

PL ISSN 0324-833X

POLSKIE
TOWARZYSTWO
ANATOMICZNE

POLSKIE
TOWARZYSTWO
BIOLOGII
KOMÓRKI

TOM 22 NR-2'95
(101–204)

Postępy Biologii Komórki

Kwartalnik Polskiego Towarzystwa Anatomicznego, Polskiego Towarzystwa Biologii Komórki, Polskiej Sieci UNESCO oraz Fundacji Biologii Komórki i Biologii Molekularnej wydawany z częściową pomocą finansową Komitetu Badań Naukowych.

Redaguje Kolegium:

Szczepan BILIŃSKI (*Instytut Zoologii UJ, 30-060 Kraków, ul. Ingardena 6*),

Jerzy KAWIAK (*Zakład Cytologii Klinicznej CMKP, 01-813 Warszawa, ul. Marymoncka 99*),

Maciej KAWALEC (*Zakład Cytologii Klinicznej CMKP, 01-813 Warszawa, ul. Marymoncka 99*),

Wincenty KILARSKI (*Instytut Zoologii UJ, 30-060 Kraków, ul. Ingardena 6*),

Jan MICHEJDA (*Zakład Bioenergetyki UAM, 61-701 Poznań, ul. Fredry 10*),

Maria OLSZEWSKA (*Zakład Cytologii i Cytochemii Roślin Instytutu Fizjologii i Cytologii UŁ, 90-237 Łódź, ul. Banacha 12/16*),

Maciej ZABEL (*Zakład Histologii AM, 50-368 Wrocław, ul. Chalubińskiego 6a*)

Rada Redakcyjna:

Zofia OSUCHOWSKA – przewodnicząca, Mieczysław CHORAŻY, Leszek CIECIURA, Antoni

HORST, Aleksander KOJ, Włodzimierz KOROHODA, Leszek KUŹNICKI,

Olgierd NARKIEWICZ, Aleksandra PRZEŁĘCKA, Aleksandra STOJAŁOWSKA,

Lech WOJTCZAK

Adres Redakcji: Centrum Medyczne Kształcenia Podyplomowego ul. Marymoncka 99, 01-813 Warszawa, tel. 340 344, fax 340470.

W tym zeszycie • Postępów Biologii Komórki •

- Artykuł pt. "Białka wiążące GTP jako uniwersalny przekaźnik sygnałów" to drugi w ostatnich zeszytach artykuł publikowany w związku z nagrodą Nobla 1994 dla Alfreda Gilmana i Martina Rodbella (str. 103 oraz PBK 1994; 21: 479).
- Wpływ anomalii kariotypu somatycznego na przebieg mejozy u mężczyzn i następstwa tego zjawiska obserwowane w procesie rozrodu omówiono na stronie 113.
- M. Ratajczak i współpracownicy w kolejnym artykule (por. PBK 1993; 20:279) wyjaśniają proces regulacji hematopoezy. Artykuł na stronie 131 autorzy poświęcili udziałowi ligandu receptora STK-1 w tym procesie.
- Wanad jest pierwiastkiem śladowym powszechnie występującym w środowisku oraz tkankach roślin i zwierząt. W stężeniach mikromolarnych może wykazywać działanie mitogenne, regulować aktywność czynników wzrostu oraz wielu enzymów (str. 149).
- Dotąd w PBK nieliczne artykuły dotyczyły komórek układu nerwowego. Na stronie 169 Czytelnik znajdzie opisy ekspresji białek cytoszkieletowych w astrocytach podczas powstawania blizny pourazowej, a na stronie 181 charakterystykę komórek mikrogleju uważanych za makrofagi ośrodkowego układu nerwowego.

W tym zakresie * Testujmy swoją wiedzę!

- 1. W jakiej formie występuje woda w atmosferze? (1 pkt)
- 2. W jakiej formie występuje woda w atmosferze? (1 pkt)
- 3. W jakiej formie występuje woda w atmosferze? (1 pkt)
- 4. W jakiej formie występuje woda w atmosferze? (1 pkt)
- 5. W jakiej formie występuje woda w atmosferze? (1 pkt)
- 6. W jakiej formie występuje woda w atmosferze? (1 pkt)
- 7. W jakiej formie występuje woda w atmosferze? (1 pkt)
- 8. W jakiej formie występuje woda w atmosferze? (1 pkt)
- 9. W jakiej formie występuje woda w atmosferze? (1 pkt)
- 10. W jakiej formie występuje woda w atmosferze? (1 pkt)

BIAŁKA WIĄŻĄCE GTP JAKO UNIWERSALNY PRZEKAŹNIK SYGNAŁÓW

GTP BINDING PROTEINS AS AN UNIVERSAL SIGNAL TRANSDUCER

Grażyna ADLER

Zakład Biochemii Klinicznej, Centrum Medyczne Kształcenia Podyplomowego,
Warszawa

Streszczenie: Do nadrodziny białek wiążących GTP należą błonowe, heterotrimeryczne białka G i monomeryczne białka niskocząsteczkowe. Białka G uczestniczą w przenoszeniu sygnału do wnętrza komórki. Opracowanie mechanizmu tego procesu stało się podstawą do nagrody Nobla z zakresu medycyny w 1994 roku. W procesie przenoszenia sygnału obok białek G biorą udział receptory błonowe i efekторы, takie jak cyklaza adenylanowa, fosfolipaza C i kanały jonowe. Niskocząsteczkowe białka wiążące GTP regulują szereg zmian wewnątrzkomórkowych, często związanych również z przenoszeniem sygnału.

Słowa kluczowe: białka G, hormony, receptory, cyklaza adenylanowa, fosfolipaza C, kanały jonowe, GTP-aza

Summary: The superfamily of GTP-binding proteins consists of heterotrimeric proteins G and monomeric "small" proteins. G proteins act as transducer of the messages into the cells. The description of these processes was the basis of 1994 Nobel prize in medicine. Others proteins involved in signal transductions are membrane receptors and effectors as adenylate cyclase, phospholipase C and ionic channels. The "small" GTP binding proteins regulate many intracellular processes which are often also connected with signal transduction.

Key words: Protein G, hormones, receptors, adenylate cyclase, phospholipase C, ionic canals, GTP-ase

Pierwsze wyniki prac Alfreda Gilmana i Martina Rodbella nad charakterystyką wiążącego GTP białka G pochodzą z początku lat siedemdziesiątych. W tym czasie Rodbell badał mechanizm stymulacji glukagonem komórek wątroby [18], natomiast Gilman pracował nad układem modelowym limfocytów mysich stymulowanych

przez katecholaminy [8]. Wiadomo już było, że wiele hormonów nie wchodzi do komórki docelowej, a po związaniu przez występujący w jej błonie specyficzny receptor przekazuje niesiony przez siebie sygnał przez układ cykazy adenylanowej. W warunkach *in vitro* stymulację cykazy adenylanowej bada się w obecności egzogenego ATP, który jest substratem tego enzymu. Zaobserwowano, że stymulacja hormonalna nie zachodzi, jeżeli podczas reakcji użyje się specjalnie oczyszczony preparat ATP. Wskazywało to na udział w reakcji przekazywania sygnału jakiegoś związku zanieczyszczającego handlowe preparaty ATP. W innych badaniach zaobserwowano, że egzogeny GTP jest stymulatorem cykazy adenylanowej, a jeszcze silniejszym stymulatorem jest pochodna GTP niewrażliwa na hydrolizę enzymatyczną jak np. GppNHp (*guanazyinoimidotryfosforan*). Te i podobne obserwacje doprowadziły do wykrycia białka G jako uniwersalnego łącznika przekazującego sygnały z receptorów błonowych na efekторы i do wnętrza komórki oraz do uzyskania przez Gilmana i Rodbella w 1994 roku nagrody Nobla z zakresu fizjologii i medycyny. Nazwa białka G pochodzi od jego zdolności wiązania i hydrolizy nukleotydów guanylewych, przy czym czas hydrolizy GTP do GDP reguluje szybkość transmisji sygnału [1]. Szybkość przekazywania sygnału tą drogą jest rzędu sekund i jest szybkością pośrednią, niższą od szybkości przekazywania kanałami jonowymi zależnymi od ligandu np. acetylocholino, a wyższą od przekazywania za pomocą kinaz tyrozynowych, np. przez insulinę [22].

Powyższy, opracowany w latach siedemdziesiątych i aktualny do dziś schemat mechanizmu przenoszenia sygnału do komórki dotyczył tylko jednego systemu przekaźników dających w rezultacie stymulację cykazy adenylanowej [13]. Obecnie wiemy już, że istnieje cała rodzina homologicznych białek G o strukturze heterotrimeru i że przekazują one sygnały na różne efekторы. Białka te należą do nadrodziny GTP-az, do której ponadto należą błonowe i rozpuszczalne białka o strukturze monomeru.

Bardzo pomocnym w badaniu białek G okazała się wrażliwość wielu z nich na toksyny bakteryjne. Otóż aktywatorem niektórych białek G jest toksyna cholery (Gs), natomiast inhibitorem innych toksyna krztusćca (Gi). Toksyny powodują ADP-rybozylację białka G i odpowiednio stymulację lub inhibicję aktywności GTP-azowej. Tak więc procesy, które są modulowane przez jedną z tych toksyn zachodzą z udziałem określonych białek G [7,19]. Inną techniką pomocną w wielu badaniach jest stosowanie specyficznych przeciwciał. Końcowym potwierdzeniem udziału białka G w określonym procesie jest rekonstrukcja aktywnego układu przekazującego sygnał. Rekonstrukcja może być prowadzona przez fuzję odpowiednio dobranych zmutowanych komórek selektywnie pozbawionych pojedynczych składników układu lub przez odtworzenie w sztucznych błonach aktywnego układu z jego poszczególnych, uprzednio wyizolowanych elementów [13]. W ostatnich latach do rekonstrukcji używa się poszczególne białka lub ich fragmenty uzyskane z komórek owadzych, komórek

Escherichia coli lub innych, które uprzednio transfekowano wirusem z wbudowanym genem kodującym to białko [6].

W tabeli 1 podano przykłady czynników, które przekazują komórce sygnały z udziałem białek G [14]. Są to więc przede wszystkim hormony, neurohormony, prostaglandyny [4]], ale również substancje zapachowe i światło. W tabeli podano też przykładowo komórki docelowe, odbierające sygnał. W rzeczywistości białka G biorą udział w przenoszeniu sygnału nie tylko do tych, ale do wszystkich komórek w organizmie, jako że wszystkie komórki mają mechanizmy pozwalające na odebranie i przekształcenie informacji z otaczającego je środowiska. Istnieje szereg określonych efektorów, z którymi współdziałają białka G. Są nimi enzymy: cyklaza adenylanowa, fosfolipazy, kinazy receptorów i fosfodiesteraza cyklicznego GMP; są nimi także kanały jonowe. Wewnątrzkomórkowe zjawiska zachodzące pod wpływem sygnału zależą jednak nie tylko od efektora odbierającego sygnał, ale też i układu enzymów występujących w komórce i odbierających ten sygnał. Dlatego też np. stymulacja cyklazy adenylanowej prowadzi do innych zmian w komórce tarczycy przygotowanej do syntezy hormonów, a innych w komórkach wątroby przygotowanej do katabolizowania związków. W przenoszeniu sygnału przez błonę komórkową biorą udział różne białka G. Wszystkie zbudowane są z trzech podjednostek: α , β , γ . Każda z podjednostek syntetyzowana jest przez odrębny gen. Zidentyfikowano 17 genów kodujących podjednostkę α , 4 geny dla podjednostki β i 6 genów dla podjednostki γ [20]. Ponieważ aktywny trimer może powstać w wyniku połączenia produktów różnych genów, z wyliczeń wynika, że możliwe jest wytworzenie prawie 1000 różnych białek G. Wiadomo jednak, że tylko niektóre kombinacje podjednostek występują preferencyjnie. W hodowlach różnych linii komórkowych stwierdzono równoczesne występowanie w jednej komórce mRNA w ilości pozwalającej na wytworzenie prawie 100 różnych heterotrimerów [20]. Wydaje się także, że w trakcie przekazywania sygnału może nastąpić wymiana podjednostek. Tak więc ilość czynnych białek G jest bardzo duża. Niektóre z białek G występują we wszystkich komórkach, inne natomiast są charakterystyczne dla jednego rodzaju komórek np. komórek nerwowych, czy układu krwiotwórczego [7,20].

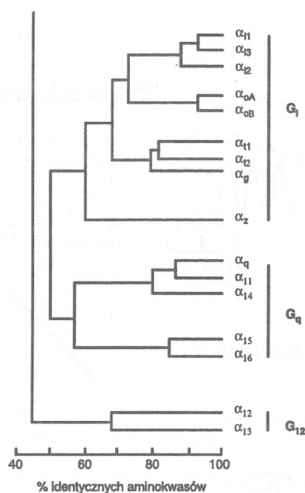
Pomimo istnienia pewnych różnic wszystkie podjednostki α , jak również β i γ cechuje duże podobieństwo budowy. Ze względu na podobieństwo w podjednostce α białka podzielono na 4 główne grupy: Gs, Gi, Gq i G₁₂, a w każdej z tych grup występuje szereg podgrup (rys. 1) [7,20]. Podział ten, oparty o budowę częściowo pokrywa się z podziałem funkcyjnym białek. Białka z grupy Gs współdziałają z cyklazą adenylanową i kanałami jonowymi, z grupy Gi z cyklazą, fosfodiesterazą i kanałami jonowymi, z grupy Gq z fosfolipazą C. Efektor dla białek z grupy G₁₂ nie jest znany. Aktywność GTP-azowa białek G jest związana z podjednostką α o masie cząsteczkowej 39–46 kDa i jest zlokalizowana w wewnętrznej części łańcucha białkowego [7]. W reakcji z receptorem aktywny jest C koniec podjednostki α , a w wiązaniu z kompleksem $\beta\gamma$ – N koniec [20]. Niektóre z podjednostek α mają w N

TABELA 1. Wybrane zjawiska fizjologiczne zachodzące z udziałem białek G (zmodyfikowane na podstawie [14])

Bodziec	Komórki docelowe	Białko G	Efektor	Wywołane zjawisko
Adrenalina, glukagon	komórki wątroby	Gs	cyklaza adenylanowa	rozkład glikogenu
Adrenalina, glukagon	komórki tłuszczowe	Gs	cyklaza adenylanowa	rozkład tłuszczu
Hormon luteinizujący	pęcherzyki jajnikowe	Gs	cyklaza adenylanowa	zwiększenie syntezy estrogenów i progesteronu
Hormon tyreotropowy	tarczyca	Gs	cyklaza adenylanowa	sekrecja T3 T4
Prostagandyna PG12	płytki krwi	Gs	cyklaza adenylanowa	przeciwdziałanie agregacji płytek krwi
Acetylocholina	komórki mięśnia sercowego	Gi	kanał potasowy	zwolnienie rytmu serca i zmniejszenie siły skurczów
Enkefaliny, endorfiny, opioidy	neurony mózgu	Gi	kanały wapniowe i potasowe, cyklaza adenylanowa	zmiana aktywności elektrycznej neuronów
Angiotensyna	komórki mięśni gładkich w naczyniach krwionośnych	Gq	fosfolipaza C	skurcz mięśni; wzrost ciśnienia krwi
Substancje zapachowe	komórki nerwowo-nabłonkowe w nosie	Gs	cyklaza adenylanowa	wykrywanie zapachów
Światło	pręciki i czopki w siatkówce	Gi	fosfodiesteraza cyklicznego GMP	odbieranie sygnałów wzrokowych

końcu dołączony kwas tłuszczowy, co wzmacnia jej wiązanie z kompleksem $\beta\gamma$, a także strukturami błonowymi. Podjednostka β o masie 37 kDa jest bardzo silnie związana z podjednostką γ , a w wiązaniu bierze udział N koniec. Najbardziej charakterystycznym w budowie podjednostki β jest wielokrotne powtórzenie sekwencji ok. 40 aminokwasów zawierających w części centralnej motyw Trp-Asp [9]. Podjednostka γ ma masę ok. 8 kDa [9]. Jest ona modyfikowana po translacji, a modyfikacja polega na dołączeniu 3 lub 4 reszt izoprenylu i karboksymetylacji cysteiny występującej na C końcu cząsteczki. Nadaje to podjednostce γ silnie hydrofobowy charakter i pozwala na zamocowanie jej i całego trimery w błonie komórkowej [10].

W stanie niepobudzonym wszystkie trzy podjednostki białka G są ściśle powiązane i dodatkowo podjednostka α wiąże silnie GDP (rys. 2). Receptor zaktywowany przez bodziec wpływa na białko G w ten sposób, że obniża powinowactwo podjednostki α do GDP. GDP jest uwalniane, a na jego miejsce wchodzi GTP. Pociąga to za sobą zmianę konformacyjną białka G, dysocjację na podjednostkę α i kompleks $\beta\gamma$, a w następstwie stymulację efektora. Przekazywanie sygnału kończy hydroliza GTP związanego z podjednostką α , co prowadzi do reasocjacji podjednostek. Utworzone trimeryczne białko G jest gotowe na przyjęcie następnego sygnału. Uwolniona podczas stymulacji podjednostka α odgrywa decydującą rolę w reakcji z efekтором. Jednakże nowsze prace, głównie z pracowni Gilmana przynoszą dowody na udział w



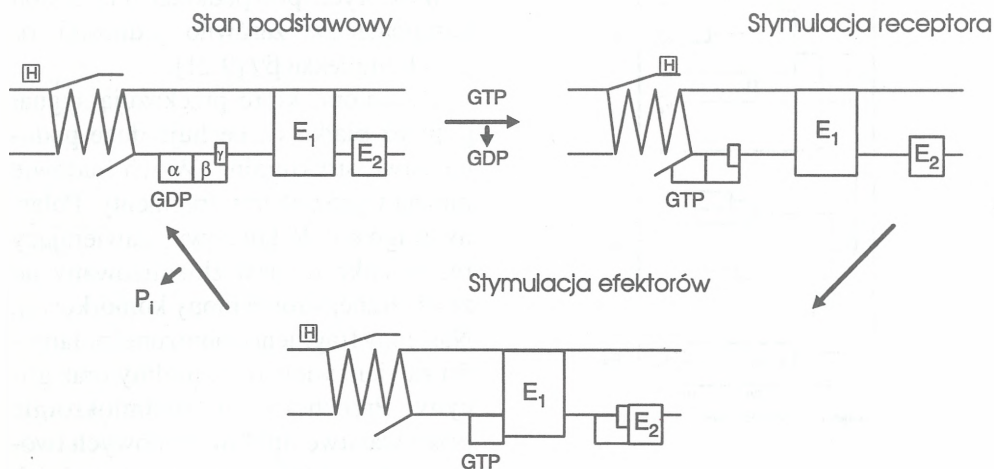
Rys. 1. Podobieństwo w budowie podjednostek α i podział białek G na grupy (zmodyfikowane, na podstawie [7,20])

tych reakcjach również kompleksu $\beta\gamma$, a w niektórych przypadkach udział obu komponentów zarówno jednostki α , jak i kompleksu $\beta\gamma$ [9,21].

Receptory, które przekazują sygnał poprzez białko G, cechuje duże podobieństwo strukturalne. W ich budowie można wyróżnić trzy fragmenty. Polarny fragment N końcowy, zawierający reszty cukrowe jest zlokalizowany po zewnętrznej stronie błony komórkowej. Następny fragment o obniżonej polarności zawiera wiele reszt proliny oraz glicyny. Przechodzi on siedmiokrotnie przez warstwę lipidów błonowych tworząc pętle zarówno po zewnętrznej, jak i po wewnętrznej stronie błony. Po stronie cytoplazmatycznej zlokalizowany jest fragment C końcowy. Sekwencje biorące udział w reakcji z białkiem G znajdują się w końcu C i na trzeciej pętli

cytoplazmatycznej. Ta pętla w różnych receptorach ma różną budowę, która prawdopodobnie warunkuje reakcję receptora z odpowiednim białkiem G. Na końcu C występują reszty seryny i treoniny, które łatwo ulegają fosforylacji. Wyróżnia się dwie grupy receptorów: do grupy A należą receptory wiążące czynniki drobnocząsteczkowe, np. katecholaminy [22], do grupy B należą np. receptory hormonów glikoproteinowych [15]. Receptory grupy A mają stosunkowo krótką pozabłonową część N końcową, a dla związania hormonu istotna jest konfiguracja fragmentów transmembranowych, tworzących rodzaj kieszeni. Receptory grupy B mają dłuższą część pozakomórkową i prawdopodobnie wyłącznie ta część bierze udział w wiązaniu hormonu.

Aktywowany receptor może stymulować wiele cząsteczek białka G, w wyniku czego sygnał ulega wzmocnieniu. Jednak istnieje mechanizm wyłączający przekazywanie sygnału. Zmiany konformacyjne w receptorze wywołane przez dołączenie czynnika stymulującego są zauważane nie tylko przez białko G. Opisano kinazy cytoplazmatyczne, które przenoszą fosforan na cząsteczkę receptorów. Ich cechą charakterystyczną jest zdolność fosforylacji jedynie receptora w formie aktywnej. Te z kinaz, które współdziałają z białkiem G, nazwano "kinazami receptorów powiązanych z białkiem G" (GRK). Fosforylacja wymaga transportu kinazy z cytoplazmy do błony komórkowej, enzym musi więc nabyć cechy hydrofobowe. Kinaza fosforylująca receptory β adrenergiczne nabywa te cechy przez połączenie się z zakotwiczonym



Rys 2. Przekazywanie sygnału z udziałem białka G: receptor zaktywowany przez hormon (H) przekazuje aktywację na białko G, w wyniku czego następuje odłączenie GDP z podjednostki α i dołączenie GTP; następnie białko G rozpada na podjednostkę α i kompleks $\beta\gamma$, aktywujące efekторы (E_1 i E_2); hydroliza GTP kończy przekazywanie sygnału i układ wraca do stanu podstawowego (zmodyfikowane, wg [7])

w błonie, uwolnionym podczas aktywacji kompleksem $\beta\gamma$ białka G. Po dołączeniu fosforanu receptor β adrenergiczny łączy białko o angielskiej nazwie β *arrestin*, co uniemożliwia dalsze przekazywanie sygnału [12]. Proces fosforylacji receptorów powoduje specyficzne cofnięcie wrażliwości na hormon, czyli angielskie *desensitisation*, a więc jest rodzajem mechanizmu obronnego, dzięki któremu komórka nie jest stymulowana przy nadmiernym bodźcu [22]. Cofnięcie wrażliwości w wyniku aktywności kinazy zależnej od c-AMP i białek G zachodzi przy niskich stężeniach katecholamin, a kinazy niezależnej od c-AMP przy stężeniach 100-krotnie wyższych. Tak więc jako pierwszy jest inaktywowany układ, który przekazał sygnał, czyli spełnił swoje zadanie.

Kinazy receptorów powiązane z białkiem G są jednym z efektorów, na które przenoszony jest sygnał za pośrednictwem kompleksu $\beta\gamma$. Jak są stymulowane inne efekторы? Pierwszym z opisanych efektorów była wspomniana już cyklaza adenylanowa. Występuje ona powszechnie w błonach komórek i dotychczas opisano 5 różnych izoform tego enzymu. Wszystkie te izoformy mogą być stymulowane przez podjednostkę α białka G_s [7]. Skutkiem działania wielu hormonów jest hamowanie cyklazy adenylanowej. Wrażliwość tej reakcji na toksynę krztuśca wskazuje na udział białek G_i . Jednakże *in vitro* izolowana z G_i podjednostka α nie wpływa na aktywność cyklazy. Wysłunięto więc koncepcję, że aktywny jest kompleks $\beta\gamma$. Reakcja

ta może być pośrednia i polegać na blokowaniu przez ten kompleks podjednostki α z białka Gs, albo też jest bezpośrednia. Bezpośrednie hamowanie wykazano dotychczas dla zależnej od kalmoduliny cyklazy w komórkach mózgu [9].

Następnym efektozem odbierającym sygnał z udziałem białek G są kanały jonowe [17]. Istnieją tu dwa główne mechanizmy regulujące przepływ przez kanały jonowe. Pierwszy to bezpośrednia interakcja kanału jonowego z białkiem G, a drugi to fosforylacja kanałów przez odpowiednie kinazy zależne od białka G. Bezpośrednie powiązanie białek G i kanałów jonowych wykazano dla tkanek pochodzenia endokrynnego, nerwowego, mięśni szkieletowych i serca. W komórkach serca np. wykazano, że w przekazywaniu bodźca na kanał wapniowy i sodowy bierze udział podjednostka α , ta sama, która *in vitro* stymuluje cyklazę, czyli pochodząca z białka Gs. Jej wpływ na kanał wapniowy jest stymulujący, natomiast na kanał sodowy hamujący [7]. Wiele kontrowersji wywoływał mechanizm stymulacji kanałów potasowych w sercu. Występują tam dwa kanały potasowe aktywowane przez białka Gi: kanał zależny od muskarynowych receptorów acetylocholino i kanał zależny od ATP. Efekt aktywacji obu tych kanałów jest różny: zwolnienie bicia serca i przewodnictwa przedsionkowo komorowego zależne jest od acetylocholino, natomiast skrócenie potencjału czynnościowego serca w zawale zależne jest od ATP. Różny jest też mechanizm aktywacji tych kanałów: kanał zależny od acetylocholino jest stymulowany przez kompleks $\beta\gamma$, a w aktywacji kanału zależnego od ATP bierze udział podjednostka α [11].

Wiele hormonów neurotransmiterów, eikozanoidów i czynników wzrostu wywołuje swój efekt poprzez aktywację izoenzymów fosfolipazy C. Enzym ten powoduje hydrolizę błonowego fosfolipidu, fosfatydyloinozytolu na diacyloglicerol, który pozostaje w błonie i aktywuje kinazę C i inozytolo-1,4,5-trifosforan (*trifosfoinozytol*). Trifosfoinozytol jest wiązany przez specyficzne receptory w siateczce śródbłonkowej magazynującej Ca^{++} . Cztery monomery białka receptorowego tworzą kanał jonowy, który otwiera się po dołączeniu trifosfoinozytolu, co powoduje wzrost poziomu Ca^{++} w cytoplazmie. Istnieją dwa podstawowe mechanizmy, za pomocą których hormony i inne czynniki stymulują hydrolizę fosfatydyloinozytolu, przy czym tylko jeden zależny jest od białek G zaktywowanych przez typowe, uprzednio opisane receptory. Wykazano że białka G stymulujące hydrolizę fosfatydyloinozytolu należą do grupy Gq, a sygnał jest w tym przypadku przekazywany za pośrednictwem podjednostki α . Przykładowo w komórkach tarczycy ten sam zaktywowany receptor przenosi sygnał na białko Gs i stymuluje cyklazę adenylanową oraz na białko Gq i w tym przypadku dochodzi do stymulacji fosfolipazy C [2]. Jednakże nie jest tak we wszystkich komórkach, gdyż np. w hodowli hepatocytów i erytrocytów nie udało się odtworzyć aktywnego układu z użyciem podjednostki α białka Gq. Aktywację uzyskano natomiast w obecności stosunkowo dużych stężeń kompleksu $\beta\gamma$. Nie wiadomo, z jakiego białka G pochodzi ten kompleks. Postuluje się tu możliwość reakcji z udziałem białek Gi, gdyż w niektórych warunkach reakcja hamowana jest przez toksynę krztuśca, a

ponadto białko Gi występuje w komórkach w większych stężeniach niż białko Gq [3,6].

Druga droga stymulacji fosfolipazy C jest już niezależna od białka G i zachodzi z udziałem kinazy tyrozynowej. Tą drogą przenoszony jest sygnał np. przez czynniki wzrostu.

Jednym z transmitterów wewnątrzkomórkowych odbierających i przekazujących dalej sygnał z kinazy tyrozynowej jest białko ras o aktywności GTP-azy. Białko to należy do drugiej rodziny białek wiążących i hydrolizujących nukleotydy guanylowe do monomerycznych białek niskocząsteczkowych określanych jako "małe". Ze względu na znaczne podobieństwo budowy tych białek do budowy związku kodowanego przez protoonkogen p21^{ras}, białka te nazywa się czasem "rodziną białek G pokrewnych z ras". Stwierdzono, że w wielu komórkach nowotworowych białka te ulegają częstym mutacjom. Z tego też względu muszą one odgrywać jakąś rolę w procesie nowotworzenia. Niskocząsteczkowe białka wiążące GTP wykryto prawie we wszystkich rodzajach tkanek. Wiele komórek ma po kilkanaście różnych takich białek, a zlokalizowano je zarówno we frakcji błon, jak i w cytoplazmie [5]. Każdy przedział wewnątrzkomórkowy ma swój określony komplet niskocząsteczkowych białek ras. W tabeli 2 podano przykłady lokalizacji tych białek [16]. W niskocząsteczkowych białkach monomerycznych sekwencje wiążące GTP są bardzo zbliżone do występujących w białkach trimerycznych. Również charakterystyczne jest występowanie, podobnie jak w białkach trimerycznych, apolarnego łańcucha izoprenyloвого zakotwiczonego te białka w błonie [10]. Najprawdopodobniej ewolucyjnie białka monomeryczne i heterotrimeryczne pochodzą z tych samych prekursorów. Opisano ponad 40 niskocząsteczkowych białek G. W oparciu o podobieństwo budowy można podzielić je na 4 grupy. Podobnie jak w przypadku białek heterotrimerycznych, podział ten w znacznej mierze odpowiada podziałowi opartemu na funkcji poszczególnych białek. Są to więc białka regulujące różnicowanie i wzrost komórek, regulujące organizację cytoszkieletu, biorące udział w transporcie poprzez błony wewnątrzkomórkowe, np. aparatu Golgiego czy błonę jądrową oraz biorące udział w procesie egzocytozy [10, 14, 16]. Ponadto stwierdzono, że niektóre białka z tej grupy powstają tylko w komórkach zainfekowanych wirusem i mogą pełnić funkcje obronne. Wydaje się, że opracowanie mechanizmów zachodzących z udziałem niskocząsteczkowych białek wiążących GTP mogłoby być bardzo dobrym tematem na następną nagrodę Nobla.

TABELA 2. Przykłady niskocząsteczkowych białek wiążących GTP i ich wewnątrzkomórkowej lokalizacji

Białko	Frakcja, w której występuje
rab 1 (YPT 1)	siateczka śród błonkowa, aparat Golgiego
rab 3A	pęcherzyki sekrecyjne
rab 5	wczesne endozomy, błony plazmatyczne
rab 7	późne endozomy
SEC 4	pęcherzyki sekrecyjne
ARF	aparat Golgiego, cytozol
SAR 1	siateczka śród błonkowa

LITERATURA

- [1] ADLER G. Udział białek wiążących nukleotydy guanylowe w hormonalnej regulacji cykazy adenylowej. *Postępy Biochem* 1982; **28**: 413–432.
- [2] ALLGEIER A, OFFERMANN S, van SANDE J, SPICHER K, SCHULTZ G, DUMONT JE. The human thyrotropin receptor activates G-proteins Gs and Gq/11. *J Biol Chem* 1994; **269**: 13733–13735.
- [3] BOYER JL, PATERSON A, HARDEN TK. G-protein mediated regulation of phospholipase C. *Trends Cardiovasc Med* 1994; **4**: 88–94.
- [4] BRASS LF, MANNING DR. G-proteins and low molecular weight GTP binding proteins in platelets. *Trends Cardiovasc Med* 1991; **1**: 92–98.
- [5] BURGOYNE RD. Small GTP-binding proteins. *Trends Biochem Sci* 1989; **14**: 394–396.
- [6] EXTON JH. Phosphoinositide phospholipases and G proteins in hormone action. *Annu Rev Physiol* 1994; **56**: 349–369.
- [7] HELPER JR, GILMAN AG. G Proteins. *Trends Biochem Sci* 1992; **17**: 383–387.
- [8] HOWLETT RC, GILMAN AG. Hydrodynamic properties of the regulatory component of adenylate cyclase. *J Biol Chem* 1980; **255**: 2861–2866.
- [9] INIGUEZ-LLUHI J, KLEUSS C, GILMAN AG. The importance of G-protein β subunits. *Trends Cell Biol* 1993; **3**: 230–235.
- [10] KINSELLA T, O'MAHONY D. Lipid modification of G proteins. *Trends Cardiovasc Med* 1994; **4**: 27–33.
- [11] KURACHI Y. G-protein control of cardiac potassium channels. *Trends Cardiovasc Med* 1994; **4**: 64–69.
- [12] LEFKOWITZ RJ. G protein-coupled receptor kinases. *Cell* 1993; **74**: 409–412.
- [13] MOORE MS, BLOBEL G. A G protein involved in nucleocytoplasmic transport: the role of Ran. *Trends Biochem Sci* 1994; **19**: 211–216.
- [14] LINDER ME, GILMAN AG, Białka G. *Świat Nauki* 1992; **9**: 42–50.
- [15] NAGAYAMA Y, RAPOPORT B. The thyrotropin receptor 25 years after its discovery: new insight after its molecular cloning. *Molecular Endocrinol* 1992; **6**: 145–156.
- [16] PFEFFER SR. GTP-binding proteins in intracellular transport. *Trends Cell Biol* 1992; **2**: 41–45.
- [17] REUTER H, SIGEL E. Ionic channels: modulation by G proteins and by phosphorylation. *Current Opinion in Neurobiology* 1991; **1**: 27–31.
- [18] RODBELL M, BIRNBAUMER L, POHL S, KRANS MJ. The glucagon sensitive adenylate cyclase system in plasma membranes of rat liver. *J Biol Chem* 1971; **246**: 1877–1882.
- [19] ROSENTHAL W, KLEUSS Ch, ESCHELER J, WITTIG B, SCHULTZ G. Approaches to studying the interaction between G-proteins and voltage-dependent Ca^{2+} channels. [w] *Molecular and Cellular Biology of Pharmacological Targets*. New York: Glossman, Striessing, Plenum Press 1993: 141–161.
- [20] SIMON MI, STRATHMANN MP, GAUTAM N. Diversity of G proteins in signal transduction. *Science* 1991; **252**: 802–807.
- [21] TANG WJ, GILMAN AG. Type-specific regulation of adenylate cyclase by G protein β subunits. *Science* 1991; **254**: 1500–1503.
- [22] TAYLOR CW. The role of G proteins in transmembrane signalling. *Biochem J* 1990; **272**: 185–197.

Otrzymano: 16.01.1995 r.

Przyjęto: 15.03.1995 r.

Adres autora: Zakład Biochemii Klinicznej CMKP,
01-813 Warszawa, Marymoncka 99

CYTOGENETYKA MĘSKIEJ GAMETOGENEZY. CZEŚĆ 1. TRANSLOKACJE WZAJEMNE*

GAMETOGENESIS OF HUMAN MALE. I. RECIPROCAL TRANSLOCATION

Artur BARCZYK

Zakład Biologii i Genetyki Medycznej, Instytut Nauk Podstawowych, Wojskowa
Akademia Medyczna

Streszczenie: Artykuł omawia wpływ anomalii kariotypu somatycznego na przebieg mejozy u mężczyzn i następstwa tego zjawiska obserwowane w procesie rozrodu. Prezentuje on możliwości badania chromosomów na poszczególnych etapach gametogenezy, a także mechanizmy powstania zaburzeń w różnych typach translokacji wzajemnych. Praca wykorzystuje najnowsze dane pochodzące z badań prowadzonych w trakcie mejozy, badań plemników oraz badań pre- i postnatalnych.

Słowa kluczowe: mejoza, ludzkie chromosomy, aberracje chromosomowe, translokacje, segregacja chromosomów

Summary: This article discusses the influence of somatic karyotype anomalies on the course of meiosis in human male, and their consequences observed in reproduction. It presents the possibilities of chromosome investigations during gametogenesis, and also the mechanisms of disturbance arising in different types of reciprocal translocations. The latest data from meiotic and sperm surveys, prenatal and postnatal studies are reviewed.

Key words: meiosis, human chromosomes, chromosome aberrations, translocations, chromosome segregation

1. WSTĘP

Pierwsza połowa XX wieku to okres badań mających na celu zdobycie wiedzy o ludzkich chromosomach, w tym poznanie ich prawidłowej liczby. Trudności techniczne z uwidocznieniem chromosomów spowodowały, iż początkowo skrawki tkanki

*Dofinansowanie pracy: grant KBN 4 S 405 066 06.

jądrowej były jedynym materiałem do ich badania. Wprowadzenie w połowie lat pięćdziesiątych metod hodowli fibroblastów i limfocytów skoncentrowało badania cytogenetyczne na komórkach somatycznych. Obecnie badania chromosomów w przebiegu mejozy u człowieka są wykorzystywane głównie w przypadku męskiej niepłodności.

Materiał uzyskany drogą biopsji jądra zawiera trzy rodzaje komórek pozwalających na bezpośrednią obserwację chromosomów. Pierwszym z nich są dzielące się mitotyczne spermatogonie, o 46 chromosomach nieco przypominających te, które uzyskiwane są z hodowli limfocytów. Drugi to spermatocyty pierwszego rzędu, w trakcie profazy pierwszego podziału mejotycznego. W stadium pachytenu skoniugowane chromosomy przybierają postać długich splecionych nici. Później w stadiach diplotenu i diakinezy obecne są 24 bivalenty. Chromosomy autosomalne rozdzielają się z zachowaniem chiazmy i centromeru, co nadaje im kształt wielokrotnych ósemek, a chromosomy X i Y łączą się końcami tworząc bivalent płciowy, o kształcie liniowym. Ostatni rodzaj komórek to spermatocyty drugiego rzędu, gdzie chromosomy uwidaczniają się podczas metafazy II podziału mejotycznego. Jest ich 23, każdy złożony z 2 chromatyd silnie pofalowanych i pozwijanych, nie poddają się barwieniu prążkowemu [38].

Alternatywnym źródłem uzyskiwania chromosomów mejotycznych może być nasienie, zawierające pewną ilość niedojrzałych komórek płciowych. Metoda ich uzyskiwania jest szczególnie przydatna do badań mejozy u mężczyzny z oligozoospermia, u których odsetek złuszczonej spermatocytów jest szczególnie wysoki [82]. Jednak nie jest ona powszechnie stosowana.

Interesujące informacje mogło przynieść badanie chromosomów plemnikowych. Niestety chromosomów plemnika nie udało się jak dotąd uwidocznic przy zastosowaniu tradycyjnych metod cytogenetycznych. Również fuzja plemników z komórkami somatycznymi ani oddziaływanie wyciągiem z jaj płazów nie przyniosły zadowalających wyników. Rozwiązanie przyniosła metoda pozwalająca uzyskać wniknięcie obcogatunkowego plemnika do oocyta chomika [72]. Powoduje to dekondensację główki i wyodrębnienie chromosomów męskiego przedjądra, umożliwiając bezpośrednią ich analizę w trakcie pierwszego podziału zygoty-chimery. Modyfikacja tej metody wprowadzona do praktyki laboratoryjnej w latach osiemdziesiątych umożliwiła badanie chromosomów plemników ludzkich na większą skalę [4, 52, 75]. Ich analiza pozwala ocenić końcowy rezultat prawidłowej mejozy, jak również umożliwia poznanie wpływu czynników mogących ją zakłócać np. aberracje kariotypu, oddziaływanie mutagenów fizycznych i chemicznych.

Okazało się, że podział mejotyczny w znacznym odsetku komórek przebiega nieprawidłowo. Na podstawie analizy chromosomowej plemników pochodzących od zdrowych mężczyzn ustalono, że 10% plemników ma genom z aberracjami chromosomowymi. W materiale obejmującym ponad 12 000 kariotypów plemnikowych, blisko połowę wszystkich aberracji chromosomowych stanowi aneuploidia [58]. Wśród

kariotypów hiperploidalnych stwierdzono większy od oczekiwanego nadmiar chromosomów z grupy G i chromosomów płci. Wśród kariotypów hipoploidalnych ujawniono natomiast większy od oczekiwanego deficyt chromosomów z grup E, G i chromosomów płci. Opierając się na identyfikacji chromosomów metodami prążkowymi stwierdzono, zgodnie z oczekiwaniami, wysoką częstość nondysjunkcji mejozytycznej dla chromosomów 18, 21, 22, X i Y, zaskakująco wysoką dla chromosomu 1, a niespodziewanie niską dla chromosomu 13. Drugi typ powstających *de novo* błędów w mejozie to aberracje strukturalne, obecne w nieco ponad 5 % plemników. Najczęstsze wśród nich to złamania chromosomowe i fragmenty acentryczne. Obok nich występują translokacje, chromosomy dicentryczne, delecje terminalne i izochromosomy, a w pojedynczych przypadkach liczne i złożone aberracje uniemożliwiające określenie kariotypu [9].

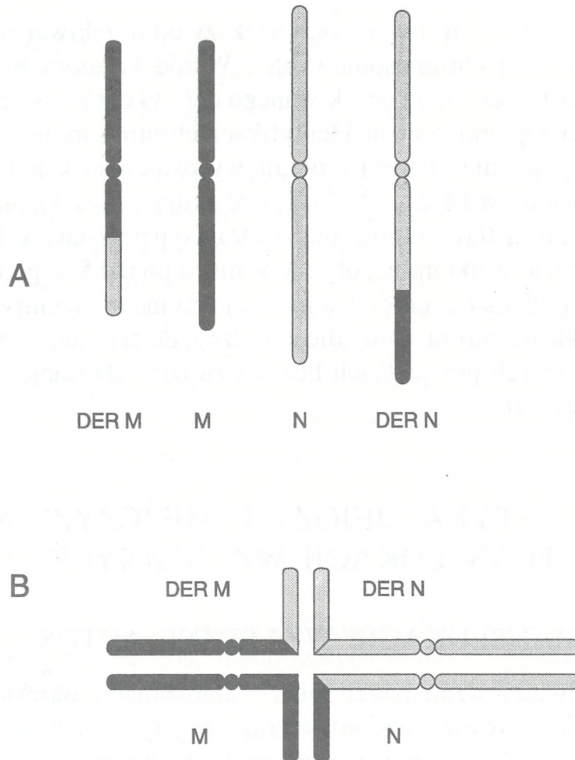
2. CYTOGENETYKA MEJOZY U MĘŻCZYZN-NOSICIELI TRANSLOKACJI WZAJEMNYCH

2. 1. TRANSLOKACJE WZAJEMNE AUTOSOMÓW

Nosiciele translokacji wzajemnych między autosomami, określonych w badaniu cytogenetycznym jako zrównoważone (rys. 1a), z reguły nie wykazują żadnych zmian w fenotypie. W materiale z biopsji jąder na ogół nie stwierdza się znaczących różnic w budowie histologicznej ani w aktywności gametogenetycznej w stosunku do płodnych mężczyzn o prawidłowym kariotypie [17, 28]. Liczba plemników w ejakulacie jest zwykle nieco niższa, ale mieści się powyżej dolnej granicy normy [51, 60]. Większość nosicieli takich aberracji jest płodnych, a aberrację rozpoznaje się najczęściej dopiero po urodzeniu dziecka z zespołem wad, spowodowanych odziedziczeniem translokacji w postaci niezrównoważonej [22, 29].

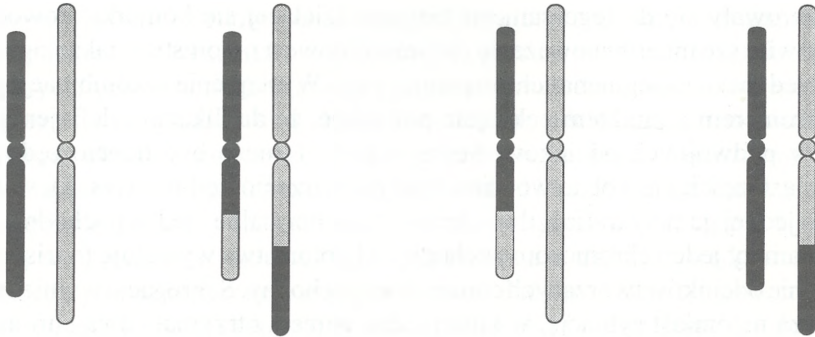
W tej grupie mężczyzn ryzyko związane z rozrodem jest podwyższone na skutek zaburzenia procesów wzajemnego oddziaływania chromosomów w I podziale mejozytycznym. Parowanie odcinków homologicznych powoduje powstanie w pachytenie (P 1) struktury złożonej z 4 chromosomów, zwanej kwadriwalentem (tetrawalentem), o kształcie mniej lub bardziej regularnego krzyża (rys. 1b). Chromosomy mejozytyczne obserwowane w późniejszych fazach podziału (M 1) układają się w 21 biwalentów i jeden kwadriwalent MI 22, XY, IVC(M; N). Po rozdzieleniu chromosomów kwadriwalent przybiera kształt pierścienia lub łańcucha, zależnie od położenia punktów pęknięć i wytworzonych chiazm. Liczba chiazm w kwadriwalencie jest pozytywnie skorelowana z długością jego poszczególnych ramion, a ogólna ich suma w komórce jest zbliżona do obserwowanej u normalnych mężczyzn.

Rozejście chromosomów tworzących kwadriwalent podczas anafazy I podziału jest bardziej skomplikowane od typowej segregacji biwalentów; do dwóch komórek



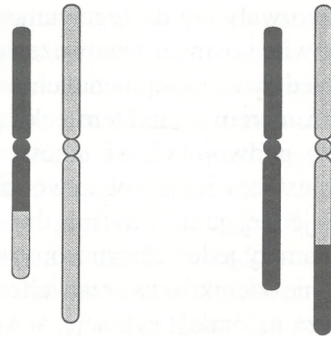
Rys. 1. Chromosomy u nosiciela translokacji wzajemnej 46, XY, t(M; N): A – chromosomy w komórce somatycznej: M, N – przykładowe chromosomy normalne; der M, der N – przykładowe chromosomy pochodne (fragment centryczny i fragment translokowany); B – kwadriwalent pachytenowy utworzony z tych chromosomów

potomnych mogą trafić chromosomy w proporcjach: 2 : 2, 3 : 1 lub 4 : 0. W obrębie segregacji 2:2 wyróżniamy segregację naprzemienną, przyległą 1 i przyległą 2. O segregacji naprzemiennej (rys. 2) mówimy wtedy, gdy do jednej gamety trafiają 2 normalne chromosomy, a do drugiej ich homologi, które uległy translokacji. Zapłodnienie takimi gametami prowadzi do prawidłowego kariotypu w pierwszym przypadku oraz nosicielstwa translokacji zrównoważonej w drugim. W wyniku segregacji przyległej 1 (niehomologicznej, łącznej) (rys. 3) do każdej gamety przechodzi jeden chromosom normalny i jeden pochodny, którego większy fragment zawierający centromer pochodzi z drugiej pary chromosomów objętych translokacją. Oznacza to, że centromery chromosomów homologicznych rozeszły się do przeciwnych biegunów dzielącej się komórki. Powoduje to niewielkie niezrównoważenie chromosomowe u potomstwa (duplikacja i deficycja) ograniczone do pojedynczego segmentu chromosomowego. Wystąpienie rekombinacji pomiędzy centromerem a punktem pęknięcia powoduje, że jej produkty stają się morfologicznie nieodróżnialne od



A **B**

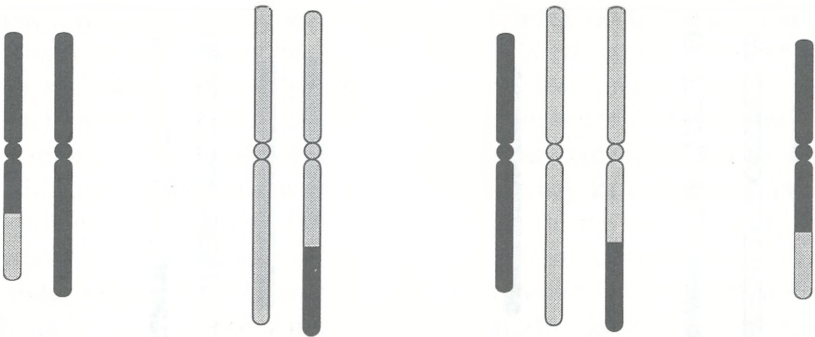
Rys. 2. Segregacja naprzemienna – chromosomy par objętych translokacją: A – z komórki o kariotypie 23, X lub Y; B – z komórki o kariotypie 23, Y lub X, -M, -N, + der (M), +der (N)



A **B**

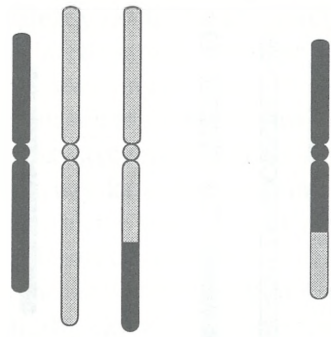
Rys. 3. Segregacja przyległa 1 – chromosomy par objętych translokacją: A – z komórki o kariotypie 23, X lub Y, -M, +der (M); B – z komórki o kariotypie 23, Y lub X, -N, +der (N)

segregacji naprzemiennej. Z kolei segregacja przyległa 2 (homologiczna, rozłączna) (rys. 4) ma miejsce wtedy, gdy do każdej gamety trafia jeden chromosom normalny i jeden pochodny, którego większy fragment zawierający centromer, pochodzi z tej samej pary chromosomów. W tym wypadku centromery chromosomów homologicz-



A **B**

Rys. 4. Segregacja przyległa 2 – chromosomy par objętych translokacją: A – z komórki o kariotypie 23, X lub Y, -N, +der (M); B – z komórki o kariotypie 23, X lub Y, -M, +der (N)

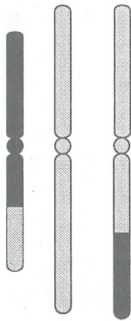


A **B**

Rys. 5. Segregacja 3 : 1 trzyciorzędowa – chromosomy par objętych translokacją: A – z komórki o kariotypie 24, X lub Y, +der (N); B – z komórki o kariotypie 22, Y lub X, -M, -N, +der (M) [inna możliwość niż przedstawiona na rycinie: 24, X lub Y, +der (M) i 22, Y lub X, -M, -N, +der (N)]

nych skierowały się do tego samego bieguna dzielącej się komórki. Powoduje to znacznie większe niezrównoważenie chromosomowe u potomstwa, także ograniczone do pojedynczego segmentu chromosomowego. Wystąpienie rekombinacji pomiędzy centromerem a punktem pęknięcia powoduje, że duplikacja i deficycja będą dotyczyły podwójnych odcinków. Segregacja 3: 1 może być trzeciorzędowa lub wymienna. Częściej jest obserwowana segregacja trzeciorzędowa (rys. 5), w wyniku której do jednej gamety trafiają dwa chromosomy normalne i jeden pochodny, zaś do drugiej gamety jeden chromosom pochodny. U potomstwa wywołuje to trisomię lub monosomię odcinków tworzących chromosom pochodny. Segregacja wymienna (rys. 6) oznacza natomiast sytuację, w której jedna gameta otrzymała dwa chromosomy pochodne i jeden normalny, a druga tylko jeden chromosom normalny. Powoduje to wystąpienie u potomstwa trisomii lub monosomii pojedynczego chromosomu. Rekombinacja między centromerem a punktem pęknięcia dodatkowo zwiększa liczbę potencjalnych kariotypów, chociaż ich powstanie można również wytłumaczyć nondysjunkcją chromatyd w anafazie II podziału mejotycznego. Typ segregacji 4: 0 (rys. 7) jest teoretycznie możliwy, jednak dotychczas nie był obserwowany ani w badaniach żywo urodzonych dzieci, ani poronieniach samoistnych i diagnostyce prenatalnej.

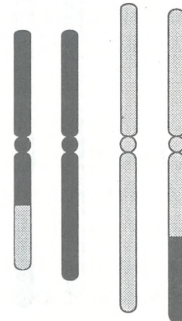
Początkowe obserwacje potomstwa nosicieli pozwoliły stwierdzić, że dla danej translokacji oprócz segregacji naprzemiennej pojawia się zasadniczo tylko jeden typ segregacji niezrównoważonej. Zestawienie konfiguracji kwadriwalentu pachytenowego w obserwowanych translokacjach pozwoliło określić specyficzne cechy translokacji predestynujące ją do określonego typu niezrównoważenia [39, 48]. W następstwie tego powstał model pozwalający na przewidywanie najbardziej prawdo-



A



B



A

B

Rys. 6. Segregacja 3 : 1 wymienna – chromosomy par objętych translokacją: A – z komórki o kariotypie 24, X lub Y, -M, +der (M); +der (N); B – z komórki o kariotypie 22, Y lub X, -N [inna możliwość niż przedstawiona na rycinie: 24, X lub Y, +der (N) i 22, Y lub X, -M, -N, +der (M)]

Rys. 7. Segregacja 4 : 0 – chromosomy par objętych translokacją: A – z komórki o kariotypie 25, X lub Y, +der (M), +der (N); B – z komórki o kariotypie 21, Y lub X, -M, -N

podobnego typu niezrównoważonej segregacji mejotycznej dla danej translokacji o znanych punktach pęknięcia chromosomów, w oparciu o nierówne długości fragmentów centrycznych i translokowanych [40, 41]. Linia segregacji przebiega między najdłuższymi i najuboższymi w heterochromatynę odcinkami kwadriwalentu, co powoduje, że obserwowane niezrównoważenie jest najmniejsze z możliwych. Proces selekcji mający miejsce podczas ciąży dodatkowo różnicuje ryzyko między poszczególnymi translokacjami: wielkość niezrównoważonego odcinka i zawarte w nim geny decydują o poronieniach samoistnych lub urodzenia dzieci z wadami. Dziś już wiadomo, że pewne nieliczne translokacje mogą dać dwa różne typy niezrównoważenia (przyległa 1 i 3: 1) oraz że nie wszystkie czynniki predysponujące do określonego typu niezrównoważenia potwierdziły się w obserwacjach dokonanych na liczniejszej grupie rodzin z translokacjami. Badania cytogenetyczne materiału z poronień i diagnostyki prenatalnej dowiodły ponadto, że nosiciel translokacji produkuje różne typy niezrównoważonych gamet, a mechanizmy selekcji w czasie ciąży eliminują zarodki i płody o niezrównoważeniu powyżej 2,5% monosomii lub powyżej 4% trisomii genomu haploidalnego [15, 41].

Heterozygotyczni nosiciele translokacji wzajemnych byli jedną z pierwszych grup ryzyka genetycznego, w której zastosowano badanie chromosomów plemnikowych metodą penetracji oocytów chemicznych. Do tej pory poddano analizie ponad 3700 kariotypów plemnikowych, pochodzących od 28 nosicieli pojedynczych translokacji wzajemnych (tab. 1). Obserwowane u danego nosiciela proporcje między kariotypami plemnikowymi, pochodzącymi z poszczególnych typów segregacji mejotycznej, tworzą tzw. wzór segregacji. Rezultaty początkowych badań wskazywały na to, że każda translokacja ma swój własny wzór segregacji, zależny od uczestniczących w niej chromosomów [65]. W tym wypadku wszyscy nosiciele tej samej translokacji powinni mieć ten sam wzór. Jednak badanie dwóch spokrewnionych nosicieli tej samej translokacji pozwoliło stwierdzić, że ich wzory segregacji nie były co prawda identyczne, ale też nie wykazywały różnic znamiennej statystycznie [27]. Taki sam wynik przyniosło porównanie wzorów innych translokacji, uzyskanych na podstawie analizy co najmniej 90 kariotypów. Może to sugerować istnienie wzoru segregacji wspólnego dla wszystkich translokacji wzajemnych, niezależnie od tego, które chromosomy uległy przszeregowaniu. Różnice między dotychczasowymi badaniami miałyby więc charakter losowy, uzależniony głównie od liczby uzyskanych kariotypów plemnikowych (w dotychczasowych doniesieniach od 13 do 548 sztuk).

Wzór segregacji mejotycznej, jaki uzyskuje się na podstawie zsumowania aktualnych danych, ma następujące wartości: segregacja naprzemienna – 45,4% (SD $\pm 13,3\%$), w tym kariotypy normalne – 25,5% ($\pm 9,48$) i zrównoważone – 19,8% ($\pm 7,0\%$), kariotypy niezrównoważone – 54,6% ($\pm 13,0\%$) w tym segregacja przyległa 1 – 38,2% ($\pm 10,5\%$), segregacja przyległa 2 – 11,5% ($\pm 9,0\%$), segregacja 3: 1 – 4,8% ($\pm 7,4\%$). Segregacji typu 4 : 0 nie stwierdza się, natomiast dokonanie się rekombi-

TABELA 1. Wyniki badania kariotypów plemnikowych u nosicieli translokacji wzajemnych

Autor	Aberracja	Segregacja [%]				Liczba kariotypów
		N	P 1	P 2	3 : 1	
Barczyk [5]	t (1; 7)	46,2	45,3	5,1	3,4	117
Balkan [6]	t (5; 18)	80,6	16,1	–	3,3	31
Balkan [6]	t (6; 14)	68,4	31,6	–	–	19
Brandriff [8]	t (8; 15)	37,2	38,1	21,2	3,5	226
Brandriff [8]	t (3; 16)	37,3	41,3	16,4	5,0	201
Estop [27]	t (1; 4)	46,1	38,3	6,9	8,7	115
Estop [27]	t (1; 4)	38,9	50,0	7,8	3,3	90
Jenderny [42]	t (2; 17)	56,0	33,0	11,0	–	18
Jenderny [42]	t (3; 8)	34,2	43,8	20,5	1,4	73
Martin [53]	t (11; 22)	23,1	38,5	23,1	15,4	13
Martin [54]	t (9; 10)	40,5	48,2	5,4	5,9	168
Martin [55]	t (1; 9)	45,7	37,6	13,3	3,5	173
Martin [55]	t (16; 19)	39,5	27,9	31,4	1,2	172
Martin [56]	t (2; 9)	43,3	28,4	24,1	4,3	208
Martin [56]	t (4; 6)	45,6	51,9	1,9	0,6	158
Martin [56]	t (7; 14)	52,6	31,6	15,8	–	19
Martin [57]	t (12; 20)	46,8	41,6	9,7	1,8	113
Martin [59]	t (7; 20)	38,4	39,9	16,3	5,3	263
Martin [59]	t (3; 11)	47,7	45,8	5,7	0,8	262
Martin [59]	t (15; 22)	34,0	39,5	22,4	4,1	147
Pellestor [65]	t (4; 17)	56,7	35,0	6,4	1,6	60
Pellestor [65]	t (5; 13)	77,2	21,1	1,7	–	57
Pellestor [65]	t (6; 7)	51,2	48,8	–	–	84
Pellestor [65]	t (9; 18)	34,2	63,4	–	2,4	82
Spriggs [78]	t (11; 17)	38,6	32,1	26,6	2,7	184
Spriggs [78]	t (1; 11)	33,2	42,9	15,9	8,0	548
Templado [83]	t (2; 5)		73,3*	5,3	21,3	75
Templado [84]	t (1; 2)	41,0	41,9	5,7	11,4	105

Typy segregacji: N – naprzemienna; P 1 – przyległa 1; P 2 – przyległa 2; * – niektóre kariotypy pochodzące z segregacji naprzemiennej i przyległej 1 były nie do odróżnienia

nacji mejotycznej można dowieść tylko w pojedynczych komórkach. Ostateczne wyjaśnienie problemu wzoru wymaga dalszych badań.

Wzór segregacji mejotycznej u nosicieli t (1;11) został poddany weryfikacji przy zastosowaniu trzech różnych metod badawczych: analizy chromosomów mejotycznych [34], dekondensowanych *in vitro* jąder plemnikowych barwionych metodą fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ* (FISH) [79] oraz analizy prążkowej chromosomów plemnikowych po penetracji oocytów chemicznych [78]. Mimo iż rozróżnienie niektórych typów segregacji było niemożliwe, uzyskano zadziwiająco zgodne wyniki. Segregacja naprzemienna i przyległa 1 (kolejno w 3 wymienionych metodach badawczych) – 77,5; 82,5 i 76,1%, segregacja przyległa 2 – 13,75; 8,3 i 15,9%, segregacja 3 : 1 – 8,75, 9,2 i 8,0%. Oznaczają one, że niezależnie od metody badawczej wzór segregacji jest stały u danego nosiciela, a ponadto iż selekcja komórek ze względu na

zawartość materiału genetycznego ma miejsce dopiero po zakończeniu gametogenezy.

Badaniu FISH poddano też materiał z biopsji jądra nosiciela $t(15;20)$. Liczba chiazm była obniżona, natomiast wzrósł odsetek komórek, w których miała miejsce rekombinacja. To może tłumaczyć uzyskanie nieco odmiennego wzoru: segregacja naprzemienna – 14,5%, segregacja przyległa 1 – 16,2%, segregacja naprzemienna lub przyległa 1 z rekombinacją – 27,4%, segregacja przyległa 2 – 39,3%, segregacja 3 : 1 – 1,7%, segregacja 4 : 0 – 0,9%. Odnotowano tu pierwszą i jak dotąd jedyną obserwację segregacji 4 : 0 [33].

Wcześniejsze badania w rodzinach nosicieli translokacji wzajemnych wskazywały na możliwość częstszego występowania aneuploidii u ich potomstwa. Tłumaczono to znaczącym wpływem aberracji na podział mejotyczny, prowadzącym w konsekwencji do nondysjunkcji innych chromosomów. Zjawisko to nazwano efektem międzychromosomowym. Jak dotąd w żadnym z badań chromosomów plemnikowych nie stwierdzono podwyższenia odsetka aneuploidalnych plemników, a zatem istnienie efektu nie zostało potwierdzone. Ostatnie badania cytogenetyczne i molekularne prowadzone w rodzinach z aberracjami chromosomowymi negują jego istnienie [74].

Jednoczesna obecność dwóch niezależnych translokacji wzajemnych jest u człowieka niezmiernie rzadka. W dostępnej literaturze brak danych o przebiegu mejozy i gametogenezy u nosicieli takiej anomalii. Tym niemniej poddano analizie chromosomów plemnikowych mężczyznę będącego podwójną heterozygotą $46,XY,t(5p;11q),t(7q;14q)$. Translokacje segregowały niezależnie, ale uzyskany wzór różnił się od obserwowanego u pojedynczych heterozygot : segregacja podwójnie naprzemienna – 13,7%, segregacja naprzemienna i przyległa 1 – 56,5%, segregacja przyległa 2 – 0%, segregacja 3 : 1 – 26,0%, segregacja 4 : 0 – 4,3%. Wysoki odsetek kariotypów nie zrównoważonych (86,3%) i obecność segregacji 4 : 0 tłumaczy się zarówno większym zaburzeniem przebiegu mejozy w obecności dwóch kwadriwalentów, jak i niewielką liczbą analizowanych kariotypów (tylko 23 plemniki) [10].

2.2. CYTOGENETYKA MEJOZY U MĘŻCZYŹN Z ABERRACJAMI CHROMOSOMÓW PŁCI

2.2.1. TRANSLOKACJE CHROMOSOMU X

Translokacje wzajemne X – autosom są znacznie rzadsze od poprzednio opisanych. Większość nosicieli stanowią kobiety z pierwotnym lub wtórnym brakiem miesiączki. Jest to związane z uszkodzeniem tzw. regionu krytycznego X ($q13; q26-28$), powodującym niedorozwój jajników i wtórnych cech płciowych; w pozostałych przypadkach kobiety nie wykazują zmian fenotypowych i są płodne [17]. Mężczyźni są rozpoznawani w trakcie badań rodzinnych lub z powodu bezpłodności.

W literaturze opisano 13 przypadków dorosłych nosicieli translokacji X - autosom, jednak biopsji tkanki jądrowej dokonano tylko u 5 z nich (tab. 2). We wszystkich przypadkach stwierdzono zahamowanie spermatogenezy na etapie spermatocytu I rzędu, z przeważającą liczbą komórek w stadium pachytenu. Teoria sformułowana przez Lifschytza i Lindsleya [47] zakłada inaktywację chromosomu X w spermatocytach jako czynnika niezbędnego do prawidłowego przebiegu spermatogenezy u *Drosophila*. Zahamowanie mejozy w takich przypadkach jest tłumaczone zakłóceniem jego inaktywacji, spowodowanym obecnością fragmentu autosomalnego. W spermatocytach opisywanych mężczyzn stwierdzono wyraźnie zaburzenia w formowaniu pęcherzyka płciowego, co potwierdza słuszność tej teorii i również u człowieka. W nielicznych metafazach obserwowano obecność kwadriwalentu łańcuchowego, złożonego z chromosomów Y, pochodnego X, pochodnego autosomu i jego normalnego homologu [25, 28, 67].

Autosomy zaangażowane w dotychczas obserwowane translokacje należały do grup A, B i C (nr 1, 2, 3, 5, 7, 12) oraz D i G (nr 14, 15, 21, 22). Punkty pęknięcia chromosomu X były zlokalizowane przeważnie na ramieniu długim, każdorazowo dotyczyły one izolowanego przypadku bezpłodności z azospermia. Trzy przypadki dotyczące ramienia krótkiego X mogą być szczególnie interesujące są z uwagi na odmienny efekt fenotypowy. Dwóch mężczyzn było płodnych i posiadało po 1 dziecku (badań nasienia nie wykonano) [11, 46], w trzecim przypadku bezpłodności stwierdzono nieliczne plemniki w nasieniu [31]. Wszyscy mężczyźni byli rozpoznani w trakcie badań rodzinnych, a kobiety nosicielki tej samej translokacji były płodne.

TABELA 2. Zestawienie translokacji X -autosom u dorosłych mężczyzn

Autor	Punkty pęknięcia		Nasienie	Płodność	Biopsja	
					H	M
Buckton [11]	X p	14q	AZS	—*	—	+
Buckton [11]	X p	14q	?	+*	—	—
Couco [19]	X q	22q	AZS	—	—	—
Dutrillaux [25]	X q	1q	AZS	—	+	+
Faed [28]	X q	21q	AZS	—	—	+
Ford [30]	X	7	?	—	—	—
Fraccaro [31]	X p	15p	c OZS	—*	—	—
Leichtman [46]	X p	1q	?	+*	—	—
Marmor [51]	X q	22q	AZS	—	—	—
Millet [61]	X q	12 q	?	—	—	—
Quack [67]	X q	2 p	AZS	—	+	+
Quack [67]	X p	12 q	AZS	—	+	+
Rivas [70]	X q	3 p	AZS	—	—	—
Stengel - Rutkowski [80]	X q	5 q	AZS	—	—	—

Nasienie: AZS – azospermia; c OZS – ciężka oligozoospermia; ? – nasienie nie badane; płodność: +: mężczyzna płodny; -: mężczyzna niepłodny; * – kobiety nosicielki w tej samej rodzinie płodne; biopsja jądra: H – histologia jądra; M – chromosomy mejozyczne; +: badanie wykonane; -: badania nie wykonano

Może to wskazywać, że uszkodzenia w obrębie Xp są lepiej tolerowane od uszkodzeń Xq również u mężczyzn. Niestety w żadnym z tych przypadków nie wykonano biopsji jąder, co mogłoby przyczynić się do wyjaśnienia zaobserwowanego zróżnicowania i zwrócenia uwagi na rolę regionu krytycznego Xq w męskiej mejozie.

2. 2. 2. TRANSLOKACJE CHROMOSOMU Y

Translokacje wzajemne Y-autosom występują nieco częściej od translokacji z udziałem chromosomu X. Spotykane są w przypadkach dzieci z wadami wrodzonymi, występują też u fenotypowo normalnych kobiet i mężczyzn, powodują zaburzenia prokreacji [3, 76].

W literaturze opisano ponad 40 przypadków dorosłych mężczyzn, będących nosicielami takiej translokacji (tab. 3), w większości wypadków przyczyną rozpoznania było obniżenie płodności spowodowane azoospermią. Biopsja tkanki jądra dokonana w kilkunastu przypadkach najczęściej wykazywała zahamowanie spermatogenezy na etapie spermatocytów II rzędu [28, 44], a nawet spermatyd [68], czasami na etapie spermatocytów I rzędu [50, 62] lub całkowity brak komórek nabłonka plemnikotwórczego [2, 3]. Jednak u niektórych mężczyzn obserwowano aktywną spermatogenezę o obniżonym nasileniu, której towarzyszyła obecność pewnej liczby plemników w nasieniu [21]. Podobnie jak w przypadku chromosomu X, w spermatocytach stwierdzono zaburzenia w formowaniu pęcherzyka płciowego oraz formowanie kwadriwalentu łańcuchowego, złożonego z chromosomów X, pochodnego Y, pochodnego autosomu i jego normalnego homologu [35, 44, 50, 90]. U mężczyzn, którzy produkowali plemniki, bivalent autosomalny był wyraźniej oddzielny od pęcherzyka płciowego, a kwadriwalent przyjmował w części komórek postać pierścieniową [21, 45].

W dotychczas obserwowane translokacje były zaangażowane prawie wszystkie autosomy (z wyjątkiem 8, 11, 12, 20). Najczęściej translokacji ulegały chromosomy numer 1, 13, 14, 15 i 16. Punkty pęknięcia chromosomu Y były zlokalizowane najczęściej na ramieniu długim. Hipoteza o częstszym występowaniu translokacji między krótkim ramieniem chromosomu akrocentrycznego a długim ramieniem Y nie potwierdza się w stosunku do niepłodnych mężczyzn [76]. Lokalizacja punktów złamania wydaje się nie być skorelowana ani w 8 przypadkach obecności plemników w nasieniu [18, 21, 24, 28, 45, 69, 87], ani w 7 przypadkach klinicznie stwierdzonej płodności (w tym po 1 przypadku normospermii [45], ciężkiej oligospermii [87] i prawdopodobnej azoospermii [64], w 4 pozostałych przypadkach nasienia nie badano [7, 13, 85, 87]). Trudno jest o wyjaśnienie przyczyn odrębności u tych nosicieli, ponieważ u większości z nich biopsji jąder nie wykonano. Biorąc jednak pod uwagę zahamowanie mejozy pojawiające się z reguły na późniejszym etapie oraz liczniejsze przypadki płodności należy stwierdzić, że translokacje wzajemne Y - autosom mają nieco słabszy wpływ destrukcyjny na męską gametogenezę od translokacji X - autosom.

TABELA 3. Zestawienie translokacji Y-autosom u dorosłych mężczyzn

Autor	Punkt pęknięcia	Nasienie	Płodność	Biopsja	
				H	M
Abeliovich [1]	Yq	16p	AZS	-	-
Andersson [2]	Yp	4q	AZS	-	+
Arnemann [3]	Yq	22p	AZS	-	+
Bertheas [7]	Yq	15q	?	+ #	-
Bussani Mastellone [13]	Yp	9q	?	+	-
Callen [14]	Yq	22p	?	- * #	-
Casperson [16]	Yq	2p	?	-	+
Coco [18]	Yp	7q	c OZS	-	-
Croquette [20]	Yq	21p	?	-	-
Croquette [20]	Yq	14q	AZS	-	+
Curtis [21]	Yq	13p	c OZS	-	+
Diaz - Castanos [23]	Yq	19q	AZS	-	-
Doneda [24]	Yq	13p	ATZ	? #	-
Doneda [24]	Yq	13p	NORMA	+ *	-
Dutrillaux [26]	Yq	5p	AZS	-	+
Faed [28]	Yq	16q	c OZS	-	+
Gonzales [35]	Yq	3q	AZS	-	+
Gregori Romero [36]	Yq	16q	AZS	-	-
Gregori Romero [36]	Yq	1p	AZS	-	-
Hendry [37]	Y	F	AZS	-	+
Laurent [43]	Yq	14q	AZS	-	+
Laurent [44]	Yq	17q	AZS	-	+
Laurie [45]	Yq	10q	NORMA	+ *	+
Lopez Pajares [49]	Yq	10p	AZS	-	+
Maraschio [50]	Yq	1p	AZS	-	+
Moreau [62]	Yq	1p	?	-	+
Morris [63]	Yq	13p	?	+	-
Nikolis [64]	Yq	13q	AZS *	+ *	-
Petit [66]	Yq	14q	AZS	-	-
Ratomponirina [68]	Y q	14p	AZS	-	+
Retief [69]	Yq	21p	c OZS	-	-
Rousset [71]	Y	16	AZS	-	-
Schempp [73]	Yq	15p	AZS	-	-
Smith [76]	Yq	19	AZS	-	-
Spowart [77]	Y	15p	?	?	-
Subrt [81]	Yq	15q	?	+ *	-
Teyssier [85]	Yq	1q	?	+ *	-
Turleau [86]	Yq	16q	?	-	-
Turleau [87]	Yq	7q	c OZS	+	+
Turleau [88]	Yq	14p	AZS	-	+
van den Berghe [89]	Yp	2p	?	- #	+
Viguié [90]	Y cen	6 cen	AZS	-	+

Nasienie: AZS – azoospermia; c OZS – ciężka oligozoospermia; ATZ – astenoterozoospermia; norma – wartości prawidłowe; ? – nasienie nie badane; * – prawdopodobna obecność niewielkiej liczby plemników (klinicznie potwierdzona płodność); płodność: +: mężczyzna płodny; -: mężczyzna niepłodny; *- przypadek rodzinny; # – rozpoznanie przypadkowe (inny powód niż niepłodność); ? – brak danych; biopsja jądra: H – histologia jądra; M – chromosomy mejoetyczne; + : badanie wykonane; - : badanie nie wykonano

2. 2. 3. TRANSLOKACJE X - Y i Y - Y

Tego rodzaju aberracje stanowią wyjątkową rzadkość. Opisano pojedyncze przypadki, w niektórych z nich prowadzono badania płodności u dorosłych mężczyzn. W dwóch rodzinach obserwowano translokację t(X; Y) (p22; q11) u nieplodnych mężczyzn z azoospermia [32, 91]. Biopsja gonad wykazała zahamowanie mejozy na etapie spermatocytów. W profazie I podziału następowało normalne formowanie pęcherzyka płciowego, jednak później chromosom Y i pochodny X pozostawały niesparowane, na skutek uszkodzenia odcinka pseudoautosomalnego. Również u nosiciela translokacji t(Yp; Yq) nieplodność była spowodowana azoospermia. W biopsji stwierdzono zahamowanie gametogenezy na etapie spermatocytów I rzędu, chromosomów mejozycznych nie badano [12].

LITERATURA

- [1] ABELIOVICH D., POSTASHNIK G, DAR H, LUGASIN, RAVED. Chromosomal rearrangements in three infertile man. *Andrologia* 1986; **18**: 147-151.
- [2] ANDERSSON M, PAGE DC, BROWN LG, ELFVING K, DE LA CHAPELLE A. Characterization of a (Y;4) translocation by DNA hybridization. *Hum Genet* 1988; **78**: 377-381.
- [3] ARNEMANN J, SCHNITTGER S, HINKEL GK, TOLKENDORF E, SCHMIDTKE J, HANSMANN I. A sterile male with 45, X and a Y; 22 translocation. *Hum Genet* 1991; **87**: 134-138.
- [4] BARCZYK A. Metoda uwidocznienia chromosomów z ludzkich plemników i jej zastosowanie. *Ginekol Pol* 1992; **63**: 240-245.
- [5] BARCZYK A, COZZI J, SÈLE B. Irregular segregation of reciprocal translocations during meiosis. Cumulative data from t(1; 7) (p34; q36) carrier and over 3000 reported sperm karyotypes. (w przygotowaniu do druku)
- [6] BALKAN W, MARTIN RH. Chromosome segregation into the spermatozoa of two men heterozygous for different reciprocal translocations. *Hum Genet* 1983; **63**: 345-348.
- [7] BERTHEAS MF, GERMAIN D, LAURAS B, GAJA R, BLACHE G, FRAISSE J, BRIZZARD CP. Translocation t(Y; 15) chez un homme fertile, dépistée à l'occasion d'une amniocentèse. *J Genet Hum* 1988; **36**: 63-67.
- [8] BRANDRIFF B, GORDON L, ASHWORTH LK, LITTMAN V, WATCHMAKER G, CARRANO AV. Cytogenetics of human sperm: meiotic segregation in two translocation carriers. *Am J Hum Genet* 1986; **38**: 197-208.
- [9] BRANDRIFF BF, GORDON LA, MOORE II D, CARRANO AV. An analysis of structural aberrations in human sperm chromosomes. *Cytogenet Cell Genet* 1988; **47**: 29-36.
- [10] BURNS JP, KODURU PRK, ALONSO ML, CHAGANTI RSK. Analysis of meiotic segregation in man heterozygous for two reciprocal translocations using the hamster *in vitro* penetration system. *Am J Hum Genet* 1986; **38**: 954-964.
- [11] BUCKTON KE, JACOBS PA, RAE LA, NEWTON MS. An inherited X - autosome translocation in man. *Ann Hum Genet* 1971; **35**: 171-178.
- [12] BUTLER MG, SANGER WG, WALZAK MP. A unique Y/ Y translocation in an infertile male. *Cytogenet Cell Genet* 1981; **31**: 175-177.

- [13] BUSSANI MASTELLONE C, GIOVANNUCI UZIELLI ML, GUARDUCCI S, NATHAN G. Four cases of trisomy 9p syndrome with particular chromosome rearrangements. *Ann Genet* 1991; **34**: 115–119.
- [14] CALLEN DF, SUTHERLAND GR, CARTER RF. A fertile man with tdc (Y; 22): how a stable neo - X₁ X₂Y sex - determining mechanism could evolve in man. *Am J Med Genet* 1987; Suppl. **3**: 151–155.
- [15] CANS C, COHEN O, MERMET MA, DEMONGEOT J, JALBERT P. Human reciprocal translocations: is te unbalanced mode at birth predictable? *Am J Hum Genet* 1993; **91**: 228–232.
- [16] CASPERSON T, HULTEN M, JONASSON J, LINDSTEN J, THERKELSEN A, ZECH L. Translocations causing non - fluorescent Y chromosomes in human XO/XY mosaics. *Hereditas* 1971; **68**: 317–324.
- [17] CHANDLEY AC. Meiotic studies and fertility in human translocation carriers. (w) Daniel A (red.) The cytogenetics of mammalian autosomal rearrangements. New York: Alan Liss Inc. 1988: 361–382.
- [18] COCO R, GALLEGO MS, BRUGO S, CARRERE C, NICHOLSON R. Cytogenetic findings in 301 sterile and/ or infertile men with abnormal spermograms. *Medicina* (Buenos Aires) 1986; **46**: 303–310.
- [19] COUCO C, GIMELLI P, MARASCHIO P, PASQUALI F. X / autosomal translocations and male sterility. *Clin Genet* 1980; **17**: 61–62.
- [20] CROQUETTE MF, GABRIEL- ROBEZ O, COUTURIER J. Etude du caryotype d'hommes stériles et hypofertiles. *Bull Assoc Anat* 1987; **71**: 35–39.
- [21] CURTIS DJ. Meiotic chromosomes in an infertile male with an unbalanced Y / 13 translocation. *Hum Genet* 1977; **37**: 249–254.
- [22] DE BRAEKELEER M, DAO TN. Cytogenetic studies in male infertility: a review. *Hum Reprod* 1991; **6**: 245–250.
- [23] DIAZ-CASTANOS L, RIVERA H, GONZALEZ-MONTES R, DIAZ M. Translocation (Y; 19) (q12;q13) and azoospermia. *Ann Genet* 1991; **34**: 27–29.
- [24] DONEDA L, MAGNANI, TIBILETTI MG, DALPRA L, LARIZZA L. Different phenotypes in two cases of apparently identical familial (Yq; 13p) translocation. *Hum Reprod* 1992; **7**: 495–499.
- [25] DUTRILLAUX B, COUTURIER J, ROTMAN J, SALAT J, LEJEUNE J. Stérilité et translocation familiale t(1q-; Xq+). *C R Acad Sc Paris* 1972; **274**: 3324–33327.
- [26] DUTRILLAUX B, GUEGUEN J. Etude méiotique et mitotique dans un cas de translocation t(5; Y). *Hum Genet* 1975; **27**: 241–245.
- [27] ESTOP AM, LEVINSON F, CIEPLY K, VANKIRK V. The segregation of a translocation t(1;4) in two male carriers heterozygous for the translocation. *Hum Genet* 1992; **89**: 425–429.
- [28] FAED MJW, LAMONT MA, BAXBY K. Cytogenetic and histological studies of testicular biopses from subfertile men with chromosome anomaly. *J Med Genet* 1982; **19**: 45–56.
- [29] FORD CE, CLEGG HM. Reciprocal translocations. *Br Med Bull* 1969; **25**: 110–114.
- [30] FORD J. Cytogenetics of infertility and habitual abortion. *Records Adelaide J Child Hosp* 1977; **1**: 287–293.
- [31] FRACCARO M, MARASCHIO P, PASQUALI F, SCAPPATICI S. Women heterozygous for deficiency of the (p21 → pter) region of the X chromosome are fertile: *Hum Genet* 1977; **39**: 283–292.
- [32] GABRIEL - ROBEZ O, RUMPLER Y, RATOMPONIRINA C, PETIT C, LEVILLIERS J, CROQUETTE MF, COUTURIER J. Deletion of the pseudoautosomal region and lack of sex - chromosome pairing at pachytene in two infertile men carrying an X; Y translocation. *Cytogenet Cell Genet* 1990; **54**: 38–42.
- [33] GOLDMAN ASH, HULTEN MA. Meiotic analysis by FISH of human male 46, XY, t (15; 20) (q11.2;q11.2) translocation heterozygote: quadrivalent configuration, orientation and first meiotic segregation. *Chromosoma* 1993; **102**: 102–111.

- [34] GOLDMAN ASH, HULTEN MA. Analysis of chiasma frequency and first meiotic segregation in human male reciprocal translocation heterozygote, t(1; 11)(p36.3; q13.1), using fluorescence in situ hybridisation. *Cytogenet Cell Genet* 1993; **63**: 16–23.
- [35] GONZALES J, LESOURD S, DUTRILLAUX B. Mitotic and meiotic analysis of a reciprocal translocation t (Y; 3) in an azoospermic male. *Hum Genet* 1981; **57**: 111–114.
- [36] GREGORI ROMERO M, LOPEZ-GINÉS C, GIL R, GALAN SANCHEZ F, PELLIN - PÉREZ A. Dos nuevos casos de translocation Y - autosoma asociada con azoospermia. *Rev Clin Esp* 1990; **187**: 71–73.
- [37] HENDRY WF, POLANI PE, PUGH RCB, SOMMERVILLE IF, WALLACE DM. 200 infertile males: correlation of chromosome, histological, endocrine and clinical studies. *Br J Urol* 1976; **47**: 899–908.
- [38] HULTEN M, LINDSTEN J. Cytogenetic aspects of human male meiosis. *Adv Hum Genet* 1973; **4**: 327–387.
- [39] JALBERT P, SÈLE B. Factors predisposing to adjacent 2 and 3: 1 disjunctions. Study of 161 human reciprocal translocations. *J Med Genet* 1979; **16**: 467–478.
- [40] JALBERT P, SÈLE B, JALBERT H. Reciprocal translocations: a way to predict the mode of imbalances segregation by pachytene - diagram drawing. *Hum Genet* 1980; **55**: 209–222.
- [41] JALBERT P, JALBERT H, SÈLE B. Types of imbalances in human reciprocal translocations: risk at birth. (w) The cytogenetics of mammalian autosomal rearrangements. Daniel A (red.) New York: Alan Liss Inc. 1988: 267–291.
- [42] JENDERNY J. Sperm chromosome analysis of two males heterozygous for a t (2; 17) (q35; p13) and t (3; 8) (p13; p21) reciprocal translocation. *Hum Genet* 1992; **90**: 171–173.
- [43] LAURENT C, DUTRILLAUX B. Translocation t(Y; 14) chez in homme azoospermique. *Ann Genet* 1976; **19**: 207–209.
- [44] LAURENT C, CHANDLEY AC, DUTRILLAUX B, SPEED RM. The use of surface spreading in the pachytene analysis of a human t (Y; 17) reciprocal translocation. *Cytogenet Cell Genet* 1982; **33**: 312–318.
- [45] LAURIE DA, PALMER RW, HULTEN MA. Studies on chiasma frequency and distribution in two fertile men carrying reciprocal translocations; one with a t(9;10) karyotype and one with a t (Y;10) karyotype. *Hum Genet* 1984; **68**: 235–247.
- [46] LEICHTMAN DA, SCHMICKEL RD, GELEHRTER TD, JUDD WJ, WOODBURY MC, MEILINGER KL. Familial Turner syndrome. *Ann Int Med* 1978; **89**: 473–476.
- [47] LIFSCHYTZ E, LINDSLEY DL. The role of X - chromosome inactivation during spermatogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1972; **69**: 182–186.
- [48] LINDENBAUM RH, BOBROW M. Reciprocal translocations in man. 3: 1 meiotic disjunction resulting in 47- or 45-chromosome offspring. *J Med Genet* 1975; **12**: 29–43.
- [49] LOPEZ PAJARES I, DELICADO A, COBOS PV, SANCHEZ CORRAL F, CUADRADO C. An azoospermic male with a Y / autosome translocation. *Hum Genet* 1979; **46**: 155–158.
- [50] MARASCHIO P, TUPLER R, DAINOTTI E, CORTINOVIS M, TIEPOLO L. Molecular analysis of human Y; 1 translocation in an azoospermic male. *Cytogenet Cell Genet* 1994; **65**: 256–260.
- [51] MARMOR D, TAILLEMITE JL, VAN DEN AKKER J, PORTNOT MF, LE PORRIER N, JIYE N, DELAFONTAINE D, ROUX C. Semen analysis in subfertile balanced - translocation carriers. *Fertil Steril* 1980; **34**: 496–502.
- [52] MARTIN R H. A detailed method for obtaining preparations of human sperm chromosomes. *Cytogenet Cell Genet* 1983; **35**: 252–256.
- [53] MARTIN RH. Analysis of human sperm chromosome complements from a male heterozygous for a reciprocal translocation t (11; 22) (q23; q13). *Clin Genet* 1984; **25**: 357–361.
- [54] MARTIN RH. Meiotic segregation of human sperm chromosomes in translocation heterozygotes: report of a t (9; 10) (q34; q11) and review of the literature. *Cytogenet Cell Genet* 1988; **47**: 48–51.

- [55] MARTIN RH. Sperm chromosome analysis of two men heterozygous for reciprocal translocations: t(1; 9)(q22; q31) and t(16; 19)(q11. 1; q13, 3). *Cytogenet Cell Genet* 1992; **60**: 18–21.
- [56] MARTIN RN, BARCLAY L, HILDEBRAND K, KO E, FOWLOW SB. Cytogenetic analysis of 400 sperm from three translocation heterozygotes. *Hum Genet* 1990; **86**: 33–39.
- [57] MARTIN RH, MCGILLIVRAY B, BARCLAY L, HILDEBRAND K, KO E. Sperm chromosome analysis of a man heterozygous for a reciprocal translocation 46, XY, t(12; 20)(q21; q11). *Hum Reprod* 1990; **5**: 606–609.
- [58] MARTIN RH, KO E, RADEMAKER A. Distribution of aneuloidy in human gametes: comparison between human sperm and oocytes. *Am J Med Genet* 1991; **39**: 321–331.
- [59] MARTIN RH, HULTEN M. Chromosome complements in 695 sperm from three men heterozygous for reciprocal translocations, and a review of the literature. *Hereditas* 1993; **118**: 165–175.
- [60] MATSUDA T, NONOMURA M, YAMAMOTO S, HAYASHI K, YOSHIDA O. Sperm morphology in subfertile carriers of autosomal translocations. *Int J Fertil* 1991; **36**: 178–182.
- [61] MILLET D, PLACHOT M, LETY MA, DE GROUCHY J, NETTER A. Les remaniements chromosomiques dans la stérilité masculine. *J Gyn Obst Biol Repr* 1975; **4**: 689–701.
- [62] MOREAU N, TEYSSIER M, ROLLET J. A new case of (Y;1) balanced reciprocal translocation in an infertile man with Hodgkin's disease. *J Med Genet* 1987; **25**: 379–380.
- [63] MORRIS MI, HANSON FW, TENNANT FR. A novel Y/13 familial translocation. *Am J Obstet Gynecol* 1987; **157**: 857–858.
- [64] NIKOLIS J, IVANOVIĆ K, DIKLIĆ V. Partial trisomy 13q resulting from a paternal reciprocal Yq; 13q translocation. *J Med Genet* 1991; **28**: 425–426.
- [65] PELLESTOR F, SÈLE B, JALBERT H, JALBERT P. Direct segregation analysis of reciprocal translocation: a study of 283 sperm from four carriers. *Am J Hum Genet* 1989; **44**: 464–473.
- [66] PETIT P, UNGLIK A, FRYNS JP. Translocation 46, X, t(Y; 14)(q122; q111) in a case of sterility in the male. *Ann Genet* 1982; **25**: 63–64.
- [67] QUACK B, SPEED RM, LUCIANI JM, NOEL B, GUICHAIOUA M, CHANDLEY AC. Meiotic analysis of two human reciprocal X - autosome translocations. *Cytogenet Cell Genet* 1988; **48**: 43–47.
- [68] RATOMPONIRINA C, COUTURIER J, GABRIEL - ROBEZ O, RUMPLER Y, DUTRILLAUX B, CROQUETTE MF, RABACHE Q, LEDUC M. Aberrations of the synaptonemal complexes in a male 46, XY, -14, +der(14)t(Y14). *Ann Genet* 1985; **28**: 214–218.
- [69] RETIEF AE, VAN ZYL JA, MENKVELD R, FOX MF, KOTZE GM, BRUSNICKY J. Chromosome studies in 496 infertile males with a sperm count below 10 million/ml. *Hum Genet* 1984; **66**: 162–164.
- [70] RIVAS F, GARCIA-ESQUIVEL L, DIAZ M, RIVERA H, CANTU JM. Cytogenetic evaluation of 163 azoospermics. *J Genet Hum* 1985; **35**: 291–298.
- [71] ROUSSET H, BERTHEAS MF, TOGNET E, CLAVREUL G, PASTEUR X, FRAISSE J. Intérêt de l'étude systématique du caryotype dans le bilan d'une infertilité masculine. *Lyon Med* 1984; **251**: 67–70.
- [72] RUDAKE E, JACOBS PA, YANAGIMACHIR. Direct analysis of the chromosome constitution of human spermatozoa. *Nature* 1978; **274**: 911–913.
- [73] SCHEMPP W, WEBER B, SERRA G, NERI G, GAL A, WOLFU. A 45, X male with evidence of translocation of Y euchromatin onto chromosome 15. *Hum Genet* 1985; **71**: 150–154.
- [74] SCHINZEL AA, ADELSBERGER PA, BINKERT F, BASARAN S, ANTONARKIS SE. No evidence for a paternal interchromosomal effect from analysis of the origin of non disjunction in Down Syndrome patients with concomitant familial chromosome rearrangements. *Am J Hum Genet* 1992; **50**: 288–293.
- [75] SÈLE B, PELLESTOR F, ESTRADÉ C, OSTORERO C, WAREMBOURG E, GELAS M, JALBERT H, JALBERT P. Mise en évidence des chromosomes de spermatozoïdes humains dans un système hétérospécifique. *Path Biol* 1985; **33**: 875–880.

- [76] SMITH A, FRASER IS, ELLIOT G. An infertile male with balanced Y; 19 translocation. Review of Y; autosome translocations. *Ann Genet* 1979; **22**: 189–194.
- [77] SPOWART G. Reassessment of presumed Y/22 and Y/15 translocations. *Cytogenet Cell Genet* 1979; **23**: 90–94.
- [78] SPRIGGS EL, MARTIN RH, HULTEN M. Sperm chromosome complements from two reciprocal translocation heterozygotes. *Hum Genet* 1992; **88**: 447–452.
- [79] SPRIGGS EL, MARTIN RH. Analysis of sperm from a t(1; 11) translocation carrier by FISH. *Am J Hum Genet* 1993; **53** Suppl.: 128A.
- [80] STENDEL - RUTKOWSKI S, ZANKL H, RODEWALD A, SCHARRER S, CHAUDHURI JP, ZANG KD. Aspermia, associated with a presumably balanced X / autosomal translocation. Karyotype 46, Y, t (X; 5) (q28; q11) *Hum Genet* 1976; **31**: 97–106.
- [81] SUBRT I, BLEHOVA B. Robertsonian translocation between the chromosome Y and 15. *Hum Genet* 1974; **23**: 305–309.
- [82] TEMPLADO C, MARINA S, COLL M, EGOZCUE J. Meiotic studies in human semen. *Hum Genet* 1980; **53**: 335–339.
- [83] TEMPLADO C, NAVARRO J, BENET J, GENESCA A, PEREZ MM, EGOZCUE J. Human sperm chromosome studies in a reciprocal translocation t (2; 5). *Hum Genet* 1989; **79**: 24–28.
- [84] TEMPLADO C, NAVARRO J, REQUENA R, BENET J, BALLESTA F, EGOZCUE J. Meiotic and sperm chromosome studies in a reciprocal translocation t (1; 2) (q32; q36). *Hum Genet* 1990; **84**: 159–162.
- [85] TEYSSIER M, RAFAT A, PUGEAT M. Case of (Y; 1) familial translocation. *Am J Med Genet* 1993; **46**: 339–340.
- [86] TURLEAU C, PLACHOT M, CHAVIN - COLIN F, ROUBIN M, LANGMAID H, COCHET C, BLANC - BRUDE M, LETY MA, DE GROUCHY J. Distribution des points de cassure chromosomique dans les remaniements constitutionnels. *Lyon Med* 1975; **233**: 329–335.
- [87] TURLEAU C, CROQUETTE MF, FOURLINNIE JC, DESMONS F, DE GROUCHY J. Translocation 46, X, t (Y; 7) (q122; q111) dans un cas de stérilité masculine. *Ann Genet* 1976; **19**: 210–212.
- [88] TURLEAU C, CHAVIN - COLIN F, DE GROUCHY J. A 45, X male with translocation of euchromatic Y chromosome material. *Hum Genet* 1980; **53**: 299–302.
- [89] VAN DEN BERGHE H, FRYNS JP, DAVID D. An autosome - Y translocation restudied. *Hum Genet* 1973; **20**: 375–376.
- [90] VIGUIÉ F, ROMANIF, DADOUNE JP. Male infertility in a case of (Y; 6) balanced reciprocal translocation. Mitotic and meiotic study. *Hum Genet* 1982; **62**: 225–227.
- [91] YAMADA K, NANKO S, HATTORI S, ISURUGI K. Cytogenetic studies in a Y - to - X translocation observed in three members of one family, with evidence of infertility in male carriers. *Hum Genet* 1982; **60**: 85–90.

Otrzymano: 29.09.1994 r.

Przyjęto: 02.11.1994 r.

Adres autora: 90-647 Łódź, Pl. gen. Hallera 1

UDZIAŁ LIGANDU RECEPTORA STK-1 (FLK2/FLT3) W REGULACJI LUDZKIEJ I MYSIEJ HEMATOPOEZY

THE ROLE OF STK-1 RECEPTOR LIGAND IN THE REGULATION OF HUMAN AND MURINE HEMATOPOIESIS

Mariusz Z. RATAJCZAK, Maciej HAŁASA, Wojciech I. KUCZYŃSKI

Zakład Patologii Komórki PAM w Szczecinie

Streszczenie: W pracy przedstawiono obecny stan wiedzy dotyczący nowo odkrytego receptora hemopoetycznego posiadającego wewnętrzną aktywność kinazy tyrozynowej STK-1 (FLT3/FLK2) oraz jego swoistego ligandu (STK-1 L). Kolejno omówiono aspekty związane z odkryciem i sklonowaniem genów kodujących powyższy receptor i jego ligand przedstawiając następnie budowę molekularną obydwu protein oraz zgromadzone do tej pory dane doświadczalne dotyczące roli, jaką powyższy receptor pełni w proliferacji komórek układu krwiotwórczego.

Słowa kluczowe: receptor STK-1, ligand receptora STK-1, hematopoiza, receptory o wewnętrznej aktywności kinazy tyrozynowej.

Summary: In this paper a new discovered haematopoietic receptor with intrinsic tyrosine kinase activity - STK-1 receptor (FLK2/FLT3) and its cognate ligand (STK-1 L) are described. There are discussed aspects concerning: isolation and cloning of genes encoding this receptor-ligands pair, molecular structure of both proteins and the experimental data evaluating the physiological role of STK-1R - STK-1L axis in the regulation of the proliferation of haematopoietic cells.

Key words: STK-1 receptor, STK-1 receptor ligand, haematopoiesis, receptors with intrinsic tyrosine kinase activity.

Wykaz skrótów stosowanych w pracy: **bFGF R** (ang. *Basic Fibroblast Growth Factor Receptor*) – receptor dla zasadowego czynnika wzrostowego fibroblastów; **BFU-E** – (ang. *Burst Forming Units of Erythrocytes*) – wczesna komórka układu czerwonokrwinkowego tworząca *in vitro* 14 dnia hodowli duże kolonie erytroidalne; **CFU-GM** (ang. *Colony Forming Units of Granulocytes and Macrophages*) –

wczesna komórka układu granulocytowo-makrofagowego tworząca *in vitro* 11 dnia hodowli kolonie granulocytowo-makrofagowe; **CFU-Mix** (ang. *Colony Forming Units of Mixed Lineages*) – jedna z wcześniejszych komórek układu krwiotwórczego tworząca 15 dnia hodowli *in vitro* kolonie składające się z krwinek czerwonych, granulocytów, makrofagów i megakariocytów; **c-KIT-R** – receptor c-kit. **CSF-1** (ang. *Colony Stimulating Factor-1*) czynnik wzrostowy układu monocytowo-makrofagowego, inaczej M-CSF; **cDNA** – DNA komplementarny do mRNA, uzyskuje się go w wyniku przepisania cząsteczek mRNA na komplementarne cząsteczki DNA; **EpO** – erytropoetyna; **FLK-2** (ang. *Fetal Liver Tyrosine Kinase - 2*), inna nazwa receptora STK-1; **FLT-3** (ang. *FMS like tyrosine kinase-3*) – inna nazwa receptora STK-1; **FACS** – (ang. *Fluorescein Activated Cell Sorting*) – technika izolacji komórek za pomocą cytofluorometru przepływowego, który może sortować komórki mające odpowiedni antygen; **FMS-R** – receptor dla CSF-1 (makrofagopoetyny); **GM-CSF** (ang. *Granulocyte-Monocyte Colony Stimulating Factor*) – czynnik wzrostowy stymulujący wzrost kolonii granulocytowo-makrofagowych; **G-CSF** (ang. *Granulocyte - Colony Stimulating Factor*) – granulocytopoetyna; **IGF-1R** (ang. *Insuline Like Growth Factor-1 Receptor*) – receptor dla IGF-1; **IL-3** – interleukina-3; **KKM** – krwiotwórcze komórki macierzyste – najwcześniejsze komórki hemopoetyczne mające zdolność samoodnawiania; **KKU** – Krwiotwórcze Komórki Ukierunkowane – bardziej dojrzałe od komórek macierzystych, tracąc zdolność do samoodnawiania, w hodowlach *in vitro* tworzą klony komórek potomnych; **KL** (ang. *kit ligand*) – ligand receptora c-kit; **PDGF-R** (ang. *Platelet Derived Growth Factor Receptor*) – receptor dla PDGF; **RT-PCR** (ang. *Reverse Transcription - Polymerase Chain Reaction*) – czuła technika badania ekspresji mRNA w komórce, składa się z dwóch etapów, w pierwszym mRNA, którego ekspresję chcemy ocenić, “przepisywany” jest za pomocą enzymu, tzw. odwrotnej transkryptazy, na komplementarny odcinek cDNA, w drugim otrzymane cDNA jest amplifikowane za pomocą termocyklicznej reakcji PCR, amplifikowany wiele miliardów razy produkt może zostać uwidoczniiony np. na żelu agarozowym; **SH-2 domena** – domena białkowa o homologii białka src (ang. *src homology domain*); **STK-1 R** (ang. *Stem Cell Tyrosine Kinase-1 Receptor*) – nowoopisany receptor o aktywności kinazy tyrozynowej występujący na ludzkich komórkach krwiotwórczych, inna nazwa FLK-2/FLT-3; **STK-1 L** – ligand receptora STK-1.

WSTĘP

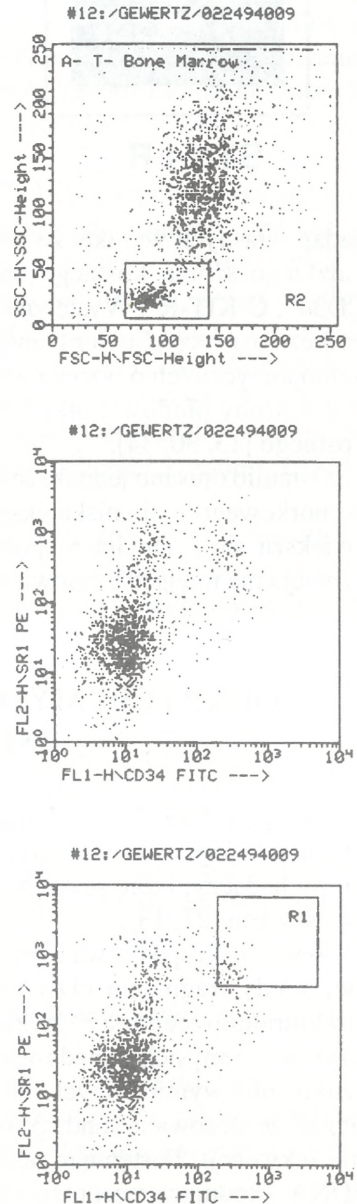
Dzięki postępom współczesnej hematologii eksperymentalnej coraz bardziej zbliżamy się do opracowania skutecznej metody izolacji ze szpiku kostnego krwiotwórczych komórek macierzystych (KKM). Z chwila, gdy stanie się to w pełni możliwe wykorzystując odpowiednie układy hodowlane podjęte zostaną próby ich namnażania poza organizmem, czyli tzw. ekspansji do celów transplantologicznych oraz zabiegów terapii genowej. Dlatego też, tak ważne znaczenie ma dokładne poznanie mechanizmów molekularnych regulujących proliferację najwcześniejszych komórek krwiotwórczych. Komórki te w mikrośrodkowisku krwiotwórczym są pod ciągłym wpływem czynników humoralnych działających zarówno ujemnie, jak i dodatnio na ich proliferację. Stosunkowo najwięcej informacji zgromadzono do tej pory o czynnikach stymulujących namnażanie oraz różnicowanie komórek układu krwiotwórczego [16].

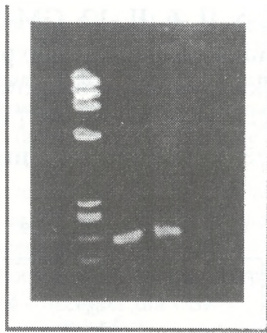
Czynniki stymulujące namnażanie komórek układu krwiotwórczego możemy podzielić na dwie główne grupy. Pierwsza to czynniki, których synteza w organizmie zwiększa się głównie podczas stanów stresowych (infekcje, krwawienia) [16]. Produkowane są i wydzielane m.in. przez komórki immunokompetentne jak limfocyty T

lub monocyty. Do grupy tej należą m.in.: IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-12, GM-CSF, G-CSF. Czynniki te działają poprzez receptory powierzchniowe ulegające po pobudzeniu swoistym ligandem przejściowej interakcji z białkami kinaz tyrozynowych, które występują wewnątrz komórki jak np.: src, fyn, JAK-1, JAK-2, JAK-3, TYK-2 itd. Czynniki należące do drugiej grupy działają poprzez tzw. receptory mające wewnętrzną aktywność kinazy tyrozynowej [3, 6, 9, 19, 22, 23, 24, 25, 31].

Receptory tej grupy mają aktywność enzymatyczną kinazy tyrozynowej i po pobudzeniu swoistym ligandem mogą autofosforylować własne białko receptorowe. Do receptorów tej grupy zaliczamy m.in.: FMS-R, C-KITR, b-FGFR, receptor insulinowy, IGF-1R oraz PDGF-R. Lista receptorów mających wewnętrzną aktywność kinazy tyrozynowej nie została jeszcze zamknięta. Sklonowano bowiem wiele sekwencji cDNA, które jak się uważa mogą kodować receptory tej grupy i ulegać ekspresji m.in. na komórkach układu hemopoetycznego. Receptory te ciągle oczekują na odkrycie swoistych ligandów i zidentyfikowanie biologicznej roli, jaką pełnią w proliferacji komórek hemopoetycznych. Przykładem receptora, który został najpierw odkryty na powierzchni komórek hemopoetycznych oraz sklonowany, zanim poznano jego ligand, jest receptor STK-1 (FLK2/FLT3) [13, 28, 30]. Receptor ten występuje m.in. na ludzkich komórkach hemopoetycznych mających antygen CD34, czyli komórkach zbliżonych fenotypowo do frakcji KKM. Jak przedstawiono na rysunkach 1 i 2, z

Rys. 1. Cytogram komórek szpiku kostnego barwionych na obecność antygenu CD 34 i receptora C-KIT (badania własne): górny panel – ocena ugięcia światła na brzegach komórki (FSC) oraz rozproszenia na ziarnistościach (SSC) umożliwiła zidentyfikowanie regionu R₂ zawierającego tzw. małe komórki limfoidalne, komórki tego regionu poddano następnie ocenie; panel środkowy – komórki z regionu R₂ podwójnie wybarwione na obecność antygenu CD 34 (przeciwciało znakowane fluoresceiną) oraz receptora C-KIT (przeciwciało znakowane fikoerytryną); panel dolny – zaznaczony region R₁ zawierający najjaśniejsze podwójnie znakowane komórki CD34⁺ C-KIT-R⁺, komórki takie sortowano i za pomocą techniki RT-PCR badano ekspresję wybranych genów (rys. 2, 3)





STK-1 R

Rys. 2. Komórki CD34⁺ (pozycja 1) oraz CD34⁺ C-KIT-R⁺ (pozycja 2) – sortowane za pomocą cytofluorometru przepływowego z regionu R₁ (rys. 1) badane na ekspresję receptora STK-1 za pomocą techniki RT-PCR (badania własne), w obydwu populacjach komórek stwierdzono obecność produktu odpowiadającego wielkością fragmentowi amplifikowanego receptora STK-1, produkty reakcji RT-PCR po przeniesieniu z żelu agarozowego na membranę nylonową hybrydyzowały ze swoistą sondą, pozycja 3 – negatywna kontrola reakcji RT-PCR, ϕ – marker DNA

badania własnych wynika, że receptor STK-1 ulega również ekspresji w komórkach ludzkiego szpiku kostnego bardziej wzbogaconych w KKM, jakimi są komórki CD34⁺, C-KIT-R⁺. Występuje on również na wczesnych komórkach układu krwiotwórczego myszy. Stwierdzono jego obecność m.in. na najwcześniejszych komórkach hemopoetycznych o wzorze antygenowym AA4.1⁺, Sca-1⁺, C-KIT-R⁺, Lin^{low} mysiej wątroby płodowej oraz komórkach Lin^{low}, C-KIT-R⁺, CD34⁺ mysiego szpiku kostnego [13, 30, 34].

Ostatnio opisano jednak, że najwcześniejsze mysie KKM będące w fazie G₀ cyklu komórkowego mają niską ekspresję tego receptora na powierzchni. Ekspresja jego zwiększa się z chwilą rozpoczęcia przez nie proliferacji [33, 34]. Czy podobna sytuacja ma miejsce u człowieka, jeszcze nie rozstrzygnięto.

ODKRYCIE MYSIEGO I LUDZKIEGO RECEPTORA STK-1 (FLT3/FLK-2)

Receptor STK-1 został najpierw odkryty u myszy i nazwany FLT-3/FLK-2. Dwoistość jego nazwy wynika z faktu, że został sklonowany przez dwie niezależne grupy badaczy, które przyjęły różne strategie wyizolowania cDNA kodującego powyższy gen [27, 13].

Pierwsza grupa prowadzona przez Birnbauma sklonowała go używając jako swojej sondy fragmentu cDNA kodującego część wewnątrzkomórkową podobnego strukturalnie receptora FMS. Za jej pomocą przeszukiwano najpierw bibliotekę cDNA uzyskaną z mysich gonad męskich, a potem z mysiego łożyska [27]. Podczas przeszukiwania wymienionych bibliotek stosowano tzw. “warunki słabej hybrydyzacji” licząc, że stosowana sonda pozwoli na “wyłowienie” nowych, zbliżonych strukturalnie sekwencji. Postępując tak udało się wyizolować i sklonować nową sekwencję cDNA – kodującą receptor o wewnętrznej aktywności kinazy tyrozynowej. Nazwano

go FLT-3 (skrót od *FMS Like Tyrosine Kinase -3*, czyli kinazy tyrozynowej FMS-podobnej - 3).

Druga grupa prowadzona przez Lemischke wyizolowała natomiast cDNA dla STK-1 R z najwcześniejszych komórek hemopoetycznych mysiej wątroby płodowej mających marker hemopoetyczny – AA4.1⁺ [13]. W tym celu amplifikowano najpierw za pomocą reakcji RT-PCR - cDNA pochodzące z tych komórek wykorzystując primery swoiste dla tzw. fragmentów stałych kinaz tyrozynowych. Jeden z amplifikowanych produktów zawierający nową sekwencję posłużył następnie do wyizolowania z mysiej biblioteki embionalnej odpowiedniego cDNA. Zespół Lemischki nazwał nowo sklonowany receptor - FLK-2, co jest z kolei skrótem nazwy *Fetal Liver Kinase -2* (kinaza tyrozynowa wątroby płodowej - 2).

Ludzki odpowiednik mysiego receptora FLK-2/FLT-3 odkrył dwa lata później zespół Birnbauma [28]. Nowoodkryty gen otrzymał taką samą nazwę. Izolując, a następnie klonując odpowiednie cDNA posłużono się fragmentem sekwencji cDNA mysiego receptora. Nazwę STK-1 (ang. *Stem Cell Tyrosine Kinase -1*) wprowadził natomiast zespół Civina klonując niezależnie od grupy Birnbauma ludzki odpowiednik receptora FLK2/FLT-3 [30]. Znaleziono go za pomocą techniki RT-PCR używając swoistych primerów dla fragmentu stałego ludzkich kinaz tyrozynowych. Odcinek ludzkiego cDNA mający homologię do mysiego receptora posłużył następnie do izolowania odpowiedniej pełnej ludzkiej sekwencji z biblioteki komórek CD34⁺ szpiku kostnego człowieka.

Zgodnie z powyższym nowoopisany receptor nazywany jest często w literaturze jako STK-1 R (FLK-2/FLT-3). Długa nazwa wskazuje, że nadszedł czas na uproszczenie i ujednolicenie jego terminologii. W dalszej części niniejszej pracy będziemy się posługiwać terminem STK-1R.

BUDOWA MOLEKULARNA ORAZ DYSTRYBUCJA NARZĄDOWA MYSIEGO RECEPTORA STK-1

Receptor STK-1 należy do tzw. III grupy receptorów mających wewnętrzną aktywność kinazy tyrozynowej wg klasyfikacji Schlessingera i Ullricha [31]. Receptory te, do których należy m.in. PDGF-R, FMS-R oraz C-KIT R mają następujące cechy anatomiczne:

- 1) Część wiążąca ligand składa się z pięciu tzw. domen immunoglobulinowo-podobnych.

- 2) Fragment zewnątrzkomórkowy receptorów jest bogato glikozylowany.

- 3) Część wewnątrzkomórkowa, która ma miejsce wiążące ATP i wykazuje aktywność fosfotransferazy, rozdzielona jest tzw. insertem składającym się z hydrofilowego 70–80-aminokwasowego odcinka.

Mysi receptor STK-1 kodowany jest przez gen mieszczący się na długim ramieniu 5 chromosomu, dystalnie od genów dla receptorów PDGF typu A oraz C-KIT [11, 13, 27]. Składa się on z 3453 nukleotydów, a jego kodon obejmujący zapis genetyczny dla 990 aminokwasów ograniczony jest od końca 5' przez 30, a od końca 3' przez 447 nukleotydy nie ulegające translacji. Białka kodowane przez sekwencję FLK3 oraz sekwencje FLT2 mają niemal identyczną budowę na poziomie aminokwasowym (98% zgodności) [11, 13, 27]. Dość znaczne różnice występują natomiast na końcu 3' – począwszy od nukleotydu w pozycji 957. Uważa się jednak, że obydwie mysie białka kodowane są przez ten sam gen. Prawdopodobnie podczas klonowania FLT2 popełniono kilka drobnych pomyłek, gdyż późniejsze próby izolowania i sekwencjonowania tego genu potwierdzają prawdziwość sekwencji FLK3 [11].

Aminokwasy następujące po inicjującym translację kodonie metioninowym – ATG (adenina-tymidyna-guanina) są hydrofobowe i mają charakterystyczną sekwencję peptydu sygnałowego. Peptyd sygnałowy rozpoczyna zawierającą 542 aminokwasy część zewnątrzkomórkową receptora, przechodzącą w 20-aminokwasowy śródbłonowy odcinek hydrofobowy, a następnie 438-aminokwasowy region wewnątrzkomórkowy cząsteczki receptora.

Pod względem budowy molekularnej STK-1R podobnie jak inne receptory kinazy tyrozynowej III grupy ma w części receptora wiążącej ligand pięć immunoglobulinowo podobnych podjednostek mających kształt pętli. Są wynikiem tworzenia mostków siarczkowych pomiędzy resztami cysteinowymi. Część zewnątrzkomórkowa receptora zawiera ponadto dziewięć potencjalnych miejsc dla N-glikozylacji. Część wewnątrzkomórkowa rozdzielona jest wspomnianym powyżej insertem o długości 77 aminokwasów. Oprócz znacznego podobieństwa do innych receptorów o wewnętrznej aktywności kinazy tyrozynowej III grupy, STK-1R ma również pewne cechy indywidualne. W części zewnątrzkomórkowej tego receptora znajduje się 12 reszt cysteinowych nie spotykanych ani w receptorze C-KIT, ani receptorze FMS [11, 13, 27].

Ekspresja mysiego receptora STK-1 w transfekowanych swoistym cDNA dla STK-1R komórkach COS wykazała, że dojrzała forma powierzchniowa ma masę 155–158 kd [12]. Masa cząsteczkowa przewidziana na podstawie analizy sekwencji aminokwasowej wynosi z kolei 110 kd. Blokując za pomocą tunikamycyny w transfekowanych komórkach COS proces N-glikozylacji obserwujemy występowanie jedynie formy niedojrzałej o masie 110 kd [12]. Oprócz formy pierwotnej i dojrzałej, otrzymano również formę pośrednią, o wielkości 132 i 143 kd. Jest to niedojrzała postać receptora o wysokiej zawartości mannozy w miejscach ulegających N-glikozylacji. Postać dojrzała receptora ma w tych miejscach węglowodany złożone [12]. Receptor STK-1 występuje u myszy na komórkach: mózgu, mózdzku, gonad męskich oraz wątroby. Mniejszą ekspresję stwierdzono w łożysku, śledzionie i grasicy. Nie ulega natomiast ekspresji lub ekspresja jego jest bardzo niska na komórkach mięśnia sercowego, mięśni szkieletowych, komórkach skóry i nerki [11, 12, 13, 27].

Ekspresję receptora STK-1, jak wspomniano powyżej, stwierdza się również na wczesnych mysich komórkach hemopoetycznych [13].

BUDOWA MOLEKULARNA ORAZ DYSTRYBUCJA NARZĄDOWA LUDZKIEGO RECEPTORA STK-1

Ludzki gen kodujący receptor STK-1 znajduje się na długim ramieniu chromosomu 13 w segmencie 12 (13q12) [28, 30]. Oznacza to, że podczas ewolucji odłączył się w przeciwieństwie do genu mysiego od tandemu genów kodujących receptory: PDGF typu A oraz C-KIT. Geny te u człowieka mieszczą się bowiem na długim ramieniu chromosomu 4 [19, 23, 25].

cDNA kodujące ludzki receptor STK-1 składa się z 3422 nukleotydów i zawiera kodon obejmujący 2979 nukleotydów odpowiadających sekwencji 993 aminokwasów, które tworzą białko receptora. Podobieństwo ludzkiego STK1 R do sekwencji mysiego odpowiednika (FLT 3) wynosi 86%.

Łańcuch peptydowy białka STK-1 rozpoczyna się podobnie jak receptora mysiego hydrofobowym fragmentem sygnałowym o długości 23 aminokwasów. Część zewnątrzkomórkowa peptydu tworzącego receptor obejmuje 541 aminokwasy, śród błonowy fragment składa się z 21 aminokwasów, a część wewnątrzkomórkową tworzą 431 aminokwasy. Część zewnątrzkomórkowa zawiera 5 ętle immunoglobulinowo podobnych oraz 9 potencjalnych miejsc glikozylacji. Część wewnątrzkomórkowa białka receptorowego rozdzielona jest 75-aminokwasowym insertem. Ludzki receptor STK-1 wykazuje pod względem budowy 18 i 19% podobieństwa do C-KIT i FMS R w części zewnątrzkomórkowej i odpowiednio 63 i 64% podobieństwa w części wewnątrzkomórkowej. Przewidywana na podstawie sekwencji aminokwasowej wielkość cząsteczki STK-1R oszacowano na 113 kd. Dojrzała bogato glikozylowana forma ma natomiast masę 130–160 kd. Obecność receptora STK-1 stwierdzono za pomocą czulej techniki RT-PCR w ludzkiej wątrobie, śledzionie, grasicy i szpiku. Bardzo słaba ekspresja występuje natomiast w łożysku [28]. Ogólnie ujmując u człowieka w przeciwieństwie do myszy receptor STK-1 prawdopodobnie znacznie słabiej ulega ekspresji w tkankach niehemopoetycznych.

Jak przedstawiono na rysunkach 1 i 2, receptor STK-1 występuje na wczesnych ludzkich komórkach hemopoetycznych mających antygen CD 34 oraz C-KIT R. Ekspresja jego w komórkach hemopoetycznych zmniejsza się w miarę ich dojrzewania i różnicowania. Zgodnie z powyższym zanika całkowicie na limfocytach T i B, a słaba – wykrywalna jedynie techniką RT-PCR ekspresja utrzymuje się w granulocytach i monocytach [28]. Receptor STK-1 występuje również na powierzchni wielu komórek białaczkowych linii limfocytarnych i niektórych mieloidalnych. Spośród linii mieloidalnych silną ekspresję stwierdza się np. na komórkach linii mielomono-

cytovej HL-60. Nie stwierdzono natomiast jego obecności na komórkach linii erytroidalnych, takich jak: TF-1, HEL, K-562 [28]. Receptor STK-1 ulega również nadmiernej ekspresji na blastach pacjentów cierpiących na ostre białaczki mielo- i limfoblastyczne [2, 14, 17]. Obecność STK-1 R stwierdzono także za pomocą czułej techniki RT-PCR w komórkach nowotworowych niektórych guzów litych: raka sutka, czerniaka, neuroblastomy, raka pęcherza moczowego oraz raka sutka [8, 28]. Ekspresja ta jest jednak niewielka i dalszego wyjaśnienia wymaga, czy komórki te, pomimo że mają odpowiednie mRNA, mogą rzeczywiście produkować białko receptorowe.

BIAŁKA BIORĄCE UDZIAŁ W TRANSDUKCJI SYGNAŁU Z POBUDZONEGO RECEPTORA STK-1

Receptor STK-1 podobnie jak inne receptory należące do III grupy receptorów o wewnętrznej aktywności kinazy tyrozynowej ulega w wyniku interakcji z ligandem oligomeryzacji i autofosforylacji [31]. Oligomeryzacja wymuszona jest budową ligandu, który występuje w formie dimeru. Ufosforylowane w procesie autofosforylacji, a występujące w części cytoplazmatycznej receptora reszty tyrozynowe stanowią miejsca akceptorowe dla tzw. domen SH-2. Domeny takie obecne są w białkach enzymatycznych i adaptorowych biorących udział w transdukcji sygnału z receptora do cytoplazmy i jądra komórkowego [19, 31]. Proteiny te odpowiadają za efekt biologiczny pobudzenia receptora przez swoisty ligand.

Stwierdzono, że autofosforylowany receptor STK-1 wiąże: fosfolipazę C- γ 1, podjednostkę regulacyjną p85 kinazy 3' fosfatydiloinozytoli, białka adaptorowe Shc, Grb2 oraz kinazę src i fyn. Aktywuje z kolei w sposób pośredni: białka vav oraz GAP [5].

Jednym z efektów biologicznych pobudzenia receptora STK-1 w komórkach docelowych jest zwiększenie syntezy DNA i pobudzenie proliferacji [9].

ODKRYCIE I SKLONOWANIE MYSIEGO ORAZ LUDZKIEGO LIGANDU RECEPTORA STK-1

Ligand receptora STK-1 (STK-1L) został odkryty niezależnie przez dwie grupy badawcze, które klonując kodujący go gen przyjęły różne strategie.

Jako pierwsza sklonowała mysia, a następnie ludzki STK-1L grupa prowadzona przez Beckmann [9]. Realizując to zadanie założono, że STK-1L podobnie jak inne ligandy działające przez receptory należące do III grupy receptorów o wewnętrznej aktywności kinazy tyrozynowej powinien występować w formie związanej z błoną komórkową oraz w formie wolnej wydzielanej przez komórki do medium hodowla-

nego [19]. Poszukiwania rozpoczęto od znalezienia ligandu związanego z powierzchnią komórek. W tym celu przygotowano białko rekombinowane będące w połowie cząsteczką receptora STK-1, a w połowie fragmentem Fc ludzkiej IgG. Białko to (STK-1R - Fc IgG) użyto następnie jako swoistą "sondę molekularną" do wykrycia linii komórkowej, która mając na powierzchni komórki ligand receptora STK-1 będzie wiązać je do swej powierzchni. Interakcję białka STK-1R - Fc IgG ze swoistym ligandem powierzchniowym badano za pomocą cytofluorometrii przepływowej.

Spośród 100 zbadanych mysich linii komórkowych jedna z nich – linia limfocytarna T oznaczona skrótem P7B-0.3A4 okazała się linią swoiście wiążącą proteinę STK-1R – Fc IgG. W dalszym etapie, klonowania genu kodującego STK-1L z komórek tej linii przygotowano tzw. ekspresyjną bibliotekę cDNA. Polega ona na wklonowaniu cząsteczek cDNA pochodzących z biblioteki w plazmid, który umożliwia w transfekowanych komórkach eukariotycznych produkcję białek kodowanych przez wklonowane fragmenty biblioteki.

Bibliotekę tą podzielono następnie na części i stosując stopniowe rozcieńczenia cDNA pochodzącego z przygotowanej biblioteki transfekowano nią komórki CV-1/EBNA oceniając następnie ich zdolność do produkcji STK-1 L, a tym samym wiązania do błony komórkowej białka STK-1R - Fc IgG. Postępując w ten sposób zidentyfikowano klon komórkowy mający ulegający ekspresji gen kodujący STK-1L.

Sekwencja STK-1L myszy posłużyła następnie do wyizolowania ludzkiego cDNA kodującego STK-1L z biblioteki cDNA uzyskanej z ludzkich limfocytów T [10].

Druga z grup prowadzona przez Lee przyjęła inną strategię sklonowania genu kodującego STK-1L [6]. Ligandu tego postanowiono poszukiwać w nadsączach komórek różnych linii stromalnych. W tym celu myszą linią pro-B limfocytarną Ba/F3 transfekowano najpierw cDNA kodującym receptor STK-1. Ustalona w wyniku transfekcji linia komórkowa, nazwana Ba-FLT, została następnie użyta jako linia docelowa w testach proliferacyjnych nadsączów uzyskanych z różnych mysich linii stromalnych. Stwierdzono, że nadsącz jednej z linii stromalnych tzw. komórek TA4 stymulował proliferację komórek Ba-FLT oraz autofosforylację ulegającego ekspresji na ich powierzchni białka receptorowego STK-1. W następnym etapie z nadsączu uzyskanego z komórek TA4 izolowano STK-1L za pomocą kolumn zawierających jako absorbent unieruchomione białko receptorowe STK-1. Zatrzymane w kolumnach białko ligandu częściowo zsekwencjonowano, co pozwoliło na ustalenie sekwencji primerów, za pomocą których techniką RT-PCR amplifikowano następnie fragmenty cDNA kodujące STK-1L. Fragmenty te użyto jako swoiste sondy do izolacji z biblioteki cDNA komórek TA4 cząsteczek cDNA kodujących mysiej STK-1L. Klon cDNA kodujący mysiej STK-1L posłużył następnie do izolacji ludzkiej sekwencji tego genu z biblioteki cDNA komórek linii stromalnej SV48 grasicy człowieka.

BUDOWA MOLEKULARNA I EKSPRESJA NARZĄDOWA LIGANDU RECEPTORA STK-1

STK-1L podobnie jak ligandy innych receptorów należących do III grupy receptorów o wewnętrznej aktywności kinazy tyrozynowej ma w części zewnątrzkomórkowej cztery α -helikalne pętle [6, 9, 10]. Ligand receptora STK-1 analogicznie do ligandów receptorów: C-KIT i FMS występuje zarówno w postaci związanej z błoną komórkową, jak i wolnej ulegającej uwolnieniu z powierzchni komórki. Postać związana z błoną komórkową podobnie jak zbliżonego strukturalnie: KL i CSF-1 ma krótki fragment wewnątrzkomórkowy i charakterystyczny motyw 4 reszt cysteiny w części zewnątrzkomórkowej.

Ligand receptora STK-1 ulega uwolnieniu z powierzchni błony komórkowej w wyniku trawienia proteazą [6, 9]. Miejscem cięcia jest prawdopodobnie reszta prolinowa znajdująca się w fragmencie zewnątrzkomórkowym cząsteczki STK-1 L.

Uważa się, że w niektórych komórkach istnieje odmienny mechanizm uwalniania ligandu niż trawienie proteolityczne formy umieszczonej na powierzchni błony komórkowej. Opisano bowiem kilka wariantów molekularnych STK-1L – różniących się budową fragmentu karboksyterminalnego cząsteczki [6, 9, 10]. Są one wynikiem odmiennego splajcingu pre-mRNA kodującego STK-1 L. Udowodniono, że w wyniku splajcingu powstają cząsteczki, które pozbawione są np. fragmentu przezbłonowego. Powyższe formy molekularne ligandu mogą więc być bezpośrednio wydzielane przez komórkę bez konieczności uprzedniego umieszczenia na powierzchni błony.

Istnienie takiego mechanizmu sekrecji może uzasadniać i tłumaczyć opisaną różnorodność uzyskanych klonów cDNA kodujących ligand receptora STK-1 [6, 9]. Ludzki i myszy ligand receptora STK-1 mają 72% homologie sekwencji aminokwasowej i wykazują podobną biologiczną aktywność krzyżową [6, 9, 10]. Obydwa w podobnych dawkach stymulują proliferację zarówno komórek myszy, jak i człowieka.

Ligand STK-1 ulega ekspresji prawie we wszystkich tkankach z wyjątkiem mózgu. Największą ekspresję stwierdza się w śledzionie i płucach [6, 9, 10]. Otwartą sprawą pozostaje natomiast wykazanie za pomocą odpowiednich immunoblotów, czy komórki, które wykazują ekspresję mRNA dla ligandu receptora STK-1, rzeczywiście produkują go w postaci aktywnego biologicznie białka.

BIOLOGICZNA ROLA STK-1L W FIZJOLOGICZNEJ REGULACJI PROLIFERACJI I RÓŻNICOWANIA KOMÓREK HEMOPOETYCZNYCH

Uważa się, że podobnie jak w przypadku osi regulującej hemopoezę: C-KIT R - KL swoisty ligand receptora STK-1 produkowany jest przez komórki stromalne podścieliska szpiku kostnego w postaci związanej z błoną komórkową bądź w postaci wolnej wydzielanej na zewnątrz komórek [6, 9, 10]. Receptor STK-1 podobnie jak

receptor C-KIT znajduje się z kolei na wczesnych komórkach hemopoetycznych [13, 33, 34]. Forma ligandu związana z powierzchnią komórek podścieliska, może więc wiązać receptor obecny na wczesnych komórkach hemopoetycznych – biorąc tym samym udział w procesie adhezji komórek: CD 34⁺, STK-1 R⁺ do komórek stromalnych szpiku [19].

Teorię tą potwierdzają pierwsze dane doświadczalne wykonane przez nasz zespół – oceniające rolę biologiczną receptora STK-1 w układzie krwiotwórczym. Otrzymano je za pomocą strategii oligomerów antysensowych [19, 30]. Badania te wykonaliśmy w okresie, kiedy jeszcze nie sklonowano swoistego ligandu.

Zaburzenia w ekspresji STK-1 R w ludzkich komórkach CD34⁺ szpiku kostnego powodowały głównie upośledzenie proliferacji tzw. komórek tworzących hodowle długoterminowe komórek szpiku [30]. Obserwowano również zahamowanie wzrostu bardzo wczesnych komórek klonogennych, jakimi są CFU-Mix. W mniejszym stopniu zniesienie ekspresji receptora STK-1 wpływało na wzrost CFU-GM i BFU-E. Dane te wskazują, że STK-1R odgrywa ważną rolę w utrzymaniu zarówno żywotności, jak i potencjału proliferacyjnego najwcześniejszych komórek hemopoetycznych [19, 30].

Z chwila gdy sklonowano ligand myszy, a następnie jego ludzki odpowiednik możliwa stała się bezpośrednia ocena wpływu obydwu czynników wzrostowych na proliferację komórek hemopoetycznych myszy i człowieka w różnych modelach doświadczalnych. Badania te potwierdziły ważną rolę osi STK-1 R - STK-1 L w regulacji proliferacji komórek układu krwiotwórczego.

Zgodnie z powyższym, pomimo że STK-1L okazał się słabszym kostymulatorem krwiotwórczych komórek ukierunkowanych w testach klonogennych *in vitro* niż KL, to jak wykazano jednak stymuluje najwcześniejsze komórki hemopoetyczne pochodzące z mysiej wątroby płodowej o wzorze antygenowym AA4.1⁺, Sca-1⁺, Lin^{low}. Nie działa natomiast na komórki bardziej dojrzałe posiadające wzór AA4.1⁺, Sca-1⁺, Lin^{high}. Efekt biologiczny STK-1L zwiększa się znacznie w obecności ligandu receptora c-kit (KL), IL-7 oraz IL-3 [1, 3, 9, 10].

Okazało się ponadto, że STK-1L zwiększa inkorporację znakowanej tymidyny do komórek CD34⁺ ludzkiego szpiku kostnego [10]. Stosowany sam w testach proliferacyjnych komórek ludzkich – podobnie jak w modelu mysim – jest słabym stymulatorem wzrostu komórek CD34⁺. Wykazuje jednak znaczny efekt kostymulujący wzrost kolonii granulocytowo-makrofagowych tworzonych przez GM-CFU po skojarzeniu w hodowlach *in vitro* z IL-3, GM-CSF oraz białkiem łączonym PIXY 321 (rekombinowana chimera: GM-CSF + IL-3). STK-1L jest również kostymulatorem IL-6. Zwiększa ponadto proliferację tymocytów płodowych [6, 9, 10].

Z wykonanych do tej pory badań *in vitro* nie wynika, aby STK-1L wpływał na wzrost komórek ukierunkowanych układu czerwono-krwinkowego (BFU-E) [6, 9, 10]. Nie zwiększa bowiem wzrostu kolonii erytroidalnych będąc kostymulatorem EpO bądź EpO + KL. Ostatnio pojawiło się jednak doniesienie, że STK-1L podawany *in*

vivo przyspiesza u myszy poddanych subletalnemu napromienieniu odnowę komórek układu czerwono krwinkowego [33]. Wydaje się więc, że udział STK-1L w erythropoezie wymaga dalszych badań weryfikujących uzyskane do tej pory dane.

LIGAND RECEPTORA STK-1L ULEGA EKSPRESJI W LUDZKICH KOMÓRKACH CD34⁺, C-KIT R⁺, STK-1R⁺ LUDZKIEGO SZPIKU KOSTNEGO

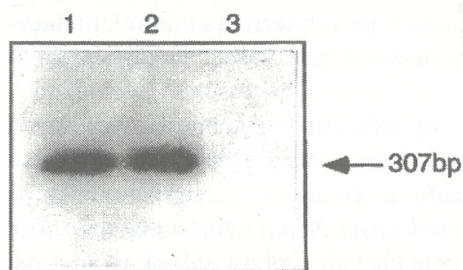
Udowodniono, że niektóre klony komórek białaczkowych mogą produkować różne biologicznie aktywne cytokiny hemopoetyczne – swoiste dla receptorów, których obecność wykrywa się jednocześnie na powierzchni blastów. Opierając się na tych danych wysunięto najpierw hipotezę, a następnie ją udowodniono, że wzrost niektórych białaczek może być wynikiem autokrynej stymulacji ich proliferacji. Ostatnio pojawiły się doniesienia, że geny kodujące tzw. wczesne cytokiny ulegają również ekspresji w prawidłowych wczesnych komórkach hemopoetycznych człowieka. Przykładem są geny kodujące IL-1 β , IL-3, GM-CSF czy TGF- β – ulegające ekspresji w ludzkich komórkach CD34⁺ [29, 32, 35]. Dane te mogą przemawiać za istnieniem autokrynych mechanizmów regulujących pewne etapy wzrostu również w prawidłowych wczesnych komórkach krwiotwórczych.

Wychodząc z powyższego założenia postanowiliśmy sprawdzić, czy STK-1 L nie ulega ekspresji we wczesnych komórkach hemopoetycznych człowieka.

W tym celu za pomocą cytofluorometru przepływowego (FACS) izolowaliśmy z komórek szpiku kostnego człowieka frakcje komórek mających antygen CD34 i receptor C-KIT-R (rys. 1). Jak wykazaliśmy, komórki te mają na powierzchni również receptor STK-1 (rys. 2). Obecność ekspresji STK-1L w tych komórkach ocenialiśmy wykorzystując czułą technikę RT-PCR (rys. 3). Sygnał odpowiadający ekspresji STK-1L udało nam się amplifikować w komórkach pochodzących z kilku kolejnych sortów od kilku zdrowych niezależnych dawców [20, 21].

Obecność mRNA ligandu receptora STK-1 w ludzkich komórkach szpiku kostnego o fenotypie CD34⁺, C-KIT R⁺, STK-1R⁺ może przemawiać za tym, że oś STK-1R - STK-1L bierze czynny udział w autokrynej regulacji pewnych etapów proliferacji ludzkich wczesnych komórek hemopoetycznych [20, 21]. Oś ta może z jednej strony wpływać na pewne etapy proliferacji i różnicowania komórek CD34⁺, z drugiej zaś zwiększać ich żywotność – hamując np. zjawisko apoptozy [20, 21].

Warto nadmienić, że w tych samych komórkach stwierdziliśmy również za pomocą techniki RT-PCR obecność ligandu receptora C-KIT. Ekspresja KL we wczesnych komórkach hemopoetycznych może mieć podobne znaczenie biologiczne jak w przypadku STK-1L [20, 21].



Rys. 3. Wynik *Southern blottu* (badania własne) produktów reakcji RT-PCR; za pomocą powyższej techniki badano ekspresję mRNA dla ligandu receptora STK-1 w ludzkich komórkach CD34⁺, C-KIT-R⁺, STK-1 R⁺ z regionu R₁ uwidocznionego na rys. 1 (pozycja 1) oraz w komórkach fibroblastoidalnych szpiku kostnego (pozycja 2); w obydwu przypadkach amplifikowano produkt odpowiadający wielkością fragmentowi cDNA ligandu receptora STK-1, który hybrydyzował ze swoistą sondą; pozycja 3 – negatywna kontrola reakcji RT-PCR

Chcąc ocenić znaczenie biologiczne ekspresji STK-1L w najwcześniejszych komórkach szpiku staramy się zaburzyć ekspresję STK-1L w komórkach C-KIT R⁺, STK-1R⁺ ludzkiego szpiku kostnego za pomocą swoistych oligomerów antysensowych [18, 20, 21, 26].

ROLA OSI STK-1R - STK-1L W PATOLOGII

Do tej pory nie opisano defektu genetycznego będącego wynikiem mutacji STK-1 receptora lub jego ligandu. Z drugiej strony sekwencja cDNA kodująca STK-1R lub STK-1L nie występuje również w genomie żadnego, ze znanych do tej pory wirusów onkogennych. Pomimo tego stosunkowo wcześniej wykazano, że receptor ten ma zdolności mitogenne i transformujące komórki [12].

Badania te przeprowadzono używając sklonowanego chimerycznego genu kodującego białko receptorowe (FMS-R + STK-1R) składające się w połowie z fragmentu receptora FMS (część zewnątrzkomórkowa białka wiążąca ligand) oraz w połowie z receptora STK-1 (część wewnątrzkomórkowa białka biorąca udział w transdukcji sygnału). Fibroblasty szczurze transfekowane tym genem proliferowały pod wpływem stymulacji CSF-1 (ligand FMS-R) w pożywce agarowej tracąc jednocześnie zależność do wzrostu warunkowanego przyleganiem do podłoża (ang. *anchorage independent growth*).

Jak wspomniano, STK-1R ulega ekspresji na komórkach wielu nowotworowych linii hemopoetycznych, komórkach białaczkowych uzyskanych od pacjentów oraz w mniejszym stopniu na komórkach niektórych guzów litych [2, 8, 28]. STK-1L jest natomiast produkowany przez komórki wielu różnych narządów [6, 9, 10].

Wykazano, że receptor STK-1 ulega nadmiernej ekspresji w komórkach białaczkowych uzyskanych od pacjentów cierpiących na ostre białaczki mielo- i limfoblastyczne [2]. Dodawany do hodowli stymulował w 20% przypadków wzrost komórek białaczkowych uzyskanych od pacjentów z ostrą białaczką mieloblastyczną [14]. Szczególnie wrażliwe na stymulację były blasty o fenotypie białaczkowym M5 i M6

wg tzw. klasyfikacji FAB (francusko - amerykańsko - brytyjskiej) [14]. Inna grupa doniosła z kolei o silnych właściwościach kostymulujących wzrost komórek białaczkowych w obecności innych czynników wzrostowych, takich jak: G-CSF-u, GM-CSF-u i IL-3 [17].

Jednoczesną ekspresję STK-1 R i STK-1 L stwierdzono w wielu nowotworowych liniach hemopoetycznych [15]. Jest to dodatkowy dowód przemawiający za możliwością autokrynnej regulacji wzrostu komórek hemopoetycznych i czynnym udziale w nim osi STK-1 R - STK-1 L. Przytoczone dane wskazują, że pojawiła się konieczność wykonania odpowiednich eksperymentów oceniających wpływ zablokowania osi STK-1 R - STK-1L za pomocą swoistych przeciwciał lub oligomerów antysensowych [18, 26] na wzrost i różnicowanie komórek białaczkowych.

PERSPEKTYWY WYKORZYSTANIA LIGANDU RECEPTORA STK-1 W KLINICE. DALSZY KIERUNKI BADAŃ

Możliwość uzyskania ligandu receptora STK-1 w postaci wysoce oczyszczonego rekombinowanego białka stwarza nadzieję, że wkrótce podjęte zostaną próby jego wykorzystania w klinice. Czynnikiem ten będzie z pewnością stosowany w próbach pobudzenia hemopoezy u pacjentów poddanych chemioterapii, przeszczepom krwiotwórczym bądź u chorych cierpiących na niektóre postacie cytopenii pochodzenia szpikowego.

Warto nadmienić, że receptor STK-1 w przeciwieństwie do receptora C-KIT nie występuje na powierzchni komórek tucznych [25].

Terapia swoistym ligandem nie naraża więc pacjenta na wystąpienie w trakcie leczenia groźnych objawów anafilaktoidalnych związanych z uwolnieniem przez mastocyty niekorzystnie działających mediatorów. STK-1L znajdzie również prawdopodobnie zastosowanie przy opracowywaniu optymalnych protokołów ekspansji *ex vivo* wczesnych komórek hemopoetycznych do celów przeszczepowych. Pierwsze takie próby już podjęto wykazując, że STK-1L wspólnie z KL powoduje ekspansję *in vitro* ludzkich komórek inicjujących hodowle długoterminowe oraz wczesnych komórek hemopoetycznych mających wzór antygenowy CD34⁺, CD38^{dim} [4].

Dalszych badań wymaga ocena wpływu STK-1L na zwiększenie tzw. mobilizacji komórek macierzystych szpiku do krwi obwodowej do celów transplantologicznych czy też podniesienie wydajności technik transfekcji genów do komórek CD34⁺ dla potrzeb terapii genowej. O potrzebie oceny wpływu zablokowania za pomocą oligomerów antysensowych lub swoistych przeciwciał monoklonalnych osi STK-1R - STK-1L na wzrost komórek nowotworowych wspomniano powyżej. Należy również poznać mechanizmy regulujące ekspresję STK-1R i STK-1L w komórkach hemopoetycznych. Nie wiemy również, czy u człowieka podobnie jak u myszy ekspresja

STK-1R zwiększa się w miarę wkraczania KKM w cykl komórkowy. Pominiętym do tej pory aspektem jest ewentualny wpływ *in vitro* STK-1L na megakariopoezę. Wstępne dane uzyskane w modelu mysim *in vivo* sugerują, że STK-1L może posiadać właściwości trombopoetyczne [33].

Należy się również spodziewać, że wkrótce ukazą się dane doświadczalne uzyskane na myszach transgenicznym, które przygotowuje się wprowadzając do ich komórek dodatkowe kopie genu kodującego STK-1 L. Podobnie technikami tzw. homologicznej rekombinacji uzyska się zwierzęta z wywołanymi doświadczalnie mutacjami genu kodującego STK-1 R lub STK-1 L. Analiza takich zwierząt mających odpowiednio: zwiększoną lub zablokowaną funkcję biologiczną receptora pozwoli na uzyskanie dodatkowych informacji o udziale osi STK-1 R - STK-1 L w fizjologii układu krwiotwórczego.

Nie ulega więc wątpliwości, że najbliższe lata przyniosą odpowiedź na wiele z wymienionych pytań i bardziej zbliżą nas do poznania pasjonujących zagadnień regulacji najwcześniejszych etapów krwiotworzenia.

LITERATURA

- [1] BANU N, DENG B, LYMAN S, GROOPMAN JE, AVRAHAM H. Modulation of hematopoietic progenitor development by recombinant human FLT3 ligand. *Blood* 1994, **84** suppl 1, 269a.
- [2] CAROW CE, LEVENSTEIN M, KAUFMANN SH, CHEN J, AMIN S, ROCKWELL P, WITTE L, CIVIN CI, SMALL D. Expression of the hematopoietic growth factor receptor STK-1 (FLT3/FLK2), in human acute leukemias. *Blood* 1994, **84** suppl 1, 51a.
- [3] DeVRIES P, BRASEL KA, mcKENNA HJ, WILLIAMS DE, LYMAN SD. The role of FLT3 ligand in early murine hematopoiesis. *Blood* 1994, **84** suppl 1, 279a.
- [4] DOOLEY DC, HEINRICH M, PLUNKETT JM, OPPENLANDER BK, PEETOOM F. FLT3 ligand (FLT3L) and stem cell factor (SCF) support the *ex vivo* expansion of primitive human hematopoietic cells: response of long-term culture initiating cells (LTCIC) and CD34⁺ CD38^{dim} cells. *Blood* 1994; **84** suppl 1, 368a.
- [5] DOSIL M, WANG S, LEMISCHKA IR. Mitogenic signalling and substrate specificity of the Flk2/Flt3 receptor tyrosine kinase in fibroblasts and Interleukin-3 dependent hematopoietic cells. *Mol Cell Biol* 1993; **13**: 6572–6585.
- [6] HANNUM C, CULPEPPER D, CAMPBELL D, McCLANAHAN T, ZURAWSKI S, BAZAN JF, KASTELEIN R, HUDAK S, WAGNER J, MATTSON J, LUH J, DUDA G, MARTINA N, PETERSON D, MENON S, SHANAFELT A, MUENCH M, KELNER G, NAMIKAWA R, RENNICK D, RONCAROLO M, ZLOTNIK A, ROSNET O, DUBREULL P, BIRNBAUM D, LEE F. Ligand for FLT3/FLK2 receptor tyrosine kinase regulates growth of haematopoietic stem cells and is encoded by variant RNAs. *Nature* 1994; **368**: 643–648.
- [7] HIRAYAMA F, LYMAN SD, CLARK SD, OGAWA M. FLT3 ligand (FLT3) supports proliferation of lymphohematopoietic and early B-lymphoid progenitors. *Blood* 1994, **84** suppl 1, 512a.
- [8] KUCZYŃSKI WI, RATAJCZAK MZ. STK-1 receptor gene is expressed in various human non-hematopoietic tumor cell lines. RT-PCR directed analysis of STK-1 mRNA expression. Preliminary report. *Acta Haematol Pol* 1994; **25**: 43–46.

- [9] LYMAN SD, JAMES L, BOS TV, deVRIES P, BRASEL K, GLINIĄK B, HOLLINGSWORTH LT, PICHA KS, McKENNA HJ, SPLETT RR, FLETCHER FA, MARASKOVSKY E, FARRAH T, FOXWORTHE D, WILLIAMS DE, BECKMANN MP. Molecular cloning of a ligand for the flt3/flk-2 tyrosine kinase receptor: a proliferative factor for primitive hematopoietic cells. *Cell* 1993; **75**: 1157-1167.
- [10] LYMAN SD, JAMES L, JOHNSON L, BRASEL K, deVRIES P, ESCOBAR SS, DOWNEY H, SPLETT RR, BECKMANN MP, McKENNA HJ. Cloning of the human homologue of the murine flt3 ligand: a growth factor for early hematopoietic progenitor cells. *Blood* 1994; **83**: 2795-2801.
- [11] LYMAN SD, JAMES L, ZAPPONE J, SLEATH PR, BECKMANN MP, BIRD T. Characterization of the protein encoded by the flt3 (flk2) receptor-like tyrosine kinase gene. *Oncogene* 1993; **8**: 815-822.
- [12] MAROC N, ROTTAPPEL R, ROSNET O, MARCHETTO S, LAVEZZI C, MANNONI P, BIRNBAUM D, DUBREUIL P. Biochemical characterization and analysis of the transforming potential of the FLT3/FLK2 tyrosine kinase. *Oncogene* 1993; **8**: 909-918.
- [13] MATTHEWS W, JORDAN CT, WIEGAND GW, PARDOLL D, LEMISCHKA IR. A receptor tyrosine kinase specific to hematopoietic stem and progenitor cell - enriched populations. *Cell* 1991; **65**: 1143-1152.
- [14] McKENNA HJ, SMITH FO, deVRIES P, BRASEL K, LYMAN SD, WILLIAMS DE. The effect of FLT3 ligand on primary acute human leukemias. *Blood* 1994, **84** suppl 1, 52a.
- [15] MEIERHOFF G, DIRKS W, GRUSS HJ, HU AB, ROSNET O, BIRNBAUM D, DREXLER HG. Expression of FLT-3 and FLT-3 ligand in a panel of human leukemia-lymphoma cell lines. *Blood* 1994, **84** suppl 1, 127a.
- [16] MOORE MAS. Clinical implications of positive and negative hematopoietic stem cell regulators. *Blood* 1991; **78**: 1-19.
- [17] PIACIBELLO W, FUBINI L, SEVERINO A, SANAVIO F, GARETTO L, STACCHINI A, LYMAN S, AGLIETTA M. The stimulatory/costimulatory effects of FLT3-ligand on human myeloid leukemia cells. *Blood* 1994, **84** suppl 1, 127a.
- [18] RATAJCZAK MZ, GEWIRTZ AM. Oligonucleotide-based therapeutics of human malignancies. w: *Nucleic Acids and Molecular Biology* Eckstein F., Lilley DMJ (red) Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg 1994, 298-326.
- [19] RATAJCZAK MZ, GEWIRTZ AM. Rola receptorów obdarzonych wewnętrzną aktywnością kinazy tyrozynowej w regulacji krwiotworzenia u człowieka. *Post Biol Kom* 1993; **20**: 279-95.
- [20] RATAJCZAK MZ, KUCZYŃSKI WI, MOORE J, GEWIRTZ AM. FACS sorted human CD34⁺ bone marrow cells coexpress C-KIT ligand (KL) and stem cell tyrosine kinase-1 receptor ligand (STK-1L). *Blood* 1994, **84** suppl 1, 370a.
- [21] RATAJCZAK MZ, KUCZYŃSKI WI, MOORE JS, PLETCHER CH, GEWIRTZ AM. Expression, and physiologic significance, of kit ligand and stem cell tyrosine kinase-1 receptor ligand in normal human CD34⁺, c-KIT R⁺ marrow cells. *Blood* 1995 (przesłane do druku).
- [22] RATAJCZAK MZ, KUCZYŃSKI WI, ONODERA K, MOORE J, RATAJCZAK J, KREGENOW DA, DeRIEL K, GEWIRTZ AM. A reappraisal of the role of insulin-like growth factor I in regulation of human hematopoiesis. *J Clin Invest* 1994; **94**: 320-327.
- [23] RATAJCZAK MZ, LUGER S, GEWIRTZ AM. Rola receptora C-KIT i jego ligandu w regulacji procesów krwiotworzenia u człowieka. *Post Biol Kom* 1992; **19**: 187-204.
- [24] RATAJCZAK MZ, LUGER SM, DERIEL K, ABRAHAM J, CALABRETTA B, GEWIRTZ AM. Role of the KIT protooncogene in normal and malignant human hematopoiesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; **89**: 7350-7354.
- [25] RATAJCZAK MZ, LUGER SM, GEWIRTZ AM. The c-kit protooncogene in normal and malignant hematopoiesis. *Int J Cell Cloning* 1992; **10**: 205-214.
- [26] RATAJCZAK MZ, SKORSKI T. Perspektywy wykorzystania strategii antysensów w medycynie doświadczalnej i klinicznej. *Post Biol Kom* 1994; **21**: 177-196.

- [27] ROSNET O, MARCHETTO S, deLAPEYRIERE O, BIRNBAUM D. Murine Flt3, a gene encoding a novel tyrosine kinase receptor of the PDGFR/CSF1R family. *Oncogene* 1991; **6**: 1641–1650.
- [28] ROSNET O, SCHIFF C, PEBUSQUE MJ, MARCHETTO S, TONNELLE C, TOIRON Y, BIRG F, BIRNBAUM D. Human FLT3/Flk2 gene: cDNA and expression in hematopoietic cells. *Blood* 1993; **82**: 1110–1119.
- [29] SCIBLER KR, LI Y, OHLS RK, NYE NC, DURNHAM MC, WHITE W, LIECHTY KW, LE T, CHRISTENSEN RD. Possible mechanisms accounting for the growth factor independence of hematopoietic progenitors from umbilical cord blood. *Blood* 1994; **84**: 3679–3684.
- [30] SMALL D, LEVENSTEIN M, KIM E, CAROW C, SHAHINA A, ROCKWELL P, WITTE L, BURROW C, RATAJCZAK MZ, GEWIRTZ AM, CIVIN CI. STK-1, the human homolog of Flk-2/Flt-3, is selectively expressed in CD34⁺ human bone marrow cells and is involved in the proliferation of early progenitor/stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; **91**: 459–463.
- [31] ULLRICH A, SCHLESSINGER J. Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity. *Cell* 1990; **61**: 203–212.
- [32] WATARI K, LANSDORP PM, DRAGOWSKA W, MAYANI H, SCHRADER JW. Expression of interleukin-1 β gene in candidate human hematopoietic stem cells. *Blood* 1994; **84**: 36–40.
- [33] ZEIGLER FC, BENNETT B, JORDAN CT, BAUER K, MATTHEWS W. Cellular and molecular characterization of the role of the FLK-2/FLT-3 receptor tyrosine kinase in hematopoietic stem cells. *Blood* 1994, **84** suppl 1, 415a.
- [34] ZEIGLER FC, BENNETT BD, JORDAN CT, SPENCER SD, BAUMHUETER S, CARROLL KJ, HOOLEY J, BAUER K, MATTHEWS W. Cellular and molecular characterization of the role of the FLK-2/FLT-3 receptor tyrosine kinase in hematopoietic stem cells. *Blood* 1994; **84**: 2422–2430.
- [35] ZHU XL, NOVAK FP, HEINRICH M, OPPENLANDER BK, DOOLEY DC. Autocrine inhibition by TGF- β 1 suppresses FLT3 ligand (FLT3L) and stem cell factor (SCF) stimulated growth: evidence for TGF- β 1 gene expression in hematopoietic cells. *Blood* 1994, **84** suppl 1, 221a.

Otrzymano 20.03. 1995 r.

Przyjęto: 04.04.1995 r.

Adres autorów: Zakład Patologii PAM,
71-344 Szczecin, ul. Unii Lubelskiej 1

The first part of the paper discusses the concept of 'philosophy of education' and its relationship to other disciplines. It argues that philosophy of education is a distinct field of inquiry that seeks to understand the nature and purpose of education. This involves examining the underlying assumptions and values that inform educational practice. The second part of the paper explores the role of philosophy in education. It suggests that philosophy can provide a critical perspective on educational theory and practice, helping to identify and challenge dominant assumptions. The third part of the paper discusses the importance of philosophical reflection for educators. It argues that educators should engage in philosophical reflection to better understand their own beliefs and values, and to make more informed decisions about their practice. The fourth part of the paper discusses the relationship between philosophy and education policy. It suggests that philosophy can provide a theoretical foundation for educational policy, helping to ensure that policies are grounded in sound philosophical principles. The fifth part of the paper discusses the role of philosophy in teacher education. It argues that philosophy should be an integral part of teacher education, helping to prepare teachers to engage in philosophical reflection and to make informed decisions about their practice. The sixth part of the paper discusses the relationship between philosophy and educational research. It suggests that philosophy can provide a theoretical framework for educational research, helping to identify and explore important issues in education. The seventh part of the paper discusses the role of philosophy in educational reform. It argues that philosophy can provide a critical perspective on educational reform, helping to identify and challenge dominant assumptions about the nature and purpose of education. The eighth part of the paper discusses the relationship between philosophy and educational practice. It suggests that philosophy can provide a theoretical foundation for educational practice, helping to ensure that practice is grounded in sound philosophical principles. The ninth part of the paper discusses the role of philosophy in educational leadership. It argues that philosophy can provide a theoretical foundation for educational leadership, helping to ensure that leaders are grounded in sound philosophical principles. The tenth part of the paper discusses the relationship between philosophy and educational evaluation. It suggests that philosophy can provide a theoretical foundation for educational evaluation, helping to ensure that evaluation is grounded in sound philosophical principles. The eleventh part of the paper discusses the role of philosophy in educational policy-making. It argues that philosophy can provide a theoretical foundation for educational policy-making, helping to ensure that policies are grounded in sound philosophical principles. The twelfth part of the paper discusses the relationship between philosophy and educational reform. It suggests that philosophy can provide a critical perspective on educational reform, helping to identify and challenge dominant assumptions about the nature and purpose of education.

ROLA WANADU W METABOLIZMIE KOMÓRKI ZWIERZĘCEJ

VANADIUM AND ITS SIGNIFICANCE IN ANIMAL CELL METABOLISM

Halina ZAPOROWSKA

Zakład Biologii Komórki, Instytut Biologii UMCS w Lublinie

Streszczenie: Wanad jest pierwiastkiem śladowym powszechnie występującym w środowisku oraz tkankach roślin i zwierząt. W komórce gromadzi się przede wszystkim w jądrze, mitochondriach i cytozolu. W stężeniach mikromolarnych może wykazywać działanie mitogenne, regulować aktywność czynników wzrostu oraz wielu enzymów. Działa ponadto jako prooksydant zarówno *in vitro*, jak i *in vivo*. W literaturze opisano także działanie mutagenne i karcinogenne tego pierwiastka.

Słowa kluczowe: wanad, metabolizm fosforanów inozytolu, jony wapnia, procesy wolnorodnikowe

Summary: Vanadium is a trace element which occurs commonly in the environment, plant and animal tissues. In the cell, the highest vanadium concentration were found in the nuclei, mitochondria and cytosol. In micromolar concentrations vanadium exerts mitogenic effect, regulates growth factors and many enzymes activities. Moreover, this element acts as pro-oxidant both *in vitro* and *in vivo*. In the literature was described also mutagenic and carcinogenic effect of this element.

Key words: vanadium, inositolphosphates metabolism, calcium ions, free radical processes.

WSTĘP

Wanad jest pierwiastkiem powszechnie występującym w glebie, wodzie, roślinach oraz tkankach zwierzęcych [60]. Znaczne jego ilości wykryto w ropie naftowej oraz węgla kamiennym [58]. Związki wanadu wykorzystywane są m.in. w przemyśle metalurgicznym, chemicznym, szklarskim i ceramicznym [32], dlatego w okolicach,

gdzie są zlokalizowane tego typu zakłady przemysłowe, znaczne ilości wanadu są uwalniane do środowiska (rys. 1). Prowadzi to do wzrostu jego stężenia w powietrzu, glebie i wodzie [27]. Ze środowiska wanad jest pobierany przez rośliny i dalej poprzez łańcuch pokarmowy dostaje się do organizmów zwierząt oraz człowieka.

Podobnie jak wiele innych pierwiastków, wanad w małych dawkach oddziałuje korzystnie na rozwój organizmów zwierzęcych. Stwierdzono, że niedobór wanadu u ssaków powoduje zahamowanie wzrostu oraz zaburzenia: funkcji generatywnych, metabolizmu tarczycy, procesu mineralizacji kości, gospodarki lipidowej i węglowodanowej organizmu [27, 51, 54]. Na tej podstawie Nielsen i Uthus zaproponowali, żeby uznać wanad za niezbędny pierwiastek śladowy dla prawidłowego wzrostu i rozwoju zwierząt oraz ludzi [51]. Dzielne zapotrzebowanie organizmu ludzkiego na wanad wynosi ok. 10 μg , zaś jego spożycie zależy od diety i oceniane jest na 10–60 μg [36, 51], zatem niedoboru wanadu raczej nie należy się obawiać.

Większe dawki tego pierwiastka w postaci różnych związków są jednak toksyczne i w sąsiedztwie zakładów przemysłu petrochemicznego oraz ceramicznego występuje zagrożenie szkodliwym oddziaływaniem wanadu. Stąd duże zainteresowanie metabolizmem oraz toksykologią wanadu i liczne badania nad jego wpływem na organizm zwierząt laboratoryjnych oraz człowieka [4, 10, 21, 25, 27, 35, 51, 83, 84]. Jednak nadal nie do końca poznano rolę tego pierwiastka w metabolizmie komórki. W ostatnich latach zaczęły ukazywać się liczne prace na ten temat. Celem niniejszego artykułu przeglądowego jest usystematyzowanie tych wiadomości.

WYSTĘPOWANIE WANADU W ORGANIZMACH SSAKÓW I CZŁOWIEKA

Obliczono, że organizm dorosłego człowieka zawiera ok. 100 μg wanadu, z czego połowa znajduje się w kościach. Pozostała ilość gromadzi się głównie w wątrobie, nerkach i śledzionie [27]. Wymienione narządy są również miejscem największej akumulacji wanadu u innych ssaków, co związane jest ze znaczeniem tych organów w detoksyfikacji organizmu i wydalaniu szkodliwych substancji [2,22,23,57].

We krwi ssaków wanad stanowi ok 0,2–0,5 ng/g , z czego prawie 80% występuje w osoczu w połączeniu z transferyną [22]. Akumulacja wanadu w hepatocytach zachodzi dzięki wymianie wanadu pomiędzy osoczną transferyną a wątrobową ferrytyną [64].

W niektórych schorzeniach poziom wanadu we krwi ludzi ulega znacznym wahaniom. Wyraźny wzrost stężenia wanadu we krwi obserwowano m.in. w przypadkach niewydolności nerek [7, 62] oraz psychozach maniako-depresyjnych [13, 50]. Znaczny spadek zaś stwierdzono w miażdżycy, chorobach wrzodowych przewodu pokarmowego oraz marskości wątroby [53]. Dotychczas brak jest jednak przekonu-



Rys. 1. Źródła emisji związków wanadu do środowiska

jących danych, że etiologia określonej choroby bezpośrednio związana jest z niedoborem lub nadmiarem wanadu.

Badania wewnątrzkomórkowej akumulacji wanadu wykonywano m.in. na komórkach wątroby i nerek zwierząt laboratoryjnych, którym podawano wcześniej w iniekcji dożylniej lub dotchawiczo odpowiednią dawkę ^{48}V . Stwierdzono, że hepatocyty i komórki nerki gromadzą wanad przede wszystkim w jądrze, mitochondriach i cytozolu [22, 23].

Komórki wielu linii ustalonych hodowanych *in vitro* na pożywkach z dodatkiem różnych związków wanadu gromadziły ten pierwiastek głównie w jądrze i mitochondriach, mniej natomiast w cytozolu [76].

PRZEMIANY METABOLICZNE WANADU

W płynach ustrojowych i zewnątrzkomórkowo wanad występuje głównie w formie 5-wartościowej [38], zazwyczaj w postaci jonów: H_2VO_4^- , HVO_4^{2-} lub VO_3^- [29, 76]. Przez błonę komórkową przenika kanałem dla anionów [76]. W komórce zaś wanad 5-wartościowy ulega bioredukcji do formy 4-wartościowej. Proces ten odbywa się głównie przy udziale glutationu, katechołu, cysteiny, NADH, NADPH oraz kwasu L-askorbinowego [38, 41, 42, 65]. Shi i Dalal stwierdzili, że reduktaza glutationowa (GR; EC 1.6.4.2) może również pełnić funkcję reduktazy wanadanu [71]. Powstały podczas redukcji jon wanadylowy (VO^{2+}) wpływa na metabolizm komórki, co stwierdzono w licznych badaniach *in vitro* (rys. 2) [43, 46, 58, 65, 76].

Jon wanadylowy wykazuje dużą reaktywność *in vitro*. W reakcji z ADP i ATP powstają połączenia: AMPV zamiast ADP oraz AMPV_2 lub ADPV jako analogi ATP

[28]. Jon VO^{2+} może również tworzyć kompleksy z glutationem, aminokwasami, zwłaszcza z kwasem glutaminowym, cysteiną i glicyną oraz peptydami i białkami [15, 26, 45]. Z połączeń wanadu z białkami najlepiej poznane są kompleksy z hemoglobina, transferyną, ferrytyną, laktoferyną i kalmoduliną [3, 52, 60, 64]. Stwierdzono, np. że VO^{2+} z kalmoduliną łączy się w stosunku stechiometrycznym 4:1 [52]. Znane są również połączenia VO^{2+} z węglowodanami. W reakcji wanadu z glukozą powstaje np. glukozo-6-wanadan [31]. Na razie trudno jednak odpowiedzieć na pytanie, które z wymienionych połączeń wanadu mogą odgrywać istotną rolę *in vivo*.

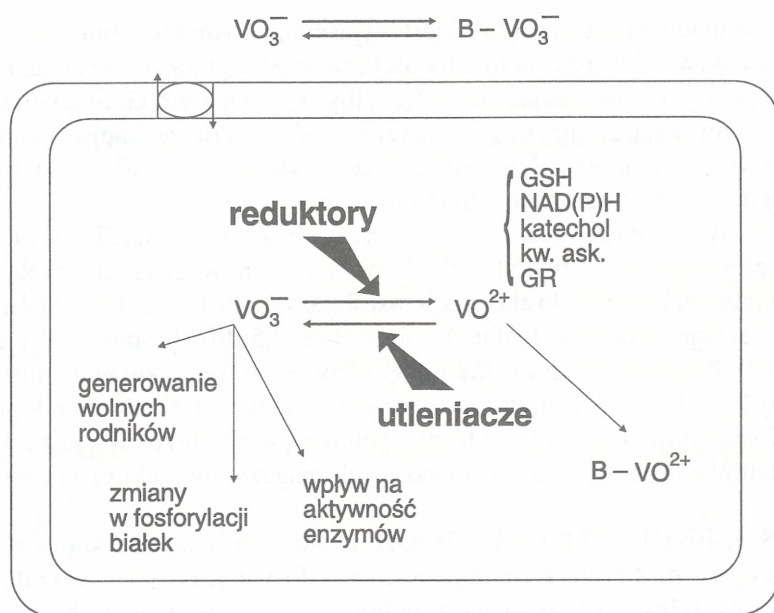
Związki wanadu tworzą w środowisku wodnym, poza monomerami (H_2VO_4^-), także liczne oligomery, zwłaszcza dimery ($\text{H}_2\text{V}_2\text{O}_7^{2-}$), tetramery ($\text{V}_4\text{O}_{12}^{4-}$), pentamery ($\text{V}_5\text{O}_{15}^{5-}$) oraz dekamery ($\text{V}_{10}\text{O}_{28}^{6-}$). Wzajemny ich stosunek ilościowy w roztworze zależy przede wszystkim od stężenia roztworu, rodzaju użytego buforu oraz pH środowiska. Stwierdzono np., że w buforze fosforanowym o pH=7 przeważają tetramery [14]. Wykazano także, że wyniki badań prowadzonych *in vitro* zależą od rodzaju powstałych oligomerów. Tym można więc tłumaczyć różnice w badaniach otrzymywane przez kolejnych autorów [66]. Lobert i wsp. [44] wykazali np., że dimery i tetramery mają mały wpływ na polimeryzację mikrotubul, podczas gdy dekamery powstałe w 750 μM roztworze ortowanadanu sodu wyraźnie hamują ten proces. Mechanizm tego działania polegał nie tylko na bezpośredniej interakcji z tubuliną [14, 40], ale również na hamowaniu wiązania do mikrotubul białek towarzyszących: MAP2 i tau. Nie obserwowano natomiast wpływu wanadu na morfologię mikrotubul [44].

Liczne eksperymenty potwierdziły wpływ wanadu na procesy fosforylacji i defosforylacji białek zachodzące w komórkach [46, 76, 77, 86]. Fosforylacja białek przez kinazy i defosforylacja przy udziale fosfataz to kluczowe reakcje w regulacji metabolizmu, proliferacji i różnicowania komórek. Zor i wsp. [87] stwierdzili, że makrofagi myszy inkubowane w obecności 250 μM NaVO_3 i 200–250 μM H_2O_2 wykazują podwyższoną aktywność kinazy białkowej C oraz kinazy tyrozynowej. Natomiast aktywność białkowej fosfatazy tyrozynowej w tych samych warunkach była hamowana. Z tych doświadczeń oraz badań innych autorów wynika, że wanad może regulować aktywność wielu enzymów [58, 83] oraz uczestniczyć w procesach wolnorodnikowych [11, 20, 75].

W komórce możliwa jest również reakcja utlenienia wanadyliu. Dlatego forma, w jakiej wanad występuje wewnątrz komórki, zależy od stosunku ilościowego całej puli reduktorów do utleniaczy metabolicznych (rys. 2).

WPŁYW WANADU NA SYNTEZĘ WTÓRNYCH PRZEKAŹNIKÓW INFORMACJI

Każda komórka, tkanka, określony organ i wreszcie cały organizm może sprawnie funkcjonować jedynie w warunkach prawidłowego przekazu informacji. Przepływ



Rys. 2. Transport wanadu do komórki i jego wpływ na procesy wewnątrzkomórkowe (rysunek zmieniony i uzupełniony wg [38]): B – białko, GSH – zredukowany glutation, kw. ask. – kwas L-askorbinowy, GR – reduktaza glutationowa

informacji między komórkami odbywa się dzięki tzw. zewnątrzkomórkowym (pierwotnym) i wewnątrzkomórkowym (wtórnym) przekąźnikom. Pierwotne przekąźniki to głównie hormony, neurotransmitery oraz czynniki wzrostu. Sygnały, które docierają do komórki, są odbierane przez białka wbudowane w błonę komórkową i przekazywane poprzez cytoplazmę aż do jądra, gdzie wywołują ekspresję odpowiednich genów. Z wtórnych przekąźników informacji najlepiej poznany są cykliczne nukleotydy (np. cAMP, cGMP), trifosforan inozytoli (IP_3), diacyloglicerol (DAG) oraz niektóre jony np. Ca^{2+} i Na^+ [6, 80].

W badaniach *in vitro* stwierdzono, że wanad może regulować stan aktywności wtórnych przekąźników informacji. Wykazano, że pierwiastek ten działa stymulująco na aktywność cykazy adenylowej (AC; EC 4.6.1.1.), enzymu katalizującego reakcję przekształcenia ATP w cAMP. Wzrost aktywności cykazy adenylowej pod wpływem wanadu obserwowano m.in. w błonach płytek krwi inkubowanych z dodatkiem $100 \mu\text{M}$ NH_4VO_3 [1] oraz komórek mięśnia sercowego kotów w obecności $300 \mu\text{M}$ NH_4VO_3 lub VCl_3 [68]. W plazmalemie komórek izolowanych z nadnerczy szczurów aktywność AC była hamowana przez jon wanadylowy (VO^{2+}) w stężeniu 1 mM , podczas gdy wanad w postaci anionu VO_4^{3-} i w tym samym stężeniu nie miał takiego działania [37].

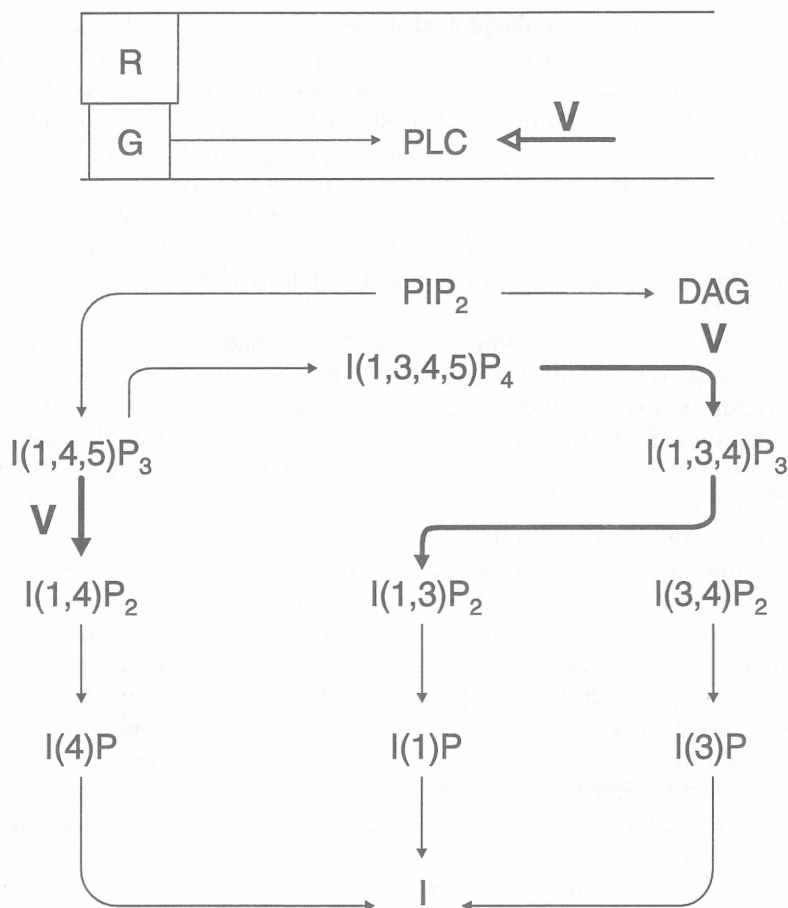
Wpływ wanadu na aktywność AC jest wyjaśniany dwojako. Jedni autorzy tłumaczą zmiany aktywności enzymu możliwością tworzenia przez ortowanadan kompleksu z GDP, który to "naśladować" GTP łączyłby się z białkiem G_s aktywującym AC [17]. Inni zaś uważają, że enzym ten może zawierać specyficzne miejsca wiązania dla oksyanionów (np. jonu wanadylowego), które przyłączając się tam mogłyby bezpośrednio regulować aktywność enzymu [48].

Powstanie dwóch następnych, wtórnych przekazników informacji (IP_3 i DAG) jest także procesem enzymatycznym [6,80]. Aktywacja błonowego receptora R prowadzi za pośrednictwem białka G do aktywacji fosfolipazy C (PLC; EC 3.1.4.3). Enzym ten katalizuje reakcję hydrolizy fosfatydyloinozytolo(4,5)difosforanu (PIP_2) do IP_3 i DAG (rys. 3). Powstały IP_3 gromadzi się w cytoplazmie i przy odpowiednim stężeniu może łączyć się ze specyficznymi receptorami w błonach retikulum endoplazmatycznego. Końcowym efektem pobudzenia tych receptorów przez IP_3 jest uwalnianie Ca^{2+} do cytoplazmy z wewnątrzkomórkowych magazynów, jakimi są cysterny ER [6].

Zick i Sagi-Eisenberg [86] stwierdzili, że 1 mM ortowanadan sodowy (Na_3VO_4) w kombinacji z 3 mM H_2O_2 stymuluje *in vitro* fosforylację tyrozyny w białkach oraz zwiększa poziom IP_3 w komórkach takich linii, jak: komórki nowotworowe wątroby szczura (Fa0), komórki mięśni (BC3H-1), komórki jajnika chomika chińskiego (CHO-T), oraz bazofilne komórki leukemiczne szczura (RBL). Natomiast Morita i wsp. [49] wykazali, że sam Na_3VO_4 w stężeniu 2-krotnie wyższym powoduje wzrost poziomu IP_3 w tkance tłuszczowej szczurów. Randazzo i wsp. [59] opisali wzrost poziomu fosfatydyloinozytoli w fibroblastach linii NIH 3T3 inkubowanych w pożywce z dodatkiem 100 i 1000 $\mu M Na_3VO_4$.

Z kolei metawanadan sodowy ($NaVO_3$) już w zakresie stężeń 0,1–0,5 mM stymulował inkorporację ^{32}P - ortofosforanu do fosfatydyloinozytoli i kwasu fosfatydylowego w mikronaczyniach mózgu. Wyższe stężenia (rzędu 2–4 mM) miały mniejszy wpływ na ten proces [12].

Wzrost stężenia IP_3 w badanych komórkach wynika z jednej strony z aktywacji fosfolipazy C (PLC; EC 3.1.4.3.) przez wanad [17], z drugiej zaś z hamowania defosforylacji fosforanów inozytoli [8]. Wykazano, że omawiany pierwiastek hamuje *in vitro* hydrolizę inozytolo(1,4,5) trisfosforanu [$I(1,4,5)P_3$] do inozytolo (1,4) bisfosforanu [$I(1,4)P_2$], inozytolo (1,3,4) trisfosforanu [$I(1,3,4)P_3$] do inozytolo (1,3) bisfosforanu [$I(1,3)P_2$] oraz inozytolo(1,3,4,5)tetrakisfosforanu [$I(1,3,4,5)P_4$] do inozytolo(1,3,4)trisfosforanu [$I(1,3,4)P_3$]. Mechanizm tego działania polega na hamowaniu aktywności odpowiednich fosfomonoesteraz inozytoli (rys. 3), zatem wanad zwiększa w komórce akumulację następujących form inozytoli: $I(1,4,5)P_3$, $I(1,3,4)P_3$ oraz $I(1,3,4,5)P_4$ [8, 17, 49, 86].



Rys. 3. Wpływ wanadu na cykl fosforanów inozytoli: v → hamujący wpływ wanadu na odpowiednie fosfomonoesterazy inozytoli; v ⇨ stymulujący wpływ wanadu; R – receptor; G – białko wiążące GTP; PLC – fosfolipaza C; PIP₂ – fosfatydyloinozytolo-(4,5)bisfosforan; DAG – diacyloglicerol; I(1,4,5)P₃ – inozytolo(1,4,5)trisfosforan; I(1,3,4)P₃ – inozytolo(1,3,4)trisfosforan; I(1,3,4,5)P₄ – inozytolo(1,3,4,5)tetrakisfosforan; I(1,4)P₂, I(1,3)P₂ i I(3,4)P₂ – odpowiednie inozytolo(bis)fosforany; I(4)P, I(1)P i I(3)P – odpowiednie inozytolo(fos)forany; I – inozytol (schemat opracowano na podstawie cytowanej literatury)

WPLYW WANADU NA AKUMULACJĘ I TRANSPORT JONÓW WAPNIA W KOMÓRCE

Omówiony wpływ wanadu na metabolizm fosforanów inozytoli sugeruje pośrednią rolę tego pierwiastka w przekazywaniu wewnątrzkomórkowych sygnałów. IP₃ odgrywa podstawową rolę w regulacji stężenia jonów wapniowych w komórce [6]. Wzrost poziomu IP₃ pod wpływem wanadu zakłóca więc komórkową homeostazę.

Wspomniana wcześniej stymulacja fosfolipazy C przez wanad oraz hamowanie fosfomonoesteraz inozytolu prowadzi do wzrostu poziomu IP_3 w komórce. Powoduje to mobilizację jonów Ca^{2+} z RE i wzrost ich stężenia w cytozolu. Zwiększenie napływu jonów Ca^{2+} do komórki ze środowiska ma prawdopodobnie mniejsze znaczenie. Wykazano bowiem w badaniach z erytrocytami, komórkami linii ustalonej oraz izolowanych z narządów zwierząt laboratoryjnych, że związki wanadu powodują inhibicję ATP-az kationozależnych, w tym Ca^{2+} -ATPazy i Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATPazy [18, 39, 83]. Jedynie w komórkach *carcinoma epidermalis* linii A431 hodowanych *in vitro* opisano stymulujący wpływ jonów wanadu na transport Ca^{2+} do komórki [wg 30].

Gullapalli i wsp. [30] badali wpływ podawania wanadu na wewnątrzkomórkowe rozmieszczenie jonów wapnia. Okazało się, że frakcja mitochondrialna otrzymana z wątroby szczurów traktowanych wcześniej dootrzewnowo związkami wanadu gromadziła statystycznie znamienne mniej Ca^{2+} niż taka sama frakcja otrzymana od zwierząt kontrolnych. Natomiast w cytozolu obserwowano znamienne wyższy poziom Ca^{2+} niż w kontroli. Wskazuje to na pewien hamujący wpływ wanadu na transport jonów wapnia do mitochondrium.

Trudno jednoznacznie wytłumaczyć mechanizm działania wanadu w mobilizacji jonów Ca^{2+} . Wydaje się, że działanie poprzez wzrost stężenia IP_3 nie jest jedyną możliwością. Wyniki badań Gullapalli i wsp. pozwalają przypuszczać, że orto- i metawanadan sodu w stężeniu 100 μM może również działać na poziomie błony poprzez aktywację α -adrenergicznych receptorów. Następstwem tego mogą być zmiany w błonowych kanałach jonowych i zwiększony przez to napływ jonów Ca^{2+} do komórki. Za możliwością takiego działania wanadu przemawia wynik doświadczeń z fenoksybenzaminą. Podanie tego typowego antagonisty receptorów α -adrenergicznych, wyraźnie hamowało indukowaną przez wanad mobilizację jonów wapnia [30]. Jednak rola wanadu w transporcie jonów Ca^{2+} nie jest w pełni poznana i wymaga jeszcze dalszych badań oraz obserwacji.

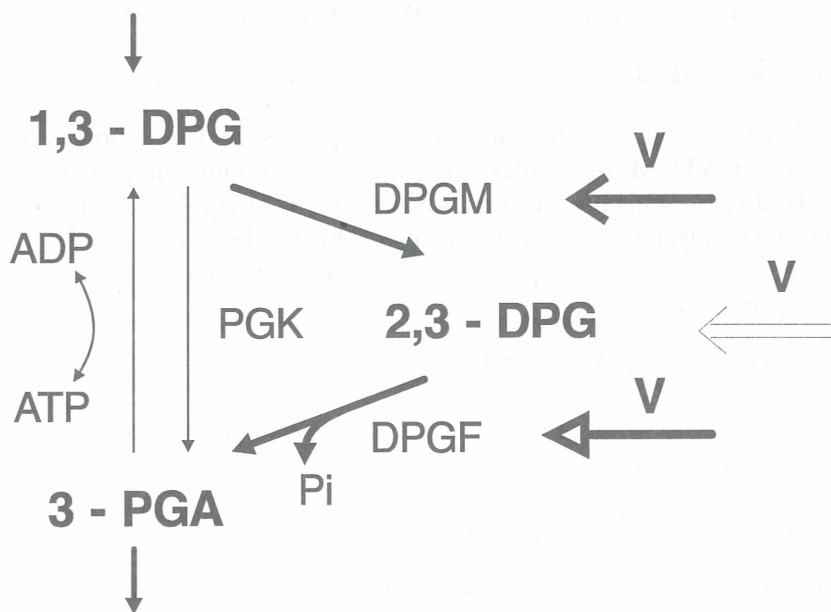
WPŁYW WANADU NA METABOLIZM ERYTROCYTÓW

Wanad powoduje zmiany przepuszczalności błony erytrocytów, co może być przyczyną zaburzeń metabolizmu tych komórek. Wykazano, że pierwiastek ten hamuje aktywny transport jonów Ca^{2+} , a zwiększa selektywną przepuszczalność jonów K^+ przez błony erytrocytów. Ponadto działa hamująco na aktywność Na^+ , K^+ -ATPazy, Ca^{2+} -ATPazy, Ca^{2+} , Mg^{2+} -APTazy, fosfogliceromutazy, fosfoglukomutazy, dehydrogenazy 6-fosfoglukonianowej oraz kinazy adenylowej. Natomiast działa stymulująco na aktywność NADH oksydazy, cyklazy adenylowej oraz fosfatazy 2,3-bisfosfoglicerynianowej [wg 83].

Badania przeprowadzone na erytrocytach *in vitro* wykazały wpływ wanadu na transport tlenu przez hemoglobinę. Erytrocyty posiadają charakterystyczny szlak metaboliczny – cykl Rapoporta-Lueberinga, który stanowi odgałęzienie glikolizy na

poziomie kwasu 1,3-dwufosfoglicerynowego (1,3-DPG). W cyklu tym z 1,3-DPG przy udziale enzymu fosfogliceromuazy powstaje kwas 2,3-dwufosfoglicerynowy (2,3-DPG), który reguluje powinowactwo hemoglobiny do tlenu (rys. 4). 2,3-DPG ma zdolność wiązania się z cząsteczką hemoglobiny nieutlenowanej, przez co traci ona powinowactwo do tlenu. Zatem wydajność przenoszenia tlenu przez hemoglobinę zależy od stężenia 2,3-DPG w erytrocytach [73].

Erytrocyty ludzkie inkubowane *in vitro* z jonami wanadu posiadają obniżony poziom 2,3-DPG, co jest przyczyną wzrostu powinowactwa hemoglobiny do tlenu. Spadek poziomu 2,3-DPG w krwinkach czerwonych wynika z jednej strony z hamującego wpływu wanadu na aktywność difosfogliceromuazy, z drugiej zaś strony wanad aktywując difosfoglicerofosfatazę powoduje defosforylację 2,3-DPG do 3-PGA (rys. 4) [wg 83]. Wykazano również, że wanad wzmacnia *in vitro* nieenzymatyczną hydrolizę 2,3-DPG do nieorganicznego fosforu i 3-PGA [74].



Rys. 4. Cykl Rapoport-Lueberinga w erytrocytach: 1,3-DPG – kwas 1,3-dwufosfoglicerynowy; 2,3-DPG – kwas 2,3-dwufosfoglicerynowy; 3-PGA – kwas 3-fosfoglicerynowy; DPGM – difosfogliceromuaza (EC 2.7.5.3); DPGF – difosfoglicerofosfataza (EC 3.1.3.13); PGK – kinaza fosfoglicerynianowa (EC 2.7.2.3); → v hamujący wpływ wanadu; ⇌ v stymulujący wpływ wanadu; ⇐ v stymulacja nieenzymatycznej hydrolizy przez wanad

WANAD A PROCESY WOLNORODNIKOWE

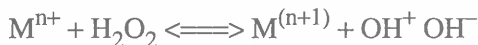
Wolne rodniki to atomy lub grupy atomów mające niesparowane elektrony na orbicie zewnętrznej. Są one niezwykle reaktywne i chemicznie niestabilne, ponieważ mogą być donatorami niesparowanego elektronu lub pobierać taki elektron od innej cząsteczki [33, 79]. W wielu procesach wolnorodnikowych wyróżniono trzy podstawowe etapy: inicjację, propagację czyli tworzenie nowych rodników w reakcjach łańcuchowych oraz terminację tzn. unieczynnianie wolnych rodników [79].

Na podstawie wyników dotychczasowych badań można stwierdzić, że wanad wpływa na wszystkie trzy wymienione etapy, chociaż proces propagacji i układ antyoksydacyjny wydają się być głównym miejscem docelowym działania tego pierwiastka [63, 70, 85]. Wolne rodniki (szczególnie anionorodnik ponadtlenkowy: O_2^-) tworzą się *in vivo* w wyniku interakcji tlenu lub innych związków z wolnymi elektronami powstającymi podczas reakcji oksydoredukcyjnych w komórce [79]. Powstały anionorodnik ponadtlenkowy może reagować z drugim takim rodnikiem i w obecności wodoru dawać podczas tzw. reakcji dysmutacji, katalizowanej przez dysmutazę ponadtlenkową (SOD), cząsteczkę nadtlenu wodoru [33]:



Powstała cząsteczka H_2O_2 jest substratem dla peroksydazy glutationowej (GSH-Px) i katalazy (CAT). Może również reagować z anionorodnikiem ponadtlenowym, co prowadzi do powstania bardziej reaktywnego rodnika hydroksylowego.

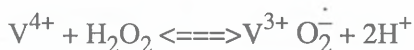
Pierwiastki przejściowe układu okresowego, takie jak: Fe^{2+} , Cu^+ , Co^{2+} i V^{4+} [56], mogą także reagować z H_2O_2 i prowadzić do powstania wolnych rodników hydroksylowych zgodnie z reakcją:



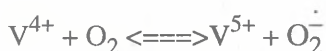
Zatem 4-wartościowy wanad w reakcji z H_2O_2 prowadzi do powstania rodnika hydroksylowego [11, 20]:



Możliwe są również reakcje dające anionorodnik ponadtlenkowy [75]:



lub



Powstałe pod wpływem wanadu wolne rodniki tlenowe mogą zapoczątkowywać autokatalityczną peroksydację lipidów zawierających nienasycone kwasy tłuszczowe. Prowadzi to do powstania w komórce wielu organicznych wolnych rodników, dienów oraz aldehydów np. aldehydu dimalonowego (MDA). Związek ten, reagując z aminokwasami białek plazmalemy tworzy wiązania typu zasady Schiffa. Prowadzi to do agregacji białek, usztywnienia błony komórkowej i przez to do obniżenia jej zdolności do odkształcania się. W przypadku erytrocytów, gdy nadal utrzymuje się działanie wanadu jako czynnika generującego wolne rodniki, zmiany w błonie są tak znaczące, że prowadzą do hemolizy [34,55].

Wykazano, że w reakcjach *in vitro* z izolowanymi błonami komórkowymi lub homogenatami narządów wewnętrznych w obecności wanadu są generowane aktywne formy tlenu i wzmagany jest proces peroksydacji lipidów (LPO). Jako wskaźnik LPO oznaczany był najczęściej poziom MDA [25, 70]. Podobne zjawisko zachodzi również *in vivo*, o czym świadczy wzrost poziomu MDA we krwi oraz narządach wewnętrznych zwierząt laboratoryjnych zatrutowanych związkami wanadu [25, 84].

Znacznie mniej wiadomo o wpływie wanadu na enzymy antyoksydacyjne. Serra i wsp. [69], badając *in vitro* wpływ VOSO_4 i NH_4VO_3 w stężeniu 0,1 mM na aktywność preparatów CAT z wątroby oraz GSH-Px i Cu-Zn SOD z erytrocytów wołu nie stwierdzili istotnych zmian w aktywności tych enzymów. Podobnie Elfant i Keen [25] nie obserwowali zmian aktywności wątrobowej Cu-Zn SOD i Mn-SOD u szczurów otrzymujących pożywienie z dodatkiem 75 μg V/g paszy. Hamujący wpływ NaVO_3 na aktywność preparatów Cu-Zn SOD *in vitro* wykazał Apella i wsp., którzy przebadali wymieniony związek w zakresie stężeń 10^{-5} – 10^{-2} M [5].

Stosunkowo liczne prace opisują wpływ wanadu na inne składniki układu antyoksydacyjnego, zwłaszcza na poziom kwasu L-askorbinowego i GSH w organizmie zwierzęcym. We wszystkich tych przypadkach stwierdzono u zwierząt, otrzymujących różne związki wanadu w diecie lub wodzie do picia, wyraźny spadek poziomu kwasu L-askorbinowego i GSH we krwi i narządach wewnętrznych, zwłaszcza w wątrobie i nerce [25,41,70,85].

PODSUMOWANIE

Wanad jest pierwiastkiem przejściowym układu okresowego powszechnie występującym w przyrodzie. W środowisku nie powoduje tak dużych skażeń jak inne pierwiastki, szczególnie metale ciężkie. W większych dawkach dostaje się do organizmu zwierząt i ludzi żyjących w pobliżu zakładów przemysłu petrochemicznego i ceramicznego. W małych dawkach jest uważany za mikroelement niezbędny do prawidłowego wzrostu i rozwoju zwierząt.

W organizmie ssaków gromadzi się przede wszystkim w kościach, wątrobie i nerkach. W komórkach akumuluje się głównie w jądrze, mitochondriach i cytozolu [22, 23, 27, 57, 76].

W stężeniach od nano- do mikromolarnych pierwiastek ten stymuluje syntezę DNA, proliferację oraz różnicowanie wielu linii komórkowych *in vitro* [46, 61, 76]. W stężeniach wyższych jednak hamuje podziały i międzykomórkową adhezję. W kulturach *in vitro* powoduje wzrost liczby komórek dwu-, wielojądrzastych oraz olbrzymich [24, 81, 82]. Może również prowadzić do aberracji chromosomalnych, zwłaszcza liczbowych [47]. W literaturze opisano także karcinogenne [76] jak i antykarcinogenne działanie tego pierwiastka [67].

W komórkach wanad wpływa na aktywność wielu enzymów, może też regulować syntezę wtórnych przekazników informacji oraz proces przekazu sygnałów w komórce. Stymuluje np. aktywność cyklazy adenylowej, fosfolipazy C, fosfolipazy D oraz A_2 . Natomiast działa hamująco m.in. na aktywność Na^+ , K^+ -ATPazy, Ca^{2+} -ATPazy, Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATPazy, kinazy adenylowej [9, 58, 83, 87]. Na skutek zmian aktywności wymienionych enzymów wanad wpływa na przepuszczalność i elastyczność błony komórkowej, a także zmienia stężenie jonów wapniowych w cytozolu. W erytrocytach poprzez zmiany stężenia 2,3-DPG reguluje powinowactwo hemoglobiny do tlenu.

Wanad działa ponadto jako prooksydant. W jego obecności są generowane wolne rodniki oraz wzmagany proces peroksydacji lipidów [11, 20, 56]. Pierwiastek ten wykazuje również synergistyczne działanie z innymi oksydantami. Z drugiej strony powoduje obniżenie poziomu kwasu L-askorbinowego i GSH we krwi oraz narządach wewnętrznych badanych zwierząt, przez co osłabia układ antyoksydacyjny w komórkach i całym organizmie. Wyniki badań własnych oraz innych autorów sugerują zatem konieczność uzupełniania diety naturalnymi antyoksydantami (np. kwasem L-askorbinowym lub β -karotenem) w warunkach zawodowego narażenia na wanad lub zwiększonej jego podaży w diecie. Związki te powinny być również brane pod uwagę jako ewentualne preparaty uzupełniające w przypadku stosowania wanadu w badaniach farmakologicznych.

W ostatnich latach opisano także insulinopodobne działanie wanadu [16, 19, 72, 78]. Stąd duże zainteresowanie wpływem tego pierwiastka na metabolizm komórek wątroby i trzustki. Prowadzone są również badania nad wpływem wanadu na organizm zwierząt z doświadczalnie wywołaną cukrzycą. Jednak zastosowanie wanadu w farmakologii wymaga jeszcze wielu badań *in vitro*, a zwłaszcza *in vivo*.

LITERATURA

- [1] AJTAI K, TUKA K, BIRÓ ENA. The activation of human platelet adenylate cyclase by vanadate. *Thromb Res* 1983; **29**: 371-376.

- [2] AL-BAYATI MA, RAABE OG, GIRI SN, KNAAK JB. Distribution of vanadate in the rat following subcutaneous and oral routes of administration. *J Am Coll Toxicol* 1991; **10**: 233–241.
- [3] AHMED RH, NIEVES J, KIM L, ECHEGOYEN L, PUETT D. Vanadyl binding to a testicular S-100-like protein and to calmodulin: electron paramagnetic resonance spectra of VO^{2+} -protein complexes. *J Protein Chem* 1987; **6**: 431–439.
- [4] ALTAMIRANO-LOZANO M, ALVAREZ-BARRERA L, ROLDÁN-REYES E. Cytogenetic and teratogenic effects of vanadium pentoxide on mice. *Med Sci Res* 1993; **21**: 711–713.
- [5] APELLA MC, GONZALEZ SN, BARAN EJ. The inhibitory effect of vanadium oxoanions on the activity of copper-zinc superoxide dismutase. *Biol Trace Elem Res* 1988; **18**: 123–129.
- [6] BARAŃSKA J. Rozpad fosfolipidów a przekazywanie informacji w komórce. Monografia Pol Tow Biochem Warszawa 1992.
- [7] BELLO-REUSS EN, GRADY TP, MAZUMDAR DC. Serum vanadium levels in chronic renal disease. *Ann Intern Med* 1979; **91**: 743.
- [8] BENCHERIF M, LUKAS RJ. Vanadate amplifies receptor-mediated accumulation of inositol trisphosphates and inhibits inositol tris- and tetrakis-phosphatase activities. *Neuroscience Lett* 1992; **134**: 157–160.
- [9] BOURGOIN S, GRINSTEIN S. Peroxides of vanadate induce activation of phospholipase D in HL-60 cells. Role of tyrosine phosphorylation. *J Biol Chem* 1992; **267**: 11908–11916.
- [10] BOSQUE MA, DOMINGO JL, LLOBET JM, CORBELLA J. Variability in the embryotoxicity and fetotoxicity of vanadate with the day of exposure. *Vet Hum Toxicol* 1993; **35**: 1–3.
- [11] CARMICHAEL AJ. Vanadyl-induced Fenton-like reaction in RNA. An ESR and spin trapping study. *FEBS Lett* 1990; **261**: 165–170.
- [12] CATALÁN RE, MARTINEZ AM, ARAGONÉS MD, MIGUEL BG, DIAZ G, HERNÁNDEZ F. Pertussis toxin-insensitive regulation of phosphatidylinositol hydrolysis by vanadate in brain microvessels. *Biochem Int* 1991; **25**: 985–993.
- [13] CONRIC, SIMONOFF M, FLEURY B, MOREAUF. Does vanadium play a role in depressive states? *Biol Psychiatry* 1986; **21**: 546–548.
- [14] CORREIA JJ, LIPSCOMB LD, DABROWIAK JC, ISERN N, ZUBIETA J. Cleavage of tubulin by vanadate ion. 1994; **309**: 94–104.
- [15] CRANS DC, BUNCH RL, THEISEN LA. Interaction of trace levels of vanadium (IV) and vanadium (V) in biological systems. *J Am Chem Soc* 1989; **111**: 7597–7607.
- [16] DAI S, THOMPSON KH, McNEILL JH. One-year treatment of streptozotocin-induced diabetic rats with vanadyl sulphate. *Pharmacol Toxicol* 1994; **74**: 101–109.
- [17] DEHAYE JP, GROSFILS K. Interaction of vanadate with isolated rat parotid acini. *Gen Pharmacol* 1993; **24**: 479–488.
- [18] DELFERT DM, McDONALD JM. Vanadyl and vanadate inhibit Ca^{2+} transport systems of the adipocyte plasma membrane and endoplasmic reticulum. *Arch Biochem Biophys* 1985; **241**: 665–672.
- [19] DE TATA V, NOVELLI M, CAVALLIANI G, MASIELLO P, GORI Z, BERGAMINI E. Beneficial effects of the oral administration of vanadyl sulphate on glucose metabolism in senescent rats. *J Gerontol* 1993; **48**: B191–B195.
- [20] DING M, GANNETT PM, ROJANASAKUL Y, LIU K, SHI X. One-electron reduction of vanadate by ascorbate and related free radical generation at physiological pH. *J Inorg Biochem* 1994; **55**: 101–112.
- [21] DOMINGO JL. Metal-induced developmental toxicity in mammals: a review. *J Toxicol Environ Health* 1994; **42**: 123–141.
- [22] EDEL J, SABBIONI E. Retention of intratracheally instilled and ingested tetravalent and pentavalent vanadium in the rat. *J Trace Elem Electrolytes Health Dis* 1988; **2**: 23–30
- [23] EDEL J, SABBIONI E. Vanadium transport across placenta and milk of rats to the fetus and newborn. *Biol Trace Elem Res* 1989; **22**: 265–275.

- [24] EDWARDS JG, CAMPBELL G, GRIERSON W, KINN SR. Vanadate inhibits both intercellular adhesion and spreading on fibronectin of BHK21 cells and transformed derivatives. *J Cell Sci* 1991; **98**: 363–368.
- [25] ELFANT M, KEEN CL. Sodium vanadate toxicity in adult and developing rats. Role of peroxidative damage. *Biol Trace Elem Res* 1987; **14**: 193–208.
- [26] FERRER EG, WILLIAMS PAM, BARAN EJ. A spectrophotometric study of the VO²⁺-glutathione interactions. *Biol Trace Elem Res* 1991; **30**: 175–183.
- [27] FRENCH RJ, JONES PJH. Role of vanadium in nutrition: metabolism, essentiality and dietary considerations. *Life Sci* 1993; **52**: 339–346.
- [28] GERALDES CFGC, CASTRO MMCA. Multinuclear NMR study of the interaction of vanadate with mononucleotides, ADP, and ATP. *J Inorg Biochem* 1989; **37**: 213–232.
- [29] GORDON J. Use of vanadate as protein-phosphotyrosine phosphatase inhibitor. *Meth Enzymol* 1991; **201**: 477–482.
- [30] GULLAPALLI S, SHIVASWAMY V, RAMASARMA T, KURUP CKR. Redistribution of subcellular calcium in rat liver on administration of vanadate. *Mol Cell Biochem* 1989; **90**: 155–164.
- [31] GRESSER MJ, TRACEY AS. Vanadates as phosphate analogs in biochemistry. [w] Chasteen ND, red. Vanadium in Biological Systems. Physiology and Biochemistry. Dordrecht, Boston, London: Kluwer Academic Publishers 1990: 63–79.
- [32] GRUSZCZYKH, PAWLIKOWSKI S. Zastosowanie wanadu. [w] Surowce Mineralne Świata: Wanad – V, Tytan – Ti, Cyrkon – Zr, Hafn – Hf. Bolewski A, Gruszczyk H, Wutcen E, Smakowski T (red.) Wydawnictwo Geologiczne Warszawa 1982: 87–89.
- [33] HALLIWELL B, GUTTERIDGE JMC, CROSS CE. Free radicals, antioxidants, and human disease: where are we now? *J Lab Clin Med* 1992; **119**: 598–620.
- [34] HAMADA T. Vanadium induced hemolysis of vitamin E deficient erythrocytes in Hepes buffer. *Experientia* 1994; **50**: 49–53.
- [35] HAMADA T. A new experimental system of using fertile chick eggs to evaluate vanadium absorption and antidotal effectiveness to prevent vanadium uptake. *J Nutr Biochem* 1994; **5**: 382–388.
- [36] HARLAND BF, HARDEN-WILLIAMS BA. Is vanadium of human nutritional importance yet? *J Am Diet Assoc* 1994; **94**: 891–894.
- [37] HAYASHI Y, KIMURA T. The effects of vanadium compounds on the activation of adenylate cyclase from rat adrenal membrane. *Biochim Biophys Acta* 1986; **869**: 29–36.
- [38] HEINZ A, RUBINSON KA, GRANTHAM JJ. The transport and accumulation of oxyvanadium compounds in human erythrocytes *in vitro*. *J Lab Clin Med* 1982; **100**: 593–612.
- [39] JANISZEWSKA G, LACHOWICZ L, JASKÓLSKI D, GROMADZIŃSKA E. Vanadium inhibition of human parietal lobe ATPases. *Int J Biochem* 1994; **26**: 551–553.
- [40] KIRAZOV EP, WEISS DG. Effects of vanadate on the assembly and disassembly of purified tubulin. *Cell Motil Cytoskel* 1986; **6**: 314–323.
- [41] KRETZSCHMAR M, BRÄUNLICH H. Role of glutathione in vanadate reduction in young and mature rats: evidence for direct participation of glutathione in vanadate inactivation. *J Appl Toxicol* 1990; **10**: 295–300.
- [42] LEGRUM W. The mode of reduction of vanadate (+V) to oxovanadium (+IV) by glutathione and cysteine. *Toxicology* 1986; **42**: 281–289.
- [43] LEVINE L. Actions of vanadate on arachidonic acid metabolism by cells in culture. *Prostaglandins* 1991; **41**: 7–19.
- [44] LOBERT S, INSERN N, HENNINGTON BS, CORREIA JJ. Interaction of tubulin and microtubule proteins with vanadate oligomers. *Biochemistry* 1994; **33**: 1744–6252.
- [45] LORD KA, REED GH. Vanadyl(IV) complexes with pyruvate kinase: activation of the enzyme and electron paramagnetic resonance properties of ternary complexes with the protein. *Arch Biochem Biophys* 1990; **281**: 124–131.

- [46] MAHER PA. Stimulation of endothelial cell proliferation by vanadate is specific for micro-vascular endothelial cells. *J Cell Physiol* 1992; **151**: 549–554.
- [47] MIGLIORE L, BOCCIARDI R, MACRÍ C, LO JACONO F. Cytogenetic damage induced in human lymphocytes by four vanadium compounds and micronucleus analysis by fluorescence *in situ* hybridization with a centromeric probe. *Mutation Res* 1993; **319**: 205–213.
- [48] MITTAG TW, GUO W, TANIGUCHI T. Interaction of vanadate and iodate oxyanions with adenylyl cyclase of ciliary processes. *Biochem Pharmacol* 1993; **45**: 1311–1316.
- [49] MORITA T, MOTOYASHIKI T, TSURUZONO Y, KANAGAWA A, TOMINAGAN, UEKI H. Rapid increase of inositol 1,4,5-trisphosphate content in isolated rat adipose tissue by vanadate. *Chem Pharm Bull* 1992; **40**: 2242–2244.
- [50] NAYLOR GJ, CORRIGAN FM, SMITH AH, CONNELLY P, WARD NI. Further studies of vanadium in depressive psychosis. *Br J Psychiatry* 1987; **150**: 656–661.
- [51] NIELSEN FH, UTHUS EO. The essentiality and metabolism of vanadium. [w] Vanadium in Biological Systems. Physiology and Biochemistry. Chasteen ND (red.) Dordrecht, Boston, London: Kluwer Academic Publishers 1990: 51–62.
- [52] NIEVES J, KIM L, PUETT D, ECHEGOYEN L, BENABE J, MARTINEZ-MALDONADO M. Electron spin resonance of calmodulin-vanadyl complexes. *Biochemistry* 1987; **26**: 4523–4527.
- [53] NOZDRJUCHINA LR. Vanadij. [w] Biologičeskaja Rol Mikroelementov v Organizme Životnyh i Tcheloveka. Izdatelstwo Nauka, Moskva 1977: 119–125.
- [54] UTHUS EO, NIELSEN FH. Effect of vanadium, iodine and their interaction on growth, blood variables, liver trace elements and thyroid status indices in rats. *Magnesium Trace Elem* 1990; **9**: 219–226.
- [55] PFAFFEROTT C, MEISELMAN HJ, HOCHSTEIN P. The effect of malonyldialdehyde on erythrocyte deformability. *Blood* 1982; **59**: 12–15.
- [56] QUINLAN GJ, COUDRAY C, HUBBARD A, GUTTERIDGE JMC. Vanadium and copper in clinical solutions of albumin and their potential to damage protein structure. *J Pharm Sci* 1992; **81**: 611–614.
- [57] RAMANADHAM S, HEYLIGER C, GRESSER MJ, TRACEY AS, McNEILL JH. The distribution and half-life for retention of vanadium in the organs of normal and diabetic rats orally fed vanadium (IV) and vanadium (V). *Biol Trace Elem Res* 1991; **30**: 119–124.
- [58] RAMASARMA T, CRANE FL. Does vanadium play a role in cellular regulation? *Curr Topics in Cell Reg* 1981; **20**: 247–301.
- [59] RANDAZZO PA, OLSHAN JS, BIJIVI AA, JARETT L. The effect of orthovanadate on phosphoinositide metabolism in NIH 3T3 fibroblasts. *Arch Biochem Biophys* 1992; **292**: 258–265.
- [60] REHDER D. Structure and function of vanadium compounds in living organisms. *BioMetals* 1992; **5**: 3–12.
- [61] RIJKSEN G, VÖLLER MCW, VAN ZOELLEN EJJ. Orthovanadate both mimics and antagonizes the transforming growth factor action on normal rat kidney cells. *J Cell Physiol* 1993; **154**: 393–401.
- [62] ROMERO RA. Aluminium, vanadium and lead intoxication of uremic patients undergoing hemodialysis in Venezuela. *Transplant Proc* 1994; **26**: 330–332.
- [63] RUSSANOV E, ZAPOROWSKA H, IVANCHEVA E, KIRKOVA M, KONSTANTINOVA S. Lipid peroxidation and antioxidant enzymes in vanadate-treated rats. *Comp Biochem Physiol* 1994; **107C**: 415–421.
- [64] SABBIONI E, RADE J, BERTOLERO F. Relationships between iron and vanadium metabolism: the exchange of vanadium between transferrin and ferritin. *J Inorg Biochem* 1980; **12**: 307–315.

- [65] SABBIONIE, POZZI G, DEVOS S, PINTAR A, CASELLA L, FISCHBACH M. The intensity of vanadium (V)-induced cytotoxicity and morphological transformation in BALB/3T3 cells is dependent on glutathione-mediated bioreduction to vanadium(IV). *Carcinogenesis* 1993; **14**: 2565–2568.
- [66] SANDIRASEGARANE L, GOPALAKRISHNAN V. Limitations of the radioreceptor assay of inositol-1,4,5-trisphosphate in vanadate-treated cell suspensions. *Biochem J* 1994; **298**: 511–512.
- [67] SARDAR S, MONDAL A, CHATTERJEE M. Protective role of vanadium in the survival of hosts during the growth of a transplantable murine lymphoma and its profound effects on the rates and patterns of biotransformation. *Neoplasma* 1993; **40**: 27–30.
- [68] SCHMITZ W, SCHOLZ H, ERDMANNE, KRAWIETZ W, WERDAN K. Effect of vanadium in the +5, +4 and +3 oxidation states on cardiac force of contraction, adenylate cyclase and (Na⁺ + K⁺)-ATPase activity. *Biochem Pharmacol* 1982; **31**: 3853–3860.
- [69] SERRA MA, PINTAR A, CASELLA L, SABBIONI E. Vanadium effect on the activity of horseradish peroxidase, catalase, glutathione peroxidase, and superoxidase *in vitro*. *J Inorg Biochem* 1992; **46**: 161–174.
- [70] SHERIFF DS. Effect of vanadium on rat liver and testicular glutathione (GSH) and lipid peroxide levels. *Reprod Toxicol* 1991; **5**: 513–415.
- [71] SHI X, DALAL NS. Glutathione reductase functions as vanadate (V) reductase. *Arch Biochem Biophys* 1990; **278**: 288–290.
- [72] SHISHEVA A, IKONOMOV O, SHECHTER Y. The protein tyrosine phosphatase inhibitor, pervanadate, is a powerful antidiabetic agent in streptozotocin-treated diabetic rats. *Endocrinology* 1994; **134**: 507–510.
- [73] STANISZEWSKA K. 2,3-Dwufosfoglicerynian jako regulator powinowactwa hemoglobiny do tlenu. *Diagn Lab* 1993; **29**: 429–433.
- [74] STANKIEWICZ PJ. Vanadium (IV)-stimulated hydrolysis of 2,3-diphosphoglycerate. *Arch Biochem Biophys* 1989; **270**: 489–494.
- [75] STANKIEWICZ PJ, STERN A, DAVISON AJ. Oxidation of NADH by vanadium: kinetics, effects of ligands and role of H₂O₂ or O₂¹. *Arch Biochem Biophys* 1991; **287**: 8–17.
- [76] STERN A, YIN X, TSANG S-S, DAVISON A, MOON J. Vanadium as a modulator of cellular regulatory cascades and oncogene expression. *Biochem Cell Biol* 1993; **71**: 103–112.
- [77] TESSIER S, CHAPDELAIN A, CHEVALIER S. Effect of vanadate on protein phosphorylation and acid phosphatase activity in the canine prostate. *Mol Cell Endocrinol* 1989; **64**: 87–94.
- [78] TRZOS R, KORDOWIAK AM. Pochodne wanadu jako czynnik normalizujący kliniczne objawy cukrzycy. *Post Biol Kom* 1994; **21**: 293–302.
- [79] WANIEK A, WYSOCKI J, CHORAŻY M. Rola wolnych rodników w patologii człowieka. *Pol Tyg Lek* 1990; **45**: 195–199.
- [80] WIKIEŁ H, STROSZNAJDER J. Fosforany inozytoli i ich rola w procesie transdukcji sygnałów. *Post Biol Kom* 1991; **18**: 109–115.
- [81] ZAPOROWSKA H, SŁOTWIŃSKA M, ROSIŃSKA A. Cytotoxicity of vanadium *in vitro*. *Folia Histochem Cytobiol* 1990; **28**: 196–197.
- [82] ZAPOROWSKA H, SŁOTWIŃSKA M, PIOTROWSKA A. Wpływ wanadu na morfologię oraz aktywność mitotyczną komórek *in vitro*. *Bromat Chem Toksykol* 1991; **24**: 73–77.
- [83] ZAPOROWSKA H, WASILEWSKI W. Haematological effects of vanadium on living organisms. *Comp Biochem Physiol* 1992; **102C**: 223–231.
- [84] ZAPOROWSKA H, WASILEWSKI W, SŁOTWIŃSKA M. Effect of chronic vanadium administration to rats in drinking water. *BioMetals* 1993; **6**: 3–10.
- [85] ZAPOROWSKA H. Effect of vanadium on L-ascorbic acid concentration in rat tissues. *Gen Pharmacol* 1994; **25**: 467–470.

- [86] ZICK Y, SAGI-EISENBERG R. A combination of H_2O_2 and vanadate concomitantly stimulates protein tyrosine phosphorylation and polyphosphoinositide breakdown in different cell lines. *Biochemistry* 1990; **29**: 10240–10245.
- [87] ZOR U, FERBER E, GERGELY P, SZÜCS K, DOMBRÁDI V, GOLDMAN R. Reactive oxygen species mediate phorbol ester-regulated tyrosine phosphorylation and phospholipase A_2 activation: potentiation by vanadate. *Biochem J* 1993; **295**: 879–888.

Otrzymano: 10.01.1995 r.

Przyjęto: 21.03.1995 r.

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

**UDZIAŁ ASTROCYTÓW W POWSTAWANIU BLIZNY
POURAZOWEJ W OŚRODKOWYM UKŁADZIE
NERWOWYM. I. EKSPRESJA BIAŁEK
CYTOSZKIELETOWYCH JAKO PRZEJAW
REAKCJI NA USZKODZENIE**

CONTRIBUTION OF ASTROCYTES TO THE POSTTRAUMATIC
SCAR FORMATION IN THE CENTRAL NERVOUS SYSTEM.
I. EXPRESSION OF CYTOSKELETAL PROTEINS
AS EVIDENCE OF THE RESPONSE TO INJURY

Krzysztof JANECKO

Zakład Neuroanatomii, Instytut Zoologii, Uniwersytet Jagielloński, Kraków

Streszczenie: W astrocytach reagujących na uszkodzenie tkanki ośrodkowego układu nerwowego (OUN) następuje wzrost poziomu GFAP – białka cytoszkieletowego charakterystycznego dla tych komórek nieneuronalnych. Immunocytochemiczne wykrywanie GFAP umożliwia identyfikację reaktywnych form astrocytów i obserwację ich udziału w procesie formowania blizny pourazowej. W uszkodzonym OUN ssaków blizna stanowi trwałą barierę dla regenerujących aksonów. Dlatego niemożliwe jest odtworzenie przerwanych połączeń nerwowych i restytucja funkcjonalna uszkodzonych układów neuronalnych. Poznanie mechanizmu powstawania blizny ma podstawowe znaczenie dla opracowania metody minimalizacji efektów uszkodzenia.

Słowa kluczowe: uszkodzenie mózgu, astrocyt reaktywny, ekspresja GFAP, regeneracja połączeń nerwowych

Summary: An increase in the cellular level of cytoskeletal protein – GFAP – is a characteristic feature of astrocytes reacting to the central nervous system (CNS) injury. On the basis of GFAP immunolabeling, reactive astrocyte forms can be distinguished and their substantial contribution to the posttraumatic scar formation can, therefore, be observed. In the mammalian CNS the posttraumatic scar constitutes a barrier non-permissive for regenerating axons. As a consequence, restitution of nerve connections broken following injury and a functional recovery of neuronal systems proved to be impossible. Further

experimental exploration of the mechanism underlying the scar formation is the fundamental way to elaborate a method to minimize effects of brain injury.

Key words: brain injury, reactive astrocyte, GFAP expression, regeneration of nerve connections.

Sto lat temu, w roku 1895, Michaly von Lenhossek [59], określając jeden z typów komórek nieneuronalnych obecnych w tkance mózgowej, użył po raz pierwszy terminu "astrocyt". Od tego czasu przeprowadzono znaczną liczbę eksperymentów i badań klinicznych mających na celu poznanie funkcji tych komórek zarówno w warunkach normalnych, jak i patologicznych.

Po uszkodzeniu tkanki ośrodkowego układu nerwowego rozpoczyna się proces odtwarzania zniszczonych układów neuronalnych. Regeneracja aksonów, których ciągłość została przerwana, zmierza do przywrócenia połączeń istniejących przed uszkodzeniem. Uszkodzenie wywołuje również reakcję tkanki glejowej, prowadzącą do powstania blizny pourazowej. U ssaków, struktura tej blizny lub jej właściwości biochemiczne składają się na to, że dla regenerujących aksonów stanowi ona barierę trudną lub niemożliwą do pokonania [1, 46, 8, 10, 52]. Dlatego aksony te nie mogą osiągnąć ponownie obszarów, do których przesyłały informacje przed uszkodzeniem, a zatem zniszczony układ neuronalny nie może być odtworzony. Zbadanie mechanizmu powstawania blizny i ustalenie przyczyn zatrzymywania przez nią regenerujących aksonów oraz wypracowanie metod sterowania tymi zjawiskami to jeden z najważniejszych problemów współczesnej neurologii klinicznej.

1. POJĘCIE ASTROCYTU REAKTYWNEGO

We wczesnej fazie okresu pouszkodzeniowego, zachowanie astrocytów wiąże się ściśle z funkcjami pełnionymi przez nie w warunkach normalnych [2, 5]. Wyznaczają one ich najwcześniejsze reakcje określane jako bezpośrednie [42]. Przykładem takiej bezpośredniej reakcji jest pęcznienie astrocytów, zachodzące w czasie kilku sekund po uszkodzeniu, a wynikające z ich aktywności skierowanej na kompensację zmian w środowisku pozakomórkowym (regulacja poziomu jonów i substancji przekąźnikowych) [37, 49].

Reagując na czynniki uszkadzające, astrocyty zmieniają swoje właściwości fizjologiczne i morfologiczne. Tak zmienione ich formy określa się mianem astrocytów reaktywnych. Wraz z rozwojem badań efektów uszkodzenia tkanki nerwowej, zakres definicji astrocytu reaktywnego ulegał stopniowemu rozszerzeniu, obejmując kolejno poznawane zmiany w reaktywnym zachowaniu tego typu komórek. Zmiany te można najogólniej uporządkować jako wczesne i późne [42]. Zmiany wczesne są efektem modyfikacji normalnych cech astrocytów i polegają na nabyciu cech nowych, adekwatnych do sytuacji uszkodzenia ośrodkowego układu nerwowego. Można do nich

zaliczyć reaktywną syntezę i wzrost ekspresji białek cytoszkieletowych, zachodzące w czasie kilku godzin po uszkodzeniu [14, 18]. Zmiany późne – długotrwałe lub trwałe – obejmują na przykład przerost (hipertrofię) oraz proliferację i migrację [42, 44, 45, 49]. Prowadzą one do powstania w miejscu uszkodzenia skupiska astrocytów o znacznie podwyższonej ekspresji białek cytoszkieletowych, które określa się mianem astroglejozy. W skład blizny wywołanej uszkodzeniem, oprócz astrocytów, wchodzi również komórki innego typu, w tym także egzogenne komórki pochodzenia mezodermalnego. Bliznę o tak urozmaiconej strukturze nazywa się ogólnie gleją lub gleją reaktywną.

Wiele bieżących badań, w tym również prowadzone w naszym zakładzie [32, 33, 34, 35, 36], poświęcono ustaleniom czasowo-przestrzennego modelu typowych przejawów reaktywności astrocytów. Celem niniejszego opracowania jest przedstawienie problemów związanych z identyfikacją i opisem reaktywnego zachowania tych komórek jako przejawiających zmiany poziomu ekspresji białek cytoszkieletowych. Zawiera ono także dane eksperymentalne, wskazujące na doniosłą rolę astrocytów w regulacji przebiegu reakcji tkanki ośrodkowego układu nerwowego na uszkodzenie.

2. IDENTYFIKACJA ASTROCYTÓW NORMIE I PATOLOGII

Wypracowanie kryteriów identyfikacji typów komórek wykazujących zachowanie reaktywne było jednym z najważniejszych celów długoletnich badań procesów zachodzących w uszkodzonej tkance ośrodkowego układu nerwowego. Udało się ustalić, że niektóre spośród tych komórek zawierają charakterystyczne dla siebie substancje uznane za ich markery immunocytochemiczne. Oznacza to, że dzięki powszechnie stosowanym technikom immunocytochemicznym możliwe jest wykrywanie obecności tych charakterystycznych substancji i w konsekwencji rozpoznawanie komórek, które je zawierają.

2.1. IMMUNOCYTOCHEMICZNY MARKER ASTROCYTÓW – GFAP

Najbardziej znanym i najszerzej stosowanym markerem astrocytów jest GFAP (*glial fibrillary acidic protein*). Białko to, pierwotnie wyosobnione z płytek stwardnienia rozsianego [19], jest głównym składnikiem filamentów pośrednich astrocytów [31].

W normalnej, nie uszkodzonej tkance ośrodkowego układu nerwowego, tylko część astrocytów wykazuje ekspresję GFAP [40]. W wyniku uszkodzenia populacja astrocytów GFAP-pozytywnych znacznie wzrasta, ale i tak znaczna ich część pozostaje nadal GFAP-negatywna. Zatem immunocytochemiczne wykrywanie obecności GFAP nie daje możliwości uwidocznienia wszystkich astrocytów obecnych w sąsied-

dztwie miejsca uszkodzenia. Również komórki potomne, powstałe po reaktywnych podziałach dojrzałych astrocytów mogą być GFAP-negatywne lub też mogą one przejść późniejszą regresję immunoreaktywności na GFAP [33]. Obserwacja zachowania takich form astrocytów jest znacznie utrudniona, ponieważ może opierać się tylko o morfologiczne cechy ich jąder. Z punktu widzenia wymagań metodycznych, reprezentowanych przez współczesną literaturę przedmiotu, rozpoznanie astrocytu bez wykazania jego immunoreaktywności na GFAP może być w pełni zaakceptowane tylko w wyjątkowych okolicznościach. Okoliczności takie ilustruje doniesienie Kitamura i wsp. [39]. Jego autorzy stwierdzili, że w normalnym nerwie twarzowym u szczura astrocyty nie wykazują zawartości GFAP. Ich identyfikacja jest więc możliwa tylko poprzez ocenę morfologii jąder komórkowych. Nie oznacza to, aby były one całkowicie niezdolne do ekspresji GFAP, bowiem zachodzi ona w nich po uszkodzeniu tego nerwu.

Wykrywając immunocytochemicznie astrocyty reaktywne nie można zapominać o tym, że specyficzność przeciwciał rozpoznających GFAP weryfikowano poprzez porównanie obrazu immunohistochemicznego astrocytu z dobrze już znanym jego obrazem otrzymanym przy użyciu klasycznych technik impregnacji opracowanych przez Golgiego, Ramona y Cajala i Del Rio Hortegę. Również we współczesnych badaniach immunocytochemicznych jednoczesne wykorzystanie tradycyjnych kryteriów morfologicznych znacznie ułatwia rozpoznawanie typu komórek immunopozytywnych.

W okresie prenatalnym i wczesnym postnatalnym zastosowanie GFAP jako markera astrocytów napotyka na dodatkową trudność, ponieważ wtedy białko to występuje również w niedojrzałych oligodendrocytach [15]. W tych warunkach, immunocytochemiczne barwienie astrocytów powinno być uzupełnione wykrywaniem np. MBP (*myelin basic protein*) lub galaktocerebrozydów charakterystycznych dla oligodendrocytów. Okazuje się więc, że w niektórych sytuacjach eksperymentalnych immunocytochemiczna identyfikacja astrocytów może być także zawodna.

Badanie ekspresji GFAP ma duże znaczenie w klinicznej diagnostyce nowotworów pochodzenia gwałtownego (określenie stopnia złośliwości). Zaobserwowane zmiany poziomu GFAP w warunkach patologicznych skłaniają do przypuszczeń dotyczących jego roli w reaktywnym zachowaniu tkanki nerwowej. Przyjmuje się, że większa zawartość GFAP charakteryzuje astrocyty o mniejszej zdolności do migracji. W przypadku uszkodzenia tkanki mózgowej powstaje problem, czy zwiększona produkcja GFAP sprzyja restytucji funkcji uszkodzonych układów neuronalnych, czy też ją utrudnia. Gdyby okazało się, że zjawisko to ma rzeczywiście doniosłe znaczenie praktyczne, możliwość modyfikacji ekspresji GFAP w warunkach klinicznych mogłaby mieć zastosowanie w leczeniu skutków urazów ośrodkowego układu nerwowego. Chociaż zagadnieniu temu poświęcono już wielką liczbę badań eksperymentalnych, ich wyniki nie przyniosły dotąd zadowalających rezultatów.

Uznanie podwyższonej ekspresji GFAP za jedyny wskaźnik aktywacji, czy też reaktywnego stanu astrocytów stwarza niebezpieczeństwo pominięcia w badaniach

tych astrocytów, które mogą reagować na uszkodzenia tkanki nerwowej w inny sposób. Czynniki uszkadzające mogą wywoływać bowiem produkcję innych substancji czynnych, mających znaczenie dla przebiegu reakcji na uszkodzenie [18]. Można przypuszczać, że badania prowadzone na poziomie molekularnym stopniowo uwidocznią zakres różnorodności funkcjonalnej astrocytów, który może być większy niż stopień ich zróżnicowania morfologicznego.

Jako składnik filamentów pośrednich cytoszkieletu w astrocytach reaktywnych pojawia się inne białko – wimentyna [12, 35, 55]. Występuje ono również w komórkach pochodzenia mezodermalnego i dlatego immunoreaktywność komórki na wimentynę nie stanowi wystarczającej podstawy do uznania jej za astrocyt.

Cytoszkielet astrocytów może również zawierać aktynę, desminę i keratynę, jednak białka te nie są charakterystyczne dla komórek tego typu.

2.2. WZROST EKSPRESJI BIAŁEK CYTOSZKIELETOWYCH JAKO GŁÓWNY PRZEJAW REAKTYWNOŚCI ASTROCYTÓW

Badania kliniczne i eksperymentalne dostarczyły danych o dużej liczbie i różnorodności czynników prowadzących do wzrostu ekspresji GFAP [20, 27, 29, 44, 45], mimo to rzeczywisty udział GFAP w reaktywnym zachowaniu astrocytów pozostaje nadal nieznanym [20].

Aktywacja astrocytów, obserwowana jako wzrost poziomu GFAP mRNA, pojawia się w czasie od jednej do 6 godzin po uszkodzeniu [13, 18, 16]. Po 6 godzinach poziom GFAP mRNA wzrasta 3 lub 4 razy, a po 24 godzinach prawie 10 razy, osiągając szczyt do piątego dnia po uszkodzeniu [13, 14], a następnie maleje [14, 16]. Nie oznacza to, że ekspresja GFAP narasta równie szybko. Według Hozumi i wsp. [30] po upływie 6 godzin po uszkodzeniu następuje nawet 20% zmniejszenie ekspresji GFAP, która zaczyna dopiero wzrastać po około 24 godzinach, osiągając około 7 dnia poziom maksymalny dochodzący nawet do 180% poziomu pierwotnego.

U ośmiodniowych chomików po przecięciu drogi korowordzeniowej [50] stwierdzono obniżanie się ekspresji GFAP i wimentyny w miarę wzrostu odległości od miejsca uszkodzenia. Zauważono również, że astrocyty znajdujące się w jego bliskim sąsiedztwie zawierały zarówno GFAP, jak i wimentynę, natomiast w miarę wzrostu odległości od miejsca uszkodzenia pojawiały się astrocyty wykazujące ekspresję tylko GFAP. W cytowanej publikacji rozważana była także możliwość istnienia zależności pomiędzy ekspresją wimentyny a aktywnością proliferacyjną lub migracyjną astrocytów. Zwracano również uwagę na to, że opisane przez nich rozmieszczenie astrocytów zawierających wimentynę może wskazywać na istnienie czynnika wywołującego jej ekspresję, uwalnianego w miejscu uszkodzenia. Istnienie takiego czynnika wywołującego glejozę było już wielokrotnie dyskutowane [44].

Zróżnicowany poziom GFAP w astrocytach [28] wiąże się prawdopodobnie z ich specyficzną funkcją w danym rejonie mózgu. Zawartość GFAP lub/i natężenie jego wymiany może być wskaźnikiem aktywności astrocytarnej. Ekspresja GFAP [38] i poziom GFAP mRNA [43] są względnie wyższe w *glia limitans* i w formacji hipokampa niż na przykład w korze nowej. Zróżnicowanie ekspresji GFAP w astro-

cytach odbija strukturę wewnętrzną półkuli mózgu, z uwarstwieniem kory nowej i formacji hipokampa włącznie [38, 55].

Nie wiadomo, czy zróżnicowana ekspresja GFAP zależy od specyficznego zapotrzebowania określonych okolic mózgu na astrocyty danego typu, czy też koreluje ona z ogólnie zwiększonym metabolizmem lub stanem funkcjonalnym astrocytów. Różne struktury ośrodkowego układu nerwowego wykazują znaczne zróżnicowanie gęstości astrocytów i ekspresji GFAP [38]. Są one także różne w różnych polach cytoarchitektonicznych kory mózgowej [63]. Landry i wsp. [43] ustalili u szczura, że rozwojowy wzrost ekspresji GFAP mRNA przebiega zgodnie z tylnym-przednim (*caudo-rostral*) gradientem rozwojowym tkanki nerwowej.

Ekspresja ta osiąga najwyższy poziom w 15 dniu życia zwierzęcia. Zilles i wsp. [63] wskazują na znaczne zagęszczenie astrocytów o wysokiej immunoreaktywności na GFAP w okolicach, które w ontogenezie mózgu tworzyły jego powierzchnię (*surface contact glia*).

Nie wiadomo dokładnie, czy wysoki poziom GFAP obniża zdolność astrocytu do migracji, czy też ją całkowicie znosi. Na tej podstawie powstało przypuszczenie, że glejoza, jaka powstaje w miejscu uszkodzenia, to przede wszystkim wynik lokalnej transformacji astrocytów w formy włókniste o wysokiej zawartości GFAP przy stosunkowo niewielkim natężeniu ich lokalnej proliferacji. Nie można jednak wykluczyć, że na glejozę składają się również astrocyty, które, jako GFAP-negatywne, poprzez migrację z innych okolic trafiają do miejsca uszkodzenia. Tutaj dopiero, w wyniku postępującej syntezy białek cytoszkieletowych, stają się one wykrywalne immunocytochemicznie. Na takie pochodzenie części astrocytów, wchodzących w skład trwałej glejozy, wskazują również wyniki badań przeprowadzonych w naszym zakładzie [33].

Molekularne podłoże zmian immunoreaktywności astrocytów na GFAP nie jest wystarczająco poznane. Interpretując wyniki badań immunocytochemicznych, zakłada się, że wzrost ich immunoreaktywności na GFAP zachodzi w wyniku nasilonej syntezy lub zmniejszonego turnover tego białka. Należy wziąć pod uwagę możliwość wzrostu immunoreaktywności bez odpowiadającego mu rzeczywistego wzrostu zawartości GFAP. Przyczyną tego zjawiska może być zwiększona proteoliza i rozpad glejowych filamentów pośrednich na podjednostki [48].

3. BLIZNA GLEJOWA A RESTYTUCJA FUNKCJI USZKODZONYCH UKŁADÓW NEURONALNYCH

Chociaż jak dotąd przeważa pogląd, że reaktywna glejoza utrudnia odnowę funkcji zaburzonych uszkodzeniem mózgu, nie wiadomo, który typ komórek zaangażowanych w procesy reaktywne jest bezpośrednią przyczyną takich właśnie efektów bliznowacenia tkanki. Różne populacje komórkowe mogą kontrolować proces jej zdrowienia przez oddziaływania o odmiennych skutkach. Dotychczasowe badania roli astrocytów w procesie powstawania blizny w uszkodzonej tkance nerwowej i resty-

tucji jej funkcji można podzielić na dwie grupy. Pierwsze dowodzą, że to astrocyty uniemożliwiają odtwarzanie uszkodzonych połączeń nerwowych, drugie zaś świadczą o tym, że astrocyty sprzyjają temu zjawisku, wpływając pozytywnie na żywotność neuronów w uszkodzonym mózgu i ułatwiając odrastanie zniszczonych aksonów.

3.1. ASTROCYTY JAKO CZYNNIK UTRUDNIAJĄCY ODTWARZANIE USZKODZONYCH POŁĄCZEŃ NERWOWYCH

Pierwsze doniesienia o zatrzymaniu odrastania aksonu przez bliznę glejową pochodzą od Ramon y Cajala i Penfielda [52]. Po zakończeniu okresu rozwojowego mózgu większość aksonów przestaje rosnąć. Neurony zachowują jednak zdolność regeneracji aksonów uszkodzonych. Wbrew tej zdolności, w ośrodkowym układzie nerwowym ssaków odtwarzanie zniszczonych połączeń przez odrastanie aksonów zasadniczo nie zachodzi. W obwodowym układzie nerwowym taka możliwość jest zachowana. Komórki glejowe Schwanna ułatwiają regenerację uszkodzonych aksonów [1, 22], natomiast komórki glejowe układu ośrodkowego – astrocyty i oligodendrocyty [1, 44, 56] wydają się wytwarzać warunki nie sprzyjające takiej regeneracji. Wzrost aksonów hamuje także mielina [56]. Być może dlatego regeneracja aksonów w istocie szarej jest bardziej efektywna niż w istocie białej. Uszkodzenie wywołuje podziały komórek glejowych, inwazję makrofagów, odkładanie się różnych substancji w przestrzeni pozakomórkowej oraz produkcję czynników troficznych i mitogennych. Podejmowane są próby znalezienia wśród tych zjawisk komórkowej lub molekularnej przyczyny tego, że następstwa uszkodzenia ośrodkowego i obwodowego układu nerwowego są tak dalece zróżnicowane. Jednym z wyników tych usiłowań jest wykrycie różnicy strukturalnej pomiędzy GFAP pochodzącym z obwodowego i ośrodkowego układu nerwowego [23]. Można przypuszczać, że różnica ta ma znaczenie funkcjonalne.

Przyczyną zatrzymania wzrostu aksonów w obrębie astroglejozy może być uformowanie przez nie zakończeń synaptycznych na astrocytach [52]. Możliwe jest również, że astrocyty produkują substancje zatrzymujące wzrost aksonów. Ostatnio zaobserwowano, że błony izolowane z obszaru glejozy mają hamujący wpływ na wzrost aksonów [7, 9]. Wyrażono także przypuszczenie, że dojrzałe i reaktywne astrocyty hamują aktywność proteolityczną konieczną do wzrostu regenerującego aksonu poprzez astroglejozę [47]. Prawdopodobnie, aby wzrost ten mógł zachodzić, konieczna jest ciągła restrukturyzacja przestrzeni pozakomórkowej, podobna do zachodzącej w przypadku nowotworów [52]. Uważa się, że dojrzałe i reaktywne astrocyty nie syntetyzują czynników powierzchniowych koniecznych do wzrostu aksonów lub też produkują czynniki zapobiegające temu [52].

Przypuszcza się również, że błona podstawna obecna w obszarze glejozy, a wytwarzana przez astrocyty, jest czynnikiem zatrzymującym wzrost aksonów, mimo że zawiera lamininy będące dobrym substratem dla wzrostu aksonów *in vitro* [53].

Prowadzono badania możliwości sterowania intensywnością glejozy i ekspresją GFAP drogą farmakologiczną [26]. Dla przykładu można wspomnieć badania wykonane na szczurach 7-dniowych, których autorami byli Burtrum i Silverstein [11]. Przez działanie czynnika MK-801, antagonisty receptora NMDA, spowodowano obniżenie syntezy GFAP mRNA i obniżenie ekspresji GFAP w bliźnie glejowej. Syntezę GFAP hamowano również *in vitro* [20, 62]. Poprzez blokadę receptora β -adrenergicznego systemowo podawanym propranololem spowodowano 73% redukcję ekspresji GFAP i zmniejszenie hipertrofii astrocytów wywołanej zniszczeniem nerwu kulszowego [57]. Żadna z tych prac nie zawierała jednak doniesienia o pozytywnym wpływie przeprowadzonych zabiegów na odrastanie aksonów poprzez glejozę.

3.1. ASTROCYTY JAKO CZYNNIK UŁATWIAJĄCE ODTWARZANIE USZKODZONYCH POŁĄCZEŃ NERWOWYCH

Liczne są doniesienia o faktach odrastania uszkodzonych aksonów w ośrodkowym układzie nerwowym. Stwierdzono dobry odrost aksonów monoaminergicznych [6], aksonów neurosekrecyjnych w tylnym płacie przysadki [17] oraz cienkich aksonów monoaminergicznych i cholinergicznych pozbawionych osłonek mielinowych. Aksony tego typu rosną szczególnie szybko. Przypuszcza się więc, że ich odtworzenie mogło zajść jeszcze przed uformowaniem się blizny glejowej. Ponieważ należą one do starszych filogenetycznie części układu nerwowego, być może dlatego zachowały zdolność regeneracji właściwą niższym kręgowcom. Układy zbudowane z aksonów o dużej średnicy i zmielinizowanych, charakterystyczne dla ssaków, nie odtwarzają się [58]. Pomyślnie regenerujące aksony neurosekrecyjne znajdują się poza obrębem bariery krew-mózg, stąd zjawisko to można rozpatrywać jako charakterystyczne dla obwodowego układu nerwowego [4].

Berry i Riches [4] wyrazili pogląd, że nawet po neonatalnym uszkodzeniu mózgu szczura, kiedy nie tworzy się dojrzała blizna glejowa, poprzez amorficzny ślad po uszkodzeniu przerastają tylko aksony nie uszkodzone, rosnące zgodnie z normalnym programem rozwojowym, natomiast nie są do tego zdolne aksony, które w tym wczesnym okresie zostały uszkodzone. Świadczy to o tym, że uszkodzenie mózgu we wczesnym okresie rozwoju prowadzi do podobnej zmiany właściwości tkanki nerwowej, jaką obserwuje się po uszkodzeniu mózgu dojrzałego.

Aksony ośrodkowego układu nerwowego wrastają w przeszczepę tkanki obwodowego układu nerwowego i rosną w nich. Jednak po opuszczeniu przeszczepu mogą sięgać jedynie 1–2 mm poza jego granice [52]. Paradoksalne jest to, że aksony z ośrodkowego układu nerwowego wrastają do przeszczepionej do mózgu tkanki obwodowego układu nerwowego poprzez astroglejozę. Zachodzi to prawdopodobnie pod silnym wpływem tropicznego i troficznego tkanki przeszczepu. Zatem gdyby astroglejoza była tylko przeszkodą mechaniczną, nie hamowałaby wzrostu aksonów tylko w jedną stronę

Niektóre z badań *in vitro* i *in vivo* wskazują, że astrocyty ułatwiają przeżywalność neuronów i rośnięcie aksonów [44, 51]. Astroglej reaktywny produkuje lamininy, będące dobrym substratem dla rosnących aksonów [25]. Vaca i Wendt [41] i Giulian [60] stwierdzili, że astrocyty uwalniają również czynniki przeciwdziałające neurotoksynom produkowanym przez mikroglej. Astrocyty są również źródłem białka S-100, które jest czynnikiem wzmagającym wzrost aksonów [49].

Badanie astrocytów reaktywnych *in vitro* jest utrudnione, ponieważ przyjmują one postać blastyczną [9] i nie mają cech charakterystycznych dla uszkodzonej tkanki [61]. Mimo to w tych warunkach podejmowane są próby badania zachowania astrocytów [54, 62]. Zauważono, że w hodowlach jednowarstwowych astrocyty ułatwiają odrastanie aksonów, natomiast utrudniają je w hodowlach przestrzennych [21]. Dotychczas nie wiadomo jednak, co jest tego przyczyną.

Badania *in vitro* prowadzone w ciągu ostatnich lat przez zespół Nieto-Sampedro [7, 24] zwróciły uwagę na zróżnicowanie oddziaływań na rosnące aksony astrocytów pochodzących z różnych typów glejocy. Błony komórkowe astrocytów wyosobnionych z obszaru glejocy izomorficznej zatrzymywały wzrost aksonów, podczas gdy aksony mogły swobodnie rosnąć wzdłuż błon komórkowych astrocytów pobranych z obszaru glejocy anizomorficznej.

Według tych autorów, pozytywny czy negatywny wpływ astrocytów na aksony odtwarzające uszkodzone połączenia zależałby zatem od czynnika uszkadzającego lub sposobu, w jaki została uszkodzona tkanka mózgowa.

Bardzo szeroki zakres oraz tematyczna i metodyczna różnorodność badań reaktywnego zachowania astrogleju świadczą o doniosłym znaczeniu, jakie ma poznanie mechanizmu powstawania astroglejocy i jej wpływu na odnowę zaburzonych funkcji uszkodzonej tkanki nerwowej. Wspólnym, nadrzędnym celem wszystkich prac eksperymentalnych jest uzyskanie danych, które w praktyce klinicznej umożliwiłyby minimalizację negatywnych efektów uszkodzenia ośrodkowego układu nerwowego, a przez to znaczące polepszenie wyników klinicznych działań rehabilitacyjnych.

BIBLIOGRAFIA

- [1] BAHR M, BONHOEFFER F. Perspectives on axonal regeneration in the mammalian CNS. *Trends in Neurosci* 1994; **17**: 473–479.
- [2] BARRES BA. New roles for glia. *J Neurosci* 1991; **11**: 3685–3694.
- [3] BERRY M. Regeneration in the central nervous system. *Rec Adv Neuropathol* 1979; **1**: 67–111.
- [4] BERRY M, RICHES AC. An immunological approach to regeneration in the central nervous system. *British Med Bull* 1974; **30**: 135–140.
- [5] BIGNAMI A. Glial cells in the central nervous system. *Discussions in Neuroscience* 1991; **8**: 8–45.
- [6] BJORKLUND A, STENEVI U. Regeneration of monoaminergic and cholinergic neurons in the central nervous system. *Physiol Rev* 1979; **59**: 62–100.

- [7] BOVOLENTA P, WANDOSEL F, NIETO-SAMPEDRO M. Neurite outgrowth over resting and reactive astrocytes. *Restor Neurol Neurosci* 1991; **2**: 221–228.
- [8] BOVOLENTA P, WANDOSELL F, NIETO-SAMPEDRO M. CNS glial scar tissue: a source of molecules which inhibit central neurite outgrowth. *Prog Brain Res* 1992; **94**: 367–379.
- [9] BOVOLENTA P, WANDOSELL F, NIETO-SAMPEDRO M. Characterization of a neurite outgrowth inhibitor expressed after CNS injury. *Europ J Neurosci* 1993; **5**: 454–465.
- [10] BUNGE RP, HOPKINS JM. The role of peripheral and central neuroglia in neural regeneration in vertebrates. *Seminars in the Neurosciences* 1990; **2**: 509–518.
- [11] BURTRUM D, SILVERSTEIN FS. Excitotoxic injury stimulates glial fibrillary acidic protein mRNA expression in perinatal rat brain. *Exp Neurol* 1993; **121**: 127–132.
- [12] CALVO JL, CARBONELL, AL BOYA J. Co-expression of glial fibrillary acidic protein and vimentin in reactive astrocytes following brain injury in rats. *Brain Res* 1991; **566**: 333–336.
- [13] CANCELLA P, BREADY J, BERLINER BAJ, SHARIFI-NIA H, TOGA AW, SANTORI EM, SCULLY S, DEVELLIS J. Expression of mRNA for glial fibrillary acidic protein after experimental cerebral injury. *J Neuropathol Exp Neurol* 1992; **51**: 560–565.
- [14] CAVICCHIOLI L, FLANIGAN TP, POLATO P, VANTINI G, LEON A. Evidences for early glial activation in the CNS following mechanical injury. *J Neurochem* 1989; Suppl 52 S114.
- [15] CHOI BH, KIM RC. Expression of glial fibrillary acidic protein by immature oligodendrocytes and its implications. *J Neuroimmunol* 1985; **8**: 215–235.
- [16] CONDORELLI DF, DELL'ALBANI P, KACZMAREK L, MESSINA L, PAMPINATO G AVOLA, R MESSINA A, GIUFRIDA-STELLA AM. Glial fibrillary acidic protein messenger RNA and glutamine synthetase activity after nervous system injury. *J Neurosci Res* 1990; **26**: 251–257.
- [17] DELLMAN HD. Degeneration and regeneration of neurosecretory systems. *Int Rev Cytol* 1973; **36**: 215–315.
- [18] EDDLESTON M, MUCKE L. Molecular profile of reactive astrocytes -implications for their role in neurologic disease. *Neuroscience* 1993; **54**: 15–36.
- [19] ENGLF, VANDERHAEGEN, JJ BIGNAMI, A GERSTL B. An acidic protein isolated from fibrous astrocytes. *Brain Res* 1971; **28**: 351–354.
- [20] ENGLF, YU ACH, LEE YL. Astrocytic response to injury. *Prog Brain Res* 1992; **94**: 353–365.
- [21] FAWCETT JW, HOUSDEN E, SMITH-THOMAS L. The growth of axons in three dimensional astrocyte cultures. *Dev Biol* 1989; **135**: 449–458.
- [22] FAWCETT JW, KEYNES RJ. Peripheral nerve regeneration. *Annu Rev Neurosci* 1990; **13**: 43–60.
- [23] FEINSTEIN DL, WEINMASTER GA, MILNER RJ. Isolation of cDNA clones encoding rat glial fibrillary acidic protein: expression in astrocytes and in Schwann cells. *J Neurosci Res* 1992; **32**: 1–14.
- [24] FERNAUD-ESPINOSA I, NIETO-SAMPEDRO M, BOVOLENTA P. Differential activation of microglia and astrocytes in aniso- and isomorphic gliotic tissue. *Glia* 1993; **8**: 277–291.
- [25] GIULIAN D. Reactive glia as rivals in regulating neuronal survival. *Glia* 1993; **7**: 102–110.
- [26] GIULIAN D, VACA K, JOHNSON B. Secreted peptides as regulators of neuron-glia and glia-glia interactions in the developing nervous system. *J Neurosci Res* 1989; **21**: 487–500.
- [27] HAJOS F, KALMAN M, ZILLES K, SCHLEICHER A, SOTONYI P.O. Remote astrocytic response as demonstrated by glial fibrillary acidic protein immunohistochemistry in the visual cortex of dorsal lateral geniculate nucleus lesioned rats. *Glia* 1990; **3**: 301–310.
- [28] HANSSON E.O. Regional heterogeneity among astrocytes in the central nervous system. *Neurochem Int* 1990; **16**: 237–245.
- [29] HATTEN ME, LIEM RKH, SHELANSKI ML, MASON CA. Astroglia in CNS injury. *Glia* 1991; **4**: 233–243.
- [30] HOZUMI I, CHIU F-CH, NORTON WT. Biochemical and immunocytochemical changes in glial fibrillary acidic protein after stab wounds. *Brain Res* 1990; **524**: 64–71.

- [31] INAGAKI M, NAKAMURA Y, TAKEDA M, NISHIMURA T, INAGAKI N. Glial fibrillary acidic protein: dynamic property and regulation by phosphorylation. *Brain Pathol* 1994; **4**: 239–243.
- [32] JANEZKO K. The proliferative response of astrocytes to injury in neonatal rat brain. A combined immunocytochemical and autoradiographic study. *Brain Res* 1988; **456**: 280–285.
- [33] JANEZKO K. Spatiotemporal patterns of the astroglial proliferation in rat brain injured at the postmitotic stage of postnatal development: a combined immunocytochemical and autoradiographic study. *Brain Res* 1989; **485**: 236–243.
- [34] JANEZKO K. The proliferative response of S-100 protein-positive glial cells to injury in the neonatal rat brain. *Brain Res* 1991; **564**: 86–90.
- [35] JANEZKO K. Co-expression of GFAP and vimentin in astrocytes proliferating in response to injury in the mouse cerebral hemisphere. A combined autoradiographic and double immunocytochemical study. *Int J Devl Neurosci* 1993; **11**: 139–147.
- [36] JANEZKO K. Age-dependent changes in the proliferative response of S-100 protein positive glial cells to injury in the rat brain. *Int J Dev Neurosci* 1994; **12**: 431–440.
- [37] JUURLINK BHJ, HERTZ L. Astrocytes w: Neuromethods. A Boulton, W Waltz (red) t 23: Practical Cell Culture Techniques. Acad Press 1992 New York ss 269–321.
- [38] KALMAN M, HAJOS F. Distribution of glial fibrillary acidic protein (GFAP)-immunoreactive astrocytes in the rat brain. *Exp Brain Res* 1989; **78**: 147–163.
- [39] KITAMURA T, NAKANISHI K, FUKUYAMA R, WANATABE S, FUJITA S. GFAP-gene expression on the astroglia of rat facial nuclei after transection of the facial nerve. 10th Int Congr Neuropathol Stockholm 1986 Abstrakt nr 41.
- [40] KORR H, HORSMANN C, SCHURMANN M, DELAUNOY P, LABOURDETTE G. Problems encountered when immunohistochemistry is used for quantitative glial cell identification in autoradiographic studies of cell proliferation in the brain of the unlesioned adult mouse. *Cell Tiss Res* 1994; **278**: 85–95.
- [41] KROMER LF, CORNBROOKS CJ. Transplants of Schwann cell cultures promote axonal regeneration in the adult mammalian brain. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985; **82**: 6330–6334.
- [42] LANDIS DMD. The early reactions of non-neuronal cells to brain injury. *Annu Rev Neurosci* 1994; **17**: 133–151.
- [43] LANDRY CF, IVY GO, BROWN IR. Developmental expression of glial fibrillary acidic protein mRNA in the rat brain analyzed by *in situ* hybridization. *J Neurosci Res* 1990; **25**: 194–203.
- [44] MALHOTRA SK, SHNITKA TK. Adaptative plasticity and diversity among reactive astrocytes in centralo nervous system lesions. *Biomed Lett* 1994; **49**: 273–302.
- [45] MALHOTRA SK, SHNITKA TK, ELBRINK J. Reactive astrocytes – a review. *Cytobios* 1990; **61**: 133–160.
- [46] MONTGOMERY DL. Astrocytes:form functions and roles in disease. *Vet Pathol* 1994; **31**: 145–167.
- [47] MOONEN G, DELREE P, LEPRINCE P, RIGO J-M, ROGISTER B, LEFEBRE PP. Developmental neurobiology and the physiopathology of brain injury. w:Pharmacological Approaches to the Treatment of Brain and Spinal Cord Injury. DG Stein i BA Sabel (red) London Plenum Press 1988; ss 259–280.
- [48] NAKAMURA Y, TAKEDA M, ANGELIDES KJ, TADA K, HARIGUCHI S, NISHIMURA T. Assembly disassembly and exchange of glial fibrillary acidic protein. *Glia* 1991; **4**: 101–110.
- [49] NOREMBERG MD. Astrocyte responses to CNS injury. *J Neuropathol Exp Neurol* 1994; **53**: 213–220.
- [50] OBLINGER MM, SINGH LD. Reactive astrocytes in neonate brain upregulate intermediate filament gene expression in response to axonal injury. *Int J Devl Neurosci* 1993; **11**: 149–156.

- [51] ODERFELD-NOWAK B, BACIA A, GRĄDKOWSKA M, FUSCO M, VANTINI G, LEON A, ALOE L. *In vivo* activated brain astrocytes may produce and secrete nerve growth factor-like molecules. *Neurochem Int* 1992; **21**: 455–461.
- [52] REIER PJ, ENG LF, JAKEMAN L. Reactive astrocyte and axonal outgrowth in the injured CNS: Is gliosis really an impediment to regeneration? w: Neural regeneration and Transplantation. Eng LF PJ Reier (red) Alan R Liss Inc 1989 New York ss 183–209.
- [53] RUDGE JS, SILVER J. Inhibition of neurite outgrowth on astroglial scars *in vitro*. *J Neurosci* 1990; **10**: 3594–3603.
- [54] RUDGE JS, SMITH GM, SILVER J. An *in vitro* model of wound healing in the CNS: analysis of cell reaction and interaction at different ages. *Exp Neurol* 1989; **103**: 1–16.
- [55] SCHMIDT-KASTNER R, SZYMAS J. Immunocytochemistry of glial fibrillary acidic protein vimentin and S-100 protein for study of astrocytes in hippocampus of rat. *J Chem Neuroanat* 1990; **3**: 179–192.
- [56] SCHWAB ME. Myelin-associated inhibitors of neurite growth and regeneration in the CNS. *Trends in Neuroscience* 1990; **13**: 452–456.
- [57] SUTIN J, GRIFFITH R. β -adrenergic receptor blockade suppresses glial scar formation. *Exp Neurol* 1993; **120**: 214–222.
- [58] SVENDGAARD NA, BJORKLUND A, STENEVI U. Regeneration of central cholinergic neurones in the adult rat brain. *Brain Res* 1976; **102**: 1–22.
- [59] TOWER DB. Development of knowledge about astrocytes since Virchow w: The Biochemical Pathology of Astrocytes. MD Norenberg, L Hertz i A Schousboe (red) Alan R Liss 1988 New York ss 3–18.
- [60] VACA K, WENDT E. Divergent effects of astroglial and microglial secretions on neuron growth and survival. *Exp Neurol* 1992; **118**: 62–72.
- [61] WANDOSELL F, BOVOLENTA P, NIETO-SAMPEDRO M. Differences between reactive astrocytes and cultured astrocytes treated with di-buteryl-cyclic AMP. *J Neuropathol Exp Neurol* 1993; **52**: 205–215.
- [62] YU ACH, LEE YL, ENG LF. Astrogliosis in culture: I The model and the effect of antisense oligonucleotides on glial fibrillary acidic protein synthesis. *J Neurosci Res* 1993; **34**: 295–303.
- [63] ZILLES K, HAJOS F, KALMAN M, SCHLEICHER A. Mapping of glial fibrillary acidic protein-immunoreactivity in the rat forebrain and mesencephalon by computerized image analysis. *J Comp Neurol* 1991; **308**: 340–355.

Otrzymano: 15.03.1995 r.

Przyjęto: 13.04.1995 r.

Adres autora: Zakład Neuroanatomii, Instytut Zoologii, UJ
30 060 Kraków, ul. Ingardena 6

MIKROGLEJ: MAKROFAGI OŚRODKOWEGO UKŁADU NERWOWEGO

MICROGLIA: THE MACROPHAGES OF THE CENTRAL NERVOUS SYSTEM

MAREK ZIAJA

Zakład Neuroanatomii Instytutu Zoologii Uniwersytetu Jagiellońskiego, Kraków

Streszczenie: Komórki mikrogleju uważane są za makrofagi ośrodkowego układu nerwowego. Pochodzą one jak i inne makrofagi z monocytów. Można wyróżnić trzy podstawowe typy morfologiczne mikrogleju: promienisty, wydłużony i zbity. W wyniku aktywacji obcymi antygenami komórki mikrogleju wykazują ekspresję antygenów powierzchniowych, charakterystycznych dla komórek układu odpornościowego. Świadczy to o ich udziale w reakcjach obronnych organizmu. Jednakże oprócz zwalczania skutków zmian patologicznych komórki mikrogleju mogą także powodować przez wydzielanie toksycznych związków śmierć komórek nerwowych. Niestety, mimo intensywnych badań nie zostały w pełni poznane funkcje tych komórek.

Słowa kluczowe: mikroglej, ośrodkowy układ nerwowy, antygen, układ odpornościowy.

Summary: Microglial cells are thought as macrophages in the central nervous system. It has been revealed that they origin from monocytes like different types of macrophages. Three main morphological classes of microglia can be distinguished: radially branched, longitudinal cells and compact microglia. Activation of microglia by exogenous antigens results in expression of surface antigens characteristic to cells of immune system. Microglia are involved in the immune response not only by their phagocytic activity but also by release of factors which influence other cells. Moreover, they can induce degeneration of neurons by releasing toxic substances. In spite of extensive search the functions of microglia are not completely understood.

Key words: microglia, central nervous system, antigen, immune system

WSTĘP

W organizmie kręgowców ważną rolę pełnią komórki układu odpornościowego. Przez całe życie toczą one walkę z bakteriami i wirusami atakującymi organizm, a

także usuwają ginące i zmienione patologicznie komórki różnych narządów. Wywodzą się one z układu krwiotwórczego, z produkowanych tam komórek prekursorowych. Jednym z rodzajów komórek układu odpornościowego są makrofagi. Różnicują się one z komórek hematopoetycznych (krwiotwórczych). We krwi obwodowej krążą przez kilkadziesiąt godzin jako monocyty, by następnie wejść do tkanek różnych narządów i tam przekształcić się w osiadłe makrofagi tkankowe np. płuc, śledziony czy węzłów chłonnych. W niektórych narządach określa się je specyficznymi nazwami jak np. komórki Kupffera w wątrobie. Wszystkie rodzaje makrofagów ujmujemy również w układ jednojądrzastych komórek fagocytujących (MPS – *mononuclear phagocytic system*).

Makrofagi uczestniczą zarówno w fazie rozpoznawania antygeny jak i w reakcji prowadzącej do jego eliminacji. Mają one zdolność prezentacji antygeny limfocytom, wytwarzają również substancje stymulujące lub hamujące reakcję innych komórek układu odpornościowego. Populacja osiadłych makrofagów nie jest statyczna. Może ona odnawiać się przez zastępowanie starzejących się komórek nowymi, pochodzącymi z krwi obwodowej, a także dzięki podziałom tych komórek, które znajdują się w danej tkance. Uważa się, że makrofagi aktywnie uczestniczą w utrzymywaniu homeostazy tkanki.

Większość tkanek ma swobodny kontakt z krwią, ale w niektórych narządach kontakt ten jest ograniczony. Jednym z nich jest ośrodkowy układ nerwowy (OUN). Ze względu na brak w nim sieci limfatycznej i występowanie bariery krew-mózg przyjęto, że jest on narządem, do którego komórki układu odpornościowego nie mają wstępu. Gdy w wyniku zakażenia czy uszkodzenia bariera krew-mózg ulega przerwaniu, monocyty z krwi swobodnie i szybko napływają do tkanki mózgowej, usuwając skutki infekcji. Co się jednak dzieje, gdy bariera pozostaje nietknięta, jak obserwuje się w znacznej liczbie chorób? Co dzieje się z resztkami ginących komórek tkanki mózgowej, skoro makrofagi nie mają do niej dostępu? Skoro bariera krew-mózg zapobiegająca przechodzeniu innych komórek do OUN kształtuje się we wczesnym okresie rozwoju, to jakie komórki spełniają rolę makrofagów występujących w innych tkankach i czy w ogóle są takie komórki? Takie i podobne pytania stawiali sobie naukowcy badający anatomię i fizjologię układu nerwowego. Wiemy już, że takie komórki rzeczywiście istnieją, że mózg również ma swoje makrofagi. Te makrofagi to komórki mikrogleju. Poświęca się im obecnie bardzo dużo uwagi, gdyż okazało się, że odgrywają znaczącą rolę w obronie OUN przed niekorzystnymi czynnikami.

POCHODZENIE KOMÓREK MIKROGLEJU

Komórki mikrogleju opisał po raz pierwszy del Rio-Hortega, który zaobserwował je w tkance mózgowej impregnowanej srebrem [11]. Zauważył on niewielkie komórki z rozgałęziającymi się wypustkami, dla których stworzył nazwę mikroglej. Przez wiele lat zastanawiano się nad tym, z jakiej tkanki mogą one pochodzić: mezodermalnej (z monocytów), czy, jak inne komórki układu nerwowego, z neuroektodermy. Del

Rio-Hortega uznał, że powstają one z mezodermy [11], ale przez długie lata utrzymywał się pogląd o neuroektodermalnym pochodzeniu mikrogleju [19]. Badania ostatnich lat dowiodły, że komórki mikrogleju powstają, podobnie jak makrofagi innych tkanek, z monocytów [33, 38]. Ponieważ na powierzchni komórek mikrogleju początkowo nie wykazywano antygenów charakterystycznych dla monocytów i makrofagów, wielu naukowców odnosiło się niechętnie do tej hipotezy. Jednakże udoskonalone metody immunocytochemicznego barwienia tkanki pozwoliły później potwierdzić hipotezę o pochodzeniu mikrogleju z monocytów. Ważnych informacji dostarczyły badania rozwoju embrionalnego siatkówki i mózgu [33, 38] przeprowadzone z użyciem przeciwciała F4/80. Jest to przeciwciało monoklonalne IgG2b szczura skierowane przeciwko glikoproteinie o masie 160 kDa o nieznannej funkcji [33]. Badania z użyciem tego przeciwciała ujawniły trzy podstawowe fakty.

(a) Komórki pochodzenia szpikowego wchodzą do parenchymy ośrodkowego układu nerwowego. Aby wykazać czy komórki krwiopochodne wchodzą do OUN, zwierzętom niszczone szpik kostny przez naświetlanie promieniami rentgena, który następnie odtwarzano przeszczepiając szpik od zdrowych dawców. Stwierdzono później, że w mózgu tych zwierząt znajdowały się komórki pochodzące od dawcy i mające charakterystyczne dla niego antygeny zgodności tkankowej, które są specyficzne i niezmiennie dla danego osobnika [18]. Wyniki tych badań wskazują, że istotnie komórki krwiopochodne wchodzą do parenchymy mózgu.

(b) Zachodzi przekształcenie monocytów w mikroglej. Używając przeciwciała F4/80 badano również ontogenezę mikrogleju w rozwijającej się siatkówce i mózgu myszy [33]. W szesnastym dniu rozwoju embrionalnego znaleziono F4/80-pozytywne (F4/80+) makrofagi, okrągłe lub gwiaździste, lecz nie stwierdzono klasycznego, rozgałęzionego mikrogleju. W dniu urodzenia zwiększyła się liczba komórek F4/80+, a część z nich miała bardziej rozgałęziony wygląd. W następnym tygodniu po urodzeniu, komórki F4/80+ upodobniły się do dojrzałego mikrogleju. Wykazano w ten sposób, że istotnie występuje różnicowanie się monocytów w mikroglej. Stwierdzono także, że największa liczba monocytów wchodzi z krwi do mózgu w czasie późnego embrionalnego i wczesnego postnatalnego okresu rozwoju, przy czym czas ich przejścia do parenchymy mózgu jest skorelowany ze wzrostem naturalnie występującej we wczesnej fazie rozwoju po urodzeniu, śmierci komórek [29, 33]. Zakłada się, że w wyniku tego procesu powstają substancje stymulujące napływ monocytów z krwi. Ciekawe jest to, iż w tym czasie bariera krew-mózg nie jest uszkodzona [33] i dlatego wydaje się zrozumiałe, że krążące we krwi monocyty muszą nie tylko otrzymać odpowiedni sygnał chemiczny warunkujący ich przedostawanie się do parenchymy mózgu, ale także w jakiś sposób muszą przejść przez szczelną barierę krew-mózg. Nie wiadomo, jak komórki te radzą sobie z pokonywaniem bariery krew-mózg i do tej pory zagadnienie to czeka na wyjaśnienie. Być może, jak sugeruje Piani i wsp. [41], przechodzenie monocytów do parenchymy mózgu zależy od wydzielanych przez nie miejscowo enzymów. Wiadomo, że komórki te mają zdolność

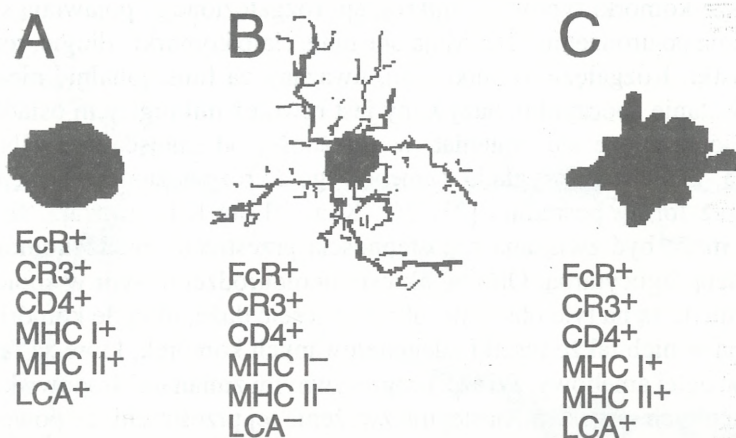
wydzielania kolagenolitycznej metaloproteinazy. Enzym ten niszczy kolagen typu IV, który jest głównym składnikiem strukturalnym błony podstawnej ścian naczyń krwionośnych.

(c) Komórki mikrogleju mają antygeny charakterystyczne dla komórek linii monocytarnej. Jeżeli komórki mikrogleju wywodzą się z monocytów, to należy oczekiwać, że będą posiadały wspólne z nimi antygeny. Okazało się, iż jest tak w istocie [15, 24, 26]. Coraz czulsze procedury barwienia immunocytochemicznego wykazały występowanie licznych antygenów charakterystycznych dla makrofagów. Poza markerem F4/80, mikroglej wykazuje ekspresję antygenów charakterystycznych dla leukocytów (LCA – *Leucocyte common antigen*) [24], receptorów łańcucha Fc immunoglobuliny (FcR) [1, 33] i składnika komplementu 3 (CR3) [33, 36]. Komórki te mają także na swojej powierzchni, zwłaszcza w stanie zaktywowanym, antygen kompleksu zgodności tkankowej klasy II (MHC II) [15, 24, 45], który jest ograniczony w występowaniu do komórek immunokompetentnych.

Przedstawione powyżej wyniki badań potwierdziły hipotezę, że komórki mikrogleju stanowią populację osiadłych makrofagów OUN. Zgodnie z tą teorią, we wczesnych etapach rozwoju embrionalnego monocytu wchodzi do parenchymy mózgu. Tam przekształcają się w amebowy mikroglej, który w dalszym rozwoju ulega transformacji do komórek osiadłego mikrogleju. Jednakże niektórzy autorzy sugerują, że większość komórek osiadłego mikrogleju powstaje z neuroektodermy. Fujita i wsp. [14] przypuszczają, że mikroglej podobnie jak astrocyty i oligodendrocyty, pochodzi z komórek neuroektodermalnych. Sugerują oni, że mikroglej i komórki prekursorowe O-2A, z których powstają oligodendrocyty i astrocyty typu 2, mają wspólne cechy histochemiczne. Z kolei De Groot i wsp. [10] przeprowadzili eksperyment, w którym jako dawców szpiku używali myszy transgeniczných i stwierdzili, że tylko 10% komórek osiadłego mikrogleju, zidentyfikowanych za pomocą przeciwciał F4/80, wykazywało sygnał transgeniczny. Dane te, jeśli zostaną potwierdzone, mogłyby świadczyć o heterogenności populacji komórek mikrogleju.

ROZMIESZCZENIE MIKROGLEJU W TKANCIE OUN

Makrofagi obserwowane w różnych tkankach nie są rozmieszczone przypadkowo, lecz znajdują się najczęściej w sąsiedztwie naczyń krwionośnych. Jednakże tkanka OUN przejawia bardzo duże zróżnicowanie strukturalne i funkcjonalne. Poszczególne rejony mózgu różnią się typami komórek nerwowych, ilością połączeń między nimi, a także rodzajem neurotransmiterów. Dlatego zastanawiano się, czy rozmieszczenie i wygląd komórek mikrogleju zmieniają się w zależności od okolicy OUN. Szczególnie interesujące było to, czy rozmieszczenie mikrogleju jest skorelowane z naturalnie występującą, rozwojową śmiercią komórek, a więc czy obszary ze wzmożoną śmiercią komórek mają również więcej mikrogleju.



Rys. 1. Schemat przedstawia trzy formy czynnościowe komórek mikrogleju i charakterystyczne dla nich antygeny; + oznacza występowanie danego antygeny, zaś -- że ekspresji takiego antygeny nie wykryto: A – komórka amebowego mikrogleju występującego w okresie okołourodzeniowym; B – komórka mikrogleju osiadłego, powstającego w wyniku transformacji mikrogleju amebowego; C – makrofag mózgowy z dużym ciałem komórki i nielicznymi, krótkimi wypustkami

W trakcie rozwoju OUN można stwierdzić występowanie różnych form mikrogleju w zależności od stanu czynnościowego tych komórek. W rozwijającym się mózgu, w okresie okołourodzeniowym, obserwuje się mikroglej amebowy [17, 21, 28]. Komórki te mają duże, owalne ciało komórki, przypominając z wyglądu makrofagi. W tym czasie w rozwijającym się mózgu występuje naturalny proces obumierania części komórek nerwowych i oligodendrocytów [5, 29]. Amebowy mikroglej fagocytuje pozostałości po tych komórkach oczyszczając tkankę mózgu ze zdegenerowanych komórek [3]. Z tą funkcją prawdopodobnie wiąże się obserwowana wysoka ekspresja antygeny zgodności tkankowej klasy I (MHC I) [24]. Ponadto badania za pomocą mikroskopu elektronowego pozwoliły stwierdzić występowanie u amebowego mikrogleju fagosomów [21, 24], świadczących o ich roli fagocytów.

Możliwe jest także, że amebowy mikroglej ma wpływ na wzrost neuronów oraz regulację synapto- i gliogenezy przez wydzielanie czynników wzrostowych i troficznych, takich jak: interleukina-1 (IL-1) [9, 17], czy czynnik wzrostowy neurytów (NGF – *neurite growth factor*) [28]. Oprócz MHC I, w komórkach amebowego mikrogleju można stwierdzić występowanie receptora dopełniacza 3 (CR3) [24] oraz LCA (*leukocyte common antigen*) [24], który jest antygenem charakterystycznym dla limfocytów, monocytów i makrofagów. Wraz z wiekiem i rozwojem mózgu obserwuje się spadek ekspresji tych antygenów, co wiąże się z ich transformacją do spoczynkowego, mikrogleju rozgałęzionego. Jednakże przypuszcza się, że nie wszystkie komórki amebowe ulegają przekształceniu do form rozgałęzionych [28].

Pierwsze komórki typowego mikrogleju rozgałęzionego pojawiają się u szczura około 5 dnia po urodzeniu [21]. Mają one małe ciało komórki i długie, rozgałęziające się wypustki. Rozgałęziony mikroglej, uważany za funkcjonalnie nieaktywny lub będący w stanie spoczynku, nazywany jest również mikroglejem osiadłym. Kształt tych komórek może się zmieniać w zależności od miejsca w OUN, w którym występują. Zmiana ich wyglądu z amebowego do rozgałęzionego następuje stopniowo poprzez formy pośrednie [21, 24]. Kaur i Ling [21] uważają, że zmiana ich wyglądu może być związana z dostępnością przestrzeni międzykomórkowej i ich aktywnością fagocytarną. Otóż w okresie okołourodzeniowym w spidle wielkim, przestrzenie te są na tyle obszerne, aby pomieścić duże, okrągłe komórki amebowe. Występują w nich także resztki zdegenerowanych komórek, które są fagocytowane przez mikroglej amebowy. Wraz z progresywnymi zmianami środowiska, mielinizacją włókien i ich wzrostem, następuje zwężenie tej przestrzeni, co powoduje wydłużanie się mikrogleju wzdłuż przebiegu tych włókien [21]. Ponadto badania Lawson i wsp. [22] jasno wskazują na bezpośredni związek między wyglądem komórek mikrogleju i ich mikrośrodowiskiem.

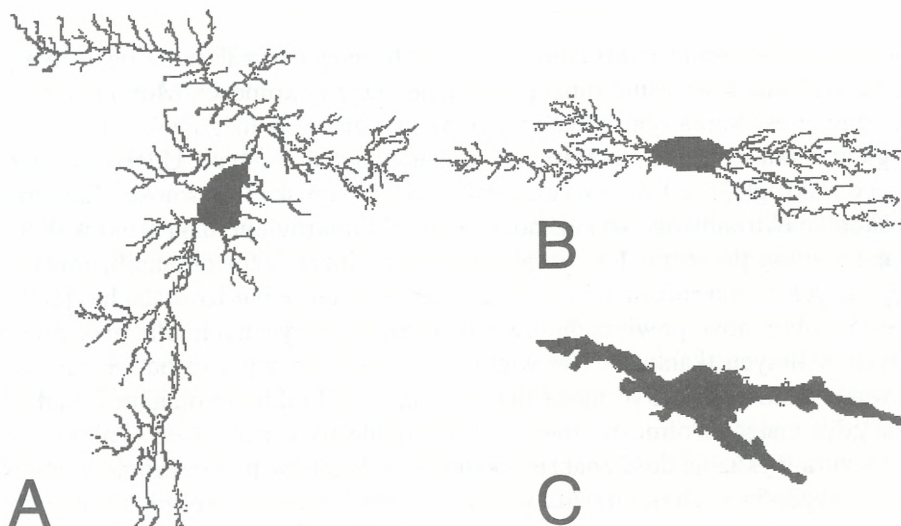
W normalnym, dojrzałym mózgu w zależności od miejsca można zaobserwować trzy typy morfologiczne komórek mikrogleju [22, 38].

(a) Mikroglej rozgałęziony występujący w istocie szarej, w której znajdują się perikariony, wypustki i synapsy neuronów. Komórki mikrogleju tego rodzaju mają trzy do pięciu głównych wypustek rozgałęziających się promieniście. Komórki tego typu różnią się długością wypustek. Związane jest to z ich wielkością i liczbą na danym obszarze, gdyż mniejsze i bardziej rozgałęzione komórki obserwuje się w rejonach o stosunkowo większej ich liczbie.

(b) W istocie białej, przez którą głównie przebiegają aksony, obserwuje się wydłużone komórki mikrogleju. Są one podobne do poprzedniego typu komórek, lecz ich wypustki są zorientowane zgodnie z kierunkiem przebiegu aksonów.

(c) W strukturach mózgu pozbawionych bariery krew-mózg, czyli tzw. narządach okołokomorowych, znajduje się mikroglej zbity. Ma on kilka długich wypustek, słabo rozgałęzionych. Nie wiadomo jeszcze, czy na wygląd ten mają wpływ białka osocza krwi. Być może jest tak w istocie, gdyż mikroglej w tych strukturach przejawia ekspresję licznych antygenów silniejszą niż w innych strukturach mózgu, chronionych barierą [34].

Stwierdzono, że mikroglej jest liczniejszy w istocie szarej niż w białej [28, 33]. Zauważono także, że struktury filogenetycznie młodsze zawierają więcej komórek mikrogleju niż struktury starsze. Jednocześnie nie stwierdzono, aby liczba i rozkład komórek mikrogleju zmieniały się wraz z postępem zaprogramowanej, naturalnej śmierci komórek. Być może rozmieszczenie i ilość komórek mikrogleju nie wiąże się w szczególny sposób z rozmieszczeniem i zróżnicowaniem innych typów komórek w OUN. Przemawia za tym brak korelacji między rozkładem mikrogleju a zróżnicowaniem funkcjonalnym poszczególnych struktur OUN, różnymi rodzajami neurotrans-



Rys. 2. Komórki mikrogleju mogą mieć różny wygląd w zależności od miejsca występowania w ośrodkowym układzie nerwowym, schematy przedstawiają: A – rozgałęzioną komórkę mikrogleju znajdującą się w substancji szarej; B – wydłużoną komórkę występującą w substancji białej; C – komórka należąca do typu zbitych komórek mikrogleju, jakie obserwuje się w narządach okołokomórkowych

miterów czy rozkładem innych komórek glejowych. Nie wiadomo dotychczas, jak komórki mikrogleju przyjmują rozkład charakterystyczny dla dojrzałego OUN i czy zależny on od miejsca, przez które napływają do OUN monocyty drogą selektywnej migracji, czy też od miejscowej proliferacji tych komórek.

Pod wpływem uszkodzenia osiadłe komórki mikrogleju w dojrzałym mózgu przekształcają się w formy reaktywne [17, 28]. Następuje stopniowa retrakcja ich wypustek i przyjmują one okrągły kształt [28]. Na ich powierzchni pojawiają się wiele antygenów charakterystycznych dla komórek immunokompetentnych, takich jak: MHC II [15, 26, 31, 45], CR3 [26], CD4 [34]. Niestety nie znany jest czynnik powodujący rewersję mikrogleju spoczynkowego do aktywnego makrofaga mózgowego.

Opisane formy czynnościowe ulegają między sobą przekształceniom. Amebowy mikroglej przekształca się w czasie rozwoju mózgu do rozgałęzionego, osiadłego mikrogleju. Ten z kolei w wyniku aktywacji pod wpływem zmian patologicznych, ulega konwersji do makrofagów mózgowych. Po zakończeniu reakcji aktywny mikroglej powraca do postaci osiadłej. Taki proces opisano w badaniach *in vitro* [44, 46], co świadczy, że podobna sytuacja może występować *in vivo*.

FUNKCJE KOMÓREK MIKROGLEJU

Badając pochodzenie mikrogleju, jego morfologię i rozmieszczenie w tkance, próbowano również wyjaśnić funkcje pełnione przez te komórki. Mimo coraz większego zainteresowania tym tematem, wciąż nie znamy pełnego zakresu działania mikrogleju w tkance OUN, zwłaszcza w organizmach dojrzałych. Uderzającą cechą osiadłego mikrogleju jest jego wygląd wskazujący na niską aktywność. Za pomocą mikroskopu elektronowego wykazano, że komórki mikrogleju mają słabo wykształcony aparat biosyntetyczny. Ich cytoplazma nie ma dużej liczby organelli, normalnie występujących w makrofagach [39]. Wiąże się z tym także bardzo słaba lub jej brak, ekspresja antygenów powierzchniowych, charakterystycznych dla makrofagów osiadłych w innych tkankach. Nie wiemy dokładnie, co wpływa na właśnie takie zachowanie mikrogleju. Być może ma to związek z brakiem kontaktu z białkami osocza, gdyż mający z nimi styczność mikroglej obecny w narządach okołokomorowych szczura wykazuje dość znaczną ekspresję antygenów powierzchniowych. Natomiast antygenów tych nie można wykryć na powierzchni mikrogleju leżącego w strukturach chronionych barierą krew-mózg [22, 37]. Nie wiadomo, jakie składniki osocza wpływają na ekspresję tych antygenów, tak ważnych dla prawidłowej reakcji komórek układu odpornościowego.

Wyniki badań nad rozwojem OUN wskazują, że monocyty i mikroglej mają zdolność wydzielania interleukiny-1, o której wiadomo, że wpływa na gliogenezę (podziały komórek glejowych) i angiogenezę (tworzenie sieci naczyniowej) [9, 26, 38, 41]. Mikroglej produkuje także specyficzne czynniki wzrostowe stymulujące podziały astrocytów, co ma szczególne znaczenie, gdyż reagują one na skutki uszkodzenia tkanki OUN [17, 38, 41].

Występowanie na powierzchni komórek mikrogleju receptorów dla łańcucha Fc immunoglobulin [1] i składnika komplementu 3 [33, 36] wskazuje na ich udział w reakcjach obronnych zależnych od przeciwciał. Jednakże znaczenie tego faktu pozostaje niejasne, gdyż w płynach pozakomórkowych OUN brak jest immunoglobulin i składników dopełniacza, które mogą pojawić się dopiero w wyniku zmian patologicznych tkanki i reakcji komórek układu odpornościowego.

Ponieważ mikroglej należy do makrofagów, należałoby oczekiwać, że bierze on udział w fagocytozie ginących komórek. Takie działanie mikrogleju wykryto u szczura w przysadce mózgowej [42]. Aksony neuronów podwzgórza kończą się w przysadce, gdzie wydzielają do krwiobiegu hormony: wazopresynę i oksytocynę. Zaobserwowano, że wypustki mikrogleju otaczają zakończenia neurytów, szczególnie te leżące w przestrzeni okołonaczyniowej. Wyszło stąd wniosek, że mikroglej fagocytuje neurosekrecyjne zakończenia aksonów. Ponieważ liczba zniszczonych w ten sposób zakończeń stanowi zaledwie ich małą część, trudno przypuszczać, aby był to mechanizm regulacji ilości wydzielanych hormonów. Z drugiej strony neurony sekrecyjne mają zdolność do regeneracji i w związku z tym, jedną z funkcji mikrogleju

w tej części mózgu mogłoby być "modelowanie" połączeń neuronów, zwłaszcza mających styczność z błoną podstawną [42]. Powstaje intrygująca hipoteza, że komórki mikrogleju mogą modyfikować połączenia neuronów, którą mogą zweryfikować dalsze systematyczne badania.

Najbardziej zmienną cechą komórek mikrogleju jest ich reakcja na różnego rodzaju uszkodzenia i infekcje OUN [2, 17, 26, 41]. Mikroglej aktywnie bierze udział w usuwaniu skutków zmian patologicznych w mózgu, czy to fagocytując pozostałości po ginących komórkach, czy to wydzielając różnego rodzaju substancje przyspieszające przebieg reakcji obronnych i przywracanie stałości środowiska zewnątrzkomórkowego [41]. Jednym z pytań stawianych przez naukowców jest to, który typ komórek glejowych: astrocyty, oligodendrocyty czy mikroglej, czy też wszystkie te rodzaje komórek, utrzymuje zdolność do podziałów i powoduje charakterystyczny wzrost liczby komórek glejowych w rejonie uszkodzenia, określanymi mianem glejozy. Wiadomo, że astrocyty, szczególnie typu 1, przechodzą aktywację i dzielą się w wyniku uszkodzenia mózgu [38]. Bardzo szybko reaguje także mikroglej, ulegając aktywacji i przekształcając się w makrofagi mózgowe. W tym czasie zachodzą także liczne podziały tych komórek zarówno wewnątrz miejsca uszkodzenia, jak i dookoła niego [16, 2]. Oczywiście, gdy w wyniku zmian patologicznych zostanie przerwana bariera krew-mózg do parenchymy mózgu napływają krążące we krwi monocyty. Odróżnienie ich od zaktywowanego mikrogleju pozostaje trudnym problemem technicznym, ze względu na ich podobieństwo w wyglądzie i antygenach powierzchniowych.

W wyniku badań nad uszkodzeniami tkanki mózgu okazało się, że mikroglej bardzo szybko reaguje na degenerację komórek. Wcześniej zauważono, że zmiany patologiczne tkanki mózgu powodują, że rozgałęziony, osiadły mikroglej przekształca się w ameboidalne, zaktywowane komórki [17, 35, 41, 43]. Po rozpoczęciu reakcji przez mikroglej, w okolicy i miejscu uszkodzenia podlegają aktywacji i dzielą się astrocyty tworząc tzw. bliźnię glejową [27, 47]. Może mieć to związek z wydzielaniem cytokin przez aktywny mikroglej, a przede wszystkim interleukiny-1 (IL-1), która stymuluje ich podziały [17, 41]. Wysuwane są także sugestie, że ameboidalne komórki obserwowane w rejonie uszkodzenia, szczególnie w partiach przypowierzchniowych, to napływające w wyniku przerwania bariery krew-mózg monocyty [17]. Jednakże podobne komórki obserwuje się w przypadku, gdy bariera krew-mózg nie jest zniszczona, co przemawia za tym, że przynajmniej część komórek osiadłego mikrogleju ulega aktywacji i rewersji do makrofagów mózgowych zdolnych do fagocytozy [17, 23, 30]. Sytuacja taka występuje w przypadku przecięcia (transekcji) nerwu twarzewego. W tym przypadku reakcję mikrogleju obserwuje się w jądrze tego nerwu co powoduje, że komórki z krwi nie napływają do miejsca reakcji. Szybko po uszkodzeniu komórki mikrogleju osiadłego w jądrze nerwu twarzewego dzielą się i przekształcają się do formy zaktywowanej [28, 45]. Powstaje tzw. aktywny mikroglej (*activated*

microglia), który z wyglądu przypomina makrofaga mózgowego, ale nie posiada właściwości żernych.

Można przypuszczać, że reakcja mikrogleju w takiej sytuacji związana jest z procesami naprawy uszkodzonej tkanki niż z usuwaniem zdegenerowanych komórek, gdyż neurony nerwu twarzowego zachowują zdolność do regeneracji i nie giną w wyniku przecięcia [28, 45]. Aktywny mikroglej otacza te komórki wciskając swoje wypustki do szczeliny synaptycznej, między element presynaptyczny a ciało komórki nerwowej, lecz nie fagocytuje tej synapsy. Znaczenie funkcjonalne tego procesu, znanego jako "*synaptic stripping*" nie jest znane. Być może ma to związek z izolacją neuronów do czasu ich regeneracji lub też z modyfikacją połączeń synaptycznych [28, 30]. Jeżeli natomiast wystąpi degeneracja komórek nerwowych np. w wyniku wstrzyknięcia takich cytotoksycznych związków, jak kwas kainowy [20], zaktywowany mikroglej przekształca się w fagocytyjące makrofagi mózgowie usuwając zakończenia degenerujących neuronów i wykazując wysoką ekspresję antygenów MHC I i MHC II. Wydaje się przy tym, że transformacja komórek mikrogleju może zależeć od stopnia degeneracji neuronów [28].

MIKROGLEJ W STANACH CHOROBYCH OUN

Badając powstawanie i rozwój chorób ośrodkowego układu nerwowego naukowcy obserwują między innymi reakcję i wpływ różnych komórek, w tym także mikrogleju, na zmiany wywołane tymi chorobami. Jako komórki układu odpornościowego są one włączone w różne formy fagocytozy i prezentują obce antygeny na swojej powierzchni. Związane jest to ze znacznie nasiloną ekspresją antygenów zgodności tkankowej klasy II, która występuje w większości chorób OUN, takich jak choroba Alzheimera [26, 30, 45], stwardnienie rozsiane [15, 26] czy zapalenie mózgu i rdzenia [25, 26]. W wyniku zmian zachodzących w przebiegu tych chorób obserwuje się znaczną aktywację komórek mikrogleju. Świadczy to o jego udziale w procesach obronnych organizmu. Ulega on także aktywacji w czasie starzenia się mózgu. Wtedy obserwowana jest większa liczba aktywnych komórek mikrogleju [30], co związane jest być może z rosnącą liczbą ginących z wiekiem komórek.

Na powierzchni komórek mikrogleju stwierdzono występowanie receptorów łańcucha Fc przeciwciał. Jest to o tyle ciekawe, że trudno określić źródło tych przeciwciał w mózgu. Jeżeli zostanie zniszczona bariera krew-mózg, to mogą one napływać z krwi. Przeciwciała są produkowane przez limfocyty B i można przyjąć, że komórki te przechodzą przez barierę krew-mózg i w parenchymie mózgu produkują przeciwciała. W przypadku stwardnienia rozsianego [26] wykazano obecność w tkance mózgu niewielkiej liczby komórek produkujących przeciwciała, a barwienie immunocytochemiczne ujawniło, że są to limfocyty B [26]. Uderzająca jest stosunkowo mała ich liczba, ale gdy weźmie się pod uwagę, że są one zdolne do produkcji ogromnej

TABELA 1. Zachowanie się i aktywność komórek mikrogleju w rozwoju i przebiegu chorób ośrodkowego układu nerwowego

Rodzaj zmian patologicznych	Reakcja komórek mikrogleju	Aktywność komórek mikrogleju
Uszkodzenie	Proliferacja i migracja mikrogleju	Fagocytoza, wydzielanie IL-1, ekspresja MHC II
Stwardnienie rozsiane	Akumulacja mikrogleju w i dookoła płytek	Fagocytoza, wydzielanie IL-1, ekspresja MHC II, FcR, CR3, podziały, prezentacja antygeny
Choroba Alzheimerera	Gromadzenie się mikrogleju w okolicach płytek starczych	Fagocytoza, wydzielanie beta amyloidu i jego prekursora -APP, ekspresja MHC II, FcR, CR3
AIDS	Infekcja komórek mikrogleju wirusem HIV-1	Wydzielanie cytokin i kwasu glutaminowego, ekspresja antygeny CD4 i MHC II

ilości przeciwciał, to staje się jasne, że ta liczba limfocytów B może być wystarczająca do efektywnej eliminacji obcych antygenów.

Oplaszczanie obcych antygenów przez przeciwciała powoduje, że makrofagi, a więc i mikroglej, szybko je rozpoznają i fagocytują. W przypadku infekcji ma to znaczenie obronne, ale w chorobach autoimmunizacyjnych w ten sam sposób atakowane są własne komórki organizmu. Przypuszcza się, że jako obce antygeny rozpoznawane są składniki mieliny, jednakże nie udało się dokładnie określić ich rodzaju.

Cechą charakterystyczną choroby Alzheimerera jest występowanie płytek starczych, zbudowanych z beta amyloidu. W płytkach tych zaobserwowano występowanie reaktywnego mikrogleju z wysoką ekspresją antygenów MHC I i MHC II [30, 31, 32]. Ten związek mikrogleju z płytkami starczymi pozwala przypuszczać, że odgrywa on rolę w odkładaniu beta amyloidu i tworzeniu płytek starczych. Stwierdzono, że mikroglej może pośredniczyć w procesach chorobowych przez wydzielanie patogennego beta amyloidu [4, 31]. Prawdopodobnie zachodzi także fagocytoza prekursora beta amyloidu (APP – *amyloid precursor protein*) przez mikroglej [28, 30]. Z drugiej strony mikroglej może być włączony w produkcję płytek *de novo* [4]. Frackowiak i wsp. [13] uważają, że reaktywny mikroglej produkuje i wydziela swój własny beta amyloid. Stwierdzono, że jego synteza zachodzi w retikulum endoplazmatycznym przy udziale specyficznych enzymów [4, 13, 49]. Reaktywny mikroglej może także wpływać na rozwój choroby Alzheimerera przez zwiększone wydzielanie IL-1, która z kolei powoduje zwiększoną ekspresję APP i α 1-antychymotrypsyny, będących składnikami płytek starczych [26, 30]. Poza tym aktywny mikroglej prawdopodobnie syntetyzuje i wydziela białka dopełniacza, których występowanie stwierdzono w mózgu ludzi chorych na tę chorobę [26, 30].

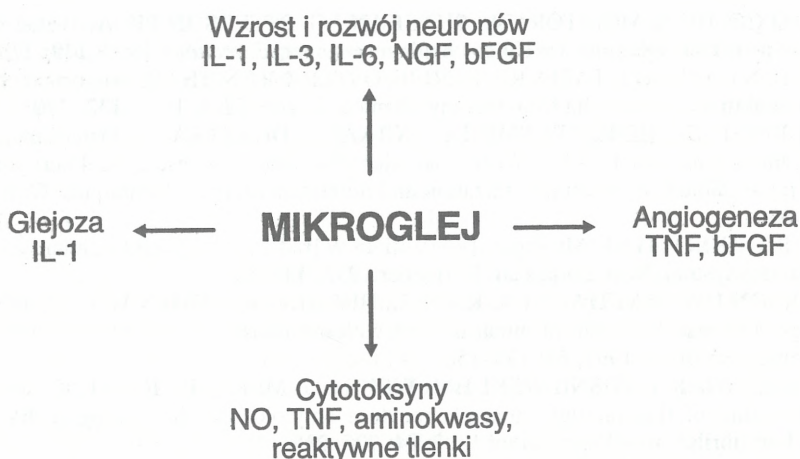
Obserwując reakcję mikrogleju na zmiany środowiska wewnętrznego OUN stwierdzono, że bierze on aktywny udział w jego kształtowaniu. Produkuje i wydziela wiele różnorodnych czynników wpływających zarówno na proces niszczenia jak i naprawy tkanki OUN. Aktywacja tych komórek doprowadza do wzrostu stężenia anionów

nadtlenkowych mających działanie cytotoksyczne, białek kaskady dopełniająca doprowadzającej do lizy komórki, czynników wzrostowych i cytokin, wpływających na działanie innych typów komórek [41]. Występowanie na powierzchni komórek mikrogleju białek CD4 sugeruje, że mogą one stanowić cel dla wirusa HIV, powodującego AIDS [7, 12, 50]. Bierze się to stąd, że białko CD4 działa jak receptor dla wniknięcia wirusa HIV do wnętrza komórki. Ekspresja tego białka zmienia się w czasie i jest większa w przypadku mikrogleju zaktywowanego. Prawdopodobnie wpływa na to obecność lub brak bariery krew-mózg, gdyż więcej ma go mikroglej mający kontakt z białkami osocza [38]. Ponadto stwierdzono występowanie wirusa HIV w makrofagach tkankowych, a także w mikrogleju, co przemawia za tym, że są one atakowane przez ten wirus [50]. Nie znany jest mechanizm zakażenia komórek mikrogleju. Być może wirus HIV-1 zakaża monocyty krążące we krwi, z których niektóre mogą czasami przejść przez barierę krew-mózg, doprowadzając do zakażenia osiadłego mikrogleju [48]. Ta hipoteza "Konia trojańskiego" dobrze wyjaśnia zarówno sposób zakażenia komórek mikrogleju, jak i ich pochodzenie z monocytów. W wyniku infekcji wirusem HIV-1 makrofagi produkują kwas glutaminowy, który w dużym stężeniu jest toksyczny dla neuronów powodując ich degenerację. Także cytokiny i kwas arachidonowy wytwarzane przez zainfekowane makrofagi mogą wpływać na zmiany w mózgu ludzi chorych na AIDS [41].

Komórki mikrogleju biorą również udział w skutecznej eliminacji mikroorganizmów, które dostały się do mózgu. W wyniku aktywacji interferonem gamma (INF- γ) wydzielanym przez limfocyty T, fagocytują i niszczą bakterie i pasożyty [41]. Pod jego wpływem wzrasta ekspresja MHC I i MHC II, a mikroglej wykazuje cechy komórki prezentującej antygen limfocytom [28, 41]. Poza tym *in vitro* wykazano produkcję przez reaktywny mikroglej, w wyniku stymulacji cytokinami, tlenków azotu (NO, ONOO⁻, NO₂, NO₂⁻), które działają jak neurotoksyny [6, 8]. Zaktywowany mikroglej może wydzielać również aniony nadtlenkowe i reaktywne rodniki tlenowe czy też inne związki toksyczne, które mogą być przyczyną degeneracji neuronów [40, 41].

PODSUMOWANIE

Komórki mikrogleju należą do układu jednojądrzastych komórek fagocytujących. Świadczy o tym ich pochodzenie i pełnione przez nie funkcje. Niewątpliwie odgrywają one ogromnie ważną rolę w funkcjonowaniu OUN. Zabezpieczają go przed skutkami zmian chorobowych i biorą udział w utrzymywaniu stałości środowiska zewnątrzkomórkowego w mózgu. Z drugiej jednak strony zachowanie ich w chorobach OUN może świadczyć, że mogą mieć one także, w wyniku zmian patologicznych, niekorzystny wpływ na przebieg procesów chorobowych. Mikroglej, będąc typem komórek bardzo czułym na wszelkie patologiczne zmiany środowiska, szybko



Rys. 3. Schemat ukazujący czynniki wydzielane przez komórki mikrogleju i ich wpływ na inne komórki ośrodkowego układu nerwowego

na nie reaguje zmieniając wygląd i zachowanie. Jednakże mimo wielu badań, funkcje tych komórek w dużej mierze pozostają nieznane. Być może dalsze badania umożliwią pełne poznanie roli tych komórek w normalnym i zmienionym patologicznie OUN, pozwalając lepiej zrozumieć przyczyny zmian chorobowych zachodzących w tkance nerwowej.

PIŚMIENNICTWO

- [1] AKIYAMA H, MCGEER PL. Brain microglia constitutively express b2integrins. *J Neuroimmunol* 1990; **30**: 81–93.
- [2] ANDERSSON PB, PERRY VH, GORDON S. The CNS acute inflammatory response to excitotoxic neuronal cell death. *Immunol Lett* 1991; **30**: 177–182.
- [3] ASHWELL K. Microglia and cell death in the developing mouse cerebellum. 1990; *Dev Brain Res* **55**: 219–230.
- [4] BANATIRB, GEHRMANN J, CZECH C, MONNING U, JONES LL, KONIG G, BEYREUTHER K, KREUTZBERG GW. Early and rapid de novo synthesis of Alzheimer bA4-amyloid precursor protein (APP) in activated microglia. *Glia* 1993; **9**: 199–210.
- [5] BARRES BA, HART IK, COLES HSR, BURNE JF, VOJVODIC JT, RICHARDSON WD, RAFF MC. Cell death and control of cell survival in the oligodendrocyte lineage. *Cell* 1992; **70**: 31–46.
- [6] BOJE KM, ARORA PK. Microglial-produced nitric oxide and reactive nitrogen oxides mediate neuronal cell death. *Brain Res* 1992; **587**: 250–256.
- [7] BRINKMANN R, SCHWINN A, NARAYAN O, ZINK C, KRETH HW, ROGGENDORF W, DORRIES R, SCHWENDER S, IMRICH H, MEULEN V. Human immunodeficiency virus infection in microglia: correlation between cells infected in the brain and cells cultured from infectious brain tissue. *Annals Neurol* 1992; **31**: 361–365.

- [8] CHAO CC, HU S, MOLITOR TW, SHASKAN EG, PETERSON PK. Activated microglia mediate neuronal cell injury via a nitric oxide mechanism. *J Immunol* 1992; **149**: 2736–2741.
- [9] COLTON CA, YAO J, TAFFS RE, KERI JE, OSTER-GRANITE ML. Abnormal production of interleukin-1 by microglia from trisomy 16 mice. *Neurosci Lett* 1991; **132**: 270–274.
- [10] DE GROOT CJA, HIPPEL W, SMINIA T, KRAAL G, DIJKSTRA CD. Determination of the origin and nature of brain macrophages and microglial cells in mouse central nervous system, using non-radioactive in situ hybridization and immunoperoxidase techniques. *Glia* 1992; **6**: 301–309.
- [11] DEL RIO-HORTEGA P. Microglia. [w] Penfield W [red.] Cytology and cellular pathology of the nervous system. New York: Paul B. Hoeber 1932: 482–534
- [12] DICKSON DW, MATTIACE LA, KURE K, HUCHINS K, LYMEN WD, BROSNAN CF. Biology of disease. Microglia in human disease, with an emphasis on acquired immune deficiency syndrome. *Lab Invest* 1991; **64**: 135–156.
- [13] FRACKOWIAK J, WISNIEWSKI HM, WEGIEL J, MERZ GS, IQBAL K, WANG KC. Ultrastructure of the microglia that phagocytose amyloid and the microglia that produce b-amyloid fibrils. *Acta Neuropathol* 1992; **84**: 225–235.
- [14] FUJITA S, TSUCHINASHI Y, KITAMURA T. Origin, morphology and function of the microglia. [w] Vidrio EA, Fedoroff S [red.] Glial and neuronal cell biology. New York: Alan R. Liss 1980: 141–169.
- [15] GEHRMANN J, BANATI RB, KREUTZBERG GW. Microglia in the immune surveillance of the brain: human microglia constitutively express HLA-DR molecules. *J Neuroimmunol* 1993; **48**: 189–198.
- [16] GIORDANA MT, ATTANASIO A, CAVALLA P, MIGHELIA, VIGLIANI MC, SCHIFFER D. Reactive cell proliferation and microglia following injury to the rat brain. *Neuropathol App Neurobiol* 1994; **20**: 163–174.
- [17] GIULIAN D. Ameboid microglia as effectors of inflammation in the central nervous system. *J Neurosci Lett* 1987; **18**: 155–171.
- [18] HICKEY WF, KIMURA H. Perivascular microglial cells of the CNS are bone marrow-derived and present antigen in vivo. *Science* 1988; **239**: 290–302.
- [19] KITAMURA T, MIYAKE T, FUJITA S. Genesis of resting microglia in the gray matter of mouse hippocampus. *J Comp Neurol* 1984; **226**: 421–433.
- [20] KAUR C, LING EA. Activation and re-expression of surface antigen in microglia following an epidural application of kainic acid in the rat brain. *J Anat* 1990; **180**: 333–342.
- [21] KAUR C, LING EA. Study of the transformation of ameboid microglial cells into microglia labelled with the isolectin Griffonia simplicifolia in postnatal rats. *Acta Anat* 1991; **142**: 118–125.
- [22] LAWSON LJ, PERRY VH, DRI P, GORDON S. Heterogeneity in the distribution and morphology of microglia in the normal adult mouse brain. *Neuroscience* 1990; **39**: 151–170.
- [23] LAWSON LJ, PERRY VH, GORDON S. Turnover of resident microglia in the normal adult mouse brain. *Neuroscience* 1992; **48**: 405–415.
- [24] LING EA, KAUR C, WONG WC. Expression of MHC and LCA in amoeboid microglia in postnatal rats. *J Anat* 1991; **177**: 117–126.
- [25] MATSUMOTO Y, OHMORI K, FUJIWARA M. Immune regulation by brain cells in the central nervous system: microglia but not astrocytes present myelin basic protein to encephalogenic T cells under *in vivo*-mimicking conditions. *Immunol* 1992; **76**: 209–216.
- [26] MCGEER PL, KAWAMATA T, WALKER DC, AKIYAMA H, TOOYAMA I, MCGEER E. Microglia in degenerative neurological disease. *Glia* 1993; **7**: 84–92.
- [27] MIYAKE T, HATTORI T, FUKUDA M, KITAMURA T. Reaction of S-100-positive glia after injury of mouse cerebral cortex. *Brain Res* 1989; **489**: 31–40.
- [28] NAKAJIMA K, KOHSAKA S. Functional roles of microglia in the brain. *Neurosci Res* 1993; **17**: 187–203.

- [29] OPPENHEIM RW, PREVETTE D, TYTELL M, HOMMO S. Naturally occurring and induced neuronal death in the chick embryo requires protein and DNA synthesis: evidence for the role of cell death genes. *Dev Biol* 1990; **138**: 104–113.
- [30] PERLMUTTER LS, SCOTT SA, CHUI HC. The role of microglia in the cortical neuropathology of Alzheimer's disease. *Bull Clinic Neurosci* 1991; **56**: 120–130.
- [31] PERLMUTTER LS, SCOTT SA, BARRÓN E, CHUI HC. MHC class II-positive microglia in human brain: association with Alzheimer lesions. *J Neurosci Res* 1992; **33**: 549–558.
- [32] PERLMUTTER LS, BARRON E, CHUI HC. Morphologic association between microglia and senile plaques amyloid in Alzheimer's disease. *Neurosci Lett* 1990; **115**: 13–18.
- [33] PERRY VH, HUME DA, GORDON S. Immunohistochemical localization of macrophages and microglia in the adult and developing mouse brain. *Neuroscience* 1985; **15**: 313–326.
- [34] PERRY VH, GORDON S. Modulation of the CD4 antigen on macrophages and microglia in the rat brain. *J Exp Med* 1987; **166**: 1138–1143.
- [35] PERRY VH, BROWN MC. Macrophages and nerve regeneration. *Curr Opinioon in Neurobiol* 1992; **2**: 679–682.
- [36] PERRY VH, GORDON S. Macrophages and the nervous system. *Int Rev Cytol* 1991; **125**: 203–244.
- [37] PERRY VH, GORDON S. Resident macrophages of the central nervous system: Modulation of phenotype in relation to a specialized microenvironment. [w] Goetzl EJ, Spector NH [red.] Neuroimmune networks: Physiology and diseases. New York: Alan R. Liss 1989
- [38] PERRY VH, GORDON S. Macrophages and microglia in the nervous system. *Trends in Neurosci* 1988; **11**: 273–277.
- [39] PETERS A, PALAY SL, WEBSTER HD. Microglia. [w] Peters A, Palay S, Webster DH [red.] The fine structure of the nervous system: the neurons and supporting cells. New York, Oxford: Oxford University Press 1991: 304–311.
- [40] PIANI D, SPRANGER M, FREI K, SCHAFFNER A, FONTANA A. Macrophage-induced cytotoxicity of NMDA receptor positive neurons involves excitatory amino acid rather than reactive oxygen intermediates and cytokines. *Eur J Immunol* 1992; **22**: 2429–2436.
- [41] PIANI D, CONSTAM DB, FREI K, FONTANA A. Macrophages in the brain: friends or enemies. *NIPS* 1994; **9**: 80–84.
- [42] POW DV, PERRY VH, MORRIS JF, GORDON S. Microglia in the neurohypophysis associate with and endocytose terminal portions of neurosecretory neurons. *Neuroscience* 1989; **33**: 567–578.
- [43] ROZEMULLER JM, VAN DER VALK P, EIKELENBOOM P. Activated microglia and cerebral amyloid deposits in Alzheimer's disease. *Res Immunol* 1992; **143**: 646–649.
- [44] SAWADA M, SUZUMURA A, YAMAMOTO H, MARUNOUCHI T. Activation and proliferation of the isolated microglia by colony stimulating factor-1 and possible involvement of protein kinase C. *Brain Res* 1990; **509**: 119–124.
- [45] STREIT WJ, GRAEBER MB, KREUTZBERG GW. Expression of Ia antigens on perivascular and microglial cells after sublethal and lethal neuronal injury. *Exp Neurol* 1989; **105**: 115–126.
- [46] SUZUMURA A, SAWADA M, YAMAMOTO H, MARUNOUCHI T. Effects of colony stimulating factors on isolated microglia in vitro. *J Neuroimmunol* 1990; **30**: 11–120.
- [47] TOPP KS, FADDIS BT, VIJAYAN VK. Trauma-induced proliferation of astrocytes in the brain of young and aged rats. *Glia* 1989; **2**: 201–211.
- [48] WATKINS BA, DORN HH, KELLY WB, ARMSTRONG RC, POTTS BJ, MICHAELS F, KUFTA CV, DUBOIS-DALEQ M. Specific tropism of HIV-1 for microglia cells in primary human brain cultures. *Science* 1990; **249**: 549–553.
- [49] WISNIEWSKI HM, WEGIEL J. The role of perivascular and microglial cells in fibrillogenesis of b-amyloid and PrP protein in Alzheimer's disease and scrapie. *Res Immunol* 1992; **143**: 642–645.

- [50] YOSHIOKA M, SHAPSHAK P, SUN NCJ, NELSON SJ, SVENNINGSSON A, TATE LG, PARDO V, RESNICK L. Simultaneous detection of ferritin and HIV-1 in reactive microglia. *Acta Neuropathol* 1992; **84**: 297-306.

Otrzymano: 23.12.1994 r.

Przyjęto: 19.04.1995 r.

*Adres autora: Uniwersytet Jagielloński, Instytut Zoologii, Zakład Neuroanatomii
30060 Kraków, ul. Ingardena 6*

WPŁYW CZYNNIKA MARTWICY NOWOTWORU NA KOMÓRKI ŚRÓDBŁONKA NACZYŃ

INFLUENCE OF TUMOR NECROSIS FACTOR ON VASCULAR ENDOTHELIAL CELLS

Sławomir TERLIKOWSKI*, Henryk Fr. NOWAK**, Wiktor ŁOTOCKI*

Klinika Ginekologii i Położnictwa Septycznego Instytutu Położnictwa i Chorób Kobiecych Akademii Medycznej w Białymstoku, ** Zakład Anatomii Patologicznej Akademii Medycznej w Białymstoku

Streszczenie: Śródbłonek naczyń krwionośnych stanowi barierę między tkankami a krążącą krwią. Zmiany zachodzące w komórkach śródbłonka mogą określać regulację ruchu komórek i cząsteczek do tkanek. Występuje tu wiele zróżnicowanych reakcji, które mogą zależeć od działania cytokin. W przeglądzie tym podsumowano badania *in vitro* i *in vivo* opisujące zmiany czynnościowe zachodzące w komórkach śródbłonka przy udziale czynnika martwicy nowotworu (*Tumor Necrosis Factor*, TNF).

Słowa kluczowe: czynnik martwicy nowotworu (TNF), śródbłonek

Summary: The endothelium constitutes a barrier between the tissues and the blood-stream. Alterations in the endothelium are important factors determining the regulation of the traffic of the circulating cells and molecules into the tissues. There are many different responses that may be cytokine related. In this review we tried to summarize the *in vitro* and *in vivo* experiments that describe the numerous cytokine *Tumor Necrosis Factor* (TNF) – mediated modulations of endothelial cell function.

Key words: Tumor Necrosis Factor (TNF), endothelium

WSTĘP

W licznych badaniach *in vitro* i *in vivo* stwierdzono istnienie dużej grupy heterogennej, rozpuszczalnych białek o dużej aktywności biologicznej, nazywanych

Praca wykonana w ramach projektu badań statutowych AM Białystok Nr. 303817.

cytokinami, uczestniczących w przekazywaniu informacji między komórkami [37]. Produkowane przez komórki różnego pochodzenia stanowią klucz do poznania mechanizmów procesów aktywacji, proliferacji i różnicowania się komórek zaangażowanych również w zjawiska immunologiczne.

CYTOKINY A KOMÓRKI ŚRÓDBŁONKA

Immunoregulacyjne właściwości cytokin związane są z możliwością ich wpływu na wytwarzanie w komórce tej samej lub innej cytokiny oraz na wywołaniu efektu działania na poziomie komórki docelowej. Dlatego też precyzyjna ocena efektów biologicznej aktywności cytokin może być przeprowadzona i określona tylko w środowisku, w którym działają [11, 12, 37, 40].

Stwierdzono, że komórki śródbłonna naczyń krwionośnych są miejscem działania wielu cytokin. Substancje te wpływają na stan czynnościowy komórek śródbłonna [11, 40, 41, 44]. Szczególne znaczenie w regulacji reakcji immunologicznych przypisuje się odmianie śródbłonna wyściełającego część naczyń pozawłośniczkowych, tzw. żyłkom o wysokim śródbłonku – HEV (*High Endothelial Venule*). Naczynia takie występują w obwodowych narządach limfatycznych, m.in. węzłach chłonnych, tkance limfatycznej przewodu pokarmowego, migdałkach. Śródbłonek tych naczyń pozwala na wybiórczą migrację poza naczynie określonych subpopulacji komórek w wyniku ich interakcji ze specyficznymi, powierzchniowymi receptorami [4, 9, 42, 60].

Charakterystyczne dla tego śródbłonna jest wytwarzanie dużej ilości usiarczanych glikolipidów [28]. W naczyniach wysłanych wysokim śródbłonkiem zachodzi przemieszczanie się krwinek białych i makrocząsteczek [1, 4, 26, 44].

W obecności cytokin komórki śródbłonna ulegają aktywacji i nabywają zdolności pełnienia nowych funkcji. Pod wpływem substancji mających właściwości angiogeniczne dochodzi do ich migracji i proliferacji [16, 30]. W trakcie odpowiedzi immunologicznej obserwuje się uszkodzenie HEV wyrażające się lokalną martwicą komórek lub utratą integralności doprowadzającą do różnych stanów dysfunkcji.

Badania prowadzone w hodowlach komórek śródbłonna dają wiele możliwości oceny ich odpowiedzi na działanie różnych czynników [34]. Pozostaje jednak pytanie, czy efekty obserwowane w hodowlach są wykładnikiem zmian obserwowanych *in vivo*. Z tych też przyczyn rozwijane są w dalszym ciągu doświadczalne modele na zwierzętach. Dzięki dostępności cytokin w formach czystych jako białka rekombinowane oraz stosowaniu ich w modelach doświadczalnych *in vivo* należy sądzić, że ich niewątpliwy wpływ na komórki śródbłonna naczyń zostanie w najbliższym czasie precyzyjnie określony.

Wśród wielu cytokin oddziałujących na śródbłonek ważną rolę odgrywają: czynnik martwicy nowotworu (*Tumor Necrosis Factor- α* , TNF- α) oraz limfotoksyna (*Lymphotoxin*, LT, nazywana też *Tumor Necrosis Factor- β* – TNF- β) [11, 44, 57]. TNF- β

pierwotnie zidentyfikowano jako produkt aktywowanych antygenem komórek T. TNF- α wykryto jako substancję syntetyzowaną przez stymulowane endotoksyną fagocyty jednojądrowe. Endotoksyny uczynniają syntezę i uwalnianie TNF przez pobudzenie kompleksu CD11/CD18 lub cząsteczki CD14 [10, 21]. Jednocześnie TNF- α izolowano w przebiegu przewlekłych schorzeń pasożytniczych i nowotworowych jako czynnik wywołujący wyniszczenie (kacheksję) stąd istnienie określenia – kachektyna (*cachectin*) [31, 44, 56].

BIOCHEMIA WYDZIELANIA TNF

Geny dla TNF- α i TNF- β są różne. Zlokalizowane są one jako jedyne geny cytokin na ramieniu krótkim chromosomu 6, w obrębie głównego kompleksu zgodności tkankowej (*Major Histocompatibility Complex* – MHC), w regionie długości ok. 7 kb nazywanym locus TNF [57]. Lokalizacja taka sugeruje ścisły związek TNF z układem regulującym odpowiedź immunologiczną. U człowieka są one homologiczne w ok. 28%. Obydwa zawierają po cztery egzony i trzy introny. Informacyjny RNA dla TNF- α zawiera na końcu 3' w regionie nie podlegającym translacji powtarzającą się sekwencję oktamerową (UUAUUUAU) $_n$. Sekwencję taką stwierdzono także w mRNA dla innych cytokin. Jest ona zdolna do destabilizacji mRNA i hamowania translacji.

W wyniku translacji najpierw powstaje nieaktywny prekursor TNF- α , składający się z 233 aminokwasów o masie cząsteczkowej 25 kDa, który ulega przekształceniu w formę aktywną, zawierającą 157 aminokwasów, o masie cząsteczkowej (m. cz.) 17 kDa [3]. Forma prekursorowa TNF- β ma m. cz. 22 kDa, a peptyd aktywny 18 kDa [2]. Po uwolnieniu do środowiska TNF może występować w postaci dimerów, trimerów i pentamerów, może także pozostać związany z błoną komórkową syntetyzującej go komórki w formie białka transbłonowego [31].

W związku z dużą homologią obu cytokin pochodzących od różnych gatunków, która sięga około 80%, nie stwierdza się wyraźnej swoistości gatunkowej. Zarówno TNF- α , jak i TNF- β zdolne są do oddziaływania na komórki przez łączenie się z tym samym receptorem błonowym, w związku z czym wykazują tę samą aktywność biologiczną [44]. Na komórkach istnieją dwa różne typy receptorów dla TNF różniące się m. cz. (p55–55 kDa i p75–75 kDa) oraz stopniem glikozylacji [33, 35, 36, 37, 45, 46, 53, 55]. Występują one na prawie wszystkich komórkach mających jądra. Na komórkach śródbłonna stwierdzono obydwie typy receptorów [44, 46, 51]. Ich ekspresję zwiększa interferon- γ (IFN- γ), jak też i sam TNF. Przekazywane przez receptory sygnały prowadzą w komórkach do aktywacji kinaz białkowych i czynników transkrypcyjnych [47, 59].

ROLA TNF W PROCESACH AKTYWACJI ŚRÓDBŁONKA

Komórki śródbłonna wykazują zdolność hamowania krzepnięcia krwi, jak również zawierają substancje prokoagulacyjne, czyli wzmagające ten proces. Krew nie krzepnie w naczyniach między innymi dzięki ujemnemu ładunkowi glikozaminoglikanów na powierzchni śródbłonna, produkowanej przez śródbłonek prostacyclinie I₂ (PGI₂), będącej silnym inhibitorem agregacji płytek krwi oraz dzięki α -2-makroglobulinie, która jest inhibitorem proteaz układu krzepnięcia i fibrynolizy [12, 19, 58]. W doświadczeniach na zwierzętach i badaniach klinicznych stwierdzono, iż oddziałując na komórki śródbłonna TNF zmienia ich właściwości antykoagulacyjne na prokoagulacyjne [41, 54, 57]. Jest to wynik hamowania aktywności trombomoduliny i pobudzania ekspresji czynnika tkankowego. Trombomodulina po związaniu trombiny bierze udział w aktywacji białka C, działającego jako naturalny antykoagulant [15]. TNF hamuje także fibrynolizę poprzez obniżenie ekspresji tkankowego aktywatora plazminogenu oraz wzmaganie ekspresji jego inhibitorów – *Plasminogen Activator Inhibitor type 1* (PAI-1) [14, 24, 58].

TNF powoduje zwiększenie przylegania do komórek śródbłonna granulocytów i limfocytów [36, 37, 44]. Podanie dożylnie cytokiny powoduje wczesne przyleganie granulocytów obojętnochłonnych i późne limfocytów. Niezbędnym warunkiem inicjującym proces migracji krwinek białych poza łożo naczyniowe jest aktywacja śródbłonna, która zachodzi pod wpływem działania bezpośredniego TNF lub pośredniego, przy udziale wewnątrzkomórkowego białka G (*intracellular G protein*) [6, 47]. Komórki śródbłonna zmieniając swój kształt zwięzają równocześnie światło naczynia, w wyniku czego dochodzi do zwolnienia przepływu krwi i tzw. zjawiska marginacji komórek [1, 22]. Polega ono na tym, że w momencie zwolnienia przepływu krwi krwinki białe przesuwały się w świetle naczynia bardziej obwodowo zbliżając się do śródbłonna. Wstępem do ściślej adhezji i przejścia poza naczynie jest coraz wolniejsze przesuwanie się komórek po powierzchni śródbłonna, w którym pod wpływem cytokin uwalnianych przez napływające komórki dochodzi do ekspresji cząsteczek adhezyjnych [4, 29, 37, 49, 60]. Cząsteczki występujące na powierzchni limfocytów nazwano receptorami zasiedlania (*homing receptors*) [18, 32], natomiast występujące na powierzchni śródbłonna, głównie żyłek pozawłosowatych z wysokim śródbłonkiem (*High Endothelial Venule* – HEV) – adresynami naczyniowymi [52]. Receptory zasiedlania rozpoznają komórki wysokiego śródbłonna, a pod wpływem m.in. TNF uwalnianego przez napływające komórki dochodzi do ekspresji adresyn: cząsteczek adhezji międzykomórkowej (*Intercellular Adhesion Molecule-1*, ICAM-1, CD54), które biorą udział w adhezji wszystkich rodzajów krwinek białych [22, 37, 42, 61] oraz cząsteczek adhezji leukocytów do śródbłonna (*Endothelial-Leukocyte Adhesion Molecule-1*, ELAM-1 [9, 20, 29, 51]. Mimo, że cząsteczka ta jest receptorem dla neutrofilów i monocytów [23] wykazano, że może łączyć także pewną subpopulację komórek T [50]. Interakcje między leukocytami i komórkami śródbłonna są procesem

wieloetapowym [4, 8, 22, 37, 42, 60]. Niezwykle ważnym mechanizmem powodującym przyleganie naczyń jest fakt uszkodzenia komórek śródbłonka i odsłonięcie białek błon podstawnych i tkanki łącznej [19, 29, 58]. Błony podstawne zbudowane są z wielu typów białek, z których najważniejszymi są: kolagen IV oraz wykazująca powinowactwo do kolagenu IV i proteoglikanów laminina, jedno z pierwszych białek wydzielanych przez komórki w okresie rozwoju embrionalnego. Czasteczki lamininy mogą łączyć się ze sobą, z proteoglikanami zawierającymi siarczan heparanu oraz z kolagenem typu IV tworząc błonę podstawną nabłonków [19]. W obrębie tkanki łącznej takim czynnikiem integrującym jest fibronektyna, białko biorące udział w przyleganiu komórek do kolagenu, stymulujące chemotaksję i spełniające istotne funkcje w procesach różnicowania się i rozwoju [13]. Fibronektyna modelowana w struktury podobne do błony podstawnej stanowi rusztowanie, po którym migruje śródbłonek, natomiast laminina wpływa na wzrost, różnicowanie oraz zdolność migracji komórek śródbłonka [19].

Rozpoznanie lamininy i fibronektyny przez różne komórki zachodzi dzięki pojawieniu się na ich powierzchni białek receptorowych nazywanych integrynami [25, 27, 61]. Są one odpowiedzialne za adhezję międzykomórkową, jak też i za adhezję komórek do białek substancji międzykomórkowej. Integryny biorą udział w regulacji tak adhezji, jak i przechodzenia krwinek białych przez ściany naczyń krwionośnych [1]. Występująca na limfocytach, monocytach i granulocytach integryna LFA-1 (CD11a/CD18) należąca do podrodziny β_2 [5, 27, 49, 61] łączy się ze strukturami adresyny ICAM-1 (CD54) obecnej na komórkach śródbłonka.

We wczesnych pasażach hodowli komórek śródbłonka TNF indukuje syntezę czynnika aktywującego płytki krwi (*Platelet-Activating Factor*, PAF) [7, 41]. Powoduje on agregację płytek i ich degranulację oraz indukuje chemotaksję, agregację i degranulację granulocytów obojętnochłonnych i monocytów. Działa *in vitro* na komórki śródbłonka żylnego, głównie żyłek pozawłośniczkowych indukując ekspresję ELAM-1 i zwiększa ekspresję ICAM-1. TNF hamuje wzrost komórek śródbłonka i ułatwia ich migrację w modelu angiogenezy *in vitro* [30].

Stwierdzono *in vivo*, iż niewielkie dawki TNF indukują angiogenezę natomiast duże ją hamują [16]. TNF powoduje w komórkach śródbłonka zwiększanie syntezy płytkopochodnego czynnika wzrostu (*Platelet-Derived Growth Factor*, PDGF), który oddziałując w sposób auto- i parakryny wpływa na proliferację fibroblastów i miocytów. Będąc czynnikiem chemotaktycznym i mitogennym dla komórek podścieliska sprzyja budowie nowych naczyń [43].

TNF wpływa silnie na wzrost ekspresji antygenów klasy I MHC [51]. Działanie to jest stopniowe i osiąga maksimum 4–6 dnia, natomiast w ekspresji antygenów klasy II MHC rola TNF jest niewielka.

Cytokina TNF często ogranicza się do pełnienia roli mediatora pośredniczącego lub wzmacniającego odpowiedź biologiczną, jak ma to miejsce w przypadku działania endotoksyny. W badaniach porównawczych stwierdzono, że endotoksyna także od-

działa na komórki śródbłonka i wykazuje zakres aktywności zbliżony do TNF, doprowadzając w komórkach śródbłonka do ekspresji błonowej i sekrecji interleukiny 1 (Interleukin 1, IL -1), która oddziałując na śródbłonek naczyń zwiększa jego aktywność prokoagulacyjną, między innymi przez zwiększenie syntezy inhibitora aktywatora plazminogenu (PAI-1), stymuluje produkcję czynnika aktywującego płytki (PAF) oraz w wyniku zwiększonej ekspresji adresyn ICAM-1 i ELAM-1 wzmacnia przyleganie do śródbłonka limfocytów i granulocytów obojętnochłonnych [37, 38, 44].

Pod wpływem TNF komórki śródbłonka produkują interleukinę 6 (Interleukin 6, IL-6) [48, 55], białko uznawane za jeden z głównych czynników regulujących mechanizmy obronne, biorące udział w krwiotworzeniu i stymulujące produkcję i wydzielanie białek ostrej fazy oraz interleukinę 8 (*Interleukin 8*, IL-8) – inhibitor adhezji leukocytów (*Leukocyte Adhesion Inhibitor*), która wykazuje właściwości chemotaktyczne głównie w stosunku do granulocytów obojętnochłonnych [26] hamując jednocześnie ich adhezję do komórek śródbłonka [17].

W wyniku oddziaływania TNF na śródbłonek dochodzi także do syntezy i wydzielania czynnika stymulującego tworzenie kolonii granulocytarno-makrofagalnych (*Granulocyte/Macrophage Colony Stimulating Factor*, GM-CSF) [55], który wykazuje słabe działanie chemotaktyczne na granulocyty obojętnochłonne i monocyty, jednocześnie hamując ich migrację a zwiększając ich przyleganie i reaktywność na bodźce fizjologiczne.

PODSUMOWANIE

Prowadzone nadal badania *in vitro* i *in vivo* potwierdzają podstawowe znaczenie interakcji między wyściółką naczyń krwionośnych, którą stanowi śródbłonek a krążącymi we krwi komórkami odporności naturalnej. Komórki śródbłonka pełniąc rolę przekaźnika informacji poddawane są działaniu wielu czynników, których łączne oddziaływanie ukierunkowuje nie tylko przebieg reakcji immunologicznych, ale także inne reakcje ustroju na różnicowane bodźce. Udogodnieniem w tych dociekaniach jest możliwość zastosowania coraz większej liczby cytokin syntetyzowanych z wykorzystaniem technik inżynierii genetycznej, co może dostarczać wielu odpowiedzi skalających zjawiska biologicznej aktywności struktur organizmu.

TNF ma dobrze udokumentowaną rolę jako czynnik oddziałujący na komórki śródbłonka, jednak ze względu na złożoność procesu działania cytokin *in vivo* najważniejszym w chwili obecnej wydaje się być potwierdzenie tych wiadomości w badaniach doświadczalnych, gdyż tzw. sieć cytokinowa nie jest w organizmie jedynym układem regulującym.

LITERATURA

- [1] AGER A, MISTRY S. Interaction between lymphocytes and cultured high endothelial cells: an *in vivo* model of lymphocyte migration across high endothelial venule endothelium. *Eur J Immunol* 1988; **18**: 1265–1274.
- [2] AGGARWAL BB, HENZEL WJ, MOFFAT B, KOHR WJ, HARKINS RN. Primary structure of human lymphotoxin derived from 1788 lymphoblastoid cell line. *J Biol Chem* 1988; **260**: 2334–2344.
- [3] AGGARWAL BB, KOHR WJ, HAPS PE, MOFFAT B, SPENCER SA, HENZEL WJ, BRINGMAN TS, NEDWIN GE, GOEDDEL DV, HARKINS RN. Human tumor necrosis factor. Production, purification and characterization. *J Biol Chem* 1985; **260**: 2345–2354.
- [4] ALBELDA SM, SMITH CW, WARD PA. Adhesion molecules and inflammatory injury. *FASEB J* 1994; **8**: 504–512.
- [5] von ANDRIAN UH, HANSELL P, CHAMBERS JD, BERGER EM, FILHO IT, BUTCHER EC, ARFOS KE. L-selectin function is required for beta-2 integrin-mediated neutrophil adhesion at physiologic shear rates *in vivo*. *Am J Physiol* 1992; **263**: H1034–H1044.
- [6] BRETT J, GERHACH H, NAWROTH P, STEINBERG S, GODMAN G, STERN D. Tumor necrosis factor/cachectin increases permeability of endothelial cell monolayers by mechanism involving regulatory G proteins. *J Exp Med* 1989; **169**: 1977–1991.
- [7] BUSSOLINO F, CAMUSSI G, BAGLIONI C. Synthesis and release of platelet-activating factor by human vascular endothelial cells treated with tumor necrosis factor or interleukin 1 α . *J Biol Chem* 1988; **263**: 11856–11861.
- [8] BUTCHER EC. Leukocyte-endothelial cell recognition. Three (or more) step to specificity and diversity. *Cell* 1991; **67**: 1033–1036.
- [9] CARLOS T, KOVACH N, SCHWARTZ B, ROSA M, NEWMAN B, WAYNER E, BENJAMIN C, OSBORN L, LOBB L, HARLAN J. Human monocytes bind to two cytokine-induced adhesive ligands on cultured human endothelial cells: endothelial-leukocyte adhesion molecule-1 and vascular cell adhesion molecule-1. *Blood* 1991; **10**: 2266–2271.
- [10] CARSWELL EA, OLD LJ, KASSEL RL, GREEN S, FIORE NC, WILLIAMSON B. An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1975; **72**: 3666–3670.
- [11] COHEN S. Physiologic and pathologic manifestations of lymphokine action. *Hum Pathol* 1986; **17**: 112–121.
- [12] COTRAN RS. Endothelial cells. [w] Kelly W, Sledge C, Harris E, Ruddy S, red. Textbook of Rheumatology. Philadelphia, PA: Saunders 1989: 389–405.
- [13] DEAN DC, BRIKENMEIER TM, WEINTRAUB SJ. Glycoprotein synthesis and secretion. Expression of fibronectin and its cell surface receptors. *Am Rev Respir Dis* 1991; **3**: 25–28.
- [14] DOSNE AM, DUBOR F, LUTCHER F, PARANT M, CHEDID L. Tumor necrosis factor (TNF) stimulates plasminogen activator inhibitor (PAI) production by endothelial cells and decreases blood fibrinolytic activity in the rat. *Thromb Res* 1988; **51**: 115–122.
- [15] ESMON CT, OWEN WG. Identification of an endothelial cofactor for thrombin-catalyzed activation of protein C. *Proc Natl Acad Sci USA* 1981; **78**: 2249–2252.
- [16] FAJARDO LF, KAWAN HH, KOWALSKI J, PRIONAS SD, ALLISON AD. Dual role of tumor necrosis factor- α in angiogenesis. *Am J Pathol* 1992; **140**: 539–544.
- [17] GIMBRONE MA, OBIN MS, BROCK AF, LUIS EA, HASS PE, HEBERT CA, YIP YK, LEUNG DW, LOWE DG, KOHR WJ, DARBRONNE WC, BECHTOL KB, BAKER JB. Endothelial interleukin-8: a novel inhibitor of leukocyte-endothelial interactions. *Science* 1989; **246**: 1601–1603.

- [18] GOLDSTEIN LA, ZOHU DFH, PICKER LJ, MINTY CN, BARGATZE RF, DING JF, BUTCHER EC. A human lymphocyte homing receptor, the Hermes antigen, is related to cartilage proteoglycan core and link proteins. *Cell* 1989; **56**: 1063–1072.
- [19] GOTLIEB JL, PEARSON JD. Response of endothelial cells to injury. [w] Nossal HL, Vogel HJ, red. *Pathology of the Endothelial Cell*. New York: Academic 1982: 433–454.
- [20] GROVES RW, ALLEN MH, BAKER JNWM, HASKARD DO, MacDONALD DM. Endothelial leukocyte adhesion molecule-1 (ELAM-1) expression in cutaneous inflammation. *Br J Dermatol* 1991; **124**: 117–123.
- [21] HAILMAN E, LICHENSTEIN HS, WURFEL MM, MILLER DS, JOHNSON DA, KELLEY M, BUSSE LA, ZUKOWSKI MM, WRIGHT SD. Lipopolysaccharide (LPS)-binding protein accelerates the binding of LPS to CD14. *J Exp Med* 1994; **179**: 269–277.
- [22] HARLAN JM, WINN RK, VEDDER NB, DOERSCHUK CM, RICE CL. *In vivo* models of leukocyte adherence to endothelium. [w] Harlan JM, Lui DY, red. *Adhesion: Its role in inflammatory disease*. New York: Freeman and Company 1992: 117–150.
- [23] HESSION C, OSBORN L, GOFF D, CHI-ROSSO G, VASSALLO C, PA-SEK M, PITTACK C, TIZAROL R, GOELZ S, CARTHY K, HOPPLE S, LOBB R. Endothelial leukocyte adhesion molecule-1: direct expression cloning and functional interaction. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; **8**: 1673–1677.
- [24] van HINSBERG VWM, KOOISTRA T, VANDERBERGH EA, PRINCER HMG, FIERS W, EMEIS JJ. Tumor necrosis factor increases the production of plasminogen activator inhibitor in human endothelial cells *in vitro* and in rats *in vivo*. *Blood* 1988; **72**: 1467–1473.
- [25] HOLZMANN B, McINTYRE BW, WEISSMAN IL. Identification of a murine Peyer's path-specific lymphocyte homing receptor as integrin molecule with an α chain homologous to human VLA-4 α . *Cell* 1989; **56**: 37–46.
- [26] HUBER AR, KUNKEL SL, TODD RFIII, WEISS SJ. Regulation of transendothelial neutrophil migration by endogenous interleukin-8. *Science* 1991; **253**: 1–4.
- [27] HUMPHRIES MJ. The molecular basis and specificity of integrin-ligand interaction. *J Cell Sci* 1990; **97**: 587–592.
- [28] ISE Y, YAMAGUCHI K, SATO K, KITAMURA F, TAMATARI T, MIYASAKA M. Molecular mechanisms underlying lymphocyte recirculation. I. Functional, phenotypical and morphological characterization of high endothelial cells cultured *in vitro*. *Eur J Immunol* 1988; **18**: 1235–1244.
- [29] KAUL A, BLAKE DR, PEARSON J. Vascular endothelium, cytokines and the pathogenesis of inflammatory synovitis. *Ann Reum Dis* 1991; **50**: 828–832.
- [30] KLAGSBRUN M, D'AMORE PA. Regulators of angiogenesis. *Annu Rev Physiol* 1991; **53**: 217–239.
- [31] KRIEGLER M, PEREZ C, DEFAY K, ALBERET I, LU SD. A novel form of TNF/cachectin is a cell surface cytotoxic transmembrane protein: ramifications for the complex physiology of TNF. *Cell* 1988; **53**: 45–53.
- [32] LASKEY LA, SINGER MS, YEDNOCK TA, DOWBENKO D, FENNIE C, RODRIGUES H, NGUYEN T, STACHEL S, ROSEN SD. Cloning of a lymphocyte homing receptor reveals a lectin domain. *Cell* 1989; **56**: 1045–1055.
- [33] LEWIS M, TARTAGALIA LA, LEE A, BENNET GL, RICE GC, WONG GH, CHEN EY, GOEDDEL DV. Cloning and expression of cDNA for two distinct murine tumor necrosis factor receptors demonstrate one receptor is species specific. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; **88**: 2830–2834.
- [34] LODGE PA, HAISCH CE, THOMES FT. A simple method of vascular endothelial cell isolation. *Trans Proc* 1992; **24**: 2816–2817.
- [35] LOETSCHER H, PAN YC, LAHM HW, GENTZ R, BROCKHAUS M, TABUCHI H, LESSLAUER W. Molecular cloning and expression of the human 55 kd tumor necrosis factor receptor. *Cell* 1990; **61**: 351–359.

- [36] MACKAY F, LOETSCHER H, STUEBER D, GEHR G, LESSLAUER W. Tumor necrosis factor α (TNF- α)-induced cell adhesion to human endothelial cells is under dominant control of one TNF receptor type, TNF-R55. *J Exp Med* 1993; **177**: 1277–1286.
- [37] MANTOVANI A, DEJANA E. Cytokines as communication signals between leukocytes and endothelial cells. *Immunology Today* 1989; **10**: 370–375.
- [38] MANTOVANI A, BUSSOLINO F, DEJANA E. Cytokine regulation of endothelial cell function. *FASEB J* 1992; **6**: 2591–2598.
- [39] MOHLER KM, TORRANCE DS, SMITH CA, GOODWIN RG, STREMLER KE, FUNG VP, MADANT H, WIDMER MB. Soluble tumor necrosis factor (TNF) receptors are effective therapeutic agents in lethal endotoxemia and function simultaneously as both TNF carries and TNF antagonist. *J Immunol* 1993; **151**: 1548–1561.
- [40] NATHAN C, SPORN M. Cytokines in context. *J Cell Biol* 1991; **113**: 981–986.
- [41] NAWROTH PP, STERN DM. Modulation of endothelial cell hemostatic properties by tumor necrosis factor. *J Exp Med* 1986; **163**: 740–745.
- [42] OSBORN L. Leukocyte adhesion to endothelium in inflammation. *Cell* 1990; **62**: 3–6.
- [43] PIGUET PF, GRAU GE, VASSALI P. Subcutaneous perfusion of tumor necrosis factor induces local proliferation of fibroblasts, capillaries, and epidermal cells, or massive tissue necrosis. *Am J Pathol* 1990; **136**: 103–110.
- [44] POBER JS, COTRAN RS. Cytokines and endothelial cell biology. *Physiol Rev* 1990; **70**: 427–451.
- [45] PORTEU F, NATHAN CF. Mobilizable intracellular pool of p55(type I) tumor necrosis factor receptors in human neutrophils. *J Leuk Biol* 1992; **52**: 122–124.
- [46] ROTHE J, GEHR G, LOETSCHER H, LESSLAUER W. Tumor necrosis factor receptors-structure and function. *Immunol Res* 1992; **11**: 81–90.
- [47] SCHLEUNING M, MUNKER R. Tumor necrosis factor: An update on basic research and clinical applications. *Klin Wochenschr* 1990; **68**: 841–846.
- [48] SHALABY MR, WAAGE A, ESPEVIK T. Cytokine regulation of interleukin 6 production by human endothelial cells. *Cell Immunol* 1988; **121**: 372–382.
- [49] SHIMIZU Y, NEWMAN W, GOPAL TV, GRABER N, BEAL LD, van SEVENTER GA, SHAW S. Four molecular pathways of T cell adhesion to endothelial cells: Roles of LFA-1, VCAM-1 and ELAM-1 and changes in pathway hierarchy under different activation. *J Cell Biol* 1991; **113**: 1203–1221.
- [50] SHIMIZU Y, SHAW S, GRABER N, GOPAL TY, HORGAN KJ, van SEVENTER GA, NEWMAN W. Activation-independent binding of human memory T cells to adhesion molecule ELAM-1. *Nature* 1991; **349**: 799–802.
- [51] SLOWIK MR, DeLUCA LG, FIRES W, POBER JS. Tumor necrosis factor activates human endothelial cells through the p55 tumor necrosis factor receptor but the p75 receptor contributes to activation at low tumor necrosis factor concentration. *Am J Pathol* 1993; **6**: 1724–1730.
- [52] STREETER PR, ROUSE BTN, BUTCHER EC. Immunohistologic and functional characterization of vascular addressin involved in lymphocyte homing into peripheral lymph nodes. *J Cell Biol* 1988; **107**: 1853–1862.
- [53] TARGALIA LA, GOEDDEL DV. Two TNF receptors. *Immunology Today* 1992; **13**: 151–153.
- [54] TERLIKOWSKI S, NOWAK HFr, ŁOTOCKI W. Inhibitory effect of the human recombinant tumor necrosis factor on the growth of the Morris hepatoma in rats. *Exp Toxic Pathol* 1995; **47**: 81–87.
- [55] TCHÓRZEWSKI H, ZEMAN K, PALEOLOG E, BRENNAN F, FELD-MANN M, KAHAN M, GUGA P, KWINKOWSKI M, SZYMAŃSKA B, JAROSZ J, PARNIEWSKI P, KOCUR E. The effects of tumor necrosis factor (TNF) derivatives on TNF receptors. *Cytokine* 1993; **2**: 125–132.

- [56] TRACEY KJ. TNF and other cytokines in the metabolism of septic shock and cachexia. *Clin Nutrition* 1992; **11**: 1–11.
- [57] VASSALI P. The pathophysiology of tumor necrosis factors. *Annu Rev Immunol* 1992; **10**: 411–452.
- [58] WARE JA, DONALD MD, HEISTAD MD. Platelet-endothelium interactions. *N Engl J Med* 1993; **328**: 628–635.
- [59] WIEGMANN K, SCHUTZE S, KAMPEN E, HIMMLER A, MACHLEIDT T, KRONKE M. Human 55-kDa receptor for tumor necrosis factor coupled to signal transduction cascades. *J Biol Chem* 1992; **267**: 17997–18001.
- [60] ZEMAN K. Współczesne poglądy na rolę granulocytów obojętnochłonnych (neutrofilów) w procesach zapalnych. I. Patofizjologiczne podstawy udziału neutrofilów w zapaleniu. *Immunol Pol* 1993; **18**: 3–21.
- [61] ZIMMERMANN GA, PRESCOTT SM, McINTYRE TM. Endothelial cell interactions with granulocytes: tethering and signaling molecules. *Immunology Today* 1992; **13**: 93–100.

Otrzymano: 03.04.1995 r.

Przyjęto: 25.04.1995 r.

Adres autorów: Klinika Ginekologii i Położnictwa Septycznego Instytutu Położnictwa i Chorób Kobięcych Akademii Medycznej w Białymstoku, 15-062 Białystok, ul. Warszawska 15

INFORMACJE DLA AUTORÓW

POSTĘPY BIOLOGII KOMÓRKI drukują artykuły przeglądowe z zakresu najnowszych osiągnięć biologii komórki, nie publikowane dotąd w innych wydawnictwach. Autorzy odpowiadają za ścisłość podawanych informacji. Obowiązuje terminologia zgodna z polskim mianownictwem biochemicznym, histologicznym, anatomicznym i embriologicznym. Artykuły drukowane w POSTĘPACH BIOLOGII KOMÓRKI nie mogą być bez zgody redakcji publikowane w innych periodykach.

POSTĘPY BIOLOGII KOMÓRKI zamieszczają:

1. Artykuły przeglądowe nie przekraczające 20 stron maszynopisu i do 100 pozycji bibliograficznych w zasadzie z ostatnich 5 lat (do 10% pozycji bibliograficznych starszych).

2. Doniesienia z ostatniej chwili na 3–5 stronach maszynopisu z kilkoma pozycjami bibliograficznymi ostatniego roku (licząc od daty wysłania do redakcji).

3. Listy do redakcji (do 1 strony maszynopisu).

Tekst pracy i załączniki należy przysyłać w dwóch egzemplarzach na adres redakcji w Warszawie bądź jednego z Redaktorów (adresy na 2 str. okładki). Maszynopis powinien być pisany jednostronnie na papierze formatu A4 z podwójną interlinią i marginesem 4 cm po lewej stronie. Strony powinny być kolejno numerowane. W tekście nie należy robić podkreśleń. Nadesłanie tekstu pracy, poprawionego po recenzjach, na dyskietce przyspieszy publikację.

Pierwsza strona nie numerowana przeznaczona jest dla redakcji i powinna zawierać: imiona i nazwiska autorów oraz ich tytuły naukowe, adresy pracy i domowe wraz z telefonem, tytuł pracy w języku polskim i angielskim oraz liczbę stron maszynopisu, liczbę tabel i rysunków. Na pierwszej (numerowanej) stronie należy podać kolejno tytuł pracy w języku polskim i angielskim, imiona (w pełnym brzmieniu) i nazwiska autorów, nazwę zakładu naukowego, nazwisko i adres autora prowadzącego korespondencję, informację o dofinansowaniu pracy oraz skrót tytułu (do 40 znaków). Następna strona powinna zawierać w języku polskim i angielskim streszczenie (do 150 słów) oraz słowa kluczowe – 3 do 10 słów zgodnych z terminami w Medical Subject Headings (Index Medicus), o ile są tam zawarte. W tytule i streszczeniu można stosować jedynie powszechnie przyjęte skróty, np. DNA. Tekst artykułu należy rozpocząć od nowej strony. W tekście nie zamieszczać tabel, schematów lub rysunków, a jedynie zaznaczyć ówkiem na marginesie ich lokalizację (np. tab. 1, rys. 1 itp.). Dla przejrzystości tekst można podzielić na tytułowane i numerowane rozdziały oraz podrozdziały. Od nowej strony należy podać spis literatury. Skróty nazw czasopism podawać należy według Index Medicus (listy czasopism publikowane są corocznie w numerze styczniowym). Powołanie w tekście następuje przez podanie kolejnego numeru pozycji w spisie literatury w nawiasie kwadratowym (np. [5]). Spis literatury należy zestawiać alfabetycznie według następującego wzoru:

[1] HNILICA LS, McLURE ME, SPELTZBERG TC. Histone biosynthesis and the cell cycle. [w] Philips MP, Schwartz E [red.]Histone and Nucleohistones. London, New York: Philips, Plenum Press 1977: 60–64.

[2] SACHSENMAJER W, REMY V, PLATTNER R. Initiation of synchronous mitosis in *Physarium polycephalum*. *Exptl Cell Res* 1980; 2: 41–48.

Tabele, opisy schematów i rysunków powinny być załączone na oddzielnych stronach. Schematy i rysunki muszą być wykonane w postaci nadającej się do reprodukcji. Fotografie powinny być kontrastowe i wykonane na błyszczącym papierze. Wymiary poszczególnych rysunków, schematów i fotografii nie mogą przekraczać 125 x 180 mm lub ich połowy. Jeżeli załączniki są zapożyczone z innych źródeł, należy podać, skąd zostały zaczerpnięte i dołączyć zgodę autora i wydawnictwa na reprodukcję, jeżeli materiały te zamieszcza się w niezmienionej formie. Wszystkie załączniki muszą być opatrzone na odwrocie nazwiskiem pierwszego autora i oznaczeniem góry i dołu ilustracji. Stosowane jednostki miar muszą być zgodne z układem SI.

Redakcja zastrzega sobie prawo dokonywania skrótów uzgodnionych z autorem. Autor zobowiązany jest do wykonania korekty autorskiej i zwrócenia jej w ciągu 3 dni. Koszty, spowodowane większymi zmianami tekstu wprowadzanymi w korekcie poza poprawkami błędów drukarskich, ponosi autor. Autorzy otrzymują bezpłatnie 1 egz. zeszytu PBK z opublikowaną pracą, a ponadto mogą zamówić odbitki odpłatnie.

Redakcja prosi o propozycję do 5 osób (nazwisko, imię, adres, fax), które byłyby odpowiednimi recenzentami maszynopisu, nie powinny jednak być aktualnymi współpracownikami ani pracownikami instytucji, w której pracuje autor. Redakcja prosi także głównego Autora o dołączenie do maszynopisu podpisanej odpowiedzi na następujące pytania:

Dołączono 2 kopie maszynopisu,

tabel i rycin.

Wszyscy Autorzy znają i akceptują pracę.

Jest zgoda osób, których informacje niepubli-

cowane są zamieszczone w tekście artykułu

Wyrażam zgodę na to, że artykuł po przyjęciu do druku w "Postępach Biologii Komórki" przechodzi na własność redakcji i jego reprodukcja wymaga zgody redakcji.

tak

nie

tak

nie

tak

nie

tak

nie

Treść pracy nie była uprzednio publikowana i nie została

wysłana do innej redakcji.

tak

nie

Dołączono kopię pracy na dyskietce z podaniem nazwy

pliku i użytego programu edycyjnego z komputera IBM

tak

nie

Odpowiadam za całość pracy opisaną w zał. maszyn.

tak

nie

podpis

TREŚĆ

W tym zeszycie • Postępów Biologii Komórki •	101
ADLER G.: Białka wiążące GTP jako uniwersalny przekaźnik sygnałów	103
BARCZYK A.: Cytogenetyka męskiej gametogenezy. Część 1. Translokacje wzajemne	113
RATAJCZAK M. Z., HAŁASA M., KUCZYŃSKI W.I.: Udział ligandu receptora STK-1 (FLK2/FLT3) w regulacji ludzkiej i mysiej hematopoezy	131
ZAPOROWSKA H.: Rola wanadu w metabolizmie komórki zwierzęcej	149
JANECZKO K.: Udział astrocytów w powstawaniu blizny pourazowej w ośrodkowym układzie nerwowym. I. Ekspresja białek cytoszkieletowych jako przejaw reakcji na uszkodzenie	167
ZIAJA M.: Mikroglej: makrofagi ośrodkowego układu nerwowego	179
TERLIKOWSKI S., NOWAK H.F., ŁOTOCKI W.: Wpływ czynnika martwicy nowotworu na komórki śródbłonna naczyń	195

Warunki prenumeraty kwartalnika
POSTĘPY BIOLOGII KOMÓRKI

Prenumerata na rok 1995

Redakcja przyjmuje opłatę prenumeraty za rok 1995 na konto:

FUNDACJA BIOLOGII KOMÓRKI I BIOLOGII MOLEKULARNEJ, ul. Marymoncka 99, 01-813 Warszawa; Bank Polska Kasa Opieki S. A., IV O/Warszawa 501132-40006576-2701-3-1110.

Cena prenumeraty rocznika (4 zeszyty + ew. 2 suplementy) na rok 1995:
dla instytucji (bibliotek) wynosi 400 000 zł,
a dla odbiorców indywidualnych 160 000 zł.

Subscription orders for POSTĘPY BIOLOGII KOMÓRKI is through the local press distributors or directly – Editorial Board of POSTĘPY BIOLOGII KOMÓRKI, Marymoncka str. 99, 01-813 Warszawa /Poland, account No:

FUNDACJA BIOLOGII KOMÓRKI I BIOLOGII MOLEKULARNEJ, ul. Marymoncka 99, 01-813 Warszawa; Bank Polska Kasa Opieki S. A., IV O/Warszawa 501132-40006576-2701-3-1110.

Price per year 40 dollars USA.

Indeks 369705