s) de la Bipedie ches les Hominides*. Y. COPPENS i B. SENUT (red.). Editions du CNRS, Paris, 225-234.
- SHACKLETON N.J., BACKMAN J., ZIMMERMAN M., KENT D. V., HALL M. A., ROBERTS D. G., SCHNITKER D., BALDAUF J. G., DESPRAIRES A., HOMRIGHAUSEN R., NUDDLESTUN P., KEENE J. B., KALTENBACK A. J., KRUMSIECK K. A. O., MORTON A. C., MURRAY J. W. i WESTBERG-SMITH J., 1984. *Oxygen isotope calibration in the north Atlantic region*. *Nature* 307, 620-623.
- SINCLAIR A. R. E., LEAKEY M. D. i NORTHON-GRIFFITHS M., 1986. *Migration and hominid bipedalism*. *Nature* 324, 307-308.
- SPOOR F., WOOD B. i ZONNEVELD F., 1994. *Implication of early hominid labyrinthine morphology for evolution of human bipedal locomotion*. *Nature* 369, 645-64.
- STERN J. T., SUSMAN R. T., 1983. *The Locomotor Anatomy of Australopithecus afarensis*. *Am. J. Phys. Anthropol.* 60, 279-317.
- SUSMAN R. T., STERN J. T., JUNGERS W. L., 1984. *Arboreality and Bipedality in the Hadar Hominids*. *Folia Primatologica* 43, 113-156.
- TAYLOR C. R., ROWNTREE V. J., 1973. *Running on Two or Four Legs: which Consume More Energy*. *Science* 179, 186-187.
- VEERHAEGEN M., 1987. *Origin of hominid bipedalism*. *Nature* 325, 305.
- VRBA E.S., 1985. *Ecological and Adaptive Changes Associated With Early Hominids Evolution*. [W:] *Ancestors: the Hard Evidence*. E. DELSON, (red.). Alan R. Liss, Inc., New York, 63-71.
- WHEELER P. E., 1984. *The Evolution of Bipedality and Loss of Functional Body Hair in Hominids*. *J. Hum. Evol.* 13, 91-98.
- WHEELER P. E., 1985. *The Loss of Functional Body Hair in Man: The Influence of Thermal Environment, Body Form and Bipedality*. *J. Hum. Evol.* 14, 23-28.
- WRANGHAM R. W., 1980. *Bipedal locomotion as a feeding adaptation in Gelada baboons and its implications for hominid evolution*. *J. Hum. Evol.* 9, 329-331.

ELŻBIETA SZELAĞ

Zakład Neurofizjologii

Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN

Pasteura 3, 02-093 Warszawa

NEUROPSYCHOLOGICZNE PODŁOŻE JĄKANIA — PRZEGLĄD
BADAŃ EMPIRYCZNYCH NAD ASYMETRIĄ FUNKCJONALNĄ MÓZGU

WSTĘP

Rosnące zainteresowanie zaburzeniami mowy i sposobami ich terapii skierowało uwagę wielu badaczy na neuropsychologiczne podłoże procesów mowy człowieka. Zagadnienie to jest przedmiotem badań reprezentantów wielu dyscyplin naukowych: psychologów, biochemików, językoznawców, logopedów, pedagogów i lekarzy, a ze względu na ścisłą zależność pomiędzy sprawnością językową a społecznym funkcjonowaniem człowieka interesuje niemal wszystkich ludzi. Badaniom tym przyświecają nie tylko cele poznawcze, lecz również poszukiwanie wyników, które można wykorzystać w praktyce, przy opracowywaniu nowych metod stosowanych w terapii.

Obecny artykuł stanowi próbę podsumowania wyników dotychczasowych badań empirycznych prowadzonych w wielu laboratoriach na świecie nad neuropsychologicznymi mechanizmami leżącymi u podłoża jąkania i przede wszystkim koncentruje się na związku tego zaburzenia z funkcjonalną asymetrią półkul mózgowych u dzieci oraz u osób dorosłych.

Na przestrzeni ostatnich lat powstało wiele różnych definicji jąkania. W obecnym artykule zdecydowaliśmy się na przyjęcie, za przykładem autorów prac publikowanych w czasopismach o zasięgu międzynarodowym, definicji sformułowanej przez World Health Organization i zamieszczonej w *International Classification of Diseases* (1977). Zgodnie z tą definicją, jąkanie jest definiowane jako zaburzenie rytmu i płynności mówienia, które powoduje niezdolność wyartykułowania zamierzonej wypowiedzi wskutek mimowolnego, powtarzającego się przedłużania lub przerywania brzmienia wymawianych dźwięków. Należy zaznaczyć, że dla większości jąkających się wada ta jest źródłem stałych przykrych przeżyć. W związku z tym jąkanie stanowi również sumę zjawisk emocjonalnych, towarzyszących zaburzeniom płynności. Według danych zebranych przez World Health Organization ta wada mowy występuje u około 1% ludzi na świecie, co stanowi niemały problem społeczny (raport WHO 1977, s. 202).

Rozważania nasze w obecnym artykule będą ograniczać się wyłącznie do jąkania jako patologicznej niepłynności, która pojawia się w ontogenezie i rozwija w trwałe formy zaburzenia ekspresji słownej (CURLEE i PERKINS 1984), które nie

mogą zostać zakwalifikowane jako niepełność semantyczna, gramatyczna czy fonetyczna (JOHNSON i DARLEY 1963), a także rozwojowa niepełność mówienia powszechna w okresie kształtowania się mowy dziecka (TARKOWSKI 1992, BYRNE 1989). Pominiemy również jąkanie wywołane uszkodzeniem centralnego układu nerwowego (NASS i współaut. 1994), trwałym urazem psychicznym, upośledzeniem umysłowym, inną chorobą lub inną wadą mowy (CURLEE i PERKINS 1984). Skoncentrujemy się natomiast na związku jąkania z funkcjonalną asymetrią półkul mózgowych. Problematyce tej poświęca się bowiem bardzo wiele badań w wielu ośrodkach na świecie, w tym również w Pracowni Psychofizjologii Instytutu Biologii Doświadczalnej PAN w Warszawie.

Dowody na istnienie takiej asymetrii mózgu człowieka pochodzą zarówno z badań klinicznych (m.in. pacjentów z wybiórczymi uszkodzeniami lewej i prawej półkuli), jak i eksperymentalnych, prowadzonych w ostatnich latach na osobach z nie uszkodzonym ośrodkowym układem nerwowym specjalnymi nieinwazyjnymi metodami laboratoryjnymi (BUDOHOSKA i GRABOWSKA 1994). Wyniki dotychczasowych badań wykazały, że funkcje pełnione przez lewą i prawą półkulę są różnicowane. Ogólnie można stwierdzić, że lewa półkula mózgu zazwyczaj specjalizuje się w funkcjach mowy i procesach werbalnych, takich jak: ekspresja i rozumienie mowy, czytanie, pisanie, liczenie. Z kolei dominującą rolę prawej półkuli mózgu wykazano w zadaniach wymagających analizy cech wzrokowo — przestrzennych bodźca, wiążących się z orientacją w przestrzeni, rozpoznawaniem skomplikowanych kształtów i figur geometrycznych, twarzy ludzkich, a także w percepcji muzyki i dźwięków muzycznych. Funkcje półkul różnią się nie tylko ze względu na rodzaj materiału, ale również sposób jego opracowywania. I tak, półkula lewa opracowuje napływające informacje sekwencyjnie, analitycznie, element po elemencie; prawa natomiast w sposób całościowy, globalny, holistyczny, analizując jednocześnie wszystkie elementy bodźca. Taki wyraźny podział funkcji między półkulami istnieje u większości osób praworęcznych. Stopień lateralizacji może jednak zmieniać się w zależności od wielu czynników (między innymi płci, wieku, ręczności).

Niektórzy autorzy wiążą jąkanie z nieprawidłowym wzorcem asymetrii funkcjonalnej mózgu. Taki kierunek poszukiwań zapoczątkowany został ponad pięćdziesiąt lat temu przez ORTONA (1928) i TRAVISA (1931) i nadal nie stracił na aktualności. Wymienieni autorzy wysunęli hipotezę zakładającą, że w wielu przypadkach jąkanie jest spowodowane niekompletną lateralizacją funkcji w mózgu w trakcie rozwoju mowy w ontogenezie. Zgodnie z tą koncepcją u niektórych dzieci w trakcie rozwoju może wykształcić się nieprawidłowa lateralizacja funkcji mowy, skutkiem czego jąkanie rozwojowe zmienia się w trwałe formy definiowane jako patologiczne zaburzenie jej rytmu. Hipoteza ORTONA-TRAVISA wciąż inspiruje nowe badania, prowadzone obecnie z zastosowaniem nowych metod, w których poszukuje się odpowiedzi na pytanie, czy u podłoża jąkania może występować zaburzona lateralizacja funkcjonalna mózgu. Źródłem informacji na ten temat mogą być: 1) badania kliniczne, 2) badania eksperymentalne nad lateralizacją mowy i lateralizacją emocji, 3) statystyczne badania porównawcze prowadzone na dużych grupach osób wykazujących różnorodne nasilenie omawianego defektu oraz nie przejawiających tego zabu-

rzenia. Pomimo ogromnego postępu badań nadal jeszcze brak rozstrzygającej odpowiedzi na wymienione wyżej pytanie.

BADANIA KLINICZNE

Jednym ze źródeł informacji na powyższy temat są obserwacje zachowania pacjentów w klinice neurochirurgicznej, u których przeprowadzono test WADA, zwany inaczej próbą amytalową (WADA i RASMUSSEN 1960). Test ten pozwala ustalić, która półkula reguluje funkcje mowy u danego pacjenta. Próba amytalowa polega na wprowadzeniu do układu naczyniowego jednej z półkul mózgowych pacjenta soli sodowej amytału (słabego barbituratu). Pod jego wpływem czynność półkuli, do której został wprowadzony, jest silnie zaburzona na okres od kilkudziesięciu sekund do kilku minut. Jednostronne wstrzyknięcie amytału sodu do tętnicy szyjnej, która zaopatruje w krew półkulę dominującą dla funkcji mowy powoduje, że pacjent przejściowo traci zdolność ekspresji mowy, po czym mowa powoli „wraca”, chociaż początkowo występują w niej liczne błędy językowe. Test ten stanowi nie tylko cenne źródło informacji dla neurochirurga, ale również na podstawie uzyskanych wyników możliwe jest oszacowanie w badanej grupie częstości lokalizacji mowy w lewej, prawej lub obu półkulach mózgu.

Zgodnie z CURLEE i PERKINS (1984) procent pacjentów jąkających się, u których stwierdzono obupółkulową reprezentację mowy był większy niż w ogólnej populacji. Według przytoczonych danych, próbę amytalową wykonano ogółem u 11 jąkających się pacjentów, a obupółkulową reprezentację mowy stwierdzono w pięciu przypadkach (tzn. prawie u połowy przebadanych osób). Natomiast zgodnie z badaniami BRYDENA i STEENHUISA (1991) obupółkulowa lokalizacja funkcji mowy u osób praworęcznych właściwie nie występuje, natomiast została stwierdzona u około 17% osób leworęcznych.

Szczególnie interesujące badania w zakresie reprezentacji mowy u jąkających się przeprowadził JONES (1966). Badacz ten porównywał u 4 pacjentów, przejawiających od wczesnego dzieciństwa objawy głębokiego jąkania, wyniki próby amytalowej, wykonanej przed i po operacji neurochirurgicznej. Powodem operacji był w przypadku jednego pacjenta guz mózgu, a u trzech pozostałych krwawienie podpajęczynówkowe, spowodowane pęknięciem tętniaka. Przeprowadzony zabieg dotyczył obszarów klasycznie uważanych za okolice regulujące mowę człowieka. Podczas gdy przed operacją wszyscy czterej pacjenci wykazywali obupółkulową reprezentację mowy, test wada powtórzony po zabiegu nie wykazał u żadnego z pacjentów lokalizacji mowy w obu półkulach. Ponadto czasową utratę mowy obserwowano tylko wówczas, gdy iniekcji dokonano do układu naczyniowego, zaopatrującego w krew nieoperowaną stronę mózgu. Szczególnie interesujący jest fakt, że wszyscy czterej pacjenci wraz z utratą obupółkulowej reprezentacji mowy przestali się jąkać! Ten ekscytujący wynik jest niewątpliwie najsilniejszym argumentem wskazującym, że jąkanie ma związek z obupółkulową reprezentacją funkcji mowy. Zaobserwowane relacje oczywiście nie powinny być w żadnym wypadku interpretowane jako dowód, że operacja neurochirurgiczna mózgu może przy okazji leczyć zaburzenia rytmu

mowy. Należy również zaznaczyć, że dotychczas nie udało się innym autorom powtórzyć wyniku zaobserwowanego przez Jonesa (ANDREWS i współaut. 1972).

Podsumowując dane dotyczące lateralizacji funkcji mowy u osób jąkających się, u których zastosowano próbę amytalową można stwierdzić, że lewopółkulowa reprezentacja mowy nie jest u nich tak wyraźnie zaznaczona, jak u osób płynnie mówiących, oraz stosunkowo często występuje u nich reprezentacja mowy w obu półkulach mózgowych. Należy jednak pamiętać, że obupółkulowa reprezentacja mowy zdarza się również wśród osób płynnie mówiących (WADA i RASMUSSEN 1960).

BADANIA EKSPERYMENTALNE

LATERALIZACJA FUNKCJI MOWY

Oddzielną, bardzo obszerną grupę badań stanowią eksperymenty laboratoryjne przeprowadzone nieinwazyjnymi metodami, zarówno na dzieciach, jak i na dorosłych osobach jąkających się. W badaniach tych stosowano sprawdzone w wielu dotychczasowych eksperymentach techniki badania asymetrii półkulowej, jak: metodę rozdzielności słyszenia (dichotic listening test); tachistoskopowe prezentacje bodźców wzrokowych eksponowanych w prawym bądź lewym polu wzrokowym, a więc adresowanych odpowiednio do prawej lub lewej półkuli mózgowej; rejestrację potencjałów wywołanych; encefalograficzny zapis aktywności mózgu oraz korowy przepływ krwi. Dokładny opis i założenia teoretyczne przytoczonych metod można znaleźć, na przykład, w monografiach BUDHOŠKA i GRABOWSKA (1992, 1994), lub w przeglądowej książce SPRINGERA i DEUTSCHA (1989).

Badania te nie dostarczyły jednak dotychczas rozstrzygającej odpowiedzi na pytanie, czy zawsze u podłoża jąkania mają miejsce nieprawidłowości asymetrii funkcjonalnej mózgu i wykazały znaczne zróżnicowanie organizacji funkcjonalnej mózgow osób jąkających się. Stosunkowo duża liczba opublikowanych prac, a także różnorodność zastosowanych procedur eksperymentalnych i sposobów analizowania wyników sprawiły, że w obecnym artykule ograniczymy się jedynie do zasygnalizowania głównych zaobserwowanych prawidłowości.

Wielu autorów dostarczyło dowodów empirycznych, popierających hipotezę o zaburzeniach lateralizacji funkcji werbalnych u jąkających się. W wielu eksperymentach wykazano odmienny wzorzec asymetrii funkcjonalnej mózgow u osób jąkających się w porównaniu do płynnie mówiących, wyrażający się większym udziałem prawej półkuli lub obniżeniem poziomu funkcjonowania półkuli lewej w klasycznych zadaniach werbalnych, dla których zazwyczaj sprawniejszą jest lewa półkula mózgu. Do takich wniosków skłaniają badania, w których zastosowano test rozdzielności słyszenia (CURRY i GREGORY 1969, BRADY i BERSON 1975, SOMMERS i współaut. 1975, ROSENFELD i GOODGLASS 1980, LIBETRAU i DALLY 1981, RASTATTER i DELL 1987a, RASTATTER i LOREN 1988), tachistoskopową lateralną prezentację bodźców wzrokowych (MOORE 1976, PLAKOSH 1978, HAND i HAYNES 1983, RASTATTER i DELL 1987b), metody elektrofizjologiczne (MOORE i Lang 1977, MOORE i HAYNES 1980, MOORE i LORENDO 1980, MOORE i współaut. 1982, MOORE 1986, WELLS i MOORE 1990) oraz metodę korowego przepływu krwi (WOOD i współaut. 1980).

Nie brak jest jednak doniesień wskazujących, że funkcjonalna lateralizacja mózgu jąkających się i płynnie mówiących jest podobna. Przemawiają za tym niektóre wyniki badań z zastosowaniem procedury rozdzielnościowego słyszenia (QUINN 1972, SLORACH i NOEHR 1973, GRUBER i POWELL 1974, DORMAN i PORTER 1975, PINSKY i MCADAM 1980, WEBSTER 1988), jak i metod elektrofizjologicznych (FOX 1966, PINSKY i MCADAM 1980).

Tak więc pytanie odnośnie wzorca asymetrii półkulowej w funkcjach werbalnych u jąkających jest nadal otwarte. Zastanawiające jest dlaczego wyniki uzyskane w badaniach empirycznych są aż tak niejednoznaczne? Mamy podstawy przypuszczać, że przyczyna leży w nieprecyzyjnym kontrolowaniu różnic indywidualnych, na przykład nasilenia jąkania oraz poziomu emocjonalności osób badanych. Potwierdzeniem słuszności takiego przekonania są przeprowadzone przez nas badania (SZELAĞ i współaut. 1993, 1994), w których testowaliśmy asymetrię funkcjonalną u 20 jąkających się i 20 płynnie mówiących dzieci w wieku 14–16 lat, podzielonych na grupy różniące się nasileniem stopnia niepłynności. Przypuszczając, że jąkanie jest złożonym defektem i w związku z tym nie u wszystkich dzieci można oczekiwać zmian lateralizacji funkcji, bardzo precyzyjnie dokonaliśmy selekcji osób do naszego eksperymentu. Zostały zakwalifikowane wyłącznie osoby, u których patologiczne zaburzenie rytmu mowy było obserwowane od początku rozwoju mowy, tylko praworęczne i nie posiadające osób leworęcznych w najbliższej rodzinie. Głębokość zaburzenia płynności mowy oszacowywano według 7-punktowej skali (JOHNSONA i DARLEYA 1963), przy czym do badania zakwalifikowano dzieci, których defekt określano jako głęboki (9 osób) lub łagodny (11 osób). Zadanie osób badanych polegało na rozpoznawaniu słów prezentowanych w prawym bądź w lewym polu wzrokowym, a więc adresowanych bezpośrednio do lewej lub prawej półkuli mózgu. Uzyskane wyniki wykazały, że zarówno w grupie kontrolnej, jak i u słabo jąkających się w zadaniu rozpoznawania słów sprawniejsza była lewa półkula mózgu. Natomiast dzieci przejawiające głębokie jąkanie wykazywały brak wyraźnych różnic półkulowych z tendencją do przewagi prawej półkuli mózgu — a więc wzorzec odmienny niż obserwowany w grupie kontrolnej i u słabo jąkających się. Wynik ten potwierdza nasze przypuszczenie, że głębokość jąkania jest istotnym czynnikiem, który może być związany z asymetrią półkulową w percepcji materiału werbalnego. Jak wykazały wyniki, jedynie głębokim zaburzeniem rytmu mowy towarzyszy nieprawidłowa lateralizacja funkcji mowy. Szczególnie ważny wydaje się fakt, że stopień nasilenia defektu oszacowany na poziomie demonstrowanych zaburzeń werbalnych (wg. Johnsona i Darleya między innymi liczby powtórzonych sylab i słów, częstości występowania i długości przerw w mówieniu i.t.d.) miał istotny związek z nieprawidłowościami lateralizacji w zastosowanym przez nas zadaniu werbalnym. Niespójność wyników uzyskanych przez różnych autorów (na przykład CURLEE i PERKINS 1984, SPRINGER i DEUTSCH 1989) mogła więc wynikać z nieuwzględniania stopnia nasilenia jąkania u badanych osób.

W oparciu o specjalistyczną literaturę i wyniki własnych badań, dotyczących wzorca lateralizacji mózgu u jąkających się w procesach mowy oraz w percepcji wzrokowej materiału werbalnego, można więc ogólnie stwierdzić słabiej zarysowaną przewagę lewej półkuli mózgu w porównaniu z osobami płynnie mówiącymi.

LATERALIZACJA EMOCJI

Jak wykazano, mowa osób jękających się może być regulowana przez prawą półkulę mózgu. Wydaje się więc, że może to mieć wpływ na organizację innych funkcji normalnie regulowanych przez tę właśnie półkulę. Jeden z kierunków badań empirycznych w tym zakresie odwołuje się do zaburzenia prozodii mowy, które często towarzyszy jękaniu (NIPPOLD 1988). Już w latach dwudziestych SCRIPTURE (1925) w Niemczech i TRAVIS (1927) w Stanach Zjednoczonych zaobserwowali, że mowa osoby jękającej się ma monotonne brzmienie nawet w tych fragmentach wypowiedzi, w których nie stwierdza się zaburzenia jej płynności. Doniesienia te zostały poparte przez późniejsze obserwacje innych autorów, a także poprzez wyniki badań empirycznych prowadzonych przez LUSCHINGERA i DUBOISA (1963), FERNAU-HORNA (1973) i VAN RIPPERA (1982). Badania eksperymentalne prowadzone przez WINGATE (1964, 1979), ALLENA (1983), BERGMANNA (1986), BORDENA (1983), DAUERA (1983) wykazały, że jękaniu często towarzyszy zaburzenie prozodii, wyrażające się trudnościami w trakcie wypowiadania sylab akcentowanych, które są głównie wyrażane ekspresją emocjonalną w trakcie mówienia (na przykład BORDEN i współaut. 1985, LADD i współaut. 1985).

Związek zaburzenia prozodii i jękania może być w pewnym sensie kwestionowany poprzez obserwowany czasami przez logopedów-praktyków fakt, że niektórzy pacjenci usiłują artykułować mowę monotonną, zwalnając jej tempo i pozbawiając właściwej intonacji w celu złagodzenia swoich trudności i zmniejszenia niepłynności. Zjawisko to jednak nie jest częste i nie ma prawdopodobnie większego wpływu na wyżej opisane zależności, które były obserwowane w stosunkowo licznych populacjach osób jękających się. Ponadto badania kliniczne wykazują, że obserwuje się również przypadki jękania, któremu towarzyszy przyspieszenie tempa mówienia i wyrażanie w wypowiedzi nadmiernego ładunku emocjonalnego.

Aby lepiej uzmysłowić neuropsychologiczne mechanizmy prawdopodobnie leżące u podłoża monotonnej mowy, artykułowanej bez odpowiedniej intonacji i zachowania reguł akcentu, warto przytoczyć opis zaburzenia zwanego aprozodią. Defekt ten w skrajnej postaci polega na niemożności wyrażania emocji mową w skutek niestosowania zasad akcentu wyrazowego i zdaniowego (aprozodia motoryczna) lub na nierozumieniu emocji zawartych w wypowiedzi innych ludzi (aprozodia sensoryczna). Zaburzenie to występuje zazwyczaj przy uszkodzeniach półkuli prawej, w okolicach symetrycznie położonych do obszaru mowy w półkuli lewej. Występowanie objawów aprozodii po uszkodzeniach prawej półkuli mózgu wydają się wskazywać na dominację tej półkuli w zakresie wyrażania emocji w mowie oraz ich odczytywania z mowy innych osób. Zagadnienie lateralizacji emocji było w ostatnich latach przedmiotem wielu teoretycznych dyskusji i badań prowadzonych zarówno na pacjentach z jednostronnymi uszkodzeniami mózgu jak i na osobach bez uszkodzeń centralnego układu nerwowego (np. BUDOHOSKA i współaut. 1991, SZELAĞ i FERSTEN 1991, SZELAĞ i WASILEWSKI 1992). Jest wiele dowodów eksperymentalnych, wskazujących na prawopółkulową lateralizację emocji oraz na wiodącą rolę tej półkuli mózgu w zakresie przeżywania, percypowania oraz wyrażania ekspresji emocjonalnej zarówno

w zachowaniu, jak i w wypowiedziach słownych. Warto również wspomnieć o koncepcji zakładającej zróżnicowany wzorec specjalizacji zależnie od znaku emocji. Zgodnie z nią, emocje negatywne (na przykład lęk, depresja, smutek) są opracowywane przez prawą półkulę, a z kolei emocje pozytywne (na przykład zadowolenie, radość) przez półkulę lewą. Niezależnie która z tych dwóch hipotez okaże się w przyszłości słuszną, można sądzić, że zaburzeniom emocjonalnym przejawiającym się ogólnie mówiąc skłonnością do lęków, załamań nerwowych i nie zrównoważeniem emocjonalnym mogą więc towarzyszyć nieprawidłowości funkcjonowania prawej półkuli mózgu.

Tak więc zaburzenia prozodii, występujące u pacjentów obarczonych jąkaniem, wskazywałyby więc między innymi na zaburzenia w zakresie ekspresji emocjonalnej w trakcie mówienia. Biorąc pod uwagę istotną rolę prawej półkuli mózgu w suprasegmentalnym aspekcie komunikacji językowej, a także jej wiodący udział w kierowaniu emocjami, a zwłaszcza emocjami negatywnymi, można by oczekiwać, że jąkanie powinno nie tylko wiązać się z nieprawidłowościami funkcjonowania lewej lecz również prawej półkuli mózgu. Na poparcie powyższego przypuszczenia można przytoczyć znany fakt, że jąkanie to nie tylko zaburzenie rytmu, płynności czy tempa wypowiedzi, ale również suma reakcji emocjonalnych towarzyszących tym zaburzeniom. W wielu dotychczasowych badaniach eksperymentalnych wykazano, że prawa półkula mózgu dominuje zarówno w zadaniach wzrokowo-przestrzennych (HELLIGE 1993), jak i w przeżywaniu emocji, a zwłaszcza emocji negatywnych (GAINOTTI 1989). Wiele danych wskazuje również, że uszkodzenia tej półkuli zaburzą obie te funkcje. W związku z tym można by się spodziewać, że u jąkających się powinny występować nieprawidłowości funkcjonowania prawej półkuli mózgu w opracowywaniu bodźców, których wzrokowo-przestrzenny, niewerbalny charakter preferuje całościowe, holistyczne opracowywanie informacji właściwe dla tej półkuli mózgu. Dla sprawdzenia tej hipotezy przeprowadziliśmy eksperyment, w którym osoby badane rozpoznawały fotografie twarzy, przy czym u zakwalifikowanych osób określano stopień emocjonalności. W dotychczasowych badaniach eksperymentalnych nad lateralizacją funkcji w mózgu u osób jąkających się bardzo rzadko stosowano materiał wymagający analizy cech wzrokowo-przestrzennych bodźca. Wyjątek stanowią nasze kolejne badania (SZELĄG i współaut. 1994), których wyniki w pewnym stopniu przyczyniły się do wyjaśnienia niezgodności stanowisk autorów w literaturze, a także pozwoliły na lepsze zrozumienie neuropsychologicznego podłoża jąkania. Nasz eksperyment dotyczył badania asymetrii półkulowej w zadaniu rozpoznawaniu twarzy, w którym, jak wykazaliśmy w poprzednich badaniach, sprawniejszą była zazwyczaj prawa półkula mózgu (SZELĄG i CZACHOWSKA-SIESZYCKA 1986, SZELĄG i FERSTEN 1991, SZELĄG i WASILEWSKI 1992). W eksperymencie udział wzięły te same dzieci, które zakwalifikowano do omówionego poprzednio badania. Uwzględniając wiodącą rolę prawej półkuli w przeżywaniu emocji, oszacowywano u nich występowanie ewentualnych zaburzeń emocjonalnych wyrażających się skłonnościami neurotycznymi, definiowanymi jako nie zrównoważenie emocjonalne, skłonność do stanów lękowych, załamań, nerwowość i drażliwość. Poziom neurotyczności oszacowywano na podstawie polskiej wersji Inwentarza Osobowości Eysencka (CHOYNOWSKI 1968). Zgodnie z tym kwestionariuszem u 9 dzieci jąkających się

stwierdzono wysoki poziom neurotyczności, a u 10 przeciętny. (Niestety nie udało nam się znaleźć wystarczającej do analiz statystycznych liczby dzieci jākających się o niskim wskaźniku neurotyczności, pomimo naszych prawie dwuletnich intensywnych poszukiwań). Do grupy kontrolnej zakwalifikowano w oparciu o wymieniony kwestionariusz 20 dzieci, z których połowa wykazywała wysoki poziom neurotyczności, a połowa przeciętny. Wyniki obecnego eksperymentu wykazały, że poziom neurotyczności u dzieci jākających był istotnym czynnikiem determinującym obserwowaną asymetrię półkulową. Podczas gdy w grupie kontrolnej niezależnie od poziomu neurotyczności w zadaniu rozpoznawania twarzy sprawniejsza była prawa półkula mózgu, to taki kierunek różnic zaznaczył się jedynie u jākających, wykazujących przeciętną neurotyczność. Natomiast u dzieci jākających się, u których stwierdzono wysoką neurotyczność, obserwowano przeciwny kierunek różnic półkulowych, a mianowicie przewagę półkuli lewej. Taki wzorec lateralizacji był niezależny od stopnia zaburzenia rytmu mowy. A więc można przypuszczać, że towarzyszące jākaniu niezrównoważenie emocjonalne miało decydujący związek z funkcjonalną lateralizacją w zadaniu niewerbalnym, w którym zazwyczaj dominującą jest prawa półkula mózgu. Można prawdopodobnie przypuszczać, że podwyższona neurotyczność szczególnie u jākających się może mieć związek z szerszymi zaburzeniami emocjonalnymi stosunkowo często obserwowanymi w ich zachowaniu. Wyrażają się one w takich reakcjach patologicznych, jak na przykład: strach przed mówieniem, skłonność do depresji i załamań nerwowych z powodu własnej ułomności i niemożności swobodnego dzielenia się z otoczeniem własnymi myślami, świadomość przykrego wrażenia wywieranego ich mową na otoczeniu. Reakcje takie niekiedy występują również u osób płynnie mówiących. Istnieją dane eksperymentalne wskazujące na nadmierną aktywację obszarów czołowych prawej półkuli mózgu w przeżywaniu emocji negatywnych, wywołanych na przykład, stresującą sytuacją u osób z nieuszkodzonym centralnym układem nerwowym. Podobnie nadmierną aktywację tych okolic stwierdza się podczas przeżywania lęków i depresji u pacjentów z zaburzeniami psychicznymi. Patologiczne zachowania emocjonalne, obserwowane u jākających się, można więc wiązać z dysfunkcją prawej półkuli, co prawdopodobnie stanowi podłoże nieprawidłowości jej funkcjonowania w szerokim spektrum zadań, w których jest ona sprawniejsza od półkuli lewej. Prawdopodobnie dlatego u dzieci jākających się, wysoce neurotycznych nie zaznaczyła się przewaga prawej półkuli w zadaniu rozpoznawania twarzy. Uzyskany wynik wskazuje zatem, że podwyższony poziom neurotyczności u jākających się jest związany z kierunkiem asymetrii półkulowej przy analizie materiału niewerbalnego. Tak więc stopień zaburzeń emocjonalnych, wyrażający się przeżywaniem negatywnych emocji miał istotny związek u jākających się z nieprawidłowościami asymetrii funkcjonalnej w zastosowanym przez nas zadaniu niewerbalnym. Interesujące jest, że nie zaobserwowano wpływu nasilenia jākania oszacowanego według zastosowanej przez nas skali na powyższe zaburzenia. Wydaje się, że decydujący wpływ mogła mieć więc subiektywna ocena własnych trudności w mówieniu, nie zaś ich obiektywny wymiar. Osoby niestabilne emocjonalnie, skłonne do lęków i depresji mogą nawet niewielkie zaburzenia płynności swej wypowiedzi traktować jako poważny problem. Wydaje się więc, że obiektywna ocena głębokości jākania na poziomie werbalnym,

dokonana przez terapeutę, może nie mieć związku z opinią własną odnośnie występujących trudności. Dlatego też w naszym zadaniu, wymagającym analizy cech wzrokowo-przestrzennych, głębokość jąkania mogła nie mieć istotnego wpływu na zaobserwowany wzorzec różnic półkulowych.

Wykazane w naszych badaniach powiązania pomiędzy nie płynnością mowy, asymetrią półkulową i psychosocjalnymi konsekwencjami nasuwają pytanie, jaki mechanizm jest odpowiedzialny za te zaburzenia. Zgodnie z sugestią zaproponowaną przez HOWLIN i RUTTER (1987) wydaje się, że jest możliwy nie tylko jeden, ale co najmniej trzy różne potencjalne mechanizmy warunkujące powyższe wzajemne relacje. Po pierwsze, nie płynna mowa, zaburzona lateralizacja i towarzysząca temu psychopatologia rozwinęły się niezależnie pod wpływem wspólnego czynnika działającego w ontogenezie. Po drugie, zaburzenia emocjonalne i nieprawidłowości lateralizacji funkcji we wczesnym dzieciństwie są przyczyną pojawienia się jąkania. Po trzecie, zaburzenie płynności może predysponować problemy socjalne i emocjonalne ze względu na istniejące trudności w porozumiewaniu się z innymi osobami, co wyzwała lęk przed społecznym odrzuceniem. Dotychczasowe badania nie dostarczyły jednak rozstrzygającej odpowiedzi, która z przedstawionych możliwości jest słuszna, w związku z tym pytanie o mechanizmy leżące u podłoża omawianego defektu jest nadal otwarte. Zgodnie z naszym odczuciem, najprawdopodobniej ten ostatni mechanizm wydaje się warunkować zaburzenie mowy jakim jest jąkanie.

Warto jeszcze raz podkreślić, że badania nasze wskazują iż u jąkających się mogą występować nieprawidłowości w funkcjonowaniu również prawej półkuli mózgu. Wiodąca rola tej półkuli, między innymi w przeżywaniu emocji prawdopodobnie powoduje, że u osób jąkających się, które wykazują niestabilność emocjonalną, zaznaczają się również nieprawidłowości funkcjonowania prawej półkuli w analizie bodźców niewerbalnych. Biorąc pod uwagę złożoność defektu, jakim jest jąkanie, interesującym wydaje się nasz wynik wskazujący, że jeżeli jego nasilenie oszacowywać na poziomie werbalnym, wraz ze wzrostem głębokości zaburzeń oberwuje się nieprawidłowości asymetrii w zadaniu werbalnym. Z kolei jeśli trudności rozpatrywać na poziomie emocjonalnym, silniejszym zaburzeniom towarzyszy nieprawidłowość asymetrii w zadaniu niewerbalnym. Ten interesujący wynik w pewnym sensie tłumaczy przytoczone niezgodności stanowisk innych autorów i wskazuje, że związek czynników charakteryzujących osoby badane z asymetrią półkulową u jąkających się jest bardzo złożony.

PORÓWNAWCZE BADANIA STATYSTYCZNE

„OKRESY KRYTYCZNE”

Kolejnym dowodem wskazującym na wzajemne powiązania pomiędzy nieprawidłowościami lateralizacji funkcji w mózgu a patologicznym zaburzeniem rytmu mowy jest również bliskie nakładanie się w czasie początków pojawienia się objawów jąkania oraz tak zwanych „okresów krytycznych” dla rozwoju mowy, które mają biologiczne podłoże, między innymi w dynamicznych przemianach w obrębie asymetrii półkulowej w ontogenezie. Nie budzi wątpliwości fakt, że jąkanie najczęściej powstaje i rozwija się w okresie kształtowania się mowy

dziecka i jest wyrazem trudności tego okresu (VAN RIPPER 1964). Interesujące badania statystyczne nad wystąpieniem po raz pierwszy objawów jąkania w różnych okresach rozwoju przeprowadziła ANDREWS i współpracownicy (1964) obserwując rozwój 1142 dzieci urodzonych w Newcastle w Anglii. Wyniki tych badań wykazały między innymi, że ryzyko pojawienia się po raz pierwszy objawów jąkania drastycznie zmniejszało się wraz z wiekiem dziecka. Podczas gdy u trzy-czterolatków wynosiło ono 1,3% (tzn. objawy jąkania stwierdzono u dwanaściorga spośród 900 przebadanych dzieci), u pięciolatków omawiany wskaźnik spadał do 0,6% (tzn. defekt ujawnił się po raz pierwszy tylko u pięciorga dzieci spośród 847 przebadanych), u ośmiolatków wynosił już tylko 0,25% (tzn. u dwojga spośród 800), a u dzieci 12-letnich i starszych prawdopodobieństwo wystąpienia po raz pierwszy tej wady mowy było zerowe (u żadnego z grupy przebadanych dzieci nie stwierdzono pojawienia się objawów jąkania). Prawidłowości zaobserwowane przez ANDREWS i współpracowników (1964) znalazły potwierdzenie w późniejszych badaniach przeprowadzonych na 1000 innych dzieciach (ANDREWS i współaut. 1983), oraz w interesujących zestawieniach statystycznych przeprowadzonych na różnych kontynentach w wielu krajach świata i przedstawionych w przeglądowych pracach VAN RIPPERA (1964, 1982) i BLOODSTEINA (1981). Z zestawień tych wynika, że jąkanie najczęściej pojawia się i rozwija pomiędzy trzecim a piątym rokiem życia. W 90% przypadków po raz pierwszy występuje przed ukończeniem siódmego roku życia (ANDREWS 1984, CONTURE 1982, SMITH i ZIMMERMANN 1993). W związku z tym uważa się, że patologicznym zaburzeniem rytmu mowy dotknięte jest aż około 4,9% dzieci w wieku do lat 15 (43 na 875 przebadanych przez ANDREWS i współaut. 1964). Interesujący wydaje się również fakt, że aż w 79% przypadków defekt ten ustąpił przed 16 rokiem życia (u 34 spośród 43 dzieci, u których wcześniej stwierdzono objawy jąkania).

Różnorodne źródła wskazują, że w trakcie rozwoju funkcji językowych występują również tak zwane „okresy krytyczne” (na przykład LOCKE 1994, SCOVEL 1988). Świadczą o tym, między innymi, badania kliniczne na dzieciach, u których w różnym okresie rozwoju nastąpiło jednostronne uszkodzenie mózgu (np. RASMUSSEN i MILNER 1977, WITESON 1987, LOCKE 1994). Badania te wykazały, że dzieci, u których uszkodzenie w obrębie klasycznych obszarów mowy wystąpiło przed piątym rokiem życia, były w stanie w stosunkowo szybkim czasie po uszkodzeniu posługiwać się mową w podobnym stopniu, jak ich rówieśnicy z nieuszkodzonym mózgiem. Wydaje się prawdopodobne, że w omawianych przypadkach w wyniku plastyczności funkcjonalnej, czyli podatności mózgu na zmiany we wczesnym okresie rozwoju, nieuszkodzona prawa półkula mózgu na zasadzie kompensacji przejęła realizację funkcji, dla których, jak można przypuszczać, dominującą byłaby uszkodzona półkula. Badania WITELSON (1987) dostarczyły jednoznacznych dowodów wskazujących, że plastyczność funkcjonalna oraz możliwości przejmowania realizacji zaburzonej funkcji przez nieuszkodzoną półkulę drastycznie maleją wraz z wiekiem dziecka. Oznacza to, że jeżeli uszkodzenie mózgu wystąpi w okresie późniejszym, na przykład około ósmego roku życia, pacjent będzie przejawiał trudności w posługiwaniu się mową, choć jego rekonwalescencja będzie znacznie szybsza, niż w przypadku gdy uszkodzenie wydarzy się po dwunastym roku życia (WITESON 1987, LOCKE 1991). Ogólnie

można więc stwierdzić, że stopień zaburzenia funkcji, dla której uszkodzona półkula jest dominującą, zależy od wieku, w którym nastąpiło uszkodzenie mózgu oraz im wcześniej nastąpi uszkodzenie, tym bardziej optymistyczne są rokowania co do poprawy opanowania zaburzonej funkcji. Do podobnych wniosków, wskazujących na istnienie w ontogenezie „krytycznych okresów” w rozwoju funkcji mowy, skłaniają badania innych autorów dotyczące możliwości opanowania poprawnego posługiwania się mową u osób socjalnie deprywowanych w dzieciństwie (LOCKE 1994), a także łatwości przyswajania przez dzieci imigrantów języka obcego (SCOVEL 1988, NEWPORT 1990).

Rozważania dotyczące „okresów krytycznych”, związanych z plastycznością funkcjonalną mózgu, znalazły również potwierdzenie w intensywnych badaniach anatomicznych nad dynamiką rozwoju poszczególnych obszarów lewej i prawej półkuli mózgowej w różnych okresach rozwoju (CORBALIS 1991). Badania THATCHERA i współpracowników (1987) wykazały między innymi, że w wieku trzech do sześciu lat zarówno czołowe, jak i potyliczne obszary lewej półkuli mózgu rozwijają się intensywniej, niż symetryczne obszary półkuli prawej. Okres ten jest niezmiernie istotny dla rozwoju funkcji mowy i ma związek ze zmianami w zakresie lateralizacji funkcji. Z jednej strony, zwolennicy koncepcji stopniowego rozwoju asymetrii funkcjonalnej na poszczególnych etapach ontogenezy (np. LENNEBERG 1967, CORBALIS i MORGAN 1978) wyrażają pogląd, że „okresy krytyczne” stanowią odzwierciedlenie kolejnych etapów rozwoju tej asymetrii. Z drugiej strony, zwolennicy koncepcji zakładającej istnienie asymetrii już od urodzenia (na przykład BRADSHAW 1989, HELLIGE 1993) uważają, że dynamiczne zmiany anatomiczne związane z plastycznością, stanowią biologiczną bazę dla ujawniania asymetrii istniejącej już od urodzenia. Która z tych dwóch koncepcji kształtowania się lateralizacji funkcjonalnej w ontogenezie okaże się prawdziwą, pokażą przyszłe badania.

Opierając się na dotychczasowych wynikach można stwierdzić, że okres od trzeciego do piątego, a nawet siódmego roku życia jest szczególnie zagrożony wystąpieniem jąkania, a jednocześnie jest bardzo istotny dla dynamicznych zmian leżących u podłoża nabywania funkcji językowych i kształtowania się asymetrii funkcjonalnej. Zgodność w czasie pojawiania się objawów jąkania i rozwoju, czy też ujawniania funkcjonalnej asymetrii wskazują na prawdopodobieństwo istnienia pewnych wspólnych mechanizmów leżących u podłoża tych dwóch procesów.

REĆCZNOŚĆ A ASYMETRIA FUNKCJONALNA MÓZGU

Innym źródłem informacji wskazującym na możliwość występowania nieprawidłowości asymetrii funkcjonalnej mózgu u osób wykazujących patologiczne zaburzenia rytmu mowy są porównawcze zestawienia częstości występowania przypadków leworęczności i oburęczności w dużych grupach osób jākających się i płynnie mówiących. Wyniki w tym zakresie nie zawsze są zgodne. I tak na przykład wielu autorów (m.in. prace przeglądowe HERRONA 1980 oraz BRYDENA i STEENHUISA 1991) udowodniło, że wśród leworęcznych i oburęcznych istnieje większy odsetek osób wykazujących prawo- lub obupółkulową reprezentację mowy, niż w populacji praworęcznych. Na tej podstawie, większy procent

leworęcznych wśród jąkających się mógłby sugerować, na zasadzie analogii, częstsze występowanie prawo- bądź obupółkulowej reprezentacji funkcji mowy. Zgodnie z tym, zarówno doniesienia logopedów-praktyków, jak i badania GESHWINDA i BEHANA (1982, 1984) wykazały większą liczbę osób leworęcznych i oburęcznych wśród jąkających (według GESHWINDA aż pięciokrotnie), niż wśród płynnie mówiących. Natomiast WEBSTER i POULOS (1987) wykazali podobną proporcję występowania leworęczności zarówno w grupie jąkających, jak i płynnie mówiących. Przeciwny obraz zależności stwierdzony przez autorytety w zakresie badań nad lateralizacją funkcji w dwóch bardzo znanych na świecie ośrodkach wymaga wyjaśnienia. Naszym zdaniem powyższa rozbieżność wyników mogła być spowodowana między innymi poprzez fakt, że zarówno GESCHWIND, jak i WEBSTER niezbyt precyzyjnie rejestrowali różnice indywidualne w grupie jąkających się, jak na przykład: głębokość jąkania, występowanie przypadków tej wady mowy w bliskiej rodzinie badanego, lateralizacja tak zwana skrzyżowana, poziom neurotyczności i podobne, co mogło wpłynąć na uzyskaną rozbieżność wyników. Za takim wyjaśnieniem rozbieżności przemawiają przytoczone wcześniej nasze wyniki badań, w których kontrolowaliśmy głębokość jąkania i cechy osobowości osób badanych. Stanowisko nasze jest zgodne z poglądem, że jąkanie jest defektem bardzo złożonym i w związku z tym nie u wszystkich osób, wykazujących tę wadę mowy, można oczekiwać nieprawidłowego wzorca asymetrii funkcjonalnej półkul mózgowych.

Omawiając związek ręczności z jąkaniem należy poświęcić nieco uwagi intrygującemu zagadnieniu, czy jąkanie można wywołać przeuczając ze względów kulturowych dziecko leworęczne do posługiwania się ręką prawą w wykonywaniu podstawowych czynności, jak pisanie, jedzenie, rysowanie i podobne. Są znane bowiem doniesienia logopedów — praktyków, a także opisy pojedynczych przypadków pacjentów wskazujące, że intensywne tłumienie leworęczności i energiczne zachęcanie dziecka leworęcznego do posługiwania się ręką prawą powodowało pojawienie się jąkania, które ustępowało po zaprzestaniu takiego postępowania (SOVAK 1984). Są opisane również przypadki pojawienia się jąkania u dorosłych, którzy po amputacji prawej ręki lub jej zranieniu uczyli się pisania ręką lewą (LENNON 1962). Wydaje się, że co najmniej dwa czynniki mogą mieć istotne znaczenie przy rozważaniu ewentualnych skutków takiego przedstawiania: lateralizacja struktur realizujących funkcje mowy, czytania i pisanie oraz kontrola motoryczna ręki dominującej przez przeciwległą stronę mózgu. Zgodnie z przytoczonymi wcześniej danymi uzyskanymi przez BRYDENA i STEENHUISA (1991) u 66% osób leworęcznych struktury regulujące procesy mowy są zlokalizowane w lewej półkuli mózgu, u 17% w półkuli prawej, istnieje poza tym całkiem liczna grupa osób leworęcznych (17%), u których mowa jest zlokalizowana obupółkulowo. Uwzględniając powszechnie znany fakt, że połączenia eferentne i aferentne występują przede wszystkim pomiędzy półkulą mózgową i przeciwległą stroną ciała, przymuszanie do zmiany naturalnej preferencji ręki jest więc dramatyczną ingerencją w neuropsychologiczne mechanizmy zakodowane genetycznie i utrwalone w ontogenezie, co nie może być obojętne dla dalszego rozwoju dziecka. Przytoczone wyżej doniesienia o możliwości wystąpienia objawów jąkania w trakcie tłumienia leworęczności zostały jednak zakwestionowane w przeglądowej pracy SPRINGERA i DEUTSCHA (1989), którzy odwołali się do faktu,

że w pewnych krajach, na przykład w Chińskiej Republice Ludowej, gdzie choć szczególnie rygorystycznie wymaga się od dzieci posługiwania się ręką prawą, nie zanotowano większej liczby jąkających niż w innych, bardziej liberalnych pod tym względem krajach.

Podsumowując nasze rozważania na temat związku ręczności i jąkania należy podkreślić, że istnieją dowody wskazujące na częstsze występowanie jąkania wśród osób określanych jako „niepraworęczne”, co wskazywać może na nieprawidłowości wzorca lateralizacji funkcji mowy. Zagadnienie to nie zostało jednak w pełni wyjaśnione i wymaga dalszych badań. Nie zachęcamy jednak do tłumienia leworęczności i przestawiania dziecka leworęcznego na posługiwanie się ręką prawą, choć nie została jeszcze dostarczona pełna weryfikacja eksperymentalna ewentualnych skutków takiego postępowania.

Przedstawione w obecnym artykule badania dostarczyły wielu nowych, interesujących danych wskazujących na związek pomiędzy jąkaniem a lateralizacją funkcji w mózgu. Dowiodły one jednocześnie, że związek ten jest bardzo złożony i zależy od szeregu różnorodnych czynników. Dotychczasowe badania wykazały u jąkających się nieprawidłowości funkcjonalnej asymetrii mózgu zarówno w zakresie funkcji werbalnych powiązanych z procesami mowy, dla których zazwyczaj sprawniejsza jest lewa półkula mózgu, jak i w operacjach niewerbalnych, wymagających analizy cech wzrokowo-przestrzennych oraz w opracowywaniu informacji zawierającej ładunek emocjonalny, dla których zazwyczaj dominującą jest prawa półkula mózgu. Tak więc uzyskane wyniki upoważniają do wyciągnięcia wniosków, że asymetria półkulowa u jąkających się jest słabiej zaznaczona niż u płynnie mówiących, a jej wzorzec jest niekiedy przeciwny. Przytoczone w obecnym artykule niezgodności wyników uzyskanych w różnych ośrodkach wymagają dalszych badań. Biorąc pod uwagę niejednorodność zaburzenia mowy, jakim jest jąkanie, a także uwzględniając wpływ czynników charakteryzujących osoby jąkające się (nasilenie jąkania, neurotyczność) na asymetrię półkulową funkcji sądzimy, że przyszłe badania powinny koncentrować się na precyzyjniejszym określeniu populacji osób z tym defektem, w której zaburzenia lateralizacji funkcji są prawdopodobne. Wyniki takich badań byłyby interesujące nie tylko ze względów poznawczych lecz również utylitarnych, jako inspirujące logopedów-praktyków w poszukiwaniu nowych metod terapii.

NEUROPSYCHOLOGICAL BASIS OF STUTTERING — A REVIEW OF EXPERIMENTAL STUDIES ON HEMISPHERIC ASYMMETRY

Summary

Over the past years, the scientists have attempted to define the neuropathological mechanism responsible for stuttering. Many authors have assumed that the abnormal hemispheric asymmetry pattern in processing verbal, visuo-spatial and emotional information is related to stuttering both in children and adults. Standard models of hemispheric asymmetry assume a dichotomous division of functional competence between the two hemispheres. In this article is reviewed the evidence, both positive and negative, relating stuttering to abnormalities in this area. The results of these studies indicate that stutterers may display linguistic processing capacities different from those of normal speakers. This speech disorder is also related to disturbances in right-hemisphere functions such as prosody of speech, visuo-spatial and emotional information processing. The conclusions of such literature are critically examined and the effect of various subject related factors on brain lateraliz-

ation in stutterers is reviewed. Finally, the author discusses her own conclusions and views concerning the directions that future research in this area might take.

LITERATURA

- ALLEN M., 1983. *Model of hemispheric specialization*. Psychol. Bull. 91, 73-104.
- ANDREWS G., HARRIS M., GARSIDE R. i KAY D., 1964. *The syndrome of stuttering*. Clin. Dev. Med. 17, 1-191.
- ANDREWS G., QUINN P. T. i SORBY W. A., 1972. *Stuttering: An investigation into cerebral dominance for speech*. J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry 25, 414-418.
- ANDREWS G., CRAIG A., FEYER A., HODDINOTT S., HOWIE P. i NILSON M., 1983. *Stuttering: A review of research findings and theories circa*. J. Speech Hear. Disord. 48, 226-246.
- ANDREWS G., 1984. *The epidemiology of stuttering*. [W:] *Nature and treatment of stuttering: new directions*. R. C. CURLEE i W. PERKINS (red). San Diego, College Hill Press Inc.
- BERGMANN G., 1986. *Studies on stuttering as a prosodic disturbance*. J. Speech Hear. Res. 29, 290-300.
- BLOODSTEIN O., 1981. *A handbook of stuttering*. Chicago, National Easter Seal Society.
- BORDEN G. J., 1983. *Intonation versus execution time during manual and oral counting by stutterers*. J. Speech Hear. Res. 28, 363-372.
- BORDEN G. J., BAER T., KENNEY M. K., 1985. *Onset of voicing in stuttered and fluent utterances*. J. Speech Hear. Res. 28, 363-372.
- BRADSHAW J. L., 1989. *Hemispheric specialization and psychological function*. Chichester, Wiley and Sons.
- BRADY J. P., BERSON J., 1975. *Stuttering, dichotic listening and cerebral dominance*. Arch. Gen. Psychiatry 32, 1449-1459.
- BRYDEN M. P. i STEENHUIS R. E., 1991. *Issues in assessment of handedness*. [W:] *Cerebral laterality — theory and research*. F. L. KITTERLE (red), New Jersey, Lawrence Erlbaum Associates Inc.
- BUDOHOSKA W., SOBÓTKA S., WASILEWSKI R., 1991. *Różnice półkulowe w potencjałach wywołanych w trakcie przeżywania emocji*. Przegl. Psych. 34, 583-600.
- BUDOHOSKA W., GRABOWSKA A., 1992. *Organizacja niektórych czynności psychicznych w mózgu a asymetria półkulowa*. [W:] *Psychologia ogólna, [t.:] Pamięć, uczenie się, język*. T. TOMASZEWSKI (red). Warszawa, P.W.N., 268-316.
- BUDOHOSKA W., GRABOWSKA A. 1994. *Dwie półkule — jeden mózg*. Warszawa, Wiedza Powszechna, Seria Omega.
- BYRNE R., 1989. *Pomówmy o zacinaniu*. Warszawa, Państwowy Zakład Wydawnictw Lekarskich.
- CHOYNOWSKI M., 1968. *Opracowanie polskiej adaptacji Inwentarza osobowości Eysencka*. Biul. Psych. 2, 51-95.
- COUTURE E. G., 1982. *Youngsters who stutter: diagnosis, parent counseling and referral*. Br. J. Disord. Commun. 3, 163-169.
- CORBALIS M. C., 1991. *The lopsided Ape: evolution of generative mind*. Oxford University Press, Oxford.
- CORBALIS M. C., MORGAN M. J., 1978. *On the biological basis of human laterality*. Behav. Brain Sci. 2, 261-336.
- CURLLEE R. E., PERKINS W. H., 1984. *Nature and treatment of stuttering: new directions*. San Diego, College Hill Press Inc.
- CURRY F., GREGORY H., 1969. *The performance of stutterers on dichotic listening task through to reflect cerebral dominance*. J. Speech Hear. Res. 12, 73-82.
- DAUER R. M., 1983. *Stress-timing and syllable-timing reanalyzed*. J. Phon. 11, 51-62.
- DORMAN M. F., PORTER R. J., 1975. *Hemispheric lateralization for speech perception in stutterers*. Cortex 11, 181-185.
- FERNAU-HORN H., 1973. *Die Sprechneurosen*. (2nd ed.) Stuttgart, Hippokrates.
- FOX D. R., 1966. *Encephalographic analysis during stuttering and nonstuttering*. J. Speech Hear. Res. 9, 488-497.
- GAINOTTI G., 1989. *Features of emotional behaviour relevant to neurobiology and theories of emotions*. [W:] *Emotions and the dual brain*. G. GAINOTTI, C. CALTAGIRONE (red). Berlin, SPRINGER Verlag, Experimental Brain Research Series 18, 9-27.
- GESHWIND N., BEHAN P., 1982. *Left-handedness: Association with immune disease, migraine, and developmental learning disorder*. Proceedings of the National Academy of Sciences 79, 5097-5100.

- GESHWIND N., BEHAN P., 1984. *Laterality, hormones and immunity*. [W:] *Cerebral Dominance: The Biological Foundations*. N. GESHWIND, A. M. GALABURDA (red). Cambridge (Mass) and London, Harward University Press.
- GRUBER L., POWELL R. L., 1974. *Responses of stuttering and nonstuttering children to a dichotic listening task*. *Percept. Mot. Skills* 38, 263-264.
- HAND C. R., HAYNES W. O., 1983. *Linguistic processing and reaction time differences in stutterers and non-stutterers*. *J. Speech Hear. Res.* 26, 181-185.
- HELLIGE J. B., 1993. *Hemispheric asymmetry: what's right and what's left*. Cambridge, Harward University Press.
- HERRON J., 1980. *Neuropsychology of left handers*. New York, Academic Press.
- HOWLIN P., RUTTER H., 1987. *The consequences of language delay for other aspects of development*. [W:] *Language development and disorders*. W. Yule, M. RUTTER (red). Oxford, Mac Keith Press, 271-294.
- JOHNSON W., DARLEY F. L., 1963. *Diagnostic methods in speech pathology*. New York, Haper and Row Publishers.
- JONES R. K., 1966. *Observations on stammering after localized brain injury*. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 29, 192-195.
- LADD D. R., SILVERMAN K. E., TOLKMITT F., BERGMANN G., SCHERER K. R., 1985. *Evidence for the independent function of intonation contour type, voice quality, and range in signalling speaker affect*. *J. Acoust. Soc. Am.* 78, 435-444.
- LENNEBERG E., 1967. *Biological Foundations of Language*. New York, Wiley and Sons.
- LENNON E. J., 1962. *Le begaiement. Therapeutiques modernes*. Paris.
- LIBETRAU R. M., DALLY D. A., 1981. *Auditory processing and perceptual abilities of „organic” and „functional” stutterers*. *J. Fluency Disord.* 6, 219-231.
- LOCKE J. L., 1991. *Phases in the development of Linguistic Capacity*. [W:] *Maturational constraints on language learning*. E. NEWPORT (red). *Cognit. Sci.* 14, 11-28.
- LOCKE J. L., 1994. *Phases in the developmental in linguistic capacity*. [W:] *Evolution and Neurology of Language*. D. C. GAJDUSEK, G. M. MCKHANN, L. C. BOLIS (red). Amsterdam, Elsevier Sciences B.V.
- LUSCHINGER R., DUBOIS C., 1963. *Ein Vergleich der Sprachmelodie- und Lautstärkekurve bei Normalen Gehirnkranke und Stottern*. *Folia Phoniatr.* 15, 21-41.
- MOORE W. H., 1976. *Bilateral tachistoscopic word presentation of stutterers and normal subjects*. *Brain Lang.* 3, 434-442.
- MOORE W. H. J., LANG M. K., 1977. *Alpha asymmetry over the right and left hemispheres of stutterers and control subjects predicting masses oral readings. A preliminary investigation*. *Percept. Mot. Skills* 44, 223-230.
- MOORE W. H., HAYNES W. O., 1980. *Alpha hemispheric asymmetry and stuttering: some support for a segmentation dysfunction hypothesis*. *J. Speech Hear. Res.* 23, 229-247.
- MOORE W. H. J., LORENDO I., 1980. *Alpha hemispheric asymmetries in stuttering and nonstuttering subjects for words of high and low imagery*. *J. Fluency Disord.* 5, 11-26.
- MOORE W. H., CRAVEN D., FABER M., 1982. *Hemispheric alpha asymmetries of words with positive, negative and neutral arousal values preceding tasks of recall and recognition*. *Brain Lang.* 17, 211-224.
- MOORE W. H., 1986. *Hemispheric alpha asymmetries of stutterers and nonstutterers for the recall and recognition of words and connected reading passage: some relationships to severity of stuttering*. *J. Fluency Disord.* 11, 71-89.
- NASS R., SCHRETER B., HEIER L., 1994. *Acquired stuttering after a second stroke in a two-year-old*. *Dev. Med. Child Neurol.* 36, 70-83.
- NEWPORT E., 1990. *Maturational constraints on language learning*. *Cogn. Sci.* 14, 11-28.
- NIPPOLD M., 1988. *Concomitant speech and language disorders in stuttering children*. *J. Speech Hear. Disord.* 55, 51-60.
- ORTON S., 1928. *A physiological theory of reading disability and stuttering in children*. *N. Engl. J. Med.* 199, 1046-1052.
- PINSKY S. D., McADAM D. W., 1980. *Encephalographic and dichotic indices of cerebral laterality in stutterers*. *Brain Lang.* 11, 374-397.
- PLAKOSH P., 1978. *The functional asymmetry of the brain: Hemispheric specialization in stutterers for processing visually presented linguistic and spatial stimuli*. Praca doktorska, the Palo Alto School for Professional Psychology.
- QUINN P. T., 1972. *Stuttering, cerebral dominance and dichotic listening word test*. *Med. J. Aust.* 2, 639-643.

- RASMUSSEN T., MILNER B., 1977. *The role of early left-brain injury in determining lateralization of cerebral speech function*. Ann. N. Y. Acad. Sci. 299, 355-369.
- RASTATTER M. P., DELL C., 1987a. *Reaction times of moderate and severe stutterers to monaural verbal stimuli: some implications for nonlinguistic organization*. J. Speech Hear. Res. 30, 21-27.
- RASTATTER M. P., DELL C., 1987b. *Vocal reaction times of stuttering subjects to tachistoscopically presented concrete and abstract words*. J. Speech Hear. Res. 30, 306-310.
- RASTATTER M. P., LOREN C. A., 1988. *Visual coding dominance in stuttering: some evidence from central tachistoscopic stimulation (tachistoscopic viewing and stuttering)*. J. Fluency Disord. 13, 89-95.
- ROSENFELD D. B., GOODGLASS H., 1980. *Dichotic listening for cerebral dominance in stutterers*. Brain Lang. 11, 170-180.
- SCOVEL T., 1988. *A time to speak. A psycholinguistic inquiry into the critical period for human speech*. New York, Newbury House.
- SCRIPTURE E. W., 1925. *Das Stottern*. Arch. Psychiatr. Forsch. 72, 108-113.
- SLORACH N., NOEHR B., 1973. *Dichotic listening in stuttering and dyslalic children*. Cortex 9, 295-300.
- SMITH A., ZIMMERMANN G. N. 1993. *Stuttering: physiological correlates and theoretical perspectives*. [W:] *Linguistic Disorders and Pathologies*. G. BLANKEN, J. DITTMAN, H. GRIMM, J. MARSHALL, C. WALLESH (red). An international handbook, Berlin, Walter de Gruyter.
- SOMMERS R. K., BRADY W., MOORE W. H., 1975. *Dichotic ear preference of stuttering children and adults*. Percept. Mot. Skills 41, 931-938.
- SOVAK M., 1984. *Logopedie predskolního věku*. Praha, Statní Pedagogické Nakladatelství.
- SPRINGER S. P., DEUTSCH G., 1989. *Left brain, right brain*. New York, W.H. Freeman and Company.
- SZELAG E., CZACHOWSKA-SIESZYCKA B., 1986. *Measurement of lateral differences for faces in two-response paradigm*. Acta Neurobiol. Exp. 46, 213-221.
- SZELAG E., FERSTEN E., 1991. *Recognition of faces expressing emotions in patients with unilateral brain damage*. Acta Neurobiol. Exp. 51, 115-123.
- SZELAG E., WASILEWSKI R., 1992. *The effect of congenital deafness on cerebral asymmetry in the perception of emotional and non-emotional faces*. Acta Psych. 79, 45-57.
- SZELAG E., GARWARSKA-KOLEK D., HERMAN A., STĄSIEK J., 1993. *Brain lateralization and severity of stuttering in children*. Acta Neurobiol. Exp. 53, 263-267.
- SZELAG E., HERMAN A., GARWARSKA-KOLEK D., 1994. *Individual differences in the cerebral lateralization of stutterers in the visual perception of faces (w przygotowaniu)*.
- TARKOWSKI Z., 1992. *Jąkanie wczesnodziecięce*. Warszawa, Wydawnictwa Szkolne i Pedagogiczne.
- THATCHER R. W., WALDER R. A., GUIDICE S., 1987. *Human cerebral hemispheres develop at different rates and ages*. Science 36, 1110-1113.
- TRAVIS L. E. 1927. *A phono-photographic study of stutterers' voice and speech*. Psychol. Monogr. 36, 109-141.
- TRAVIS L. E., 1931. *Speech pathology*. New York: Appleton-Century-Crofts.
- VAN RIPPER C., 1964. *Speech correction. Principles and methods*. New Jersey, Englewood Cliffs.
- VAN RIPPER C., 1982. *The nature of stuttering*. Englewood Cliffs, New York, Prentice Hall.
- WADA J., RASMUSSEN T., 1960. *Intracarotid injection of sodium amytal for lateralization of cerebral speech dominance. Experimental and clinical observations*. J. Neurosurg. 17, 266-282.
- WEBSTER W. G., PAULOS M., 1987. *Handedness distributions among adults who stutter*. Cortex 23, 705-708.
- WEBSTER W. G., 1988. *Neural mechanisms underlying stuttering: evidence from bimanual handwriting performance*. Brain Lang. 33, 226-244.
- WELLS B. G., MOORE H. W., 1990. *EEG alpha asymmetries in stutterers and non-stutterers: effects of linguistic variables on hemispheric processing and fluency*. Neuropsychologia 28, 1295-1305.
- WINGATE M. E., 1964. *A standard definition of stuttering*. J. Speech. Hear. Disord. 29, 484-489.
- WINGATE M. E. 1979. *The loci of stuttering: Grammar or prosody?* J. Commun. Disord. 12, 283-290.
- WITSON S. F. 1987. *Neurobiological aspects of language*. Child Dev. 58, 653-688.
- WOOD F., STRUMPS D., MCKEEHAN A., SHELDON S., PROCTOR J., 1980. *Patterns of regional cerebral blood flow during attempted reading aloud by stutterers both on and off haloperidol medication: evidence for inadequate left frontal activation during stuttering*. Brain Lang. 9, 141-144.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1977. *Manual of the international statistical classification of diseases, injuries and causes of death*. Geneva, World Health Organization.

RAFAŁ BUTOWT

*Zakład Cytologii i Embriologii Roślin Instytutu Biologii
Uniwersytet Mikołaja Kopernika
Gagarina 9, 87-100 Toruń*

FILTROWANIE ENERGII ELEKTRONÓW — NOWA TECHNIKA
TWORZENIA OBRAZU W TRANSMISYJNYM MIKROSKOPIE
ELEKTRONOWYM

WPROWADZENIE

Mikroskop elektronowy jest jednym z podstawowych narzędzi stosowanych do badań strukturalnych, zarówno w odniesieniu do materii żywej, jak i nieżywej. Postępujące udoskonalanie współczesnych transmisyjnych mikroskopów elektronowych (ang. TEM — transmission electron microscope) w znacznym stopniu przyczyniło się do postępu badań biologicznych, zwłaszcza na poziomie komórkowym i tkankowym.

Pierwszy mikroskop elektronowy został zbudowany w 1931 roku przez E. Ruska i M. Knolla. Ten przyrząd jest dziś uważany za pierwszy mikroskop elektronowy, nawet jeśli wspomnieć o jego nadzwyczaj skromnym, całkowitym powiększeniu ($3,6 \times 17,4$).

Przez punktową zdolność rozdzielczą rozumie się na ogół najmniejszą odległość między dwoma punktami, w jakiej są one jeszcze rozróżnialne jako oddzielne obiekty. Już w 1873 roku Ernst Abbe wykazał, że zdolność rozdzielcza mikroskopu świetlnego nie może być lepsza niż około 200 nm. Wartość ta jest bowiem w przybliżeniu równa wartości połowy długości fali elektromagnetycznej stosowanej do obserwacji. W przybliżeniu określa to następujące znane wyrażenie:

$$d = L/A \quad (1)$$

gdzie: d — zdolność rozdzielcza fali elektronowej [nm]

L — długość fali świetlnej [nm]

A — apertura obiektywu (czyli sinus połowy maksymalnego kąta rozwarcia przesłony obrazowej obiektywu).

Mikroskop elektronowy podlega tym samym prawom optyki co mikroskop świetlny. Tak więc wyrażenie (1) obowiązuje jednakowo w mikroskopii świetlnej i mikroskopii elektronowej. Jednak różnego rodzaju błędy formowania odwzorowania obrazu są w mikroskopie elektronowym znacznie trudniejsze do usunięcia aniżeli w mikroskopie świetlnym. Stąd też ogólne wyrażenie określające punkto-

wą zdolność rozdzielczą współczesnych TEM przedstawia się najczęściej w postaci (HUTCHISON 1990):

$$d = 0,66 \times c_s^{1/4} \times L^{3/4} \quad (2)$$

gdzie: d — zdolność rozdzielcza [nm]

c_s — współczynnik aberracji sferycznej

L — długość fali elektronowej [nm]

Rozpędzony w polu elektrycznym między katodą i anodą strumień elektronów tworzy w kolumnie mikroskopu wiązkę elektronów o fali bardzo małej długości (MEEK 1976). Wartość długości tej fali zależy od masy elektronu (masa ta nie jest stała, lecz rośnie wraz ze wzrostem prędkości — tak zwany efekt relatywistyczny) oraz od jego prędkości. Iloczyn tych dwu wielkości określa pęd elektronu. Związek pędu i długości fali elektronu jest opisywany znanym równaniem de Broglie'a:

$$L = h/m \times v \quad (3)$$

gdzie: L — długość fali pędzących elektronów [nm]

h — stała Plancka [$6,62 \times 10^{-34}$ J \times s]

m — masa elektronu [$9,11 \times 10^{-31}$ kg]

v — prędkość elektronu [m/s]

Prędkość elektronu zależy natomiast od wartości przyłożonego między katodą i anodą napięcia przyspieszającego E_0 (MEEK 1976). Na przykład, dla $E_0 = 100$ keV prędkość elektronów wynosi około 164 000 km/s. Poruszające się z tą prędkością elektrony są opisywane falą o długości równej w przybliżeniu 0,0037 nm. Po wstawieniu tej liczby do równania (1) (oraz założeniu że $A = 2 \times 10^{-2}$ Rad) otrzymalibyśmy zdolność rozdzielczą d rzędu 0,2 nm = 2×10^{-10} m. Wartość ta jest zbliżona do teoretycznej zdolności rozdzielczej mikroskopu elektronowego, działającego pod napięciem przyspieszającym 100 keV. Ażeby osiągnąć taką wartość d , soczewki powinny być idealne, zasilanie mikroskopu nieskończenie stabilne, natomiast bardzo cienka próbka nie powinna zmieniać struktury pod wpływem bombardowania wiązką elektronów (SLAYTER E. i SLAYTER H. 1993).

Spełnienie tych warunków nie jest jednak proste. W chwili obecnej najlepsze uzyskiwane rozdzielczości w wysokorozdzielczych transmisyjnych mikroskopach elektronowych są rzędu 0,12–0,16 nm (HUTCHISON 1990). Z taką zdolnością rozdzielczą osiąga się odwzorowanie obrazów dla specjalnie przygotowywanych próbek nieorganicznych, a nie dla preparatów biologicznych. W praktyce, rozdzielczości obrazów uzyskiwane we współczesnych TEM w skrawkach biologicznych o grubości poniżej 100 nm osiągają wartości rzędu 0,25–0,50 nm (EGLE i współaut. 1984). W przypadku skrawków grubszych od 200–300 nm rozdzielczość obrazu jest co najmniej o rząd wielkości gorsza. Wynika stąd, że w konwencjonalnym TEM rozdzielczość obrazów zależy w dużej mierze od grubości stosowanych preparatów.

W przypadku preparatów biologicznych dodatkowe kłopoty z otrzymanymi obrazami sprawia niewielki ich kontrast (SLAYTER E. i SLAYTER H. 1993). Oznacza to, że obraz składa się z sąsiadujących ze sobą obszarów o niewielkiej różnicy

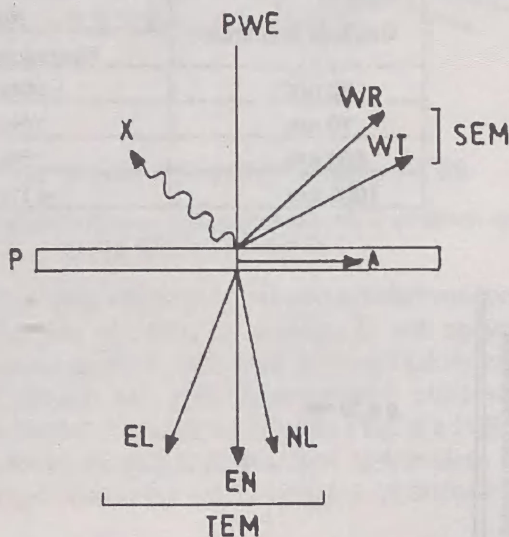
w skali szarości¹. Przy czym może on być zbyt jasny lub zbyt ciemny. Ten drugi przypadek zdarza się, gdy nadmierna grubość skrawka utrudnia jego penetrację przez wiązkę elektronową.

Powyższe problemy wynikają ze sposobu oddziaływania pierwotnej wiązki elektronów z materiałem próbki (rys. 1). Spośród wielu efektów tego oddziaływania za powstanie prawidłowego obrazu w TEM są odpowiedzialne elektrony rozproszone na badanym preparacie w sposób elastyczny (ang. elastic scattering). Rozproszenie elastyczne dokonuje się na skutek oddziaływań elektrostatycznych (Coulomba) pędzących elektronów z jądrami atomów próbki, zachodzi bez strat energii tych elektronów ($dE = 0$) oraz generalnie pod dużym kątem w stosunku do osi optycznej mikroskopu (SLAYTER E. i SLAYTER H. 1993).

Elektrony rozproszone przez próbkę nieelastycznie tracą część swojej energii głównie w wyniku oddziaływań z elektronami wewnątrz różnych atomów próbki (ang. inelastic scattering). W wyniku oddziaływań nieelastycznych większość elektronów jest rozpraszana pod małymi kątami w stosunku do osi mikroskopu (rys. 1, SLAYTER E. i SLAYTER H. 1993). Elektrony te stanowią „tło” powstającego obrazu, obniżając tym jego zdolność rozdzielczą i kontrast.

Jakość obrazu w TEM pogarsza się drastycznie ze wzrostem grubości badanej próbki, ponieważ w tych warunkach spada stosunek elektronów rozproszonych elastycznie do elektronów rozproszonych nieelastycznie (tab. 1, ANDREWS i LEAPMAN 1993).

Intensywność rozpraszania elektronów zależy również od masy atomowej pierwiastka rozpraszającego. Wraz ze wzrostem masy rośnie ogólna wydajność rozpraszania oraz stosunek rozproszeń elastycznych do nieelastycznych (SLAYTER E. i SLAYTER H. 1993). Stąd też materiały biologiczne, złożone głównie z pierwiastków lekkich, bez odpowiednich modyfikacji, są mało kontrastowe.



Rys. 1. Niektóre efekty oddziaływania wiązki elektronowej (PWE) z próbką (P) badanego materiału (MEEK 1976).

WR — elektrony rozproszone wstecznie; WT — elektrony wtórne; EL — elektrony rozproszone elastycznie; NL — elektrony rozproszone nieelastycznie; EN — elektrony nierozproszone; X — promieniowanie rentgenowskie; SEM — skaningowy mikroskop elektronowy; TEM — transmisyjny mikroskop elektronowy; A — elektrony zaabsorbowane.

¹Miarą kontrastu obrazu jest wartość wyrażenia:

$$\%C = I_t - I_o \times 100\%$$

gdzie: %C — miara kontrastu

I_t — intensywność promieniowania w punkcie obrazu należącym do tła

I_o — intensywność promieniowania w punkcie należącym do obiektu.

Idealna krzywa rozkładu energii elektronów rozproszonych na preparacie biologicznym posiada charakterystyczny, hiperboliczny przebieg (rys. 2). Opisuje ją funkcja typu:

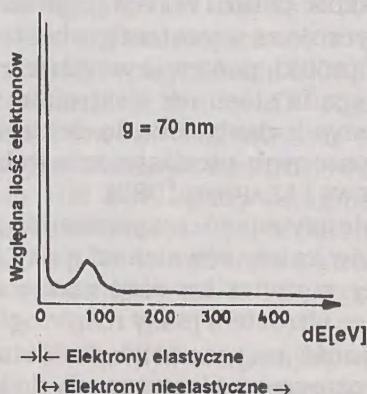
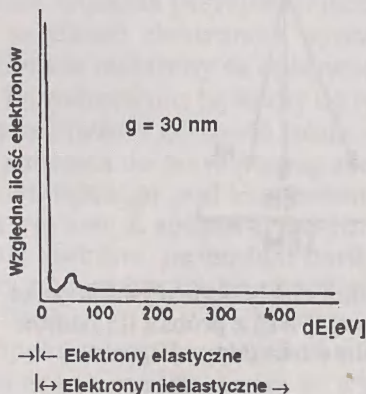
$$Y = ax^{-b} \quad (4)$$

Wysokość i położenie jej maksimum zależą od grubości preparatu i wartości napięcia przyspieszającego wiązkę elektronową w mikroskopie. Miarą wartości liczbowej elektronów rozproszonych elastycznie i nieelastycznie jest powierzchnia pod krzywą.

Tabela 1

Względny udział elektronów rozproszonych elastycznie i nieelastycznie w zależności od grubości próbki biologicznej (dla napięcia przyspieszającego $E_0 = 80$ kV).

Grubość preparatu	Rodzaj rozpraszania	
	Elastyczne	Nieelastyczne
30 nm	> 90%	< 10%
70 nm	70%	30%
500 nm	3%	97%
1000 nm	< 1%	> 99%



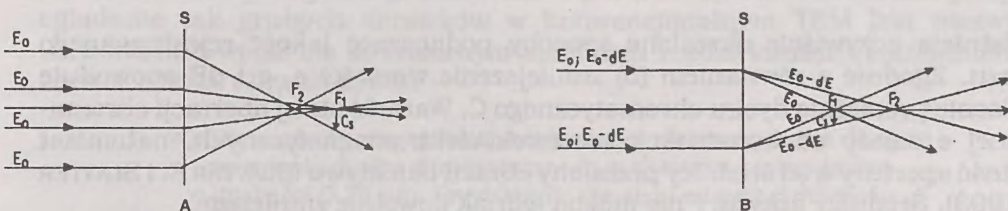
Rys. 2. Schemat rozkładu strat energii elektronów (dE) rozproszonych na preparacie biologicznym o różnej grubości (g).

PRZYCZYNY „KŁOPOTÓW” Z OBRAZEM

Sama obecność elektronów rozproszonych elastycznie, nieelastycznie oraz elektronów nierozproszonych jest naturalną konsekwencją budowy materii i sposobu jej oddziaływania z wiązką pędzących elektronów i bezpośrednią przyczyną powstawania obrazu i powstających zaburzeń obrazu. Przyczyn pośrednich zaburzeń obrazu mikroskopowego należy szukać we właściwościach

soczewek elektromagnetycznych, stosowanych do budowy mikroskopów elektronowych.

Termin „soczewka” odzwierciedla analogię funkcjonalną z soczewkami szklanymi wchodzącymi w skład mikroskopu świetlnego. Soczewki elektromagnetyczne wykazują, bowiem, zdolności skupiania i rozpraszania elektronów bez zmiany ich energii i prędkości (MEEK 1976). Obydwa rodzaje soczewek podlegają zatem tym samym prawom optycznym. Odnosi się to również do występowania w nich zniekształcających obraz aberracji, zwłaszcza aberracji sferycznej i aberracji chromatycznej (rys. 3), astygmatyzmu i podobne.



Rys. 3. Schemat aberracji sferycznej (a) oraz aberracji chromatycznej (b).

S — soczewka; F1, F2 — ogniskowe; Cc — promień dysku chromatycznego; Cs — promień dysku sferycznego; E0, E0 - dE — energie wiązki elektronów.

W efekcie wystąpienia zjawiska aberracji sferycznej i aberracji chromatycznej soczewka ogniskuje wiązkę elektronową w różnych punktach osi optycznej mikroskopu (rys. 3). Dlatego też obrazem punktu jest dysk, którego promień jest miarą wielkości danej aberracji. Promień ten jest jednocześnie zbliżony do osiąganey w danym mikroskopie zdolności rozdzielczej (HEZEL i BAUER 1985).

Podkreślić należy, że aberracja sferyczna jest zasadniczym zjawiskiem ograniczającym zdolność rozdzielczą współczesnych mikroskopów elektronowych (HUTCHISON 1994).

Dodatkowym źródłem problemów związanych z jakością obrazu w mikroskopach pracujących pod napięciami 20–100 keV, które są najczęściej używane w badaniach biologicznych, jest aberracja chromatyczna układów soczewek znajdujących się w mikroskopie poniżej preparatu (SOKOŁOWSKI i współaut. 1980). Emitowane przez katodę elektrony tworzą wiązkę elektronów przestrzennie spójną o energii $E_0 \pm 1-2$ eV. Jednak w procesach oddziaływań wiązki elektronów z atomami preparatu, zwłaszcza jeśli jest to gruby preparat biologiczny, znaczna ich część ulega rozproszeniom nieelastycznym. Elektrony rozproszone nieelastycznie o niższej energii (E_0-dE) i dłuższej fali są ogniskowane w dalszych punktach osi optycznej mikroskopu, aniżeli elektrony rozproszone elastycznie o energii E_0 .

Wielkość promienia dysku chromatycznego można oszacować na podstawie wyrażenia (HEZEL i BAUER 1985):

$$C = e \times a \times dE/E_0 \tag{5}$$

gdzie: C — długość promienia dysku chromatycznego [mm]

e — stała aberracji chromatycznej [mm]

a — apertura obiektywu

dE — wartość strat energii elektronów rozproszonych nieelastycznie [eV]

E_0 — napięcie przyspieszające wiązkę elektronową [eV].

Zakres strat energii elektronów rozproszonych nieelastycznie posiada istotny wpływ na wartość C . Mieści się on w bardzo szerokich granicach i, jak zauważono wcześniej, wykazuje rozkład hiperboliczny (rys. 2).

MOŻLIWOŚCI POPRAWIANIA JAKOŚCI OBRAZU MIKROSKOPOWEGO

Istnieją oczywiście określone sposoby podnoszące jakość rejestrowanego obrazu. Zgodnie z równaniem (5) zmniejszenie wartości e , a i dE spowoduje obniżenie promienia dysku chromatycznego C . Wartość stałej aberracji chromatycznej e zależy od konstrukcji soczewek elektromagnetycznych, natomiast wartość apertury a od średnicy przesłony obrazu obiektywu (SLAYTER E. i SLAYTER H. 1993). Średnicy apertury nie można jednak dowolnie zmniejszać.

Odwrotna zależność istnieje natomiast między wielkościami C i E_0 . Zastosowanie zatem bardzo wysokich napięć przyspieszających wiązkę elektronową również umożliwi obniżenie wartości promienia dysku chromatycznego C . Napięcia stosowane w mikroskopach wysokonapięciowych sięgają milionów elektronowoltów (HERMAN 1983). W tego rodzaju TEM możliwe jest oglądanie z dobrą rozdzielczością także grubych preparatów (rzędu mikrometrów), jednakże kontrast uzyskiwanego obrazu jest niewielki i maleje wraz ze wzrostem napięcia przyspieszającego elektrony (MANNELLA i RATKOWSKI 1983, DELONG i współaut. 1994). Mikroskopy wysokonapięciowe konstruuje się już od wielu lat. Nie są one zbyt rozpowszechnione w laboratoriach biologicznych z uwagi na ich wysoki koszt.

Dotychczas polepszenie jakości obrazu skrawków biologicznych dokonywano w praktyce krojąc odpowiednio cienkie preparaty, najlepiej poniżej 100 nm. Jak zauważono bowiem, dla cieńszych skrawków preparatu wzrasta stosunek rozproszeń elastycznych do nieelastycznych.

Najnowszym i niestety bardzo drogim sposobem poprawiania jakości obrazu mikroskopowego jest metoda polegająca na filtrowaniu energii elektronów, to znaczy przepuszczaniu na ekran lub kliszę fotograficzną elektronów o ściśle określonej energii (HEZEL i BAUER 1985, BAUER 1988, KOPF-MAIER 1991). Metodę tę określa się terminem elektronowej spektroskopii obrazu, lub w skrócie ESI (ang. electron spectroscopic imaging). Możliwości zastosowania techniki ESI przewidziano już na początku lat sześćdziesiątych, w praktyce jednak do szerokiego użytku weszła ona kilkanaście lat później (CASTAING i HENRY 1962, OTTENSMEYER i ANDREW 1980).

ZASADA FUNKCJONOWANIA TRANSMISYJNEGO MIKROSKOPU ESI/TEM

Do zalet metody ESI w odniesieniu do materiału biologicznego należy (EGLE i współaut. 1984):

— Znaczne poprawienie jakości uzyskiwanych, mikroskopowych obrazów skrawków o grubości powyżej 200 nm. Rozdzielczość mikroskopowych obrazów w mikroskopie ESI/TEM jest zbliżona i wynosi około 0,2–0,5 nm (dla E_0 rzędu 100 keV).

— Wzmocnienie kontrastu obrazu zarówno ultracienkich, jak i grubych skrawków.

— Wykrywanie i lokalizacja pierwiastków w wydzielonych mikroobszarach próbek z rozdzielczością rzędu 5–10 nm.

Użyteczność metody ESI objawia się szczególnie w przypadku badania skrawków biologicznych o grubości 0,2–1 μm (tab. 2). Jak zauważono powyżej, oglądanie tak grubych skrawków w konwencjonalnym TEM jest niezwykle utrudnione i wiąże się ze znacznym spadkiem rozdzielczości i zaciemnieniem obrazu (HEZEL i BAUER 1985).

Tabela 2

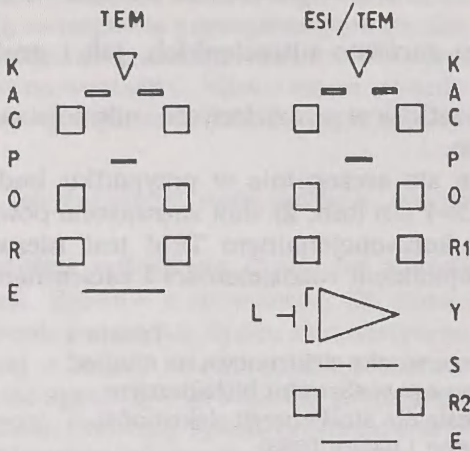
Wpływ napięcia przyspieszającego wiązkę elektronową na długość promienia dysku chromatycznego w skrawku biologicznym o grubości 0,75 μm . Przybliżenie dla strat energii elektronów, $dE = 250$ eV (HEZEL i BAUER 1985).

Rodzaj mikroskopu	Napięcie przyspieszające	Promień dysku chromatycznego
Konwencjonalny TEM	80–120 kV	25–30 nm
Wysokonapięciowy TEM	1000 kV	2 nm
ESI/TEM	80–120 kV	2–3 nm

W konwencjonalnym TEM efekt wzmocnienia kontrastu dla skrawków biologicznych uzyskuje się traktując je solami niektórych metali ciężkich. Wykorzystuje się w tym celu głównie sole ołowiu i uranu (REYNOLDS 1963). Metale ciężkie silnie rozpraszają elektrony i dlatego są doskonale widoczne w otoczeniu pierwiastków lekkich, stanowiących podstawową część materiału biologicznego. Posiadając względnie duże jądra atomowe, zwiększają prawdopodobieństwo rozproszeń elastycznych (SLAYTER E. i SLAYTER H. 1993). Wykazują one ponadto selektywne powinowactwo do niektórych składników komórki. Na przykład, czterotlenek osmu (OsO_4) wiąże się głównie z lipidami i ułatwia w ten sposób lokalizację struktur błoniastych w komórce. Metale ciężkie mają jednak tendencję do tworzenia agregatów, co ogranicza zdolność rozdzielczą w ujawnianiu struktur w ultracienkich skrawkach do około 1–2 nm (OTTENSMEYER i PEAR 1975). W mikroskopie ESI/TEM (mikroskop ten określa się również jako EF/TEM — energy filtering TEM) wzmocnienie kontrastu uzyskuje się bez traktowania materiału dodatkowymi związkami chemicznymi. Dzięki temu struktura badanego obiektu jest z pewnością bardziej wierna rzeczywistości.

Mikroskop ESI/TEM posiada identyczny plan budowy jak konwencjonalny TEM (rys. 4, HEZEL i BAUER 1985, DE BBRUJN i współaut. 1993). Podstawowa różnica polega na tym, że ESI/TEM jest wyposażony w spektrometr do pomiaru strat energii elektronów. Jego głównymi elementami są: zwierciadło elektrostatyczne będące odmianą działa elektronowego i pryzmaty magnetyczne (OTTENSMEYER 1984). Najnowsze spektrometry strat energii elektronów, stosowane w TEM, nie posiadają zwierciadła elektrostatycznego, lecz są zbudowane z czterech

symetrycznie ułożonych pryzmatów magnetycznych (MAYER 1993). W tego typu spektrometr jest wyposażony między innymi mikroskop ZEISS 912 Omega.



Rys. 4. Porównanie budowy konwencjonalnego TEM oraz mikroskopu ESI/TEM. Schemat ESI/TEM odpowiada budowie mikroskopu ZEISS 902A.

K — katoda; A — anoda; C — soczewki kondensora; P — preparat; O — soczewki obiektywu; R, R1, R2 — soczewki projektora; L — lustro elektrostatische; Y — pryzmat magnetyczny; S — energo-dyspersyjna szczelina; E — ekran.

W pryzmatach jest wytwarzane pole magnetyczne odchylające strumień elektronów pod kątem zależnym od ich energii. Elektrony rozproszone elastycznie są odchylane dokładnie pod kątem 90 stopni, natomiast nieelastyczne pod kątem większym (JOY 1979). Spektrometr jest umieszczony w mikroskopie pomiędzy dwoma układami soczewek projektora (rys. 4b).

Bieg elektronów w ESI/TEM jest analogiczny do ich biegu w konwencjonalnym TEM aż do poziomu pierwszego układu soczewek projektora. Następnie jednak elektrony wchodzą w obszar pierwszego pryzmatu magnetycznego. Po odbiciu od zwierciadła elektrostatischego i wyjściu z obszaru drugiego pryzmatu tworzą wiązkę rozbieżną. Z tego właśnie powodu przez energo-selektywną szczelinę przechodzi tylko pewien fragment tej wiązki, zawierający elektrony o określonej energii. Pozostała część elektronów jest absorbowana i odbijana od materiału ograniczającego szczelinę (JOY 1979). Elektrony, które przeszły przez szczelinę trafiają do drugiego układu soczewek projektora. Elektrony, docierające do drugiego układu soczewek projektora mają bardzo zbliżoną energię. W przypadku stosowania napięcia przyspieszającego $E_0 = 100$ keV, układ przepuszcza elektrony o energii $E_0 \pm 10$ eV (KOPF-MAIER 1991). Ostatecznie elektrony tworzą obraz padając na ekran, kliszę fotograficzną lub elektroniczny detektor (EGLE i współaut. 1984).

Mikroskop ESI/TEM może pracować w trzech podstawowych trybach (rys. 5, EGLE i współaut. 1984). W przypadku, gdy nie ma energo-selektywnej szczeliny uzyskuje się tak zwany obraz całkowity (ang. global image). Jest on odpowiednikiem obrazu uzyskiwanego w konwencjonalnym TEM (HEZEL i BAUER 1985).

W przypadku, gdy przez szczelinę przechodzą elektrony o energii zgodnej z energią wiązki pierwotnej E_0 , uzyskuje się obraz dzięki elektronom rozproszonym elastycznie (ang. elastic image). Z uwagi na to, że wielkość strat energii elektronów dE jest zbliżona do zera, ten tryb pracy ESI/TEM określa się jako ESI w $dE = 0$ (EGLE i współaut. 1984).

Trzecim możliwym trybem pracy ESI/TEM jest realizacja ESI dla elektronów charakteryzujących się stratami energii $dE > 0$. W tym przypadku przez energo-selektywną szczelinę przechodzą elektrony rozproszone nieelastycznie (EGLE i współaut. 1984). Nie są to jednak wszystkie elektrony rozpraszane nieelastycznie

W pryzmatach jest wytwarzane pole magnetyczne odchylające strumień elektronów pod kątem zależnym od ich energii. Elektrony rozproszone elastycznie są odchylane dokładnie pod kątem 90 stopni, natomiast nieelastyczne pod kątem większym (JOY 1979). Spektrometr jest umieszczony w mikroskopie pomiędzy dwoma układami soczewek projektora (rys. 4b).

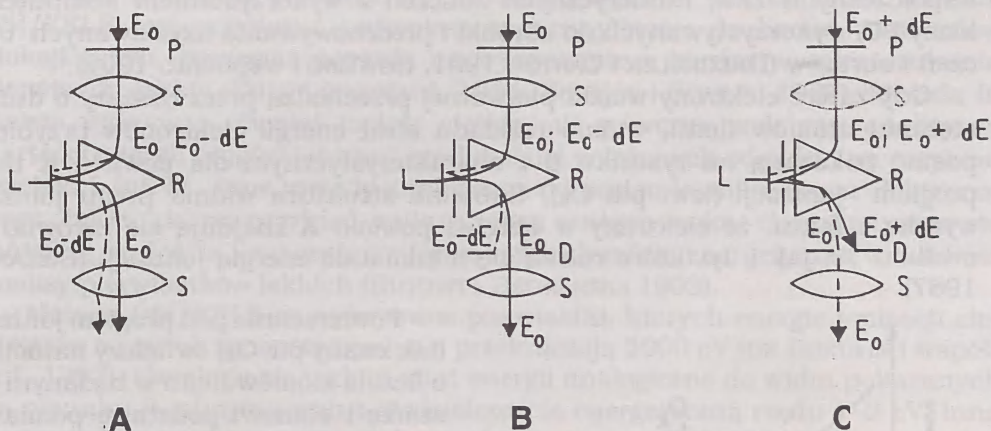
Bieg elektronów w ESI/TEM jest analogiczny do ich biegu w konwencjonalnym TEM aż do poziomu pierwszego układu soczewek projektora. Następnie jednak elektrony wchodzą w obszar pierwszego pryzmatu magnetycznego. Po odbiciu od zwierciadła elektrostatischego i wyjściu z obszaru drugiego pryzmatu tworzą wiązkę rozbieżną. Z tego właśnie powodu przez energo-selektywną szczelinę przechodzi tylko pewien fragment tej wiązki, zawierający elektrony o określonej energii. Pozostała część elektronów jest absorbowana i odbijana od materiału ograniczającego szczelinę (JOY 1979). Elektrony, które przeszły przez szczelinę trafiają do drugiego układu soczewek projektora. Elektrony, docierające do drugiego układu soczewek projektora mają bardzo zbliżoną energię. W przypadku stosowania napięcia przyspieszającego $E_0 = 100$ keV, układ przepuszcza elektrony o energii $E_0 \pm 10$ eV (KOPF-MAIER 1991). Ostatecznie elektrony tworzą obraz padając na ekran, kliszę fotograficzną lub elektroniczny detektor (EGLE i współaut. 1984).

Mikroskop ESI/TEM może pracować w trzech podstawowych trybach (rys. 5, EGLE i współaut. 1984). W przypadku, gdy nie ma energo-selektywnej szczeliny uzyskuje się tak zwany obraz całkowity (ang. global image). Jest on odpowiednikiem obrazu uzyskiwanego w konwencjonalnym TEM (HEZEL i BAUER 1985).

W przypadku, gdy przez szczelinę przechodzą elektrony o energii zgodnej z energią wiązki pierwotnej E_0 , uzyskuje się obraz dzięki elektronom rozproszonym elastycznie (ang. elastic image). Z uwagi na to, że wielkość strat energii elektronów dE jest zbliżona do zera, ten tryb pracy ESI/TEM określa się jako ESI w $dE = 0$ (EGLE i współaut. 1984).

Trzecim możliwym trybem pracy ESI/TEM jest realizacja ESI dla elektronów charakteryzujących się stratami energii $dE > 0$. W tym przypadku przez energo-selektywną szczelinę przechodzą elektrony rozproszone nieelastycznie (EGLE i współaut. 1984). Nie są to jednak wszystkie elektrony rozpraszane nieelastycznie

cznie, lecz o ściśle wybranej wartości strat energii (np. elektrony o $dE = 280 \pm 10$ eV). Mikroskop ESI/TEM jest tak zbudowany, że dzięki nim (tzn. elektrony ze stratą energii, $E_0 - 280$ eV) jest formowany obraz mikroskopowy (ang. inelastic image). Jest to zawsze obraz w ciemnym polu (JOY 1979). Oznacza to, że struktury będące jasne w konwencjonalnym TEM i w ESI/TEM dla $dE = 0$ tutaj są ciemne i *vice versa*.



Rys. 5. Możliwe tryby pracy mikroskopu ESI/TEM (EGLE i współaut. 1984).

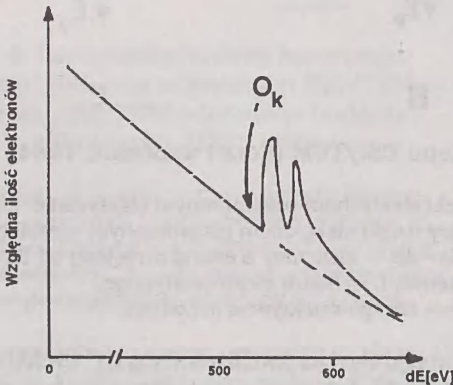
A — obraz całkowity; B — obraz powstający dzięki elektronom rozproszonym elastycznie i nierozproszonym (ESI dla $dE = 0$) C — obraz powstający dzięki elektronom rozproszonym nieelastycznie (ESI dla $dE > 0$). E_0 — elektrony o energii E_0 ; $E_0 - dE$ — elektrony o energii mniejszej od E_0 o wartość dE ; P — preparat; S — soczewki; L — lustro elektrostatyczne; R — pryzmat magnetyczny; D — energo-selektywna szczelina.

Bardzo ważną cechą obrazu tworzego dzięki „odfiltrowanym” elektronom nieelastycznym rozproszonym w wyniku oddziaływań nieelastycznych jest jego specyficzność względem niektórych pierwiastków (OTTENSMEYER i ANDREW 1980, SHUMAN i SOMLYO 1987, BAUER 1988). Jak zaznaczono wcześniej rozproszenia nieelastyczne dokonują się w wyniku oddziaływań elektrostatycznych elektronów wiązki pierwotnej z elektronami wewnątrz atomów próbki. Niektóre z tych oddziaływań prowadzą do wzbudzenia elektronów z powłok wewnętrznych (K, L, względnie M) i jonizacji tych atomów. Poszczególne powłoki różnych pierwiastków posiadają charakterystyczne dla siebie energie jonizacji (BIELAŃSKI 1987). Przez energię jonizacji rozumie się minimalną energię, jaką należy dostarczyć elektronowi, ażeby wyrwać go z danej powłoki na powłokę o wyższej energii. Na przykład energie jonizacji powłoki K (dla orbitalu $1s$) węgla, azotu i tlenu wynoszą odpowiednio: C — 280 eV; N — 400 eV i O — 530 eV.

Zatem przykładowo w wyniku oddziaływania elektronu wiązki pierwotnej o energii $E_0 = 100$ keV z elektronem powłoki $1s$ atomu tlenu dochodzi do przekazania energii i jonizacji tego atomu. Wzbudzony z powłoki $1s$ elektron posiada energię równą 530 eV, która odpowiada energii jonizacji tej powłoki atomu tlenu. Natomiast zgodnie z zasadą zachowania energii, energia elektronu wiązki pierwotnej w wyniku oddziaływania i przekazania energii na wzbudzenie atomu tlenu maleje i po zderzeniu jest równa $E_0 - dE$ (czyli 100 keV - 530 eV).

Jeżeli spektrometr mikroskopowy ESI/TEM będzie „nastawiony” na przepuszczanie elektronów o energii $E_0 - 530$ eV (straty energii elektronów dE), uzyskamy obraz rozmieszczenia tlenu w oglądanym fragmencie próbki. W celu wyeliminowania tła obrazu od uzyskanego kontrastu obrazu odejmuje się zwykle kontrast obrazu uzyskany dla elektronów o nieco mniejszych stratach energii (w tym przypadku np. dla dE = 500 eV). Jest to możliwe dzięki zastosowaniu we współczesnych TEM numerycznych obliczeń z wykorzystaniem komputerów klasy PC, wykorzystywanych do obróbki i przechowywania uzyskiwanych obliczeń i obrazów (DRECHSLER i CANTOW 1991, BOWLING i współaut. 1992).

Gdy zatem elektrony wiązki pierwotnej przechodzą przez obszary o dużym stężeniu atomów tlenu, widmo rozkładu strat energii elektronów przybierze postać pokazaną na rysunku 6 z charakterystycznym dla powłoki K tlenu progiem jonizacji (tzw. pik O_K). Subtelna struktura widma progu jonizacji wynika z faktu, że elektrony w obrębie powłoki K znajdują się zarówno na orbitalu $1s$, jak i $1p$, które różnią się minimalnie energią jonizacji (BIELAŃSKI 1987).



Rys. 6. Rozkład strat energii elektronów wiązki mikroskopowej w obszarze o dużej zawartości atomów tlenu. Strzałka wskazuje próg jonizacji powłoki K atomu tlenu, korelujący z jej energią jonizacji. Linia przerywaną zaznaczono teoretyczny przebieg krzywej przy braku atomów tlenu. Powyższy schemat jest uproszczeniem. Oryginalne widma posiadają charakterystyczną strukturę subtelną.

Wielkość analizowanego obszaru jest uwarunkowana średnicą stosowanej wiązki elektronowej (ISAACSON 1977).

ESI/EELS jest metodą o bardzo wysokiej czułości. Umożliwia ona wykrycie w objętości kilkuset nm^3 próbki, kilkuset, a nawet kilkudziesięciu atomów analizowanego pierwiastka (KRIVANEK 1991). Na przykład dla fosforu szacuje się, że minimalna ilość wykrywanych atomów wynosi 25 (LEAPMAN i ANDREWS 1992). Bezwzględna czułość metody sięga do 10^{-21} g masy analizowanego obszaru.

Powierzchnia pod progiem jonizacji (tak zwany pik O_K) świadczy natomiast o liczbie atomów tlenu w badanym obszarze i stanowi podstawę pomiarów ilościowych (SORBER i współaut. 1991, DE BRUIJN i współaut. 1993). W celu wykonania takich pomiarów należy porównać otrzymane widmo z widmem standardu o znanej zawartości badanego pierwiastka. Wiarygodna analiza ilościowa skrawków biologicznych wymaga jednak zastosowania mroźniowych technik ich preparowania, w celu zmniejszenia dyfuzji oznaczanych pierwiastków w czasie przygotowywania preparatów (KRIVANEK 1991).

Technika ESI/TEM dla elektronów o $dE > 0$ jest zatem analityczną metodą określania jakościowego i ilościowego składu pierwiastkowego próbki. Ogólna analiza strat energii elektronów określa się terminem spektroskopii strat energii elektronów (ang. EELS — electron energy loss spectroscopy).

Warunkiem koniecznym dla analizy pierwiastków jest jednakże stosowanie skrawków o grubości nie przekraczającej 50 nm. W skrawkach grubszych efekt wielokrotnego rozpraszania elektronów wiązki pierwotnej powoduje zniekształcenie otrzymywanych wyników pomiaru (ANDREWS i LEAPMAN 1993).

Generalnie mikroskopy ESI/TEM wykorzystuje się nie tylko do badania preparatów biologicznych, lecz także wszelkich innych próbek ciała stałego, takich jak kryształy, polimery czy próbki geologiczne (MAYER 1993). Metoda ESI/EELS jest przydatna natomiast w szczególności do badań materiałów biologicznych, ponieważ pozwala na wykrywanie z bardzo wysoką czułością pierwiastki lekkie (EGLE i współaut. 1984, SHUMAN i SOMLYO 1987). Metodą tą można wykrywać również metale ciężkie, ale wówczas podstawą analizy są wartości energii progów jonizacji powłok dalej położonych od jądra, na przykład powłoki L lub M. Inne metody analityczne na poziomie mikroskopu elektronowego, takie jak, na przykład, mikroanaliza rentgenowska, charakteryzują się mniejszą czułością i znacznie mniejszą rozdzielczością energetyczną w zakresie analizy pierwiastków lekkich (BUTOWT i BEDNARSKA 1993).

Metodą ESI/EELS są wykrywane pierwiastki, których energie jonizacji elektronów z powłok wewnętrznych nie przekraczają 2000 eV (DE BBRUJN i współaut. 1993). Uzyskuje się widma strat energii analogiczne do widm pokazanych na rysunku 6, otrzymanych z rozdzielczością energetyczną rzędu 1–2 eV. Inną formą informacji otrzymywanych z wykorzystaniem ESI/TEM jest otrzymanie obrazu mikroskopowego, powstającego dzięki elektronom o określonej wartości strat energii. Obrazy takie są mapami rozkładu określonego pierwiastka w objętości badanej próbki (KOPF-MAIER 1991).

PODSUMOWANIE

Obrazy mikroskopowe powstają w wyniku oddziaływania elektronów wiązki pierwotnej z badanym materiałem i z soczewkami mikroskopu. Od momentu powstania pierwszego mikroskopu elektronowego wprowadza się rozmaite rozwiązania techniczne, mające na celu zmniejszenie wpływu aberracji soczewek elektromagnetycznych na jakość powstającego obrazu. Za jakość obrazu są odpowiedzialne przede wszystkim dwa jego parametry: zdolność rozdzielcza i kontrast obrazu w transmisyjnym mikroskopie elektronowym. Szczególne problemy w tym zakresie stwarzają preparaty biologiczne, ponieważ w większości wypadków są amorficzne i składają się głównie z lekkich, słabo rozpraszających elektrony pierwiastków. Ponadto jakość obrazu próbek biologicznych pogarsza się z biegiem czasu, gdyż są one niezwykle wrażliwe na bombardowanie wiązką elektronową.

W konwencjonalnym TEM, stosuje się bardzo małe średnice przysłon obrazowych obiektywu. Wtedy są przepuszczane tylko przyosiowe składowe wiązki. Dzięki temu uzyskuje się obrazy mikroskopowe z lepszą zdolnością rozdzielczą.

Najnowszym rozwiązaniem w dziedzinie badań materiałów biologicznych było wprowadzenie systemu filtrowania energii elektronów ESI. W systemie tym spektrometr ESI działa analogicznie jak filtr w mikroskopie świetlnym, rozdzielając elektrony o różnej energii i przepuszczając na ekran lub do detektora

elektrony o określonej wybranej energii. Dzięki temu mikroskopowe obrazy preparatów biologicznych są otrzymywane z lepszą rozdzielczością, lepszy jest również kontrast otrzymywanych obrazów rozkładu chemicznego pierwiastków w badanej próbce. Jest to istotne dla skrawków biologicznych, gdyż stwarza możliwość wyeliminowania z procedury ich przygotowywania etapu wysycania solami metali ciężkich i umożliwia oglądanie skrawków grubszych od 100 nm.

Zastosowanie techniki ESI/TEM ($dE > 0$) do badań materiałów biologicznych umożliwia wykonanie ilościowej analizy składu pierwiastkowego wybranych mikroobszarów próbki i jej struktury. Bezwzględna czułość pomiarów jest bardzo wysoka i sięga 10^{-19} – 10^{-21} g analizowanego pierwiastka. Metoda ta jest przystosowana przede wszystkim do analizy pierwiastków o małej i średniej masie atomowej i z tego względu jest szczególnie przydatna dla materiału biologicznego.

Współczesne mikroskopy ESI/TEM są urządzeniami w pełni skomputeryzowanymi. Umożliwia to między innymi zatrzymywanie otrzymywanych obrazów w pamięci komputera i późniejszą ich dodatkową obróbkę.

Autor pragnie wyrazić szczerze podziękowanie Pani Doktor Elżbiecie Mizerze z Instytutu Fizyki PAN w Warszawie za pomoc okazaną w trakcie pisania niniejszej pracy.

ELECTRON ENERGY FILTRATION — A NEW TECHNIQUE FOR IMPROVING THE IMAGE IN TRANSMISSION ELECTRON MICROSCOPE (TEM)

Summary

The paper describes the basis of the Electron Spectroscopic Imaging (ESI) technique, which is a relatively new method of improving the resolution and contrast of the biological image in TEM. In addition, the ESI is a highly sensitive method for the elemental analysis of samples in TEM. The usefulness of the method for studying biological samples is discussed.

LITERATURA

- ANDREWS S. B., LEAPMAN R. D., 1993. *Biological scanning transmission electron microscopy*. Eur. Micr. Anal. 24, 21–24.
- BAUER R., 1988. *Electron spectroscopic imaging: an advanced technique for imaging and analysis in transmission electron microscopy*. [W:] F. MEYER (red.), Academic Press, 20, 133–146.
- BIELAŃSKI A., 1987. *Podstawy chemii nieorganicznej*. PWN Warszawa, 275–276.
- BOWLING C. D., TRYKA A. F., CASBY A. P., COX W. E., VAN DEVANTER S. H., 1992. *A computer aided approach to electron energy loss spectroscopy and imaging*. Comput. Methods. Programs. Biomed. 38(1), 1–10.
- BUTOWT R., BEDNARSKA E., 1993. *Metoda mikroanalizy rentgenowskiej w badaniach biologicznych*. Post. Biol. Kom. 4, 403–420.
- CASTAING R., HENRY L., 1962. C. R. Sci. Paris B, 255, 76–86.
- DE BRUIJN W. C., SORBER C. W. J., GELSEMA E. S., BECKERS A. L. D., JONGKIND J. F., 1993. *Energy-filtering transmission electron microscopy of biological specimens*. Scann. Microsc. 7(2), 693–709.
- DELONG A., HLADIL K., KOLARIK V., 1994. *A low voltage transmission electron microscope*. Eur. Microsc. Anal. 27, 13–16.
- DRECHSLER M., CANTOW H. J., 1991. *EELS data acquisition, processing and display for the Zeiss CEM 902 based on Lotus 1–2–3: Application examples from a biological system and inorganic transition metal compounds*. J. Microsc. 162(1), 61–76.

- EGLÉ W., KURZ D., DILK A., 1984. *The TEM 902, a new analytical TEM for ESI and EELS*. Mag. for Electron Microsc. Opton Information, 3-7.
- HERMAN K. -H., 1983. *Instrumental requirements for high resolution imaging*. J. Microsc. 131(1), 67-79.
- HEZEL U. B., BAUER R., 1985. *Opton EM 902, the new TEM with Integrated Imaging Electron Energy Spectrometer*. Opton Product Information, 1-12.
- HUTCHISON J. L., 1990. *400 kilovolt high resolution electron microscopy o semiconductors: the current state of the art*. Jeol News, 28(1), 4-7.
- HUTCHISON J. L., 1994. *Seeing atoms in and around crystals*. Eur. Microsc. Anal. 28, 9-12.
- ISAACSON M. S., 1977. *Specimen damage in the electron microscope*. [W:] *Principles and Techniques of Electron Microscopy*. M. A. HAYAT (red.), Van Nostrand-Reinhold New York, 1-78.
- JOY D. C., 1979. *The basic principles of electron energy loss spectroscopy*. [W:] *Introduction to Analytical Electron Microscopy*. J. J. HREN, J. I. GOLDSTEIN, D. C. JOY (red.). Plenum Press, New York.
- KOPF-MAIER P., 1991. *Electron spectroscopic imaging — a new method for analysing the distribution of light element in mammalian cells and tissues*. Acta Histochem. 91(1), 25-37.
- KRIVANEK O. L., 1991. *EELS quantification near the single atom level*. Microsc. Microanal. Microstruct. 2, 257-267.
- LEAPMAN R. D., ANDREWS S. B. 1992. *Characterization of biological macromolecules by combined mass mapping and electron-energy loss spectroscopy*. J. Microsc. 165(Pt2), 225-238.
- MANNELLA C. A., RATKOWSKI A. J., 1983. *Adaptation of high-voltage electron microscope for routine biological dark-field imaging*. Ultramicrosc. 11, 21-35.
- MAYER J., 1993. *Applications of energy-filtering TEM in material science*. Eur. Microsc. Anal. 25, 21-23.
- MEEK G. A., 1976. *Practical Electron Microscopy For Biologists*. John Wiley & Sons Inc.
- OTTENSMEYER F. P., PEAR M., 1975. *Contrast in unstained sections: a comparison of bright and dark field electron microscopy*. J. Ultrastruct. Res. 51, 253-260.
- OTTENSMEYER F. P., ANDREW J. W., 1980. *High resolution microanalysis of biological specimens by electron energy loss spectroscopy and by electron spectroscopy imaging*. J. Ultrastruct. Res. 72, 336-348.
- OTTENSMEYER F. P., 1984. *Electron spectroscopic imaging: parallel energy filtering and microanalysis*. J. Ultrastruct. Res. 88, 121-134.
- REYNOLDS E. S., 1963. *The use of lead citrate at high pH as an electron opaque stain in electron microscopy*. J. Cell Biol. 17, 208-212.
- SHUMAN H., SOMLYO A. P., 1987. *Electron energy loss analysis of near-trace elemental concentrations of calcium*. Ultramicrosc. 21, 23-32.
- SLAYTER E. M., SLAYTER H. S., 1993. *Light and Electron Microscopy*. Cambridge University Press.
- Sokołowski J., PLUTA B., NOSIŁA M., 1980. *Elektronowy mikroskop skaningowy*. Dział Wydawnictw Pol. Śląskiej, 8-17.
- SORBER C. W. J., KETELAARS G. A. M., GELSEMA E. S., JONGKIND J. F., DE BRUIJN W. C., 1991. *Quantitative analysis of electron energy loss spectra from ultrathin-sectioned biological material*. J. Microsc. 162(Pt1), 61-76.
- TREBBIA P., MORY C., 1990. *EELS elemental mapping with unconventional methods. II Applications to biological specimens*. Ultramicrosc. 34, 179-203.

STEFAN M. JANION

*Instytut Ekologii PAN,**M. Konopnickiej 1, Dziekanów Leśny, 05-092 Łomianki*EWOLUCJA ORGANIZMÓW I EWOLUCJA WSPÓLZALEŻNOŚCI
(RELACJI) MIĘDZY ORGANIZMAMI

Gdzie i czy przebiega linia dzieląca ewolucję organizmów i ewolucję poziomów organizacji ponadorganizmalnych? Czy ewolucja ponadorganizmalna jest po prostu dalszym ciągiem przedłużenia ewolucji organizmów, gdzie czynniki za nią odpowiedzialne nie ulegają zmianom, a mimo to jej już „ponadorganizmalny podmiot”* ulega przekształceniom? W jakim stopniu jest uzasadnione używanie pojęcia ewolucja tam, gdzie zachodzą zjawiska czy procesy zmian różnorodnych relacji przystosowawczych (organizacyjnych) między organizmami i całokształtem otaczającego je środowiska ale bez zmian jakościowych, genetycznych? Co jest ostatecznie miarą ewolucji biologicznej, czy można ją wartościować i czy pokrywa się ona z pojęciem postępu?

Podstawę teorii ewolucji Darwina, teorii specjacji, stanowią jej materialne czynniki, takie jak zmienność, dziedziczność, walka o byt i dobór naturalny. Nie zawsze jednak wystarczająco wyraźnie uświadamiamy sobie jedyne następstwo przebiegającego na takich zasadach procesu ewolucyjnego; jest nim skala przystosowań wyrażająca się uniezależnieniem się organizmów od kontroli otaczającego je tak ożywionego, jak i nieożywionego środowiska.

Tak właśnie przebiegająca ewolucja została zapoczątkowana w momencie powstania życia tej niepowtarzalnej raz uzyskanej od otaczającego środowiska autonomii, od pierwszego zdolnego do przekazania tej informacji koacerwatu, pierwszego samoodtwarzającego się zespołu molekularnego, od prokariota do naczelnych i niezwykłego jej tworu człowieka. Gatunek ten, który dzięki doborowi naturalnemu uzyskał samoświadomość, zdołał przekroczyć barierę praw ewolucji biologicznej, darwinowskiej. Stało się to dzięki temu, że potrafił stworzyć własne środowisko, środowisko społeczne, środowisko kulturowe z jego prawami i tym prawom zaczął podlegać uniezależniając się tym samym od kontroli otaczającego go środowiska przyrodniczego. Ewolucja biologiczna straciła dla niego swoją dostosowawczą skuteczność i przestała mieć znaczenie. Przejęła to na siebie ewolucja kulturowa, transformując i przesuując istniejący dotąd

*Podmiot oznacza tu jednostkę autonomiczną w jakimś zakresie niezależną od otaczającego środowiska dzięki podleganiu własnemu prawom.

ostateczny horyzont ewolucji biologicznej zapewniający, dzięki uniezależnieniu się od środowiska, tylko przeżycie i rozwój, do horyzontu kontroli nad środowiskiem i wykreowania autonomii ducha.

Ewolucja biologiczna, której teoretyczne podstawy dał Darwin, która doprowadziła do powstania *Hominidae*, wskazuje również, że końcowym etapem, jedynym i ostatecznym efektem takiego rozwoju, takiej ewolucji, jest powstanie nowej jakości, nowego gatunku. Ale wskazuje też i na to, że dzięki walce o byt, następuje równoległa ewolucja organizacji relacji międzyosobniczych ich współzależności. Prowadzi to czasami do wysoko zorganizowanych układów społecznych, które traktuje się na ogół jako najwyższy stopień organizacji. Można sobie wyobrazić, że ewolucja zatacza tu spirale, jakby „naprawiała błąd”, który doprowadził przez dezintegrację materii nieożywionej do powstania życia i zmierza, na innym poziomie, do ponownej integracji ale już kosztem uzyskanej autonomii form ożywionych. Doświadcza tego szczególnie gatunek *Homo* poprzez uzyskanie samoświadomości, wykształcenie własnego środowiska kulturowego i związane z tym „ból” świadomości istnienia.

Powstają też, jako nieodłączny element postępu, niezliczone mechanizmy chroniące trwałość i niezmienność już uzyskanych dla określonych warunków środowiskowych, organizmalnych dostosowań. Zmienne bodźce środowiska oddziałując na kontrolowane przez dobór relacje międzyosobnicze, przekształcają je w ekologiczne mechanizmy samoregulacyjne, które spełniają tu rolę właściwego rozgrywania otrzymanych już kart. Taki sposób doskonalenia organizacji z jednej strony umożliwia optymalne wykorzystywanie powstałych w czasie specjacji na drodze doboru naturalnego cech i właściwości organizmów, z drugiej doskonalenia się mechanizmów zachowawczych, utrwalających tak uzyskane zmiany. Jest to powodem bogactwa i różnorodności gatunków nas otaczających, nie przekształcających się w jeden wielki superorganizm.

W końcu lat trzydziestych istniało już wiele prac ekologicznych, dotyczących tak świata roślinnego, jak i zwierzęcego, które stworzyły podstawę do ugruntowania przesłanki mówiącej o tym, że ewolucja biologiczna (specjacja), jest procesem przebiegającym dużo wolniej niż zmiany czynników środowiskowych. Mówiąc inaczej, szybszym zmianom ulegają warunki środowiska i zmiany przystosowawcze organizacji występujących w nim zespołów roślinnych i zwierzęcych, niż zmiany genetyczne (jakościowe) biorących w tym udział organizmów. Spowodowało to ukształtowanie się i utrwalenie poglądu, że na przykład rozwój i sukcesję zespołu wielogatunkowego można uważać za jego ontogenezę, a kształtowanie się integracji międzygatunkowej można traktować jako ewolucję filogenetyczną. I ostatecznie, że zespoły międzygatunkowe rozwijają się jako zintegrowane jednostki ponadustrojowe (superorganizmalne). Zostało to zilustrowane wieloma przekonywującymi przykładami, szczególnie z zakresu fitosocjologii, gdzie pogląd ten jest do dziś dominujący (MATUSZKIEWICZ 1984). Taki sposób widzenia przedstawiony został również w *Zasadach ekologii zwierząt*, podręczniku pięciu amerykańskich autorów (ALEE i współaut. 1958), który stał się dekalogiem rozwijającej się w Polsce w latach pięćdziesiątych i sześćdziesiątych ekologii. Przyjmuje się tam, że dobór naturalny działa na cały system międzygatunkowy (populację międzygatunkową), co powoduje powolną ewolucję przystosowawczą uczestniczących w nim gatunków i doprowadza do coraz

większego scalenia i równowagi. Ostatecznie taki system międzygatunkowy, zdaniem autorów, w drodze ewolucji wyrobił w sobie cechy organizmu i dlatego może być nazwany nadorganizmem ekologicznym (patrz ALLEE i współaut. 1958). Stąd też analogicznie, ewolucja populacji jest pod niektórymi względami podobna do ewolucji organizmu. Na marginesie tego punktu widzenia nieco później, równoległe z rozwojem genetyki i posługując się jej zdobyczami, ale opierając się o przesłanki z zakresu socjologii (altruizm), uzupełniono go teorią doboru grupowego i krewniaczego (ŁOMNICKI 1976). Dość popularny stał się również związany z tym pogląd i częste odwoływanie się do przystosowań niekorzystnych dla osobnika, ale korzystnych dla gatunku (zespołu) (PETRUSEWICZ 1978).

W tym też okresie paleontolog G. G. SIMPSON (1955), w swojej znaczącej teorii ewolucji kwantowej, proces ewolucji i jej zachowawczości na drodze doskonalenia relacji między organizmami oraz między organizmami i środowiskiem, przedstawił jako proces realizowania się przystosowań prospektywnych (adaptacji prospektywnych) w ekologicznych strefach przystosowawczych. Stało się to najlepiej teoretycznie ugruntowaną interpretacją braku form przejściowych między bliskimi taksonomicznie grupami. Dla lepszego zobrazowania przebiegu tych procesów w czasie, Simpson wprowadził umowne określenia dla różnych poziomów podziałów taksonomicznych mogących mieć miejsce, czy też które można sobie wyobrazić w trakcie filogenetycznego rozwoju spokrewnionych grup organizmów. Zmiany różnicowania się populacji w obrębie gatunku (specjacje) określił jako mikroewolucję, tworzenie się rodzajów na poziomie rodzin jako makroewolucję, rządów, gromad jako megaewolucję. Właśnie te określenia wykorzystuje się często, chyba jednak wbrew intencjom autora, jako ciąg, jako definiowanie różnych etapów ewolucyjnych przemian odpowiednich grup taksonomicznych. Są to przykłady nakładania się i przeplatania różnych sposobów widzenia koncepcji ewolucji i postępu świata organicznego. Ewolucji jako procesu specjacji, tworzenia się nowej (genetycznej) jakości, nowego gatunku (doborowi podlega wyłącznie osobnik), albo ewolucji również jako procesu specjacji, ale i równoległego doskonalenia organizacji poziomów ponadosobniczych, doskonalenia wzajemnych przystosowań (selekcja i dobór działają tu na całość biocenozy kształtując „ponadgatunkowe” przystosowania). Z jednej strony kształtują się w ten sposób odrębne jakościowo zintegrowane jakości (gatunki), z drugiej, ciągiem, etapami tak przebiegającego procesu są również wyodrębniające się grupy o nowych adaptacjach, nowe jednostki taksonomiczne. Wieloletnia dyskusja na ten temat nie doprowadziła do ujednolicenia poglądów. Podstawy różnicy zdań na ten temat zarysowały się już chyba w chwili ogłoszenia teorii Darwina. Według Darwina postęp organizacji, jak i jej uproszczenie nie jest warunkiem procesu ewolucji (specjacji), warunkiem jest ogólnie rozumiane przystosowanie — fitness. Darwin, wbrew pozorom, nie utożsamiał, nie łączył komplikowania się organizacji z narastaniem, nawarstwianiem się i przygotowywaniem do powstania nowej jakości, nowego gatunku. Przystosowanie przedstawiał jako zmianę konkretnych cech organizmów, zgodnie z postulowaną przez siebie zasadą zmienności i dziedziczności. W tym samym czasie SPENCER (1852) postulował, że ze wzrostem złożoności organizacji otaczającego światażywionego (postępem), jest połączone wzrastające uniezależnianie się organizmów od kontroli środowiska. Każde doskonalenie się organizacji, według Spencera,

z jednej strony może służyć do optymalnego wykorzystywania już posiadanych właściwości i cech organizmów, z drugiej może być bodźcem do kształtowania się nowych przystosowań organizmów.

Współczesny rozwój genetyki i ekologii ułatwił poszukiwania istniejącego przedziału między ewolucją organizmów, specjacją a doskonaleniem organizacji. Istotą ewolucji organizmów, specjacji, jest zmiana informacji molekularnej, genetycznej, powstanie nowej jakości. Istotą doskonalenia (ewolucji) organizacji układów o wspólnej puli genetycznej są zmiany informacji behawioralnej (JANION 1987). Zmiany informacji behawioralnej na podstawie i z udziałem, ale bez konieczności zmian informacji genetycznej, umożliwiają przetrwanie wielu błędów powstałych w czasie jej przekazu (różnorodność osobników). Łagodzi to ostrość odbieranych bodźców i selekcji utrzymując jednocześnie zmienność. Badania ekologiczne potwierdziły dalej, że istniejące ponadorganizmalne systemy, trwają i funkcjonują dzięki relacjom, jakie powstają między tworzącymi je osobnikami (JANION 1988). Relacje międzyosobnicze (walka o byt), ich różnicowanie się i doskonalenie, stwarza osobnikom prawie nieograniczone możliwości dostosowywania się do zmieniających się warunków środowiskowych. Kształtujące się dzięki tym relacjom mechanizmy samoregulacyjne, jak na przykład hierarchia dominacyjna, terytorializm, drapieżnictwo, pasożytnictwo, komensalizm, symbioza i podobne decydują o demografii całego systemu, tak na poziomie populacyjnym, jak i na poziomie zespołu. Stąd często bardzo precyzyjna organizacja i funkcjonowanie takich zespołów, dostosowywanie się do zmieniających się czynników, skłania do traktowania ich jako superorganizmów. Należy jednak stale pamiętać, że każda zmiana, która powstała na drodze zmiany informacji genetycznej, jest zaistniała w genotypie konkretnego osobnika trwałą zmianą, która może w drodze selekcji i doboru utrwalić się stając się cechą gatunkową i tylko gatunkową. Natomiast każde dostosowanie uzyskane przez zmianę informacji behawioralnej, przez doskonalenie organizacji dowolnej wielkości jedno, czy wielogatunkowego zespołu osobników, jest pochodną już istniejących genetycznych dostosowań organizmów, jest wydobywaniem potencjalnych i ujawnianiem nowych możliwości, ale wyłącznie we wzajemnych relacjach osobników. W ten sposób zachodząca ewolucja (doskonalenie organizacji) realizuje się przez tworzenie doraźnych i zmiennych międzyosobniczych relacji, nowych konfiguracji istniejących już dostosowań, przez kształtowanie się ekologicznych, powiązanych ze zmiennością środowiska, mechanizmów samoregulacyjnych.

Zmiany współzależności układów ponadorganizmalnych, ich różnicowanie się i przebudowa, są zatem efektem ekologicznych (powiązanych ze środowiskiem) mechanizmów regulacyjnych i samoregulacyjnych. Są one następstwem rejestrowanej w informacji genetycznej, przez nieskończone szeregi pokoleń, zmienności presji środowiskowej, informacji odzwierciedlającej jednocześnie skalę zakresu fizjologicznej tolerancji organizmów na te zmiany. Na tej podstawie kształtują się międzyosobnicze relacje — mechanizmy umożliwiające optymalną trwałość układu, jego ekologiczną organizację. Wśród osobników o wspólnej puli genetycznej a więc na poziomie populacji, taka organizacja ekologiczna jest określoną strukturą (JANION 1994). Jest to struktura, którą tworzy zbiór osobników powiązanych ze sobą przekazem informacji genetycznej o zdeteterminowa-

nych, przeciwstawnych sobie, stanowiących o osobniczej autonomii reakcjach. Autonomia ta może być zachowana jedynie dzięki relacjom, jakie powstają między tymi osobnikami, relacjom tworzącym informację behawioralną. Walka o byt na poziomie populacji, to określony dzięki tego typu strukturze, typ konkurencji, konkurencji integrującej i związane z tym wytworzone mechanizmy (np. hierarchia, terytorializm), dzięki którym jest hamowana agresja wewnątrzpopulacyjna. Jest to konieczne w celu zapewnienia optymalnej reprodukcji i zachowania potomstwa. Wszelkie zmiany genotypu powodowane mutacjami, jak i izolacją, czy dryftem genetycznym mogą tu prowadzić do zmiany relacji międzyosobniczych, zmiany istniejącego typu konkurencji. Dotychczasowy typ konkurencji, kształtujący i podtrzymujący mechanizmy integrujące (konkurencja integrująca), może się przekształcić w konkurencję dezintegrującą, co może stać się początkiem procesu specjacji. I tylko na tym poziomie (populacyjnym) zachodzi podstawowy i jedyny akt powstawania nowej jakości genetycznej, powstanie nowego gatunku, specjacji (JANION 1994).

Wszystkie inne, oprócz gatunku, jednostki taksonomiczne są filogenetycznymi ciągami, bliżej lub dalej spokrewnionymi, dostosowanymi do różnych warunków środowiska gatunków. Są to jednostki wyróżnione na podstawie ich pochodzenia i pokrewieństwa. Różne gatunki, występujące w podobnych warunkach środowiskowych, tworzą związane ekologicznymi mechanizmami, poziomy organizacji żywej przyrody. Poziomy te ewoluują w kierunku upraszczania lub różnicowania ich organizacji, doskonalenia samoregulacji, celem optymalnego wykorzystywania pojemności i zasobów otaczającego, ulegającego nieustannym zmianom środowiska.

EVOLUTION OF ORGANISMS AND THE RELATIONSHIPS BETWEEN THE ORGANISMS

Summary

The Darwinian theory of evolution claims that a final, and the only effect of evolution, is the emergence of a new quality, a new species. It claims, however, also that due to the struggle for existence there is a parallel evolution in organization of the relationships between the individuals, i.e. in their mutual interrelationships. Variations in the environmental stimuli acting on the inter-individual relationships, promote formation of ecological self regulating mechanisms. That way of organization fitting allows, on the one hand, for the optimal exploration of the features created by the natural selection and, on the other, for fitting of the self preserving mechanisms retaining thereby gained features.

LITERATURA

- ALLEE W. C., EMERSON A. E., PARK O., PARK T., SCHMIDT K. P., 1958. *Zasady ekologii zwierząt*. PWN, Warszawa.
- DARWIN K., 1955. *O powstawaniu gatunków*. PWRiL, W-wa.
- JANION S. M., 1987. *Informacja behawioralna i dostosowania populacyjne*. Kosmos, 36, 145-149.
- JANION S. M., 1988. *Autonomia osobnicza i walka o byt*. Kosmos 37, 659-669.
- JANION S. M., 1994. *Ewolucja ekosystemalna*. Kosmos 42, 303-307.
- ŁOMNICKI A. 1976. *Dobór naturalny ograniczony wzrost i regulacja wielkości populacji*. Kosmos 36, 539-554.
- MATUSZKIEWICZ W., 1984. *Przewodnik do oznaczania zbiorowisk roślinnych Polski*. PWN, W-wa.

- PETRUSEWICZ K., 1978. *Osobnik, populacja, gatunek*. PWN, W-wa.
- SIMPSON G. G., 1955. *The Major Features of Evolution*. Columbia Univ. Press, New York.
- SPENCER H. 1852. *A Theory of Population, Deducted from the General Law of Animal Fertility*. Westminster Rev. 57, 46.

Bright Air, Brilliant Fire, on the Matter of the Mind (Nowa teoria ewolucji, rozwoju i pracy mózgu). GERALD EDELMAN. New York 1992, Basic Books.

Autor tej książki w roku 1972 otrzymał Nagrodę Nobla za odkrycia z dziedziny immunologii. Później zajmował się neurofizjologią publikując z tej dziedziny, między innymi, trzy książki: *Neural Darwinism* (1987), *Topobiology* (1988) i *The Remembered Present* (1990), w których rozwijał swą teorię centralnego systemu nerwowego, nazwaną teorią doboru naturalnego grup neuronów (theory of neuronal group selection TNGS). Recenzowane dzieło stanowi bieżącą syntezę poglądów, przeznaczoną nie dla neurofizjologów, lecz adresowaną do intelektualistów nie będących biologami. Znajdują się w nim niektóre wiadomości elementarne, na przykład, odnoszące się do budowy komórek nerwowych (neuronów). Nie jest to jednak lektura łatwa, gdyż autor polemizuje w niej z różnymi poglądami filozoficznymi, których można by ewentualnie użyć do kwestionowania jego wniosków, a orientuje się swobodnie nie tylko w neurobiologii, lecz także w niektórych problemach fizyki, psychologii i lingwistyki. Trudność czytania książki, a także referowania jej zawartości wzrasta, gdyż autor swobodnie w wielu miejscach wykorzystuje wieloznaczność angielskich wyrazów, takich jak *mind*, *meaning*, *consciousness* — w innych zaś nadaje im nową przez siebie zdefiniowaną treść. Powszechnie uważa się, że termin „pojęcie” (*concept*) za bliskoznaczny z terminem „wyraz” i pisze się, że nie posiadające mowy zwierzęta nie dysponują pojęciami. Edelman natomiast jest zdania, że co najmniej ssaki zdają sobie sprawę z takich pojęć, jak na przykład: blisko — daleko, niżej — wyżej, jadalny — niejadalny, chociaż oczywiście nie mogą ich nazwać. Sądzi też, że posiadanie takich pierwotnych pojęć musiało poprzedzić powstanie mowy.

Postulatem logiki jest używanie wyłącznie wyrazów jednoznacznych. Niestety, twórcy nowych hipotez naukowych, chcąc je przedstawić Czytelnikom i słuchaczom są często zmuszeni do rozszerzania lub zważania treści powszechnie stosowanych wyrazów. Czyni to też często autor recenzowanej książki.

Ten wstęp jest konieczny, gdyż pomimo tego że hipoteza Edelmana znakomicie wyjaśnia wiele zagadnień z ewolucji systemu nerwowego i jego rozwoju, muszę się przyznać, że moje wiadomości nie wystarczają do pełnego zrozumienia niektórych fragmentów dzieła. Być może inni Czytelnicy, o odmiennym przygotowaniu, będą mieli rację zarzucając mi spłylenie hipotez Edelmana.

Liczbę neuronów zawartych w ludzkim mózgu ocenia się na 10 do potęgi 11. Neurony tworzą wypustki, niekiedy bardzo długie. Połączenie wypustek neuronów nazywa się synapsami. Podstawową cechą komórki nerwowej jest przybieranie przez nią stanu spoczynku lub pobudzenia. Dzięki synapsom komórki nerwowe mogą się wzajemnie pobudzać lub hamować. Ocenia się, że każdy z neuronów łączy się za pomocą wypustek z tysiącem innych, a więc liczba synaps w ludzkim mózgu wynosi około 10 do potęgi 15. Mózgi innych ssaków są bezwzględnie, lub względnie znacznie mniejsze, lecz ich budowa jest w zasadzie identyczna. Edelmana interesuje przede wszystkim mózg ludzki, do mózgow zwierząt nawijazuje w razie potrzeby. W mózgu są obecne oprócz neuronów komórki pełniące funkcje pomocnicze, lecz nie przewodzące stanów pobudzenia. Jest ich wielokrotnie więcej niż neuronów. Komórki nerwowe są bardzo rozmaite. Ich rozmieszczenie w mózgu nie jest bynajmniej jednolite. Istnieją partie mózgu, gdzie komórek nerwowych jest niewiele, a przeważają drogi nerwowe — pęki wypustek. Inne okolice zawierają przede wszystkim opatrzone jądrami ciąża neuronów. W mózgach ssaków największe nagromadzenie komórek nosi nazwę kory mózgowej.

Każda informacja biegnie w systemie nerwowym ssaka po pęku włókien nerwowych i pobudza grupy leżących koło siebie komórek, liczących u człowieka od 50 do 10 tysięcy neuronów. Komórki tworzące grupy nie są identyczne ani liczbą wypustek, ani ich połączeniami, Edelman przywiązuje duże znaczenie do faktu, że komórki różnicują się w czasie rozwoju mózgu w sposób losowy. Inaczej wykształca się komórka położona na skraju grupy, inaczej leżąca w głębi. Rosnące wypustki neuronów rywalizują ze sobą o przestrzeń i o miejsca na cele innych komórek. W efekcie nie ma w mózgu dwu neuronów zupełnie identycznych. W mózgu wyróżnia się okolice, do których dobiegają bodźce z określonych receptorów. Bodźce z jednego receptora z reguły dosięgają równocześnie wielu grup komórek, leżących w różnych okolicach mózgu. Przypuszczalnie wszystkie komórki systemu nerwowego są ze sobą bezpośrednio lub pośrednio połączone. Jednak niektóre komórki są tak ze sobą sprzężone, że zawsze reagują równocześnie, inne oddzielają tak długie łańcuchy neuronów, że nigdy nie reagują równocześnie.

Istotną cechą związku między neuronami jest obecność połączeń powrotnych. Jeśli, na przykład, podrażnienie grupy A zostanie przekazane do grupy B, to grupa B po pewnym zmodyfikowaniu bodźców przekaże je z powrotem do grupy A. Edelman nazwał to zjawisko „reentry”, nie stosuje zaś terminu „feedback” (sprzężenie zwrotne) przypuszczalnie w tym celu, by podkreślić odmiennosc tych dwu procesów. Sprzężenie zwrotne jest negatywne lub pozytywne, przyspiesza lub hamuje. Natomiast reentry — połączenie pierwotne — może modyfikować reakcje grup komórek w sposób bardziej urozmaicony. Grupy komórek o zbliżonych funkcjach tworzą większe zespoły nazwane przez Edelmana „mapami”. Wzajemne ułożenie map często się powtarza, jeśli z określoną funkcją są związane różne partie systemu nerwowego. Tak na przykład wrażenia wzrokowe są odbierane przez siatkówkę, gdzie przechodzą pierwszą interpretację i zostają przekazane do trzeciego odcinka mózgu. Położenie neuronów obsługujących w tej okolicy siatkówkę powtarza mapę siatkówki. Również na wyższych piętrach mózgu neurony związane ze wzrokiem są ułożone w zbliżone mapy. Na wszystkich poziomach mapy są ze sobą połączone przez liczne połączenia powrotne.

Zarówno połączenia grup komórek, jak i połączenia map mają charakter wielopiętrowy, hierarchiczny. Najniższa hierarchia to połączenia komórek należących do jednej grupy, wyższe poziomy to połączenia komórek w mapy, piętro najwyższe tworzy „mapa całości” (global mapping) — zespół szlaków łączących ze sobą wszystkie części mózgu. Zdaniem Edelmana mózg posiada cechę swoistą, którą nazwał „intentionality”, zbliżoną do „celowości” lub „funkcjonalności”. Procesy bieżące w mózgu wydają się prowadzić zawsze do jakiegoś celu, wypełniają jakąś funkcję, którą może być odszukanie charakterystycznej cechy dostrzeganego przedmiotu, czy też pokonanie w biegu przeszkody. Może to być wykonekane sprawniej lub mniej sprawnie.

Przytoczona wyżej liczba zawartych w mózgu neuronów odpowiada przypuszczalnie stadium rocznego dziecka. Od tego czasu liczba neuronów nie wzrasta, natomiast przez całe życie, aż do późnej starości bieżąco proces obumierania neuronów. Zjawisko to jest szczególnie szybkie pod koniec rozwoju ontogenetycznego. W pewnych okolicach mózgu do 70% komórek obumiera jeszcze przed ukończeniem ontogenezy mózgu. Fakt ten stanowi podstawę hipotez Edelmana.

Wspomniałem już, że różnicujące się neurony rywalizują ze sobą o możliwość wytworzenia dużej liczby połączeń. Rywalizacja ta wywołuje obumieranie tych komórek, które nie wytworzyły minimalnej liczby synaps. Gdy do systemu nerwowego noworodka zaczynają dobiegać bodźce z otoczenia, wzbudzają liczne grupy komórek złączonych piętlami połączeń powrotnych. Podrażnienie każdej synapsy wymaga prawdopodobieństwo jej powtórnego użycia, komórki często pobudzane trwają, a szlaki łączące je usprawniają się. Ginią neurony pozbawione bodźców. Edelman uważa, że podstawową cechą systemu nerwowego jest jego ocena własnej sprawności. Poszczególne drogi pobudzeń są oceniane jako lepsze od innych, stosownie do celowości działania częstość ich używania wzrasta. Inne łańcuchy jako gorsze, pobudzane coraz rzadziej, zamierają.

Neurofizjologowie dzielą mózg pod względem czynności na dwa układy. Jeden z nich, wzgórzowokorowy, mieszczący się głównie w korze mózgowej i w jądrach nerwowych drugiego odcinka mózgu odbiera sygnały i zawiera grupy komórek tworzące mapy. Wydaje decyzje do mięśni szkieletowych. Drugi układ, nazwany limbicznym mieści się w pniu mózgu, nie zawiera map komórek. Jego podstawową funkcją jest ocena sprawności składników układu wzgórzowo korowego. Podstawowym kryterium, określającym, czy dana grupa komórek, względnie map pełni funkcję dodatnią jest stwierdzenie, czy jego czynność wzmacnia wewnętrzną homeostazę organizmu, czy też ją narusza. Następne kryterium to ocena sterowania zachowaniami zwierzęcia w środowisku, przynoszącymi korzyść lub szkodę. Centralnym składnikiem hipotezy Edelmana jest nieustanny dobór, analogiczny do darwinowskiego, przebiegający w centralnym systemie nerwowym. Przy czym jednostką doboru jest grupa komórek. Przemawiają za tym niektóre obserwacje, a także następujące rozumowanie Edelmana: pojedyncze neurony mogą jedynie wzmacniać lub hamować czynność kolejnego neuronu. Przetwarzać informację mogą grupy komórek. Wobec tego ocena przydatności musi się odnosić do grup komórek.

Analizując doboru naturalnego zarzucono, że przebiega on w rozmnażających się populacjach, natomiast liczba neuronów w życiu osobnika pozostaje stała. Edelman replikuje, że liczba komórek w mózgu ssaka jest tak gigantyczna, że dobór może działać swobodnie przez całe życie osobnika. Ponadto obumieranie pewnych neuronów pozwala pozostałym na tworzenie nowych wypustek, które łącząc się ze sobą losowo tworzą nowe drogi podrażnień, ewentualnie później wzmacniane przez częste użycie.

Obumieranie grup komórek i tworzenie się nowych szlaków w mózgu przebiega z bardzo różną szybkością. Najszybsze jest w dzieciństwie, najwolniejsze w późnej starości. Tylko całkiem małe dzieci mogą opanowywać fonemy wszystkich języków. Nieco później zdolność ta zanika. W obcym języku, nauczoną później znawca prawie zawsze dostrzeże odmiennosci dźwiękowe. Zdolność do opano-

wania drugiej gramatyki i składni trwa dłużej. Możliwość uzyskania wirtuozerii w muzyce lub sporcie również wymaga rozpoczynania nauki w dzieciństwie.

Tak naszkicowana organizacja mózgu zwraca uwagę na diametralną odrębność systemu nerwowego od komputera, który ma określoną liczbę składników i jednoznacznych programów. Natomiast system nerwowy każdego osobnika jest różny od systemów pozostałych, gdyż dzięki losowemu różnicowaniu się neuronów w ontogenezie, nawet mózgi jednojądrowych bliźniąt są już od urodzenia odmienne, zaś późniejsze różnice indywidualnych przeżyć wzmagają własne cechy osobników, nie doprowadzając jednak (poza przypadkami patologicznymi) do zaburzeń homeostazy organizmu, ponieważ system nerwowy sam się reguluje.

Edelman odrzucając porównanie systemu nerwowego do komputera porównuje równowagę wewnętrzną systemu nerwowego raczej do ekologicznej homeostazy dżungli tropikalnej. W obu układach istnieje pewne podobieństwo. Dobór naturalny odrzuca w dżungli niektóre genomy wielkich roślin, eliminując równocześnie wiele organizmów z nimi związanych, na przykład epifitów i pasożytów. Podobnie dobór naturalny odrzuca, względnie zachowuje nie tylko osobniki o określonej budowie systemu nerwowego, ale także różnicuje mechanizmy ontogenetyczne, odpowiedzialne za łączenie się wzajemnie neuronów, ze względu na ich niezawodność — lub przeciwnie — preferując ich zmienność i plastyczność.

Kolejną różnicą dzielącą system nerwowy od komputera są własności pamięci. Wielokrotne przypomnianie sobie pewnych wydarzeń, czy przedmiotów utrwała zapamiętanie, jednak nader często znieszkłała obraz. Sięganie do pamięci komputera ani jej nie usprawia, ani nie znieszkłała. Natomiast mózg ma tendencję do odtwarzania zapamiętanych faktów montując różne szczegóły w sposób niekoniecznie identyczny. Łuki w pamięci uzupełnia materiał, który po powtórzeniach włącza się do pamięci w sposób trwały i pozostaje nieodróżnialny dla właściciela.

Teoria Edelmana obejmuje ewolucję systemu nerwowego od form najprostszych, którym autor poświęca bardzo mało miejsca, do mózgu ludzkiego. Mózgi najprościej zorganizowane odbierają sygnały z otoczenia i reagują na nie bezwzględnie. Na przykład małże zamykają skorupę, aby ją po upływie pewnego czasu otworzyć, skorupki od pewnych bodźców uciekają, pod wpływem innych posuwają się w kierunku pożywienia i pożerają je. Zachowanie tych zwierząt nie dowodzi istnienia jednolitego, naczelnego układu kierującego. Kręgowce, a w każdym razie ssaki i ptaki zdają się posiadać koordynację nie tylko wszystkich bodźców dobiegających z różnych receptorów, ale również przeszłych wydarzeń zachowanych w pamięci. Pies rozpoznaje znane sobie osoby, z niektórymi się wita, innych się boi.

Możemy powiedzieć, że ssaki łączą różne bodźce w pojęcia przedmiotów, pomimo tego, że nie mając mowy nie mogą tego wyrazić. Edelman uważa, że ptaki i ssaki mają świadomość pierwotną, różną od świadomości ludzkiej, ale podobną. Przypuszczamy, że nie mają świadomości własnego istnienia, nieuchronnie czekającej ich śmierci, istnienia na granicy przeszłości i przyszłości oraz możliwości kierowania myśli w wybranym kierunku. Cechy te ma tylko człowiek. Wedle Edelmana mogły one powstać dopiero po rozwinięciu się mowy. Edelman podkreśla z naciskiem znaczenie mowy dla rozwoju pojęć zwracając równocześnie uwagę, że każdy człowiek ma ogromny świat przeżyć wewnętrznych, których nie da się w pełni wyrazić językiem. Człowiekowi, który by nigdy nie miał w ustach gruszki lub truskawki nie zdołamy opisać smaku tych owoców. Podobnie nie jesteśmy w stanie przekazać oburzenia odczuwanego przy obrażeniu pewnych symboli lub komizmu niektórych sytuacji.

Możliwość wymiany informacji w obrębie rodziny, czy stada musiała przynosić także korzyści ewolucyjne, że wśród przodków człowieka powstały obieg sprzeżeń zwrotnych dodatknych między siłami doboru popierającymi rozwój języków, powiększania rozmiarów mózgu, przedłużania okresu dzieciństwa, używania narzędzi, doskonalenia organizacji polowania (Edelman nie stosuje wyrażenia „feedback” lecz „bootstrapping”, wyrażenie nawiązujące chyba do bajki o Münchhausenie, który wyciągnął siebie z bagna za pętle przy cholewach).

Teoria selekcji grup ułatwia zrozumienie przyczyn odpowiedzialnych za szybkie powiększanie się rozmiarów mózgu w ewolucji bezpośrednich przodków człowieka. Powiększenie mózgu musi wydłużyć rozwój zarodkowy, zaś mózg zużywa stale duże ilości energii na utrzymanie różnicy stężeń jonów na błonie komórkowej. Wydaje się też, że mózg ludzki jest „zbyt wielki” i wskutek tego nie wykorzystany. Hipotezę Edelmana można by wykorzystać do następującego rozumowania. Przodkowie człowieka szybko zmieniali swe zachowanie zależnie od onastępujących środowisk. Uczenie się nowych sposobów zachowania było koniecznością, stąd posiadanie jak największej liczby neuronów w mózgu stało się opłacalne.

Rozwój mowy umożliwił rozumowanie logiczne. Edelman uważa, że każde rozmyślanie polega na dialogu, w którym człowiek rozmawia ze stworzonym przez siebie rozmówcą. Rozmyślanie

doprowadziło człowieka do świadomości drugiego stopnia. Warto zwrócić uwagę, że w języku angielskim nie można przełożyć polskiego wyrażenia „samoświadomość”, gdyż „selfconscious” znaczy po angielsku nieśmiały, skrępowany, a nie ma nic wspólnego ze świadomością.

Świadomość wedle Edelmana to proces ciągłego krążenia stanów pobudzenia po drogach mózgu. Edelman stanowczo odrzuca wszystkie hipotezy zakładające istnienie w mózgu „homunculusa” — karzełka, który interpretowałby stan systemu nerwowego. Świadomość tego karzełka byłaby z kolei odczytana przez jego „mikrokarzełka” — i tak dalej do nieskończoności.

Nawiązując do poglądów Gödela i Heisenberga Edelman stwierdza, że jednym z wielkich osiągnięć współczesnej nauki jest zrozumienie, że istnienie absolutnie pewnego rozumowania jest niemożliwe. Dodaje, że z jego teorii wynika wniosek podobny. Mózg ludzki jest plastyczny, stale zmienia się pod wpływem przeżyć, co więcej dokonuje autopoprawek w sposób niedostrzegalny dla właściciela. Ponadto mózg każdego człowieka jest unikatem. Nie tylko dlatego, że każdy z nas ma inny zestaw genów, ale także dlatego, że na mózg każdego z nas wpłynęły jego własne indywidualne przeżycia. Wobec tego nikt z nas nie może sądzić, że jego rozumowania są w pełni poprawne. W innym miejscu pisze: „the self is the last thing to be understood by its possessor”, co chyba można przetłumaczyć: człowiek nie może zrozumieć przede wszystkim siebie samego.

Przeciwstawia też przyrodnika („scientist”), skromnego, wypowiadającego się tylko w zakresie swej specjalności — filozofom, którzy w swych poglądach uparcie dążą do wyjaśniającej wszystko syntezy. A jednak z głębokim przekonaniem i bez dalszego uzasadnienia oświadczą, że teoria selekcji grup komórek dowiodła, że umysł jest nieporównanie młodszy od świata materialnego. Powstał dlatego, że był możliwy i okazał się ewolucyjnie pożyteczny. Jego teoria obala więc dualizm i wszystkie inne filozoficzne „izmy”. Edelman nie dostrzega, że w tym twierdzeniu wykracza przeciwko cnotom skromnego i wiarygodnego przyrodnika.

Neurofizjologia, psychologia, embriologia i cytologia — to niezmiernie obszerny zestaw nauk, które Edelman musiał uwzględnić szkicując swoje poglądy. Pomimo tego, że nasza wiedza w tych przedmiotach jest ogromnie rozległa, znacznie większe są obszary czekające na zbadanie, autor hipotez musiał wypełniać luki wyobraźnią. Nawet zasadniczy składnik jego poglądów, jakim jest selekcja grup komórek, jest raczej postulatem, niesprzecznym z faktami, niż faktem opartym na obserwacjach. Edelman zdaje sobie sprawę z tego, ale oświadcza, że śmiałe hipotezy łączące z sobą pozornie odległe fakty są bardzo istotnym składnikiem postępu.

Nie wszyscy specjaliści akceptują poglądy Edelmana bez żadnych zastrzeżeń, chociaż znaczna większość z nimi się zgadza, nie brak jest też głosów nazywających Edelmana współczesnym Darwinem. Ewolucjonizm wymagał przeprowadzenia wielu badań, rozwoju nowych gałęzi nauki, jak na przykład ekologii i genetyki, nim się ostatecznie stał podstawowym kanonem biologii. Teoria selekcji grup neuronów wywoła prawdopodobnie również wiele badań szczegółowych, sprawdzających przypuszczenie Edelmana. Zapewne znajdują się szczególne wymagające korekt lub uściśleń. Mam jednak wrażenie, że naszkicowany przez Edelmana ogólny obraz systemu nerwowego jest zgodny z rzeczywistością i pozostanie trwałą częścią neurobiologii.

HENRYK SZARSKI
Słowackiego 15 m 8
31-159 Kraków

SIUDA K. 1991. *Kleszcze (Acari: Ixodida) Polski. Część I. Zagadnienia ogólne*. PWN, Warszawa, Wrocław, 278 pp.

SIUDA K. 1993. *Kleszcze Polski (Acari: Ixodida). Część II. Systematyka i rozmieszczenie*. Pol. Tow. Parazytologiczne, Warszawa, 381 pp.

Kleszcze (*Ixodida*) są na pewno najbardziej znanymi roztocznymi (Acari). Są po prostu, jak na roztocze, znacznych rozmiarów oraz budzą duże zainteresowanie po względem praktycznym, medycznym i weterynaryjnym. Są one grupą bezkręgowców badaną od dawna. Informacji o nich jest wiele, a bibliografia na ich temat sięga już kilku dziesiątków tysięcy pozycji. Wydawałoby się również, że są roztocznymi najlepiej zbadanymi lecz, jak się okazuje, szczegółowa ich znajomość jest na tyle słaba,

że „wytarte” już stwierdzenie, iż akarologia jest opóźniona w stosunku do entomologii o około 100 lat, ma i w tym szczególnym przypadku swoje uzasadnienie.

Jakie są tego stanu przyczyny? Przede wszystkim materiał jest trudny do zdobycia, co wynika z prostego faktu, że większość to kleszcze gniazdowo-norowe, trudno dostępne do badań. Każdy gatunek ma swoją fazę życia pasożytniczego i życia wolnego. Poszczególne gatunki charakteryzują się nieznacznymi różnicami morfologicznymi, a pewne stadia młodociane są nie opisane. Nie ułatwia też systematyzowania silny dymorfizm płciowy. Toteż kleszcze nie są do końca rozpoznane, gdy chodzi o ich biologię, ekologię, rozmieszczenie i znaczenie parazytologiczne. Najbardziej chyba zdumiewający jest fakt, że obecny podział systematyczny, który pochodzi sprzed kilkunastu lat, ma charakter roboczy i na pewno nie jest to naturalna klasyfikacja tej grupy bezkręgowców.

Rozkwit badań nad kleszczami nastąpił po II wojnie światowej, głównie jako pasożytów i przenosieli zarazków wielu groźnych chorób transmisyjnych. Myślę jednak, że w badaniach tych nastąpił pewien przerost zainteresowań *stricte* parazytologicznych nad systematycznymi i dotyczącymi biologii. Obecnie mamy kilka opracowań syntetycznych, które są na ogół monografiami kleszczy kilku poszczególnych krajów Europy. Są to jednak dzieła sprzed 30 lat, na ogół przestarzałe, niekiedy o wartości historycznej, a niektóre z nich zawierają zbyt dużo błędów.

Toteż monografia dra K. Siudy — *Kleszcze (Acar: Ixodida) Polski* pojawia się we właściwym momencie, jako pierwsze syntetyczne opracowanie tej grupy bezkręgowców w Polsce. Mimo bowiem kilkuset pozycji, które liczy polska bibliografia kleszczy, większość z nich dotyczy jednego, najpospolitszego gatunku — *Ixodes ricinus*.

Monografia składa się z dwóch tomów. Pierwszy wydany przez PWN w 1991 roku poświęcony jest zagadnieniom ogólnym, drugi wydany przez PTP w 1993 roku traktuje o systematyce i rozmieszczeniu kleszczy.

Tom pierwszy, którego treść znacznie przekracza informacje o kleszczach z Polski, liczy 287 stron, 21 zestawów rysunkowych i 6 tabel. Składa się on z 7 rozdziałów.

Krótki rozdział I dotyczy ogólnej charakterystyki z ryssem morfologii i znaczenia kleszczy. Opis morfologiczny powtarzać się będzie jeszcze dwa razy — w zasadniczym rozdziale o charakterystyce morfologicznej oraz w drugim tomie przy systematyce. Powtórki te uważam jednak za celowe, a opisy są zawarte we właściwych porządkach.

Rozdział drugi — to historia badań nad biologią kleszczy. Być może lepiej byłoby przesunąć cały ten rozdział do wstępu rozdziału 5, traktującego o biologii kleszczy, albo jeśliśliby to miała być historia badań to nie ograniczyć jej tylko do zagadnień biologii.

Inna uwaga szczegółowa dotyczy tych omawianych prac przeglądowych i faunistycznych, które nie traktują o biologii kleszczy, a więc nie powinny znaleźć się w tym przeglądzie.

Rozdział 3 przedstawia opis morfologiczny poszczególnych części ciała kleszczy, to jest Idiosomy, gnatosomy i nóg, z wprowadzeniem niektórych nie znanych wcześniej w polskiej literaturze ikso-dologicznej terminów, na przykład *alloscutum* zostało określone jako przytarcze (s. 39).

Zostały tu również omówione i zilustrowane główne grupy anomalii morfologicznych, nie bez znaczenia dla systematyki kleszczy.

W rozdziale tym spotykamy nieliczne, drobne błędy, na przykład *neotrichia* nie jest różną liczbą szczecinek u osobników tego samego gatunku (s. 42). Pewną niezręcznością jest numerowanie zestawów rysunkowych cyframi i liczbami arabskimi, jak również elementów tych zestawów również cyframi arabskimi. Prowadzi to do nieporozumień. Na przykład, nie znajdujemy rysunku nogi (s. 42) na rysunku 3, ponieważ jest to element nr 3 na rysunku 4.

Rozdział 4 to zarys anatomii kleszczy z omówieniem poszczególnych układów i narządów zmysłów. Jest to z natury rzeczy najbardziej kompilacyjna część pracy.

Najbardziej interesujący, w moim mniemaniu, jest rozdział 5 dotyczący zagadnień biologii kleszczy, w którym zostały przedstawione: rozród, zachowanie i aktywność płciowa, czynniki wpływające na płodność samic, dzieworództwo, długość i rodzaje cykli rozwojowych, cykl osobniczy i wiek fizjologiczny, żerowanie kleszczy i ich swoistość żywicielska, linienie, biologiczne rytmy dobowe i sezonowe oraz diapauza, feromony w aktywności biologicznej kleszczy.

Mimo, że praca ma charakter kompilacyjny, w tekście często są zamieszczone obserwacje i uwagi własne autora, a zwłaszcza w tym rozdziale. Są to dla przykładu: uwagi dotyczące populacji (s. 89), sposobu składania jaj (s. 93), „wysładzania jaj” (s. 94), okresu dorozwoju (s. 108), własny osąd zagadnienia dotyczącego metody oznaczania „wieku fizjologicznego” (s. 115), zagadnienia dotyczące swoistości żywicielskiej kleszczy polskich (s. 129–132) wraz z podziałem kleszczy na odpowiednie grupy, kanibalizmu (s. 132), rytmu dobowego (s. 155), a poza tym rozdziałem, o bytowaniu obrzęzków (s. 218).

Starannie skonstruowany klucz do oznaczania stadiów rozwojowych jest zamieszczony na stronie 107, zresztą niepotrzebnie, bowiem ten sam klucz znajduje się w tomie systematycznym (s. 51–52).

Ostatnie dwa rozdziały są szczególnie interesujące dla specjalistów z innych dziedzin. W rozdziale 6 wykazano ogromne znaczenie pod względem medycznym, weterynaryjnym i gospodarczym kleszczy jako pasożytów człowieka i zwierząt, wynikające z bezpośrednich następstw ich pasyżytowania jak również z ich roli jako rezerwuarów i przenosieli na człowieka i zwierzęta hodowlane licznych wirusów, riketsji, pierwotniaków i robaków chorobotwórczych. Wykazano ujemne znaczenie przyczepu i żerowania kleszczy, toksycznego oddziaływania śliny oraz frapujące przykłady bezpośrednio ataku kleszczy na człowieka wraz ze szczegółowymi objawami chorobotwórczymi. W rozdziale tym jest załączona oryginalna lista gatunków roztoczy o znaczeniu medycznym i weterynaryjnym, które zostały stwierdzone na wszystkich kontynentach oraz w Polsce.

Chciałbym podkreślić szczególną wartość praktyczną, po raz pierwszy syntetycznego zestawienia w tabelach 5 i 6 wykazu chorób człowieka i zwierząt, wywoływanych przez kleszcze wraz z podanymi zarazkami i nazwami wektorów — kleszczy, które je przenoszą.

Omówienie szkodliwie gospodarczego znaczenia kleszczy jest istotne, gdyż kleszcze są przyczyną największych strat w gospodarce hodowlanej zwierząt użytkowych spośród strat powodowanych przez pasożytnicze stawonogi.

W rozdziale 7 są przedstawione ogólne zasady zapobiegania atakom kleszczy i ich zwalczania, omówione osobno w przypadkach atakowania ludzi oraz w przypadkach atakowania zwierząt hodowlanych (s. 220). Podano tu również zasady zwalczania kleszczy podczas ich fazy niepasożytniczej, to jest bytowania poza ciałem żywiciela. Rozdział istotny, bo przecież, jak pisze autor, wystarczy jedna minuta żerowania jednego z gatunków kleszczy, by zachorować na groźną kleszczową gorączkę powrotną.

Podano interesujące i przekonujące przykłady walki z kleszczami, na przykład wykorzystywanie w tym celu kur w gospodarstwie.

Na końcu tomu jest podana obszerna bibliografia oraz dwa skorowidze — jeden nazw kleszczy, a drugi rzeczowy, jak również dwa wykazy, jeden żywicieli kleszczy, drugi rycin.

Drugim tom monografii jest zatytułowany „Systematyka i rozmieszczenie”. Tom ten liczy 381 stron i zawiera 159 zestawów rysunkowych oraz 7 tabel. Wiele z rysunków jest oryginalnych, natomiast większość wykorzystanych rysunków innych autorów została zmieniona lub poprawiona.

We wstępie autor przedstawia współczesne badania nad fauną kleszczy w Europie oraz stan zbadania fauny Polski z podziałem na grupy biologiczno-ekologiczne. Obydwa te zagadnienia powinny zostać omówione w tomie I. Tu autor rekomenduje i komentuje własne, oryginalne propozycje terminologiczne, na przykład kleszcze pozagniazdowe w miejsce pastwiskowych, czy też proponuje nazwę kleszcz pospolity dla *Ixodes ricinus*.

Nieporozumieniem jest, jak sądzę, zamieszczenie we wstępie podrozdziału dotyczącego położenia systematycznego i systematyki kleszczy, które to treści są integralną częścią dalszych rozdziałów.

Bardzo cenny jest następny rozdział o metodyce badań, dotyczący zbioru różnych grup kleszczy, dokumentacji i konserwacji zbiorów. Podrozdział — *Cechy wykorzystywane przy oznaczaniu* — powinien być zdecydowanie wyłączony z rozdziału — *Metodyka badań*. Tutaj autor bardzo praktycznie potraktował cechy morfologiczne, skupiając się jedynie na ich znaczeniu diagnostycznym. Myślę, że była to okazja dla oceny wartości cech, choć nie jest wykluczone, że było to niemożliwe ze względu na brak danych. Być może zaniedbania dotyczące tego zagadnienia uniemożliwiły, jak dotąd, utworzenie naturalnej klasyfikacji kleszczy.

Dalej jest sporządzona klasyfikacja *Ixodida*, a następnie w klasyczny sposób przedstawiony przegląd systematyczny, a więc charakterystyka morfologiczna i ekologia, najpierw taksonów wyższych, rzędu, podrzędu, rodzin, podrodzin i rodzajów, wreszcie przegląd systematyczny gatunków, z zaznaczeniem gatunków stałych w faunie Polski, zawlekanych i tych, które mogą bytować i być zawlekane. Opis gatunku obejmuje: pełną nazwę łacińską, nazwę polską (w większości przypadków wprowadzoną po raz pierwszy), najważniejsze synonimy, opisy morfologiczne samca, samicy, nimfy i larwy ilustrowane rysunkami, rozmieszczenie na świecie oraz w Polsce (wraz ze stanowiskami ilustrowanymi mapą UTM, co jest o tyle cenne, że materiał był często trudno dostępny), wybrane zagadnienia z biologii zawierające cechy środowiska występowania, cechy pasożytnictwa, wykaz żywicieli, informacja o atakowaniu ludzi, cykl rozwojowy w warunkach naturalnych (jeśli był zbadany), sezonowe i dobowe rytmy aktywności (jeśli są znane) postaci dorosłych i młodocianych, znaczenie medyczne i weterynaryjne ze szczególnym uwzględnieniem roli gatunku w przenoszeniu zarazków chorób transmisyjnych ludzi i zwierząt domowych.

W rozdziale tym jest załączonych wiele obserwacji własnych, a w przypadku brakujących, autor pleczołowicie powołuje się na dane bibliograficzne. Niekiedy jednak obserwacje własne nie są wyraźnie oddzielone od innych autorów. Skądinąd wiem, że liczba tych pierwszych jest na tyle znaczna, że nie zaznaczenie ich w tekście świadczyć może o zbyt skromnym udziale autora.

Bardzo wartościowe jest klucz do oznaczania gatunków, zwłaszcza dla kleszczy właściwych, który jest opracowany osobno dla samców, samic, nymf i larw. Jest to pierwszy w Polsce i w Europie Środkowej klucz do oznaczania kleszczy obejmujący wszystkie stadia rozwojowe omawianych gatunków.

Tom drugi jest uzupełniony wykazem bibliograficznym, listą żywicieli kleszczy oraz skorowidzem.

Autor mimo, że jak sam pisze, jest faunistą, w sposób twórczy ustosunkowuje się do klasyfikacji systematycznej, proponowanej przez różnych autorów. Między innymi nie zgadza się, argumentując swój sprzeciw, z klasyfikacją zaproponowaną przez CAMIS i MOREL (1977). Ustosunkowuje się również do przyjętej klasyfikacji uważając, iż rodziny i rodzaje tworzą dobrze wyodrębnione i zespolone grupy gatunków, jedynie status podrodzajów wymaga dalszych badań.

W pracy systematycznej w wyniku której powstaje klucz do oznaczania, rysunki nie powinny być poprzedzane długimi fragmentami tekstu. Jest to niepraktyczne, nie ułatwia odszukania rysunku podczas oznaczania, czy też podczas śledzenia opisu morfologicznego. Ułatwieniem byłyby rysunki podane w zwartej kolejności.

Niezbyt szczęśliwe jest również rozdzielanie bibliografii. W tomie II nie uwzględniono tych publikacji, które były cytowane w tomie I. Utrapieniem dla Czytelnika jest częste, dwukrotne poszukiwanie w bibliografii cytowanej pozycji.

Zastrzeżenie moje budzi również skorowidz, który jest zbyt oszczędny. Nie podano w nim wielu nazw morfologicznych, zawartych w tekście.

Klucze do oznaczania zredagowane są bardzo starannie tak, że nie udało mi się znaleźć zbyt wielu błędów.

Przy opisie niemal każdej cechy znajduje się odwołanie do rysunku, co jest istotne przy niekiedy mało precyzyjnym określeniu, zwłaszcza kształtu, na przykład, „rogi grzbietowe masywne albo krepę” (s. 100).

O staranności przygotowania redakcyjnego świadczą zamieszczone w obu tomach erraty. Jedyną usterką, którą udało mi się znaleźć jest cytat BUCZEK (1991) zamiast (1991b) — (II: s. 13).

Książka doktora K. Siudy — *Kleszcze (Acari: Ixodida) Polski* jest zbiorem wiadomości o tej ważnej i interesującej grupie roztoczy, niespotykanym dotąd w literaturze polskiej. Jest to pierwsze tak szerokie opracowanie w oryginalnym układzie, w którym zostały zebrane dane o występujących u nas gatunkach wraz z opisami morfologicznymi i informacjami o ich biologii, z kluczami do oznaczania. Obok rejestracji stanu fauny kleszczy są podane przypadki zawlekania, a co istotne, także prognozy występowania spodziewanych gatunków, zawleczeń. Wreszcie jest omówione ich znaczenie medyczne i weterynaryjne. Jest to prawdziwa kopalnia wiedzy o kleszczach, wiedzy teoretycznej, podstawowej, jak i praktycznej.

Często zdarza się, że książki popularne są zbyt naukowe, przeładowane terminologią — wtedy niechętnie sięgają do nich Czytelnicy. Często zdarza się również, że są one zbyt powierzchowne, zniechęcające płytkością i banalnością relacjonowanych zagadnień. Dzieło natomiast dra K. Siudy jest opracowaniem i naukowym i popularnym. Sądzę, że wykorzystywane będzie przez zoologów, specjalistów od bezkręgowców, a przede wszystkim przez wszystkich praktyków, lekarzy, epidemiologów, weterynarzy, leśników, bowiem ułatwi im ono pracę. Jest napisane żywym, poprawnym, a nawet starannym językiem w sposób, który potrafi zainteresować nawet bardzo wybrednego czytelnika.

WOJCIECH NIEDBAŁA

Zakład Taksonomii i Ekologii Zwierząt
Wydział Biologii Uniwersytetu im. A. Mickiewicza
Szamarzewskiego 91A, 60-569 Poznań

M. GROMADZKI, A. DYRCZ, Z. GŁOWACIŃSKI, M. WIELOCH. *Ostoje ptaków w Polsce*. Gdańsk 1994. Biblioteka Monitoringu Środowiska, Ogólnopolskie Towarzystwo Ochrony Ptaków, s. 403. ISBN 83-902466-0-0.

Recenzowana książka jest dziełem czworga autorów i blisko dwustu współpracowników (wymienionych z nazwiska na stronie autorskiej), członków i sympatyków Ogólnopolskiego Towarzystwa Ochrony Ptaków (OTOP), obecnie chyba najprężniej działającej organizacji miłośników przyrody. Bez przesady można powiedzieć, że na tę książkę czekały rzesze Czytelników już od pięciu lat, kiedy to ukazała się angielska praca na ten sam temat *Important bird areas in Europe*, GRIMMET i JONES (1989). Pierwotnie miała zawierać tylko tłumaczone fragmenty dotyczące Polski o objętości niewielkiej broszurki. W trakcie przygotowywania jej okazało się jednak, że wykaz zawiera duże luki, a wiele wiadomości straciło na aktualności. Część ostoi uległo zmianom środowiskowym, w części lepiej rozpoznano awifaunę, czy wreszcie przeszukano nowe tereny kraju i znaleziono tam szereg interesujących miejsc. Zresztą podobnie swoje dane uaktualnili już między innymi Czesi, Hiszpanie, Anglicy i Niemcy, które stały się podstawą osobnych, narodowych wydań.

Co to jest ostoja? „Ostoja ptaków jest przestrzenią, wyróżniającą się spośród otoczenia tym, że jest ona wykorzystywana przez szczególnie cenne gatunki ptaków, lub że jest to przestrzeń szczególnie licznie przez ptaki zasiedlona”. Przestrzeń tę wybrano uwzględniając przede wszystkim cztery grupy ptaków:

1. Gatunki wędrowne, pojawiające się regularnie i licznie na danym terenie;
2. Gatunki zagrożone globalnie, to jest zagrożone wymarciem na całym świecie;
3. Gatunki i podgatunki zagrożone na znacznej części swego arealu europejskiego;
4. Gatunki mające stosunkowo niewielki areal, ze znaczącymi liczebnie populacjami europejskimi.

Uwzględniając powyższe kryteria przygotowano wstępne teksty, które rozesłano do regionów ornitologicznych w Polsce, do wojewódzkich konserwatorów przyrody oraz do wielu ornitologów. Pozwoliło to na weryfikację, uzupełnienie i uaktualnienie danych, a nawet włączenie do wykazu nowych terenów. Dzięki temu przedstawiono w książce pełne informacje odnośnie 118 ostoi, zawierające jego koordynaty geograficzne, położenie administracyjne, powierzchnię i status ochronny, krótko scharakteryzowano szatę roślinną i opisano granice ostoi, które można zweryfikować w terenie z pomocą załączonych map. Podano również dla jakich ptaków ostoja jest szczególnie ważna oraz liczebności przebywających tam ptaków w różnych porach roku. Wyjątek zrobiono dla ptaków drapieżnych w okresie lęgowym. Nie wskazywano ich występowania, aby nie ułatwić wyszukania gniazda i tym samym nie dopuścić do wykorzystania tej wiadomości przez kolekcjonerów jaj i piskląt. Ponadto sporządzono wykaz osób, które zbierały i przekazały wiadomości, w celu przygotowania niniejszej książki.

Książka zawiera również spis piśmiennictwa, informacje dotyczące OTOP-u, międzynarodowych stowarzyszeń ochrony ptaków, międzynarodowych inicjatyw i praw ochrony przyrody (między innymi Konwencja Berneńska, Konwencja Bońska). Bardzo pomocne są załączone dodatki. W pierwszym z nich zamieszczono liczby stanowiące próg liczebne stosowane do waloryzacji ostoi europejskiej. Na podstawie tych liczb łatwo ustalić, jaki procent europejskiej populacji wybranego gatunku ptaka wodno-błotnego na badanym terenie gniazduje, bądź stale przebywa. W kolejnych (2 i 3) wymieniono gatunki zagrożone w skali światowej i zagrożone na całym świecie lub w znacznej części europejskiego arealu.

Wszystko to razem sprawia, że Czytelnik biorąc do ręki tę książkę może zaczerpnąć podstawowych informacji o terenach leżących w Polsce, mających kluczowe znaczenie dla ochrony dziko żyjących gatunków ptaków w Europie. A jest ona przeznaczona dla tych wszystkich osób, które z racji wykonywanego zawodu lub pełnionej funkcji powinny znać rozmieszczenie terenów przyrodniczo cennych. Trafić więc powinna do: samorządów terytorialnych, pracowników administracji rządowej i samorządowej, planistów zajmujących się planowaniem przestrzennym, biur zarządzania lasu, pozarządowych organizacji zajmujących się ochroną przyrody. Na pewno zainteresuje też wszystkich ornitologów i innych przyrodników, zarówno zawodowych, jak i amatorów.

PIOTR TRYJANOWSKI

Zakład Badań Środowiska Rolniczego i Leśnego PAN
Stacja Badawcza, 64-003 Turew

WULF SCHIEFENHÖVEL, JOHANNA UHER, RENATE KRELL (Hrsg.), *Im Spiegel der Anderen. Aus Lebenswerk des Verhaltensforschers Irenäus Eibl-Eibesfeldt*, München 1993, Realis Verlags-GmbH, ss. 224.

W latach 1948–1970 I. Eibl-Eibesfeldt był jednym z najbliższych współpracowników laureata Nagrody Nobla — Konrada Lorenza — twórcy etologii, a więc biologicznej nauki o zachowaniu. I. Eibl-Eibesfeldt należy do twórców etologii człowieka rozumianej jako interdyscyplinarnie ukierunkowana biologia ludzkiego zachowania, gdzie właściwości ludzkiego zachowania bada się zgodnie z metodami wypracowanymi w etologii ogólnej. Z okazji 65-lecia urodzin jego ucznów i przyjaciół urządzili specjalną wystawę zbiorów etnograficznych, a także wydali pracę zbiorową *W zwierciadle innych. O życiu badacza zachowania Irenäusa Eibla- Eibesfeldta*. Wymieniona książka zawiera prace samego I. Eibla- Eibesfeldta, a także jego najwybitniejszych uczonych i przyjaciół, poświęcone biologicznemu dziedzictwu człowieka, przy tym uwzględnia się ludy pierwotne z różnych odległych niekiedy zakątków globu. Oryginalna kultura tych ludów stanowi świadectwo przystosowania się człowieka do różnych warunków życia jeszcze przed powstaniem współczesnego społeczeństwa przemysłowego. Szczególną uwagę przywiązują etologowie do przystosowań biologicznych (nazywanych często filogenetycznym) w zachowaniu. W ujęciu I. Eibla-Eibesfeldta filogenetyczne przystosowania, które jeszcze dzisiaj wyznaczają w dużym stopniu nasze zachowania, rozwinęły się w tym długim okresie czasu, gdy nasi przodkowie żyli jeszcze w małych grupach jako łowcy i zbieracze. Taki charakterystyczny sposób życia prowadzili wszyscy ludzie jeszcze przed 10000 lat. W ten sposób powstały „wspólne cechy naszych spostrzeżeń, ocen, motywacji i działań, a więc tak zwane uniwersalia” (str. 6). Wymienione elementy ludzkiego zachowania wpływają — także i dzisiaj — na kompleksowe strategie społeczne. Etologia człowieka reprezentuje tezę, że „człowiek został zaprogramowany w ewolucyjnym procesie przystosowania, trwającym setki lat do ówczesnych warunków życia” (str. 10). Omawiana książka składa się z kilku charakterystycznych części: *Badacz, Kultura, Dziecko, Dziedzictwo, Dawanie, Święto*. Pierwsza część jest poświęcona sylwetce naukowej i głównym koncepcjom naukowym I. Eibla-Eibesfeldta. Jego celem badawczym stało się zbadanie wpływu biologicznych struktur zachowania powstałych w procesie tysięcy lat, jak też skutki rozwoju ludzkiej kultury. W ciągu ostatnich dziesięciu tysięcy lat człowiek — pod względem biologicznym — prawie się nie zmienił, pomimo że stworzył cywilizację techniczną, wielkie miasta, anonimowe masowe społeczeństwa.

W części poświęconej kulturom przedstawiono Buszmenów, jako reprezentantów kultury paleolitycznej — łowców i zbieraczy. Do początkujących rolników i łowców zaliczono Indian Yanomami z dorzecza górnego Orinoko w Ameryce Południowej. Za „neolitycznych” rolników można uważać plemię Eipo, z Nowej Gwinei, a za pasterzy lud Himba z południowo-zachodniej Afryki. Natomiast Trobriadczyków żyjących na tropikalnych wyspach Melanezji traktować trzeba jako wysoko rozwinięte społeczeństwo rolników i rybaków.

Buszmeni Namibii i Botswany posiadają kulturę łowiecko-zbieracką, którą określa się często jako „paleolityczną”. Podobny sposób życia prowadziła ludzkość aż do tak zwanej rewolucji neolitycznej, kiedy pojawiła się uprawa roli i hodowla zwierząt. Jeszcze na początku naszej ery połowę zamieszkałego przez człowieka świata zajmowały ludy łowiecko-zbierackie. Do niedawna uważano Buszmenów za przykład „pierwotnego, pokojowego człowieka”. Dokładne badania wykazały jednak, że Buszmeni posiadają wyodrębnione terytoria i nie można ich społeczności traktować jako „otwartych społeczeństw”. Grupy Buszmenów liczą od 30 do 60 osób i są porównywalne z innymi ludami łowiecko-zbierackimi. Podstawę życia społecznego stanowią najczęściej monogamiczne rodziny mieszkające w oddzielnych chatkach. Wśród ludzi występuje ścisły podział pracy, łowiectwo — mężczyźni a zbieractwo — kobiety. Wielką wagę przywiązują też Buszmeni do zabaw, które pochłaniają dużo czasu, dając odprężenie fizyczne i psychiczne. Zabawy oparte na walce są w dużej mierze rytualizowane i sformalizowane. Stąd też jawna agresja jest u Buszmenów stosunkowo rzadka. Posiadają też dość rozwiniętą mitologię religijną, chociaż rytuały mają skromny charakter (głównie tańce).

Yanomami należą do bardzo wojowniczego ludu indiańskiego, żyjącego nad górnym Orinoko i jego dopływami. Zajmują oni około 80000 km². Yanomami należą do największych ludów żyjących w dzungli południowoamerykańskiej, które zachowały swój pierwotny sposób życia (15 tys. ludzi i 125 wiosek). Dużym zagrożeniem dla Indian stają się poszukiwacze złota i zawlekanie przez nich epidemie chorób zakaźnych. Mamy tutaj początek uprawy roślin (głównie banany, słodki maniok, jams), które są uprawiane na niewielkich polkach. Obok uprawy roślin dużą rolę odgrywa też łowiectwo i rybactwo. Yanomami posiadają już bardzo złożone wierzenia o duszy i rozwiniętą mitologię religijną. Organizują też kilkudniowe święta, zwłaszcza gdy przybędą goście z sąsiednich wsi.

Wszystkie święta posiadają charakterystyczną strukturę: fazę otwarcia (wzajemnego oficjalnego poznania), fazę intensywnych interakcji społecznych i wreszcie fazę pożegnania. Jest charakterystyczne, że także współczesne święta przebiegają podobnie według wymienionych uniwersalnych reguł. Dla Yanomami ideałem jest bycie wojownikiem (waitheri), gdyż lud ten prowadził wiele wojen. Na wojnach ginie gwałtowną śmiercią około 25% męskiej populacji. W życiu codziennym mężczyźni podkreślają swoją wojowniczość i męskość.

Na Nowej Gwinei żyją jeszcze neolityczni rolnicy — lud Elpo. Prowadzą oni kopteniaczy sposób uprawy roślin, a do niedawna uprawiali kanibalizm oraz prowadzili liczne wojny. Charakterystyczny jest rozdział pomiędzy płciami, który polega na niezbyt jasnych wyobrażeniach magicznych. Istotna jest także regulacja wielkości rodziny przez praktykę dzieciobójstwa, a także liczne reglamentacje stosunków płciowych. Dużą rolę odgrywają u Elpo domy mężczyzn, gdzie są przechowywane przedmioty o charakterze sakralnym. Chłopcy — w przeciwieństwie do dziewcząt — mają więcej czasu, który wykorzystują na zabawy w wojnę. Obchodzi się także święta, które przerywają monotonię codzienności i umacniają więzi pomiędzy mieszkańcami wiosek. Wojna odgrywa u Elpo dużą rolę — prowadzi się ją bezwzględnie i bez rycerskości. Najczęściej są to ataki gradu strzał na ludzi pracujących przy uprawie roślin. Działalność fundamentalistycznych sekt protestanckich prowadzi obecnie do szybkiego zniszczenia kultury Elpo.

Na obszarze Namibii i Angoli żyje pasterski lud Himba. W umocnionych obozowiskach (kralach) przebywają nocą zarówno ludzie, jak i zwierzęta domowe. Życie tych ludzi wyznacza hierarchia społeczna, kult przodków a także kult świętego ognia. Podstawą społeczności Himba jest polygiczna rodzina. Założyciel albo dziedzic kraju jest jednocześnie jego wodzem. Wszyscy członkowie obozowiska są wzajemnie spokrewnieni albo przynajmniej spowinowaceni. Władza ma charakter dziedziczny o wyraźnym charakterze politycznym. Bydło, kozy i owce stanowią podstawę gospodarki dostarczając mleka i mięsa.

Troblandzcy cieszą się dużym zainteresowaniem w badaniach etnologicznych i antropologicznych dzięki działalności Bronisława Malinowskiego, który badał ich kulturę w latach 1915–1918. Od 1979 roku Troblandzcy są przedmiotem badań zespołu badawczego I. Eibla-Eibesfeldta. Najważniejsze zdarzenia społeczne wiążą się u nich ze zbiorem korzeni jamsu. Te ostatnie są synonimem bogactwa służąc do budowania własnego prestiżu i poważania społecznego. Wzajemne obdarowywanie się płodami ziemi odgrywa przy tym ważną rolę społeczną.

Trzecia część książki jest poświęcona zachowaniu się dziecka. Wśród biologów ewolucyjnych toczy się od dawna spór: Dlaczego porody kobiet są tak trudne w porównaniu do innych ssaków? Obecnie wskazuje się głównie na dwa czynniki: budowę szkieletu wynikającą z dwunożnej postawy a także dużą główkę dziecka. Ważnym problemem staje się wykorzystanie zebranych danych o sposobie rodzenia wśród ludów pierwotnych. Ma to duże znaczenie zwłaszcza w kontekście międzynarodowej dyskusji o najkorzystniejszych sposobach rodzenia. Porody były do niedawna — także w krajach rozwiniętych — powiązane z poważnym niebezpieczeństwem dla matki i dziecka. Jeszcze dzisiaj w krajach Trzeciego Świata umiera (do pierwszego roku życia) do 20% wszystkich dzieci. W przypadku ludu Elpo porody odbywają się w pozycji siedzącej w specjalnych domach kobiet w otoczeniu doświadczonych kobiet. Obecnie wiele biologicznych i medycznych czynników przemawia za pionową postawą w czasie rodzenia — charakterystyczną między innymi dla kobiet z gór Nowej Gwinei. Ważne znaczenie ma także atmosfera społeczna w czasie porodu. Pomiedzy matką a dzieckiem istnieją wzajemne mechanizmy tworzenia więzi społecznej. Silne działanie stymulujące wywiera płacz dziecka; występuje on w różnych sytuacjach społecznych, między innymi w przypadku oddzielenia dziecka od matki. Dla niemowlęcia i małego dziecka istotne znaczenie posiada kontakt fizyczny z matką, gdyż u ludów pierwotnych dzieci są noszone. Kontakt z matką prowadzi u dziecka do odpowiedniego stosunku do świata, który E. Erikson określa jako „pierwotne zaufanie” (str. 82). Jest charakterystyczne, że w pierwotnych kulturach matki prawie natychmiast reagują na płacz dziecka, natomiast w Europie Zachodniej dopiero po dziesięciu a nawet 30 minutach płaczu. Co więcej, 33% matek w ogóle nie reaguje na płacz dziecka.

O hierarchii społecznej decyduje nie tylko przewaga fizyczna i agresja, ale przede wszystkim kompetencja społeczna, a zwłaszcza umiejętności tworzenia koalicji społecznych. Wśród dzieci wyróżniamy typy dominujące i agresywne, które charakteryzują się wysokim poziomem agresji, a także dzieci przewodzące zabawom w grupie. Te ostatnie wykazują szereg innowacji i działań kooperacyjnych. Aby zapewnić sobie wpływ w grupie dzieci rozwijają specjalne strategie zwracania na siebie uwagi, między innymi za pomocą zabawek. Dzieciom chodzi nie tylko o harmonię w grupie, ale o stabilizację i poprawę własnej pozycji w grupie. Grupy dziecięce — u ludów pierwotnych — obejmują dzieci od dwóch do trzynastu lat, a prestiż społeczny zależy głównie od wieku. Zabawy odgrywają istotną rolę w procesach socjalizacji i „wejścia” do świata dorosłych. Szczególnie zaintere-

sowanie etologów wywołały zabawy wśród Buszmenów. Grupy zabawowe liczą tam do siedmiu dzieci. Dzieci przebywają w nich wiele godzin wracając praktycznie dopiero pod wieczór do swoich rodzin, a dorośli nie mieszają się w ich zabawy (str. 114). W zabawach uczestniczą często nawet bardzo małe dzieci, które starają się naśladować starszych. W naszych „nowoczesnych” społeczeństwach przy zabawach dzieci muszą być obecne opiekunki lub opiekunowie, gdyż grupy dziecięce są najczęściej homogeniczne pod względem wieku. U Buszmenów pełnią starsze dzieci ważną funkcję socjalizacyjną.

Część czwarta książki jest poświęcona wspólnym cechom zachowania ludzi, tak zwanym uniwersallom. Swoje uniwersalne cechy gatunkowe zawdzięcza człowiek ewolucji biologicznej. Jak wykazali etologowie nasze myślenie, postrzeganie czy działanie wyznaczone jest w dużym stopniu przez filogenetyczne przystosowania. Według I. Eibla-Eibesfeldta „Nasze biologiczne zaprogramowania nie zmieniły się w krótkim okresie czasu, kiedy zaszły wszystkie zmiany kulturowe” (str. 130). Życie w dużych miastach wywołuje szereg niekorzystnych skutków dla człowieka uniemożliwiających także zaspokojenie potrzeb społecznych. Dało to bodziec do rozwoju etologii miasta. Okazało się, że samopoczucie mieszkańców miast, poziom przestępczości czy wandalizmu zależą od charakteru stosunków społecznych między mieszkańcami. Przyjęcie określonych rozwiązań architektonicznych i urbanistycznych może zwiększyć znacznie poziom zadowolenia wśród mieszkańców miast. Potrzebna jest tutaj wszechstronna współpraca pomiędzy przedstawicielami różnych dyscyplin naukowych.

U człowieka agresja występuje w służbie różnorodnych funkcji, a same działania agresywne mogą posiadać także pozytywne skutki. Wojnę trzeba uznać — także w świetle wyników etologii — za wynik ewolucji kulturowej. Jednakże wrodzone człowiekowi dyspozycje odgrywają tutaj ważną rolę. Apele do lojalności grupowej i indoktrynacja przez propagandę trafiają łatwo na „podatny grunt”, a „wróg” ulega szybko dehumanizacji. Wojnę trzeba traktować z etologicznego punktu widzenia jako strategię konkurencyjnych grup dla zdobywania i obrony ograniczonych zasobów. Współczesna wojna nie stanowi wcale optymalnej strategii zdobywania zasobów i utrzymania tożsamości etnicznej. Strach i obawa — podobnie jak ból — należą do największych motywów zachowania życia. Już zwierzęta rozporządzają wrodzonym programem rozpoznawania i unikania niebezpieczeństw, a ich zachowanie jest oparte na wrodzonym „schemacie wroga” jako neuronalnym wzorze postrzegania i oceny sytuacji. Ludzie dysponują różnymi technikami przewyżczenia strachu, między innymi przez noszenie amuletów. Jest charakterystyczne, że wiele amuletów zawiera stylizowane męskie członki i narządy płciowe kobiet. Służą one do zwalczania wrogich sił zagrażających człowiekowi. Człowieka charakteryzuje więc uznanie mocy magicznych znaków powstających przez stylizowanie i symbolizowanie. Stylizacja jest bardzo podobna w różnych kulturach, natomiast tworzenie symboli ogranicza się do ograniczonej liczby osób i bywa jedynie zrozumiałe przez członków danej kultury lub grupy. Do znanych stylizacji należą „oczy” i „zęby” (te ostatnie w formie charakterystycznych zygzaków). Symboliczne funkcje pełnią u człowieka na przykład rytuały pozdrowień. Efektywne używanie symboli języka doprowadziło u człowieka do rozwoju świata kultury i życia duchowego.

W piątej części książki omawia się szeroko problematykę podarków i ich rolę w nawijaniu i utrzymywaniu więzów międzyludzkich. W tradycyjnych społecznościach występuje ścisła relacja pomiędzy stosunkami przyjaźni a gospodarczymi potrzebami. Wzajemne podarki odgrywają ważną rolę społeczną służąc do eliminowania ryzyka i niepewności. Występuje tak w przypadku systemu „hxaro” u Buszmenów polegającego na wzajemności wymiany podarków i przyjaźni. Partnerstwo „hxaro” wiąże ściśle dwie osoby, które są zobowiązane do okazywania pomocy i przyjaźni, a także wzajemnej wymiany podarków. Każdy dorosły jest zazwyczaj członkiem od 16 do 17 partnerów „hxaro”. Partnerstwo „hxaro” dziedziczą także dzieci. W przypadku wojowniczego plemienia Yanomami dużą rolę odgrywa przyjacielska wymiana strzał zwanych „rahaka”. Służą one głównie na wojnie i w polowaniu na grubego zwierza. Wsie, w których jest brak przyjacielskich stosunków, uchodzą jako „wrogle”, a za wszelkie nieszcześćia są odpowiedzialni ich szamani. Przy zawieraniu przyrzeczy pomiędzy wsiami dochodzi zawsze do wymiany podarków i rozwoju szeregu osobistych przyjaźni. W przypadku Yanomami wymiana podarków w postaci strzał umacnia więzi społeczne pomiędzy mężczyznami. Dochodzą do tego wspólne zabawy i uczyty. „Rahaka” posiadają — jako obiekty wymiany — dużą wartość symboliczną, a nie tylko praktyczną. W okresie świąt członkowie ludów pierwotnych starają się wyglądać odświętnie i przywiązują dużą wagę do ozdób i malowania ciała. Świąta dają bowiem możliwość przedstawienia własnej osoby od najlepszej strony. Służą też one do podkreślenia własnej odrębności określonej grupy etnicznej stanowiąc jeden z elementów tak zwanej pseudospecjalizacji kulturowej człowieka. Wydają się być one dla ludzi biopsychologiczną koniecznością, gdyż nie znane społeczeństwa są ich pozbawione. Szczególną wagę przywiązuje się wszędzie do tak zwanych rytuałów przejścia, a więc przechodzenia do innej kategorii społecznej (np.

ze świata dzieci do świata dorosłych). Swoista dla człowieka jest także potrzeba ceremonii religijnych lub quasi-religijnych, które służą między innymi do nawiązywania więzi i stabilizacji społecznej.

Książka *W zwierciadle innych. O życiu badacza zachowania Irenäusa Eibla-Eibesfeldta* zasługuje na uwagę polskich biologów. Przedstawiono w niej — w przystępnej i bogato ilustrowanej formie — ponad trzydziestoletnie badania profesora Irenäusa Eibla-Eibesfeldta i jego uczniów w zakresie biologicznych podstaw zachowania społecznego. Etologia człowieka obalila popularne do niedawna koncepcje behawiorystów, między innymi przekonanie, że człowiek jest *tabula rasa*, a więc ukształtowany wyłącznie przez warunki swojego otoczenia i wychowania. Omawiana tutaj książka zasługuje w pełni na przetłumaczenie na język polski. Należy ona do tych książek, które zmuszają do głębszej refleksji o ludzkim zachowaniu i podstawach kultury.

EUGENIUSZ KOŚMICKI
Bułgarska 80A m 8
60-321 Poznań 38

Veterinärmedizinische Endokrinologie (Endokrynologia weterynaryjna) pod redakcją F. DÖCKE, wydanie 3. przeredagowane i rozszerzone, Gustav Fischer Verlag Jena Stuttgart 1994, 863 stron, 445 rycin, 165 tabel, cena 438 DM, ISBN 3-334-60432-2.

Endokrynologia w ostatnich latach rozwija się niezwykle dynamicznie, a ze względu na rozległość i złożoność problemów wyodrębnia się coraz bardziej jako samodzielna dyscyplina nauki. Program studiów na wydziałach medycyny weterynaryjnej, biologii i zootechniki przewiduje szerokie omówienie zagadnień z tej dziedziny wiedzy. Skupia także uwagę lekarzy weterynarii praktyków oraz przedstawicieli innych zawodów zajmujących się kontrolą procesów rozrodczych u zwierząt.

Tymczasem w kraju odczuwa się deficyt polskich podręczników z tego zakresu. Brak ten może w znacznym stopniu uzupełnić trzecie wydanie książki *Veterinärmedizinische Endokrinologie* pod redakcją F. Döcke, które ukazało się w 1994 roku nakładem Gustav Fischer Verlag Jena-Stuttgart.

Jest to kolejne, znacznie zaktualizowane wydanie znanego w naszym kraju podręcznika. W stosunku do poprzedniego drugiego wydania, które ukazało się w 1981 roku, nowy podręcznik jest znacznie rozszerzony, a ponadto uwzględnił postępy endokrynologii z ostatnich lat.

Książka składa się z trzech zasadniczych części, z których pierwsza jest poświęcona endokrynologii ogólnej, druga problematyce endokrynologii szczegółowej, trzecia zaś zastosowaniu hormonów w medycynie weterynaryjnej oraz kontroli procesów rozrodczych u zwierząt. Treść podręcznika została podzielona na 30 rozdziałów, których tytuły dokładnie informują Czytelnika o ich treści.

Część I: 1. *Endokrynną sekrecja*, 2. *Chemia, biochemia i oznaczanie hormonów sterydowych*, 3. *Biochemia, struktura i oznaczanie hormonów peptydowych*, 4. *Receptory hormonalne: mechanizm działania hormonów w komórkach docelowych*, 5. *Podstawy regulacji w układzie dokrewnym*, 6. *Biorytmy sekrecji hormonów*. Część II: 7. *System podwzgórzowo-przysadkowy*, 8. *Hormonalna regulacja wzrostu*, 9. *Prolaktyna*, 10. *Endogenne opioidy i hormon stymulujący melanocyty*, 11. *Tarczycza*, 12. *Przytarczycze, kalcitonina i witamina D*, 13. *Kora nadnerczy*, 14. *Rdzeń nadnerczy*, 15. *Stres*, 16. *Gruczoły płciowe*, 17. *Ciąża, poród i okres poporodowy*, 18. *Endokrynologia płodu*, 19. *Endokrynologia laktacji*, 20. *Endokrynologia noworodków*, 21. *Trzustka*, 22. *Hormony żółtkowo-jelitkowe*, 23. *Eikozanoidy*, 24. *Feromony*, 25. *Endokrynologia ptaków*. Część III: 26. *Zastosowanie hormonów w chirurgii i internie weterynaryjnej*, 27. *Hormonalna kontrola funkcji rozrodczych*, 28. *Podstawy hormonalnej terapii zaburzeń rozrodu*, 29. *Sterowanie procesami rozrodczymi z użyciem hormonów*, 30. *Zastosowanie hormonów w reprodukcji u psów i kotów*.

Każdy rozdział podręcznika jest uzupełniony wykazem najnowszego piśmiennictwa, co znacznie podnosi jego wartość, zwłaszcza dla korzystających z niego pracowników naukowych, zaś na końcu książki został umieszczony obszerny skorowidz rzeczowy.

Poszczególne rozdziały książki zostały opracowane przez 29 doświadczonych, światowej sławy naukowców z wielu ośrodków badawczych. Zespół autorów trzeciego wydania został po raz pierwszy poszerzony o badaczy z Australii, Szwajcarii i USA. Polskiemu Czytelnikowi jest niezmiernie miło dostrzec w grupie autorów nazwisko prof. dra hab. Andrzeja Ślebodzińskiego, który jest autorem

rozdziałów poświęconych tarczycy i endokrynologii noworodka. Jest to wyraz olbrzymiego uznania dla dokonań naukowych prof. A. Ślebodzińskiego i jego zespołu. Udział w zespole autorskim wielu znanych i cenionych naukowców podnosi wartość i rangę podręcznika. Należy także dodać, że w stosunku do wydania drugiego zespół współautorów wydania trzeciego został znacznie zmieniony. Zaledwie pięciu autorów wydania poprzedniego wzięło udział w redagowaniu recenzowanego dzieła. Okoliczność ta sprawiła, iż Czytelnik i nabywca otrzymuje do rąk zupełnie nową książkę.

Recenzowany podręcznik uwzględnia ogromne postępy endokrynologii z ostatnich lat. W stosunku do poprzedniego wydania z 1981 roku zawiera nie tylko nowe treści w rozdziałach już wcześniej istniejących, ale także został wzbogacony o kolejne rozdziały dotyczące najaktualniejszej problematyki. Wymienić tu należy fragmenty książki poświęconej biorymtom sekrecji hormonów, hormonalnej regulacji wzrostu, roli i znaczenia endogennych opłoidów i prolaktyny w regulacji procesów rozrodczych. Ponadto w książce po raz pierwszy znalazły się rozdziały omawiające endokrynologię płodu i ptaków, a także kontrolę procesów rozrodczych poprzez oznaczanie poziomu hormonów. Godny podkreślenia jest również fakt, iż w podręczniku uwzględniono w sposób nowoczesny i szeroki trudną problematykę stosowania hormonów w praktyce weterynaryjnej. Ten aspekt książki stanowi jej istotny element i nadaje recenzowanemu dziełu cechy podręcznika praktycznie użytecznego dla szerokich rzesz praktyków. Przy tym należy zaznaczyć, iż treści podręcznika uwzględniają ewolucję, jaka dokonuje się w ostatnich latach w zawodzie lekarza weterynarii. Odzwierciedleniem tego jest choćby rozdział poświęcony stosowaniu hormonów u psów i kotów.

Recenzowany podręcznik ze względu na bogactwo zawartych w nim treści oraz unikalny układ rozdziałów jest książką mogącą służyć pracownikom nauki i studentom na wielu wydziałach przyrodniczych, a także praktykom.

Polecam uwadze Czytelnika również znacznie ulepszoną i rozszerzoną w stosunku do wydań wcześniejszych ilustracyjną dokumentację książki. Duża liczba doskonałych zdjęć, tabel, wykresów i schematów uzupełniają tekst oraz znacznie ułatwiają zrozumienie poruszanej problematyki. Logiczny układ rozdziałów, przejrzysty spis treści oraz bogaty indeks znacznie ułatwiają korzystanie z podręcznika i umożliwiają szybkie i łatwe odszukanie interesującego Czytelnika problemu. W sumie recenzowana książka stanowi nowoczesne i bardzo wartościowe opracowanie, które w dużym stopniu uzupełnia brak podręczników na temat endokrynologii weterynaryjnej. Dzieło to, poprzez swój unikalny układ, może być cennym źródłem wiedzy dla studentów akademii rolniczych i uniwersytetów, a także pracowników nauki i praktyków zajmujących się problematyką endokrynologii zwierząt.

TOMASZ JANOWSKI

*Katedra Położnictwa i Patologii Rozrodu
Wydział Medycyny Weterynaryjnej ART
Kortowo II, 10-957 Olsztyn*

WYKAZ PRYZNANYCH NAGRÓD I WYRÓŻNIEŃ ZA PRACE BADAWCZE
W DZIEDZINIE BIOLOGII NA SESJI PLENARNEJ WYDZIAŁU II PAN
W ŁODZI W DNIU 1 GRUDNIA 1994 ROKU

NAGRODA INDYWIDUALNA:

1. Prof. dr hab. Wojciech Niedbała, Uniwersytet im. A. Mickiewicza, Wydział Biologii, Zakład Taksonomii i Ekologii Zwierząt za pracę pt. *Phthiracaroida (Acart, Oribatida). Systematic Studies*. PWN Warszawa 1992, Elsevier Amsterdam-Oxford-New York-Tokyo.

NAGRODY ZESPOŁOWE:

1. Nagroda dla zespołu z Instytutu Biochemii i Biofizyki PAN: prof. dr hab. Andrzej Paszewski, doc. dr hab. Małgorzata Balińska (IBD PAN), dr Jerzy Brzywczy, dr Renata Natorf za cykl prac pt. *Genetyczna regulacja metabolizmu siarkowego u grzybów*. Prace były publikowane w latach 1993-1994 w Acta Biochimica Polonica oraz innych czasopismach krajowych i zagranicznych, między innymi w Elsevier Amsterdam-London-New York-Tokyo 1994.
2. Nagroda dla zespołu z Instytutu Biologii Doświadczalnej PAN: doc. dr. hab. Leszek Kaczmarek, mgr Eugeniusz Nikolajew za badania dotyczące molekularnego podłoża pamięci długotrwałej. Prace były publikowane w latach 1991-1993 w czasopismach krajowych i zagranicznych.
3. Nagroda dla zespołu z Zakładu Antropologii PAN: dr Elżbieta Rogucka, dr Czesław Brajczewski za prace badawcze dotyczące nasilenia przedczesnej umieralności osób dorosłych w Polsce. Prace były publikowane w latach 1992-1993 w czasopismach krajowych i zagranicznych.

WYRÓŻNIENIA:

1. Dr Ewa Krzemińska, doc. dr hab. Wiesław Krzemiński z Instytutu Systematyki i Ewolucji Zwierząt PAN za pracę pt. *W bursztynowej pułapce*. Praca została opublikowana przez Wydawnictwo Muzeum Przyrodniczego Instytutu Systematyki i Ewolucji Zwierząt PAN w Krakowie w 1993 roku.
2. Dr Bolesław Burakowski z Muzeum Instytutu Zoologii PAN za pracę pt. *Laboratory methods for rearing soil beetles (Coleoptera)*. Publikacja: Memorabilia Zoologica nr 46, Polska Akademia Nauk, Muzeum i Instytut Zoologii PAN, Warszawa 1993.
3. Prof. dr hab. Adolf Riedel z Muzeum i Instytutu Zoologii PAN za pracę pt. *The Zonitidae (sensu lato) (Gastropoda, Pulmonata) of Greece*. Publikacja: 1992, Hellenic Zoological Society, Athens, w serii Fauna Graeciae, vol. V, 194 str. + 39 map.
4. Dr Jana M. Wójcik z Zakładu Badania Ssaków PAN za publikację pt. *Chromosome races of the common shrew Sorex araneus in Poland: a model of karyotype evolution*. Publikacja: 1993, Acta Theriologica 38, 315-338.
5. Doc. dr hab. Adam Boratyński, prof. dr hab. Władysław Bugała z Instytutu Dendrologii PAN za monografię pt. *Biologia sosny zwyczajnej*. Publikacja: Polska Akademia Nauk, Instytut Dendrologii, Sorus, Poznań-Kórnik 1993.
6. Dr Rafał Mól z Zakładu Botaniki Uniwersytetu im. A. Mickiewicza, za prace badawcze dotyczące eksperymentalnej embriologii roślin. Publikacje: Hodowla Roślin, Aklimatyzacja i Nasiennictwo, Tom 36, Zeszyt 1/2 1992. Biologia Plantarum 35 (1), 25-30, 1993. Plant Science, 81 (1992) 261-269, Elsevier Scientific Publishers Ireland Ltd. The Plant Journal (1994) 5 (2), 197-206. Planta (1993) 189, 213-217. Zygote 2 (February), pp 0-00. Copyright 1994 Cambridge University Press.
7. Prof. dr hab. Tadeusz Baszyński, prof. dr hab. Zbigniew Krupa, dr hab. Anna Tukendorf, dr Waldemar Maksymiec, dr Ewa Skórzyńska, mgr Anna Siedlecka z Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie za prace pod wspólnym tytułem *Mechanizmy inhibicji fotosyntetycznej*

- aktywności roślin i ich tolerancji wobec metali ciężkich. Prace były publikowane w latach 1991–1993 w czasopiśmie krajowych i zagranicznych.
8. Dr Aleksandra Kohlman-Adamska z Muzeum Ziemi PAN za rozprawę doktorską pt. *Pollen analysis of the Neogene deposits from the Wyrzysk region, north-western Poland*. Publikacja: Acta Paleobotanica. 33 (3), 91–297, 1993 rok.
 9. Doc. dr hab. Adam Boratyński, prof. dr hab. Kazimierz Browicz, prof. dr hab. Jerzy Zieliński z Instytutu Dendrologii PAN za pracę pt. *Chronology of trees and Shrubs in Greece*. Publikacja: Polska Akademia Nauk, Instytut Dendrologii, Sorus, Poznań/Kórnik, 1992.
 10. Prof. dr hab. Nikodem Grankowski, doc. dr hab. Teresa Jakubowicz, dr Ryszard Szyszka, dr Marek Pilecki, mgr Piotr Dukowski, mgr Małgorzata Cytryńska z Zakładu Biologii Molekularnej Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej, za pracę pt. *Kinazy białkowe; struktura i funkcja biologiczna*. Prace były publikowane w latach 1991–1993 w Acta Biochimica Polonica oraz innych czasopiśmie krajowych i zagranicznych.
 11. Prof. dr hab. Stanisław Rakusa-Suszczewski z Zakładu Biologii Antarktyki PAN za redakcję, naukowy patronat i autorski udział w opracowaniu monografii pt. *The Maritime Antarctic Coastal Ecosystem of Admiralty Bay*. Publikacja: Polska Akademia Nauk, Zakład Biologii Antarktyki, Warszawa 1993.
 12. Doc. dr hab. Andrzej Sobota, dr Katarzyna Kwiatkowska, mgr Joanna Bandrowicz, Kazimiera Mrozińska z Instytutu Biologii Doświadczalnej PAN za badania dotyczące oddziaływania białek wiążących mikrofilamenty ze składnikami plazmolemy. Prace były publikowane w latach 1990–1993 w czasopiśmie krajowych i zagranicznych.
 13. Dr Wojciech Witaliński z Zakładu Anatomii Porównawczej Instytutu Zoologii Uniwersytetu Jagiellońskiego za serię prac dotyczących biologii rozrodu roztoczy. Prace były publikowane w latach 1991–1993 w czasopiśmie zagranicznych.
 14. Prof. dr hab. Anna Stańczykowska-Plotrowska z Instytutu Biologii Wyższej Szkoły Rolniczo-Pedagogicznej w Siedlcach i Krzysztof Lewndowski z Instytutu Ekologii PAN w Dziekanowie Leśnym za pracę pt. *Thirty Years of Studies of Dreissena polymorpha Ecology in Mazurian Lakes of Northeastern Poland*. Publikacja: 1993 Zebra Mussels Biology, Impacts, and Control, Lewis Publishers.
 15. Dr Włodzimierz Jędrzejewski, dr Bogumiła Jędrzejewska z Zakładu Badania Ssaków PAN za pracę: *Predation on rodents in Białowieża primeval forest, Poland*. Publikacja: Ecography 16, 47–64. Copenhagen 1993.

NAGRODA WICEPREZESA, SEKRETARZA NAUKOWEGO PAN

1. Nagroda naukowo-organizacyjna PAN przyznana przez Wiceprezesa, Sekretarza Naukowego PAN zespołowi pracowników Muzeum Przyrodniczego Instytutu Systematyki i Ewolucji Zwierząt Polskiej Akademii Nauk w składzie: Bożena Bednarek, Barbara Miękina, Janusz Kasza jako wyraz wysokiego uznania za zaprojektowanie i zorganizowanie wystawy *Świat puszczy tropikalnej*.

SPIS TREŚCI

<i>Profesor Doktor Włodzimierz Michajłow</i>	5
<i>Ewa J. Godzińska</i> — Taktyki alternatywne w zachowaniu się owadów	11
<i>Piotr Mikołajczyk</i> — Wpływ inhibitorów syntezy chityny na produkcję kutikuli <i>in vitro</i> w dyskach imaginalnych skrzydeł larw <i>Spodoptera frugiperda</i> (J. E. Smith) (<i>Lepidoptera</i> : <i>Noctuidae</i>)	25
<i>Józef Banaszak, Tomasz Cierznik</i> — Ekonomiczne efekty zapylania roślin uprawnych przez pszczołę miodną i dziko żyjące pszczołowate (<i>Apoidea</i>)	47
<i>Józef Banaszak, Halina Ratyńska, Wojciech Szwed</i> — Wyspy leśne jako ważny składnik krajobrazu	63
<i>Marek Jurgowiak, Ryszard Oliński</i> — Wolne rodniki a starzenie się	71
<i>Tadeusz Włostowski</i> — Metalotioneina a podział komórki	89
<i>Wanda Kłopotcka</i> — Rola wewnątrzkomórkowego wapnia w ruchu ameboidalnym i w zjawis- kach z nim związanych	99
<i>Andrzej Wójcik</i> — Technika malowania chromosomów i jej zastosowanie w radiobiologii	115
<i>Andrzej Bajguz, Romuald Czerpak</i> — Występowanie i aktywność biologiczna brassino- steroidów — nowych hormonów roślin	129
<i>Piotr Kamiński</i> — Wpływ środowiska miejskiego na rozwój ptaków synantropijnych (prze- gląd badań)	145
<i>Hanna Jaśkowska</i> — Para-brodawki jako nowy model symbiozy	163
<i>Valery Isidorov, Ewa Pirożnikow, Jadwiga Jaroszyńska</i> — Emisja roślinna lotnych zwią- zków organicznych (LZO) oraz ich znaczenie ekologiczne	169
<i>Stawomir Kozieł</i> — Dwunożność — podstawowy problem w filogenezie człowieka	187
<i>Elżbieta Szelaq</i> — Neuropsychologiczne podłoże jąkania — przegląd badań empirycznych nad asymetrią funkcjonalną mózgu	199
<i>Rafał Butowt</i> — Filtrowanie energii elektronów — nowa technika tworzenia obrazu w trans- misyjnym mikroskopie elektronowym	215
<i>Dyskusje</i>	229
<i>Recenzje książek</i>	235
<i>Nagrody naukowe</i>	249

CONTENTS

<i>Ewa J. Godzińska</i> — Alternative tactics in insect behavior	11
<i>Piotr Mikołajczyk</i> — Effect of chitin synthesis on cuticle production in vitro in wing imaginal discs of <i>Spodoptera frugiperda</i> (<i>Lepidoptera: Noctuidae</i>) larvae	25
<i>Józef Banaszak, Tomasz Cierznia</i> — Economical effects of arable crops pollination by honey bee and wild bees (<i>Apoidea</i>)	47
<i>Józef Banaszak, Halina Ratyńska, Wojciech Szwed</i> — Forest islands as an important element of the landscape	63
<i>Marek Jurgowiak, Ryszard Oliński</i> — Free radicals and ageing	71
<i>Tadeusz Włostowski</i> — Metallothionein and cell proliferation	89
<i>Wanda Kłopotcka</i> — The role of intracellular calcium in ameboid movement and related phenomena	99
<i>Andrzej Wójcik</i> — The technique of chromosome painting and its application in radiation biology	115
<i>Andrzej Bajguz, Romuald Czerpak</i> — The occurrence and biological activity of brassino- steroids — a new type of plant hormones	129
<i>Piotr Kamiński</i> — The impact of urban environment upon the development of synanthropic birds (a review)	145
<i>Hanna Jaśkowska</i> — Para-nodules as a new model of symbiosis	163
<i>Valery Isidorov, Ewa Pirożnikow, Jadwiga Jaroszyńska</i> — Emission of volatile organic compounds from living plants and their ecological significance	169
<i>Sławomir Koziel</i> — Bipedalisation — a crucial event in human phylogeny	187
<i>Elżbieta Szela</i> — Neuropsychological basis of stuttering — a review of experimental studies on hemispheric asymmetry	199
<i>Rafał Butowt</i> — Electron energy filtration — a new technique for improving the image in transmission electron microscope (TEM)	215

WSKAZÓWKI DLA AUTORÓW KWARTALNIKA KOSMOS

1. *KOSMOS* publikuje artykuły informujące o stanie wiedzy w różnych dziedzinach szeroko pojętej biologii i jej pogranicza z innymi naukami, opracowane przez specjalistów dla czytelników z wyższym wykształceniem, zainteresowanych problemami biologii. Jest adresowany przede wszystkim do pracowników naukowych, nauczycieli szkół średnich i wyższych oraz studentów.

2. Artykuły powinny być zatem pisane językiem naukowym lecz zrozumiałym dla niespecjalistów w danej dziedzinie. Jest wskazane wyjaśnianie specjalistycznego słownictwa a zwłaszcza wprowadzanych skrótów. Należy unikać nadmiernej liczby cytowań oryginalnych prac, odsyłając czytelników w miarę możliwości do artykułów przeglądowych.

3. Objętość artykułu nie powinna w zasadzie przekraczać 1 arkusza autorskiego, to jest około 20 stron znormalizowanego maszynopisu, łącznie ze spisem literatury, tabelami i ilustracjami. W przypadku zeszytów tematycznych, objętość artykułu należy ustalić w porozumieniu z redaktorem merytorycznym zeszytu.

4. Prace należy nadsyłać w formie maszynopisu w 2 kopiach na białym papierze formatu A4 oraz 1 kopię na dyskietce, napisaną pod dowolnym edytorem tekstu na komputerze klasy IBM PC, bez centrowania tytułów, zaznaczania akapitów, formatowania i wymuszania przenoszenia.

5. Teksty powinny być pisane z podwójnym odstępem między wierszami i lewym marginesem szerokości około 4 cm, bez używania wyróżnień (podkreślenia, spacjowania, pisania kursywą). Wszelkie wskazówki dotyczące wyróżnień w tekście oraz miejsca włamania ilustracji należy zaznaczać zwykłym ołówkiem na marginesie maszynopisu. Wszystkie śródtytuły piszemy bez numeracji, czcionką tej samej wielkości a ich gradację zaznaczamy na marginesie ołówkiem: I-, II- lub III-rzędu. Strony należy numerować. Na oddzielnej, nie numerowanej stronie tytułowej należy podać tytuł pracy, imię (w pełnym brzmieniu) i nazwisko autora(ów), nazwę i adres zakładu pracy, adres zamieszkania, numer telefonu, telefaksu i adres poczty elektronicznej (E-mail).

6. Cytowane w tekście prace zaznaczamy przez podanie nazwiska autora(ów) i roku publikacji w nawiasie półokrągłym, np. (BROOKS i FROG 1993), (FISHER i współaut. 1992). Cytowaną literaturę należy zestawić na końcu maszynopisu bez numeracji w alfabetycznej kolejności według nazwisk autorów w następujących formatach:

— artykuł: BROOKS W. J., FROG T. K., 1993. Tytuł pracy w języku oryginału. Przyjęty skrót nazwy czasopisma, tom, strony od...do..., np.: *Kosmos* 43, 129-146;

—rozdział: FISHER D., KAY M. D., JUREK Z., 1992. Tytuł rozdziału. [W:] Nazwisko(a) i inicjały redaktora(ów), (red.). Nazwa wydawnictwa miejsce wydania, strony od...do.....;

—książka: WÓJCICKI B., 1993. Tytuł. Wydawnictwo, miejsce wydania, str...

7. Do maszynopisu należy dołączyć na oddzielnej kartce tytuł i krótkie streszczenie artykułu w jęz. angielskim (nie przekraczające 1 str.), informujące o zasadniczej jego treści.

8. Rysunki, schematy i fotografie (oryginały + 2 kserokopie) muszą być dostarczone łącznie z maszynopisem w formie nadającej się do reprodukcji. Na odwrocie należy zaznaczyć ołówkiem ich numerację oraz nazwisko(a) autora(ów) i kilka pierwszych słów tytułu pracy. Rysunki powinny być wykonane w skali 1:1 (maksymalna szerokość 13,5 cm a wysokość — 19,5 cm z uwzględnieniem miejsca na podpis pod rysunkiem, dostosowane do wymiarów kolumny 13,5 × 19,5 cm), lub proporcjonalnie większej, czarnym tuszem na kalce (białym papierze wysokiej jakości), a w przypadku rysunków wykonanych techniką komputerową — wydrukowane na białym papierze drukarką laserową (oryginał prosimy przysłać na dyskietce). Opisy na rysunkach powinny być wykonane czcionką odpowiedniej wielkości: nie mniejszą niż 12 punktów dla rysunków w skali 1:1, lub odpowiednio większą, tak aby po zmniejszeniu do druku opis był czytelny. Kolorowe ilustracje mogą być umieszczone wyłącznie na koszt Autora(ów) lub zatrudniającej instytucji.

9. Autorzy otrzymują 25 nadbitek autorskich. Dodatkowe nadbitki są odpłatne i należy je zamawiać wraz ze wzrotem korekty tekstu.

ADRESY REDAKCJI:

Redaktor Naczelny — prof. dr Kazimierz L. Wierzchowski
Instytut Biochemii i Biofizyki, Pawińskiego 5A, 02-106 Warszawa
Sekretarz Redakcji — mgr Barbara Bierzyńska
Muzeum i Instytut Zoologii PAN, Wilcza 64, 00-679 Warszawa

Adresy, pod którymi można zamówić prenumeratę lub nabyć poszczególne zeszyty *KOSMOSU*:

Medyczna Agencja Wydawniczo Informacyjna, Złota 60/28

Nr konta: PKO BP IX O/W-wa nr 1599-321004-136.

Amos, Zuga 12, 01-806 Warszawa

Nr konta: PKO VIII O/W-wa nr 1586-77578-136.

KOSMOS

KONTYNUACJA PRENUMERATY:

TAK

NIE

ROCZNA

PÓLROCZNA

LICZBA EGZ. 1 2 3 4

WARTOŚĆ.....zł

Zakreśl właściwie!

KOSMOS

KONTYNUACJA PRENUMERATY:

TAK

NIE

ROCZNA

PÓLROCZNA

LICZBA EGZ. 1 2 3 4

WARTOŚĆ.....zł

Zakreśl właściwie!

KOSMOS

KONTYNUACJA PRENUMERATY:

TAK

NIE

ROCZNA

PÓLROCZNA

LICZBA EGZ. 1 2 3 4

WARTOŚĆ.....zł

Zakreśl właściwie!

CZASOPISMO JEST DOSTĘPNE GŁÓWNIEM W PRENUMERACIE

<i>Lubczyński Leszek</i> — Parki narodowe w Polsce	1	49
<i>Michalik Stefan</i> — Międzynarodowy Rezerwat Biosfery Karpaty Wschodnie	1	117
<i>Nowak Jerzy</i> — Postępy terapii genowej chorób dziedzicznych	3-4	571
<i>Nowak Jerzy</i> — Znaczenie i perspektywy genetyki w rozwoju nauk medycznych	3-4	347
<i>Paprocka Maria</i> — Przeciwciała monoklonalne	2	273
<i>Paschalis Piotr</i> — Próby rozwiązania niektórych problemów leśnictwa światowego	1	31
<i>Pawlak Andrzej L.</i> — Dziedziczne podatności na nowotwory i czynniki wpływające na ryzyko zachorowania	3-4	537
<i>Pawłowski Bogusław</i> — Altruizm jako fenomen biologiczny	2	191
<i>Popowska Ewa</i> — Molekularne podłoże zespołu Huntera	3-4	445
<i>Pucek Zdzisław</i> — Postępy i zagrożenia restytucji żubra	1	147
<i>Rożynkowa Danuta</i> — perspektywy genetycznych badań nowotworów — odkrycia i wizje	3-4	507
<i>Sąsiadek Maria, Jagielski Józef</i> — Biologiczne skutki działania czynników mutagennych	3-4	563
<i>Słomski Ryszard, Kwiatkowska Jolanta, Chlebowska Hanna, Siemieniako Barbara, Słomska Magdalena</i> — Polimorficzne sekwencje DNA i ich zastosowanie w dochodzeniu spornego ojcostwa	3-4	479
<i>Sokołowski Aleksander W.</i> — Przyroda Puszczy Białowieskiej i jej ochrona	1	87
<i>Stempniewicz Lech</i> — Dzieciobójstwo u zwierząt. Interpretacja socjobiologiczna	2	201
<i>Szyfter Krzysztof</i> — Zróżnicowanie procesu naprawy DNA w normie i patologii człowieka	3-4	551
<i>Witt Michał</i> — Wybrane aspekty zależności genotyp — fenotyp w mukowiscydozie	3-4	409
<i>Wróbel Borys</i> — Pamięć na poziomie komórkowym i molekularnym	2	231
<i>Zaremba Jacek</i> — Diagnostyka prenatalna	3-4	363

DYSKUSJE

<i>Janion Stefan M.</i> — Informacja behawioralna — ewolucyjny mechanizm przystosowawczy	2	309
<i>Urbanek Adam</i> — Przyjaciele Adama	2	313

KRONIKA NAUKOWA

<i>Bebel Danuta</i> — IX Ogólnopolskie Seminarium Dydaktyki Biologii	2	315
<i>Kowalski Marek</i> — VI Europejskie Sympozjum Badaczy Nietoperzy (with European Bat Research Symposium) Evora, 22–27 sierpnia 1993 roku oraz Drugie Europejskie Warsztaty Detektorowe (second European Bat Detector Workshop) Park Narodowy Sierra De Grazalema, 29–31 sierpnia 1993 roku	2	325
<i>Kowalski Marek, Ostrach Agnieszka</i> — VII Ogólnopolska Konferencja Chiropterologiczna Poznań, 23–24 października 1993 roku	2	317
<i>Wojtal Agata</i> — Apel do przyrodników o ilustracje okrzemek	2	330

RECENZJE

<i>Chatto Beth</i> — Im grünen Reich der Stauden. Der neue englische Staudengarten	2	339
<i>Fessler Alfred</i> — Der Staudengarten. 110 Farbfotos, 54 Zeichnungen und Plän	2	341
<i>Geisler Gerhard</i> — Farbatlas. Landwirtschaftliche Kulturpflanzen	1	183
<i>Hartl Günter B., Markowski Janusz</i> — Ecological Genetics in Mammals	1	179
<i>Reichholf Josef H.</i> — Der schöpferische Impuls. Eine neue Sicht der Evolution	2	333
<i>Schröder Rudolf</i> — Kaffee, Tee und Kardamon. Tropische Genussmittel und Gewürze. .	1	181
<i>Wuketits Franz M.</i> — Gene, Kultur und Moral: Soziobiologie — Pro und Contra	2	336

Prenumeratę, jak również sprzedaż pojedynczych zeszytów **KOSMOSU** prowadzi, oprócz Wydawcy — **MAWI**, także firma **AMOS**, 01-806 Warszawa, ul. Zuga 12. Koszt prenumeraty w 1995 r. wynosi 28,00 zł.

Zlecenie dostawy za granicę jest o 100 procent droższe. W przypadku życzenia dostaw drogą lotniczą zamawiająca pokrywa dodatkową opłatę.

Wpłaty są przyjmowane na konto firmy **AMOS**: PKO VIII O/W-wa Nr 1586-77578-136, z dopiskiem na blankiecie tytułu i okresu prenumeraty, a w przypadku pojedynczych zeszytów numeru tomu i zeszytu.