

RECEPTORY POWIERZCHNIOWE LIMFOCYTÓW I. BADANIA POWIERZCHNIOWYCH IMMUNOGLOBULIN

Jerzy NOWAK

Zakład Genetyki Człowieka Polskiej Akademii Nauk w Poznaniu

Streszczenie. Przedstawiono krytyczny przegląd metod wykrywania powierzchniowych immunoglobulin na limfocytach. Omówiono trudności i zastrzeżenia metodyczne tych badań przy użyciu różnych technik. Podczas omawiania techniki immunofluorescencji powierzchniowej, najczęściej stosowanej do wykrywania powierzchniowych immunoglobulin, zwrócono szczególną uwagę na rolę receptora dla Fc IgG, który wiążąc immunoglobuliny (klasę IgG) powoduje częste błędne wyniki oznaczeń. W konkluzji stwierdzono, że tylko te limfocyty, które posiadają zdolność resyntezy powierzchniowych immunoglobulin w warunkach *in vitro*, można — przy stosowaniu techniki immunofluorescencji — uznać za limfocyty B.

Technikami bardziej czułymi niż immunofluorescencja można wykazać również obecność immunoglobulin na powierzchni limfocytów T, gdzie występują one w znacznie mniejszej liczbie cząsteczek niż na limfocytach B. Immunoglobuliny limfocytów T składają się z łańcuchów lekkich λ lub κ oraz łańcuchów ciężkich podobnych, lecz nie identycznych z łańcuchami ciężkimi μ .

Omówiono znaczenie powierzchniowych immunoglobulin limfocytów w tworzeniu receptorów dla antygenów i ich prawdopodobną rolę w interakcji (współdziałaniu) limfocytów B i T.

Dużym osiągnięciem współczesnej immunologii było niewątpliwie odkrycie zróżnicowania populacji limfocytów na dwie zasadnicze populacje B i T. Limfocyty B i T charakteryzuje odmienne pochodzenie, właściwości i funkcje [23].

Następnym osiągnięciem było wykazanie na powierzchni limfocytów B powierzchniowych immunoglobulin, spełniających prawdopodobnie rolę swoistych receptorów dla antygenów [11, 45, 48].

Zapoczątkowanie wszystkich typów odpowiedzi immunologicznej zależy w dużym stopniu od bezpośredniej interakcji antygeny z powierzchnią komórki immunologicznie kompetentnej. Następowe różnicowanie się komórek immunokompetentnych do komórek efektorowych w róż-

nych typach odporności obejmuje szereg reakcji, interakcji lub współdziałania pomiędzy różnymi typami komórek [32, 50].

Jednym z głównych problemów współczesnej immunologii jest wyjaśnienie i zbadanie poszczególnych etapów różnicowania się komórki po bodźcu antygenowym. Z drugiej strony, proces aktywacji i różnicowania się komórek immunologicznie kompetentnych może służyć jako doskonały model badań do wyjaśnienia ogólnobiologicznego procesu aktywacji i różnicowania się komórek w poszczególnych tkankach ustroju.

Pierwszym etapem na drodze aktywacji i różnicowania się komórek immunokompetentnych jest zwiążanie czynnika indukującego (w okresie życia płodowego) lub antygeny (również w okresie płodowym lub późniejszym) z powierzchniowym receptorem. Istotne znaczenie w tym procesie mają niewątpliwie powierzchniowe immunoglobuliny.

Celem niniejszej pracy jest przedstawienie aktualnych poglądów na występowanie powierzchniowych immunoglobulin, ich pochodzenie i rolę w procesach immunologicznych.

Zakładając, że receptory dla antygenów na powierzchni limfocytów są cząsteczkami immunoglobulin, oznaczenie ich na drodze wykazania powierzchniowych immunoglobulin (SIg — surface immunoglobulins) przy użyciu swoistych surowic przeciwko Ig wydaje się rzeczą łatwą i oczywistą. Jednak interpretacja uzyskanych wyników bynajmniej nie jest prosta, a nawet komplikuje się w miarę postępów badań w tej dziedzinie. Nasuwające się zasadnicze problemy można ująć w formie kilku pytań:

1. Czy wszystkie limfocyty posiadają powierzchniowe immunoglobuliny?
2. Czy powierzchniowe immunoglobuliny pochodzą (są produkowane) z komórek, na których są wykrywane?
3. Jak duży jest udział powierzchniowych receptorów dla immunoglobulin (ściśle fragmentu Fc IgG) w przypadkach, w których powierzchniowe immunoglobuliny nie są produkowane przez komórki, na których są wykrywane?

Próba częściowej odpowiedzi na te pytania jest podany krytyczny przegląd technik stosowanych do wykrywania powierzchniowych immunoglobulin.

METODY STOSOWANE DO WYKRYWANIA POWIERZCHNIOWYCH IMMUNOGLOBULIN (SIg)

Podstawowym elementem większości metod stosowanych do wykrywania SIg są swoiste surowice przeciw Ig. Jest zrozumiałe, że wykrycie

SIg będzie w dużym stopniu zależało od swoistości używanych surowic. Z kolei wiadomo, że surowice wielu gatunków zwierząt zawierają naturalne przeciwciała reagujące krzyżowo z komponentami powierzchni limfocyta innych gatunków. Stąd jednym z podstawowych warunków jest wykazanie, że wiązanie surowicy anty-Ig do powierzchni komórki jest spowodowane wyłącznie przeciwciałami przeciwko Ig. Niezbędne dla celów kontrolnych jest równoległe użycie, uzyskanych na swoistych immunoabsorbentach, czystych przeciwciał. Jednakże i w tym układzie istnieje możliwość błędu, ponieważ wytworzone rozpuszczalne kompleksy Ig - anty Ig mogą być wiązane do limfocyta poprzez receptor dla fragmentu Fc IgG (receptor Fc) [16].

Drugim czynnikiem, który może być powodem błędu, jest wiązanie zagregowanej Ig do powierzchni limfocyta przez receptor Fc [15]. Dla uniknięcia tego błędu — zwłaszcza w metodzie immunofluorescencji powierzchniowej i w technice wiązania znakowanych radioaktywnym izotopem przeciwciał — zastąpienie pełnych (całych) cząsteczek Ig fragmentami $F(ab')_2$ swoistych przeciwciał, eliminuje możliwość wiązania agregatów Ig (ściślej IgG) przez receptor Fc.

Podczas oznaczania klas względnie specyficznych allotypów SIg, konieczne jest sprawdzenie swoistości surowicy anty - Ig metodami o równej, względnie wyższej czułości, niż sam test oznaczania SIg (np. podwójna dyfuzja w żelu agarowym, immunoelektroosmoprecypitacja, wiązanie białek monoklonalnych itd.).

Cząsteczki Ig posiadają więcej niż jedną determinantę antygenową, tak więc, aby z całą pewnością stwierdzić brak SIg należałoby używać różnych surowic przeciwko Ig. Jest to szczególnie ważne przyjmując możliwość częściowej ekspozycji (częściowego ujawnienia się) cząsteczek powierzchniowych immunoglobulin.

I. METODY BEZPOŚREDNIEGO WYKRYWANIA POWIERZCHNIOWYCH Ig

1. Powierzchniowa immunofluorescencja. Technika powierzchniowej immunofluorescencji (IF) jest obecnie najczęściej stosowana do wykrywania powierzchniowych immunoglobulin. Przy użyciu znakowanych izotiocyanianem fluoresceiny lub rodaminą surowic przeciwko Ig możliwa jest ilościowa ocena limfocytów z SIg.

W razie zastosowania znakowanych monowalentnych surowic przeciwko poszczególnym klasom i podklasom Ig lub pojedynczym łańcuchom lekkim λ lub κ , możemy oznaczać odsetkowe zawartości limfocytów (lub innych komórek) wykazujących na swej powierzchni poszczególne determinanty immunoglobulinowe.

Równoczesne zastosowanie surowic znakowanych rodaminą i fluoresceiną umożliwia badanie występowania dwóch lub więcej klas Ig, jak również podklas oraz łańcuchów lekkich lub ciężkich na powierzchni limfocytów.

Wyniki badań zawartości odsetkowej limfocytów z SIg w krwi obwodowej człowieka, przy użyciu techniki IF, uzyskane przez różnych autorów (tabela 1), wahają się w szerokich granicach (11–32%). Pierwszym z czynników mogących zniekształcić wynik badania jest procedura izolacji limfocytów, która może zwiększyć zawartość limfocytów z SIg, dających się łatwiej oddzielać od erytrocytów [6, 7]. Z drugiej strony, limfocyty z SIg (limfocyty B) mają większą przyczepność do powierzchni, zwłaszcza plastikowych [17], a ponadto oczyszczanie limfocytów z monocytów drogą adsorpcji powierzchniowej może wiązać się z utratą pewnej ilości limfocytów B. Aby uniknąć błędów wynikających z metod izolacji, Brown i Greaves [6, 7] oznaczali immunofluorescencyjnie SIg, biorąc do badania zawiesinę wszystkich komórek jądrzastych krwi po rozbiciu erytrocytów roztworem chlorku amonu.

Jednak i tak uzyskane wyniki obarczone były błędami wynikającymi z tego, że płukanie komórek przed oznaczaniem SIg przeprowadza się zwykle w temperaturze pokojowej. W tych warunkach nie tylko limfocyty z wbudowanymi w błonę komórkową immunoglobulinami (stable surface immunoglobulins) wykazują fluorescencję, lecz również limfocyty, wiążące na swej powierzchni IgG poprzez receptor na fragment Fc tej klasy immunoglobulin [34, 38].

Aby uniknąć znakowania limfocytów z zaadsorbowanymi immunoglobulinami klasy IgG, zaproponowano płukanie tych komórek przed ich znakowaniem w temperaturze 37°C. W tych warunkach daje się wypłukać również zaadsorbowane IgG. W rzeczywistości mniej niż 1% limfocytów krwi obwodowej człowieka ma na powierzchni stabilne immunoglobuliny klasy IgG i dlatego przy oznaczaniu tradycyjną metodą liczby limfocytów noszących na powierzchni poszczególne klasy Ig, od tej wartości należy odjąć limfocyty z IgG, co sprowadza wyniki poszczególnych autorów do podobnego poziomu, tj. 9–14% limfocytów wykazujących immunoglobuliny na powierzchni.

Mimo to pozostają jeszcze potencjalne możliwości błędu wynikające stąd, że znakowane przeciwciała same zawierają immunoglobuliny klasy IgG, a znakowanie przeprowadzać można tylko w niskich temperaturach (m.in. w celu zapobiegania zjawisku „capping”), co sprzyja wiązaniu znakowanych przeciwciał klasy IgG przez komórki z receptorem Fc IgG. Mimo sugestii Thrashera i wsp. [54], że już lekkie znakowanie przeciwciał fluoresceiną uniemożliwia ich wiązanie przez receptor dla Fc IgG, Winchester i wsp. [66] stwierdzili istotnie wyższe wyniki

TABELA 1. Zestawienie wyników oznaczeń limfocytów z powierzchniowymi immunoglobulinami (SIg) w krwi obwodowej człowieka

% limfocytów z SIg (średnia)	Metoda	Autor
5	Mieszana reakcja antyglobulinowa	Coombs i wsp. 1969 [11]
5	Mieszana reakcja antyglobulinowa	Heller i wsp. 1971 [28]
8	Mieszana reakcja antyglobulinowa	Litwin 1972 [36]
11	Immunofluorescencja (surowica anty-F(ab') ₂)	Fröland i Natvig 1972 [19]
14	Immunofluorescencja (surowica poliwalentna)	Aisenberg i Bloch 1972 [3]
15	Immunofluorescencja (surowica poliwalentna)	Pernis i wsp. 1971 [45]
16	Immunofluorescencja (surowica przeciwko łańcuchom lekkim λ i κ)	Preud'homme i Seligmann 1972 [47]
16	Immunofluorescencja (surowica anty-Fab)	Van Boxel i wsp. 1972 [55]
17	Immunofluorescencja (surowica przeciwko łańcuchom lekkim λ i κ)	Piessens i wsp. 1973 [46]
22	Immunofluorescencja (surowica poliwalentna)	Siegal i wsp. 1971 [53]
23	Immunofluorescencja (surowica przeciwko łańcuchom ciężkim)	Williams i wsp. 1973 [64]
24	Immunofluorescencja (surowica poliwalentna)	Ross i wsp. 1973 [51]
28	Immunofluorescencja (surowica przeciwko łańcuchom lekkim λ i κ)	Grey i wsp. 1971 [25]
29	Immunofluorescencja (surowica poliwalentna)	Papamichael i wsp. 1971 [44]
30	Immunofluorescencja (surowica przeciwko łańcuchom ciężkim)	Gajl-Peczalska i wsp. 1973 [20]
30	Test cytotoksyczny	Wernet i wsp. 1972 [61]
32	Immunofluorescencja (surowica przeciw łańcuchom ciężkim)	Cooper i wsp. 1971 [13]
34	Znakowanie ¹²⁵ I (autoradiografia)	Wilson i Nossal 1971 [65]

oznaczeń limfocytów B podczas znakowania pełnymi przeciwciałami niż przy użyciu ich znakowanych fragmentów F(ab')₂. Te ostatnie nie posiadając fragmentu Fc i nie mogą być wiązane przez receptor komórkowy dla Fc. Wiązanie IgG przez receptor Fc nie zachodzi, jeżeli IgG znajduje się w formie niezagregowanej, jednakże w warunkach in vitro istnieje duże prawdopodobieństwo tworzenia się agregatów złożonych co naj-

mniej z kilku cząsteczek IgG. Właśnie te małe agregaty są odpowiedzialne za wiązanie IgG przez receptor dla Fc IgG.

Powierzchniowa immunofluorescencja, mimo szerokiego stosowania do badania SIg, nie jest najbardziej czułą metodą. Warto podkreślić, że ujemna reakcja barwienia przy użyciu surowicy znakowanej fluoresceiną przeciwko Ig nie może być jednoznacznie interpretowana jako brak SIg. Ujemną reakcję barwienia należy raczej tłumaczyć jako wynik względnie małej ilości Ig na powierzchni komórki. Bardziej czułymi metodami (np. znakowaniem przeciwciał anty-Ig radioaktywnymi izotopami) można wykrywać determinanty immunoglobulinowe na powierzchni limfocytów, które nie wykazują SIg przy użyciu immunofluorescencji. Metoda immunofluorescencji powierzchniowej jest dostatecznie czuła do wykrywania względnie dużej ilości immunoglobulin na powierzchni limfocytów B.

2. Wiązanie przeciwciał anty-Ig znakowanych radioaktywnymi izotopami. W metodzie tej do znakowania oczyszczonej frakcji IgG przeciwciał, uzyskanych od zwierząt uodpornianych ludzkimi Ig, używa się radioaktywnego ^{125}I . Stopień wiązania przeciwciał przez komórki z SIg może być oznaczony autoradiograficznie względnie drogą zliczania impulsów przy użyciu licznika [1, 57, 61].

Raff i wsp. [49] porównali stopień wiązania przez limfocyty przeciwciał ^{125}I i fluoresceiną. W obydwu przypadkach wzrastające stężenie przeciwciał dawało wzrastający odsetek znakowanych komórek (^{125}I lub fluoresceiną) aż do osiągnięcia plateau. Zaobserwowano istotne różnice w czułości obydwu metod. Do osiągnięcia plateau komórek wiążących przeciwciała znakowane fluoresceiną konieczne było stężenie rzędu 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$, natomiast do osiągnięcia plateau komórek znakowanych jodem radioaktywnym — tylko 0.05 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

Mimo tak dużej czułości również i ta metoda nie jest wolna od licznych zastrzeżeń. Jednym z najważniejszych jest intensywne wiązanie znakowanych przeciwciał do uszkodzonych błon komórkowych. W metodzie IF bardzo łatwo można odróżnić komórki z uszkodzoną błoną komórkową (komórki martwe) barwiące się równomiernie, bardzo intensywnie na całej swej powierzchni. Podczas znakowania radioaktywnym jodem jest to oczywiście niemożliwe zarówno przy ocenie autoradiograficznej, jak i licznikowej.

Podobnie jak w metodzie immunofluorescencji pośredniej, można zastosować również wiązanie przeciwciał nieznakowanych, a następnie przeciwciał znakowanych, skierowanych przeciwko przeciwciałom nieznakowanym. Jest to jeszcze czulsza metoda od bezpośredniego wiązania znakowanych ^{125}I przeciwciał.

Możliwe jest także równoczesne zastosowanie przeciwciał znakowa-

nych ^{125}I i przeciwciał znakowanych fluoresceiną, celem określenia różnych determinant immunoglobulinowych na powierzchni komórki [14].

3. Wiązanie przeciwciał znakowanych ferrytyną. Zasada testu jest podobna jak podczas wiązania przeciwciał znakowanych radioaktywnym jodem. W metodzie pośredniej, pierwsza warstwa przeciwciał jest nieznakowana, druga zawiera swoiste przeciwciała znakowane ferrytyną.

Zastrzeżenia wysuwane do tej metody są podobne jak dla metody wiązania przeciwciał znakowanych radioaktywnym jodem. Uważa się, że metoda ta jest stosunkowo mało czuła ze względu na to, że konjugaty ferrytynowe są zbyt duże, aby po związaniu z błoną stanowiły jej wierne odbicie w obrazie mikroskopu elektronowego [60].

4. Wiązanie przeciwciał znakowanych enzymami. Najczęściej przeciwciała anty - Ig są znakowane peroksydazą. Po związaniu znakowanego przeciwciała z powierzchnią limfocyta stosuje się na peroksydazę standardowe cytochemiczne techniki. Preparaty można oceniać w mikroskopie świetlnym lub elektronowym.

II. METODY POŚREDNIE

1. Mieszana reakcja antyglobulinowa. W tej metodzie SIg są wykrywane w sposób pośredni. Najpierw przemyte limfocyty poddaje się działaniu przeciwciał anty - Ig określonego gatunku zwierzęcia. Następnie po ponownym płukaniu (2-3 razy) limfocyty inkubuje się z erytrocytami barana opłaszczonymi subaglutynacyjnym stężeniem antyerytrocytarnych przeciwciał zawierających determinanty reagujące z przeciwciałami anty - Ig, użytymi w reakcji z limfocytami.

Oryginalna metoda opisana przez Coombsa i wsp. [11, 12] została zmodyfikowana przez Litwina i wsp. [37], którzy zastosowali drugą warstwę przeciwciał opłaszczających limfocyty. W wersji zmodyfikowanej metoda jest bardziej czuła i wykrywa nieco większe ilości limfocytów z SIg.

Jednakże w porównaniu z innymi technikami, oznaczenie SIg metodą mieszanej reakcji i antyglobulinowej daje stosunkowo najniższe wyniki wartości odsetkowej limfocytów z SIg (tabela 1). Wydaje się, że jest to metoda stosunkowo mało czuła i obarczona licznymi zastrzeżeniami metodycznymi w sensie używania odpowiednio dobranych surowic różnych gatunków zwierząt.

2. Test cytoksyczny. Dla oceny SIg stosuje się w tej metodzie surowice przeciwko Ig wraz z komplementem. Następnie oblicza się odsetek martwych komórek [61]. Metoda jest mało czuła — zabiciu ulegają jedynie komórki z względnie dużą ilością SIg. Stosowane przeciw-

ciała muszą zawierać immunoglobuliny łączące komplement (głównie IgM, w mniejszym stopniu IgG). Ponadto jako konieczne układy kontrolne wymagane są oznaczenia z komplementem uzyskanym od różnych zwierząt. Z kolei jednak surowice używane jako źródło komplementu mogą też zawierać naturalne przeciwciała przeciwko komponentom powierzchniowym limfocyta, z którymi mogą reagować (np. surowica królika lub świnki morskiej w stosunku do myszy [43]), co może stanowić nowe źródło błędów.

3. Test transformacji blastycznej limfocytów. Dodanie przeciwciał anty-Ig powoduje stymulację limfocytów do transformacji blastycznej. Wymagane jest wielowartościowe wiązanie przeciwciał anty-Ig z determinantami immunoglobulinowymi limfocyta. Fragmenty Fab lub Fab' przeciwciał nie posiadają zdolności do wywoływania transformacji blastycznej limfocytów [18, 21]. W tej metodzie możemy jedynie pośrednio wnioskować o obecności SIg limfocytów.

4. Elektroforeza komórkowa i kolumny anty-Ig. Metody te są stosowane prawie wyłącznie do uzyskiwania populacji limfocytów z SIg (elektroforeza) [67] lub limfocytów nie wykazujących SIg (elektroforeza i kolumny anty-Ig) [62, 63, 67].

III. TECHNIKI WYKRYWANIA SIg Z MOŻLIWOŚCIĄ ILOŚCIOWEJ OCENY I CHARAKTERYSTYKI SIg

1. Znakowanie SIg radioaktywnymi izotopami. Metoda ta służy zarówno do wykrywania SIg, jak i do fizykochemicznego i immunologicznego badania SIg wyznakowanych radioaktywnym jodem [9, 40].

Metoda ta opiera się na zdolności laktoperoksydazy do katalizowania reakcji kowalencyjnego wiązania radioaktywnego jodu z tyrozyną na powierzchni żywych limfocytów. Ocena preparatów można przeprowadzać w mikroskopie świetlnym i elektronowym.

Chcąc przeprowadzić charakterystykę fizykochemiczną lub immunologiczną znakowanych SIg stosuje się czynniki powodujące wydzielenie SIg do środowiska (np. kilkugodzinną hodowlę limfocytów, w czasie której dochodzi do złuszczenia się SIg (shedding) [8]. Poza tym stosuje się kwas acetomocznikowy, powodujący również odrywanie się SIg [39] lub lizę komórek niejonowymi detergentami [4, 10].

Właśnie przy użyciu tej metody uzyskano najbardziej kontrowersyjne wyniki dotyczące występowania immunoglobulin na powierzchni limfocytów T [9, 40, 41].

2. Test zahamowania hemaglutynacji. Klein i wsp. [33] po raz pierwszy zastosowali test zahamowania hemaglutynacji do ilościowego oznaczenia IgM na powierzchni ustalonych linii komórkowych. Jest to

metoda niezwykle czuła, jednakże nie może być użyta do badania heterogenności populacji komórek z SIg (w badaniu Kleina i wsp. nie miało to istotnego znaczenia ze względu na jednorodność badanych komórek). Wydaje się jednak, że właśnie test zahamowania hemaglutynacji może być niezwykle przydatny w badaniach *in vitro* udziału limfocytów z SIg w różnych reakcjach immunologicznych.

3. Radioimmunoassay. W odniesieniu do badania SIg metoda ta jest podobna do testu zahamowania hemaglutynacji z tą różnicą, że zamiast aglutynacji erytrocytów oznacza się precypitaty (kompleksy) radioaktywnie znakowanej Ig ze specyficznymi przeciwciałami anty-Ig.

Najważniejszym problemem tej metody jest trudność udowodnienia, że wykrywane Ig są rzeczywiście SIg, a nie immunoglobulinami wewnątrzkomórkowymi. Dalsze zastrzeżenia do tej niezwykle czułej techniki są takie same jak w przypadku testu zahamowania hemaglutynacji.

Na podstawie przedstawionego krytycznego przeglądu metod badania powierzchniowych Ig limfocytów można odpowiedzieć na pytania postawione na początku pracy.

1. Podczas stosowania większości technik badania powierzchniowych Ig tylko część limfocytów wykazuje na swej powierzchni immunoglobuliny. Są to grasiczo-niezależne (szpiko - pochodne, burso - ekwiwalentno - pochodne) limfocyty B.

Jedynie podczas zastosowania techniki znakowania SIg radioaktywnymi izotopami stwierdza się występowanie immunoglobulin na wszystkich limfocytach. Według danych uzyskanych przez Marchalonisa [42], limfocyty B mają na swej powierzchni około 200 razy więcej cząsteczek immunoglobulin niż limfocyty T (grasiczo - zależne) — średnio limfocyty B wykazują 10^5 cząsteczek Ig/komórkę, limfocyty T — 10^2 – 10^3 cząsteczek.

2. Pełną odpowiedź na pytanie, czy SIg są produkowane przez limfocyty, na których są one wykrywane można uzyskać poprzez wykazanie w warunkach *in vitro* resyntezy SIg przez limfocyty. W tym celu usuwamy SIg przez:

działanie przeciwciał anty-Ig w temperaturze 37°C — dochodzi wtenczas do zjawiska tworzenia czap (capping) i następnej endocytozy względnie złuszczenia utworzonych kompleksów (shedding);

trawienie enzymami proteolitycznymi, np. pronazą.

Tylko te limfocyty z powierzchniowymi Ig, które posiadają zdolność resyntezy utraconych immunoglobulin (*in vitro*, powierzchniowe immunoglobuliny resyntetyzują się po kilkunastu godzinach hodowli) można uważać za limfocyty B.

3. Po odkrywczym stwierdzeniu Lobo i wsp. [38], że prawie wszystkie limfocyty z powierzchniowymi IgG wiążą, a nie syntetyzują tę klasę Ig poprzez receptor Fc, znacznie „zmaląła” rzeczywista ilość limfocytów z SIg wykrywanych we krwi obwodowej i narządach limfatycznych.

Na podstawie danych Lobo i wsp. [38] oraz Horowitza i Lobo [30] wszystkie dotychczasowe wyniki oznaczania SIg wymagają powtórzenia, a wysunięte wnioski — weryfikacji.

Stąd też zgodnie z danymi Horowitza i Lobo [30] wstępna procedura po izolacji limfocytów, a przed oznaczaniem SIg, polegająca na 30 - minutowej inkubacji w temperaturze 37°C i następnym płukaniu komórek w 37°C, jest godna polecenia, a właściwie konieczna dla uzyskiwania wiarygodnych wyników.

Odkrycie Lobo i wsp. wprowadza pewne zamieszanie do ustalonych poglądów na temat różnicowania się komórek z SIg, zakładających, że niezależnie od wprowadzonego antygeny różnicowanie powierzchniowych Ig przebiega według schematu: IgM → IgG → IgA [35, 58]. Dane Lobo i wsp. stwarzają przesłanki do rozpatrywania procesu różnicowania się limfocytów z SIg w dojrzałym organizmie po bodźcu antygenowym zawsze od limfocytów z powierzchniowymi IgM w kierunku limfocytów z IgG i dalej plazmocytów produkujących IgG. Innymi słowy, sugeruje to, że u osobnika dorosłego nie ma prekursorów (w sensie limfocytów z IgG) komórek produkujących IgG (plazmocyty), co innymi słowy oznacza, że komórki produkujące IgG we wtórnej odpowiedzi immunologicznej wywodzą się z limfocytów z powierzchniowymi IgM.

Implikacje odkrycia Lobo i wsp. wymagają oczywiście doświadczonego potwierdzenia. Przyjmując wyniki Lobo i wsp. jako wiarygodne, wydaje się niecelowe dokładne omawianie wyników uzyskanych przez różnych autorów, dotyczących wzajemnego stosunku liczbowego limfocytów z powierzchniowymi IgM do limfocytów z powierzchniowymi IgG. Przykładowo można przytoczyć dane uzyskane przez Williamsa i wsp. [64] w badaniach limfocytów krwi obwodowej człowieka — wykazujących stosunek limfocytów z powierzchniowymi IgM do limfocytów z powierzchniowymi IgG w szerokich granicach od 0,4 do 2,0.

Weryfikacji wymagają również dane uzyskane w badaniach nad częstością występowania łańcuchów lekkich λ i κ . Według różnych autorów stosunek limfocytów z łańcuchami $\lambda : \kappa$ waha się w limfocytach krwi obwodowej u człowieka od 1,2 do 3,6, średnio 1,9 (według Warnera [60]).

Podobnie krytycznej oceny z przytoczonych względów wymagają dane uzyskane w rozwoju ontogenetycznym człowieka, dotyczące stosunku limfocytów z łańcuchami λ i κ na powierzchni [31].

Wartości limfocytów z SIg w krwi obwodowej i w różnych narządach limfatycznych u człowieka i myszy przedstawiono w tabeli 2. Zawartości odsetkowe limfocytów z SIg są bardzo podobne u myszy i człowieka, co sugeruje, że genetycznie uwarunkowana ekspresja limfocytów B jest filogenetycznie zbliżona u tak odległych gatunków, jak człowiek i mysz.

TABELA 2. Limfocyty z powierzchniowymi immunoglobulinami (SIg) w różnych tkankach limfatycznych i krwi obwodowej u człowieka i myszy

	Mysz*	Człowiek**	Literatura
Śledziona	40	27	51
Węzły chłonne	21	23	56
Przewód piersiowy	19	18	51
Szpik kostny	18	6	33
Migdałki	—	42	24
Grasica	1	2	51
Krew obwodowa	27	5—34***	

* Średnie wartości uzyskane przez 15 autorów różnymi testami, na podstawie danych Warnera [60].

** Wyniki uzyskane przy użyciu techniki immunofluorescencji powierzchniowej.

*** Zakres wyników oznaczania limfocytów z powierzchniowymi immunoglobulinami różnymi technikami przedstawionymi w tab. 1.

ZNACZENIE POWIERZCHNIOWYCH Ig W TWORZENIU SWOISTYCH RECEPTORÓW DLA ANTYGENÓW

Na podstawie licznych eksperymentów wykazano ponad wszelką wątpliwość, że powierzchniowe immunoglobuliny limfocytów B spełniają rolę receptorów wiążących antygeny. Po zastosowaniu poliwalentnej surowicy anti-Ig na komórki wiążące antygen, następuje całkowite zahamowanie wiązania antygeny [2, 59].

Stwierdzono, że u nie uczulanych zwierząt powierzchniowe immunoglobuliny klasy IgM pełnią rolę receptorów wiążących antygen. Wykazano, że w przebiegu odpowiedzi immunologicznej na wprowadzony antygen następuje zmiana klasy immunoglobuliny wiążącej antygen na powierzchni limfocyty z IgM na IgG. Ponadto stwierdzono, że w czasie odpowiedzi immunologicznej między 1 a 7 dniem po wprowadzeniu antygeny wiele komórek posiada równocześnie na swej powierzchni łańcuchy ciężkie co najmniej dwóch klas Ig — IgM i IgG [22].

Hamowanie wiązania antygeny przez limfocyty T, mimo że nie jest wolne od zastrzeżeń metodycznych, przedstawia się podobnie jak w przypadku limfocytów B. Istotną wykazaną różnicą było stwierdzenie, że dla

zahamowania wiązania antygeny przez limfocyty T konieczne było wyższe stężenie surowicy anty-Ig. Ponadto wykazano, że w czasie odpowiedzi immunologicznej wiązanie antygeny przez limfocyty T można blokować tylko surowicą przeciwko łańcuchowi ciężkiemu μ [29]. Również efekt hamujący stwierdzono przy użyciu surowic anty-Fab, anty-F(ab')₂, anty- κ . Nie wykazano natomiast hamującego działania surowic przeciwko innym niż μ łańcuchom ciężkim Ig, co implikuje, że receptor dla antygeny na limfocytach T może mieć jedynie charakter klasy IgM, bez zmiany ekspresji na inną klasę w trakcie odpowiedzi immunologicznej [26, 27].

Jednakże Hogg i Greaves [29] wykazali, że w trakcie odpowiedzi immunologicznej zmiana ekspresji łańcucha lekkiego zachodzi również na limfocytach T wiążących antygen, z łańcucha κ na λ . Autorzy ci uzyskali hamowanie tworzenia rozetek przez limfocyty T (u myszy) z erytrocytami barana przez surowicę anty- λ w 40–80% między 2 a 6 dniem po iniekcji erytrocytów barana i hamowanie w około 20% po miesiącu po iniekcji.

Na podstawie przedstawionych danych należy przyjąć, że limfocyty T mają na swej powierzchni determinanty immunoglobulinowe klasy IgM. W odróżnieniu od limfocytów B jest ich jednakże znacznie mniej i być może są one tylko częściowo eksponowane na powierzchni komórki.

Cone i wsp. [9] wykazali, że receptory wiążące antygen produkowane przez zaktywowane limfocyty T mogą być usuwane przez wytrącanie swoistą surowicą anty-Ig. Na tej podstawie wysunięto hipotezę, że antygen po związaniu z limfocytym T może indukować uwalnianie IgM, po czym następuje łączenie się dalszych cząsteczek antygeny z IgM pochodzącą z limfocytów T. Antygen w formie kompleksu byłby zatem wiązany przez powierzchnię makrofagów (przez receptor dla IgM limfocyta T) i prezentowany limfocytom B w celu indukcji dalszych etapów odpowiedzi immunologicznej. IgM pochodząca z limfocytów T jest prawdopodobnie antygenowo swoista w odróżnieniu od nieswoistych czynników wydzielanych przez zaktywowane limfocyty T w ich kooperacji z limfocytami B.

Na podstawie licznych doświadczeń wykazano, że na powierzchni ludzkich limfocytów B równocześnie z klasą IgM występuje klasa IgD [5, 52, 55]. Znaczenie równoczesnego występowania tych dwóch klas immunoglobulin na powierzchni limfocyta nie zostało dotąd wyjaśnione.

Występowanie immunoglobulin na powierzchni limfocytów T w przeciwieństwie do dawnych poglądów jest sprawą bezsporną. Należy jednak podkreślić, że ilość determinant immunoglobulinowych na limfocytach T jest znacznie mniejsza niż na limfocytach B. Udowodniono, że

cząsteczki Ig na powierzchni limfocytów T posiadają masę cząsteczkową 200 000 daltonów i zawierają łańcuchy lekkie, identyczne z łańcuchami λ lub κ , oraz łańcuchy ciężkie, podobne, lecz nie identyczne z łańcuchami ciężkimi μ [42]. Łańcuchy ciężkie μ na limfocytach T różnią się antygenowo i elektroforetycznie od analogicznych łańcuchów występujących w surowicy krwi i na limfocytach B. Determinanty immunoglobulinowe limfocytów B i T pełnią rolę receptorów wiążących antygeny, jednakże mechanizm, dzięki któremu następuje aktywacja limfocytów i ich różnicowanie po przyłączeniu antygeny, nie jest jeszcze dokładnie poznany i wymaga dalszych badań.

LITERATURA

- [1] ABDOU N. I., Immunoglobulin (Ig) receptors on human peripheral leukocytes. II. Class restriction of Ig receptors, *J. Immunol.*, **107**: 1637-1642, 1971.
- [2] ADA G. L., Antigen-binding cells in tolerance and immunity, *Transplant. Rev.*, **5**: 105-129, 1970.
- [3] AISENBERG A. C., BLOCH K. J., Immunoglobulins on the surface of neoplastic lymphocytes, *New Engl. J. Med.*, **287**: 282-284, 1972.
- [4] BAUR S., VITETTA E. S., SCHERR C. J., SCHENKEIN I., UHR J. W., Isolation of heavy and light chains of immunoglobulin from the surface of lymphoid cells, *J. Immunol.*, **106**: 1153-1155, 1971.
- [5] BOXEL J. A., BUELL D. N., IgD on cell membranes of human lymphoid cell lines with multiple immunoglobulin classes, *Nature*, **251**: 443, 1974.
- [6] BROWN G., GREAVES M. F., Cell surface markers for human T and B lymphocytes, *Eur. J. Immunol.*, **4**: 302-309, 1974.
- [7] BROWN G., GREAVES M. F., Enumeration of absolute numbers of T and B lymphocytes in human blood, *Scand. J. Immunol.*, **3**: 161-172, 1974.
- [8] CONE R. E., MARCHALONIS J. J., ROLLEY R. T., Lymphocyte membrane dynamics. Metabolic release of cell surface proteins of normal and neoplastic lymphocytes, *J. Exp. Med.* **134**: 1373-1382, 1971.
- [9] CONE R. E., SPRENT J., MARCHALONIS J. J., Antigen-binding specificity of isolated cell-surface immunoglobulin from thymus cells activated by histocompatibility antigens, *Proc. Nat. Acad. Sci. US.*, **69**: 2556-2560, 1972.
- [10] CONE R. E., MARCHALONIS J. J., Surface proteins of thymus-derived lymphocytes and bone-marrow-derived lymphocytes. Selective isolation of immunoglobulin and theta-antigen by non-ionic detergents, *Biochem. J.*, **140**: 345-354, 1974.
- [11] COOMBS R. R. A., FEINSTEIN A., WILSON A. B., Immunoglobulin determinants on the surface of human lymphocytes, *Lancet*, **2**: 1157-1159, 1969.
- [12] COOMBS R. R. A., GURNER B. W., JANEWAY C. A., WILSON J. A. B., GELL P. G. H., KELUS A. S., *Immunol.*, **18**: 417-426, 1970.
- [13] COOPER M. D., LAWTON A. R., BOCKMAN D. E., Agammaglobulinaemia with B lymphocytes. Specific defect of plasma-cell differentiation, *Lancet*. **2**: 791-793, 1971.

- [14] DAVIE J. M., PAUL W. E., Receptors on immunocompetent cells. II. Specificity and nature of receptors on dinitrophenylated guinea pig albumin - 125 I - binding lymphocytes of normal guinea pigs., *J. Exp. Med.*, **134**: 495-504, 1971.
- [15] DICKLER H. B., KUNKEL H. G., Interaction of aggregated gamma globulin with B lymphocytes, *J. Exp. Med.*, **136**: 191-203, 1972.
- [16] DICKLER H. B., Studies of the human lymphocyte receptor for heat-aggregated or antigen - complexed immunoglobulin, *J. Exp. Med.*, **140**: 508-522, 1974.
- [17] EISEN S. A., WEDNER H. J., PARKER C. W., Isolation of pure human peripheral blood T-lymphocytes using nylon wool columns, *Immunol. Communications*, **1**: 571-577, 1972.
- [18] FANGER M. W., HART D. A., WELLS J. V., NISONOFF A., Requirement for cross-linkage in the stimulation of transformation of rabbit peripheral lymphocytes by antiglobulin reagents, *J. Immunol.*, **105**: 1484-1492, 1970.
- [19] FRÖLAND S. S., NATVIG J. B., Surface-bound immunoglobulin on lymphocytes from normal and immunodeficient humans, *Scand. J. Immunol.*, **1**: 1-12, 1972.
- [20] GAJL-PECZALSKA K. J., PARK B. H., BIGGAR W. D., GOOD R. A., T and B lymphocytes in primary immunodeficiency diseases in man, *J. Clin. Invest.*, **52**: 919-928, 1973.
- [21] GREAVES M. F., TORNIGIANI G., ROITT I. M., Blocking of the lymphocyte receptor site for cell mediated hypersensitivity and transplantation reactions by anti - light chain sera, *Nature*, **222**: 885-886, 1969.
- [22] GREAVES M. F., The expression of immunoglobulin determinants on the surface of antigen - binding lymphoid cells in mice. I. An analysis of light and heavy chain restrictions on individual cells, *Eur. J. Immunol.*, **1**: 186-194, 1971.
- [23] GREAVES M. F., OWEN J. T., RAFF M. C., T and B lymphocytes: their origins, properties and roles in immune response, Associated Scientific Publications, Amsterdam 1973.
- [24] GREAVES M. F., BROWN G., A human B lymphocyte specific antigen, *Nature New Biol.*, **152**: 116-119, 1973.
- [25] GREY H. M., RABELLINO E., PIROFSKY B., Immunoglobulins on the surface of lymphocytes. IV. Distribution in hypogammaglobulinaemia, cellular immune deficiency and chronic lymphatic leukemia, *J. Clin. Invest.*, **50**: 2368-2376, 1971.
- [26] HÄMMERLING G. J., McDEVITT H. O., Antigen binding T and B lymphocytes. I. Differences in cellular specificity and influence of metabolic activity on interaction of antigen with T and B cells, *J. Immunol.*, **112**: 1726-1733, 1974.
- [27] — Antigen binding T and B lymphocytes. II. Studies on the inhibition of antigen binding to T and B cells by anti - Ig and anti - H - 2 sera, *J. Immunol.*, **112**: 1734-1740, 1974.
- [28] HELLER P., BHOOPALAM N., YAKULIS V. J., COSTEA N., Kappa and lambda receptor sites on single lymphocytes, *Clin. Exp. Immunol.*, **9**: 637-643, 1971.
- [29] HOGG N. M., GREAVES M. F., Antigen binding thymus derived lymphocytes. II. Nature of the immunoglobulin determinants, *Immunol.*, **22**: 967-980, 1972.

- [30] HOROWITZ D. A., LOBO P. I., Characterization of two populations of human lymphocytes bearing easily detectable surface immunoglobulin, *J. Clin. Invest.*, **56**: 1464-1472, 1975.
- [31] JAMES K. K., HURTURBISE P. E., MACPHERSON C. R., MURPHY S. G., Human lymphocyte membrane immunoglobulin as a reflection of maturation, *J. Immunol.*, **113**: 698-701, 1974.
- [32] KATZ D., BENACERRAF B., The regulatory influence of activated T cells on B cell responses to antigen, *Adv. Immunol.*, **15**: 1-94, 1972.
- [33] KLEIN E., ESKELAND T., INOUE M., STROM R., JOHANSSON B., Surface immunoglobulin - moieties on lymphoid cells, *Exp. Cell Res.*, **62**: 133-148, 1970.
- [34] KURNICK J. T., GREY H. M., Immunoglobulin-bearing lymphocytes and cells reactive with sensitized human erythrocytes, *J. Immunol.*, **115**: 305-307, 1975.
- [35] LAWTON A. R., KINCADE P. W., COOPER M. D., Sequential expression of germ line genes in development of immunoglobulin class diversity, *Federation Proc.*, **34**: 33-39, 1975.
- [36] LITWIN S. D., Allelic and class exclusion of membrane-associated immunoglobulins of human lymphocytes, *J. Immunol.*, **108**: 1129-1131, 1972.
- [37] LITWIN S. D., OCHS H., POLLARA B., Surface immunoglobulin on blood lymphocytes of normal and immunodeficient persons studied by the mixed antiglobulin method, *Immunol.*, **25**: 573-581, 1973.
- [38] LOBO P. I., WESTERVELT F. B., HOROWITZ D. A., Identification of two population of Ig - bearing lymphocytes in man, *J. Immunol.*, **114**: 116-119, 1975.
- [39] MARCHALONIS J. J., CONE R. E., SANTER V., Enzymic iodination. A probe for accessible surface proteins of normal and neoplastic lymphocytes, *Biochem. J.*, **124**: 921-929, 1971.
- [40] MARCHALONIS J. J., CONE R. E., ATWELL J., Isolation and partial characterization of lymphocyte surface immunoglobulin, *J. Exp. Med.* **135**: 956-966, 1972.
- [41] MARCHALONIS J. J., CONE R. E., von BOEHMER H., Surface immunoglobulins of peripheral thymus-derived lymphocytes, *Immunochem.*, **11**: 271-277, 1974.
- [42] MARCHALONIS J. J., Lymphocyte surface immunoglobulins, *Science*, **190**: 20-29, 1975.
- [43] MILLER J. F. A. P., Lymphocyte interactions in antibody responses, *Int. Rev. Cytol.*, **33**: 77-92, 1972.
- [44] PAPAMICHAEL M., BROWN J. C., HOLBORROW E. J., Immunoglobulins on the surface of human lymphocytes, *Lancet*, **2**: 850-851, 1971.
- [45] PERNIS B., FORNI L., AMANTE L., Immunoglobulins as cell receptors, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **190**: 420-427, 1971.
- [46] PIESSENS W. F., SCHUR P. H., MOLONEY W. C., CHURCHILL W. H., Lymphocyte surface immunoglobulins. Distribution and frequency in lymphoproliferative diseases, *New Engl. J. Med.*, **288**: 176-178, 1973.
- [47] PREUD'HOMME J. L., SELIGMAN M., Immunoglobulins on the surface of lymphoid cells in Waldenström's macroglobulinemia, *J. Clin. Invest.*, **51**: 701-705, 1972.

- [48] RABELLINO S., COLONS S., GREY H. M., UNANUE E. R., Immunoglobulins on the surface of lymphocytes. I. Distribution and quantitation, *J. Exp. Med.*, **133**: 156-162, 1971.
- [49] RAFF M. C., STERNBERG M., TAYLOR R. B., Immunoglobulin determinants on the surface of mouse lymphoid cells, *Nature*, **225**: 553-555, 1970.
- [50] RAFF M. C., T and B lymphocytes and immune response, *Nature*, **242**: 19-23, 1973.
- [51] ROSS G. D., RABELLINO E. M., POLLEY M. J., GREY H. M., Combined studies of complement receptor and surface immunoglobulin-bearing cells and sheep erythrocyte rosette-forming cells in normal and leukemic human lymphocytes, *J. Clin. Invest.*, **52**: 377-385, 1973.
- [52] ROWE D. S., HUG K., FORNI L., PERNIS B., Immunoglobulin D as a lymphocyte receptor, *J. Exp. Med.*, **138**: 965-972, 1973.
- [53] SIEGAL F. P., PERNIS B., KUNKEL H. G., Lymphocytes in human immunodeficiency states: a study of membrane-associated immunoglobulins, *Eur. J. Immunol.*, **1**: 482-488, 1971.
- [54] THRASHER S. G., BIGAZZI P. E., YOSHIDA T., COHEN S., The effect of fluorescein conjugation on Fc-dependent properties of rabbit antibody, *J. Immunol.*, **114**: 762-764, 1975.
- [55] Van BOXEL J. A., PAUL W. E., TERRY W. D., GREEN I., IgD-bearing human lymphocytes, *J. Immunol.*, **109**: 648-650, 1972.
- [56] VERMA R. C., BALAKRISHNAN K., VASUDEVAN D. M., TALWAR G. P., Lymphocytes bearing immunoglobulin determinants in normal human lymph nodes and in patients with lepromatous leprosy, *Int. J. Lepr.*, **39**: 20-24, 1971.
- [57] VITETTA E. S., BIANCO C., NUSSENZWEIG V., UHR J. W., Cell surface immunoglobulin. IV. Distribution among thymocytes, bone marrow cells, and their derived populations, *J. Exp. Med.*, **136**: 81-93, 1972.
- [58] VITETTA E. S., UHR J. W., Immunoglobulin-receptors revisited, *Science*, **189**: 964-969, 1975.
- [59] WARNER N. L., BYRT P., ADA G. L., Blocking of the lymphocyte antigen receptor site with anti-immunoglobulin sera in vitro, *Nature*, **226**: 942-943, 1970.
- [60] WARNER N. L., Membrane immunoglobulins and antigen receptors on B and T lymphocytes, *Adv. Immunol.*, **19**: 67-216, 1974.
- [61] WERNET P., FEIZI T., KUNKEL H. G., Idiotypic determinants of immunoglobulin M detected on the surface of human lymphocytes by cytotoxicity assays, *J. Exp. Med.*, **136**: 650-658, 1972.
- [62] WIGZELL H., SUNDQUIST K. G., YOSHIDA T. O., Separation of cells according to surface antigens by the use of antibody-coated columns. Fractionation of cells carrying immunoglobulins and blood group antigen, *Scand. J. Immunol.*, **1**: 75-87, 1972.
- [63] WIIG J. N., THUNOLD S., Electrophoresis of lymphoid cells. Characterization of human B and T cells in peripheral lymphoid tissues, *Clin. Exp. Immunol.*, **15**: 497-506, 1973.
- [64] WILLIAMS R. C., DE BOARD J. J. R., MELLBYE O. J., MESSNER R. P., LINDSTRÖM F. D., Studies of T- and B-lymphocytes in patients with connective tissue diseases, *J. Clin. Invest.*, **52**: 283-295, 1973.
- [65] WILSON J. D., NOSSAL G. J. V., Identification of human T and B lymphocytes in normal peripheral blood and in chronic lymphocytic leukaemia, *Lancet*, **2**: 788-791, 1971.

- [66] WINCHESTER R. J., FU S. M., HOFFMAN T., KUNKEL H. G., IgG on lymphocyte surface: technical problems and the significance of a third cell population, *J. Immunol.*, **114**: 1210-1212, 1975.
- [67] ZEILLER K., HOLZBERG E., PASCHER G., HANNIG K., Free flow electrophoretic separation of T and B lymphocytes. Evidence for various subpopulations of B cells, *Hope - Seyler's Z. Physiol. Chem.*, **353**: 105-114, 1972.

Otrzymano: 1 kwietnia 1976.

Przyjęto: 10 maja 1976.

Adres autora: ul. Świącickiego 6, 60-781 Poznań.

POWIERZCHNIOWE TRANSFERAZY GLIKOZYLOWE I ICH ROLA WE WZAJEMNYM ODDZIAŁYWANIU KOMÓREK

Krystyna KOZŁOWSKA

Pracownia Cytofizjologii Zakładu Histologii
Instytut Biologii Medycznej Akademii Medycznej w Gdańsku

Streszczenie. Przedstawiono aktualne poglądy na temat występowania transferaz glikozylowych (E.C.2.4.) na powierzchni komórek oraz ich roli we wzajemnych kontaktach między komórkami.

Na podstawie przeprowadzonych badań ustalono, że w błonie plazmatycznej większości komórek zwierzęcych występują różnorodne łańcuchy heterosacharydowe, stanowiąc najbardziej powierzchniowo usytuowane składniki błony [12, 16, 22, 30, 42, 45].

Zaobserwowano również, iż struktura powierzchni błony plazmatycznej ma decydujące znaczenie dla sposobu w jaki komórki „komunikują się” i współdziałają ze sobą oraz ze swoim środowiskiem. Wyrażono pogląd, że powierzchnia komórkowa może brać udział w regulowaniu kontroli podziału, wzrostu i różnicowania komórek [6, 11, 16, 17, 32].

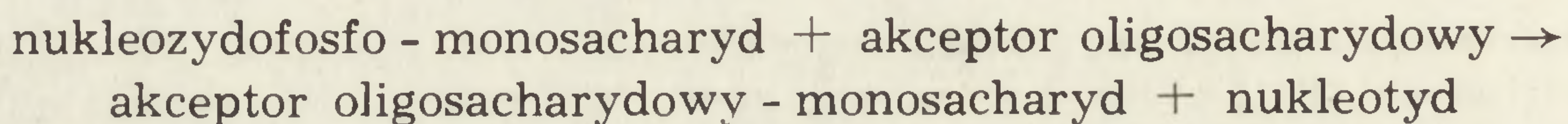
W miarę przybywania informacji dotyczących tej dziedziny wiedzy, coraz bardziej oczywisty stawał się związek heterosacharydowych łańcuchów powierzchniowych z takimi procesami, jak wzrost, podział komórek, zjawisko adhezji, wzajemne rozpoznawanie się komórek w procesie morfogenezy, a także osłabienie oddziaływań międzykomórkowych w trakcie transformacji nowotworowej komórek [6, 7, 14, 20, 28, 31, 50]. Jednakże mechanizm tych interakcji między powierzchniami komórek na poziomie molekularnym pozostawał niewyjaśniony.

Dotychczasowe próby wyjaśnienia zjawiska adhezji zakładały, że komórki mogłyby się rozpoznawać i łączyć dzięki dopasowywaniu komplementarnych cząstek obecnych na powierzchni komórek lub też określając precyzyjniej — na zasadzie połączenia antygen-przeciwciało

[12, 36]. Jednakże próby te stwarzały tylko bardzo ogólne możliwości wyjaśnienia zjawiska adhezji komórkowej bez określenia, jakie cząsteczki mogłyby pośredniczyć w tych interakcjach.

Wobec takiego stanu rzeczy, teoria przedstawiona przez Rosemana w 1970 r. [36], precyzująca charakter mechanizmu adhezji, wydaje się być bardziej obiecującą próbą w dążeniu do wyjaśnienia oddziaływań międzykomórkowych. Roseman, opierając się na wcześniejszych swoich pracach [29], wysunął pogląd, że komórki mogą łączyć się ze sobą dzięki istnieniu na ich powierzchniach enzymów i odpowiadających im specyficznych akceptorów. Akceptorami tymi byłyby powierzchniowe łańcuchy heterosacharydowe, natomiast enzymami — transferazy glikozyłowe.

Transferazy glikozyłowe (E.C.2.4.) stanowią dużą grupę nie sklasyfikowanych jeszcze całkowicie enzymów, z których każdy może katalizować przeniesienie reszty cukrowcowej z nukleozydofosfocukru na swoisty akceptor według następującej reakcji:



Transferazy glikozyłowe przenoszące określone reszty cukrowcowe (np. sjalilowe, galaktozyłowe, fukozyłowe) używają określonego rodzaju nukleotydu, który po połączeniu z monosacharydem służy jako donator reszty cukrowcowej w reakcji transferazowej.

Dla grupy transferaz galaktozyłowych donatorem będzie UDP - galaktoza, dla transferaz sjalilowych — CMP - kwas sjalowy, dla fukozyłowych — GTP - fukoza. Jednakże dla danej cząsteczki akceptorowej bądź jej analogów enzym odznacza się wysoką specyficznością.

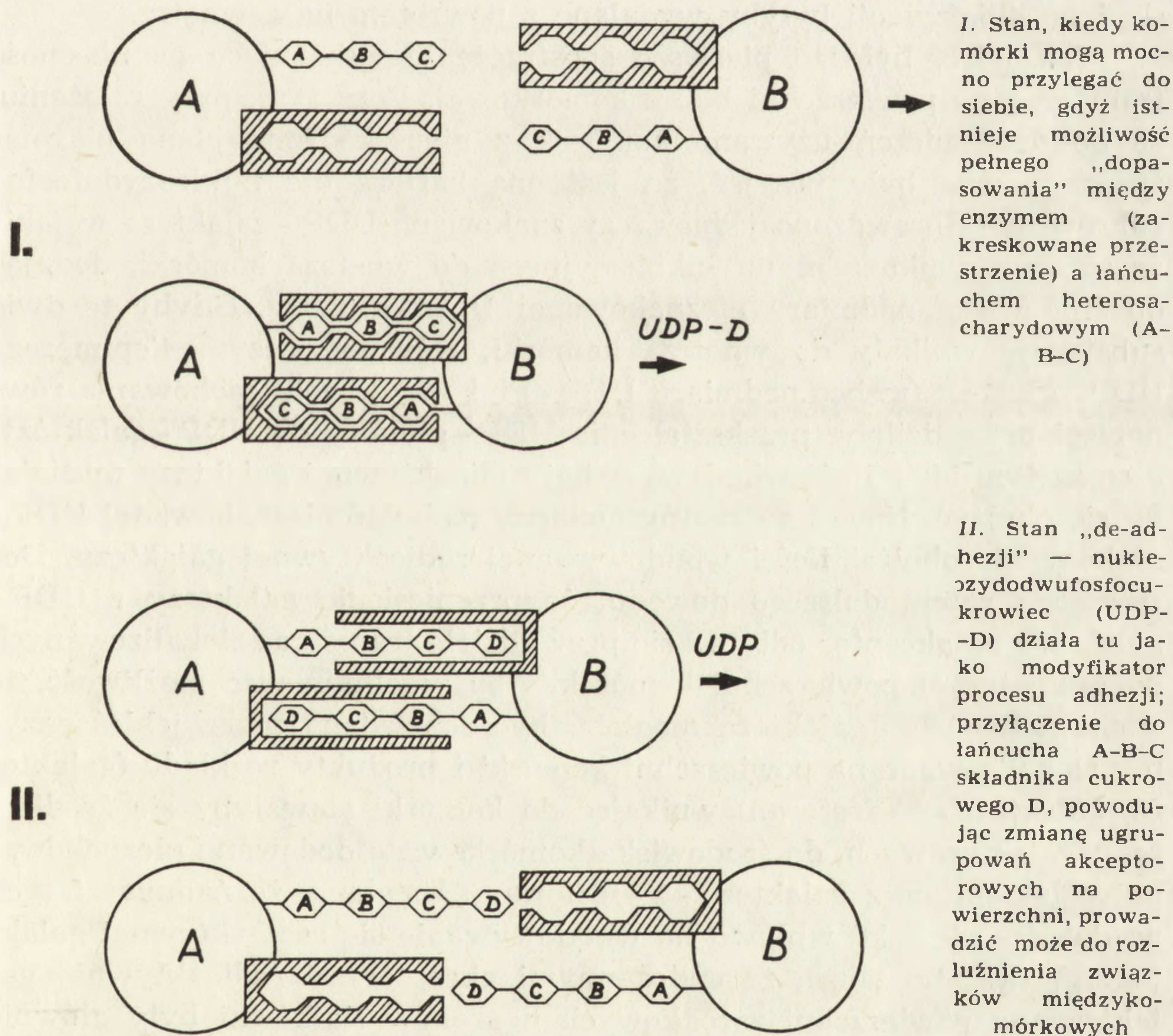
Różnorodność łańcuchów heterosacharydowych na powierzchni różnych komórek czyni tę powierzchnię bardzo zróżnicowaną. Z faktu tego może wynikać duża różnorodność specyficznych interakcji pomiędzy transferazami i łańcuchami cukrowcowymi komórek, stwarzając szerokie możliwości do rozpoznawania się komórek i w następstwie do ich przylegania — adhezji.

Podkreślić należy, że o ile w odniesieniu do roli heterosacharydów powierzchniowych w procesach adhezji komórek teoria Rosemana wydawała się bardzo atrakcyjna i miała już ustaloną eksperymentalnie podbudowę, to część koncepcji odnosząca się do udziału enzymów — transferaz glikozyłowych, w procesach interakcji komórka-komórka — była początkowo czysto hipotetyczna. Autor oparł swe przypuszczenia na założeniu, że możliwa jest obecność transferaz glikozyłowych na powierzchni błon plazmatycznych skoro enzymy te obecne są w błonach układu Golgiego [41], gdzie prowadzą kolejne etapy biosyntezy wielko-cząsteczkowych połączeń węglowodanowo-białkowych (glikoproteidy, pro-

teoglikany). Wiadomo przy tym było, że chociażby w czasie wydzielania tych makrocząsteczek poza obręb komórki, błony ziarenek wydzielniczych pochodzących z układu Golgiego, łącząc się z błoną plazmatyczną mogłyby się stawać źródłem transferaz powierzchniowych.

Roseman w swej oryginalnej koncepcji rozszerzył pogląd na rolę transferaz, przypisując im udział w ogólnobiologicznych funkcjach komórki. Postulowany mechanizm procesu adhezji, przy udziale: transferaza-nukleotyd-akceptor heterosacharydowy, ilustruje rys. 1. Ilustruje ona również możliwość modyfikacji kontaktów pomiędzy komórkami poprzez nukleozydofosfocukrowce.

Pierwsze doniesienia o obecności transferaz na powierzchni komórek pochodzą z 1971 r. [38]. Wkrótce zaczęły napływać także inne informacje o występowaniu tych enzymów na powierzchni wielu komórek [2, 4, 9, 31, 37, 43, 51]. Do chwili obecnej poczyniono liczne spostrzeżenia



Rys. 1. Schemat ilustrujący udział transferaz i akceptorów powierzchniowych w procesie adhezji międzykomórkowej (cyt. za [12] nieco zmodyfikowany).

wskazujące, że transferazy glikozylowe są istotnie związane z procesami wzrostu, różnicowania oraz transformacją onkogenną komórek, a więc z tymi wszystkimi procesami, u których podstaw tkwi oddziaływanie pomiędzy powierzchniami poszczególnych komórek [8-10, 18, 19, 25, 26, 47, 51].

Nieuszkodzone neurony wyizolowane z siatkówki zarodków kurczęcia mogą katalizować przeniesienie znakowanej galaktozy z UDP - galaktozy zarówno na endogenny akceptor (np. jakiś glikoproteid na powierzchni neuronów), jak i na akceptory egzogenne [38]. Przy tym preparaty komórkowe nie tylko wykorzystują akceptory o niskim ciężarze cząsteczkowym, jak np. N - acetyloglukozoaminę, ale również glikoproteidy o wysokim ciężarze cząsteczkowym, pochodzące ze ślinianek, lub glikoproteidy surowicy krwi. Znakowane produkty reakcji znajdowano w płynie zewnątrzkomórkowym, wydawało się zatem niemożliwe, aby glikoproteidy o dużej cząsteczce mogły wnikać do wnętrza komórek, skąd po glikozylacji byłyby wydalane z powrotem na zewnątrz.

Tak więc, było to pierwsze spostrzeżenie wskazujące na obecność transferaz na powierzchni błony komórkowej. Poza tym, przy założeniu, że do doświadczeń używano komórek z nieuszkodzoną błoną plazmatyczną można było przyjąć, że jest ona barierą dla nukleozydofosfocukrowców. Sprawdzone jednak, czy znakowana UDP - galaktoza w jakiś sposób nie wnika z płynu inkubacyjnego do wnętrza komórki, dodając do środowiska nadmiar nieznakowanej UDP - glukozy. Gdyby te dwie substancje wnikały do wnętrza komórki, wówczas enzym 4'epimeraza UDP - glukozy (wobec nadmiaru UDP - glukozy) w celu zachowania równowagi prowadziłaby przekształcenia UDP - glukozy do UDP - galaktozy, a co za tym idzie ilość wbudowywanej radioaktywnej galaktozy musiałaby się obniżyć. Nawet 5 - krotny molarny nadmiar nieznakowanej UDP - glukozy nie obniżał ilości wbudowywanej radioaktywnej galaktozy. Dostarczono zatem dalszego dowodu, że przeniesienie galaktozy z UDP - galaktozy na akceptor odbywa się przy udziale transferaz zlokalizowanych na zewnętrznej powierzchni komórek. Aby wyeliminować możliwość, że znakowana UDP - galaktoza mogłaby być rozkładana przez jakieś enzymy zlokalizowane na powierzchni komórki i produkty rozkładu (galaktoza, galaktozo - 1 - fosforan) wnikając do komórki stawałyby się źródłem reszt galaktozowych, do środowiska komórkowego dodawano nieznakowanej galaktozy oraz galaktozo - 1 - fosforanu. Ustalono, że nadmiar i tych produktów nie miał wpływu na wbudowywanie się radioaktywnej galaktozy. Wykazano także, że endogennymi akceptorami radioaktywnej galaktozy na powierzchni zarodkowych neuronów siatkówki były głównie glikoproteidy, a tylko 6% radiaktywności związana była z powierzchniowymi glikolipidami [38].

Badania Barber i Jamieson [4] również z 1971 r. wskazały na obecność transferaz glikozylowych na powierzchni płytek krwi. Stwierdzono, że enzymy te biorą udział w przyleganiu płytek do kolagenu. Według sugestii autorów, mechanizm tego zjawiska polegałby na połączeniu powierzchniowych transferaz galaktozylowych płytek krwi z wolnymi resztami galaktozy w kolagenie. Wykazano również, że inhibitory transferaz glikozylowych hamują także proces przylegania płytek krwi do kolagenu. Utworzenie takiego kompleksu enzym – akceptor może być istotnym etapem w hemostazie [5, 23]. Koncepcję tą wspiera fakt, że na powierzchni płytek nie wykryto dotąd akceptorów dla transferaz glikozylowych. W przypadku więc płytek krwi, enzymy te służą do tworzenia połączeń pomiędzy akceptorami zlokalizowanymi poza płytkami.

Inne prace podkreślają związek powierzchniowych transferaz z cyklem życiowym komórek [8, 10]. Określając aktywność transferaz: sialilowej, galaktozylowej oraz glukozoaminylowej w zsynchronizowanych populacjach komórek L5178Y Bosmann [10] wykazał, że aktywność tych enzymów wzrasta w fazie S, w której głównie syntetyzowane są glikoproteidy powierzchniowe tych komórek i jednocześnie zwiększa się w tej fazie adhezja międzykomórkowa. Bosmann uważa, że powierzchniowe glikoproteidy i odpowiadające im transferazy mogą służyć do wzajemnego rozpoznawania komórek i w następstwie aktywować adhezję, której mechanizm byłby taki jak zaproponował Roseman. Autor ten zwraca jednocześnie uwagę na fakt, że transferazy glikozyłowe występują na powierzchni komórek w stężeniu o wiele niższym niż to się stwierdza dla błon układu Golgiego i dlatego ich funkcja może być inna niż udział w biosyntezie glikoproteidów [10].

Opisano także występowanie transferaz galaktozylowych i sialilowych na powierzchni komórek wątrobowych, przypisując tym enzymom udział w wiązaniu i wyłapywaniu z krążenia glikoproteidów, w których odszczepiono końcową resztę kwasu sialowego [1–3, 21, 35, 48].

Komórki wątrobowe, dzięki obecności na swych powierzchniach transferaz galaktozylowych, rozpoznają terminalne, nieredukujące reszty β -D-galaktozy, odsłonięte na skutek odszczepienia od glikoproteidów końcowych cząsteczek kwasu sialowego [2].

Wprawdzie według Evansa [15] udział transferaz glikozylowych z powierzchni komórek wątrobowych w adhezji międzykomórkowej, a zwłaszcza w wiązaniu glikoproteidów pozbawionych końcowych reszt kwasów sialowych, nie jest taki oczywisty, ponieważ występująca w dużym stężeniu na powierzchni komórek wątroby pyrofosfataza nukleotydowa, rozkładająca nukleozydofosfocukrowce, pozbawia transferazy substratów.

Jednakże praca Aronsona z 1975 r. [9], stanowiąca niejako odpowiedź na zastrzeżenia Evansa, wykazuje, że transferazy galaktozyłowe z powierzchni hepatocytów mogą tworzyć połączenia pomiędzy końcową galaktozą glikoproteidu pozbawionego kwasu sjałowego, bez pośrednictwa nukleozydodwufosfocukrowców. Sugeruje się również, że transferazy galaktozyłowe są miejscami wiążącymi konkanawalinę A z powierzchnią błony komórkowej [26, 33, 34].

Z badań prowadzonych nad oczyszczoną transferazą galaktozyłową błony plazmatycznej erytrocytów [34] wynika, że enzym ten wiąże konkanawalinę A poprzez reszty mannozydowe, które są częścią składową enzymatycznej komponenty węglowodanowej.

Spostrzeżenia, że komórki charakteryzujące się niską aktywnością transferazy galaktozyłowej są słabo aglutynowane przez konkanawalinę A [26, 33] wydaje się potwierdzać udział tych enzymów w wiązaniu lektyny przez powierzchnię komórek. Badania innych autorów wskazują na powiązanie między aktywnością powierzchniowych transferaz glikozyłowych a procesem różnicowania komórek [26, 27, 50, 51].

Komórki krypt jelita cienkiego, które są jak wiadomo słabo zróżnicowane i wykazują wysoką aktywność mitotyczną, mają wyższy poziom transferaz glikozyłowych na powierzchniach enterocytów niż to się stwierdza w komórkach ze szczytu kosmków, które są zróżnicowane i mitotycznie nieaktywne [27, 50, 51]. W komórkach jelita grubego stwierdzono wyższą aktywność powierzchniowych transferaz w porównaniu z aktywnością tych enzymów w komórkach jelita cienkiego. Indukowano również nowotwory jelita, używając karcinogenu 1,2-dwumetylohydrazyny [27]. Okazało się, że komórki gruczolakoraka w jelicie cienkim wykazywały taką samą aktywność powierzchniowych transferaz glikozyłowych jak niezróżnicowane komórki krypt; aktywność transferaz w komórkach guza jelita grubego była niższa w porównaniu z komórkami prawidłowymi i podobna do aktywności stwierdzanej w komórkach jelita cienkiego. Autorzy sugerują, że być może w tym typie procesu nowotworowego nastąpiło coś w rodzaju „odróżnicowania”, jakby cofnięcie się do okresu płodowego, w którym na całej długości jelita stwierdza się podobną aktywność powierzchniowych transferaz galaktozyłowych. W związku z tym, że komórki nowotworowe i transformowane charakteryzują się zmienionymi kontaktami międzykomórkowymi, objawiające się m.in. niekontrolowanym wzrostem i słabszym na ogół przyleganiem do siebie, szczególnie interesująca wydaje się najliczniejsza obecnie grupa doniesień stwierdzających zmiany w aktywności transferaz powierzchniowych w komórkach nowotworowych i transformowanych wirusami onkogennymi [8, 9, 18, 40, 44, 46, 49]. Część autorów podaje, że aktywność transferaz glikozyłowych, a zwłaszcza transferazy

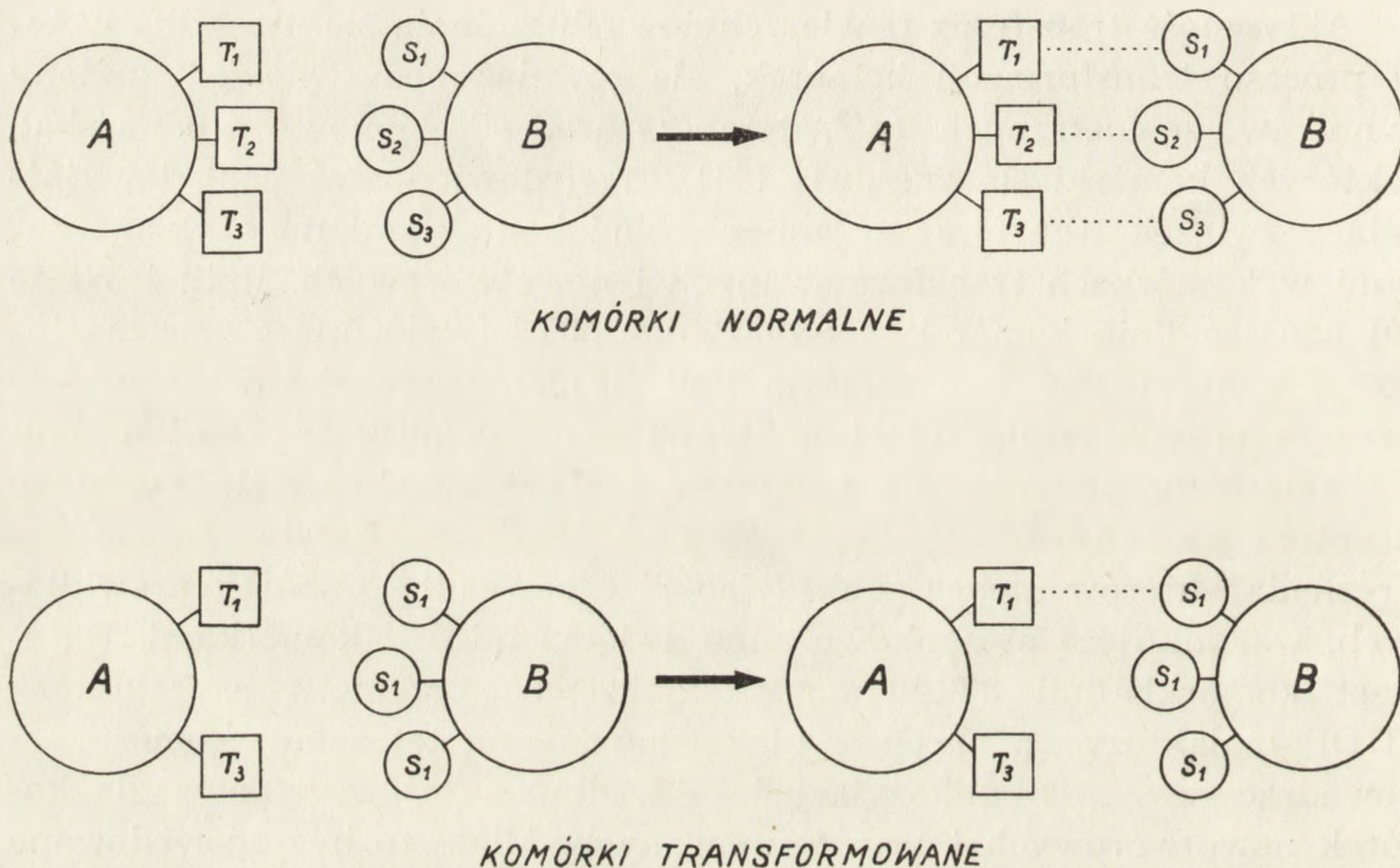
sjalilowej w komórkach transformowanych jest wyższa niż w komórkach prawidłowych [8, 9, 40, 49]. Według zaś innych autorów, aktywność tych transferaz obniża się w komórkach transformowanych [18, 19, 46]. Jak więc widać, doniesienia te nie są ze sobą zgodne i dlatego chociaż można przypuszczać, że w zmiany powierzchniowe towarzyszące transformacji nowotworowej włączone są także i zmiany aktywności transferaz glikozylowych, to jednak nie można jeszcze ustalić dokładnego powiązania tych obydwu procesów.

Aktywność transferaz powierzchniowych zmienia się nie tylko w toku procesu transformacji komórek, ale również pod wpływem zmiany czynników zewnętrznych (pH, temperatura, siła jonowa środowiska), w których komórki się znajdują [44]. Przedstawiono też pogląd wyjaśniający związek transferaz ze zmienionymi kontaktami międzykomórkowymi w komórkach transformowanych i nowotworowych. Roth i White [39] badając linie komórek myszy Balb/c - 3T3 (wykazujące znaczną inhibicję kontaktową) oraz komórki linii 3T12, wysoce złośliwe (nie wykazujące prawie wcale inhibicji kontaktowej) ustalili, że komórki linii 3T3 katalizują przeniesienie galaktozy z UDP - galaktozy do swoistego akceptora zlokalizowanego na sąsiedniej komórce. Byłaby to według określenia autorów „trans - glikozylacja” typowa dla komórek prawidłowych, warunkująca stosunkowo silne związki między komórkami. Natomiast komórki linii 3T12 mogły katalizować przeniesienie galaktozy z UDP - galaktozy na akceptor zlokalizowany na tej samej komórce — prowadząc tzw. „cis - glikozylację” — według autorów, typową dla komórek nowotworowych i transformowanych. Miało to być spowodowane tym, że na komórkach transformowanych lub nowotworowych enzymy i substraty mogą być dostatecznie blisko siebie. Na komórkach prawidłowych enzymy i substraty mogłyby być tak przestrzennie rozdzielone, że tylko trans - glikozylacja zachodziłaby, gdy sąsiednie komórki znajdują się odpowiednio blisko siebie.

Roseman [36] rozważając ewentualną rolę transferaz w procesie adhezji międzykomórkowej i próbując wyjaśnić zjawisko utraty inhibicji kontaktowej przez komórki transformowane sugerował, że komórki prawidłowe zawierając na powierzchni błony plazmatycznej transferazy glikozylowe posiadają również odpowiedni zestaw akceptorów powierzchniowych (ryc. 2).

W komórkach transformowanych i nowotworowych architektonika błony plazmatycznej zostaje zaburzona, z uwagi na występujące zmiany w kompleksach węglowodanowo - białkowych, i transferazy mogą nie znajdować odpowiednich akceptorów na powierzchni komórek transformowanych, co powoduje zmniejszony kontakt między sąsiadującymi ze sobą komórkami. Obecne spostrzeżenia wydają się potwierdzać to przy-

puszczenie Rosemana. Zwraca się uwagę na mniejsze zróżnicowanie powierzchni komórek transformowanych, na pojawienie się jednego typu łańcuchów heterosacharydowych lub też łańcuchów skróconych [12, 16, 20]. Wobec tego, powierzchniowy układ transferaz glikozylowych może nie znajdować odpowiednich akceptorów dla siebie. Konsekwencją tego mogłoby być rozluźnienie związków pomiędzy komórkami nowotworowymi, brak inhibicji kontaktowej i łatwość w powstawaniu przerzutów.



Rys. 2. Schemat przedstawiający rolę glikozylotransferaz powierzchniowych w procesie adhezji komórek normalnych i nowotworowych (wg Rosemana [33] nieco zmodyfikowany)

T_1, T_2, T_3 — transferazy; S_1, S_2, S_3 — heterosacharydy

Nie sposób jednak pominąć milczeniem prac, które negują teorię Rosemana lub też poddają w wątpliwość aktywność transferazową powierzchni komórek. Evans [15] uważa, że nie można przyjąć pośrednictwa nukleozydofosfocukrowców i ich roli modyfikacyjnej w tworzeniu kompleksu glikoproteid - transferaza, tak jak to postuluje Roseman, ponieważ na powierzchni komórek występują enzymy hydrolizujące nukleozydofosfocukrowce. Ponadto autor ten przypuszcza, że aktywność transferazowa powierzchni komórkowej może być wynikiem zanieczyszczeń pochodzących z błon układu Golgiego. Deppert i wsp. [13] wykazali również, że UDP - galaktoza była hydrolizowana przez enzymy powierzchni komórek BHK (baby hamster kidney) i ich pochodnych — linii BHK 21. Ponadto autorom tym nie udało się wykazać obecności transferaz glikozylowych na obydwu badanych typach komórek. Sądzą oni wobec tego, że

nie można generalizować roli tych enzymów i przypisywać im udziału w zjawisku adhezji, tak jak to sugeruje Roseman i inni.

Podobnie Kenan i Morre [24] przypuszczają, że jeśli przyjąć, iż transferazy powierzchniowe nie są wynikiem zanieczyszczeń powierzchni komórkowej enzymami cytoplazmatycznymi, to ich funkcję należy wiązać raczej z wytwarzaniem glikoproteidowej osłonki powierzchniowej, a nie z adhezją komórek. Podkreślić jednak należy, że prace te jak dotąd są nieliczne, natomiast mnożą się doniesienia o udziale powierzchniowych transferaz glikozylowych w omówionych już rodzajach oddziaływań międzykomórkowych.

Należy zatem przypuszczać, że rozwijające się w dalszym ciągu tak dynamicznie badania nad transferazami powierzchniowymi pozwolą bliżej scharakteryzować naturę i rozmieszczenie tych powierzchniowych receptorów i dzięki temu wzbogacą naszą wiedzę o wzajemnych kontaktach między komórkami.

LITERATURA

- [1] ARNOLD D., HOMMEL E., RISSE H. J., Glycosyl transfer activities in intact liver cells of embryonic chick, *Biochim. Bioph. Res. Comm.*, **54**: 100-107, 1973.
- [2] ARONSON N. N., TAN L. Y., PETERS B. P., Galactosyl transferase — the liver plasma membrane binding — site for asialoglycoprotein, *Biochim. Bioph. Res. Comm.*, **53**: 111-118, 1973.
- [3] ARONSON N. N., Hepatocyte sialoglycoprotein, *Nature*, **253**: 380, 1975.
- [4] BARBER A. J., JAMIESON G. A., Platelet collagen adhesion characterisation of collagen glucosyltransferase of plasma membrane of human blood platelets, *Bioch. Bioph. Acta*, **252**: 533-545, 1971.
- [5] — Characterisation of membrane bound collagen galactosyltransferase of human blood platelets, *Bioch. Bioph. Acta*, **252**: 546-552, 1971.
- [6] BEKESI J. G., WINZELER R. J., Inhibitory effects of D - glucosamine on the growth of Walker 256 carcinosarcoma and on protein RNA and DNA synthesis, *Cancer Res.*, **30**: 2905-2912, 1970.
- [7] BOREK C., GROB M., BÜRGER M., Surface alterations in transformed epithelial and fibroblastic cells in culture, *Exp. Cell Res.* **77**: 207-215, 1973.
- [8] BOSMANN H. B., CASE K. R., MORGAN H. R., Surface biochemical changes accompanying primary infection with Rous sarcoma virus. I. Electrokinetic properties of cells and cell surface glycoprotein: glycosyl transferase activities, *Exp. Cell. Res.*, **83**: 15-24, 1974.
- [9] BOSMANN H. B., Cell surface glycosyl transferases and acceptors in normal and RNA and DNA transformed fibroblasts, *Bioch. Bioph. Res. Comm.*, **48**: 523-529, 1972.
- [10] — Cell plasma membrane external surface glycosyltransferases: activity in the cell mitotic cycle, *Biochim. Bioph. Res. Comm.*, **48**: 523-529, 1972.
- [11] BROWN J. C., Surface glycoprotein characteristic of the differentiated state of neuroblastoma C - 1300 cells, *Exp. Cell Res.*, **69**: 440-442, 1971.
- [12] COOK G. M. W., STODDART R. W., Surface carbohydrates of the eukaryotic cell, *Acad. Press London N. York*, 1973.

- [13] DEPERT W., WERCHAU H., WALTER G., Differentiation between intracellular and cell surface glycosyl transferases: galactosyl transferase activity in intact cells and in cell homogenate, *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **71**: 3068-3072, 1974.
- [14] EVANS P. M., Studies on cellular adhesion - aggregation, *Exp. Cell. Res.*, **88**: 56-62, 1974.
- [15] EVANS W. H., Nucleotide pyrophosphatase, a sialoglycoprotein located on the hepatocyte surface, *Nature*, **250**: 391-394, 1974.
- [16] GAHMBERG C. G., HAKOMORI S. J., Organization of glycolipids and glycoproteins in surface membranes dependency on cell cycle and on transformation, *Bioch. Bioph. Res. Comm.*, **59**: 283-291, 1974.
- [17] GOTTLIEB D. J., Temporal changes in embrional cell surface recognition, *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **71**: 1800-1802, 1974.
- [18] GRIMES W. J., Glycosyltransferase and sialic acid levels of normal and transformed cells, *Biochemistry*, **12**: 990-996, 1973.
- [19] GRIMES W. J., SASAKI T., ROBBINS P. W., Glycosyl transferases from normal and transformed cells, *Fed. Proc.*, **30**: 1185, 1971.
- [20] GRZELAKOWSKA - SZTABERT B., Zmiany powierzchniowe komórek towarzyszące ich transformacji wirusowej, *Post. Bioch.*, **20**: 3-22, 1974.
- [21] HUDGIN R. L., ASHWELL G., Studies on the role of glycosyltransferases in the hepatic binding of asialoglycoproteins, *J. Biol. Chem.*, **22**: 7369-7372, 1974.
- [22] HUGHES R. C., Glycoproteins as components of cellular membranes, *Prog. Bioph. Mol. Biol.*, **26**: 189-268, 1973.
- [23] JAMIESON G. A., URBAN C. L., BARBER A. J., Enzymatic basis for platelet: collagen adhesion as the primary step in haemostasis, *Nature New Biol.*, **234**: 5-7, 1971.
- [24] KEENAN T. W., MORRE D. J., Glycosyltransferases: do they exist on the surface membrane of mammalian cells, *FERS Lett.*, **55**: 8-13, 1975.
- [25] KIJIMOTO S., HAKOMORI S., Enhanced glycolipid: α -galactosyl transferase activity in contact-inhibited hamster cells, and loss of this response in polyoma transformants, *Bioch. Bioph. Res. Comm.*, **44**: 557-563, 1971.
- [26] LaMONT J. T., PERROTTO J. L., WEISER M. M., ISSELBACHER K. J., Cell surface galactosyltransferase and lectin agglutination of thymus and spleen lymphocytes. *Proc. Nat. Sci.*, **71**: 3726-3730, 1974.
- [27] LaMONT J. T., WEISER M. M., ISSELBACHER K. J., Cell surface glucosyltransferase activity in normal and neoplastic intestinal epithelium of the rats, *Cancer Res.*, **34**: 3225-3228, 1974.
- [28] MARX J. L., Biochemistry of cancer cells: focus on the cell surface, *Science*, **183**: 1279-1282, 1974.
- [29] OPPENHEIMER S. B., EDIDIN M., ORR C. W., ROSEMAN S., An I-glutamine requirement for intercellular adhesion, *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **63**: 1395-1402, 1969.
- [30] PARSONS D. F., SUBJECK J. R., The morphology of the polysaccharide coat of mammalian cells, *Biochim. Biophys. Acta* **265**: 85-113, 1972.
- [31] PATT L. M., GRIMES W. J., Cell surface glycolipid and glycoprotein glycosyl transferases of normal and transformed cells, *J. Biol. Chem.*, **249**: 4157-4167, 1974.
- [32] PESSAC B., DEFENDI V., Cell aggregation: role of acid mucopolysaccharides, *Science*, **175**: 898-900, 1972.

- [33] PODOLSKY D. K., WEISER M. M., LaMONT J. T., ISSELBACHER K. J., Galactosyltransferase and concanavalin A agglutination of cells, *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **71**: 904-908, 1974.
- [34] PODOLSKY D. K., WEISER M. M., Role of cell membrane galactosyltransferase in concanavalin A agglutination of erythrocytes, *Biochem. J.*, **146**: 213-221, 1975.
- [35] PRICER W. E., ASHWELL G., The binding of desialylated glycoproteins by plasma membrane rat liver, *J. Biol. Chem.*, **246**: 4825-4833, 1971.
- [36] ROSEMAN D., The synthesis of complex carbohydrates by multiglycosyltransferase systems and their potential function in intracellular adhesion, *Chem. Phys. Lipids*, **5**: 270-297, 1970.
- [37] ROTH S., Surface glycosyltransferases on cultured mouse fibroblast, *J. Supramol Struct.* **2**: 1-6, 1974.
- [38] ROTH S., McGUISE E. J., ROSEMAN S., Evidence for cell surface glycosyltransferase, *J. Cell Biol.*, **51**: 536-547, 1971.
- [39] ROTH S., WHITE D., Intercellular galactosyl transferase activity, *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **69**: 485-489, 1972.
- [40] SAITO M., SATOK H., UKITA T., Sialyl transferase activities of rat ascites hepatoma cells and rat liver, *Biochim. Biophys. Acta*, **362**: 549-557, 1974.
- [41] SCHACKTER H., JABBAL J., HUDGIN R. L., PINTERIC L., Intracellular localization of liver sugar nucleotide glycoprotein glycosyltransferase in Golgi - rich fraction, *J. Biol. Chem.* **245**: 1090-1100, 1970.
- [42] SHARON N., Glycoproteins, *Sci. Amer.*, **230**: 78-87, 1974.
- [43] SHUR B. D., ROTH S., Cell surface glycosyltransferases, *Biochim. Biophys. Acta*, **415**: 473-512, 1975.
- [44] SPATARO A. C., MORGAN H. R., BOSMANN B., Cell surface changes accompanying viral transformation: N - acetylneuraminic acid ectotransferase system activity, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **149**: 436-490, 1975.
- [45] SPIRO R. G., Glycoproteins, *Ann. Rev. Biochem.*, **39**: 599-630, 1970.
- [46] SUDO T., ONODERA K., Response of cell surface glycosyltransferases to dibutyryl adenosine - 3' - 5' cyclic monophosphate in virus transformed and normal cells, *Exp. Cell Res.*, **91**: 191-199, 1975.
- [47] Van BEEK W. P., SMETS L. A., EMMELOT P., Changed surface glycoprotein as a marker of malignancy in human leukaemic cells, *Nature*, **253**: 457-460, 1975.
- [48] Van LEUTEN L., ASHWELL G., The binding of desialylated glycoproteins by plasma membrane of rat liver, *J. Biol. Chem.*, **247**: 4633-4640, 1972.
- [49] WARREN L., FURHER J. P., BUCK C. A., Surface glycoproteins of normal and transformed cells: a difference determined by sialic acid and a growth - dependent sialyl transferase, *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **69**: 1838-1842, 1972.
- [50] WEISER M. M., Intestinal epithelial cells surface membrane glycoprotein synthesis. I. An indicator cellular differentiation, *J. Biol. Chem.*, **248**: 2536-2541, 1973.
- [51] — Intestinal epithelial cells surface membrane glycoprotein synthesis. II Glycosyltransferase and endogenous acceptor of the undifferentiated cell surface membrane, *J. Biol. Chem.*, **248**: 2542-2548, 1973.

Otrzymano: 1 kwietnia 1976.

Przyjęto: 20 maja 1976.

Adres autora: ul. Dębinki 7, 80-211 Gdańsk.

ZAGADNIENIE CIĄGŁOŚCI ŁAŃCUCHA POLIDEZOKSYRYBOFOSFORANOWEGO W DNA EUKARIOTÓW

Ryszard OLIŃSKI i Zofia WALTER

Zakład Biochemii Instytutu Biochemii i Biofizyki Uniwersytetu Łódzkiego

Streszczenie. W pracach ostatnich lat przeważa pogląd, że DNA u eukariotów występuje w postaci olbrzymich molekuł, których masa cząsteczkowa jest bliska całkowitej zawartości DNA w danym chromosomie. W niniejszym artykule omówiono prace sugerujące możliwość występowania w DNA chromosomalnym podjednostek o masie od 2×10^8 do 6×10^8 daltonów, połączonych w większe struktury za pomocą związków nie będących dezoksyrybonukleotydami. Rolę „łączników” między podjednostkami DNA spełniać może błona jądrowa lub jej fragmenty, białka bądź RNA.

Zagadnienie, czy chromosomy komórek eukariotów zawierają jedną nieprzerwaną cząsteczkę DNA, podobnie jak u fagów i bakterii, czy też DNA w chromosomie składa się z podjednostek, połączonych związkami nie zawierającymi dezoksyrybonukleotydów, nie zostało do dzisiaj w pełni rozstrzygnięte. Badania autoradiograficzne wykazały, że DNA w chromosomach ma masę cząsteczkową $1 \times 10^9 - 5 \times 10^{10}$ daltonów, a więc bliską całkowitej zawartości DNA w chromosomie [19]. Dane z mikroskopii elektronowej wydają się również potwierdzać te spostrzeżenia [9]. Niedawno Kavenoff i wsp. [21, 22] opracowali metodę pomiaru elastolepkości, która pozwala na wyliczenie mas cząsteczkowych najdłuższych cząsteczek DNA nawet w przypadku, kiedy stanowią one małą frakcję całkowitej ilości DNA. Za pomocą tej metody wyliczono masę cząsteczkową DNA w chromosomach *Drosophila* szczepów dzikich i zmutowanych, posiadających chromosomy różnej wielkości. Kavenoff i Zimm [21] wykazali, że masa cząsteczkowa DNA jest w tym przypadku równa jego zawartości w chromosomach, a więc każdy chromosom zawierałby nieprzerwaną cząsteczkę DNA. Przedstawione wyniki badań nie wykluczają jednak możliwości, że te olbrzymie cząsteczki mogą składać się z frakcji mniejszych, połączonych za pośrednictwem związków innego typu. Z wielu prac wynika, że DNA w chromosomach eukariotów zbudowany jest z podjednostek, których masa cząsteczkowa dla różnych

komórek ssaków waha się w przedziale $2-6 \times 10^8$ daltonów [1, 2, 4, 10, 13, 18, 23, 25, 30, 32].

Ważne miejsce w omawianym zagadnieniu zajmuje organizacja poszczególnych podjednostek w większe struktury. Najczęściej w literaturze można się spotkać z poglądem, że DNA łączy się z błoną jądrową [7, 10-12] lub, że mniejsze podjednostki DNA połączone są w większe struktury za pomocą lipoproteidów, prawdopodobnie fragmentów błony jądrowej [4, 30, 31], RNA [18] bądź białka [1, 2, 23, 33].

POŁĄCZENIE DNA Z LIPOPROTEIDAMI BŁONY JĄDROWEJ

Jak niedawno wykazano [17], tego rodzaju połączenie nie jest artefaktem przypadkowej interakcji między DNA i błoną jądrową, ale wydaje się być specyficzne. Fakt, że po intensywnej degradacji około 10% całkowitego chromosomalnego DNA pozostaje połączone nadal z fragmentami błony jądrowej [20] wydaje się wskazywać również na trwałe połączenie DNA-błona jądrowa. Badania przeprowadzone za pomocą mikroskopii elektronowej sugerują możliwość asocjacji DNA lub chromosomu z błoną jądrową [7, 9]. Zdaniem Comingsa i Okady [7], przyczepienie włókien chromatyny do błony jądrowej może stanowić mechanizm umożliwiający organizację chromatyny w jądrze interfazowym. Możliwe, że miejsca, w których włókna chromatyny są przyczepione do błony jądrowej, pozostają niezmienione podczas cyklu mitotycznego, warunkując przyczepienie nowej błony jądrowej w telofazie [7]. Harrisson [16] na podstawie badań autoradiograficznych i mikroskopowoelektronowych przyjął, że podczas przejścia od interfazy do mitozy błona jądrowa (lub jej fragmenty podczas mitozy) pozostaje przyczepiona do chromatyny. Z niektórych prac [4, 10-12, 27, 30, 31] wynika, że lipoproteidy są elementem łączącym podjednostki DNA o masie cząsteczkowej rzędu 10^8-10^9 daltonów w większe struktury lub, że podjednostki o podobnej masie cząsteczkowej pozostają przyczepione do błony jądrowej. Ormerod i Lehmann [27] izolowali z komórek L5 178Y szybko sedymentujący kompleks DNA z błoną jądrową. Ustalili oni, że punkty przyczepienia DNA do błony jądrowej występują przeciętnie co 2×10^9 daltonów (co odpowiada długości około 1000 μm) wzdłuż nici polinukleotydowej. Możliwe, że występuje o wiele więcej tego typu połączeń, z których część ulega rozerwaniu w warunkach eksperymentu [27]. Podobny, szybko sedymentujący kompleks DNA z błoną jądrową obserwował Elkind [10]. DNA z komórek chomika chińskiego znajdował się początkowo w kompleksie z błoną jądrową i posiadał masę cząsteczkową powyżej 4×10^9 daltonów. Dawki promieniowania jonizującego rzędu 100-800 radów powodowały oddzielenie DNA od lipoproteidów i utworzenie podjednostek o masie cząsteczkowej 2×10^8 daltonów. Poradiacyjna inkubacja komó-

rek umożliwiła szybką reperację nie tylko pojedynczych pęknięć nici polinukleotydowych, ale i kompleksu, chociaż efektywność reperacji kompleksu spadała znacznie wraz ze wzrostem dawki. Reperacja kompleksu objawiała się ponowną reasocjacją DNA i błony jądrowej.

Ciekawych dowodów, potwierdzających możliwość występowania takiego kompleksu, jak i wskazujących na jego ważną rolę w metabolizmie komórki, dostarczyły prace Elkinda i wsp. [3, 10–12], dotyczące poradiacyjnej reperacji kompleksu DNA–błona jądrowa. Badając wpływ aktynomycyny D na poradiacyjne systemy reperacyjne kwasu dezoksyrybonukleinowego Elkind i wsp. [12] stwierdzili, że związek ten hamuje reperację kompleksu, tzn. zapobiega reasocjacji DNA z błoną jądrową, nie wpływając w zasadniczy sposób na możliwość reperacji pojedynczych pęknięć nici polinukleotydowych. Ben-Hur i Elkind [3], obserwując wpływ podwyższonej temperatury inkubacji (41–42°C) na reperację uszkodzeń popromiennych DNA komórek chomika chińskiego, doszli do wniosku, że w temperaturze 42°C reperacja pojedynczych pęknięć jest szybsza i pełniejsza, natomiast tempo reperacji kompleksu zostaje znacznie zwolnione. Autorzy uważają, że zwiększona letalność naświetlonych komórek przy podwyższonej temperaturze inkubacji może być związana z naruszeniem procesów reperacji kompleksu. Strażewskaja i wsp. [4, 30, 31] izolowali z trzech tkanek, a mianowicie z grasicy, wątroby szczura oraz leukocytów królika, nadmolekularny kompleks DNA (NM DNA), który charakteryzował się wyjątkowo wysoką lepkością graniczną. Preparaty te zawierały 1,5–3,5% białka, 1,5–3,5% lipidów i RNA. Po ekstrakcji lipidów lepkość NM DNA wahała się w granicach 290–350 dl/g, co odpowiadało masie cząsteczkowej $1 - 2 \times 10^8$ daltonów. Strażewskaja i wsp. [30] postulują, że otrzymane przez nich preparaty NM DNA są złożonym kompleksem, którego podstawowym elementem są podjednostki DNA o masie cząsteczkowej $1 - 2 \times 10^8$ daltonów. Podjednostki te mogą być połączone za pomocą lipoproteidów lub przyczepione do błony jądrowej. Otrzymane rezultaty są według autorów odbiciem organizacji DNA w chromatynie eukariotów.

ŁĄCZENIE PODJEDNOSTEK DNA ZA POMOCĄ FRAGMENTÓW RYBONUKLEOTYDOWYCH

Jedną z metod najczęściej stosowanych do badania rozmiarów DNA jest wirowanie w zasadowym gradiencie stężeń sacharozy. Niedawno wykazano, że interpretacja wyników uzyskanych tą metodą może być obarczona błędem na skutek międzyłańcuchowych interakcji zachodzących w trakcie wirowania [28]. Aby ograniczyć możliwość powstawania agre-

gatów, Hozier i Taylor [18] wprowadzili ciekawą modyfikację metody wirowania w zasadowych roztworach. Do zsynchronizowanej hodowli komórek w trakcie jednego cyklu mitotycznego wprowadzono bromodezoksyurydynę (BrUd), która w tych warunkach włączała się tylko do jednego z komplementarnych łańcuchów polinukleotydowych. Taki podstawiony BrUd łańcuch DNA ulega znacznej fragmentacji po naświetleniu promieniami UV o długości 313 nm. Po wirowaniu w alkalicznych roztworach komplementarne łańcuchy mogą być łatwo oddzielone, ponieważ łańcuch nie podstawiony BrUd posiada znacznie wyższy współczynnik sedymentacji. Dzięki temu wyklucza się możliwość oddziaływań między komplementarnymi łańcuchami, co niejednokrotnie prowadziło do niewłaściwego określania mas cząsteczkowych otrzymanych makromolekuł DNA. W ten sposób w jednołańcuchowym DNA, izolowanym z komórek jajowych chomika chińskiego, wykazano obecność dwu rodzajów podjednostek: 1. z masą cząsteczkową $1,7 \times 10^8$ daltonów i 2. z masą cząsteczkową 6×10^7 daltonów [18]. Przyjmując, że na 1 μm długości DNA przypada masa cząsteczkowa około 10^6 daltonów, odcinki te miałyby odpowiednio długość 170 i 60 μm . Każda podjednostka o długości 170 μm składałaby się z trzech 60 μm fragmentów [18]. Zaobserwowano, że podjednostki o długości 170 μm pojawiają się po stosunkowo krótkim okresie inkubacji w pH 10,8 lub w czasie trawienia pronazą w pH 9,3, są więc połączone za pośrednictwem związków labilnych w wysokich wartościach pH. Możliwe, że są to fragmenty białkowe lub krótkie odcinki RNA. Fakt, że istnieje cały szereg białek chromosomalnych mających duże powinowactwo do DNA czyni bardziej prawdopodobnym pierwsze przypuszczenie, ale ostatnie badania wskazujące na obecność w mitochondrialnym DNA miejsc labilnych w alkaliach i trawionych RN - azą [14] przemawiałyby za drugą ewentualnością. Podjednostki, analogiczne do większych odcinków, obserwowano uprzednio również i dla dwułańcuchowych cząsteczek DNA Taylor i wsp. [32]. Hozier i Taylor [18] przedstawili ciekawy model wiązań między takimi podjednostkami. Założyli, że łańcuchy DNA są zakończone rybonukleozydem z końcem 3'OH, analogicznie jak w tRNA. Do dwóch grup rybonukleozydowych 2'OH lub 3'OH jest przyłączony końcowymi grupami COO' kowalencyjnie związany dimer białkowy. W ten sposób zostają połączone w miejscu przerwania dwa łańcuchy DNA. Liza w łagodnym środowisku alkalicznym lub działanie pronazy, a następnie podwyższenie pH do około 10 powoduje zerwanie takich połączeń i uwolnienie określonych podjednostek. Krótsze podjednostki (60 μm) pojawiają się po dłuższym okresie lizy w pH 10,8 lub po trawieniu pronazą, w której stwierdzono aktywność rybonukleazową. Pozwoliło to Hozierowi i Taylorowi [18] na sformułowanie wniosku, że podjednostki 60 μm połączone są fragmentami rybonukleotydowymi.

Ponieważ nie obserwowano dwułańcuchowych podjednostek DNA o podobnej długości, jest bardzo prawdopodobne, że pęknięcia między tymi fragmentami rozmieszczone są w komplementarnych łańcuchach naprzemianlegle [18]. Odległości między poszczególnymi pęknięciami wynosiłyby wtedy 30 μm , co odpowiada długości jednostek replikacyjnych zaobserwowanych przez Handa i Tamma [15].

BIAŁKA I PEPTYDY JAKO ELEMENT ŁĄCZĄCY PODJEDNOSTKI DNA

Model chromosomu, w którym cząsteczki DNA połączone były w różny sposób przez białka, był do niedawna bardzo popularny [8, 33]. Późniejsze obserwacje wskazujące, że enzymy proteolityczne nie powodują znacznej redukcji masy cząsteczkowej DNA wykluczyły jednak możliwość występowania dużych cząsteczek białkowych między podjednostkami DNA. Degradacja białka do pojedynczych aminokwasów wymaga jednak więcej niż jednego enzymu proteolitycznego [33], dlatego też hipoteza łączenia podjednostek DNA przez krótkie peptydy jest o wiele trudniejsza do odrzucenia. Badając kołowe (ring) chromosomy, Wolf i wsp. [33] zauważyli, że wzdłuż spolaryzowanego 3'-5' łańcucha DNA może występować jedno lub kilka „wygaszeń” polarność. Być może jest to spowodowane występowaniem dwupeptydu w centromerze [33]. Warto również wymienić prace, z których wynika możliwość łączenia podjednostek DNA poprzez białka z mostkami S-S. Andoh i Ide [1, 2] wykazali, że czynniki redukujące, takie jak merkaptotanol, powodują spadek współczynnika sedymentacji DNA — izolowanego z myszy — z 340 do 130S sugerując, że podjednostki DNA mogą być połączone wiązaniami S-S pochodzącymi z małych cząsteczek białka. Prawdopodobnie są to białka resztkowe połączone kowalencyjnie z podjednostkami DNA. Cząsteczki białka resztkowego łącząc się mostkami S-S utrzymywałyby ciągłość między podjednostkami DNA. Podobnie z badań Lange [23] wynika, że DNA w chromosomie ssaków składa się z podjednostek o masie cząsteczkowej około 8×10^8 daltonów połączonych białkami zawierającymi mostki S-S. Wiązania te są wrażliwe na działanie enzymów proteolitycznych, merkaptotanolu, wysokich wartości pH i niskich dawek promieniowania.

ZAKOŃCZENIE

Do badania rozmiarów cząsteczek DNA stosuje się najczęściej metody wirowania w gradiencie stężeń sacharozy, mikroskopii elektronowej i autoradiografii. Jednakże żadna z tych metod nie jest w pełni zadowalająca dla DNA eukariotów z powodu jego olbrzymich rozmiarów. Mimo

trudności we właściwej interpretacji wyników, najczęściej stosowaną do badania rozmiarów i pęknięć jednołańcuchowego DNA jest metoda wirowania w zasadowym gradiencie stężeń sacharozy. Metodą tą można wykryć wiązania labilne w alkaliach. Lett i wsp. [25], po lizie komórek w 0,25N NaOH, otrzymali po wirowaniu w zasadowym gradiencie stężeń sacharozy dla trzech rodzajów komórek podjednostki DNA ze współczynnikiem sedymentacji 165S (około $4,75 \times 10^8$ daltonów). Eksperyment ten był podstawą dla zaproponowania modelu DNA zbudowanego z tych podjednostek, połączonych miejscami wrażliwymi w alkaliach. Nie wyjaśnione pozostaje pytanie, czy w wysokich wartościach pH następuje liza labilnych w alkaliach miejsc naturalnie występujących, czy są to przypadkowe uszkodzenia. Problem ten jest skomplikowany, ponieważ ogromna ilość labilnych w alkaliach miejsc powstaje spontanicznie w cząsteczkach DNA. Lindahl i Nyberg [24] obserwowali gwałtowną depurację DNA w fizjologicznych warunkach (pH, temp.). W DNA komórki ssaków może powstać około 10^4 miejsc apurynowych w przeciągu 20 godzin. Mimo obecności wydajnych systemów reperacyjnych, niektóre z tych miejsc mogą pozostać i stanowić źródło pęknięć ujawniających się w alkaliach. Również połączenia, których występowanie między podjednostkami DNA postulują niektórzy autorzy, ulegałyby rozerwaniu w alkaliach.

Szczególnie interesujące wydają się być hipotezy zakładające łączenie podjednostek DNA przez lipoproteidy [4, 10, 11, 12, 27, 30, 31], ze względu na rolę jaką przypisuje się błonie jądrowej w replikacji DNA eukariotów [5, 6, 17, 29]. W świetle ostatnich badań wskazujących na możliwość kowalencyjnego wiązania rybonukleotydów z nowo zreplikowanym DNA (nascent DNA) [34, 35] równie ciekawa jest hipoteza Hoziera i Taylora [18], zakładająca możliwość łączenia podjednostek DNA przez krótkie odcinki rybonukleotydowe. Godny uwagi wydaje się również fakt, że w większości prac wielkości podjednostek DNA są rzędu $2 \times 10^8 - 6 \times 10^8$ daltonów. O ile większość autorów jest zgodna co do tego, że DNA w chromosomie (lub chromatynie) eukariotów występuje w postaci olbrzymich cząsteczek, których masa cząsteczkowa jest bliska całkowitej zawartości DNA w chromosomie [26], to mimo przedstawionych dowodów, sugerujących możliwość występowania swoistych podjednostek DNA, zagadnienie to pozostaje w dalszym ciągu dyskusyjne. Wiele niejasności powoduje brak określenia charakteru połączeń między „łącznikami” i podjednostkami DNA. Dlatego najbardziej słuszne wydają się hipotezy zakładające możliwość łączenia podjednostek DNA za pośrednictwem związków innego typu za pomocą wiązań chemicznych o charakterze kowalencyjnym, podobnie jak w modelu Hoziera – Taylora [18].

LITERATURA

- [1] ANDOH T., IDE T., A novel DNA - protein complex in cultured fibroblasts, strain L - P - 3, *Exptl. Cell Res.*, **73**: 122-128, 1972.
- [2] — Disulfide bridges in proteins linking DNA in cultured mouse fibroblastes strain L - P - 3, *Exptl. Cell Res.*, **74**: 525-531, 1972.
- [3] BEN - HUR E., ELKIND M. M., Thermally enhanced radioresponse of cultured Chinese hamster cells: Damage and repair of singlestranded DNA and DNA complex, *Rad. Res.*, **59**: 484-495, 1974.
- [4] BJELJAJEW S. D., STRAŻEWSKAJA N. B., KOŁOMIICJEWA I. K., STRUCZKOW W. A., KUZIN A. M., Lipidy w nadmolekularnym kompleksie DNK timusa i pieczeni kryś, *Dok. Akad. Nauk ZSRR*, **214**: 1189-1191, 1974.
- [5] CABRADILLA C. D., TOLIVER A. P., S - phase dependent forms of DNA nuclear membrane complexes in HeLa cells, *Biochim. Biophys. Acta*, **402**: 188-198, 1975.
- [6] CLAY W. F., KATTERMAN F. R. H., BARTELS P. G., Chromatin and DNA synthesis associated with nuclear membrane in germinating cotton, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **72**: 3134-3138, 1975.
- [7] COMINGS D. E., OKADA T. A., Association of chromatin fibers with the annuli of the nuclear membrane, *Exptl. Cell Res.*, **62**: 293-302, 1970.
- [8] DE D. N., A new chromosome model, *Nature*, **203**: 343-346, 1964.
- [9] Du PRAW E. J., The organization of nuclei and chromosomes in Honeybee embryonic cells, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **53**: 161-168, 1965.
- [10] ELKIND M. M., Sedimentation of DNA released from Chinese hamster, *Cells. Bioph. J.*, **11**: 502-520, 1971.
- [11] ELKIND M. M., CHIN - MEI, CHANG - LIU, Repair of a DNA complex from x - irradiated Chinese hamster cells, *Int. J. Rad. Biol.*, **22**: 75-90, 1972.
- [12] — Actinomycin D inhibition of a DNA complex from Chinese hamster cells, *Int. J. Rad. Biol.*, **22**: 313-324, 1972.
- [13] GROSS - BELLARD M., ONDET P., CHAMBON P., Isolation of high - molecular - weight DNA from mammalian cells, *Europ. J. Bioch.*, **36**: 32-38, 1973.
- [14] GROSSMAN L., WATSON R., VINOGRAD I., The presence of ribonucleotides in mature closed - circular mitochondrial DNA, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **70**: 3339-3343, 1973.
- [15] HAND R., TAMM I., Initiation of DNA replication in mammalian cells and its inhibition by reovirus infection, *J. Mol. Biol.*, **82**: 175-183, 1974.
- [16] HARRISSON C. M. H., The arrangement of chromatin in the interphase nucleus with reference to cell differentiation and repression in higher organisms, *Tissue Cell*, **3**: 523-550, 1971.
- [17] HILDEBRAND C. E., TOBEY R. A., Temporal organization of DNA in Chinese hamster cells: cell - cycle dependent association of DNA with membrane, *Biochim. Biophys. Acta*, **331**: 165-180, 1973.
- [18] HOZIER J. C., TAYLOR J. H., Length distributions of single - stranded DNA in Chinese hamster ovary cells, *J. Mol. Biol.*, **93**: 181-201, 1975.
- [19] HUBBERMAN J. A., RIGGS A. D., Autoradiography of chromosomal DNA fibers from Chinese hamster cells, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **55**: 599-606, 1966.
- [20] JACKSON V., EARHARDT J., CHALKLEY R., A DNA lipid protein containing material isolated from calf thymus nuclear chromatin, *Biochim. Biophys. Res. Comm.*, **33**: 253-259, 1968.

- [21] KAVENOFF R., ZIMM B. H., Chromosome - sized DNA - molecules from *Drosophila*, *Chromosoma*, **41**: 1-6, 1973.
- [22] KAVENOFF R., KLOTZ L., ZIMM B. H., On the nature of chromosomesized DNA molecules, *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.*, **38**: 1-8, 1974.
- [23] LANGE Ch. S., The organization and repair of mammalian DNA, *FEBS Lett.*, **44**: 153-156, 1974.
- [24] LINDAHL T., NYBERG B., Rate of depurination of native deoxyribonucleic acid, *Biochemistry*, **11**: 3610-3618, 1972.
- [25] LETT J. T., KLUCIS E. S., SUN C., On the size of the DNA in the mammalian chromosoma. Structural subunits, *Bioph. J.*, **10**: 277-291, 1970.
- [26] LUYKX P., General organization of DNA in chromosomes, [w] *The cell nucleus red.* Harris Bush, Academic Press, New York and London 1974, tom II, 165-175.
- [27] ORMEROD M. G., LEHMANN A. R., The release of high molecular weight DNA from a mammalian cell (L_{5178Y}) Attachment of the DNA to the nuclear membrane, *Biochim. Bioph. Acta*, **228**: 331-343, 1971.
- [28] SIMPSON J. R., NAGLE W. A., BICK M. D., BELLI J. A., Molecular nature of mammalian cell DNA in alkaline sucrose gradients, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **70**: 3339-3343, 1973.
- [29] SPARVOLI E., GALLI M. G., MOSCA A., PARIS G., Localization of DNA replicator sites near the nuclear membrane in plant cells, *Exptl. Cell Res.*, **97**: 74-82, 1976.
- [30] STRĄZEWSKAJA N. B., KRUGŁOWA N. L., STRUCZKOW W. A., KRASICZKOWA Z. I., KUZIN A. M., Struktura nadmolekularnych kompleksów DNK mljekopitajuszczich, *Dok. Akad. Nauk ZSRR*, **219**: 246-248, 1974.
- [31] STRASHEVSKAYA N. B., STRUCHKOV V. A., The effect of jonizing radiation on the structure subunits of supramolecular chromatin DNA, *Rad. Res.*, **59**: 210-1974.
- [32] TAYLOR J. H., MEGO W. A., EVENSON D. P., 1970, cyt. wg pozycji 18.
- [33] *The cell nucleus red.* Harris Bush, Academic Press New York and London 1974, tom I, 541-543.
- [34] TSENG B. V., GOULIAN M., Evidence for covalent association of RNA with nascent DNA in human lymphocytes, *J. Mol. Biol.*, **99**: 339-346, 1975.
- [35] WAQAR M. A., HUBERMAN J. A., Covalent linkage between RNA and nascent DNA in the slime mold *Physarium polycephalum*, *Biochim. Bioph. Acta*, **383**: 410-420, 1975.

Otrzymano: 20 marca 1976.

Przyjęto: 30 maja 1976.

Adres autorów: Banacha 12/16, 90-237 Łódź.

WEWNĄTRZKOMÓRKOWA REGULACJA METABOLIZMU CYTRYNIANU

Urszula RAFAŁOWSKA

Zespół Neurochemii Centrum Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej
Polskiej Akademii Nauk, Warszawa

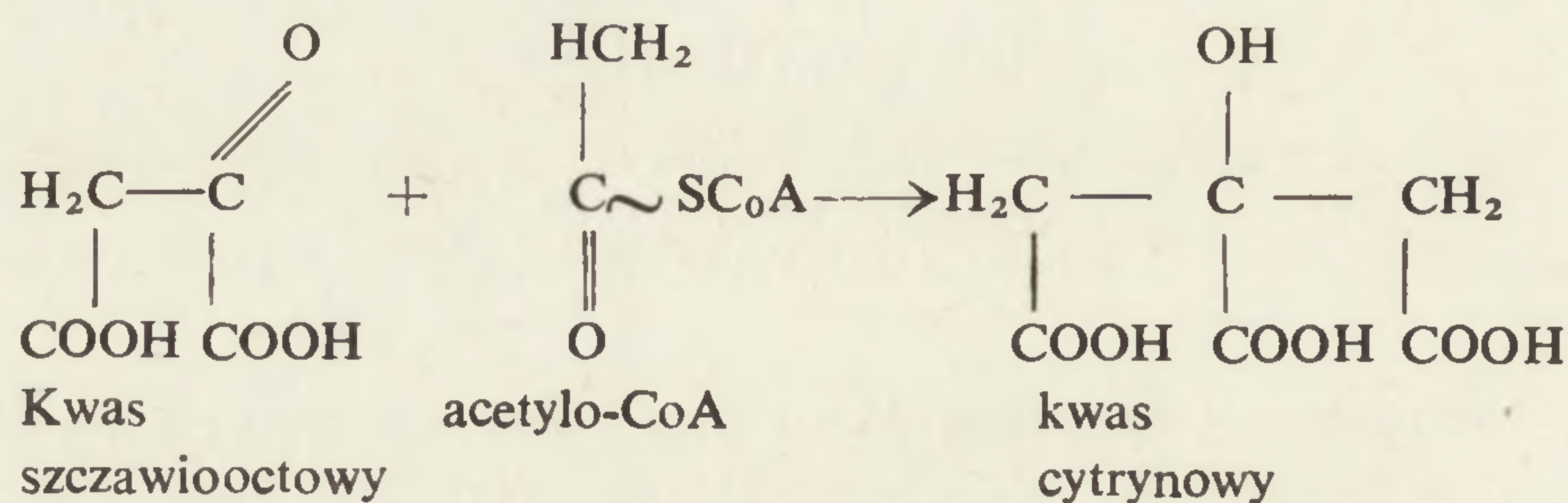
Streszczenie. Cytrynian zajmuje centralną pozycję w ogólnym metabolizmie komórki. W niniejszym opracowaniu omówione zostały podstawowe drogi syntezy i zużycia tego związku oraz mechanizmy wewnątrzkomórkowej regulacji zabezpieczające ciągłość przemian biochemicznych. Zwrócono również uwagę na współzależność w reakcjach zachodzących w subfrakcjach komórkowych oraz rolę transportu cytrynianu przez błony mitochondrialne.

Każda żywa, nie zmieniona chorobowo komórka, mimo zmiany warunków środowiska tak zewnątrz, jak i wewnątrzkomórkowego, posiada zdolność utrzymania ciągłości przemian biochemicznych. Zjawisko to jest możliwe jedynie dzięki istnieniu tzw. mechanizmów regulujących. Mogą one działać w różnorodny sposób: bądź poprzez regulację aktywności już istniejących enzymów, głównie na zasadzie sprzężenia zwrotnego [68], bądź poprzez regulację syntezy tych enzymów *de novo*. Bardzo często obydwie te mechanizmy, niezależnie od siebie, działają jednocześnie, co zapewnia prawidłową drogę przemian [63] i prowadzi do utrzymania właściwego kierunku reakcji metabolicznych. Regulacja szeregu procesów może zachodzić również poprzez inhibicję kompetycyjną enzymów, hamowanie reakcji przez jej produkty na zasadzie prawa działania mas bądź też np. wpływu zmian pH w komórce.

W niniejszym artykule omówiony zostanie metabolizm cytrynianu — jednego z podstawowych produktów przemian biochemicznych komórki z uwzględnieniem podstawowych mechanizmów regulujących — odpowiedzialnych za prawidłowy przebieg reakcji, w których ten związek uczestniczy.

SYNTEZA CYTRYNIANU W MITOCHONDRIACH

Wszelkie substancje pokarmowe: węglowodany, białka, tłuszcze, po kolejnych etapach degradacji zachodzących w organizmie, przekształcane są do acetylo-CoA często określanego jako aktywny kwas octowy. Związek ten w wyniku kondensacji aldolowej z kwasem szczawiooctowym wytwarza trójkarboksylowy kwas cytrynowy (schemat 1). Reakcja ta zachodzi w mitochondriach w obecności syntazy cytrynianowej (EC.4.1.3.7)



Schemat 1. Synteza kwasu cytrynowego

i jest pierwszą z szeregu reakcji wchodzących w skład cyklu cytrynowego zaproponowanego w 1937 r. przez Krebsa [30, 31]. Biologiczne znaczenie tego cyklu polega na umożliwieniu rozkładu cząsteczki acetylo-CoA do dwutlenku węgla i wody. Dwutlenek węgla powstaje w czasie dekarboksylacji kwasów organicznych, woda — w końcowym etapie reakcji, w których uczestniczy układ przenośników elektronów łańcucha oddechowego. Reakcje te sprzężone są z właściwą przemianą energetyczną (oksydacyjna fosforylacja), w wyniku której komórka uzyskuje energię zmagazynowaną w postaci ATP [28]. Zatem kwas cytrynowy, który występuje w komórce w formie anionu cytrynianowego, jako pierwszy produkt cyklu Krebsa odgrywa kluczową rolę w ostatecznym utlenianiu substancji pokarmowych, a szybkość, przy której operuje cykl kwasu cytrynowego, zależy w dużej mierze od syntezy tego związku w mitochondriach [3].

Syntaza cytrynianowa katalizująca reakcję syntezy cytrynianu jest obecna w mitochondriach wszystkich organizmów [40]. Wysoka aktywność tego enzymu ($V_{\max} = 100-200 \mu\text{mole/mg/min}$) pochodzącego z różnych źródeł (wątroba, serce, drożdże, bakterie, cytryna) jest silnie hamowana przez nukleotydy adeninowe [5, 26, 27, 29, 54, 55]. Inhibicja ta jest kompetycyjna w stosunku do acetylo-CoA, a w przypadku enzymu z wątroby szczura również do szczawiooctanu.

Z danych kinetycznych, opracowanych przez Shepherdę wg Garland [21], zestawionych w tabeli 1 wynika, że aktywność syntazy cytrynianowej otrzymanej z wątroby jest najbardziej hamowana przez ATP, podczas gdy ADP i AMP działają w mniejszym stopniu. Garland na pod-

TABELA 1. Kinetyczne własności syntezy cytrynianowej

Substraty	K _m	ATP _{Ki}	ADP _{Ki}	AMP _{Ki}
szczawiooctan	2,1 μM	1,1 mM	5,4 mM	12,0 mM
acetylo-CoA	16 μM	0,39 mM	0,81 mM	3,0 mM

stawie wyników badań, w których hamowano aktywność syntazy cytrynianowej w obecności różnych stężeń ATP, ADP, AMP z zachowaniem stałego stężenia całej puli nukleotydów ($\Sigma AXP = \text{constans}$), sugeruje, że na aktywność tego enzymu *in vivo* większy wpływ mają zmiany całkowitego stanu energetycznego komórki niż poszczególnych nukleotydów adeninowych [21]. Zwiększenie poziomu tych nukleotydów zmniejsza powinowactwo syntazy cytrynianowej do acetylo-CoA. Także wejście grup acetylowych do cyklu Krebsa może być regulowane odpowiednio do zapotrzebowania komórki na energię. Wiele danych doświadczalnych przemawia za tym, że inhibitorami syntazy cytrynianowej są długołańcuchowe estry acylo-CoA [36, 67, 71, 79] działające kompetycyjnie z acetylo-CoA.

Weitzman [70] oraz Harford i Weitzman [26] zaobserwowali, że u *Escherichia coli* i bakterii: *B. mageterium* i *P. aeruginosa* inhibitorem syntazy cytrynianowej jest również NADH.

W rozważaniach dotyczących syntezy cytrynianu w komórce nie wyklucza się możliwości powstawania cytrynianu pozamitochondrialnie na drodze karboksylacji α -ketoglutaranu powstałego z glutaminianu do izocytrynianu w obecności dehydrogenazy izocytrynianowej współdziałającej z NADP, a następnie izomeryzacji do cytrynianu [12]. Wydaje się jednak, że ilość α -ketoglutaranu powstającego pozamitochondrialnie na drodze transaminacji glutaminianu jest niewielka, ograniczona jedynie do puli metabolicznej aminokwasów będących prekursorami glutaminianu.

TRANSPORT CYTRYNIANU Z MITOCHONDRIÓW DO CYTOPLAZMY

Istnienie wewnątrzkomórkowych struktur i przestrzeni ograniczonych błonami, charakteryzujących się wyspecjalizowanymi funkcjami biochemicznymi, jest ważnym czynnikiem regulującym metabolizm komórki. W ustaleniu zależności metabolicznych między mitochondriami a cytoplazmą decydującą rolę odgrywają błony mitochondrialne. Jak wiadomo, zewnętrzna błona działa na zasadzie sita molekularnego, przepuszczając cząsteczki o masie do 5000 [43]. Wewnętrzna błona jest nie tylko nieprzepuszczalna dla związków wielkocząsteczkowych, ale wykazuje również znaczną nieprzepuszczalność dla wielu substancji niskocząsteczkowych. Jest ona np. nieprzepuszczalna dla pośredników cyklu

Krebsa, ogólniej zaś dla jonów kwasów dwu- i trójkarboksylowych [11]. Jest to uzasadnione z tego względu, że wszystkie enzymy cyklu Krebsa poza dehydrogenazą bursztynianową zlokalizowane są w mitochondrialnej matrix [18] i cały cykl zachodzi w przestrzeni ograniczonej błoną wewnętrzną.

Łatwa przepuszczalność błony umożliwiałaby wyciekanie pośredników cyklu Krebsa do cytoplazmy i w rezultacie powodowała zwolnienie lub całkowite zatrzymanie cyklu kwasu cytrynowego. Z drugiej strony, wiadomo jednak, że wymiana niektórych pośredników cyklu Krebsa między mitochondriami a cytoplazmą odgrywa bardzo ważną rolę w metabolizmie komórki. Tak np. transport powstałego w mitochondriach cytrynianu dostarcza materiału do przemian zachodzących w cytoplazmie, związanych z przemianami lipidów i węglowodanów, które zostaną omówione dokładniej w następnych rozdziałach.

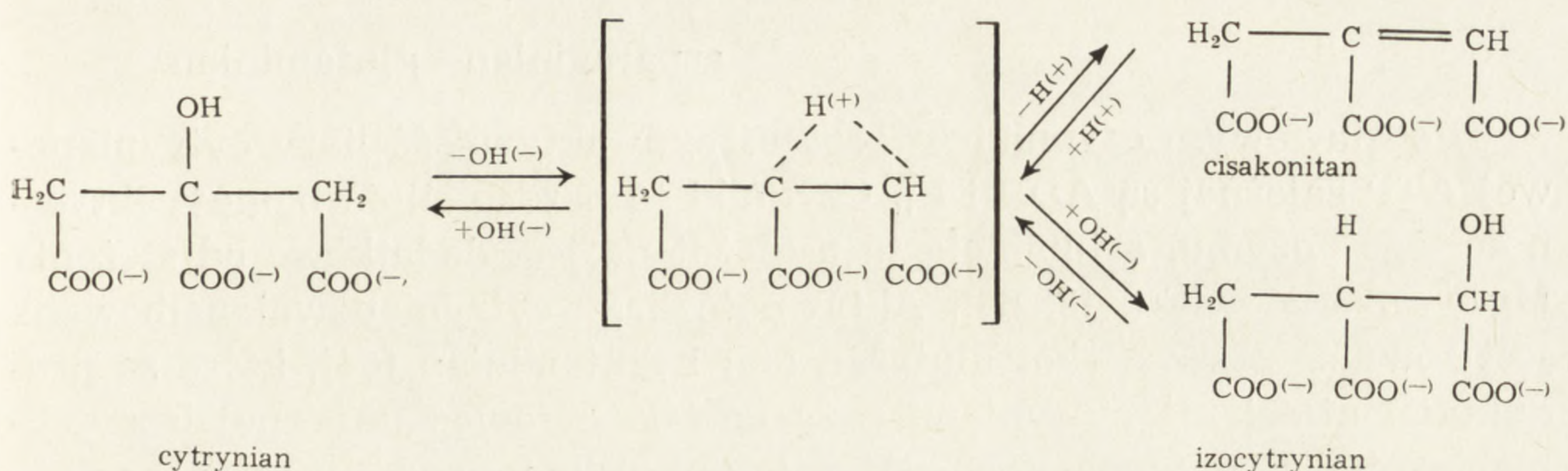
Wykazano, że transport cytrynianu zachodzi na drodze wymiany z kwasami dwukarboksyłowymi, np. z jabłkowym [14, 44], a regulowany jest przez acylo-CoA, co w konsekwencji ma duży wpływ regulujący na syntezę kwasów tłuszczowych i glukoneogenezę [23].

Z przejściem cytrynianu przez błonę mitochondrialną może łączyć się przenoszenie równoważników redukcyjnych z cytosolu do mitochondriów. Brunengaber i Lowenstein [9] zaproponowali mechanizm przeniesienia równoważników redukcyjnych z udziałem cytrynianu. Według tych autorów, cytrynian jest transportowany z mitochondriów do cytosolu i rozkładany w obecności ATP zależnej liazy cytrynianowej do acetylo-CoA i szczawiooctanu. Szczawiooctan przyjmuje wodór z cytoplazmatycznego NADH_2 i jako jabłczan wraca do mitochondriów na drodze wymiany z cytrynianem. Wewnątrz mitochondriów jabłczan jest utleniany do szczawiooctanu i przekształcany do cytrynianu po kondensacji z acetylo-CoA, a przeniesiony H_2 redukuje wewnątrzkomórkowy NAD. W ten sposób powstający w procesie cytoplazmatycznym NADH_2 może być utleniany przez łańcuch oddechowy mitochondriów, mimo niemożliwości przejścia całej cząsteczki tego związku przez błonę mitochondrialną [32-34].

ZUŻYCIE CYTRYNIANU W KOMÓRCE

Powstały w mitochondriach cytrynian może ulegać końcowemu utlenieniu w cyklu Krebsa i łańcuchu oddechowym, co łączy się z produkcją energii niezbędną dla funkcjonowania komórki. W utlenieniu cytrynianu w mitochondriach partycypują dwa enzymy: akonitaza i izocytrynianowa dehydrogenaza.

Akonitaza katalizuje przekształcenie cytrynianu do akonitanu i izocytrynianu (schemat 2). Związki te pozostają w równowadze i tak w $\text{pH} = 7,4$ w temperaturze 25°C występują one w ilościach: 90,9% cytrynian, 2,9% cisakonitan, 6,2% izocytrynian. Aktywność akonitazy,



Schemat 2. Izomeryzacja cytrynianu

której kofaktorem są jony Fe^{++} , jest silnie hamowana przez niskie stężenia jonów miedzi i rtęci oraz kompetycyjnie przez transakonitan. Powstały z cytrynianu izocytrynian w obecności izocytrynianowej dehydrogenazy związanej z NAD zostaje przekształcony do α -ketoglutaranu zgodnie z następującą reakcją:

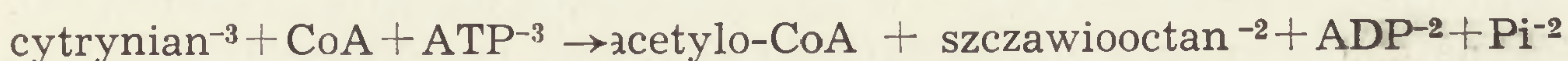


NADH utleniany jest w łańcuchu oddechowym mitochondriów. Reakcja przeprowadzana przez izocytrynianową dehydrogenazę NAD zależną jest bardzo czuła na metaboliczne systemy kontrolujące. Aktywność tego enzymu regulowana jest przez nukleotydy adeninowe i pirydynowe. Stymulowana jest przez AMP i NAD, a hamowana przez ATP i NADH. Istnieje zatem ścisły związek między zapotrzebowaniem komórki na energię i ostatecznym utlenianiem cytrynianu.

Izocytrynianowa dehydrogenaza występuje również w formie związanej z NADP. Jednak rola tego enzymu w mitochondriach i mechanizmy jego regulacji dotychczas nie są jeszcze dobrze poznane.

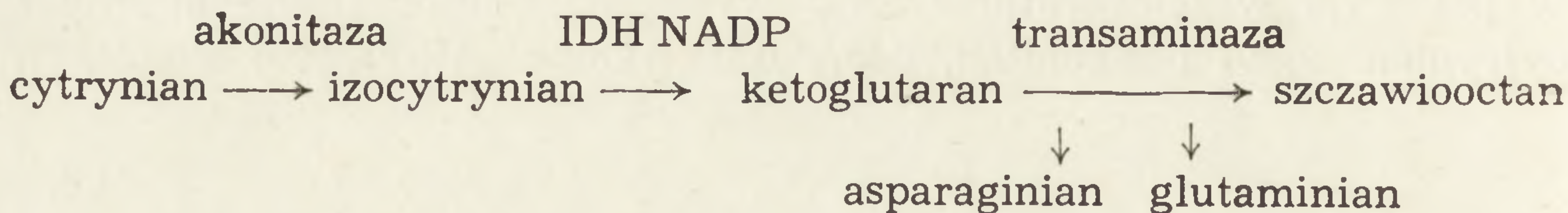
Cytrynian, który został przetransportowany z mitochondriów do cytoplazmy, podlega przemianom, w których wyniku powstaje acetylo-CoA i szczawiooctan. Przemiany te mogą zachodzić dwoma drogami:

1. W obecności liazy cytrynianowej ATP zależnej (EC. 4.1.3.8.) obecnej w cytoplazmie komórek zwierzęcych [62] zgodnie z następującą reakcją:



2. W wyniku sekwencji przemian katalizowanych przez akonitazę (EC. 4.2.1.3), izocytrynianową dehydrogenazę NADP zależną (EC. 1.1.1.42)

i asparaginianową transaminazę (EC. 2.6.1.1.) [24] według następującej reakcji:



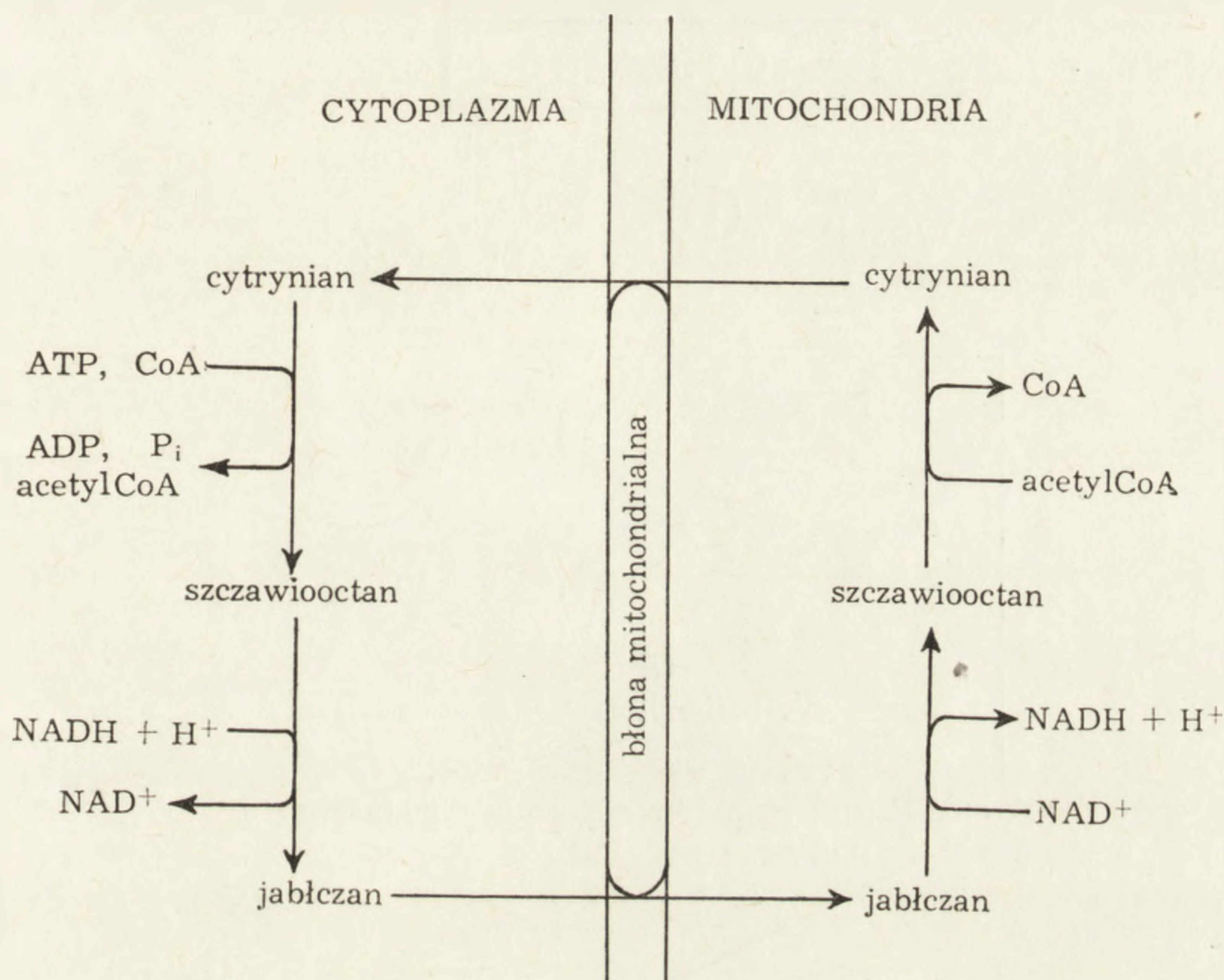
Podstawowym czynnikiem regulującym aktywność liazy cytrynianowej ATP zależnej są ADP i P_i . Czynniki te bardzo silnie hamują aktywność tego enzymu, a inhibicja ta uzależniona jest dodatkowo od stężenia Mg^{++} w środowisku [3, 65]. Aktywność liazy cytrynianowej hamowana jest również przez α -ketoglutaran [65] i glutaminian [64], które są produktami utleniania cytrynianu przy udziale cytoplazmatycznej izocytrynianowej dehydrogenazy NADP zależnej. Biorąc pod uwagę te zależności oraz fakt, że stężenia ATP aktywujące liazę cytrynianową hamują aktywność cytoplazmatycznej IDHNADP [45] można sądzić, że obydwie drogi utleniające cytrynian w cytoplazmie komórki są ze sobą ściśle związane i podlegają wzajemnej kontroli [47]. Może mieć to ogromne znaczenie w stanach patologicznych komórki (np. w czasie niedotlenienia komórek mózgu), kiedy mimo zmian w poziomach szeregu czynników regulujących aktywność badanych enzymów [16, 22] stężenie cytrynianu w cytoplazmie pozostaje niezmiennione [16, 46].

CYTRYNIAN JAKO PREKURSOR POZAMITOCHONDRIALNEGO ACETYLO - CoA

Acetylo-CoA powstający z cytrynianu jest podstawowym substratem dla syntezy kwasów tłuszczowych zachodzącej w cytoplazmie [60]. Istotnym elementem w regulacji i kontroli tej syntezy de novo jest transport metabolitów uczestniczących w biosyntezie kwasów tłuszczowych. Dotychczas postulowano kilka mechanizmów przenoszenia acetylo-CoA przez błony mitochondrialne. Początkowo sądzono, że związek ten może przechodzić na drodze dyfuzji bądź przenoszenia grup acetylowych (octanu). Obydwa te procesy wydają się jednak być za wolne w stosunku do szybkości syntezy lipidów w cytoplazmie [35].

Inny mechanizm zakłada, że transport acetylo-CoA odbywa się za pośrednictwem karnityny i enzymów z nią współdziałających [4, 7]. Przeważa jednak pogląd, że transport reszt acetylowych przy współudziale karnityny odbywa się raczej w kierunku do, a nie z mitochondrii [8]. Wiele danych przemawia za tym, że głównym, bezpośrednim prekursorem cytoplazmatycznego acetylo-CoA niezbędnego do syntezy kwasów tłuszczowych jest cytrynian [10, 35].

Badania Daikuhara i wsp. [13] wykazały, że ponad 80% pozamitochondrialnego acetylo-CoA wychodzi z mitochondriów za pośrednictwem cytrynianu, który w cytoplazmie ulega następnie rozczepieniu przez liazę cytrynianową ATP zależną. Na schemacie 3 przedstawiono cykl reakcji dostarczających cytoplazmatycznego acetylo-CoA kosztem mitochondrialnego cytrynianu. W tkance nerwowej acetylo-CoA powstający



Schemat 3. Transport cytrynianu przez błonę mitochondrialną

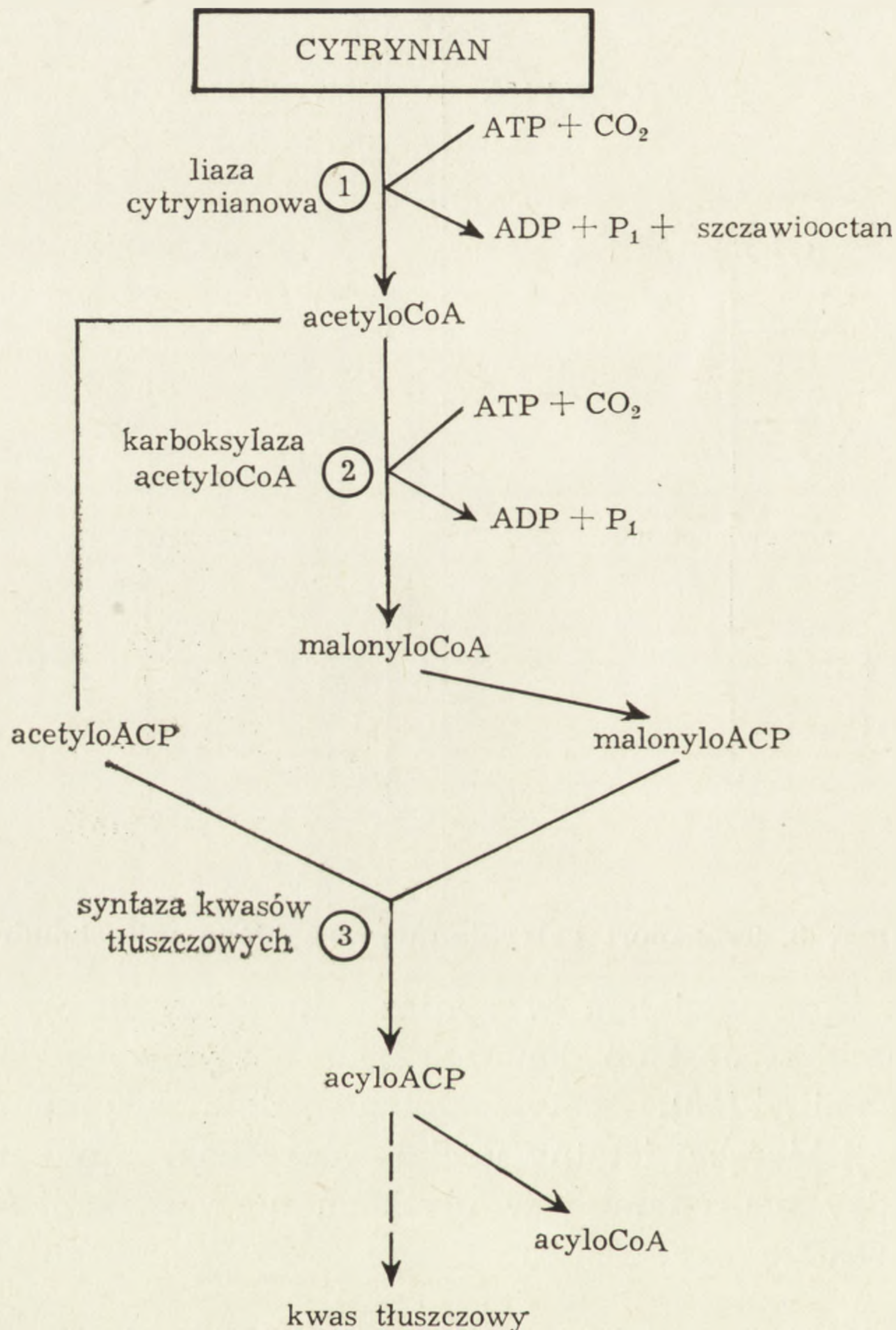
z cytrynianu poza udziałem w syntezie kwasów tłuszczowych spełnia dodatkową funkcję. Jest on donorem grup acetylowych do reakcji syntezy acetylocholino [58]. Acetylocholina spełnia rolę neurotransmitera, czyli substancji biorącej istotny udział w przekazywaniu impulsów nerwowych między neuronami i w płytkach nerwowo - mięśniowych. Zagadnienie to zostało szczegółowo opisane przez Wieraszko [73].

CYTRYNIAN A REGULACJA SYNTEZY KWASÓW TŁUSZCZOWYCH

Synteza kwasów tłuszczowych z cytrynianu zachodzi zgodnie z reakcjami przedstawionymi na schemacie 4 (Lowenstein [35]). Każdy etap w syntezie kwasów tłuszczowych podlega wielostronnej kontroli przez substraty i produkty reakcji, a także przez efektory działające wprost na enzym lub na reakcje odpowiedzialne za jego syntezę i degradację, względnie za proces transportu z miejsca ich wytwarzania do rejonu, w którym odbywa się synteza kwasów tłuszczowych. Regulacja aktywności pierwszego etapu syntezy kwasów tłuszczowych w przedstawionym

na schemacie 4 ciągu reakcji wiąże się z rolą liazy cytrynianowej i została omówiona w jednym z poprzednich rozdziałów.

W procesie regulacji syntezy kwasów tłuszczowych podnosi się rolę karboksylazy acetylo-CoA. Jest to enzym katalizujący reakcję przejścia acetylo-CoA do malonylo-CoA. Wielu autorów wykazało, że cytrynian jest dodatnim efektoorem regulującym aktywność tego enzymu [38, 59, 69].



Schemat 4. Biosynteza kwasów tłuszczowych. ACP acyloowy przenośnik białkowy

Aktywacja ta związana jest prawdopodobnie z tworzeniem się polimerów tego enzymu [39]. Zagadnienie to jest jednak bardziej skomplikowane w odniesieniu do warunków fizjologicznych. Wykazano bowiem, że karboksylaza acetylo-CoA osiąga połowę maksymalnej aktywności w obecności cytrynianu w stężeniach wyższych od 7 mM. Stężenie zaś tego związku mierzone w wątrobie wynosi zaledwie 0.3 μ mole/g świeżej tkanki [61]. Wydaje się, że regulacja aktywności karboksylazy acetylo-CoA poprzez

cytrynian może być uzależniona od intensywności transportu tego związku z mitochondriów do cytoplazmy, który jak już zaznaczono regulowany jest przez poziom acetylo-CoA. Godridge [23] zwraca uwagę na możliwość koordynowania kontroli syntezy kwasów tłuszczowych przez cytrynian i acylo-CoA zgodnie z następującym mechanizmem.

Acylo-CoA hamuje z jednej strony aktywność acetylo-CoA karboksylazy, a z drugiej — transport cytrynianu z mitochondriów do cytosolu, co w rezultacie obniża stężenie cytrynianu w tej frakcji i w konsekwencji obserwujemy zmniejszenie aktywności acetylo-CoA karboksylazy. Inhibicja acetylo-CoA karboksylazy, spowodowana spadkiem stężenia cytrynianu w cytosolu wywołanym wzrostem poziomu acylo-CoA, jest kompetycyjna w stosunku do inhibicji aktywności tego enzymu przez acylo-CoA.

Ponieważ inhibicja transportu cytrynianu prowadzi do mniejszej produkcji cytosolowego acetylo-CoA — substratu dla acetylo-CoA karboksylazy, małe zmiany w stężeniach acylo-CoA mogą dawać duże efekty w natężeniu syntezy kwasów tłuszczowych.

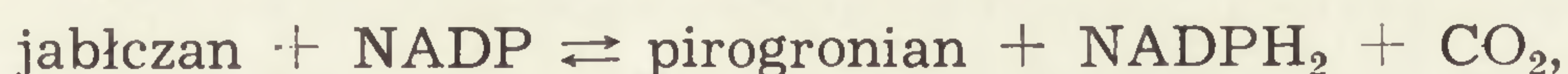
Poza omówioną regulacją syntezy kwasów tłuszczowych, zależną od stężenia cytrynianu, wytwarzanie tych związków kontrolowane jest również przez czynniki hormonalne odpowiedzialne za procesy syntezy i degradacji enzymów uczestniczących w omówionych reakcjach oraz czynniki związane z dietą zwierząt. Dieta wysokowęglowodanowa podwyższa znacznie aktywność liazy cytrynianowej ATP zależnej, czego nie obserwuje się przy diecie niskolipidowej [35, 37, 57].

METABOLIZM SZCZAWIOOCTANU POWSTAŁEGO Z CYTRYNIANU

Poza acetylo-CoA drugim produktem degradacji cytrynianu w cytoplazmie jest szczawiooctan, którego przemiany mogą przebiegać w kilku kierunkach [50, 51]. W obecności dehydrogenazy jabłczanowej i NADH_2 w cytoplazmie ulega on redukcji do jabłczanu zgodnie z reakcją:

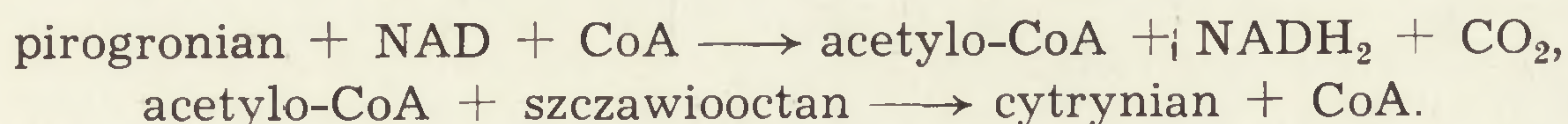


Jabłczan pod wpływem dehydrogenazy jabłczanowej dekarboksylującej i NADP wytwarza pirogronian i NADH_2 :



a powstały NADPH_2 wykorzystany jest jako źródło wodoru w syntezie kwasów tłuszczowych.

Wytworzony pirogronian może wchodzić do mitochondriów i podlegać kolejnym reakcjom prowadzącym do wytworzenia cytrynianu:



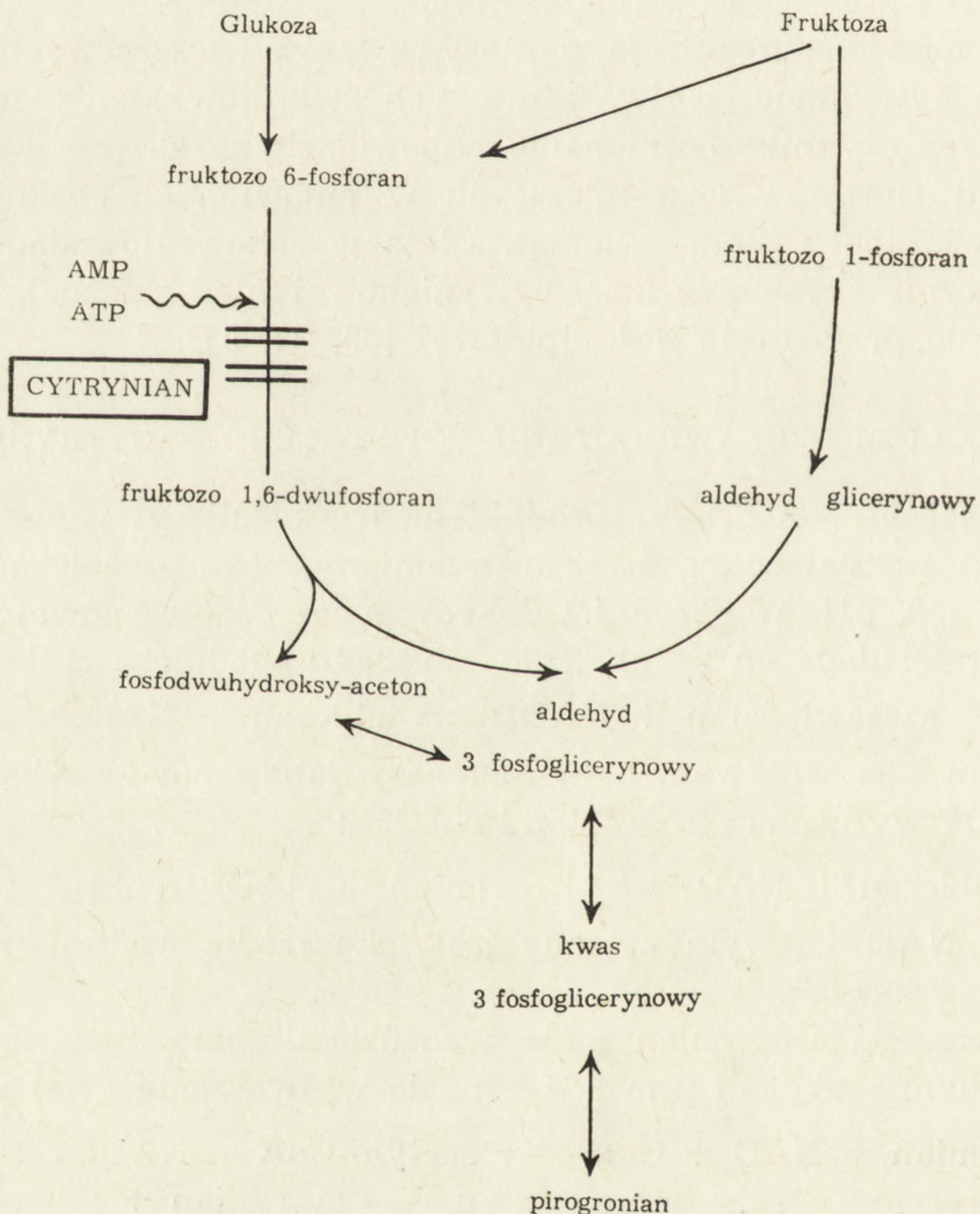
Powstały cytrynian może być utleniany w cyklu Krebsa bądź też

może przechodzić do cytoplazmy, gdzie podlega opisanym reakcjom degradacji z wytworzeniem acetylo-CoA i szczawiooctanu. Powstały ze szczawiooctanu pirogronian może również wchodzić w ciąg reakcji glikoneogenezy [25].

Należy również zwrócić uwagę na powiązanie zużycia szczawiooctanu — produktu utleniania cytrynianu — z metabolizmem aminokwasów. Związek ten może powstawać z α -ketoglutaranu otrzymanego z cytrynianu [24] bądź też może wytwarzać α -ketoglutaran w reakcji transaminacji w obecności asparaginianu i glutaminianu [12].

WPLYW CYTRYNIANU NA METABOLIZM WĘGLOWODANÓW

Metabolizm węglowodanów prowadzi do wytworzenia pirogronianu (schemat 5) [35], który może być transportowany do mitochondriów, przekształcany do cytrynianu via acetylo-CoA i utleniany w cyklu Krebsa.



Schemat 5. Przekształcenie glukozy i fruktozy do pirogronianu

W regulacji przemiany węglowodanów podstawową rolę odgrywa fosfofruktokinaza biorąca udział w przekształceniu fruktozo- 6 - fosforanu do fruktozo- 1,6 - dwufosforanu. Jest to enzym modulowany przez nukleotydy adeninowe (AMP podnosi, a ATP obniża jego aktywność) oraz przez cytrynian, który jest silnym inhibitorem fosfofruktokinazy, co zostało zaobserwowane w przypadku enzymu pochodzącego z różnych tkanek zwierzęcych [20, 41, 42], drożdży [48, 53] i marchwi [15]. Droga glikolityczna jest podstawowym źródłem pirogronianu i acetylo-CoA będącego z kolei substratem dla syntezy cytrynianu, który jest negatywnym efektem fosfofruktokinazy kluczowego enzymu glikolizy. Efekt ten jest analogiczny do klasycznego negatywnego sprzężenia zwrotnego, inhibicji metabolicznej drogi biosyntezy przez produkt [3].

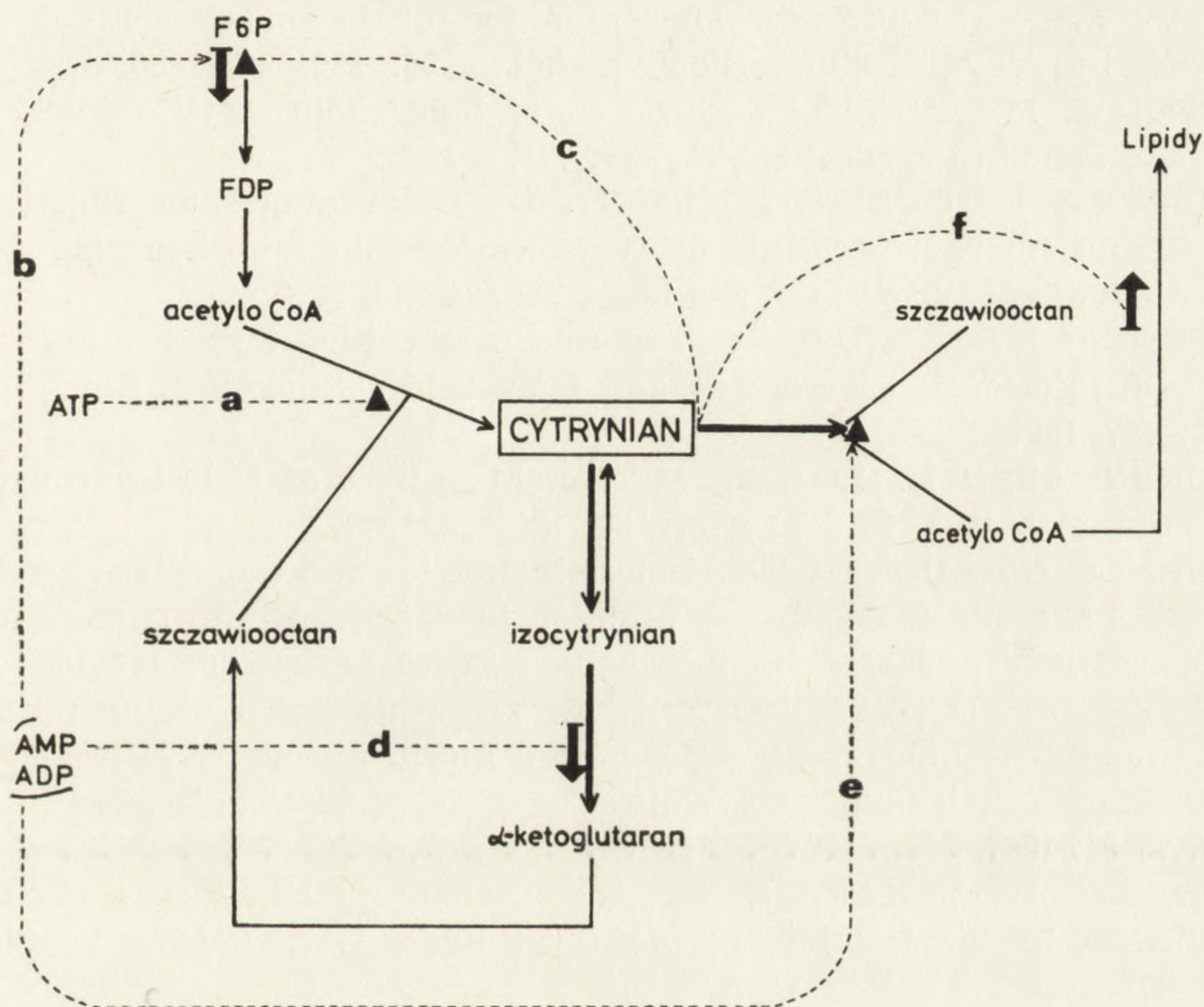
PODSTAWOWE WSPÓLZALEŻNOŚCI W REGULACJI SYNTEZY I ZUŻYCIA CYTRYNIANU — METABOLITU ŁĄCZĄCEGO PRZEMIANY WĘGLOWODANÓW, LIPIDÓW I BIAŁEK

Na schemacie 6 pokazano główne szlaki metaboliczne cytrynianu zajmującego centralne miejsce w ogólnym metabolizmie komórki. Krebs i Lowenstein (wg Lowensteina [35]) stwierdzili, że $\frac{2}{3}$ węglowodanów, całość tłuszczów i około połowy aminokwasów dostarczanych z pokarmem przekształcana jest do wspólnej jednostki metabolicznej — acetylo-CoA. Jak wynika z poprzednich rozdziałów, metabolizm tego związku jest nierozdzielnie związany z przemianami cytrynianu. Acetylo-CoA jest substratem dla syntezy cytrynianu, który następnie umożliwia mu końcowe utlenienie w wyniku wejścia do cyklu Krebsa. Po przejściu przez błonę mitochondrialną do cytoplazmy cytrynian dostarcza substratów do syntezy kwasów tłuszczowych (acetylo-CoA) oraz przemian aminokwasów i węglowodanów (szczawiooctan, α - ketoglutaran).

Podstawowe drogi regulacji syntezy i zużycia cytrynianu opisano w poprzednich rozdziałach. W komórce obydwie te procesy zachodzą jednocześnie, a stan dynamicznej równowagi między wytwarzaniem i zużyciem cytrynianu utrzymywany jest dzięki wzajemnym oddziaływaniom czynników regulujących obydwie te procesy. Przesunięcie równowagi w stronę syntezy czy zużycia cytrynianu, spowodowane czynnikami patologicznymi, fizjologicznymi czy zmianą diety, wywołuje wzrost lub spadek stężenia tego związku w komórce, co z kolei wpływa na intensywność szeregu reakcji, dla których czynnikiem regulującym jest sam cytrynian.

Główne drogi współdziałania regulacji związanej z syntezą i ze zużyciem cytrynianu w komórce przedstawiono na schemacie 7. Miejsca oznaczone literami *a*, *b*, *c* dotyczą regulacji syntezy cytrynianu. Reakcja

dehydrogenazy NAD zależnej (d), natomiast ADP jest negatywnym efektem dla liazy cytrynianowej ATP zależnej (e). Zatem obydwie drogi (d) i (e) uzależnione od stężeń poszczególnych nukleotydów adeninowych. Współdziałanie tych dwu dróg regulacji odpowiedzialne jest za rozdzielenie cytrynianu na dwie pule. Jedną, podlegającą utlenianiu w cyklu Krebsa w obecności IDH NAD, (w rezultacie czego regeneruje się ATP) i drugą, będącą materiałem wyjściowym do syntez i produkcji materiałów budulcowych komórki (co wiąże się ze zużyciem ATP). Dodatkowo sam cytrynian jest pozytywnym efektem dla karboksylazy acetylo-CoA (f), która katalizuje produkcję kwasów tłuszczowych.



Schemat 7. Współzależność regulacji syntezy i zużycia cytrynianu

Miejsce działania negatywnego efektora zaznaczono trójkątem. Strzałka wskazuje miejsce działania efektora pozytywnego

Omówiony schemat zaproponowany przez Atkinsona [2] nie obejmuje wszystkich możliwości regulacji przemian cytrynianu. W poprzednich rozdziałach zaznaczono rolę NADH i długołańcuchowych kwasów tłuszczowych w regulacji metabolicznej cytrynianu. Atkinson [2] zwraca także uwagę na rolę pH we wpływie ATP na syntazę cytrynianową. Zaobserwowano również, że cytrynian jest inhibitorem dehydrogenazy pirogrońowej i α -ketoglutarowej [56].

Ścisłe powiązanie regulacji metabolizmu cytrynianu z przemianami nukleotydów adeninowych, glikolizą, cyklem Krebsa oraz reakcjami syntez stawia ten związek w centralnej pozycji ogólnego metabolizmu komórki.

LITERATURA

- [1] ATKINSON D. E., Biological feedback control at the molecular level, *Science*, **150**: 851-857, 1965.
- [2] — Citrate and the citrate cycle in the regulation of energy metabolism, [w] *Metabolic Roles of Citrate*, Biochemical Society, Symposium No 27, red. T. W. Goodwin, Academic Press, London and New York 1968, 23-39.
- [3] — The control of citrate synthesis and breakdown, [w] *Citric Acid Cycle Control and Compartmentation*, red. J. M. Lowenstein, Marcel Dekker, New York and London 1969, 137-161.
- [4] BEENAKKERS A. M. T., HENDERSEN P. T., The localization and function of carnitine acetyltransferase in the flight muscles of the locust, *European J. Biochem.*, **1**: 187-192, 1967.
- [5] BOGIN E., WALLACE A., The inhibition of lemon citrate — condensing enzyme by ATP, *Biochim. Biophys. Acta*, **128**: 190-192, 1966.
- [6] BORTZ W. M., LYNEN F., Elevation of long chain AcylCoA derivatives in livers of fasted rats, *Biochem. Z.*, **339**: 77-82, 1963.
- [7] BRDICZKA D., GUBITZ K., PETTE D., Localization and function of external and internal carnitine acetyltransferases in mitochondria of rat liver and pig kidney, *European J. Biochem.*, **11**: 234-240, 1969.
- [8] BRESSLER R., BRENDK R., The role of carnitine and carnitine acyltransferase in biological acetylations and fatty acid synthesis, *J. Biol. Chem.*, **241**: 4092-4097, 1966.
- [9] BRUNENGABER H., LOWENSTEIN J. M., Effect of (—)-Hydroxycitrate on ethanol metabolism, *FEBS Letters*, **36**: 130-132, 1973.
- [10] BRUNNER G., BUCHER Th., Determination of the quantitative relationship of outer and inner membrane proteins in rat liver mitochondria by means of enzymology and electron microscopy, *FEBS Letters*, **6**: 105-108, 1970.
- [11] CHAPPELL J. B., HAARHOFF K. N., The penetration of the mitochondrial membrane by anions and cations, [w] *Biochemistry of Mitochondria*, red. E. C. Slater, Z. Kaniuga, L. Wojtczak, PWN Warszawa Acad. Press London 1967, 75-91, 1967.
- [12] D'ADAMO A. F., HAFT D. E., An alternate pathway of α -ketoglutarate catabolism in the isolated, perfused rat liver, *J. Biol. Chem.*, **240**: 613-617, 1965.
- [13] DAIKUHARA Y., TSUNEMI T., TAKEDA Y., The role of ATP citrate lyase in the transfer of Acetyl groups in rat liver, *Biochim. Biophys. Acta*, **158**: 51-61, 1968.
- [14] DeHAAN E. J., TAGER J. M., Evidence for a permeability barrier for α -oxoglutarate in rat-liver mitochondria, *Biochim. Biophys. Acta* **153**: 98-112, 1968.
- [15] DENNIS D. T., COULTATE T. P., Phosphofructokinase, a regulatory enzyme in plants, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **25**: 187-191, 1966.
- [16] DUFFY T. E., NELSON S. R., LOWRY O. H., Cerebral carbohydrate metabolism during acute hypoxia and recovery, *J. Neurochem.*, **19**: 959-977, 1972.
- [17] EGER - NEUFELDT I., TEINZER A., WEISS I., WIELAND O., Inhibition of glucose - 6 - phosphate dehydrogenase by long chain Acyl-Coenzyme A., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **19**: 43-48, 1965.
- [18] ERNSTER L., KNYLENSTIERN B., Structure, composition and function of mitochondrial membranes, [w] *Mitochondria - Structure and Function*, red. L. Ernster, Z. Drahota, Acad. Press, London, New York 1969, 5-31.

- [19] ESTABROOK R. W., SACKTOR B., α -glycerophosphate oxidase of flight muscle mitochondria, *J. Biol. Chem.*, **233**: 1014-1019, 1958.
- [20] GARLAND P. B., RANDLE P. J., NEWSHOLME E. A., Citrate as an intermediary in the inhibition of phosphofructokinase in rat heart muscle by fatty acids, ketone bodies, pyruvate, diabetes and starvation, *Nature*, **200**: 169-170, 1963.
- [21] GARLAND P. B., Control of citrate synthesis in mitochondria, [w] *The Metabolic Roles of Citrate*, Biochemical Society Symposium No 27, red. T. W. Goodwin, Academic Press, London and New York 1968, 41-60.
- [22] GATFIELD P. D., LOWRY O. H., SCHULZ D., PASSONNEAU J. V., Regional energy reserves in mouse brain and changes with ischemia and anesthesia, *J. Neurochem.*, **13**: 185-195, 1966.
- [23] GOODRIDGE A. G., Regulation of fatty acid synthesis in isolated hepatocytes, *J. Biol. Chem.*, **248**: 4318-4326, 1973.
- [24] GROMEK A., RAFAŁOWSKA U., Citrate oxidation in the cytoplasmic fraction of rat brain, *J. Neurochem.*, **19**: 2687-2695, 1972.
- [25] GUMIŃSKA M., Regulacja glikolitycznej drogi wytwarzania energii, [w] *Symposium Utlenianie Biologiczne, Monografie Biochemiczne*, **24**: 47-69, 1971.
- [26] HARFORD S., WEITZMAN P. D. J., Evidence for isosteric and allosteric nucleotide inhibition of citrate synthase from multiple-inhibition studies, *Biochem. J.*, **151**: 455-458, 1975.
- [27] HATHAWAY I. A., ATKINSON D. E., Kinetics of regulatory enzymes: Effect of adenosine triphosphate on yeast citrate synthase, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **20**: 661-665, 1965.
- [28] KARLSON P., Utlenianie biologiczne, [w] *Zarys Biochemii PWN*, 236-259, 1971.
- [29] KOSICKI G. W., LEE L. P. K., Effect of divalent metal ions on Nucleotide inhibition of pig heart citrate synthase, *J. Biol. Chem.*, **241**: 3571-3574, 1966.
- [30] KREBS H. A., JOHNSON W. A., The role of citric acid in intermediate metabolism in animal tissues, *Enzymologia*, **4**: 148-155, 1937.
- [31] KREBS H. A., The intermediary stages in the biological oxidation of carbohydrate, *Advan. Enzymol.*, **3**: 191-252, 1943.
- [32] — Mitochondrial generation of reducing power, [w] *Biochemistry of Mitochondria*, red. E. C. Slater, Z. Kaniuga, L. Wojtczak, PWN Warszawa, Acad. Press, London 1967, 105-113.
- [33] LEHNINGER A. L., Phosphorylation coupled to oxidation of dihydrodiphosphopyridine nucleotide, *J. Biol. Chem.*, **190**: 345-359, 1951.
- [34] LEHNINGER A. L., SUDDUTH H. C., WIRE I. B., D-hydroxybutyric dehydrogenase of mitochondria, *J. Biol. Chem.*, **235**: 2450-2475, 1960.
- [35] LOWENSTEIN J. M., Citrate and the conversion of carbohydrate into fat, [w] *The Metabolic Roles of Citrate* Biochemical Society Symposium No 27, red. T. W. Goodwin, Acad. Press London and New York 1968, 61-86.
- [36] LYNEN F., MATSUHASHI M., NUMA S., SCHWEIZER E., The cellular control of fatty acid synthesis at the enzymatic level, *Biochem. Soc. Symp.*, **24**: 43-56, 1963.
- [37] MAJERUS P. W., KILBURN E., Acetyl Coenzyme A carboxylase, *J. Biol. Chem.*, **244**: 6254-6262, 1969.
- [38] MATSUHASHI M., MATSUHASHI S., LYNEN F., Zur Biosynthese der Fettsäuren. V. Die Acetyl-CoA Carboxylase aus Rattenleber und ihre Aktivierung durch Citronensäure, *Biochem. Z.*, **340**: 263-289, 1964.

- [39] MOSS J., JAMAGISHI M., KLEINSCHMIDT A. H., LANE M. D., Acetyl coenzyme A carboxylase. Purification and properties of the bovine adipose tissue enzyme, *Biochemistry*, **11**: 3779-3786, 1972.
- [40] OCHOA S., STERN I. R., SCHNEIDER M. C., Enzymatic synthesis of citric acid, *J. Biol. Chem.*, **193**: 691-702, 1951.
- [41] PARMEGGIANI A., BOWMAN R. H., Regulation of phosphofructokinase activity by citrate in normal and diabetic muscle, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **12**: 268-273, 1963.
- [42] PASSONNEAU J. V., LOVRY O. H., P-Fructokinase and the control of the citric acid cycle, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **13**: 372-379, 1963.
- [43] PFAFF E., KLINGENBERG M., RITT E., VOGELL W., Korrelation des un-spezifisch permeablen mitochondrialen Raumes mit dem „Inter-membran-Raum“, *European. J. Biochem.*, **5**: 222-232, 1968.
- [44] QUAGLIARIELLO E., PAPA S., MEIJER A. J., TAGER J. M., Substrate transport in mitochondria and control of metabolism, [w] *Mitochondria — Structure and Function*, red. L. Ernster, Z. Drahota, Academic Press, London, New York 1969, 335-346.
- [45] RAFAŁOWSKA U., PASTUSZKO A., GROMEK A., The effect of pyridine nucleotides on the activity of NADP-dependent isocitrate dehydrogenase from brain cytosol, *FEBS Letters*, **42**: 20-22, 1974.
- [46] RAFAŁOWSKA U., ERECINSKA M., CHANCE B., The effect of aspartate on citrate metabolism in the cytosolic fraction of brain under conditions of normoxia, hypoxia and anaesthesia, *J. Neurochem.*, **25**: 497-501, 1975.
- [47] RAFAŁOWSKA U., KSIEŻAK H., Subcellular distrybution of enzymes oxidizing of citrate in rats brain, *J. Neurochem.*, **27**: 813-815, 1976.
- [48] RAMAIAH A., HATHAWAY J. A., ATKINSON D. E., Adenylate as a metabolic regulator — effect on yeast phosphofructokinase kinetics, *J. Biol. Chem.*, **239**: 3619-3622, 1964.
- [49] ROBINSON I. D., BRADY R. O., BRADLEY R. M., Biosynthesis of fatty acids. IV. Studies with inhibitors, *J. Lipid. Res.*, **4**: 144-150, 1963.
- [50] ROGNSTAD R., KATZ J., Acetyl group transfer in lipogenesis. II. Fatty acid synthesis from intra and extramitochondrial Acetyl colt, *Arch. Biochem. Biophys.*, **127**: 437-439, 1968.
- [51] ROGNSTAD R., The pyruvate cycle in adipose tissue, *Arch. Biochem. Biophys.*, **129**: 13, 1969.
- [52] SACTOR B., DICK A. R., Oxidation of extramitochondrial diphosphopyridine nucleotide by various tissues of the mouse, *Science*, **145**: 606-607, 1964.
- [53] SALAS M. L., VINUELA E., SALAS M., SOLS A., Citrate inhibition of phosphofructokinase and the Pasteur effect, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **19**: 371-376, 1965.
- [54] SHEPHARD D., GARLAND P. B., ATP controlled acetoacetate and citrate synthesis by rat liver mitochondria oxidising palmitoylcarnitine, and the inhibition of citrate synthase by ATP, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **22**: 89-93, 1966.
- [55] SHEPHARD D., GARLAND P. B., The kinetic properties of citrate synthase from rat liver mitochondria, *Biochem. J.*, **114**: 597-610, 1969.
- [56] SILBERT C. K., MARTIN D. B., Inhibition by citrate of pyruvate dehydrogenase in rat liver mitochondria, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **31**: 818-824, 1968.

- [57] SMITH S., ABRAHAM S., Fatty acid synthesis in developing mouse liver, *Arch. Biochem. Biochys.*, **136**: 112-121, 1970.
- [58] SÖRBO B., On the origin of the acetyl group of acetylcholine, [w] *Drugs and cholinergic mechanisms in the CNS*, red. E. Heilbrunn and A. Winter, 133-141, 1970.
- [59] SPENCER A. F., LOWENSTEIN J. M., The supply of precursors for the synthesis of fatty acids, *J. Biol. Chem.*, **237**: 3640-3648, 1962.
- [60] SPENCER A., CORMAN L., LOWENSTEIN J. M., Citrate and the conversion of carbohydrate into fat. A comparison of citrate and acetate incorporation into fatty acids, *Biochem. J.*, **93**: 378-388, 1964.
- [61] SPENCER A. F., LOWENSTEIN J. M., Citrate content of liver and kidney of rat in various metabolic states and in fluoroacetate poisoning, *Biochem. J.*, **103**: 342-348, 1967.
- [62] SRERE P. A., Studies on purified citrate -- enzymes metabolic interpretations, [w] *The Metabolic Roles of Citrate*, Biochemical Society, Symposium No 27, red. T. W. Goodwin, Academic Press, London and New York 1968, 11-21.
- [63] STADTMAN E. R., Allosteric regulation of enzyme activity, *Advan. Enzymol.*, **28**: 41-154, 1966.
- [64] SZUTOWICZ A., STEPIEŃ M., ANGIELSKI S., The inhibition of rat brain ATP: citrate oxaloacetate - lyase by α - glutamate, *J. Neurochem.*, **22**: 85-91, 1974.
- [65] SZUTOWICZ A., STEPIEŃ M., ŁYSIAK W., ANGIELSKI S., Purification and kinetic properties of ATP: citrate oxaloacetate lyase from rat brain, *J. Neurochem.*, **25**: 11-20, 1975.
- [66] TAHETA K., POGELL B. M., The effect of palmityl coenzyme A on glucose 6 - phosphate dehydrogenase and other enzymes, *J. Biol. Chem.*, **241**: 720-726, 1966.
- [67] TUBS P. K., Inhibition of citrate formation by long - chain acyl thioesters of coenzyme A as a possible control mechanism in fatty acid biosynthesis, *Biochim. Biophys. Acta*, **70**: 608-609, 1963.
- [68] UMBARGER H. E., Intracellular regulatory mechanisms, *Science*, **145**: 674-679, 1964.
- [69] WAITE M., WAKIL S. J., Studies on the mechanism of fatty acid synthesis. XII. Acetyl coenzyme A carboxylase, *J. Biol. Chem.*, **237**: 2750-2757, 1962.
- [70] WEITZMAN P. B. J., Regulation of citrate synthase activity in *Escherichia coli*, *Biochim. Biophys. Acta*, **128**: 213-215, 1966.
- [71] WIELAND O., WEISS L., Inhibition of citrate - synthase by palmityl - coenzyme A, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **13**: 26-31, 1963.
- [72] WIELAND O., WEISS L., EGER - NEUFELDT I., Hemmung der enzymatischen Citronensäuresynthese durch langkettige Acyl - Thioester des Coenzym A, *Biochem. Z.*, **339**: 501-513, 1964.
- [73] WIERASZKO A., Regulacja biosyntezy acetylcholiny, *Postępy Biochem.*, **21**: 57-73, 1975.

Otrzymano: 2 lutego 1976.

Przyjęto: 10 czerwca 1976.

Adres autora: ul. Dworkowa 3, 00 - 784 Warszawa.

Faint, illegible text, possibly bleed-through from the reverse side of the page.

TYLAKOIDY SINIC

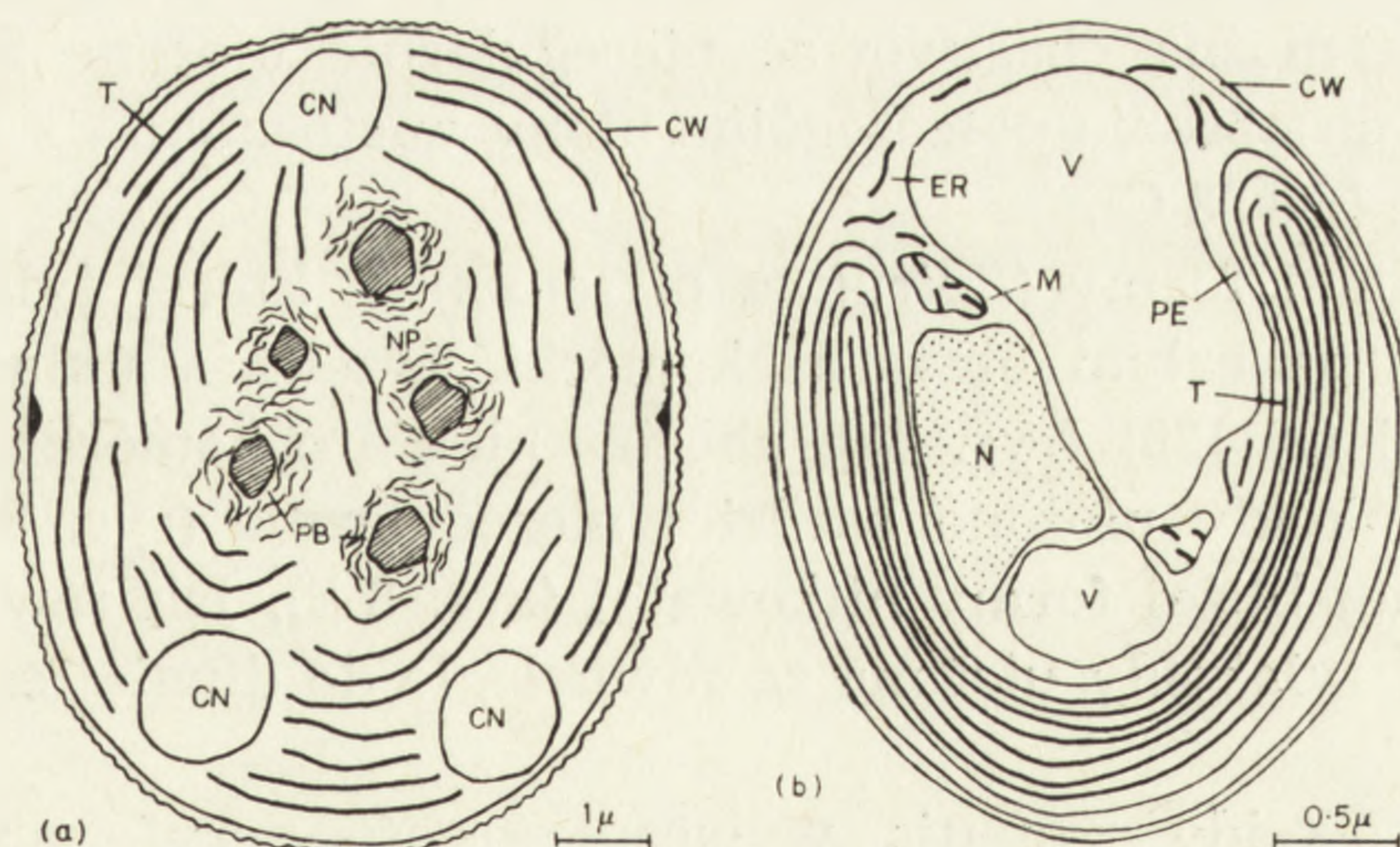
Adam WOŹNY i Fortunat MŁODZIANOWSKI

Zakład Botaniki Ogólnej Instytutu Biologii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza
w Poznaniu

Streszczenie. Scharakteryzowano ogólną budowę komórek sinic i opisano układy tylakoidów oraz ich substrukturę i funkcje, a także zależności między układem tylakoidów a czynnikami środowiska. Wykazano również, że pewne cechy związane z tylakoidami mogą być wykorzystane w taksonomii, jednak przy zachowaniu ostrożności w interpretowaniu obrazów mikroskopowych.

OGÓLNY PLAN BUDOWY SINIC

Sinice jako organizmy prokariotyczne są z reguły znacznie mniejsze i morfologicznie prostsze niż większość eukariotów. Komórki ich pozbawione są nie tylko wyodrębnionego jądra komórkowego, ale także plastydów, mitochondriów i siateczki śródplazmatycznej, które to organelle są obecne nawet w najprostszym organizmie eukariotycznym jaki dotychczas opisano, a mianowicie u przedstawiciela *Rhodophyta* — *Cyanidium caldarium*. Plan budowy tego organizmu zestawiono dla porównania z planem budowy sinicy z rodzaju *Gloeocapsa* (rys. 1) [50, 64]. Duże,



Rys. 1. Rysunki schematyczne: a — komórki *Gloeocapsa* sp. (*Cyanophyta*) i b — komórki *Cyanidium caldarium* (*Rhodophyta*).

CN — granule cyanoficyny, CW — ściana komórkowa, ER — siateczka śródplazmatyczna, M — mitochondria, N — jądro komórkowe, NP — nukleoplazma, PB — ciała wielokątne, PE — otoczka plastydowa, T — tylakoidy, V — wakuole [3]

otoczone błoną wakuole widoczne w większości komórek roślinnych, nie występują u sinic. Poza tym, cytoplazma komórek sinic charakteryzuje się dużą lepkością i brakiem prądów cytoplazmatycznych oraz ruchów Browna. Wszystkie natomiast sinice mają bardziej lub mniej skomplikowane wewnątrzkomórkowe systemy błon, będące funkcjonalnym odpowiednikiem organelli w komórce eukariotycznej. Ich układ i struktura zależą od gatunku, typu komórki i warunków fizjologicznych. Podstawowymi strukturami błoniastymi u sinic są wolne tylakoidy. Tylakoidami (thylakoides, gr. — workowaty) zostały nazwane u roślin spłaszczone pęcherzyki zawierające w błonach określone barwniki współuczestniczące w fotosyntezie [49].

UKŁAD TYLAKOIDÓW W KOMÓRKACH

W komórkach sinic tylakoidy występują najczęściej w różnych ich regionach, jednak z wyraźną tendencją do koncentrowania się w strefie peryferycznej. Układ taki m. in. występuje u różnych gatunków *Anabaena* i *Nostoc*, np. *A. azollae* [26, 41] (rys. 8 H) i *N. sphaericum* [8]. Tylakoidy mogą również zajmować wyłącznie część peryferyczną komórki, jak np. u *Anacystis nidulans* [1] (rys. 2) lub też są rozrzucone w całej komórce, jak np. w komórkach regionów merystematycznych *Gloetrichia* [52] czy w rosnących w ciemności komórkach *Chlorogloea fritschii* [60] i *Calothrix brevissima* (rys. 8 B).

W przypadku występowania tylakoidów na obszarze całej komórki, pewne z nich, ułożone peryferycznie, mogą przebiegać równolegle do obwodu komórki, a tylakoidy zajmujące centralną część komórki ułożone są nieregularnie (rys. 8 H). W komórkach niektórych sinic na całym ich przekroju można obserwować nieregularnie ułożone zwoje tylakoidów, w których obrębie poszczególne błony w stosunku do siebie ułożone są równolegle (rys. 8 C).

U kolonijnej formy (*Spirulina platensis*), u której tylakoidy występują również na całym obszarze komórki, przeważa układ prostopadły do jej długiej osi [29] (rys. 3a), chociaż niektóre komórki tego gatunku zawierają tylakoidy ułożone bardziej nieregularnie (rys. 3b). Natomiast u nieokreślonej bliżej formy nitkowatej (rys. 8 E), jak również u *Gloeo-capsa* sp. [27] tylakoidy ułożone są równolegle do długiej osi poszczególnej komórki.

Jeżeli tylakoidy zajmują wyłącznie część peryferyczną, wówczas tworzą one na przekrojach poprzecznych koncentryczne układy [57]. Ich odstępy są regularne (rys. 2 i 8 A), a liczba może być różna. Zdaniem Echlina [17], u *Anacystis montana* występuje 13–19 różnej długości tylakoidów.

W czasie podziału komórki tylakoidy pewnych gatunków ulegają natychmiastowemu rozerwaniu przez rozwijające się ściany poprzeczne, podczas gdy u innych wpuklają się wraz z wrastaniem ściany i dzielą się dopiero tuż przed połączeniem się ścian [45]. Bezpośrednie połączenia między tylakoidami i plazmalemą opisano u wielu gatunków sinic. Małe wpuklenia plazmalemmy obserwowane na niektórych przekrojach pozwalają sądzić, że dają one początek nowym tylakoidom [2, 58]. Częste i wyraźne inwaginacje plazmalemmy obserwowano w komórkach *Nostoc* i *Geosiphon* [67] oraz w hormogoniach *Oscillatoria rubescens* [35]. Smith i Peat [70] stwierdzili, że wpuklenia plazmalemmy u *Anabaena flos-aquae* i połączenia jej z tylakoidami nie są związane z jakimś określonym stadium wzrostu, chociaż najwyraźniejsze były w młodej kulturze. Na tej podstawie Whitton i wsp. [78] sądzą, że zjawiska te związane są raczej z wczesnym stadium wzrostu. Natomiast Stanier [71] twierdzi, że bezpośrednie połączenia między plazmalemą i tylakoidami są u sinic bardzo rzadkie.

W komórkach pewnych gatunków sinic obserwowano sporadycznie obrazy dichotomicznego rozgałęziania się tylakoidów (rys. 4). Przypadki takie mogą być najprawdopodobniej wynikiem rozszczepienia lub fuzji tylakoidów, chociaż nie można również wykluczyć możliwości artefaktu wywołanego utwaleniem. Fuzja tylakoidów mogłaby utworzyć wewnątrz komórki obszary, które byłyby całkowicie oddzielone od pozostałej cytoplazmy, jak np. organelle w komórce eukariotycznej. Jednak badania przestrzennego układu tylakoidów *Anabaenopsis* sp. [61] nie wykazały żadnych odizolowanych obszarów cytoplazmy, mimo że sporadycznie spotykano rozgałęzianie się tylakoidów.

Błony pojedynczego tylakoidu mogą leżeć równoległe i blisko siebie lub może między nimi znajdować się dość szeroka przestrzeń (rys. 5) przypominająca wyglądem „wakuole” wewnątrztylakoidową [43]. Tylakoidy z rozdęciami obserwowali Ris i Sing [63] w niektórych partiach komórek z rodzajów *Nostoc*, *Mastigocladus*, *Calothrix*, *Gloeotrichia*, *Anabaena* i *Fischerella*. Wyraźne wakuolopodobne obszary wykazano także tu *Anabaena azollae* [26] i w starych komórkach *Anabaena* sp. [42]. Gatunki jednokomórkowe również zawierają wakuole, np. *Synechococcus lividus* [18], lecz są one mniej wyraźne. Jensen i Bowen [34] opisali różne inkluzje znajdujące się w wakuolach wewnątrztylakoidowych. Około 1% badanych komórek *Nostoc muscorum* (Linia ISU J15) zawierało w wakuolach wewnątrztylakoidowych dziesięć i więcej sferoidów o średnicy 30 nm z gęstą dla elektronów warstwą zewnętrzną o grubości 3 nm. Otoczone błoną, bezstrukturalne wtrąty (inkluzje) o małej lub średniej gęstości dla elektronów, występujące w wakuolach tylakoidowych, obserwowano również u wielu innych gatunków sinic. Ciałka te miały okrągły zarys

i otoczone były błoną. Sporadycznie błony otaczające te inkluzje łączyły się z błonami tylakoidu.

Istnieją również inne przykłady struktur mogących mieć jakiś związek z tylakoidami, stwierdzono np., że tylakoidy starych komórek *Anabaena* sp. ułożone były promieniście względem krystalicznej struktury przypominającej ciało prolamellarne etiolowanych chloroplastów [42]. Echlin [17] opisał błoniaste struktury w komórkach *Anacystis nidulans* i nazwał je „lamellasomami”. Miały one, według niego, powstawać drogą uwypuklenia się tylakoidów, lecz nie we wszystkich przypadkach udało mu się wykazać przyleganie tych struktur do tylakoidów.

U pewnych form nitkowatych (głównie *Oscillatoriaceae*) występują komórki terminalne. Na podstawie elektronogramu sinicy *Spirulina platensis* (rys. 3 A) [29] można sądzić, że układ i liczba tylakoidów komórki terminalnej są takie same jak w pozostałych komórkach.

Badania dotyczące ultrastruktury akinet są stosunkowo nieliczne [11, 51, 52, 79], można jednak na ich podstawie stwierdzić, że ogólny układ tylakoidów jest także zbliżony do układu w komórkach wegetatywnych. W czasie kiełkowania akinet *Cylindrospermum* sp. wzrost liczby tylakoidów następuje w wyniku fuzji małych pęcherzyków w cytoplazmie [51] nieco podobnie jak w hormogoniach *Oscillatoria* [35].

Heterocysty są głównym miejscem aktywności nitrogenazy i wiązania azotu w warunkach tlenowych [39, 53, 72]. Podczas wczesnych stadiów różnicowania się heterocyst, obserwowano niewielkie zmiany w liczbie tylakoidów i ich układzie [41, 44, 79]. Jednak w miarę odkładania się trójwarstwowej otoczki pojawiają się ciekawe konfiguracje tylakoidów i wzrost ich liczby (rys. 8 D) [44]. Autorzy ci obserwowali tak wyraźne zwiększenie się liczby błon (rys. 8 G) w dojrzewających heterocystach, że postulowali ich syntezę de novo w czasie tego procesu, nie odrzucając także możliwości zmiany układu tylakoidów już istniejących. Te dodatkowe błony były ściślej upakowane niż zwykle (rys. 8 G).

Pomimo znacznego zróżnicowania układu i struktury tylakoidów w komórkach sinic, nie udało się zaobserwować charakterystycznych dla większości chloroplastów tendencji do układania się ich w stosy (grana) [37].

SUBSTRUKTURA I FUNKCJE TYLAKOIDÓW

W ostatnich latach do badania aparatu fotosyntetycznego i wyodrębnienia jego funkcjonalnych i strukturalnych podjednostek stosowano szereg metod tak fizycznych, jak chemicznych ([59] i cyt. lit.). W ten sposób, szczególnie u szpinaku, oddzielono i scharakteryzowano dwie frakcje cząstek o różnych współczynnikach sedimentacji: frakcję lekką z fotosystemem I i frakcję ciężką z fotosystemem II [5, 9].

Pierwsze prace nad fragmentami tylakoidów sinic (głównie u *Anabaena*) prowadzono z zastosowaniem wirowania różnicowego względnie wirowania w gradiencie sacharozy materiału rozdrobnionego mechanicznie [73], ultradźwiękami [23, 74], lizą osmotyczną [6, 7, 13, 47], oraz detergentami [68]. Ogawa i wsp. [55] stosując metodę rozdrabniania ultradźwiękami i detergentami otrzymali u *Anabaena variabilis* dwie różne frakcje błon zawierające dwa fotosystemy, jednak w przeciwieństwie do chloroplastów fotosystem I występował we frakcji ciężkiej, a fotosystem II — we frakcji lekkiej. Otrzymane tymi prostymi i drastycznymi metodami frakcje, zdaniem Sigalata i de Kouchkovsky'ego [69], były niejednorodne i mało aktywne.

Sigalat i de Kouchkovsky [69] uwalniali najpierw protoplasty *Anacystis nidulans* wytrawiając ściany komórkowe lizozymem. Następnie poddawali je szokowi osmotycznemu i w gradiencie sacharozy otrzymali szereg frakcji. Badali zawartość barwników w całych sinicach, protoplastach, frakcji ciężkiej (B3), średniej (B2) i lekkiej (B1). Okazało się, że zawartość fikocyjanu była niższa w izolowanych protoplastach niż w całych sinicach i bardzo niska we wszystkich pozostałych frakcjach. Poziom karotenoidów był bardzo wysoki we frakcji B1, a chlorofilu było najwięcej we frakcji B3. Szczególna forma chlorofilu *a* z maksimum absorpcji przy 750 nm występowała tylko w całych sinicach i ich protoplastach. Te fakty mogą świadczyć o wpływie czynników fizykochemicznych w czasie preparatyki na skład barwników. Autorzy omawianej pracy podają, że otrzymana przez nich frakcja ciężka (B3) i lekka (B1) u *Anacystis* są odpowiednio podobne do frakcji ciężkiej (H) i lekkiej (L) otrzymanej bardziej drastyczną metodą przez Ogawę i wsp. [55] u *Anabaena*. W następnej pracy sygnalizowanej przez de Kouchkovsky'ego i Sigalata przeprowadzona jest analiza funkcjonalna opisanych frakcji i należy się spodziewać, że zbadana zostanie również ich struktura.

Jak wynika z badań porównawczych błon fotosyntetyzujących przeprowadzonych metodą kryorytownictwa [54], w tylakoidach sinic zidentyfikować można te same rodzaje cząstek, jakie występują w tylakoidach brunatnic i krasnorostów. Ze względu na występowanie zarówno u sinic, glonów, jak i wyższych roślin dwu fotosystemów oraz dużych i małych cząstek w błonach, niektórzy autorzy przypuszczają, że podstawowe jednostki fotosyntetyczne u wszystkich roślin są podobne [54, 56]. Rozstrzygnięcie jednak tej kwestii wymagać będzie dalszych badań strukturalno-funkcjonalnych aparatu fotosyntetycznego przedstawicieli różnych grup roślin.

Istotną cechą strukturalną tylakoidów sinic jest połączenie powierzchni tylakoidu z barwnikami fikobilinowymi — fikocyjanem i fikoerytryną,

które tworzą granule zwane fikobilisomami [24] (rys. 6). Edwards i Gantt [19] zaproponowali model struktury fikobilisomów obserwowanych u *Synechococcus lividus* (rys. 7). Z ich doniesienia wynika, że forma tych struktur zależy od obecności określonego typu barwnika. Fikobilisomy występują również u przedstawicieli *Rhodophyta* mających barwnik czerwony — fikoerytrynę. Są one kuliste [24, 25]. Natomiast obecność fikocyjanu ma warunkować formę dyskoidalną. Udowodnienie tej hipotezy będzie jednak możliwe dopiero po przeprowadzeniu badań porównawczych takich sinic, u których dominuje fikoerytryna. Fikobilisomy pełnią prawdopodobnie pewną rolę przy przenoszeniu energii na chlorofil *a* w fotosystemie II [28]. Zdaniem jednak Arnona i wsp. [4], pozbawione fikocyjanu fragmenty tylakoidów *Nostoc muscorum* zachowywały pełną aktywność fotosystemów I i II. Jakkolwiek wymienionym autorom nie udało się digitoniną rozdzielić dwu fotosystemów, to ich zdaniem chlorofil *a* jest jedynym barwnikiem absorbującym światło w procesie fotosyntezy u *Nostoc*, a fikocyjan nie bierze udziału w transporcie elektronów.

Tylakoidy sinic, według Bisalputry i wsp. [8], funkcjonują nie tylko jako struktury związane z procesem fotosyntezy, ale mogą także pełnić rolę ekwiwalentu mitochondrialnego. Procesowi oddychania u sinic poświęcono wiele prac ([10] i cyt. lit.), jednak jego lokalizacja na poziomie struktur nie jest jak dotąd dokładnie poznana.

W tylakoidach niektórych sinic odbywa się także proces wiązania wolnego azotu [12, 21].

Jakkolwiek przyłączanie CO_2 w reakcji karboksylacji nie jest bezpośrednio związane z funkcją tylakoidów, to wspólnie z nimi warunkuje fotosyntezę. Przyswajanie CO_2 u sinic nawet w świetle najnowszych prac nie jest jednoznacznie interpretowane. Według pewnych autorów karboksylacja u sinic (*Anacystis nidulans*) przebiega zgodnie z cyklem Calvinia [14, 36, 62], natomiast inni badacze u tego samego gatunku sinicy obserwowali karboksylację fosfoenolopirogronianu [32], a Latzko i Gibbs [46] u sinicy z rodzaju *Tolythrix* wykazali bardzo niską aktywność karboksylazy rybulozodwufosforanowej, co wskazywałoby na mały udział cyklu Calvinia w fotosyntezie. Zdaniem Döhlera [15], wiązanie CO_2 u *Anacystis nidulans* może zachodzić w zależności od warunków zarówno przez cykl Calvinia (a więc według typu C_3), jak i poprzez szereg kwasów czterowęglowych (a więc według typu C_4).

WPLYW CZYNNIKÓW ŚRODOWISKA

Dokładne badania zmian zachodzących w systemie błon sinic pod wpływem środowiska przeprowadziła Allen [1] dla *Anacystis nidulans*. Doniosła ona, że zarówno liczba tylakoidów, jak i stężenie barwnika

zmienia się odwracalnie w zależności od intensywności światła. Ponadto okazało się, że liczba tylakoidów u sinic (określona pośrednio przez pomiar powierzchni i objętości tylakoidów) jest proporcjonalna do ilości chlorofilu. Nieco inaczej wygląda to zagadnienie w przypadku *Chlorogloea fritschii*, ponieważ komórki tego gatunku mogą występować (częściowo zależnie od intensywności światła) w różnych stadiach i mieć różne rozmiary. W wąskich nitkach tylakoidy są z reguły ułożone równolegle do dłuższej osi, podczas gdy w komórkach dużych, nie ułożonych jedna za drugą (stadium IV), układ tylakoidów jest znacznie bardziej nieregularny [60]. Findley i wsp. [22] porównywali układ tylakoidów dla stadium IV tej sinicy rosnącej przy dwóch różnych intensywnościach światła. Przy małej intensywności (20–60 foot candles) tylakoidy są długie i ciągną się nieprzerwanie przez cytoplazmę. Często występują one w formie koncentrycznych zwojów, złożonych z 4–6 jednostek, a pary błon przylegają ściśle do siebie. Natomiast przy wysokich intensywnościach (700 foot candles) tylakoidy ulegają fragmentacji i pęcznieją.

Badania White'a i Moshe [76] wykazały, że sinice z gatunku *Plectonema boryanum* mogą rosnąć w ciemności na pożywce z dodatkiem cukrów przez kilka lat. Nie tracą przy tym barwnika i stają się fotoautotrofami po wystawieniu ich na światło.

Wpływ innych czynników niż światło był analizowany mniej dokładnie. Venkataraman i wsp. [75] porównywali wpływ dwóch różnych temperatur na synchroniczny wzrost *Anacystis nidulans*. Komórki rosnące w niskiej temperaturze miały tylakoidy niewyraźne (zamaskowane), podczas gdy w wyższej temperaturze zawierały 2 lub 3 tylakoidy równolegle ułożone w części peryferycznej komórki. Różnice te były, według autorów pracy, związane z wyższą akumulacją produktów fotosyntezy przy niskiej temperaturze.

Badano także, czy stężenie CO₂ ma znaczenie dla kształtowania się poziomu barwników u sinic. Stwierdzono, że wzrost stężenia CO₂ prowadzi do zwiększonej syntezy fikocyjanu [20]. U *Anacystis nidulans* hodowanej przy dostępie powietrza atmosferycznego stosunek chlorofil : fikocyjan : karotenoid wynosił odpowiednio 1 : 6,2 : 0,7. Po wzbogaceniu powietrza w CO₂ proporcje te wynosiły odpowiednio 1 : 9,2 : 0,8 [15].

Peat i Whitton [60] badali zmiany zachodzące w komórkach *Chlorogloea fritschii* pod wpływem obecności lub braku azotu w pożywce. Jedyną wykrywalną różnicę stanowiła wyższa częstotliwość pęcherzyków wewnątrztylakoidowych na pożywce bez azotu. Nieregularny układ tylakoidów i formę pęcherzyków wiąże się często ze starzeniem się. Przypadki takie opisali Peat i Whitton [61] dla *Anabaenopsis*, Miller i Lang [52] dla *Gleotrichia*, a Whitton (nie publikowane, cyt. za Langiem i Whit-

tonem [45]) dla *Scytonema* sp. Być może, że zjawisko to wywołane jest wyczerpaniem się azotu.

Natomiast Jensen i Sicka [33] analizowali na poziomie ultrastruktury zmiany zachodzące w komórkach sinicy z gatunku *Plectonema boryanum* przy braku fosforu w pożywce i przy gwałtownym jego pobieraniu. Stwierdzili oni między innymi, że struktura tylakoidów zmienia się w zależności od stężenia fosforu. W komórkach kontrolnych sporadycznie spotykano tylakoidy z rozdęciami, częstość tych rozdęć wzrastała przy braku fosforu w pożywce, osiągając maksimum w czasie gwałtownego pobierania fosforu.

UKŁAD TYLAKOIDÓW A TAKSONOMIA

Analiza większości elektronogramów *Chroococcales* wykazuje, że tylakoidy ułożone są w szeregi bardziej lub mniej równoległe do długiej osi komórki, np. u *Gloeocapsa alpicola*, *Anacystis nidulans* [63], *Synechococcus plancticus* [16], *Anacystis montana* [17], *Chroococcus prescotti* [80] i *Synechococcus lividus* [18, 31]. Z wyjątkiem dwóch linii *Gloeocapsa*, przedstawionych przez Hagedorna [27], nie znane są przypadki w obrębie *Chroococcales*, w których układ błon różniłby się od opisanego (*Chlorogloea fritschii* jest tutaj traktowana jako przedstawiciel *Nostocaceae*, zgodnie z zaleceniem Schwabe'a i El Ayouty [67]).

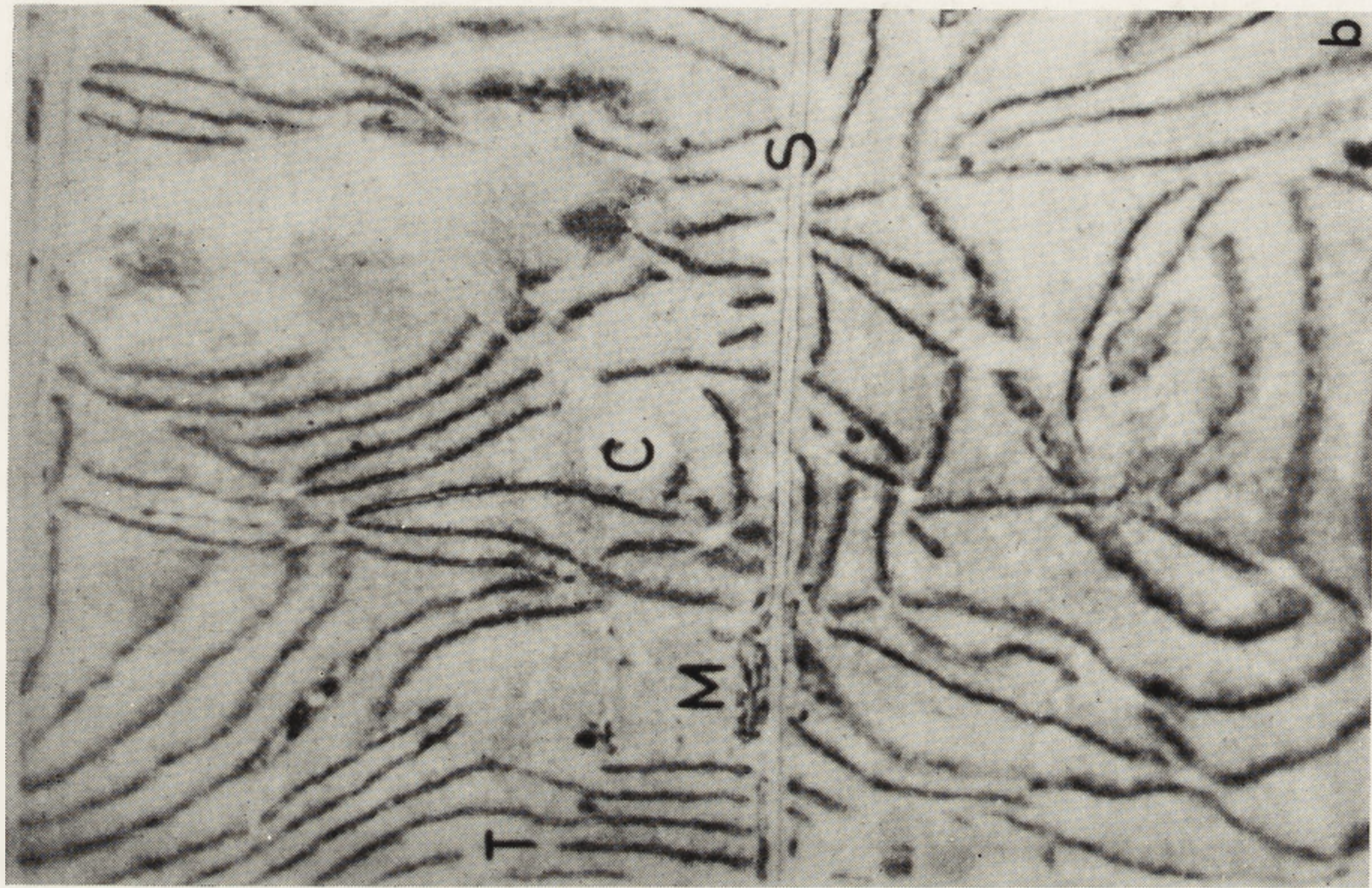
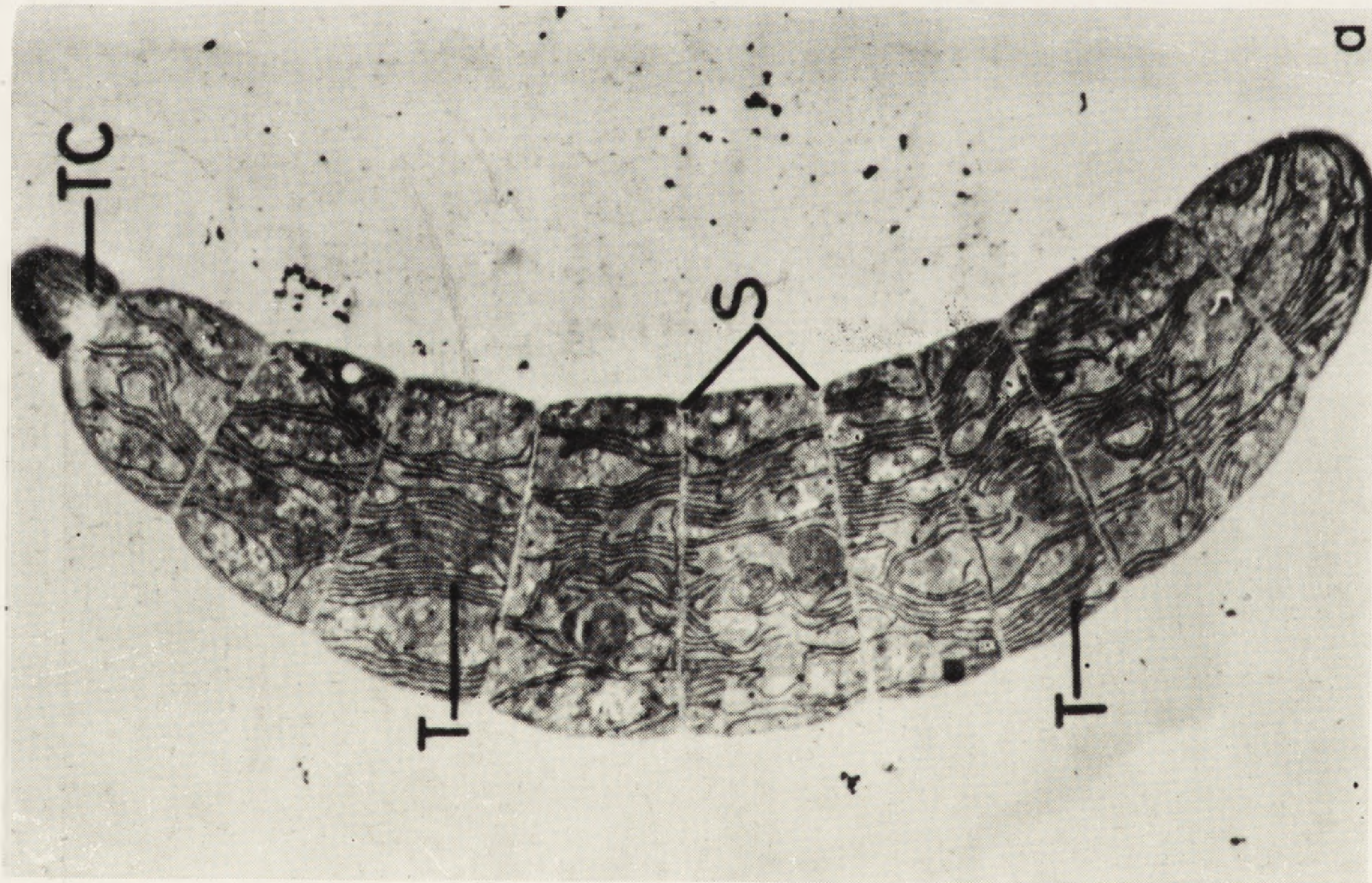
Wśród niektórych *Oscillatoriaceae* układ tylakoidów jest również równoległy do długiej osi komórki, jak np. u *Oscillatoria chalybea* [48], *O. redekei* [77], *Phormidium minnesotense* [65] i *Symploca muscorum* [58]. Jednak u innych przedstawicieli *Oscillatoriaceae* (np. u *O. limosa* [27]) obserwowano większą tendencję do nieregularnego układu tylakoidów niż u *Chroococcales*.

Mikrofotografie *Nostocaceae* pokazują układy tylakoidów bardzo podobne do układu typowego dla *Oscillatoriaceae*, np. u *Cylindrospermum* sp. [51]. O wiele jednak częściej u przedstawicieli tej rodziny spotyka się układ nieregularny (dane Risa i Singha [63] oraz Wildona i Mercera [80]).

Jak z przytoczonych danych wynika, konfiguracja tylakoidów wydaje się z reguły być zależna od pozycji taksonomicznej organizmu. Ze względu jednak na plastyczność tylakoidów w różnych warunkach środowiskowych i w komórkach znajdujących się w różnych stadiach wieku i rozwoju należy dość ostrożnie uogólniać to twierdzenie. Także ujednoczenie metod utrwalania materiału jest sprawą ważniejszą niż się zwykle sądzi. Zastosowanie różnych utrwalaczy może powodować powstawanie różnych obrazów pewnych inkluzji komórkowych, a doniesienie Hoare'a i wsp. [30] ujawniło, że może to dotyczyć także układu tylakoidów. Au-

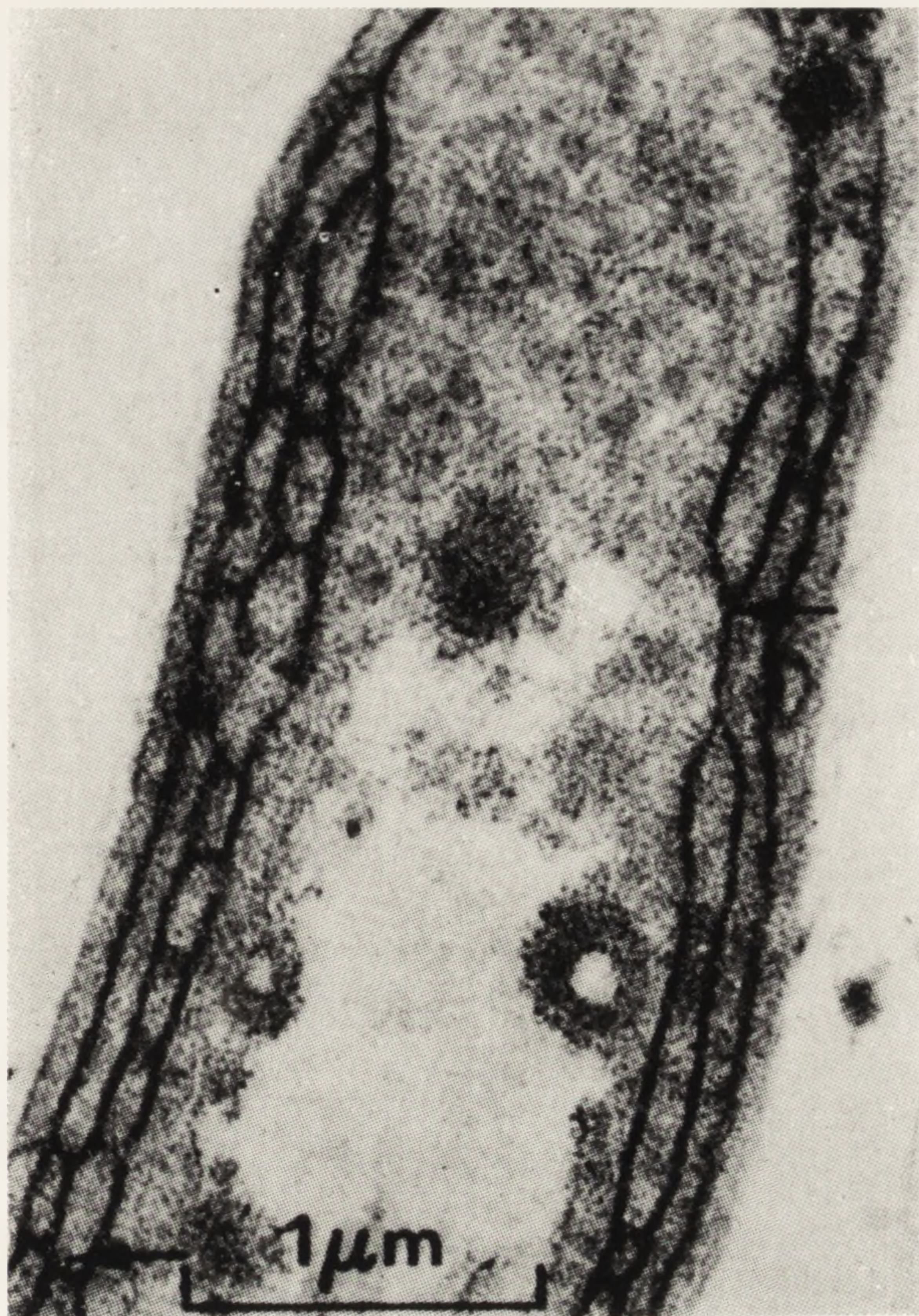


Rys. 2. Przekrój podłużny i przekroje poprzeczne przez *Anacystis nidulans*.
Utrw.: KMnO_4 . ($\times 90\,000$)

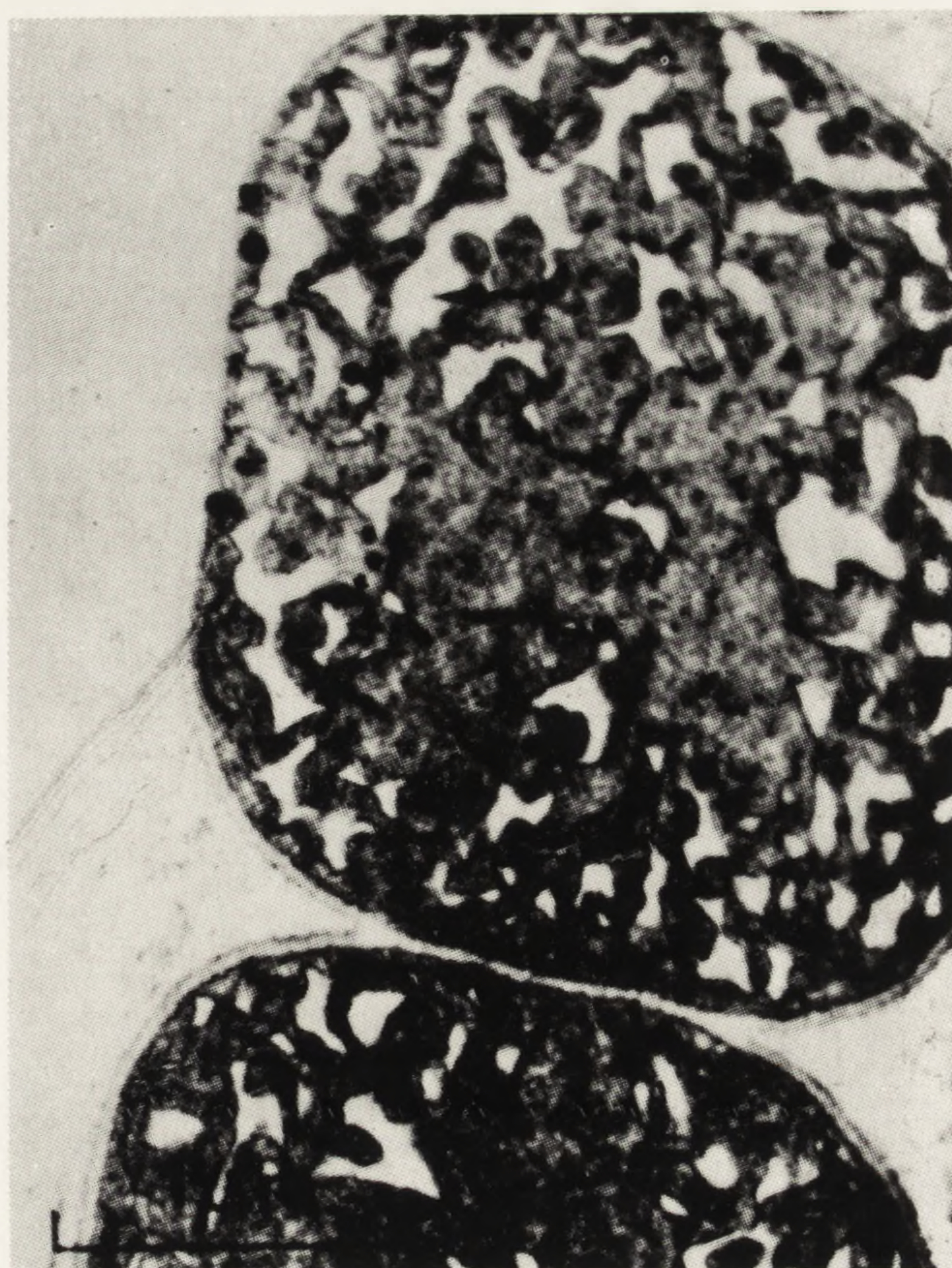


Rys. 3. Przekrój podłużny przez *Spirulina platensis*: a — widok ogólny ($\times 8\ 000$), b — fragment dwóch komórek. Widoczny bezładny układ tylakoidów, szczególnie w komórce dolnej ($\times 52\ 000$). Utrw.: aldehyd glutarowy — KMnO_4 .

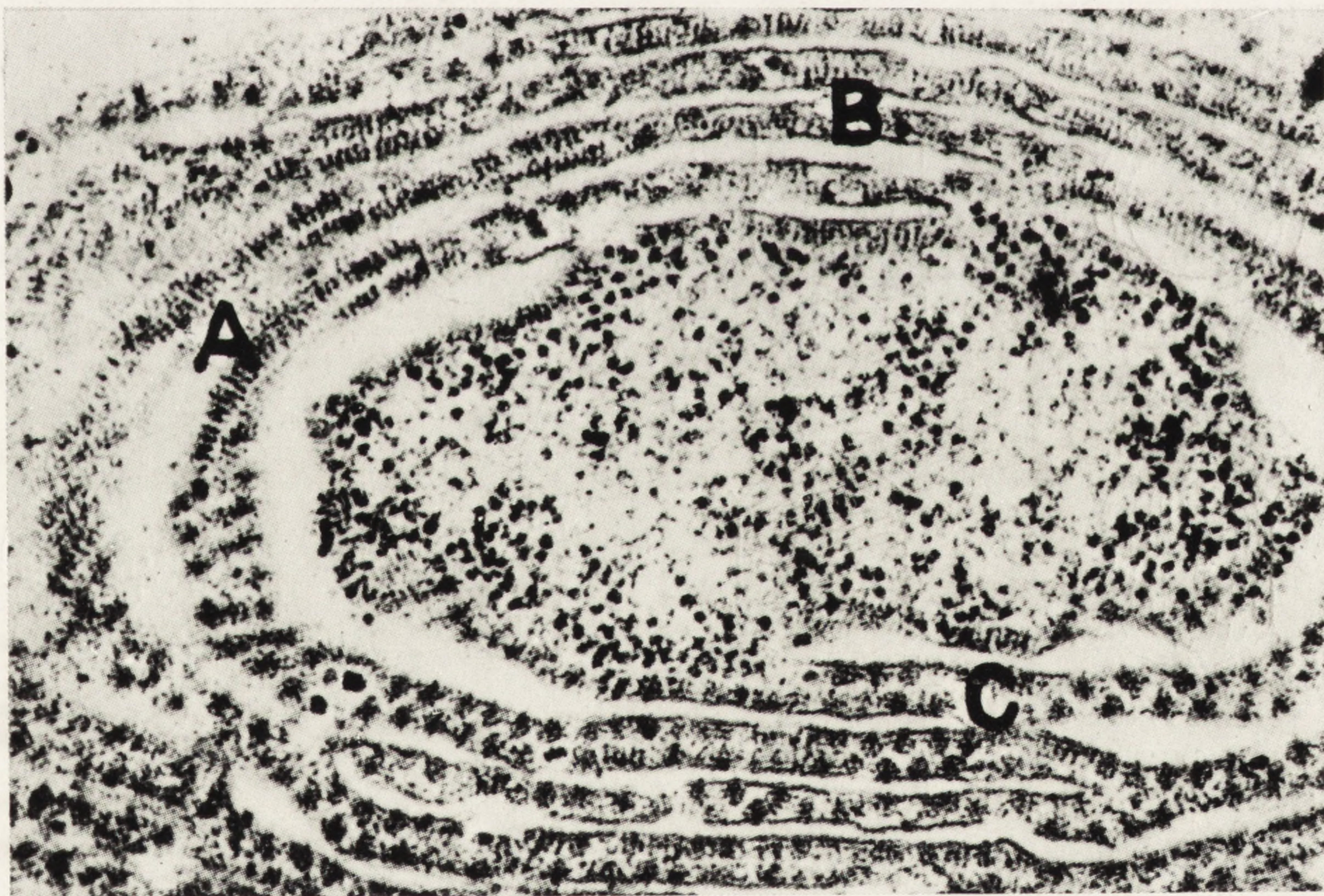
S — septa, TC — komórka terminalna, T — tylakoidy, M — błony mitochondrialne, C — granula cyjanoficyny (rozpuszczona) [29].



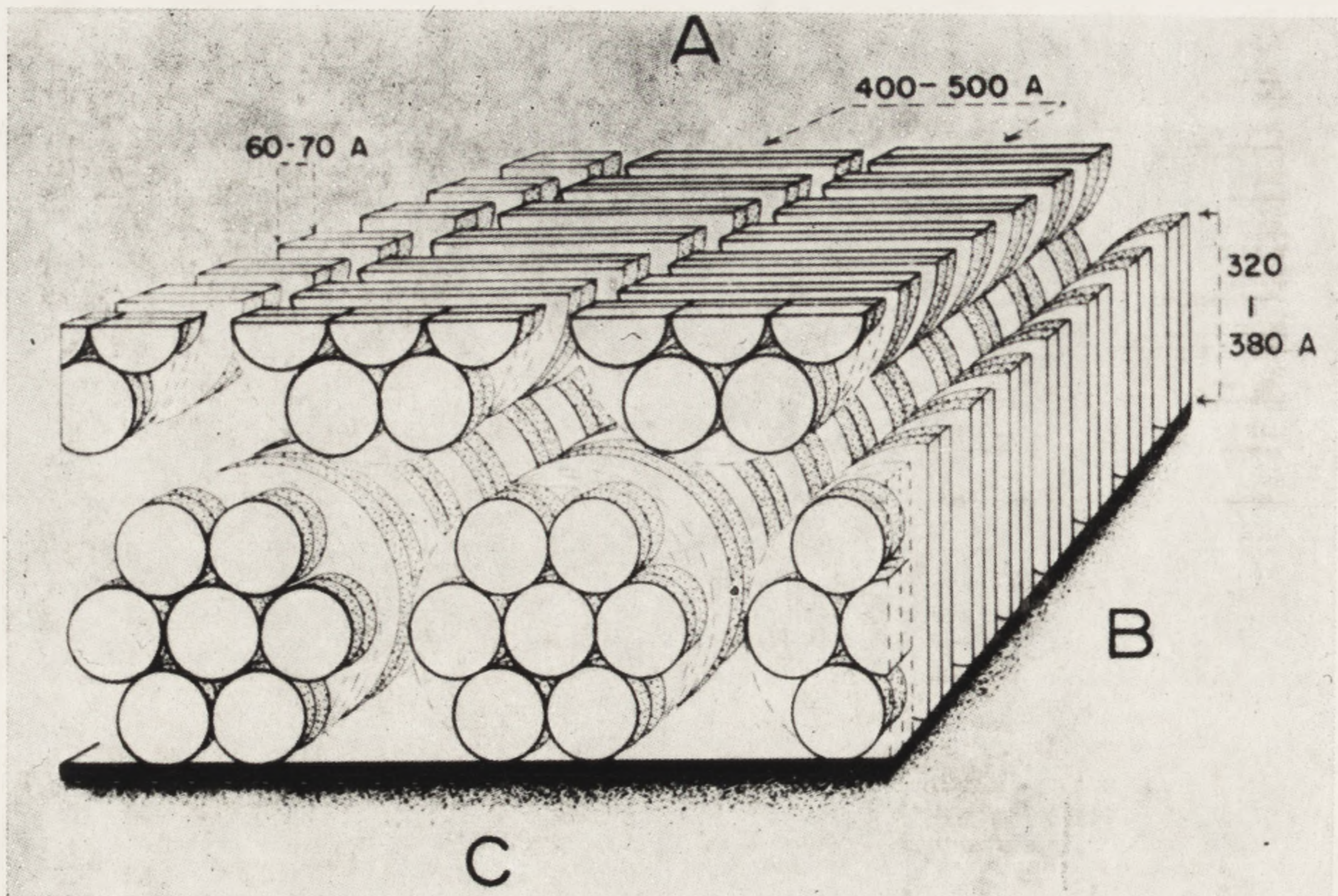
Rys. 4. *Anacystis nidulans*. Peryferyczne tylakoidy z widocznymi rozwidleniami — strzałki. Utrw. KMnO_4 ($\times 40\,000$) [44]



Rys. 5. *Cylandrospermum* sp. z widocznymi wakuolami wewnątrztylakoidowymi (strzałki). Utrw. OsO_4 . ($\times 20\,000$) [44].

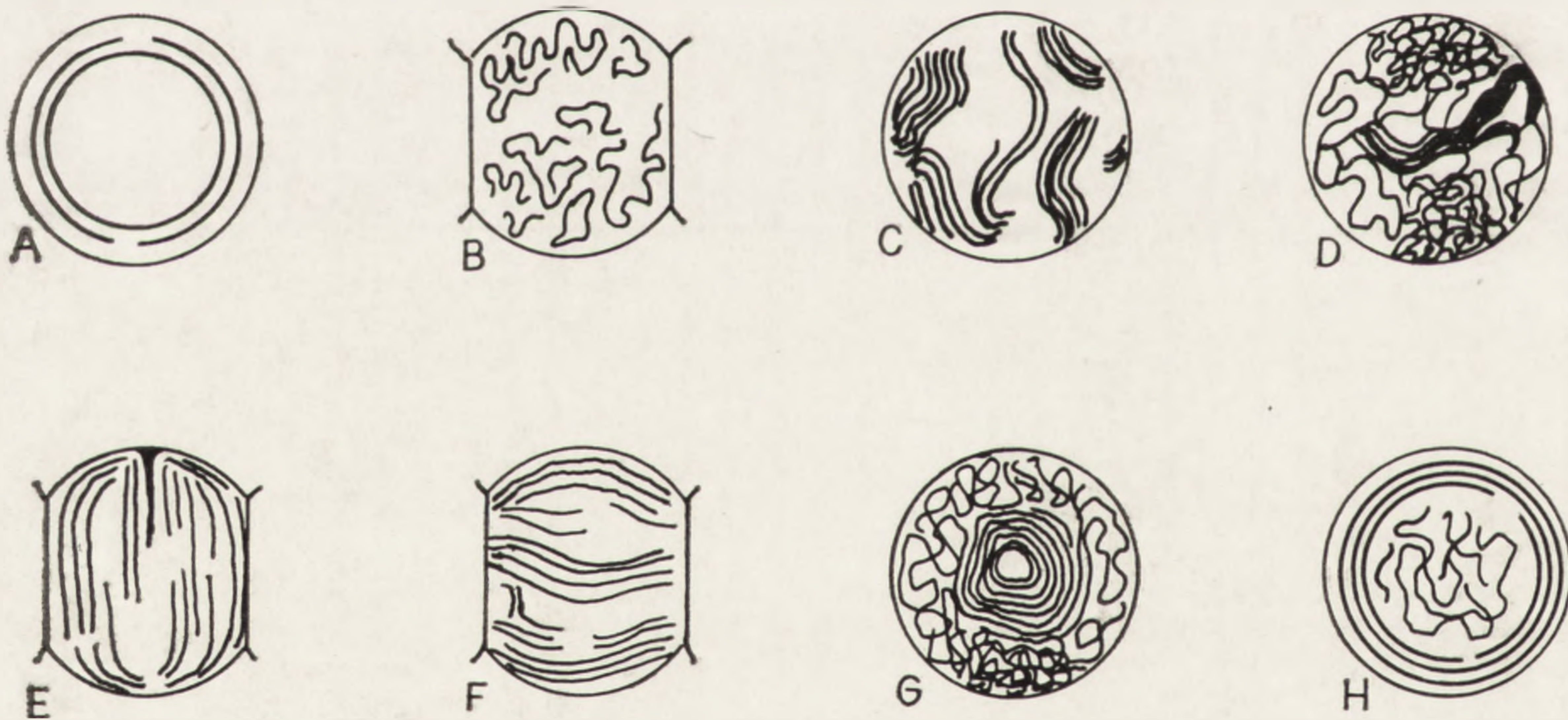


Rys. 6. Nieco skośny skrawek termofilnej sinicy *Synechococcus lividus* ukazujący różne płaszczyzny przekroju koncentrycznie ułożonych tylakoidów i przylegających do nich fikobilisomów. Na przekroju stycznym względem tylakoidów (A) fikobilisomy wyglądają jak krótkie, ciemne linie. Podobnie wyglądają one na przekroju prostopadłym do tylakoidów (B), gdzie dodatkowo widać ich przyleganie do tylakoidu. Na przekroju poprzecznym (C) fikobilisomy są wyraźnie zaokrąglone. Utrw.: aldehyd glutarowy OsO_4 . ($\times 60\,000$) [19]



Rys. 7. Schemat fikobilisomów (dla tych gatunków sinic, które zawierają fikocyjaninę).

A — przekrój styczny względem tylakoidu przez szereg fikobilisomów, B — przekrój prostopadły w stosunku do tylakoidów przez szereg fikobilisomów. Na przekroju poprzecznym C — widać zaokrąglony kształt fikobilisomów. Widoczny jest także proponowany układ podjednostek (jasne kółka) [19]



Rys. 8. Układy tylakoidów sinic.

A — 2-3 tylakoidy ułożone względem siebie równoległe w części peryferycznej komórki (np. *Anacystis nidulans*), B — tylakoidy pofałdowane i nieregularnie ułożone w całej komórce (np. u *Calothrix brevissima* rosnącej w ciemności), C — tylakoidy występują w pakietkach rozmieszczonych w całej komórce (np. u *Merismopedia* sp.), D — układy tylakoidów przypominające plaster miodu na biegunach i wyraźne zwiększenie ich liczby w centrum komórki (np. heterocysty *Anabaena cylindrica*), E — tylakoidy wypełniające znaczną część komórki przebiegają równoległe do jej dłuższej osi (np. gatunek należący do formy „Zimbabwe 4”), F — tylakoidy wypełniające znaczną część komórki przebiegają prostopadłe do jej dłuższej osi (np. u *Oscillatoria chalybea*), G — gęsto upakowane zwoje tylakoidów w centralnej części komórki (np. u heterocysty *Anabaena cylindrica*), H — tylakoidy ułożone bezładnie i luźno w centralnej części komórki oraz koncentrycznie na jej obwodzie (np. u *Anabaena azollae*)

torzy ci stwierdzili, że materiał (endofityczny gatunek *Nostoc*) utrwalony KMnO_4 zawiera tylakoidy umieszczone bardziej peryferycznie jeżeli rośnie na świetle w porównaniu z materiałem rosnącym w ciemności, podczas gdy materiał utrwalony czerwiecią rutenową — OsO_4 (nie aldehydem glutarowym — OsO_4) — takich różnic nie wykazywał.

Autorzy dziękują Profesor Alicji Szweykowskiej za cenne uwagi krytyczne udzielone przy przygotowywaniu niniejszego artykułu oraz Profesor Danucie Frąckowiak z Politechniki Poznańskiej za udostępnienie hodowli *Anacystis nidulans* dla wykonania elektronogramu.

LITERATURA

- [1] ALLEN M. M., Photosynthetic membrane system in *Anacystis nidulans*, J. Bact., 96: 836–841, 1968a.
- [2] — Ultrastructure of the cell wall and cell division of unicellular blue - green algae, J. Bact., 96: 842–852, 1968b.
- [3] ALLSOPP A., Photosynthetic relationships of the procaryota and the origin of the eucaryotic cell, New Phytol., 68: 591–612, 1969.
- [4] ARNON D. I., McSWAIN B. D., TSUJIMOTO H. Y., WADA K., Photochemical activity and components of membrane preparations from blue - green algae. I. Coexistence of two photosystems in relation to chlorophyll *a* and removal of phycocyanin, Biochem. Biophys. Acta, 357 (2): 231–245, 1974.
- [5] ARNTZEN C. J., DILLEY R. A., PETER G. A., SHAW E. R., Photochemical activity and structural studies of photosystems derived from chloroplast grana and stroma lamellae, Biochem. Biophys. Acta, 256: 85–107, 1972.
- [6] BIGGINS J., Preparation of metabolically active protoplasts from the blue - green alga *Phormidium luridum*, Plant Physiol., 42: 1442–1446, 1967a.
- [7] — Photosynthetic reactions by lysed protoplasts and particle preparations from the blue - green alga *Phormidium luridum*, Plant Physiol., 42: 1447–1456, 1967b.
- [8] BISALPUTRA T., BROWN D. L., WEIER T. E., Possible respiratory sites in a blue - green alga *Nostoc sphaericum* as demonstrated by potassium tellurite and tetranitro - blue tetrazolium reduction, J. Ultrastr. Res., 27: 182–197, 1969.
- [9] BOARDMANN N. K., ANDERSON J. M., Isolation from spinach chloroplasts of particles containing different proportions of chlorophyll *a* and chlorophyll *b* and their possible role in the light reactions of photo - synthesis, Nature, 203: 166–167, London 1964.
- [10] CARR N. G., Metabolic control and autotrophic physiology, [w] The Biology of Blue - Green Algae, ed. Carr and Whitton, Blackwell Scientific Publications Oxford, London, Edinburgh, Melbourne 1973.
- [11] CLARK R. L., JENSEN T. E., Ultrastructure of akinete development in a blue - green alga *Cylindrospermum* sp., Cytologia, 34: 439–448, 1969.
- [12] COX R. M., FAY P., FOGG G. E., Nitrogen fixation and photosynthesis in a subcellular fraction of the blue - green alga *Anabaena cylindrica*, Biochem. Biophys. Acta, 88: 208–210, 1964.

- [13] CRESPI H. L., MANDEVILLE S. E., KATZ J. J., The action of lysozyme on several blue - green algae, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **9**: 569-573, 1962.
- [14] DÖHLER G., PRZYBYŁŁA K. R., Einfluß der Temperatur auf die Lichtatmung der Blaualge *Anacystis nidulans*, *Planta*, **110**: 153-158, 1973.
- [15] DÖHLER G., C₄ - Weg der Photosynthese in der Blaualge *Anacystis nidulans*, *Planta*, **118**: 259-269, 1974.
- [16] DREWS G., PRAUSER H., UHLMANN D., Massenvorkommen von *Synechococcus plancticus* nov. spec., einer solitären, planktischen *Cyanophyceae*, in einen Abwasserteich, *Arch. Microbiol.*, **39**: 101-115, 1961.
- [17] ECHLIN P., Intra - cytoplasmic membranous inclusions in the blue - green alga *Anacystis nidulans*, *Arch. Microbiol.*, **49**: 267-274, 1964.
- [18] EDWARDS M. R., BERNS D. S., GHIORSE W. C., HOLT S. C., Ultrastructure of the thermophilic blue - green alga *Synechococcus lividus* Copeland, *J. Phycol.*, **4**: 283-289, 1968.
- [19] EDWARDS M. R., GANTT E., Phycobilisomes of the thermophilic blue - green alga *Synechococcus lividus*, *J. Cell Biol.*, **50**: 896-899, 1971.
- [20] ELEY J. H., Effect of carbon dioxide concentration on pigmentation in the blue - green alga *Anacystis nidulans*, *Plant, Cell Physiol.*, **12**: 311-316, 1971.
- [21] FAY P., COX R. M., Decarboxylations performed by particular fractions of two nitrogen - fixing blue - green algae, *Biochem. Biophys. Acta*, **126**: 402-404, 1966.
- [22] FINDLEY D. L., WALNE P. L., HOLTON R. W., The effects of light intensity on the ultrastructure of *Chlorogloea fritschii* Mitra grown at high temperatures, *J. Phycol.*, **6**: 182-188, 1970.
- [23] FUJITA Y., MYERS J., Cytochrome c redox reactions induced by photochemical system I in sonicated preparations of *Anabaena cylindrica*, *Arch. Biochem. Biophys.*, **113**: 730-737, 1966.
- [24] GANTT E., CONTI S. F., Granules associated with the chloroplast lamellae of *Porphyridium cruentum*, *J. Cell Biol.*, **29**: 423-434, 1966.
- [25] GANTT E., Properties and ultrastructure of phycoerythrin from *Porphyridium cruentum*, *Plant Physiol.*, **44**: 1629-1638, 1969.
- [26] GRILLI M., Infrastrutture di *Anabaena azollae* vivente nelle foglioline di *Azolla caroliniana*, *Ann. Microbiol. Enzimol.*, **14**: 69-90, 1964.
- [27] HAGEDORN H., Untersuchungen über die Feinstruktur der Blaualgenzellen, *Z. Naturf.*, **16 b**: 825-829, 1961.
- [28] HALLIER U. W., PARK R. B., Photosynthetic light reactions in chemically fixed *Anacystis nidulans*, *Chlorella pryenoidosa* and *Porphyridium cruentum*, *Plant Physiol.*, **44**: 535-539, 1969.
- [29] HEDENSKOG G., v. HOFSTEN A., The ultrastructure of *Spirulina platensis*, a new source of microbial protein, *Physiol. Plant.*, **23**: 209-216, 1970.
- [30] HOARE D. S., INGRAM L. O., THURSTON E. L., WALKUP R., Dark heterotrophic growth of an endophytic blue - green alga, *Arch. Microbiol.*, **78**: 310-321, 1971.
- [31] HOLT S. S., EDWARDS M. R., Fine structure of the thermophilic blue - green alga *Synechococcus lividus* Copeland. A study of frozen - fractured - etched cells, *Can. J. Microbiol.*, **18**: 175-181, 1972.
- [32] JANSZ E. R., MACLEAN F. I., CO₂ fixation by the blue - green alga *Anacystis nidulans*, *Can. J. Microbiol.*, **19**: 497-504, 1973.
- [33] JENSEN T. E., SICKO L. M., Phosphate metabolism in blue - green algae.

- I. Fine structure of the "polyphosphate overplus" phenomenon in *Plectonema boryanum*, Can. J. Microbiol., **20(9)**: 1235-1239, 1974.
- [34] JENSEN T. E., BOWEN C. C., Cytology of blue - green algae. II. Unusual inclusions in the cytoplasm, Cytologia, **35**: 132-152, 1970.
- [35] JOST M., Die ultrastruktur von *Oscillatoria rubescens* D. C., Arch. Microbiol., **50**: 211-245, 1965.
- [36] KANDLER O., Verteilung von C¹⁴ nach Photosynthese in C¹⁴O₂ von *Anacystis nidulans*, Naturwissenschaften, **48**: 604, 1961.
- [37] KIRK J. T. O., TILNEY - BASSETT R. A. E., The Plastids. str. 608. ed. W. H. Freeman and Co. San Francisco, USA, 1967.
- [38] DE KOUCHKOVSKY Y., SIGALAT C., Fractionnement et caractérisation de l'appareil photosynthétique de l'algue bleue unicellulaire *Anacystis nidulans*. II. Analyse fonctionnelle, Physiol. Vég. (w druku).
- [39] KULASOORIYA S. A., LANG N. J., FAY P., The heterocysts of blue - green algae. III. Differentiation and nitrogenase activity, Proc. R. Soc. B., **181**: 199-209, 1972.
- [40] LAMONT H. C., Sacrificial cell death and trichome breakage in an *Oscillatoriacean* blue - green alga — the role of murein, Arch. Microbiol., **69**: 237-259, 1969.
- [41] LANG N. J., Electron microscopic study of heterocyst development in *Anabaena azollae* Strasburger, J. Pycol., **1**: 127-134, 1965.
- [42] LANG N. J., RAE P. M. M., Structures in a blue - green alga resembling prolamellar bodies, Protoplasma, **64**: 67-74, 1967.
- [43] LANG N. J., The fine structure of blue - green algae, A. Rev. Microbiol., **22**: 15-46, 1968.
- [44] LANG N. J., FAY P., The heterocysts of blue green algae. II. Details of ultrastructure, Proc. R. Soc. B., **178**: 193-203, 1971.
- [45] LANG N. J., WHITTON B. A., Arrangement and structure of thylakoids, [w] The Biology of Blue - Green Algae. Ed. Car i Whitton, Blackwell Scientific Publications, Oxford London Edinburgh, Melbourne, 1973.
- [46] LATZKO E., GIBBS M., Enzyme activities of the carbon reduction cycle in some photosynthetic organisms, Plant Physiol., **44**: 295-300, 1969.
- [47] LEE S. S., YOUNG A. M., KROGMANN D. W., Site specific inactivation of the photophosphorylation reactions of *Anabaena variabilis*, Biochem. Biophys. Acta, **180**: 130-136, 1969.
- [48] MENKE W., Über das Lamellarsystem des Chromatoplasmas von *Cyanophyceen*, Z. Naturf., **16**: 543-545, 1961.
- [49] — Structure and chemistry of plastids, Ann. Rev. Plant Physiol., **13**: 27-44, 1962.
- [50] MERCER F. V., BOGOROD L., MULLENS R., Studies with *Cyanidium caldarium*. I. The fine structure and systematic position of the organism, J. Cell Biol., **13**: 393, 1962.
- [51] MILLER M. M., LANG N. J., The fine structure of akinete formation and germination in *Cylindrospermum*, Arch. Microbiol., **60**: 303-313, 1968.
- [52] — The effect of aging on thylakoid configuration and granular inclusions in *Gloeotrichia*, [w] Contributions in Phycology, Ed. Parker B. C. i Brown R. M., Jr. Allen Press, Lawrence, Kansas UAS, 1971.
- [53] NEILSON A., RIPPKA R., KUNISAWA R., Heterocyst formation and nitrogenase synthesis in *Anabaena* sp. a kinetic study, Arch. Microbiol., **76**: 136-150, 1971.

- [54] NEUSHUL M., Uniformity of thylakoid structure in a red, a brown and two blue - green algae, *J. Ultrastr. Res.*, **37**: 532-543, 1971.
- [55] OGAWA T., VERNON L. P., MOLLENHAUER H. H., Properties and structure of fractions prepared from *Anabaena variabilis* by the action of Triton X - 100, *Biochem. Biophys. Acta*, **172**: 216-229, 1969.
- [56] OLSON J. M., The evolution of photosynthesis, *Science, N. Y.*, **168**: 438-446, 1970.
- [57] OLSZEWSKA M., *Cytologia Roślin*, PWN — Warszawa, 1971.
- [58] PANKRATZ H. S., BOWEN C. C., Cytology of blue - green algae. I. The cells of *Sumploca muscorum*, *Am. J. Bot.*, **50**: 387-399, 1963.
- [59] PARK R. B., SANE P. V., Distribution of function and structure in chloroplast lamellae, *Ann. Rev. Plant Physiol.*, **22**: 395-430, 1971.
- [60] PEAT A., WHITTON B. A., Environmental effects of the structure of the blue - green algae, *Chlorogloea fritschii*, *Arch. Microbiol.*, **57**: 155-180, 1967.
- [61] — Vegetative cell structure in *Anabaenopsis* sp., *Arch. Microbiol.*, **63**: 170-176, 1968.
- [62] PELROY R. A., BASSHAM J. A., Photosynthetic and dark carbon metabolism in unicellular blue - green algae, *Arch. Microbiol.*, **86**: 25-38, 1972.
- [63] RIS H., SINGH R. N., Electron microscope studies on blue - green algae, *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, **9**: 63-80, 1961.
- [64] ROSEN W. G., SIEGISMUND K. A., Some observations on the fine structure of a thermophilic, acidophilic alga, *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, **9**: 910, 1961.
- [65] ROSSNER W., Der Einfluss von Streptomycin auf Cyanophyceen. II. Elektronenmikroskopische Untersuchungen an *Phormidium minnesotense* (Tilden) Drouet, *Planta*, **60**: 166-177, 1963.
- [66] SCHNEPF E., Zur Feinstruktur von *Geosiphon pyriforme*, *Arch. Microbiol.*, **49**: 112-131, 1964.
- [67] SCHWABE G. H., EL AYOUTY E., Über drei hormogonale Blaualgen aus indischen Böden, *Nova Hedwigia*, **10**: 527-536, 1965.
- [68] SHIMONY C., SPENCER J., GOVINDJEE C., Spectral characteristics of *Anacystis particles*, *Photosynthetica*, **1**: 113-125, 1967.
- [69] SIGALAT C., DE KOUCHKOVSKY Y., Fractionnement et caractérisation de l'appareil photosynthétique de l'algue bleue unicellulaire *Anacystis nidulans*. I. Obtention de fractions membranaires par "lyse osmotique" et analyse pigmentaire, *Physiol. Vég.*, **13(2)**: 243-258, 1975.
- [70] SMITH R. V., PEAT A., Comparative structure of the gas - vacuoles of blue - green algae, *Arch. Microbiol.*, **57**: 111-122, 1967.
- [71] STANIER R. Y., Some aspects of the biology of cells and their possible evolutionary significance, [w:] *Organisation and Control in Prokaryotic and Eukaryotic Cells 20th Symposium Soc. Gen. Microbiol.* Ed. Charles i Knight, Cambridge U. P. England, 1970.
- [72] STEWART W. D. P., HAYSTEAD A., PEARSON H. W., Nitrogenase activity in heterocysts of blue - green algae, *Nature*, **224**: 226-228, London 1969.
- [73] SUSOR W. A., KROGMANN D. W., Hill activity in cell - free preparations of a blue - green alga, *Biochim. Biophys. Acta*, **88**: 11-19, 1964.
- [74] — TPN photoreduction by cell - free preparations of *Anabaena variabilis*, *Biochem. Biophys. Acta*, **120**: 65-72, 1966.
- [75] VENKATARAMAN G. S., AMELUNXEN F., LORENZEN H., Note to the fine structure of *Anacystis nidulans* during its synchronous growth, *Arch. Microbiol.*, **69**: 370-372, 1969.

- [76] WHITE A. W., MOSHE S., Heterotrophic growth of the filamentous blue-green alga *Plectonema boryanum*, Arch. Microbiol., **102**(2): 123-128, 1975.
- [77] WHITTON B. A., PEAT A., On *Oscillatoria redekei* Van Goor, Arch. Microbiol., **68**: 362-376, 1969.
- [78] WHITTON B. A., CARR N. G., CRAIG I., A comparison of the fine structure and nucleic acid biochemistry of chloroplasts and blue-green algae, Protoplasma: **72**: 325-357, 1971.
- [79] WILDON D. C., MERCER F. V., The ultrastructure of the heterocyst and akinete of the blue-green algae, Arch. Microbiol., **47**: 19-31, 1963a.
- [80] — The ultrastructure of the vegetative cell of blue-green algae, Aust. J. Biol. Sci., **16**: 585-596, 1963b.

Otrzymano: 26 maja 1976.

Przyjęto: 16 czerwca 1976.

Adres autorów: Al. Stalingradzka 14, 61-713 Poznań.

NOWE METODY BADANIA WYMIAN SIOSTRZANYCH CHROMATYD

Zygmunt POJDA, Henryk STRÓŻYŃSKI i Regina OSIECKA

Zakład Biologii, Instytut Biologiczno - Morfologiczny

Wojskowa Akademia Medyczna, Łódź

Zakład Cytologii i Cytochemii Roślin, Instytut Fizjologii i Cytologii,
Uniwersytet Łódzki

Streszczenie. Omówiono wyniki badań wymian siostrzanych chromatyd, uzyskane w latach 1958-1975. Do roku 1973 problem ten, ze względu na zbyt małą rozdzielczość stosowanej metody autoradiograficznej, miał znaczenie raczej niewielkie. Wprowadzenie nowych technik badawczych opartych na różnej barwliwości chromatyd zawierających lub nie zawierających w składzie DNA analogu tymidyny — 5 - bromodezoksyurydyny, pozwoliło na poznanie nowych aspektów tego zjawiska.

Stwierdzono związek częstości wymian z wpływem wielu czynników fizycznych i chemicznych, jak również z niektórymi stanami chorobowymi. Lokalizacja miejsc wymian chromatyd na chromosomach nie jest w pełni przypadkowa. Obecnie czynione są próby wykorzystania zjawiska wymian siostrzanych chromatyd jako wskaźnika wpływu czynników egzogennych na komórkę, czynione są próby powiązania wymian z uszkodzeniami mechanizmów biochemicznych w przebiegu niektórych chorób. Być może lepsze poznanie zjawiska pozwoli również na uzyskanie dalszych informacji o strukturze chromosomów i charakterze mechanizmów naprawczych DNA.

Występowanie wymian siostrzanych chromatyd (sister chromatid exchanges — SCE) w chromosomach mitotycznych znane jest stosunkowo dawno. Już w 1958 r. Taylor [37] stosując technikę autoradiografii wykazał występowanie tego zjawiska w chromosomach roślinnych. Inkubując komórki w roztworze ^3H -tymidyny przez okres odpowiadający jednemu cyklowi życiowemu, a następnie usuwając ją na przeciąg następnego cyklu, uzyskał radioaktywne znakowanie tylko jednej z dwóch siostrzanych chromatyd. W takim materiale stwierdził, że pewne fragmenty chromatyd, które zgodnie z regułą semikonserwatywnej replikacji nie powinny być znakowane, zawierały odcinki radioaktywne. Inną metodą pozwalającą na obserwację SCE było badanie chromosomów pierścieniowych [3], które po nieparzystej liczbie wymian tworzą chromo-

somy dicentryczne. Dużą zaletą tej metody była eliminacja radioaktywnego trytu, zwiększającego częstość wymian [3, 28].

W 1972 r. Zakharov i Egolina [42] stwierdzili, że po inkubacji komórek w środowisku zawierającym analog tymidyny 5 - bromodezoksyurydynam (BUdR), chromatydy mające wbudowaną BUdR w obie nici podwójnej spirali DNA (B-B) wiążą mniej barwnika Giemsy niż chromatydy, w których tylko jedna nić spirali zawiera BUdR (B-T). Od tego momentu zaczęto stosować wiele rozmaitych technik różnicowania chromatyd siostrzanych, opartych na ich różnej barwliwości po włączeniu do DNA BUdR lub IUdR (5 - jododezoksyurydynam).

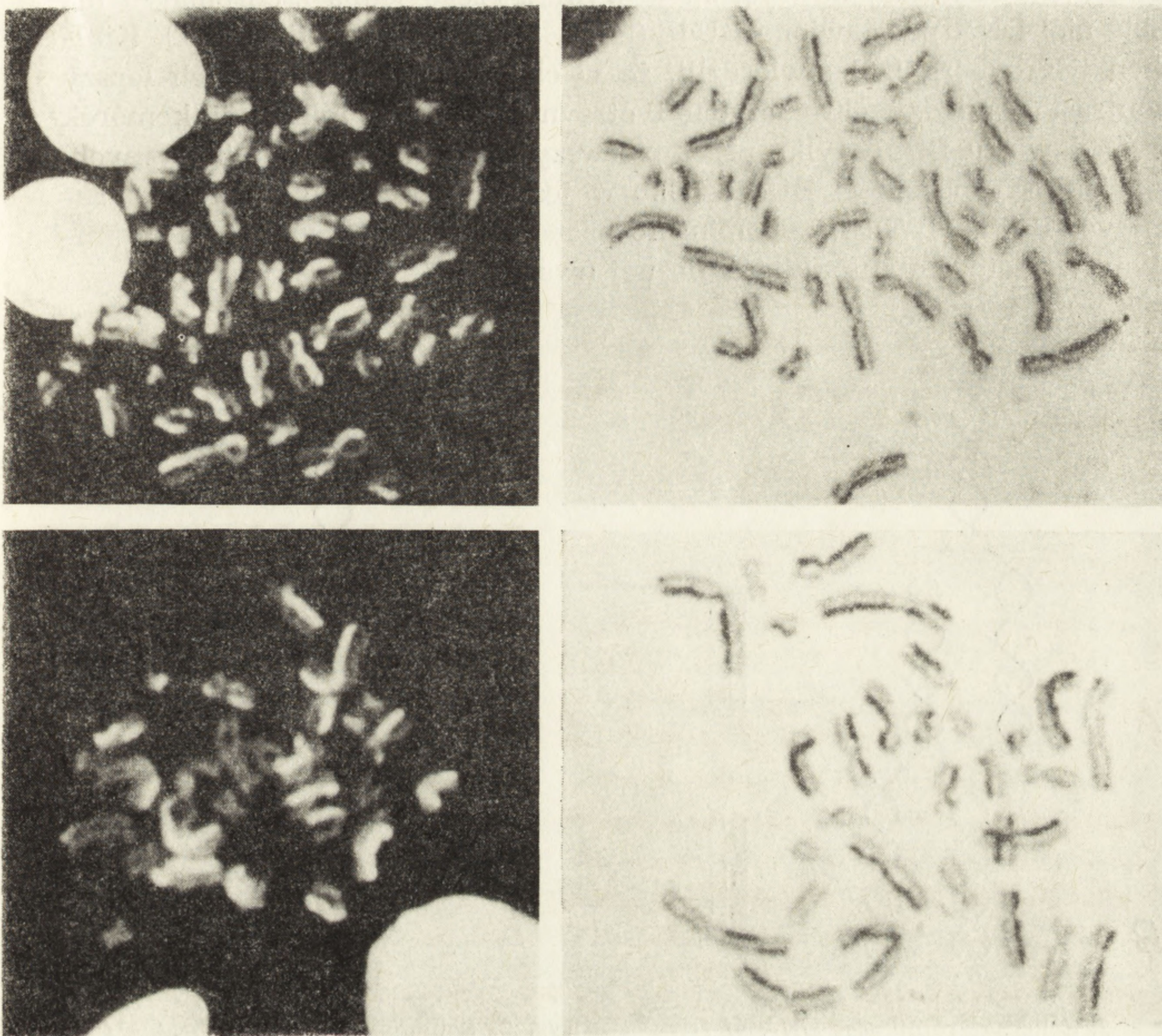
Już po wybarwieniu, standardową metodą Giemsy, chromosomów hodowanych w środowisku BUdR lub IUdR widoczna jest różnica intensywności zabarwienia siostrzanych chromatyd [14], co jest jeszcze wyraźniejsze po wybarwieniu oranżem akrydynam [8, 18, 31].

Zasadniczym jednak krokiem naprzód było wprowadzenie przez Latta metody barwienia fluorochromem 33258 Hoechst [19, 23-25, 29, 31]. Fluorescencja tego barwnika wygaszana jest w obecności (B-B) DNA. Rozwinięciem i uzupełnieniem tej metody jest technika kolejnego barwienia preparatów najpierw fluorochromem 33258 Hoechst, a następnie barwnikiem Giemsy [10, 29, 31, 32, 35, 40, 41], co daje w ostatecznym wyniku trwałe, kontrastowo zabarwione preparaty. Podobne efekty można też uzyskać bez użycia odczynnika 33258 Hoechst, stosując metodę barwienia roztworem Giemsy według Korenberg i Freedlender [22].

Wszystkie wymienione metody dają w efekcie odmienne wybarwienie siostrzanych chromatyd, a miejsca SCE są łatwe do identyfikacji (rys. 1).

Stosowane metody różnicowego barwienia siostrzanych chromatyd opierają się na modelu semikonserwatywnej replikacji DNA.

W wyniku wprowadzenia do struktury DNA radioaktywnych prekursorów lub analogów zasad następuje po dwóch podziałach komórkowych zróżnicowanie radioaktywności lub zabarwienia chromatyd. Chronologicznie pierwszą ze stosowanych metod była autoradiografia. Analiza lokalizacji ziaren srebra w emulsji nad chromosomem pozwala identyfikować miejsca wymian w punktach, w których przechodzą one z jednej chromatydy na drugą. Niedogodnością tej metody jest jednak stosunkowo duży rozrzut ziaren utrudniający bardzo lokalizację inkorporowanego izotopu. Prowadzi to do sytuacji, w której ziarna srebra leżą jednocześnie nad obydwoma chromatydami, tzw. „isolabelling”, lub nad żadną — „isononlabelling”. Zjawiska te, ostatnio oceniane jako artefakty [7, 40, 41], w okresie badań SCE jedynie techniką autoradiograficzną doprowadziły do tworzenia hipotez teoretycznych dotyczących struktury chromosomu (sugerowano strukturę wieloniciową, poddawano



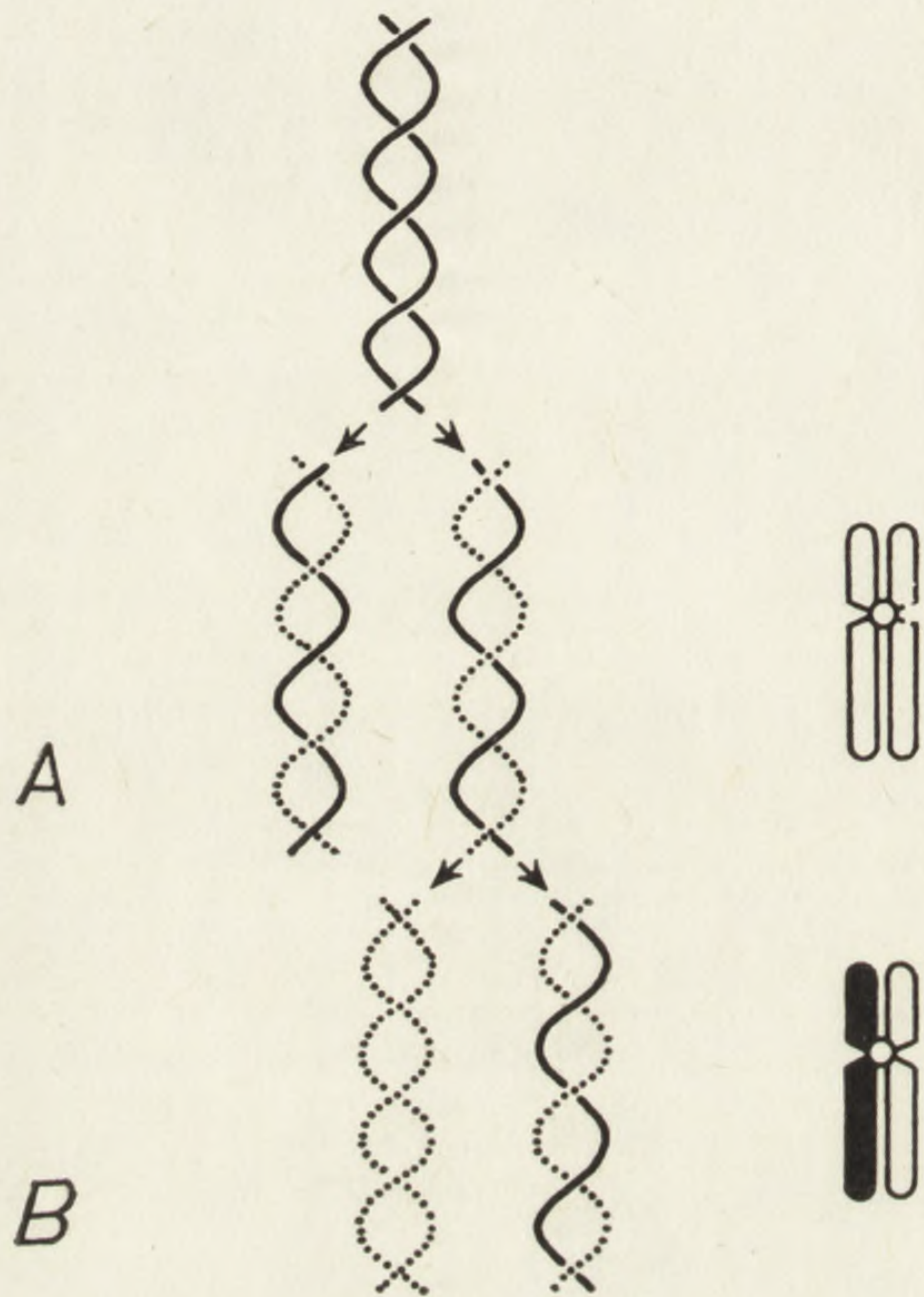
Rys. 1. Odmiennie barwienie chromatyd siostrzanych w limfocytach człowieka, uzyskane przy zastosowaniu technik barwienia fluorochromem 33258 Hoechst oraz techniki kolejnego barwienia fluorochromem 33258 Hoechst, a następnie roztworem barwnika Giemsy. Chromatydę zawierającą (B-T) DNA fluoryzuje jasno (zdjęcia lewe) i barwią się intensywniej odczynnikami Giemsy (zdjęcia prawe). W górnym rzędzie umieszczono zdjęcia chromosomów pochodzących z komórek, które przebyły dwa podziały w środowisku BUdR, w rzędzie dolnym — zdjęcia chromosomów komórek, które dzieliły się w obecności BUdR trzykrotnie

nawet w wątpliwość semikonserwatywny model replikacji DNA). Stwierdzono poza tym, że promieniowanie trytowanej tymidyny indukuje powstawanie wymian chromatyd [3, 28].

Następna grupa metod oparta jest na różnej barwliwości chromatyd, mających wbudowaną BUdR lub IUdR do jednej (B-T) lub dwóch nici podwójnej spirali DNA. Stwierdzono jednocześnie, że chromatydę te różnią się gęstością optyczną i elektronową [22].

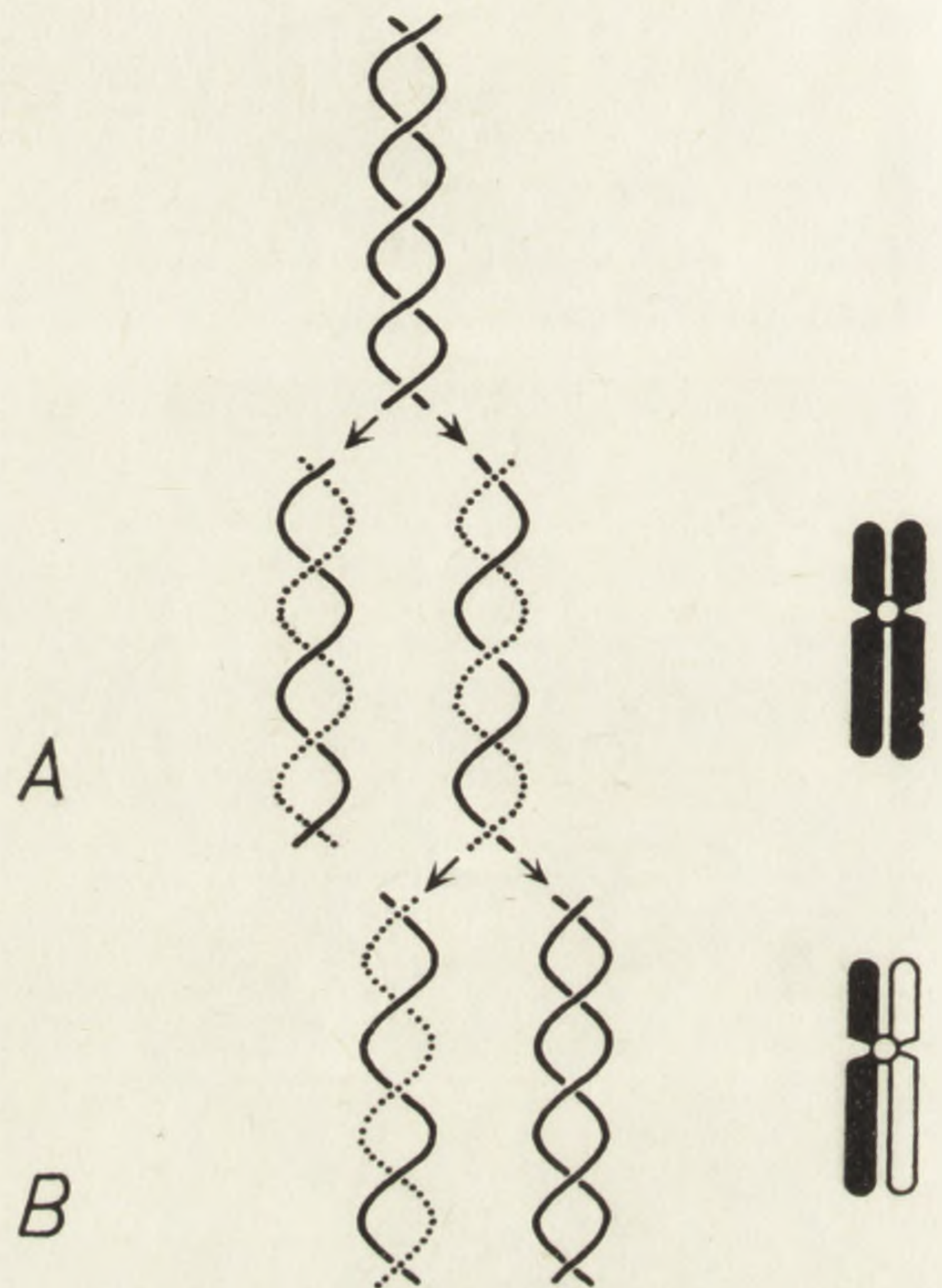
Komórki zwierzęce i ludzkie inkubuje się w roztworze BUdR przez

dwa cykle replikacyjne (rys. 2), w wyniku czego jedna z chromatyd ma obie nici DNA podstawione BUdR (B-B), a druga tylko jedną (B-T). Kihlman i Kronborg [20] stwierdzili, że w chromosomach roślinnych lepszy kontrast pomiędzy chromatydami otrzymuje się po inkubacji komórek w środowisku BUdR tylko przez pierwszy z dwóch cykli replikacyjnych, a więc przy obecności BUdR tylko w jednej nici jednej z dwóch chromatyd (B-T i (T-T). Przypomina to proporcję inkorporowanej ^3H -tymidyny w metodzie autoradiograficznej (rys. 3).



Rys. 2. Schemat replikacji DNA w środowisku zawierającym BUdR przez okres dwóch cykli podziałowych.

A — po pierwszym podziale chromatyd zawiera BUdR w jednej nici spirali DNA (B-T); B — po drugim podziale chromatyda (B-T) barwi się odmiennie niż siostrzana, mająca BUdR w obu niciach spirali DNA (B-B)



Rys. 3. Schemat replikacji DNA w środowisku zawierającym BUdR lub ^3H -tymidynę przez pierwszy z dwóch cykli podziałowych.

A — po pierwszym podziale obie chromatyd zawiera BUdR (B-T); B — po drugim podziale chromatyda (B-T) barwi się odmiennie niż siostrzana, nie zawierająca BUdR (T-T). W przypadku autoradiografii tylko jedna chromatyda zawiera ^3H -tymidynę

Metody analizy SCE oparte na włączaniu analogów zasad (BUdR, IUdR) są bardziej selektywne niż metoda autoradiografii, co pozwoliło na stwierdzenie, że wspomniane zjawisko „isolabelling” spowodowane było dużą ilością wymian na małym odcinku chromosomu [22, 40].

5 - Bromodezoksyurydyna jest analogiem tymidyny o znanych właściwościach mutagennych [7, 9, 13, 15, 34, 36], powodującym zmiany

w strukturze chromosomów [2, 11, 30, 43]. Z tego względu metoda ta nie jest również pozbawiona wady jaką jest indukowanie wymian chromatyd przez inkorporowaną BUdR. Stwierdzono jednak, że w stężeniach powszechnie stosowanych wpływ BUdR jest stosunkowo niewielki [10, 18, 24, 40]. Częstość wymian opisywana w pracach wykonanych przy użyciu BUdR [3, 8, 10, 19, 24, 25, 35] jest podobna do ustalonej na podstawie badań wymian w chromosomach pierścieniowych [3].

TABELA. Częstość wymian siostrzanych chromatyd w przeliczeniu na płytkę metafazalną, badana przez różnych autorów na materiale ludzkim (limfocyty krwi obwodowej)

Stosowane stężenie BUdR (mikromole)	Ilość SCE/płytkę metafazalną	Literatura
—	12,8	3
10	8,8	35
12	12	24
20*	14	25
66	14 (4—35)	19
160	14	10
660	27,3	8

* Stosowano dodatek 0,4 μM fluorodezoksyurydyny i 6 μM urydyny.

Podstawowym zagadnieniem dotyczącym wymian chromatyd jest określenie częstości występowania wymian w przeliczeniu na płytkę metafazową. Wyniki prac niektórych autorów przedstawia tabela. Jak wynika z zawartych w niej danych, stwierdzana przez różnych badaczy częstość SCE jedynie w sposób bardzo przybliżony koreluje ze stosowanymi przez nich stężeniami BUdR. Trudno wytłumaczyć te rozbieżności jako wynik zróżnicowania populacji, gdyż ci sami autorzy stwierdzają brak większych różnic międzyosobniczych, jak również brak różnic częstości SCE w zależności od wieku i płci badanych [8, 10]. Porównanie częstości wymian obserwowanych w chromosomach roślinnych i zwierzęcych, wykonane metodą proporcjonalnego przeliczenia częstości wymian na masę DNA chromosomów, wykazało dużą zgodność z wynikami uzyskanymi dla chromosomów limfocytów człowieka *in vitro* [20]. Znamienne niższy poziom częstości wymian obserwowano w chromosomach komórek szpiku i spermatogonii myszy *in vivo* [1, 38].

Należy przypuszczać, że BUdR inkorporowana jest do obszarów chromosomów bogatych w pary A-T. Ze względu na to, że indukuje ona wymiany chromatyd [10, 24, 40] badano, czy istnieje zależność pomiędzy składem zasad DNA i ilością SCE w określonych okolicach chromosomów.

Ogólnie stwierdzono, że ilość wymian chromatyd przeliczona na

chromosom jest proporcjonalna do jego długości [14, 24, 35], co jest zgodne z rozkładem Poissona [8, 10]. W zasadzie nie wykazano różnic w częstości występowania SCE dla chromosomów ludzkich bogatych w heterochromatynę [10, 24]. Niekiedy obserwowano jednak, że niektóre obszary poszczególnych chromosomów człowieka biorą częstszy lub rzadszy udział w wymianach. Zwiększoną ilość wymian obserwowano w obszarach przylegających do intensywnych prążków Q chromosomu nr 1 [25] oraz prawdopodobnie w odcinku heterochromatynowym chromosomu Y [10]. Rzadszy niż należałoby oczekiwać jest udział w wymianach małych chromosomów człowieka [25, 35]. U chomika chińskiego stwierdzono zwiększenie częstości wymian w chromosomie nr 1, co wykazano zarówno przy zastosowaniu BUdR, jak i IUdR [14]. Podobnie znaczny wzrost częstości SCE wykazano w chromosomach X nornicy (*Microtus agrestis*) zawierających duże bloki heterochromatyny [29]. W przeciwieństwie do wzrostu ilości SCE w obrębie heterochromatyny nornicy i — częściowo — człowieka, obserwowano obniżenie ilości wymian w odcinkach heterochromatynowych muntjaka [4]. Różnią się one jednak składem od heterochromatyny nornicy lub człowieka — nie zawierają zwiększonej w stosunku do euchromatyny ilości par A-T.

Badania nad wewnątrzchromosomową lokalizacją wymian w chromosomach ludzkich limfocytów wykazały, że zachodzą one najczęściej na obszarze międzyprążków lub na styku prążka Q z międzyprążkiem [24, 25]. Zwiększoną ilość wymian obserwowano również w okolicach centromerów [12, 35] oraz, według niektórych autorów, w rejonach heterochromatynowych [9, 19].

Dotychczasowe informacje o lokalizacji SCE w obrębie chromosomów mają charakter wstępny. Szersze poznanie tego problemu być może pozwoli na powiązanie charakteru wymian chromatyd ze strukturą chromosomu.

Wpływ mutagennych związków chemicznych na zwiększenie częstości SCE jest kilkaset razy silniejszy od wywieranego przez nie wpływu na wywoływanie aberracji strukturalnych chromosomów [24]. Spośród tych związków badano trzy grupy o znanej budowie chemicznej i stosunkowo znanych mechanizmach działania:

a. Związki alkilujące o więcej niż jednej grupie alkilowej (tzw. związki dwu- i wieloczynnościowe). Charakteryzują się one m. in. zdolnością do tworzenia mostków poprzecznych pomiędzy komplementarnymi niciami DNA (cross-links). Działanie to według niektórych autorów jest odpowiedzialne za wzrost częstości wymian chromatyd [24]. Z tej grupy badano Mitomycynę C [6, 24, 27, 32] i iperyt azotowy [32]. Stwierdzono, że mają one najsilniejszą spośród badanych związków zdolność do indukowania wymian.

b. Związki z jedną grupą alkilową (tzw. związki pojedynczego działania). Mechanizmy ich reagowania z DNA są identyczne jak grupy poprzedniej, nie tworzą one jednak mostków. Ich zdolność do indukowania wymian chromatyd jest mniejsza niż związków alkilujących wieloczynnościowych [32].

Zdolność indukowania wymian przez te dwie grupy związków jest porównywalna z intensywnością wywoływania przez nie aberracji chromosomowych. Nie ma natomiast korelacji z intensywnością indukowania mutacji punktowych [32].

c. Związki działające przez interkalację do podwójnej spirali DNA — iperyt akrychiny, adriamycyna. Stwierdzono, że również ta grupa związków posiada zdolność zwiększania częstości wymian [32].

Nowe, ciekawe możliwości analizy wpływu substancji chemicznej na częstość SCE otwiera opisana ostatnio metoda badań *in vivo* [1, 38]. Polega ona na podawaniu zarówno substancji badanej, jak i BUdR do organizmu zwierzęcia laboratoryjnego. Sposób ten eliminuje wpływ warunków hodowli komórek *in vitro* na wyniki, pozwala również badać działanie na organizm związków wytwarzanych w wyniku metabolizmu substancji wyjściowej. Godnym uwagi jest fakt znacznie niższej częstości wymian obserwowanych przy zastosowaniu tej metody.

W przeciwieństwie do działania mutagenów chemicznych stwierdzono, że po napromieniowaniu X wzrost częstości wymian chromatyd jest mniejszy niż wzrost ilości aberracji chromosomowych [32]. Wykazano, że w celu zwiększenia ilości wymian należy komórkę napromieniować w fazie G_1 lub S, natomiast napromieniowanie w fazie G_2 nie daje takiego efektu [32]. Częstość wymian zwiększana jest nie tylko przez promieniowanie X, ale również przez promieniowanie beta inkorporowanego trytu [3, 28].

Rola promieniowania UV polega prawdopodobnie na tworzeniu dimerów tyminy, które są stopniowo usuwane z DNA. Wymaga to stosunkowo długiego czasu i zależy od wydolności poreplikacyjnej naprawy DNA. Stwierdzono, że podobnie jak w przypadku promieniowania X, zwiększenie częstości SCE wymaga naświetlenia komórki w fazie G_1 lub wczesnej S [16]. W celu sprawdzenia możliwości istnienia związku pomiędzy wymianami a poreplikacyjną naprawą DNA, do badań użyto linii komórkowej zawierającej sprawny mechanizm fotoreaktywacyjny [17]. Porównując ilość SCE w komórkach naświetlonych UV, a następnie hodowanych na świetle lub w ciemności, stwierdzono wyższy ich poziom w warunkach, w których fotoreaktywacja nie mogła mieć miejsca. Fakt ten, jak również obserwowany spadek częstości wymian po podaniu kofeiny — znanego inhibitora poreplikacyjnej naprawy DNA

[16] — przemawiałby za istnieniem ścisłego związku pomiędzy tymi dwoma zjawiskami. Związek taki jest jednak podawany w wątpliwość przez innych autorów [21].

Światło widzialne posiada również zdolność zwiększania ilości wymian chromatyd [14, 40] pod warunkiem, że DNA komórek zawiera w swoim składzie inkorporowaną BUdR lub IUdR, znane jako czynniki fotoreaktywne.

Panuje pogląd, zgodnie z którym wymiany siostrzanych chromatyd uważa się za naprawione uszkodzenia struktury chromosomu, niewykrywalne w badaniach rutynowych [24, 32]. W związku z tym zainteresowano się częstością występowania SCE w jednostkach chorobowych ze zmniejszoną stabilnością struktury chromosomów. Takimi chorobami, w których prawdopodobnie uszkodzony jest biochemiczny mechanizm naprawy DNA, są m. in.: zespół Blooma [5, 6, 33], anemia Fanconiego [26, 35], ataxia telangiectasia [10] i xeroderma pigmentosum [40]. Jedynie w zespole Blooma stwierdzono znaczny wzrost częstości wymian chromatyd, natomiast ich ilość w pozostałych jednostkach chorobowych nie odbiegała od normy. Sugeruje to istnienie odmiennych defektów biochemicznych naprawy DNA w wymienionych chorobach.

Podsumowując przedstawione wyniki badań należy stwierdzić, że wymiany siostrzanych chromatyd wykazywane opisanymi metodami wydają się być czułym wskaźnikiem działania czynników pośrednio lub bezpośrednio uszkadzających DNA komórek organizmów wyższych lub uszkadzających mechanizmy naprawcze DNA. Wynika stąd perspektywa zastosowania ich analizy do badania wpływu czynników egzogennych na organizm, badania i być może diagnozowania niektórych jednostek chorobowych, oceny działania leków. Z drugiej strony, nie jest wykluczone, że badanie SCE może poszerzyć wiadomości o strukturze chromosomów organizmów eukariotycznych.

LITERATURA

- [1] ALLEN J. W., LATT S. A., Analysis of sister chromatid exchange formation in vivo in mouse spermatogonia as a new test system for environmental mutagens, *Nature*, **260**: 449-451, 1976.
- [2] BARANOVSKAYA L. I., ZAKHAROV A. F., DUTRILLAUX B., CARPENTIER S., PRIEUR M., LEJEUNE J., Différentiation des chromosomes X par les méthodes de despiralisation au 5-bromodéoxyuridine et de dénaturation thermique ménagée, *Ann. Génét.*, **15**: 271, 1972.
- [3] BREWEN J. G., PEACOCOK W. J., The effect of tritiated thymidine on sister-chromatid exchange in a ring chromosome, *Mutat. Res.*, **7**: 433-440, 1969.

- [4] CARRANO A. V., WOLFF S., Distribution of sister chromatid exchanges in the euchromatin and heterochromatin of the Indian muntjac, *Chromosoma*, **53**: 361-371, 1975.
- [5] CHAGANTI R. S. K., SCHONBERG S., GERMAN J., A manifold increase in sister chromatid exchanges in Bloom's syndrome lymphocytes, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **71**: 4508-4512, 1974.
- [6] COMINGS D. E., Implications of somatic recombination and sister chromatid exchanges in Bloom's syndrome and cells treated with Mitomycin C, *Humangenetik*, **28**: 191-197, 1975.
- [7] DEWEY W. C., STONE L. E., Sister chromatid exchanges and lack of isolabelling in Chinese hamster chromosomes, *Exp. Cell Res.*, **94**: 299-310, 1975.
- [8] DUTRILLAUX B., FOSSE A. M., PRIEUR M., LEJEUNE J., Analyse des échanges de chromatides dans les cellules somatiques humaines. Traitement au BUdR (5 - bromodéoxyuridine), et fluorescence bicolore par l'Acridine Orange, *Chromosoma*, **48**: 327-340, 1974.
- [9] ENGEL W., KRONE W., WOLE U., Die Wirkung von Thioguanin, Hydroxylamin und 5 - Bromodeoxyuridin auf menschliche Chromosomen in vitro, *Mutat. Res.*, **4**: 353-368, 1967.
- [10] GALLOWAY S. M., EVANS H. J., Sister chromatid exchange in human chromosomes from normal individuals and patients with ataxia telangiectasia, *Cytogenet. Cell Genet.*, **15**: 17-30, 1975.
- [11] GENEIX A., FELLMANN N., JAFFRAY J. Y., Chromosomes humains après incorporation de la 5 - bromodéoxyuridine: observations en microscopie électronique, *C. R. Acad. Sci. Paris, Serie D*, **280**: 1151-1152, 1975.
- [12] HERREROS B., GIANELLI F., Spatial distribution of old and new chromatid sub - units and frequency of chromatid exchanges in induced human lymphocyte endoreduplications, *Nature*, **216**: 286-288, 1967.
- [13] HSU T. C., SOMERS C. E., Effect of 5 - bromodeoxyuridine on mammalian chromosomes, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **47**: 396-403, 1961.
- [14] IKUSHIMA T., WOLFF S., Sister chromatid exchanges induced by light flashes to 5 - bromodeoxyuridine — and 5 - iododeoxyuridine substituted Chinese hamster chromosomes, *Exp. Cell Res.*, **87**: 15-19, 1974.
- [15] KABACK M. M., SAKSELA E., MELLMAN W. J., The effect of 5 - bromodeoxyuridine on human chromosomes, *Exp. Cell Res.*, **34**: 182-212, 1964.
- [16] KATO H., Induction of sister chromatid exchanges by UV light and its inhibition by caffeine, *Exp. Cell Res.*, **82**: 383-390, 1973.
- [17] — Photoreactivation of sister chromatid exchanges induced by ultraviolet irradiation, *Nature*, **249**: 552-553, 1974.
- [18] — Spontaneous sister chromatid exchanges detected by a BUdR - labelling method, *Nature*, **251**: 70-72, 1974.
- [19] KIM A., Chromatidaustausch und Heterochromatinveränderungen menschlicher Chromosomen nach BUdR - Markierung, *Humangenetik*, **25**: 179-188, 1974.
- [20] KIHLMAN B. A., KRONBORG D., Sister chromatid exchanges in *Vicia faba*. I. Demonstration by a modified fluorescent plus Giemsa (FPG) technique, *Chromosoma*, **51**: 1-10, 1975.
- [21] KIHLMAN B. A., Sister chromatid exchanges in *Vicia faba*. II. Effects of thiotepa, caffeine and 8 - ethoxycaffeine on the frequency of SCE's, *Chromosoma*, **51**: 11-18, 1975.

- [22] KORENBERG J. R., FREEDLENDER E. F., Giemsa technique for the detection of sister chromatid exchanges, *Chromosoma*, **48**: 355-360, 1974.
- [23] LATT S. A., Microfluorometric detection of deoxyribonucleic acid replication in human metaphase chromosomes, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **70**: 3395-3399, 1973.
- [24] — Sister chromatid exchanges, indices of human chromosome damage and repair: detection by fluorescence and induction by Mitomycin C, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **71**: 3162-3166, 1974.
- [25] — Localization of sister chromatid exchanges in human chromosomes, *Science*, **185**: 74-76, 1974.
- [26] LATT S. A., STETTEN G., JUERGENS L. A., BUCHANAN G. R., GERALD P. S., Induction by alkylating agents of sister chromatid exchanges and chromatid breaks in Fanconi's anemia, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **72**: 4066-4071, 1975.
- [27] LIN M. S., DAVIDSON R. L., Centromeric asymmetry and induction of translocations and sister chromatid exchanges in mouse chromosomes, *Nature*, **254**: 354-356, 1975.
- [28] MARIN G., PRESCOTT D. M., The frequency of sister chromatid exchanges following exposure to various doses of ³H - thymidine or X - rays, *J. Cell Biol.*, **21**: 159-167, 1964.
- [29] NATARAJAN A. T., KLÁSTERSKÁ I., Heterochromatin and sister chromatid exchanges in the chromosomes of *Microtus agrestis*, *Hereditas*, **79**: 150-154, 1975.
- [30] PALMER C. G., 5 - Bromodeoxyuridine induced constrictions in human chromosomes, *Canad. J. Genet. Cytol.*, **12**: 816-830, 1970.
- [31] PERRY P., WOLFF S., New Giemsa method for differential staining of sister chromatids, *Nature*, **251**: 156-158, 1974.
- [32] PERRY P., EVANS H. J., Cytological detection of mutagen-carcinogen exposure by sister chromatid exchange, *Nature*, **258**: 121-125, 1975.
- [33] SCHROEDER T. M., Sister chromatid exchanges and chromatid interchanges in Bloom's syndrome, *Humangenetik*, **30**: 317-325, 1975.
- [34] SCHWARTZ S. A., PANEM S., KIRSTEN W. H., Distribution and virogenic effects of 5 - bromodeoxyuridine in synchronized rat embryo cells, *Proc. Nat. Sci. USA*, **72**: 1829, 1975.
- [35] SPERLING K., WEGNER R. D., RIEHM H., OBE G., Frequency and distribution of sister - chromatid exchanges in a case of Fanconi's anemia, *Humangenetik*, **27**: 227-230, 1975.
- [36] STARK R. M., LITTLEFIELD J. W., BUdR mutagenesis in diploid human fibroblasts, *Mutat. Res.*, **22**: 281, 1974.
- [37] TAYLOR J. H., Sister chromatid exchanges in tritium labelled chromosomes, *Genetics*, **43**: 515-529, 1958.
- [38] VOGEL W., BAUKNECHT T., Differential chromatid staining by in vivo treatment as a mutagenicity test system, *Nature*, **260**: 448-449, 1976.
- [39] WOLFF S., BODYCOTE J., THOMAS G. H., CLEAVER J. E., Sister chromatid exchanges in Xeroderma pigmentosum cells that are defective in DNA excision repair or post - replication repair, *Genetics* **81**: 349-355, 1975.
- [40] WOLFF S., PERRY P., Differential Giemsa staining of sister chromatids and the study of sister chromatid exchanges without autoradiography, *Chromosoma*, **48**: 341-353, 1974.
- [41] — Insights on chromosome structure from sister chromatid exchange ratios

and the lack of both isolabelling and heterolabelling as determined by the FPG technique, *Exp. Cell Res.*, **93**: 23-30, 1975.

- [42] ZAKHAROV A. F., EGOLINA N. A., Differential spiralization along mitotic chromosomes. I. BUdR - revealed differentiation in Chinese hamster chromosomes, *Chromosoma*, **38**: 341-365, 1972.
- [43] ZAKHAROV A. F., BARANOVSKAYA L. I., IBRAIMOV A. I., BENJUSCH V. A., DEMITSEVA V. S., OBLAPENKO N. G., Differential spiralization along mammalian mitotic chromosomes. II. 5 - bromodeoxyuridine revealed differentiation in human chromosomes, *Chromosoma*, **44**: 343, 1974.

Otrzymano: 4 czerwca 1976.

Przyjęto: 16 czerwca 1976.

Adres autorów: Pl. 9 Maja 1, 90-647 Łódź.

MAPOWANIE LUDZKIEGO GENOMU

Małgorzata SCHMIDT, Antoni HORST i Włodzimierz Maciej STOLZMANN

Zakład Genetyki Człowieka PAN

Streszczenie. Wprowadzenie metod hybrydyzacji komórek somatycznych, hybrydyzacji kwasów nukleinowych *in situ*, mapowania delecyjnego oraz kombinacji tych metod wraz z osiągnięciami klasycznej metody mapowania doprowadziło do znacznego postępu w dziedzinie mapowania ludzkich chromosomów i pozwoliło na uzyskanie informacji o lokalizacji około 10% znanych loci w poszczególnych chromosomach.

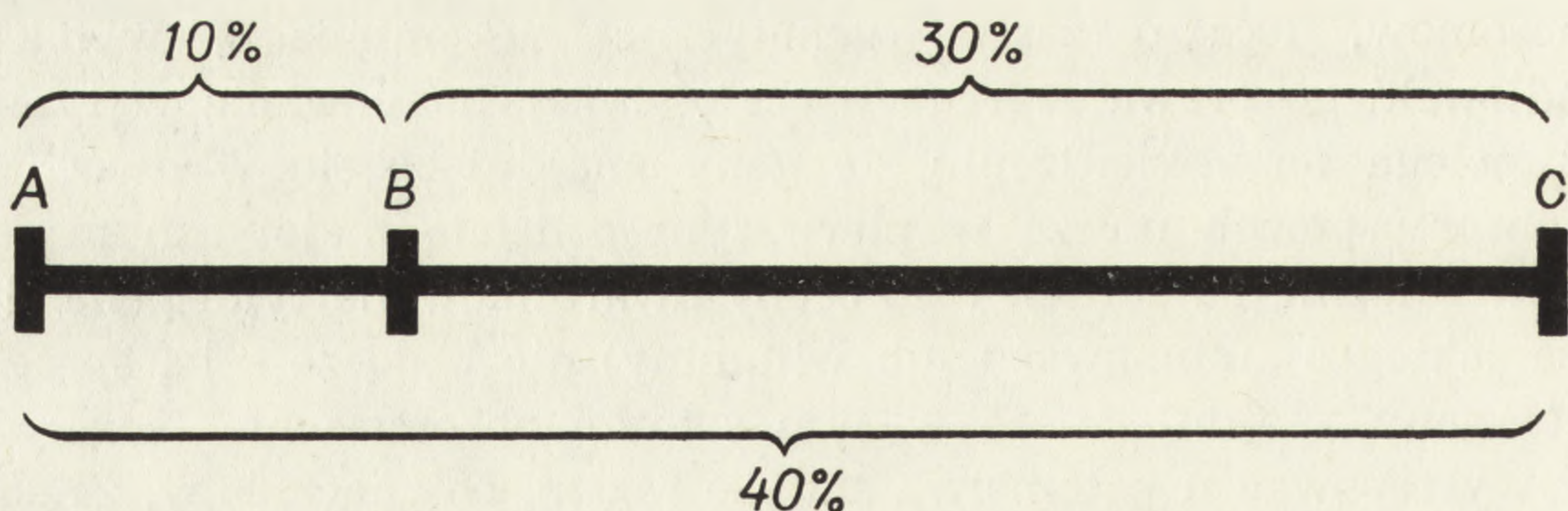
Przedstawiono zasady wymienionych metod, możliwości mapowania przy ich zastosowaniu oraz uzyskiwane rezultaty, jak również perspektywy wynikające z ustalenia mapy genomu człowieka dla biologii i medycyny.

Mapowanie ludzkiego genomu polega na możliwie najdokładniejszym określeniu umiejscowienia poszczególnych genów w chromosomach. Składa się na to zarówno określenie występowania poszczególnych genów na konkretnych chromosomach, jak i tzw. mapowanie regionalne, polegające na określeniu obszaru chromosomu, w którym znajduje się dany gen.

METODA KLASYCZNA MAPOWANIA LUDZKIEGO GENOMU

Do najwybitniejszych osiągnięć klasycznej genetyki należały konstrukcje genetycznych map chromosomów. Określenie „mapa genetyczna” nie jest najbardziej trafne, gdyż w tym wypadku nie konstruowano map rozmieszczenia genów na podstawie morfologicznych kryteriów chromosomów, lecz o zasadę genetycznej rekombinacji, wynikającą z mendlowskiego prawa segregacji cech. Zasada mapowania w tym wypadku polega na stwierdzeniu, że geny znajdujące się w dwóch różnych chromosomach muszą w pierwszym podziale mejotycznym segregować niezależnie i wskutek tego cechy uwarunkowane tymi genami (np. synteza jakiegoś aminokwasu lub witaminy) nie będą ze sobą sprzężone. Z kolei geny znajdujące się w tym samym chromosomie teoretycznie winny występować u potomstwa zawsze razem, co znaczyłoby, że są one ze sobą sprzężone. Tak jednak jest nie zawsze, gdyż z powodu „crossing over”, prowadzącego do wymiany fragmentów pomiędzy homologicz-

nymi chromosomami, mimo że obydwie badane geny znajdują się na tym samym chromosomie, mogą one u potomstwa wystąpić rozdzielnie, w zależności od odległości w jakiej znajdują się one w chromosomie. Blisko siebie położone geny z reguły nie rozdzielają się, co oznacza, że są one ze sobą sprzężone, natomiast daleko od siebie położone mogą wystąpić rozdzielnie, lub też razem, co zależy od losowej wymiany fragmentów w „crossing over”. W poszczególnych parach genów wspólnie segregujących „crossing over” zachodzi z określoną i stałą częstością, która może różnić się znacznie dla różnych par genów. Na podstawie częstości rekombinacji spowodowanej „crossing over” określa się odległości mapowe między sprzężonymi genami, co w konsekwencji pozwala na ustalenie liniowego układu „loci” genów w chromosomie. Odległości mapowe wyraża się zazwyczaj w procentowych wartościach „crossing over” przyjmując, że jednostką odległości mapowej między sprzężonymi genami jest odcinek, w którym zachodzi jeden procent rekombinacji. W wypadku, kiedy w potomstwie występuje 50% typów rodzicielskich i 50% typów rekombinacyjnych przyjmuje się, że ich rozdział był spowodowany szansą statystyczną, a nie sprzężeniem, wynikającym z występowania badanych genów w tym samym fragmencie chromosomu, ulegającym „crossing over”. Im mniejszy jest procent rekombinantów, tym bliżej siebie w chromosomie muszą się znajdować badane geny, czyli ich odległość wyrażona wielkością procentu rekombinantów jest mniejsza. Odwrotnie — im większy procent rekombinantów badanych genów, tym ich odległość mapowa jest większa aż do całkowitego braku sprzężenia (przy 50% rekombinantów). Mając tylko dwie cechy nie można jeszcze określić ich odległości mapowej, gdyż dopiero wyznaczenie odległości mapowych pomiędzy genami kilku cech może prowadzić do celu. Na przykład występowanie w badanym teście rekombinantów z cechami A i B w 10%, rekombinantów z cechami B i C w 30% i rekombinantów z cechami A i C w 40% pozwala wyznaczyć odległości rekombinacyjne, czyli mapowe genów dla tych trzech cech.



Rys. 1. Wyznaczanie odległości mapowych trzech genów na podstawie procentu rekombinantów. Objasnienia w tekście

Opisana metoda jest przydatna jedynie do mapowania regionalnego, ponieważ wykrywa sprzężenia i wzajemne stosunki położeniowe genów, ale nie określa konkretnego chromosomu, którego to sprzężenie dotyczy, pozwalając jedynie na rozróżnienie chromosomu X i autosomów. Stąd dla określenia mapowanego chromosomu niezbędny staje się marker. Takim markerem może być np. cecha przypisana do danego chromosomu na zasadzie aberracji chromosomowej spowodowanej mutacją. W odniesieniu do wszystkich cech sprzężonych z cechą markerową można sugerować, że wszystkie one występują w tym samym chromosomie, w odpowiednich odległościach mapowych.

Przedstawiony prosty sposób mapowania w istocie rzeczy jest dużo bardziej skomplikowany, na co składa się szereg dodatkowych czynników, jak wielokrotny „crossing over” pomiędzy badanymi cechami i występowanie w testowanych komórkach znacznej liczby chromosomów, dzięki czemu liczba dających się konstruować map sprzężeń (inaczej map genetycznych) odpowiada liczbie chromosomów występujących w komórce. Inne poważne trudności wynikają z długiego czasu trwania generacji ludzkiej, małej liczebności rodzin, niemożności kontrolowanego krzyżowania osobników i brak wariantów genetycznych poszczególnych produktów genowych. Z tych powodów dla określenia odległości mapowych konieczne są krzyżówki pozwalające na uzyskanie potomstwa w olbrzymich ilościach, pozwalających na określenie średnich. Niemożność zaplanowania krzyżówek u ludzi oraz oczekiwanie na potomstwo w ciągu kilkunastu lat powoduje, że określenie odległości mapowych na tej drodze musiałoby ciągnąć się przez wiele pokoleń, wskutek czego ten sam badacz nigdy nie doszedłby do wyniku, a jedynie mógłby przekazywać częściowe wyniki swoich badań następnym pokoleniom badaczy. To wszystko czyni tę metodę mapowania chromosomów człowieka, niezależnie od jej moralno - etycznych aspektów, praktycznie bezużyteczną i ogranicza jej stosowanie jedynie do badania rodowodowego rodzin na podstawie archiwalnych danych. Toteż w dobie klasycznej genetyki człowiek był uważany za najbardziej niewdzięczny obiekt badań genetycznych.

Przykładami sprzężenia ustalonego metodą analizy rodowodów są geny grupy krwi Xg_a i geny związane z występowaniem daltonizmu oraz hemofilii, znajdujące się w chromosomie X.

Impas w dziedzinie poznawania genomu człowieka mógł być przezwyciężony dopiero z chwilą wprowadzenia nowych metod badania. Taką stała się przede wszystkim technika oparta o hybrydyzację komórek. Pierwszy Barski w 1960 r. wykrył zjawisko hybrydyzacji komórek somatycznych [2]. Początkowo zaprzeczano tej możliwości, ale już w kilka lat potem hybrydyzację uzyskiwano nie tylko przypadkowo, ale rozwi-

nięto metody pozwalające na uzyskiwanie nawet międzygatunkowych hybrydyzacji [8], co stało się podstawowym narzędziem w rozwiązywaniu mapy genetycznej chromosomów człowieka. Klasyczna metoda mapowania ludzkiego genomu jest dziś stosowana głównie w skojarzeniu z techniką hybrydyzacji komórek somatycznych, gdyż obie te metody dopełniają się wzajemnie, a metoda analizy rodowodów stanowi tu jak gdyby potwierdzenie w praktyce eksperymentalnie ustalonych danych.

W następnych latach opracowano dalsze techniki mapowania oraz udoskonalono już istniejące. Dzięki tym metodom postęp w dziedzinie mapowania chromosomów człowieka jest tak duży, że w ciągu zaledwie kilku lat doprowadził do zmapowania wielu dziesiątków genów na poszczególnych chromosomach, co pozwala żywić nadzieję, że przy rysujących się obecnie technicznych możliwościach, całkowite zmapowanie chromosomów człowieka może wcale nie być tak odległe, jak to się jeszcze wydawało przed kilku laty. Stąd też zapoznanie się z tą nową dziedziną wiedzy staje się niezbędne zarówno dla lekarzy, jak i genetyków, a w szerszym zakresie również dla wszystkich biologów.

TECHNIKA HYBRYDYZACJI KOMÓREK SOMATYCZNYCH

Mapowanie ludzkiego genomu zostało znacznie ułatwione dzięki technice międzygatunkowej hybrydyzacji komórek somatycznych, polegającej na fuzji komórek somatycznych człowieka z komórkami somatycznymi innych ssaków, zazwyczaj gryzoni. W technice tej miesza się w hodowli tkankowej fibroblasty ludzkie z komórkami gryzonia. Ponieważ spontaniczna fuzja komórek obu gatunków jest rzadka, dodaje się zwykle inaktywowanego wirusa Sendai, uszkadzającego zewnętrzne błony komórkowe, dzięki czemu łączenie się komórek zostaje ułatwione [15]. Po umieszczeniu komórek obu gatunków we wspólnym środowisku, wśród rosnących komórek można wyróżnić trzy rodzaje klonów komórkowych — klony wywodzące się z obu rodzajów komórek rodzicielskich, oraz klony komórek hybrydu. Celem wyizolowania tych ostatnich stosujemy różne systemy selekcyjne. Najczęściej stosowanym środowiskiem selekcyjnym, opartym na zjawisku lekooporności jest środowisko HAT, zawierające hipoksantynę, aminopterynę i tymidynę [17, 19, 27]. Aminopteryna blokuje endogenną syntezę nukleotydów, wskutek czego wzrost komórek w jej obecności występuje tylko wówczas, jeżeli prekursorzy nukleotydów — hipoksantyna i tymidyna, znajdują się w środowisku, a komórki posiadają niezbędne enzymy, umożliwiające zużytkowanie tych prekursorów — fosforybozylotransferazę hipoksantynową (HPRT) oraz kinazę tymidynową (TK). Jeśli więc hybrydujemy ludzkie fibroblasty wytwarzające oba te enzymy ze zmutowanymi komór-

kami gryzonia, niezdolnymi do produkcji jednego lub obu z nich, w środowisku HAT komórki gryzonia wyginą, a pozostaną tylko wolno rosnące i łatwe do wyeliminowania fibroblasty ludzkie oraz szybko dzielące się komórki hybrydu.

W podobny sposób można używać innych systemów selekcyjnych, opartych na mutantach warunkowo letalnych typu auksotroficznego [9] lub wrażliwego na temperaturę [32], występujących spontanicznie w hodowli lub indukowanych sztucznie. Dla wybiórczej eliminacji komórek jednego z gatunków można też wykorzystać różną wrażliwość komórek na niektóre glikozydy [16] lub promieniowanie radioaktywne [22]. W tych warunkach wyselekcjonowane komórki hybrydu wyrastają w liczne klony, wywodzące się z oddzielnych fuzji komórkowych. Liczba chromosomów różni się w poszczególnych klonach. Jest ona mniejsza od sumy chromosomów obu kariotypów rodzicielskich i zazwyczaj tylko nieco większa od liczby chromosomów gryzonia, ponieważ w komórkach hybrydu człowiek-gryzoń genom gryzonia utrzymuje się w zasadzie w całości, natomiast większość chromosomów ludzkich podlega losowej eliminacji. Nawiasem mówiąc, losowość tej utraty jest poddawana w wątpliwość, gdyż jedne chromosomy ludzkie pozostają w komórkach hybrydu znacznie częściej niż inne, co zdaje się przeczyć zasadzie całkowitej przypadkowości. Prawdopodobnie działają tu nie znane jeszcze mechanizmy powodujące wybiórczą eliminację lub retencję niektórych chromosomów w komórkach hybrydu [1, 14, 21]. W następstwie komórki poszczególnych klonów hybrydu człowiek-gryzoń zawierają różną liczbę i różny zestaw chromosomów ludzkich. Posługując się wspomnianymi systemami selekcyjnymi możemy drogą eliminacji spowodować pozostawanie w hybrydyzowanych komórkach chromosomów ludzkich, zawierających geny komplementujące zmutowaną część genomu gryzonia.

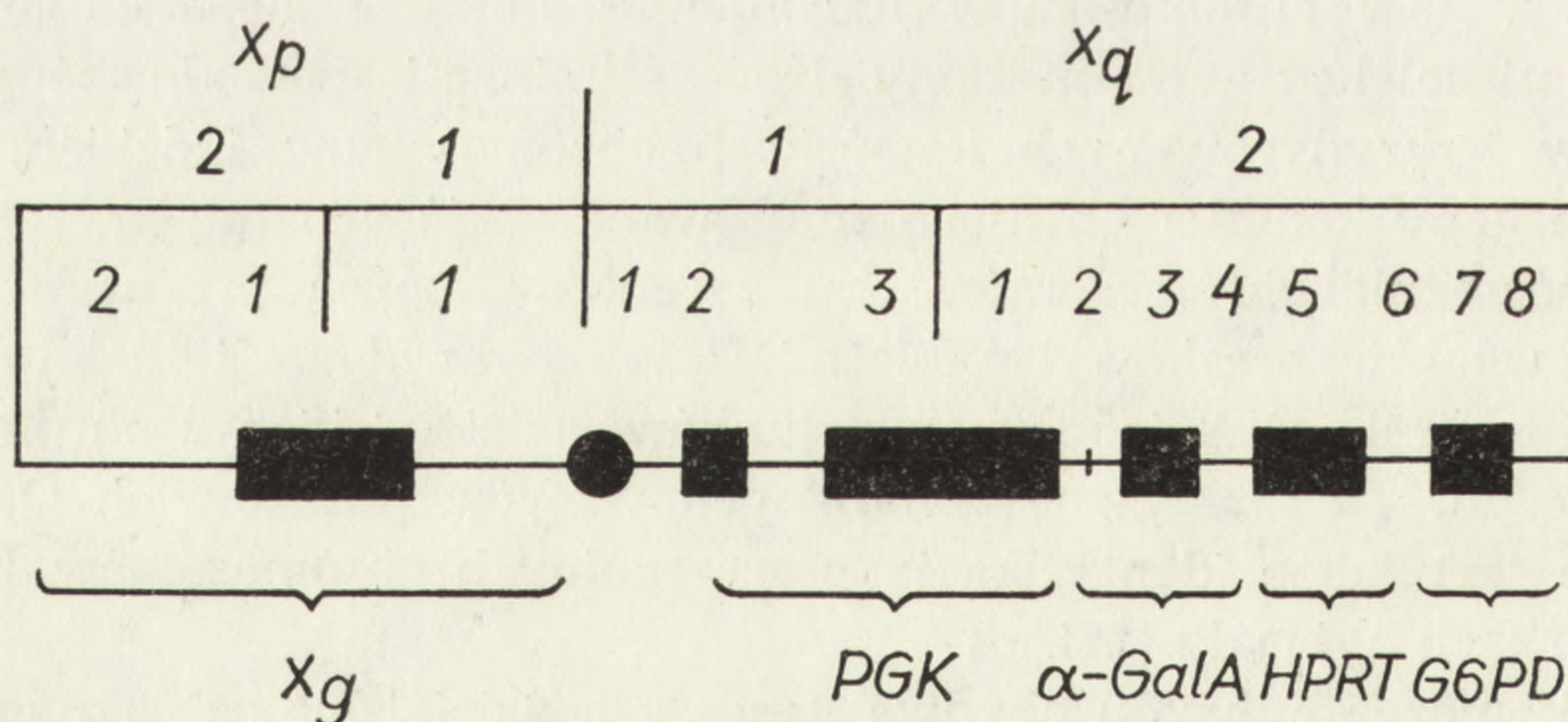
Odróżnienie chromosomów obu gatunków można przeprowadzić za pomocą wzorów prążkowych Q, G i C lub hybrydyzacji in situ satelitarnych frakcji DNA jednego z gatunków rodzicielskich z chromosomami hybrydu. Za pomocą wspomnianych wzorów prążkowych Q, G i C możliwa jest także identyfikacja poszczególnych chromosomów ludzkich w komórkach hybrydu [27].

W komórce hybrydu obydwie genomy rodzicielskie są czynne, dzięki czemu geny obu gatunków kodują specyficzne dla siebie białka. Używając metod elektroforetycznych można łatwo odróżnić homologiczne produkty genowe człowieka i gryzonia.

Produkty genów syntenicznych, czyli zlokalizowanych w tym samym chromosomie, występują w komórkach hybrydu wspólnie, całymi grupami, w zależności od obecności lub nieobecności w tych komórkach odpowiedniego chromosomu. Jeśli więc produkty dwóch określonych

genów segregują razem, czego wyrazem jest ich wspólna obecność lub nieobecność w różnych klonach hybrydu, dowodzi to, że ich geny są zlokalizowane w tym samym chromosomie. Stwierdzenie, który chromosom ludzki segreguje razem z tymi produktami genowymi umożliwia przypisanie genów tych produktów do tegoż chromosomu [26, 30, 33, 35]. Jeśli np. w klonach, w których występują enzymy — fosfoglukomutaza i dehydrogenaza 6 - fosfoglukonianowa, za każdym razem występuje jednocześnie chromosom 1, a w klonach nie produkujących tych enzymów chromosom 1 nigdy się nie pojawia, świadczy to o umiejscowieniu genów fosfoglukomutazy i dehydrogenazy 6 - fosfoglukonianowej w chromosomie 1.

Opisaną metodą nie możemy jednak określić lokalizacji locus genowego w obrębie chromosomu. Do tego celu wykorzystujemy spontaniczne lub sztucznie indukowane translokacje i delecje chromosomów ludzkich, zmieniające normalne synteniczne stosunki genów [7, 13]. Ponieważ translokowane fragmenty chromosomów segregują w klonach hybrydów oddzielnie, a ich pochodzenie możemy określić metodami cytogenetycznymi, stosując opisaną metodę określania następstwa segregacji fragmentów chromosomowych w postaci pojawiania się odpowiednich produktów genowych, możemy bliżej określić położenie locus genowego w obrębie chromosomu. W ten sposób określono mniej lub więcej dokładnie mapę ludzkiego chromosomu X (rys. 2) oraz położenie kilku lub kilkunastu genów na poszczególnych autosomach.



Rys. 2. Mapa ludzkiego chromosomu X sporządzona przy użyciu metody hybrydyzacji komórek somatycznych.

p — ramię krótkie, q — ramię długie, Xg — grupa krwi Xg, PGK — kinaza fosfoglicerynianowa, α-GalA — α-galaktozydaza A, HPRT — fosforybozylotransferaza hipoksantynowa, G6PD — dehydrogenaza glukozy-6-fosforanowa.

Liczby arabskie oznaczają regiony i prążki, zgodnie z nomenklaturą przyjętą na Konferencji Paryskiej. (Rotterdam Conference 1974. Second International Workshop on Human Gene Mapping. Birth Defects. Original Article Series, XI, 3, 1975. The National Foundation, New York.)

Dotychczas opisane sposoby mapowania genów metodą hybrydyzacji międzygatunkowej dotyczą genów konstytutywnych, syntetyzujących swe produkty w sposób permanentny. Istnieją jednakże geny ujawniające swoją czynność tylko w niektórych fazach różnicowania komórek lub pod wpływem specyficznych induktorów. Podczas mapowania takich genów należy stosować odpowiednie zewnątrzkomórkowe induktory albo przeprowadzać hybrydyzację przy użyciu wysokozróżnicowanych komórek, najlepiej z narządowo specyficznych linii nowotworowych. Tymi metodami zdołano m.in. zlokalizować geny odpowiedzialne za produkcję interferonu w odpowiedzi na inwazję wirusową. Geny te znajdują się w chromosomach 2 i 5 [28].

W przypadku kiedy jedną z populacji rodzicielskich hybrydu stanowią komórki wysoko zróżnicowane możemy dodatkowo jeszcze uzyskać cenne informacje odnośnie mechanizmów regulacyjnych komórki. Przykładowo: w hybrydzie mysich komórek wątrobowych syntetyzujących albuminy mysie z ludzkimi leukocytami, nie wytwarzającymi albumin, stwierdzono obecność ludzkich albumin, co potwierdza, że wszystkie komórki organizmu, posiadając ten sam zestaw chromosomów, posiadają również pełną informację genetyczną, jednak geny te w zależności od zróżnicowania komórek ulegają represji lub derepresji [28]. Przy użyciu tego rodzaju hybrydów zdołano zlokalizować niektóre geny regulatorowe [4, 9], np. gen regulatorowy aminotransferazy tyrozynowej w chromosomie X [5].

Interpretacja wyników lokalizacji genów metodą międzygatunkowej hybrydyzacji powinna być bardzo ostrożna, tak ze względu na możliwość translokacji w obrębie chromosomów ludzkich, jak i pomiędzy chromosomami obydwu gatunków oraz wpływ genów regulatorowych na ekspresję analizowanych genów [17]. Z tych też powodów wskazane jest sprawdzanie wiarygodności wyników przy użyciu innych metod mapowania.

Techniką międzygatunkowej hybrydyzacji komórek somatycznych oznaczono dotąd mniejszą lub większą liczbę genów na każdym z chromosomów człowieka, oprócz chromosomu Y. W wielu przypadkach zdołano zawęzić obszar możliwej lokalizacji genu do określonych regionów chromosomowych lub nawet do ściśle oznaczonego prążka. Produkty mapowanych genów, stanowiące markery poszczególnych chromosomów, zaliczono do czterech grup: markerów enzymatycznych, białkowych, antygenowych oraz różnych [29]. Przykładem markera enzymatycznego jest dehydrogenaza glukozo - 6 - fosforanowa, której gen zlokalizowano w chromosomie X. Do markerów tej grupy należą też niektóre enzymy mitochondrialne, kodowane przez jądrowy, a nie mitochondrialny DNA, których loci genowe są umiejscowione w chromosomach 7 i 12 [34].

Do przedstawicieli grupy markerów białkowych należą globiny α i β umiejscowione na chromosomach 2 i 4 [23, 29]. Przykładem markera antygenowego może być antygen Rh, stanowiący marker chromosomu 1 [29]. Wreszcie wspomniany już interferon stanowi przykład z ostatniej grupy.

Technika międzygatunkowej hybrydyzacji komórek somatycznych umożliwiła przełamanie impasu w badaniach ludzkiego genomu i spowodowała dalszy rozwój genetyki molekularnej człowieka. Znaczenie tej techniki jest ogromne i wykracza ono znacznie poza zagadnienia związane z mapowaniem ludzkiego genomu.

TECHNIKA HYBRYDYZACJI KWASÓW NUKLEINOWYCH IN SITU

W odróżnieniu od omówionych technik, określających pośrednio lokalizację danego genu w określonym regionie genomu, technika hybrydyzacji kwasów nukleinowych in situ jest techniką mapowania bezpośredniego. W tej technice wykorzystano znany fakt, że pojedyncze łańcuchy kwasów nukleinowych (RNA lub zdenaturowanego DNA) łączą się ze sobą na zasadzie komplementarności par zasad. Takiej hybrydyzacji molekularnej można dokonywać również in situ, tj. w cytologicznych preparatach chromosomów metafazalnych. W tej metodzie, po zdenaturowaniu chromosomowego DNA w preparatach cytologicznych, dodaje się znakowanego RNA lub uprzednio zdenaturowanego DNA. Znakowany kwas nukleinowy przyłącza się do chromosomowego DNA w miejscach komplementarności zasad, po czym regiony te wykrywa się za pomocą autoradiografii. Jeżeli do takiej hybrydyzacji molekularnej użyjemy oczyszczonego mRNA, specyficznego dla danego białka, lub komplementarnego DNA, uzyskanego za pomocą odwrotnej transkryptyazy ze swoistego dla danego białka mRNA, to te, uprzednio wyznakowane kwasy nukleinowe przyłączają się wyłącznie do tych regionów chromosomu, w których znajdują się sekwencje kodujące dane białko. Czułość tej metody jest uzależniona od stopnia specyficzności użytego kwasu nukleinowego oraz liczby komplementarnych nukleotydów, wystarczającej dla związania wykrywalnej ilości znakowanego kwasu nukleinowego. Technika ta jest szczególnie użyteczna dla mapowania genów wielokrotnych. Teoretycznie tą metodą można by zmapować cały ludzki genom pod warunkiem uzyskania czystego mRNA, specyficznego dla poszczególnych genów mapowanych białek.

Klasyczny przykład zastosowania techniki hybrydyzacji in situ stanowi zlokalizowanie genów globiny w chromosomach 2 i 4 [24]. Technika tą określono także dokładną lokalizację chromosomową wszystkich czterech ludzkich frakcji satelitarnych DNA [11], stanowiących prawdo-

podobnie nieaktywne genetycznie, wielokrotnie powtarzające się sekwencje nukleotydów.

Technika hybrydyzacji kwasów nukleinowych *in situ* ma prócz tego jeszcze jeden aspekt. Hybrydując wirusowy RNA z ludzkim chromosomowym DNA wykazano, że w pozornie niezainfektowanych ludzkich komórkach istnieją odcinki DNA o sekwencji homologicznej do RNA wirusowego [3, 25]. Tego typu badania wydają się mieć doniosłe znaczenie dla onkologii i wirusologii.

Ze względu na swą uniwersalność i precyzyjność metoda hybrydyzacji kwasów nukleinowych *in situ* ma wprost nieograniczone możliwości i dlatego powinna ona znaleźć zastosowanie nie tylko do wykrywania lokalizacji poszczególnych genów lub określonych sekwencji nukleotydowych, ale również do badania drobnych aberracji chromosomowych, jak delecje, translokacje, inwersje, duplikacje itd.

TECHNIKA MAPOWANIA DELECyjNEGO

Mapowanie delecyjne w piśmiennictwie anglosaskim określono alternatywnie jako efekt dawki genu (*gene dosage effect*). Metoda ta jest oparta o generalną zasadę proporcjonalnej aktywności enzymatycznej do ilości kodujących genów. Wynika to z powszechnie występującej u heterozygotycznych ssaków kodominacji biochemicznego fenotypu [6]. Jeżeli np. u osobnika z delecją określonego chromosomu występują objawy hemizygotyczności, tzn. występuje tylko połowa normalnej aktywności danego enzymu, wysnuwamy wniosek, że locus genu kodującego ten enzym znajduje się na obszarze objętym delecją, a wykrywana aktywność enzymatyczna jest zależna od genu znajdującego się w niezmiennym homologu. Przy użyciu metody wzorów prążkowych możemy zidentyfikować chromosom delecyjny i dość dokładnie określić obszar objęty delecją. Jest to obszar potencjalnej lokalizacji badanego genu.

Opisaną techniką możemy się także posłużyć w odwrotnie ukierunkowanym badaniu — dla wykluczenia lokalizacji danego genu na terenie delecji. Mapowanie na zasadzie wykluczania opiera się na fakcie, że w wielu wypadkach autosomalnych delecji możliwe jest wykazanie heterozygotyczności pewnej ilości loci, związanych z odpowiednimi produktami genowymi. Heterozygotyczność taką potwierdza się najczęściej przez wykrycie dwóch wariantów izoenzymu. Dowodzi to, że enzym jest kodowany przez dwa geny, co w zasadzie wyklucza obecność badanego locus genowego w brakującym segmencie chromosomu [11]. Gromadzenie odpowiednich danych, uzyskanych na podstawie badań większej liczby różnych delecji, konsekwentnie zawęży obszar możliwej lokalizacji poszczególnych genów na terenie genomu i teoretycznie powinno pozwolić na oznaczenie każdego locus genowego drogą wykluczania [11]. Badania

takie są jednak bardzo praco- i czasochłonne, a jednocześnie stosunkowo mało efektywne, stąd zastosowanie ich ogranicza się z reguły do mapowania regionalnego.

Zasady mapowania delecyjnego mogą się także odnosić do przypadków trisomii, w których możemy niekiedy stwierdzić obecność trzech alleli (w wypadkach wysoce polimorficznych loci) lub wykorzystać efekt dawki genu (produkty genów chromosomu trisomicznego występują w ilości o około 50% większej niż normalnie). W ten sposób możliwe jest oznaczenie locus genowego na terenie chromosomu objętego trisomią [31].

NOWE PERSPEKTYWY

Opisane cztery najczęściej obecnie stosowane techniki mapowania ludzkiego genomu mają bezsprzecznie doniosłe znaczenie i duże potencjalne możliwości. Olbrzymiej ilości danych dostarczyły szczególnie dwie metody — metoda klasyczna i metoda międzygatunkowej hybrydyzacji komórek somatycznych. Ogółem zdołano uzyskać informacje dotyczące lokalizacji przynajmniej 10% znanych loci autosomalnych (totalną liczbę znanych loci autosomalnych ocenia się na ponad 1100). W chromosomie X zlokalizowano dotąd około 93 loci [31]. Jeśli chodzi o chromosom Y, wiemy jedynie na podstawie badań klinicznych, że czynnik lub czynniki determinujące rozwój niezróżnicowanej gonady w kierunku jądra znajdują się w ramieniu krótkim tego chromosomu [31]. Wszelkie inne dane dotyczące ludzkiego chromosomu Y pozostają na razie w sferze sugestii [31, 36].

Pomimo tych niewątpliwych osiągnięć, nakreślona za pomocą opisywanych metod mapa ludzkiego genomu posiada obecnie jeszcze znacznie więcej białych plam niż regionów odkrytych i przy obecnym tempie jej rozwoju nie można spodziewać się rychłego zakończenia badań. Wydaje się, że dla rozbudowania mapy genetycznej człowieka na wzór mapy niższych eukariotów niezbędne jest zastosowanie nowych technik. Szczególnie interesujące możliwości kryje w sobie technika przenoszenia genu (gene transfer), polegająca na rekombinacji cząsteczek DNA [18, 37]. Komórki o niepełnej informacji genetycznej (np. nie wytwarzające jakiegoś enzymu) zmieszane w warunkach selekcyjnych z izolowanymi chromosomami metafazalnymi z komórek o pełnej informacji genetycznej przejmują z tych chromosomów mały fragment materiału genetycznego zawierający brakującą informację. Genom zdefektowanych komórek zostaje w ten sposób wybiórczo skomplementowany i komórki zaczynają wytwarzać brakujący uprzednio enzym. Jeśli operacji dokonano międzygatunkowo, enzym taki zachowuje oczywiście wszystkie własności typowe dla gatunku, z którego pobrane zostały chromosomy.

Skonstruowanie szczegółowej mapy genetycznej człowieka ma ogromne znaczenie, ponieważ otworzy nowe perspektywy nie tylko przed genetyką, ale i przed biologią i medycyną.

W odniesieniu do genetyki, badania ludzkiego genomu pozwolą na poznanie lokalizacji i sprzężeń genowych, wyjaśnią rolę chromosomu Y i być może naświetlą zagadnienie inaktywacji chromosomu X u kobiety. Z pewnością też przyczynią się do lepszego zrozumienia problemów regulacji genu oraz znaczenia mitochondriów w procesie dziedziczenia.

W odniesieniu do biologii dzięki tym badaniom można spodziewać się dalszych osiągnięć w wyjaśnieniu ewolucyjnego pochodzenia człowieka i jego pokrewieństwa z naczelnymi oraz odnośnie tempa rozbieżności ewolucji. Informacji tych powinna dostarczyć porównawcza analiza sprzężeń u naczelnych i człowieka, w skojarzeniu z badaniami nad budową chromosomów i sekwencją aminokwasów w białkach.

Największe praktyczne możliwości otwierają badania ludzkiego genomu przed medycyną. Umożliwią one zbadanie istoty defektów chromosomowych na poziomie molekularnym oraz wczesne ich wykrywanie na drodze diagnostyki prenatalnej, opartej na badaniach komórek płodowych, występujących w płynie owodniowym. Stworzą one także nowe możliwości profilaktyki, jak np. selekcja nasienia przed zapłodnieniem, oraz możliwości terapeutyczne, polegające przede wszystkim na praktycznym zastosowaniu inżynierii genetycznej. Ponadto mogą one dostarczyć nowych danych odnośnie badań nad onkogenezą, w szczególności nad zależnością pomiędzy wirusami a nowotworzeniem i zmianami związanymi z zezłośliwieniem normalnej komórki.

LITERATURA

- [1] BATEMAN A. J., Interpretation of linkage in somatic cell hybrids, *Nature*, **233**: 480-481, 1971.
- [2] BARSKI G., SORIEUL S., CONFERT F., Production dans des cultures in vitro de deux souches cellulaires en association de cellules de caractere "hybride", *C. R. Acad. Sci.*, **251**: 1825-1827, 1960.
- [3] CROCE C. M., GIRARDI A. J., KOPROWSKI H., Assignment of the T - antigen gene of Simian Virus 40 to human chromosome C-7, *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **70**: 3617-3620, 1973.
- [4] GROCE C. M., KIEBA J., KOPROWSKI H., MOLINO M., ROTHBLAT G. H., Restoration of the conversion of desmosterol to cholesterol in L - cells after hybridization with human fibroblasts, *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **71**: 110-114, 1974.
- [5] CROCE C. M., LITWACK G., KOPROWSKI H., Human regulatory gene for inducible tyrosine aminotransferase in rat - human hybrids, *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **70**: 1268-1272, 1973.
- [6] DIAMOND R. P., ERICKSON R. P., Gene Dosage in a deletion for a nuclear coded mitochondrial enzyme, *Nature*, **248**: 418-420, 1974.

- [7] DOUGLAS G. R., McALPINE P. J., HAMERTON J. L., Regional localization of loci for human PGM₁ and 6PGD on human chromosome one by use of hybrids of Chinese hamster - human somatic cells, *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **70**: 2737-2741, 1973.
- [8] EPHRUSSI B., WEISS M. C., Interspecific hybridization of somatic cells, *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **53**: 1040-1042, 1965.
- [9] FA TEN KAO, PUCH T. T., Genetics of somatic mammalian cells. VII. Induction and isolation of nutritional mutants in Chinese hamster cells, *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **60**: 1275-1277, 1968.
- [10] — Genetics of somatic mammalian cells — demonstration of a human esterase activation gene linked to the Ade B gene, *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **69**: 3273, 1972.
- [11] FERGUSON - SMITH M. A., Gene mapping by exclusion. Rotterdam Conference 1974. Second International Workshop on Human Gene Mapping. Birth Defects. Original Article Series, XI, 3, 1975. The National Foundation, New York, 126-129.
- [12] GOSDEN J. R., MITCHELL A. R., BUCKLAND R. A., CLAYTON R. P., EVANS H. J., The location of four human satellite DNAs on human chromosomes. Rotterdam Conference 1974. Second International Workshop on Human Gene Mapping. Birth Defects. Original Article Series, XI, 3, 1975. The National Foundation, New York, 168.
- [13] GRZESCHIK K. H., ALLDERDICE P. W., GRZESCHIK A., OPITZ J. M., MILLER O. J., SINISCALCO M., Cytological mapping of human X - linked genes by use of somatic cell hybrids involving an X - autosome translocation, *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **69**: 69-73, 1972.
- [14] HANDMAKER S. D., Cytogenetic analysis of a Chinese hamster - mouse hybrid cell, *Nature*, **233**: 416-417, 1971.
- [15] HARRIS H., WATKINS J. F., Hybrid cells derived from mouse and man. Artificial heterokaryons of mammalian cells from different species, *Nature*, **205**: 640-643, 1965.
- [16] KUCHERLAPATI R. S., BAKER R. M., RUDDLE F. H., Ouabain as a selective agent in the isolation of somatic cell hybrids. Rotterdam Conference 1974. Second International Workshop on Human Gene Mapping. Birth Defects. Original Article Series, XI, 3, 1975. The National Foundation, New York, 192-194.
- [17] Mapping Human Genes. News and views, *Nature*, **227**: 226-227, 1970.
- [18] McBRIDE O W., OZER H. L., Transfer of genetic information by purified metaphase chromosomes, *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **70**: 1258-1262, 1973.
- [19] MORROW J., Lectures in somatic cell genetics 1975, Texas Tech. University, School of Medicine, 21-32.
- [20] NABHOLZ M., MIGGIANO V., BODMER W., Genetic analysis with human - mouse somatic cell hybrids, *Nature*, **223**: 358-359, 1969.
- [21] NORUM R. A., MIGEON B., Non - random loss of human markers from manmouse somatic cell hybrids, *Nature*, **251**: 72-73, 1974.
- [22] PONTECORVO G., Induced Chromosome elimination in hybrid cells. Somatic cell hybridization, L. Davidson, F. F. de la Cruz, Raven Press, New York 1974. Proceedings of the Conference Sponsered by the National Institute of Child Health and Human Development. National Institute of Health, Bethesda, Maryland, March 11-14, 1973, Winter Park, Florida.
- [23] PRICE P. M., CONOVER J. H., HIRSCHHORN K., Chromosomal localization of human haemoglobin structural genes, *Nature*, **237**: 340-342, 1972.

- [24] PRICE P. M., HIRSCHBORN K., In situ hybridization for gene mapping. Rotterdam Conference 1974. Second International Workshop on Human Gene Mapping. Birth Defects. Original Article Series, XI, 3, 1975, The National Foundation, New York, 225-231.
- [25] PRICE P. M., HIRSCHBORN K., GABELMAN M., WAXMAN S., In situ hybridization of RD-114 virus RNA with human metaphase chromosomes, Proc. Nat. Acad. Sci., **70**: 11-14, 1973.
- [26] RUDDLE P. H., Human genetic linkage and gene mapping by somatic cell genetics. Proceedings of a Conference Sponsered by the National Institute of Child Health and Human Development, March 11-14, 1973, Winter Park, Florida.
- [27] — Linkage analysis in man by somatic cell genetics, Nature, **242**: 165-171, 1973.
- [28] RUDDLE F. H., KUCHERLAPATI R. S., Hybrid cells and human genes, Sci. Am., **231**: 36-44, 1974.
- [29] SHOWS T. B., Gene markers for mapping the human genome. The 1974 listing. Rotterdam Conference 1974, Birth Defects, Original Article Series, The National Foundation, New York, 29-37.
- [30] — Genetics of human - mouse somatic cell hybrids — linkage of human genes for lactate dehydrogenase A and Esterase A₄, Proc. Nat. Acad. Sci., **69**: 348-352, 1972.
- [31] Third International Workshop on Human Gene Mapping, Boston, October 1975, materiały nie publikowane.
- [32] THOMPSON L. H., MANKOWITZ R., BAKER R. M., TILL J. E., SIMINOWITCH L., WHITEMORE G. F., Isolation of temperature - sensitive mutants of L - cells, Proc. Nat. Acad. Sci., **66**: 377-380, 1970.
- [33] TISCHFIELD J., RUDDLE F. H., Assignment of the gene for adenine phosphoribosyltransferase to human chromosome 16 by mouse - human somatic cell hybridization, Proc. Nat. Acad. Sci., **71**: 45-49, 1974.
- [34] Van HEYNINGEN V., CRAIG I., BODMER W., Genetic control of mitochondrial enzymes in human - mouse somatic cell hybrids, Nature, **242**: 509-511, 1973.
- [35] Van SOMEREN H., WESTERVELD A., HAGEMAIJER A., MEES J. R., KHAN P. M., Human antigen and enzyme markers in man - Chinese hamster somatic cell hybrids — evidence for synteny between HL-A, PGM₃, ME₁ and IPOB Loci, Proc. Nat. Acad. Sci., **71**: 961-965, 1974.
- [36] WACHTEL S. S., KOO G. C., ZUCKERMAN E. E., HAMMERLING U., SCHEID M. P., BOYSE E. A., Serological Crossreactivity Between H-Y (Male) Antigens of Mouse and Man, Proc. Nat. Acad. Sci., **71**: 1215-1218, 1974.
- [37] WILLECKE K., RUDDLE F. H., Transfer of the gene for hypoxantine - guanine phosphoribosyltransferase of isolated human metaphase chromosomes into murine L - cells. Rotterdam Conference 1974. Second International Workshop on Human Gene Mapping. Birth Defects. Original Article Series, XI, 3, 1975. The National Foundation, New York, 288-292.

Otrzymano: 26 maja 1976.

Przyjęto: 26 czerwca 1976.

Adres autora: ul. Świącickiego 6, 60-781 Poznań.

EFEKTY BIOLOGICZNE DZIAŁANIA CYTOCHALAZYN

Aleksander HINEK

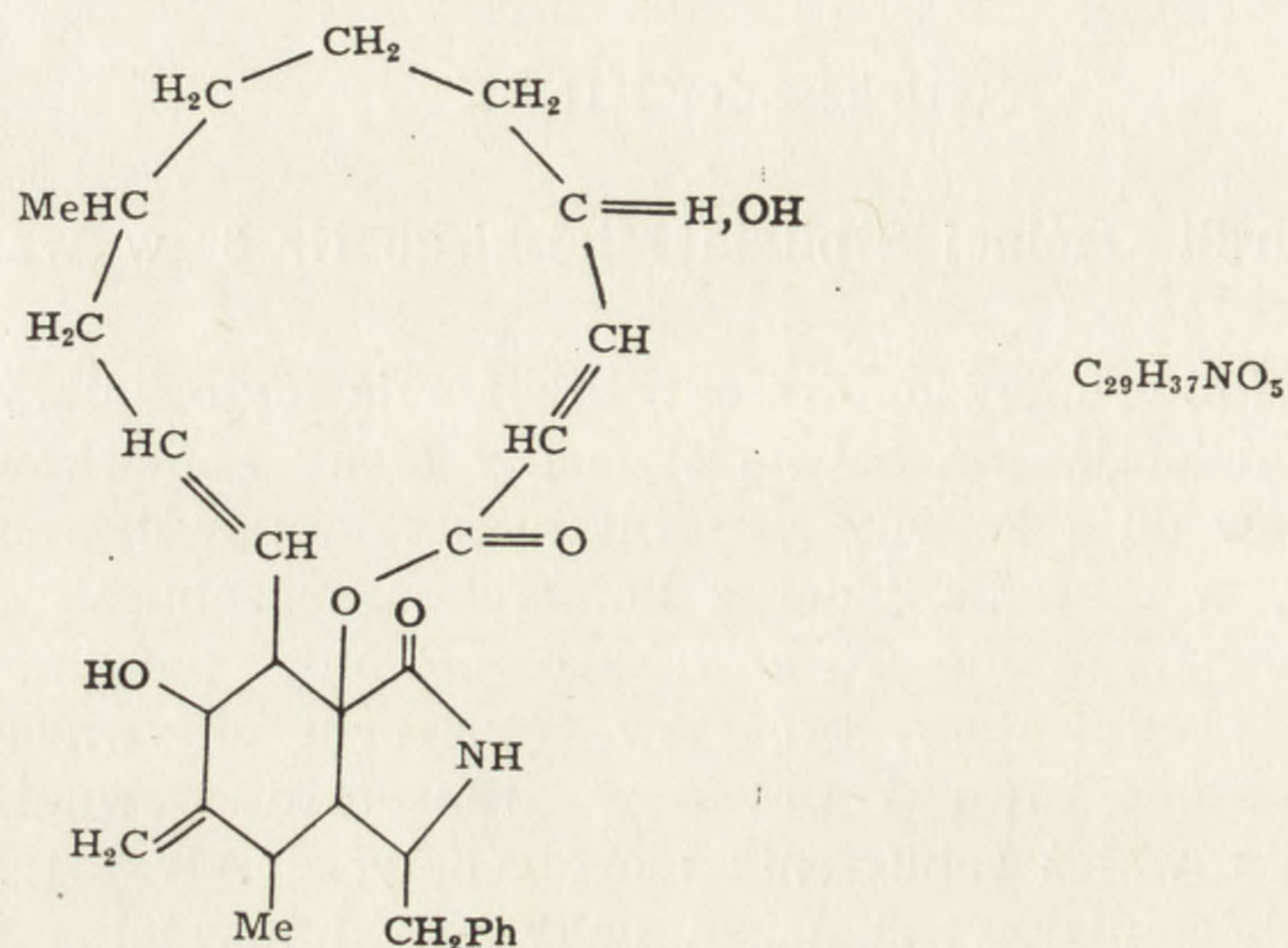
Oddział Chirurgii Ogólnej Szpitala Miejskiego Nr 8 w Warszawie

Streszczenie. W artykule omówiono efekty działania cytochalazyn na komórki i tkanki. Związki te działając na pewne elementy błony komórkowej i mikrofilamenty komórkowe powodują zmiany kształtu komórek, powstawanie wielojądrystych konglomeratów, wyrzucanie jąder z komórek oraz zaburzenia wielu funkcji komórkowych, jak zahamowanie ruchów, zahamowanie podziałów, uszkodzenie procesów endocytozy i egzocytozy, procesów transportu aktywnego szeregu substancji przez błonę komórkową i procesów transportu wewnątrzkomórkowego. Związki te powodują również zaburzenia morfogenetyczne. W artykule podkreślono również różnice działania cytochalazyn na komórki normalne i nowotworowe.

Cytochalazyny to grupa związków o strukturze makrolidowej wyizolowanych z hodowli grzybów *Metharrhizium anizopliae*, *Rossellina necatrix* i *Helminthosporium dematoideum*, podczas poszukiwań nowych antybiotyków. Nazwę swą, pochodzącą z języka greckiego (Cytos — komórka + chalasis — rozkurcz), zawdzięczają pierwszym efektom jakie udało się zaobserwować po dodaniu tych związków do hodowli komórkowych. Dotychczas wyizolowano sześć związków, oznaczonych literami alfabetu: A, B, C, D, E i F, nieco różniących się budową chemiczną, lecz wywołujących zbliżone efekty biologiczne [1-3]. Najwięcej informacji uzyskano badając efekty działania cytochalazyny B [CB].

Pierwsze efekty morfologiczne działania CB zaobserwował Carter w 1967 r. [7] po dodaniu tego związku do hodowli fibroblastów. CB hamowała ruch komórek w hodowli, powodując jednoczesne zmiany ich kształtu. Fibroblasty rozkurczały się i rozpłaszczały, zajmując większą niż normalnie powierzchnię. Traciły przy tym swe charakterystyczne wypustki. Sanger i Holzer [33], hodując chondroblasty w pożywce zawierającej 5 µg/ml CB, zaobserwowali podobne efekty, wykazali jednak, że są one odwracalne jeżeli CB usunie się ze środowiska hodowlanego. W kilkanaście minut po zmianie pożywki komórki zaczynały tworzyć wypustki, a po kilku godzinach odzyskiwały swój pierwotny kształt. Zjawisko to miało miejsce również wtedy, gdy po inkubacji komórek

z CB i cykloheksimidem (inhibitor syntezy białka) przenoszono je do środowiska zawierającego tylko cykloheksimid. Odzyskanie kształtu nie było jednak możliwe, gdy po inkubacji komórek z CB zmieniana pożywka zawierała cyjanek sodu, będący inhibitorem oksydatywnej fosforylacji. Wyniki te sugerowały więc, że do odzyskania kształtu i tworzenia wypustek, nie są potrzebne nowo syntetyzowane białka, ale proces ten zależy od dostaw energii.



Cytochalazyna B wg Aldridge i wsp. 1967

Późniejsze badania dotyczące innych rodzajów komórek potwierdziły wpływ CB na zmiany kształtu komórek i wykazały, że jest to efekt generalny [8]. Jeżeli stężenie CB w pożywce hodowlanej wynosiło około 10 µg/ml i więcej, obserwowano toksyczne działanie CB [7] przejawiające się wyrzucaniem jąder z komórki. Jądra komórek wystawionych na działanie tak wysokiego stężenia CB zmianały początkowo swą pozycję centralną i przesuwaly się pod błonę komórkową, a następnie uwypuklały ją łącząc się z komórką tylko wąskim mostkiem cytoplazmatycznym. Efekt ten, któremu początkowo nie towarzyszyły zaburzenia funkcji komórek, był w pełni odwracalny. Jeżeli jednak inkubacja przeciągała się przez wiele godzin, jądra nie powracały na swoje miejsce, stawały się pyknotyczne i ulegały degeneracji [8, 31].

Następnym efektem działania cytochalazyn, który zaobserwowano podczas długiej inkubacji komórek z niskimi stężeniami tych związków (0,5–1 µg/ml), było tworzenie się komórek olbrzymich zawierających kilka jąder [7, 17, 33]. Późniejsze badania wykazały, że twory te należy raczej uważać za konglomeraty komórek, w których każda podjednostka zachowywała swą niezależność funkcjonalną. Estensen i wsp. [11] wykazali, iż podczas pierwszych 12 godzin inkubacji z CB większość funkcji cytoplazmatycznych nie była zaburzona, a tylko włączanie prekursorów

DNA i RNA było nieznacznie zmniejszone. Cytochalazyny miałyby więc wpływać raczej na późniejsze stadium cytokinezy, hamując rozdzielanie komórek w telofazie, kiedy to po podziale jądra nie dochodziło do wytwarzania pełnej bruzdy podziałowej i pełnego podziału cytoplazmy komórek.

Badając dokładnie wspomniane zjawisko Carter [7] wyjaśnił, że komórki wystawione na działanie 0,5–1,0 $\mu\text{g/ml}$ CB wykazywały początkowo normalne podziały mitotyczne, ale w miarę upływu czasu podziałom jąder przestawał towarzyszyć podział cytoplazmy. Po 24 godzinach inkubacji z CB większość komórek stawała się dwujądrzasta, a po 72 godzinach inkubacji z CB ilość jąder wzrastała do 4. Podczas dłuższej inkubacji liczba jąder w komórkach stawała się jednak nieregularna i częściej nieparzysta. Pojawienie się nieparzystej liczby jąder sugerowało, że nierozdzielone komórki potomne traciły z czasem synchronizację cyklu mitotycznego [17]. Sugestię tę potwierdzono dodając do hodowli traktowanych CB również vinblastynę. Wykazano wtedy, że vinblastyna hamowała poszczególne jądra komórek olbrzymich w różnym stadium cyklu mitotycznego [17]. Szczególnie wrażliwe na działanie CB okazały się komórki transformowane wirusami i komórki linii wyprowadzonych z nowotworów złośliwych zwierząt i człowieka [13, 15, 26, 43]. Pod wpływem CB komórki te wykazywały szybsze niekontrolowane asynchroniczne podziały, stawały się szybciej wielojądrzaste, intensywnie syntetyzowały DNA. Tymczasem normalne fibroblasty skóry chomika i człowieka czy komórki linii nietransformowanych w obecności CB wykazywały znaczne zwolnienie syntezy DNA. Następną istotną różnicą wpływu CB na komórki nowotworowe i normalne, wynikająca właśnie z różnicy w szybkości syntezy DNA, została zaobserwowana przez O'Neila [26]. Autor ten wykazał, że CB zapobiega degeneracji komórek normalnych tkanek, która normalnie pojawia się pod wpływem arabinozydu cytozyny (analogu cytozyny zaburzającego syntezę DNA). Komórki nowotworowe degenerują się natomiast bardzo szybko w obecności tego związku i CB. Doniesiono również o wybiórczo destrukcyjnym wpływie CD na niektóre rodzaje komórek nowotworowych [14]. Cytochalazyny mogą prawdopodobnie modyfikować również odpowiedź immunologiczną, doniesiono bowiem o ich hamującym działaniu na produkcję limfotoksyn przez limfocyty pobudzone różnymi antygenami [45]. Ogromne zainteresowanie efektami cytochalazyn nie przyczyniło się niestety do pełnego wyjaśnienia mechanizmu działania tych związków na poziomie molekularnym, a wprost przeciwnie, wielorakość efektów komórkowych pozwalała na różne interpretacje, często różniące się od siebie. Wynika to prawdopodobnie z trudności ustalenia pierwotnego punktu uchwytu komórkowego dla tych związków i selekcji pierwotnych

i wtórnych efektów ich działania. Nie bez znaczenia również pozostaje fakt, że dostępne w handlu preparaty cytochalazyn zawierają pewne zanieczyszczenia, i tak Spooner i wsp. [35] i Wessels i wsp. [40, 41, 42] przypuszczają, że głównym punktem uchwytu cytochalazyn w komórkach są mikrofilamenty. Szczególnie wrażliwe na działanie tych związków mają być filamenty aktywne, zakotwiczone w błonie komórkowej. Dezagregacja tych filamentów ma powodować wtórne zmiany w błonie komórkowej przejawiające się zmianą kształtu komórki, utratą wypustek, zahamowaniem ruchów czy brakiem podziału w telofazie. Za tym punktem widzenia przemawiają również doświadczenia Spudicha i Shi-na [36], którzy wykazali bezpośredni wpływ CB na mikrofilamenty aktywne wyizolowane z komórek. Filamenty te pod wpływem CB (10^{-3} M) zmniejszały swoją lepkość i nie były zdolne do agregacji z miozyna. Puszkin i wsp. [32] wykazali nawet możliwość bezpośredniej reakcji między miozyna a CD (10^{-6} M), która hamowała kompetycyjnie połączenia miozyny z aktyną. Wydaje się jednak, że efekt ten nie jest stały dla wszystkich cytochalazyn i być może zależy od ich stężenia. Względnie niskie stężenia CB (5 $\mu\text{g/ml}$) nie powodują bowiem zmian strukturalnych aktyny ani nie hamują jej łączenia się z cząsteczkami ciężkiej meromiozyny *in vitro*. Być może, że ten zmienny efekt zależy również od pewnych różnic strukturalnych badanych białek wyizolowanych z różnych źródeł. Aktyna i miozyna nie są jednak jedynymi białkami komórkowymi wrażliwymi na działanie cytochalazyn. Wskazywać na to mogą doświadczenia Wesselsa i wsp. [40], którzy stwierdzili, że mio-blasty zawiązka serca kurczęcia reagują bardziej dramatycznie na CB niż fibroblasty tych samych zawiązków czy komórki mięśni gładkich jelit. Ruchy komórek mięśnia sercowego ustają dopiero po kilku godzinach inkubacji z CB, a odpłukanie tego związku ze środowiska hodowlanego nie powoduje powrotu ruchów. Być może, że efekt ten jest również wynikiem działania CB na inne niż aktyna białka obecne w prążkach Z komórek mięśnia sercowego. Prążki te ulegają bowiem stopniowemu zanikowi w czasie inkubacji z CB. Bezpośrednim działaniem CB na mikrofilamenty komórkowe tłumaczono efekty zaobserwowane w hodowli rozwijających się tkanek zarodka kurczęcia [35, 40, 42]. CB hamowała morfogenezę gruczołów cewkowych jajowodu, które formowały się normalnie pod wpływem działania estrogenów. Zjawisku temu towarzyszyły dezagregacja, fragmentacja i zanik filamentów komórkowych, które w procesie normalnej morfogenezy spełniały rolę sznurka sakiewki ściągającego wewnętrzne brzegi przylegających do siebie komórek nabłonkowych, zapoczątkowując w ten sposób wpuklanie się pierwotnej ściany jajowodu i formowanie się cewek gruczołowych. Wykazano również, że nowo sformowane cewki gruczołów ślinowych 13 - dniowego

zarodka myszy, powstające w podobnym mechanizmie morfogenetycznym, zanikały po dodaniu CB do środowiska hodowlanego. Nabłonek nowo powstałych cewek wygładzał się już po kilku godzinach działania CB, a zjawisku temu towarzyszył zanik mikrofilamentów obecnych w szczytowych biegunach komórek, podczas gdy filamenty podstawowych biegunów komórek pozostały nienaruszone. Efekty te były jednak łatwo odwracalne po usunięciu CB ze środowiska. Podobnym mechanizmem bezpośredniego działania CB na mikrofilamenty tłumaczono również wspomniany poprzednio brak kompletnego podziału komórek pod wpływem CB. Zaobserwowano bowiem dezagregację filamentów pierścienia telofazowego [5, 6, 34] odpowiedzialnego za maksymalne przewężenie cytoplazmy w telofazie i rozdzielenia się komórek potomnych. Cytochalazyny indukowały również nienaturalną agregację i brak rozproszenia ziaren barwnika w melanoblastach skóry żaby [19], a także uszkodzenie filamentów w komórkach rdzenia nadnerczy, co upośledzało transport śródkomórkowy substancji hormonalnych i opóźniało ich wydzielanie z komórek [37]. Podobnym mechanizmem tłumaczono również odwrotny efekt działania CB, polegający na przyspieszeniu uwalniania insuliny z komórek beta wysepek Langerhansa [27]. Zjawisko to tłumaczono zanikiem mikrofilamentów związanych z błoną komórkową, które stanowią barierę dla zbyt gwałtownego uwalniania całego zapasu hormonu z komórki.

Stwierdzono także, że CB może uszkadzać mikrofilamenty szkieletu komórkowego hepatocytów, wywołując zapadanie się ścian kapilarów żółciowych, co hamowało wpływ żółci z wątroby zarówno w warunkach *in vitro*, jak *in vivo* [28]. Wspomniane badania rejestrujące wpływ CB na mikrofilamenty komórkowe przyczyniły się bardzo do poznania roli tych organelli w różnych komórkach, ale nie wykluczyły możliwości innego jeszcze punktu uchwytu komórkowego dla cytochalazyn. Wielu autorów sugeruje, że cytochalazyny działają pierwotnie na pewne elementy błony komórkowej, a dezagregacja, zanik i zaburzenie funkcji mikrofilamentów są zjawiskiem wtórnym. Za tym punktem widzenia przemawiać może fakt, że błony komórkowe wiążą pięć razy więcej znakowanej trytem CB niż błony retikulum endoplazmatycznego i wielokrotnie więcej niż inne frakcje komórkowe [38] oraz szereg efektów działania tych związków zależnych od bezpośredniego zaangażowania błony komórkowej. Cytochalazyny hamują np. transport heksoz [11, 16, 46] nukleotydów i puryn [29, 30]. Mizel i Wilson [25] sugerują nawet, że miejsca w błonie komórkowej odpowiedzialne za transport glukozy są jednocześnie punktami uchwytu dla CB. Wniosek ten wyciągają na podstawie obserwacji świadczącej, że związanie radioaktywnej CB przez komórki ssaków hamuje transport glukozy, podczas gdy komórki

bakteryjne pozbawione systemów aktywnego transportu glukozy nie są zdolne do wiązania CB. Cytochalazyny hamowały również specyficzną tkankowo agregację komórek zarodkowych *in vitro*, a także powodowały rozpad gotowych już izomorficznych agregatów złożonych z chondroblastów i mioblastów [20, 33]. Zaobserwowano również, że związki te hamują fagocytozę i pinocytozę wielu substancji przez makrofagi, leukocyty [19] i fibroblasty [12].

Wyjaśnienie molekularnego mechanizmu działania cytochalazyn na błonę komórkową lub struktury z nią związane nie jest jednak jeszcze pełne. Liczne doświadczenia wykazują, że jest to prawdopodobnie działanie kompleksowe i nie dotyczy tylko jednego składnika powierzchni komórkowej. Malawista [19], który stwierdził zahamowanie fagocytozy bakterii przez leukocyty krwi ludzkiej pod wpływem CB, sugerował, że związek ten może wpływać bezpośrednio na mukopolisacharydy powierzchni komórkowej i zmieniać ich przestrzenne ułożenie, co miałyby w efekcie powodować zmianę ładunku powierzchniowego błony i tym samym zmniejszenie możliwości adhezji obcych cząsteczek do powierzchni komórkowej przed ich pochłonięciem. Sanger i Holzer [33] sugerowali, że CB może również hamować syntezę mukopolisacharydów powierzchni mioblastów.

Mayhew i Maslow [22] badający wpływ cytochalazyny na komórki raka Ehrliha stwierdzili, że nie ma ona bezpośredniego wpływu na syntezę kwasów sialowych powierzchni tych komórek, ale może wiązać się z ich wolnymi grupami aminowymi, co zmienia ładunek elektryczny powierzchni i może być czytane zmianami szybkości wędrowania komórek w polu elektrycznym (elektroforeza komórkowa) [21]).

Sugestia o możliwości wiązania się CB z mukopolisacharydami powierzchni komórkowej a nie z elementami strukturalnymi błony wydawała się bardzo prawdopodobna, zważywszy możliwość bardzo szybkiego odpłukania CB znakowanej z trytem z komórek. Aż 70% radioaktywności początkowej odpłukuje się w ciągu dwóch minut [23]. Bardzo szybki jest też powrót normalnych funkcji i morfologii komórek po usunięciu CB ze środowiska.

Mayhew [23] wykazał jednak, że proteazy, hialuronidaza, rybonukleaza lub blokowanie powierzchniowych reszt cukrowych lektynami nie zmieniają łączenia się radioaktywnej CB z powierzchnią komórkową. Może to sugerować, że CB łączy się z głębiej zlokalizowanymi elementami błony komórkowej, np. z resztami hydrofobowymi lipidów, a zmiany powierzchniowe są zjawiskiem wtórnym, wynikającym prawdopodobnie ze zmian we wzajemnym przestrzennym ułożeniu składników błony komórkowej. Wielorakość efektów wywoływanych przez cytochalazyny zależy bezpośrednio od zaburzeń funkcji błony komórkowej

i mikrofilamentów wydaje się najlepiej tłumaczyć koncepcja Tannenbauma i wsp. [38, 39] sugerująca, że białka strony cytoplazmatycznej błony komórkowej są miejscami wiążącymi cytochalazyny. Autorzy ci uważają, że cytochalazyny łącząc się z cytoplazmatyczną stroną błony komórkowej powodują jednocześnie przestrzenne zmiany ułożenia białek integralnych, co wyraża się zahamowaniem pewnych układów transportujących [11, 18, 25, 29] i jednoczesnym osłabieniem wiązania mikrofilamentów z błoną. Prowadzi to również do zmiany kształtu komórki i zmian przestrzennych w ułożeniu organelli komórkowych, a następnie do zaburzeń funkcji na poziomie komórki i tkanki. Podsumowując należy stwierdzić, że badania nad biologicznymi efektami cytochalazyn przyczyniły się do lepszego poznania mechanizmu wielu procesów komórkowych, w które zaangażowana jest błona komórkowa i mikrofilamenty, a wykazane różnice w działaniu tych związków na komórki normalne i nowotworowe mogą mieć pewne znaczenie w praktycznym leczeniu nowotworów.

LITERATURA

- [1] ALDRIDGE D. C., ARMSTRONG J. J., SPEAKE R. N., TURNER W. B., The cytochalasins a new class of biologically active mould metabolites, *Chem. Comm.*, **1**: 26-27, 1967.
- [2] — The structure of cytochalasin A and B., *J. Chem. Soc.*, **17**: 1667-1676, 1967.
- [3] ALDRIDGE D. C., ARMSTRONG J. J., Structures of cytochalasins C and D, *J. Chem. Soc.*, **22**: 923-928, 1969.
- [4] ARMSTRONG P. B., PARENTI D., Cell sorting in the presence of cytochalasin B, — *J. Cell Biol.*, **55**: 542-553, 1972.
- [5] BLUEMINK J. G., Effects of cytochalasin B on surface contractility and cell junction formation during cleavage in *Xenopus laevis*, *Cytobiologie*, **37**: 176, 1971.
- [6] — Cytokinesis and cytochalasin - induced furrow regression in the first cleavage zygote of *Xenopus laevis*, *Z. Zellforsch.*, **121**: 102-126, 1971.
- [7] CARTER S. B., Effects of cytochalasins on mamalian cells, *Nature*, **216**: 261-264, 1967.
- [8] COPELAND M., The cellular response to cytochalasin B, A critical revue, *Cytologia*, **39**: 709-729, 1974.
- [9] DAVIES A. T., ESTENSEN R., QUIE P. G., Cytochalasin B - III. Inhibition of human polymorphonuclear leukocyte phagocytosis, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **137**: 161-164, 1971.
- [10] ESTENSEN R. D., Cytochalasin B - III. Effect of cytokinesis of Novikoff hepatoma cells, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **136**: 1256-1260, 1971.
- [11] ESTENSEN R. D., PLEGEMAN P. G. W., Cytochalasin B. Inhibition of glucose and glucosamine transport, *Proc. Nat. Acad. Sci. US* **69**: 1430, 1972.
- [12] FIGURA K., KRESE H., Inhibition of pinocytosis by cytochalasin B, *Eur. J. Bioch.*, **48**: 357-363, 1974.
- [13] HIRANO A., KURIMURA T., Viraly transformed cells and cytochalasin B, *Exp. Cell. Res.*, **89**: 111-120, 1974.

- [14] KATAGIRI K., MATSUURA S., Antitumor activity of cytochalasin D. *J. Antibiotics*, **24**: 722-723, 1971.
- [15] KELLY F., SAMBROOK J., Differential effect of cytochalasin B on normal and transformed mouse cells, *Nature New Biol.*, **242**: 217-219, 1973.
- [16] KLETZIEN R. F., PERUDE J. F., SPRINGER A., Cytochalasins A and B. Inhibition of sugar uptake in cultured cells, *J. Biol. Chem.*, **247**: 2964-2966, 1972.
- [17] KRISHAN A., RAY - CHANDHURI R., Assynchrony of nuclear development in cytochalasin - induced multinucleate cells, *J. Cell Biol.*, **43**: 618-621, 1969.
- [18] LIN S., SANTI D. V., SPUDICH J. A., Biochemical studies on the mode of action of cytochalasin B, Preparation of H³ - cytochalasin B and studies on the binding to cells, *J. Biol. Chem.*, **249**: 2268-2274, 1974.
- [19] MALAWISTA S. E., Cytochalasin B reversibly inhibits melanin granule movement in melanocytes, *Nature, London*, **234**: 364-366, 1971.
- [20] MASLOW D. E., MAYHEW E., Cytochalasin B prevents specific sorting of reagregating embryonic cells, *Science*, **177**: 281-282, 1972.
- [21] MAYHEW E., Electrophoretic mobility of Ehrlich ascites carcinoma cells grown in vitro and in vivo, *Cancer Res.*, **28**: 1590-1595, 1968.
- [22] MAYHEW E., MASLOW D., Cytochalasin B and the sialic acids of Ehrlich ascites cells, *Exp. Cell. Res.*, **83**: 255-260, 1974.
- [23] MAYHEW E., POSTE G., COWDEN M., TOLSON N., MASLOW D., Cellular binding of H³ - cytochalasin B, *J. Cell. Physiol.*, **84**: 373-382, 1974.
- [24] McGUIRE J., MOELMANN G., Cytochalasin B. Effects on microfilaments and movement of melanin granules within melanocytes, *Science*, **175**: 642-644, 1972.
- [25] MIZEL S. B., WILSON L., Inhibition of the transport of several hexoses in mamalian cells by cytochalasin B, *J. Biol. Chem.*, **247**: 4102-4105, 1972.
- [26] O'NEIL F. J., Selective destruction of cultured tumor cells with uncontrolled nuclear division by cytochalasin B and Cytosine arabinoside, *Cancer. Res.*, **35**: 3111-3115, 1975.
- [27] ORCI L., GABBA K. H., MALAISE W. J., Pancreatic beta - cell web: Its possible role in insulin secretion, *Science*, **175**, 1128, 1971.
- [28] PHILLIPS M. J., ODA M., MAK E., FISNER M. M., JEEJEEBHOW K. N., Microfilament dysfunction as possible cause of intrahepatic cholestasis, *Gastroenterology*, **69**: 48-58, 1975.
- [29] PLAGEMANN P. G., ESTENSEN R. D., Cytochalasin B. Competitive inhibition o nucleoside tranport by cultured Novikoff rat hepatoma cell, *J. Cell Biol.*, **55**: 179-185, 1972.
- [30] PLAGEMANN P. G., ZYLKA J. H., ERBE J., ESTENSEN R. D., Membrane effect of cytochalasin B. Competitive inhibition of facilitated diffusion processes in rat hepatoma cells and other cell lines and effect on formation of functional transport sites, *J. Membrane. Biol.*, **23**: 77-90, 1975.
- [31] PRESCOTT D. M., MYERSON D., WALLACE J., Enucleation of mamalian cells with cytochalasin B, *Exp. Cell Res.*, **71**: 480-485, 1972.
- [32] PUSZKIN G. S., PUSZKIN L. W., LO W., TANENBAUM S. W., Binding of cytochalasin D to platelet and muscle myosin, *J. Biol. Chem.*, **248**: 7754-7761, 1973.
- [33] SANGER J. W., HOLZER H., Cytochalasin B. Effects on cell morphology cell adhesion and mucopolisaccharide synthesis, *Proc. Nat. Acad. Sci. US*, **69**: 442-446, 1972.

- [34] SCHROEDER T. E., The role of contractile ring filaments in dividing eggs, *Biol. Bull.*, **137**: 413-414, 1969.
- [35] SPOONER B. S., Effects of cytochalasin B upon microfilaments involved in morphogenesis of salivary epithelium, *Proc. Nat. Acad. Sci. US*, **66**: 360-364, 1970.
- [36] SPUDICH J. A., SHIN L., Cytochalasin B, its interaction with actin and actomyosin from muscle, *Proc. Nat. Acad. Sci. US*, **69**: 442, 1970.
- [37] THOA N. B., WOOTEN G. F., AXELROD J., KOPIN I. J., Inhibition of dopamine beta - hydroxylase and norepinephrine release from sympathetic nerves by colchicine, vinblastine and cytochalasin B and its enhancement by dibutyl cyclic, AMP, *Fed. Proc.*, **31**: 1984, 1972. abstract.
- [38] TANNENBAUM J. S., TANNENBAUM L. W., LO W., MIRANDA A. F., Cellular binding and subcellular localisation of H³ - cytochalasin D, *J. Cell. Biol.*, **59**: 344 A, 1973.
- [39] TANNENBAUM J. S., TANNENBAUM L. W., GODMAN S. C., MIRANDA A. F., Binding and subcellular localisation of tritiated cytochalasin D, *Exp. Cell. Res.*, **91**: 47-56, 1975.
- [40] WESSELS N. K., SPOONER B. S., ASH J. F., BRADLY M. O., LUDUENA M. A., TAYLOR B. L., WRENN J. T., YAMADA K. M., Microfilaments in cellular and developmental processes, *Science*, **171**: 135-143, 1971.
- [41] WESSELS N. K., SPOONER B. S., ASH J. F., BRADLY M. O., WRENN J. T., Cytochalasin B - microfilaments and contractile processes, *Science*, **173**: 358-360, 1971.
- [42] WRENN J. T., WESSELS N. K., Cytochalasin B. Effects upon microfilaments involved in morphogenesis of estrogen - induced glands of oviduct, *Proc. Nat. Acad. Sci. US*, **66**: 904, 1970.
- [43] WRIGHT W. E., HAYFLICK L., Formation of anucleate cells in normal and SV - 40 transformed WI - 38 by cytochalasin B, *Exp. Cell. Res.*, **74**: 187-194, 1972.
- [44] YAMADA K. M., SPOONER B. S., Ultrastructure and function of growth cones of cultured nerve cells, *J. Cell. Biol.*, **49**: 614-617, 1971.
- [45] YOSHINAGA M., WAKSMAN B., MALAWISTA S., Cytochalasin B inhibits lymphotoxin production by antigen - stimulated lymphocytes, *Science*, **176**: 1147-1148, 1972.
- [46] ZIGMOND S. H., HIRSCH J. G., Cytochalasin B. Inhibition of D - 2 deoxy-glucose transport into leukocytes and fibroblasts, *Science*, **176**: 1432-1434, 1972.
- [47] — Effects of cytochalasin B on polymorphonuclear leukocyte locomotion, phagocytosis and glycolysis, *Exp. Cell. Res.*, **73**: 383-387, 1972.

Otrzymano: 29 czerwca 1976.

Przyjęto: 8 lipca 1976.

Adres autora: 00 - 695 Warszawa, ul. Nowogrodzka 51 m. 4.

ULTRASTRUKTURA NACZYŃ WŁOSOWATYCH KRĘGOWCÓW
MORFOLOGICZNE PODSTAWY MIKROKRAŻENIA
I PRZEPUSZCZALNOŚCI

Andrzej JASIŃSKI i Wincenty KILARSKI

Zakład Anatomii Porównawczej,
Instytut Zoologii Uniwersytetu Jagiellońskiego, Kraków

*Profesorowi Zygmuntowi Grodzińskiemu,
uczonemu i wychowawcy,
w osiemdziesiątą rocznicę urodzin*

uczniowie

TREŚĆ

1. Wstęp	395
2. Budowa kapilar w świetle badań klasycznych	400
3. Ultrastruktura składników naczyń włosowatych	402
4. Bariera krew-tkanki i przepuszczalność kapilar	426
5. Typy kapilar i ich ultrastruktura	435
6. Literatura	466

SUPLEMENT

1. WSTĘP

Naczynia włosowate, zwane inaczej kapilarami, są najważniejszym czynnościowo składnikiem układu krążenia. Natomiast serce, bez względu na złożoność anatomiczną i funkcjonalną tego narządu, oraz naczynia tętnicze i żyłne służą odpowiednio do wprowadzania krwi w ruch, wyprowadzania krwi z serca i jej rozdziału między sieci naczyń włosowatych, a następnie zbierania jej z łożyska kapilarnego poszczególnych narządów i przetaczania z powrotem do serca. Nadrzędnym zadaniem układu krążenia, niemal w całości wypełnianym przez naczynia włosowate, jest obustronna wymiana substancji między krwią i tkankami narządów, jak również współdziałanie w zachowywaniu względnej stałości środowiska wewnętrznego organizmu — „milieu intérieur” Claude Bernarda [39]. Wymiana substancji zachodzi również w ograniczonym stopniu przez ściany końcowych odcinków najmniejszych naczyń tętniczych oraz początkowych odcinków naczyń żylnych, które swą budową niezbyt odbiegają od kapilar. Inaczej przedstawia się przepływ energii cieplnej przez ściany naczyń. Grubość ich ścian nie odgrywa w tym przypadku istotnej roli, toteż przeciwprądowe wymienniki ciepła są zbudowane u wielu kręgowców nie tylko z odpowiednio rozmieszczonych naczyń włosowatych [84, 318, 366, 602], lecz głównie z tętniczo-żylnych sieci dziwnych o znacznej grubości ścian i średnicy naczyń [317, 612, 622]. Wszystkie odcinki łożyska kapilarnego są również wysoce przepuszczalne dla gazów. Znaczna część tlenu może dyfundować do tkanek, zanim krew tętnicza osiągnie naczynia przedkapilarne [630].

Udział przed- i zakapilarnych odcinków naczyń w wymianie substancji zmniejsza przydatność kryterium czynnościowego definicji kapilar. Mówi ona, iż kapilary są naczyniami, przez których ściany zachodzi intensywna obukierunkowa wymiana substancji. W ujęciu Majno [434] definicja funkcjonalna określa kapilary jako część systemu naczyniowego, związaną czynnościowo z przechodzeniem gazów i substancji odżywczych oraz usuwaniem produktów odpadowych metabolizmu. Bardziej niezawodne są niektóre definicje oparte na kryteriach topograficznych lub anatomicznych. Opisują one kapilary jako naczynia (a) łączące tętnice z żyłami, (b) mające ściany pozbawione elementów mięśniowych, względnie (c) będące najcieńszymi naczyniami łączącymi

tętnice z żyłami, których komórki śródbłonka są otoczone od zewnątrz blaszką podstawną, lub (d) utworzone przez nagie rury śródbłonkowe. Dwie ostatnie definicje nasuwają pewne zastrzeżenia. Po pierwsze, przemilczają istnienie kapilar o śródbłonku pozbawionym blaszki podstawnej, a po drugie, sugerują nadmierną prostotę budowy tych naczyń, nie potwierdzoną przez nowsze badania [65].

Średnica kapilar wykazuje znaczne różnice zależnie od gatunku zwierzęcia, narządu, tkanki lub stanu czynnościowego. Mówiąc ogólnie, jest ona nieco większa od średnicy erytrocytów, u płazów wynosi przeciętnie 20–30 μm , a u ssaków 5–20 μm [573]. Średnica tzw. „prawdziwych kapilar” ssaków wynosi zależnie od źródła nieco poniżej 8 μm [36], 4–8 μm [16], do 7 μm [434], około 8 μm [47] lub 3–10 μm [575]. Jednym z powodów znacznej rozpiętości w ocenie średnicy kapilar jest pewna umowność w określaniu odcinków naczyń odpowiadających prawdziwym kapilarom. Pośród innych przyczyn można by wymienić wykonywanie pomiarów naczyń w różnych narządach rozmaitych kręgowców, będących prawdopodobnie w różnych stanach czynnościowych, bądź też stosowanie niejednakowych technik służących przygotowywaniu materiału obserwacyjnego. W uzyskiwaniu tak rozbieżnych wyników miało zapewne swój udział panujące do niedawna przekonanie, iż wszystkie naczynia włosowate mają tę samą budowę. Ustalenie oczywistego obecnie faktu, iż naczynia kapilarne tworzą szereg morfologicznych typów, a kapilary poszczególnych tkanek, narządów i jednostek taksonomicznych kręgowców mogą charakteryzować się specyficznymi cechami strukturalnymi jest rezultatem badań ultrastruktury tych naczyń.

Literatura i liczba informacji dotyczących ilości naczyń włosowatych przypadających na jednostkę objętości określonych tkanek lub narządów, wyrażanej przez łączną długość, objętość lub powierzchnię kapilar, jest bardzo obfita. Szczegółowe rozpatrywanie tego zagadnienia nie mieści się w ramach naszego opracowania, toteż ograniczamy się do przytoczenia jedynie kilku przykładów sygnalizujących ten ważny problem. Tak więc w *m. tenuissimus* kota powierzchnia kapilar w 100 cm^3 mięśnia wynosi 0,9 m^2 [190]. W 100 g *m. brzuchatego łydki* psa łączna długość oraz powierzchnia kapilar wynoszą odpowiednio około 260 km i około 2 m^2 [105]. Ilość kapilar przetykających mięśnie szkieletowe nie jest stała i może ulegać wzrostowi w następstwie intensywnych ćwiczeń. W mięśniu płaszczkowatym, *m. soleus*, i mięśniu brzuchatym łydki, *m. gastrocnemius*, świnki morskiej sprowokowanych do długotrwałego wysiłku, liczba kapilar towarzyszących włóknom czerwonym wzrosła, po zaaplikowaniu zwierzętom określonego reżimu treningowego, trwającego przez 18 tygodni, z $4,5 \pm 0,2$ do $5,8 \pm 0,3$ kapilar przypadających na jedno włókno [433].

Częścią systemu krążenia szczególnie nadającą się do uzyskania zależności ilościowych między poszczególnymi kategoriami naczyń jest łożysko naczyniowe krążenia małego ssaków. Zamieszczona tabela 1, zaczerpnięta z pracy W. S. Millera [466], jest bardzo pouczającym zestawieniem liczby i rozmiarów naczyń płucnych psa. Wskazuje ona m.in. na ścisłą zależność między średnicą naczyń i ich liczebnością.

TABELA 1

Naczynia płuc	Liczba	Średnica [w mm]	Łączna powierzchnia przekroju [w mm ²]
t. płucna	1	15,5	181
gałąź prawa i lewa	2	11,5	208
tętnice płatowe	8	5,96	223
t. 1-rzędowe	24	3,96	293
t. 2-rzędowe	164	2,26	656
t. 3-rzędowe	1021	1,0	801
t. płacikowe	16000	0,3	1120
t. przedsionkowe	64000	0,165	1344
t. woreczkowe	128000	0,165	2688
kapilary	600000000	0,007	23000
ż. woreczkowe	192000	0,23	7680
ż. przedsionkowe	32000	0,45	6098
ż. płacikowe	16000	0,4	2000
ż. 3-rzędowe	1021	1,22	1194
ż. 2-rzędowe	164	2,44	765
ż. 1-rzędowe	24	4,18	340
ż. płatowe	8	6,12	299
ż. płucne	4	13,75	756

Współczesne badania ilościowe kapilar, zwłaszcza dotyczące organelli komórek śródbłonna uczestniczących w transkapilarnej wymianie substancji, prowadzone z zastosowaniem mikroskopu elektronowego i metod stereologicznych, są jak dotąd stosunkowo nieliczne. Prowadzone są głównie w odniesieniu do kapilar typu mięśniowego [102, 105, 239, 269, 344, 399, 543] oraz kapilar trzewnych [92, 94-97, 100, 104, 123, 554, 571] i płucnych [712, 719, 710, 723, 725, 726, 728, 729, 732, 733]. Jak wykazemy w innych częściach tej pracy, udział badań morfometrycznych stosowanych w badaniach submikroskopowej organizacji naczyń dla właściwego zrozumienia i interpretacji morfologii czynnościowej kapilar jest tak duży, iż trudno go przecenić.

Organizacja przestrzenna sieci kapilarnych i sposób rozgałęziania się kapilar wykazują duże różnice zależnie od wielu czynników. Naczy-

nia włosowate tworzą zazwyczaj wspólną sieć, łożysko kapilarne, która w narządach cienkościennych jest płaska, podczas gdy w narządach grubościennych lub brylastych jest z reguły siecią przestrzenną. Długość kapilar między dwoma kolejnymi rozgałęzieniami jest na ogół nieduża, np. w mięśniach szkieletowych wynosi ok. 25 μm . W przypadkach krańcowych, jak w sieciach dziwnych gruczołów gazowych ryb głębinowych, długość pojedynczych kapilar osiąga 25 mm [443]. Budowa przestrzenna oraz kształt oczek sieci kapilarnych wiążą się zazwyczaj z histologiczną budową unaczynianych narządów. Na przykład w ścianach pęcherzyków płucnych oczka sieci kapilarnej są małe i mniej więcej okrągłe, natomiast w narządach złożonych z elementów włóknistych, jak chociażby w nerwach, są znacznie wydłużone.

W niektórych narządach występują pętlowate kapilary końcowe. Ich obecność stwierdzono w układzie nerwowym niektórych bezkręgowców oraz minogów, płazów ogoniastych i beznogich, a także u jaszczurek, tuatary i torbaczy [137–143, 607, 608, 615, 616, 670, 672, 649, 750]. W takich przypadkach tętnice kończą się pojedynczymi pętlami kapilar, które nie tworzą między sobą anastomoz. Kapilary doprowadzające (tętnicze) poszczególnych pętli przechodzą w towarzyszące im kapilary odprowadzające (żylny). Przy takiej organizacji sieci naczyniowej, blokada jakiegokolwiek naczynia doprowadzającego pozbawia odpowiedni obszar tkanki nerwowej dopływu tlenu i innych substancji odżywczych [606].

U większości kręgowców unaczynienie ośrodkowego układu nerwowego jest zorganizowane wedle jednego z dwóch wymienionych typów: trójwymiarowej sieci ciągłej lub nie łączących się ze sobą pętli kapilar. Oba typy organizacji sieci naczyniowych stwierdzono wyjątkowo u rogozęba (*Dipnoi*) [144] i aksolotla [137]. Występowanie pętlowatej organizacji łożyska kapilarnego w mózgu niektórych bezkręgowców i kręgowców, należących do różnych jednostek taksonomicznych, świadczy, iż ten osobliwy typ organizacji naczyń powstał wielokrotnie i niezależnie u przedstawicieli różnych jednostek systematycznych zwierząt i przeto nie ma znaczenia filogenetycznego. Nie ulega jednak wątpliwości, iż brak scalonego łożyska kapilarnego jest w stosunku do zespolonej anastomozami sieci kapilarnej rozwiązaniem prymitywnym i czynnościowo bardziej zawodnym. Nie rozwijając tego tematu pragniemy zwrócić jedynie uwagę, iż pętlowate sieci kapilarne realizują zasadę przeciwprądów, która w przypadku niektórych kręgowców umożliwia naczyniom kapilarnym, zorganizowanym w sieci dziwne, spełnianie funkcji wymienników ciepła lub generatorów ciśnienia gazów. Z tego punktu widzenia, czynnościowe znaczenie angioarchitektoniki mózgu torbaczy i niektórych innych kręgowców jest wciąż niecałkowicie jasne. Faktem zasługującym

w tym miejscu bodaj na wzmiankę jest pętlowata organizacja pierwotnej sieci kapilar podwzgórzowo - przysadkowego systemu wrotnego kręgowców, w obrębie wyniosłości przyśrodkowej [309, 312].

Udział kapilar w budowie niektórych narządów jest tak duży, iż w pełni zasługują one na nazwę „narządów naczyniowych”. Za przykład może posłużyć grzebień oczny ptaków [314, 321], stożek oczny gadów [322], a w stopniu jeszcze większym sieci dziwne, *retia mirabilia*, występujące m. in. w pęcherzu pławnym ryb [172, 192–194, 214, 310, 311, 325, 327, 328, 332, 443, 767] oraz w naczyniówce oczu ryb, zwłaszcza głębinowych, gdzie tworzą tzw. gruczoł naczyniówkowy [2, 15, 214, 323, 758]. Wedle dawnych wyliczeń Krogha [379], sieci dziwne w pęcherzu pławnym średniej wielkości węgorza, których łączna objętość wynosi 64 mm³, składają się z około 100 000 kapilar tętniczych i niemal tyluż kapilar żylnych, co przy ich długości około 4 mm oraz średnicy 7–10 μm daje łączną długość równą 400 m oraz powierzchnię 100 cm².

W przypadku komórek o wyjątkowo dużych rozmiarach i wysokim poziomie metabolizmu, stwierdzono obecność kapilar wewnątrzkomórkowych. Po raz pierwszy opisał je Fritsch [232] w neuronach nadrdzeniowych żabnicy, *Lophius piscatarius*, a następnie szereg innych autorów [38, 71, 79, 129, 443, 490, 605, 610].

Zainteresowanie budową naczyń włosowatych oraz fizjologią mikrokrążenia sięga odległej przeszłości. Dość przypomnieć pionierskie i rewelacyjne naonczas demonstracje i opisy naczyń kapilarnych i krążących w nich krwinek, które zawdzięczamy A. van Leeuwenhoekowi (rys. 1). Niżej przytaczamy angielską wersję językową opisu krążenia w naczyniach kapilarnych, opublikowanego przez Leeuwenhoeka w końcu XVII w.

„When I came to examine the tail of this little worm, I saw something so amusing that it surpassed anything I had ever seen in my life, for here I discovered more than fifty circulations of the blood in particular places, whenever I could place the animal as it was living in the water and lying still, under the magnifyingglass. For I not only saw that the blood was driven in many places through very thin vessels from the middle of the tail to the outside of it, but also that each such vessels was bent in a curve and carried the blood back to the interior or thickest part of the tail, in order to convey it back to the heart. So that it appeared to me that the blood - vessels, observed in this animal and called arteries and veins, are exactly alike; only they can be called arteries when they carry the blood to the utmost extremities of the small blood - vessels, and veins when they carry the same blood back to the heart”.*

* Opis dotyczy krążenia w płetwie młodego węgorza. Oryginał tekstu Leeuwenhoeka zaginął. Cytat zaczerpnięto z wydawnictwa *Some Dutch Contributions to the Development of Physiology* (Nat. Mus. Hist. Sci., Leiden 1962), które przedrukowało go z *Opuscula selecta neerlandicorum de arte medica*. I. — Amsterdam 1907.

Badania struktury naczyń włosowatych przy zastosowaniu klasycznych metod mikroskopii świetlnej cierpiały na znaczne ograniczenia. Śledzenie zaś transkapilarnej wymiany substancji leżało poza zasięgiem możliwości badaczy. Sytuacja ta zmieniła się radykalnie wraz z zastosowaniem we wczesnych latach pięćdziesiątych transmisyjnego mikroskopu elektronowego oraz stopniowym wprowadzaniem szeregu nowych technik, jak wprowadzanie do układu krążenia izotopów, fluorochromów i innych wyznaczników, co umożliwiło śledzenie ich wędrówki przez ściany naczyń. Ostatnio Zweifach [784] dał krótki, lecz wyczerpujący przegląd technik stosowanych współcześnie w badaniach mikrokrażenia, prowadzonych zarówno przyżyciowo, jak i *post mortem*.

Celem tej publikacji jest przedstawienie współczesnych poglądów na temat morfologii czynnościowej kapilar kręgowców na lapidarnie zarysowanym tle wiedzy o tym przedmiocie, poprzedzającej okres mikroskopii elektronowej. Szczególny nacisk położymy na klasyfikację kapilar wynikającą ze zróżnicowanej submikroskopowej organizacji tych naczyń, a dalej na ultrastrukturę poszczególnych składników ściany kapilar ze szczególnym uwzględnieniem submikroskopowej organizacji komórek śródbłonna oraz ich organelli uczestniczących, względnie umożliwiających wymianę substancji między krwią i tkankami. Zamieścimy również morfofizjologiczną charakterystykę kapilar typu mięśniowego, trzewnego i zatokowego oraz szeregu bardziej specyficznych kategorii tych naczyń. Posłużymy się przy tym własnymi obserwacjami i materiałem dokumentacyjnym, jak również obszerną literaturą przedmiotu, której zestawienie — zamieszczone na końcu publikacji — jest z konieczności jedynie wyborem dostępnych obecnie źródeł.

2. BUDOWA KAPILAR W ŚWIETLE BADAŃ KLASYCZNYCH

Badania histologiczne — poprzedzające zastosowanie mikroskopu elektronowego — ustaliły, że naczynia włosowate są zamkniętymi rurami, zbudowanymi z płaskich, poligonalnych komórek śródbłonna (endo-tel) o brzegach spojonych cementem międzykomórkowym. Na powierzchni komórek śródbłonna zwróconej do światła naczyń miała występować warstewka zaadsorbowanych białek, natomiast po ich stronie zewnętrznej delikatna glikoproteidowa błona podstawowa, której obecność i skład chemiczny stwierdzono za pomocą reakcji Feulgena [242]. Jednak część ówczesnych badaczy zaprzeczała istnieniu błony podstawnej kapilar [379, 711].

Na zewnętrznej powierzchni naczyń włosowatych wykazano obecność nieciągłej warstwy komórek kurczliwych, dla których stosowano następnie rozmaite nazwy, jak komórki Rougeta, komórki Rougeta-Meyera,

komórki przydanki Marchanda, perycyty Zimmermanna lub po prostu perycyty. Wydłużone kadłuby tych komórek leżą zgodnie z osią naczyń włosowatych, opasując je licznymi wypustkami.

Wykazano także obecność przydanki naczyń włosowatych, *adventitia*, złożonej z różnych elementów morfologicznych. Jednak zgodna opinia badaczy omawianego okresu wyłączyła ją spośród składników ściany naczyń włosowatych, co więcej, część autorów zaliczała do przydanki wszystkie komórki leżące po zewnętrznej stronie śródbłonka naczyń, a zatem również perycyty.

Charakteryzując komórki śródbłonka podnoszono ich silne spłaszczenie oraz duże rozmiary owalnych jąder. Zazwyczaj opisywano komórki śródbłonka jako struktury romboidalne, w niektórych kapilarach silnie wydłużone i ułożone spiralnie wzdłuż naczyń. W miarę zbliżania się do najcieńszych żyłek, ich kształt zmienia się na nieregularny, natomiast po stronie tętniczej łożyska kapilarnego komórki śródbłonka są wydłużone wrzecionowato i ułożone spiralnie. Pomijając jądra komórkowe, badania mikroskopowe, zarówno przyżyciowe jak i histologiczne, nie zdołały wykazać w komórkach śródbłonka istnienia organelli wewnątrzplazmatycznych.

Cement międzykomórkowy uważano za martwy składnik naczyń włosowatych [111]. Jego domniemaną porowatość wiązano natomiast ze zdolnością kapilar do selektywnego przepuszczania różnych substancji. Sądono przy tym, że kapilary są z reguły nieprzepuszczalne dla składników wielkocząsteczkowych osocza, natomiast nie tworzą bariery dla substancji niskocząsteczkowych, które miały przenikać przez wypełnione wodą kanaliki w cemencie.

Wiele kontrowersji nagromadziło się wokół komórek Rougeta. W pewnym okresie sądzono, że perycyty i komórki Rougeta odpowiadają dwu różnym typom komórek towarzyszących naczyń włosowatym. Obserwacje Plenka [547, 548] wykazały jednak duże podobieństwo, jeśli nie tożsamość, tych komórek. Obserwując ściany kapilar impregnowanych srebrem, Zimmermann [778] wykazał powszechną obecność perycytów na ścianach naczyń włosowatych różnych kręgowców, jednak utożsamiał je z komórkami mięśni gładkich. Zastosowanie zieleni Janusowej B pozwoliło wykazać w perycytach niektórych kręgowców obecność włókien kurczliwych, podkreślających ich podobieństwo do mięśni gładkich [35]. Krogh i Vimtrup [380] cytują również obserwacje wykazujące stopniowe przekształcanie się okrężnych włókien mięśniowych tętniczek w silnie rozgałęzione i niemal wzdłużnie ułożone komórki Rougeta kapilar. W licznych doniesieniach zwracano uwagę na związek jaki zachodzi między liczbą komórek Rougeta oraz prędkością i stopniem kurczenia się naczyń włosowatych. Wprawdzie E. L. Clark i A. R. Clark [119, 120]

wykazali, że zaciskanie światła kapilar może zachodzić niezależnie od komórek Rougeta, jednak ich obserwacje nie znalazły uznania u czołowych naonczas autorytetów [380].

3. ULTRASTRUKTURA SKŁADNIKÓW NACZYŃ WŁOSOWATYCH

3.1. SKŁADNIKI ŚCIANY NACZYŃ WŁOSOWATYCH

Autorzy dawnych publikacji wyróżniali w ścianie kapilar zaledwie jeden [379] lub dwa składniki [32]. Wprawdzie również Fawcett [211] wskazywał na dwuwarstwową budowę naczyń włosowatych, jednak większość badaczy posługujących się mikroskopem elektronowym opowiedziała się stosunkowo wcześniej za trójwarstwową budową tych naczyń [217, 297, 774], podkreślając równocześnie nieciągłość warstwy zewnętrznej oraz istnienie kapilar o zredukowanej liczbie składników strukturalnych. Problem ten przeanalizowali również Bruns i Palade [65] przy sposobności badań ultrastruktury kapilar mięśni szkieletowych i serca. Podzielając pogląd na trójwarstwową budowę ściany kapilar, autorzy ci wyróżnili (a) warstwę wewnętrzną odpowiadającą komórkom śródbłonna, (b) warstwę środkową złożoną z blaszki podstawnej i perycytów oraz (c) warstwę zewnętrzną, czyli przydanek, do której zaliczono towarzyszące kapilarom makrofagi, komórki tuczne, fibroblasty i włókna kolagenowe.

3.2. KLASYFIKACJA NACZYŃ WŁOSOWATYCH

Obserwacje w mikroskopie elektronowym wykazały, że kapilary, mimo ogólnych podobieństw, charakteryzują się dużą różnorodnością szczegółowej budowy, implikującą istnienie znacznych różnic czynnościowych między poszczególnymi typami tych naczyń. Różnice strukturalne kapilar dotyczą przede wszystkim budowy komórek śródbłonna, organizacji połączeń międzykomórkowych, obecności lub braku blaszki podstawnej położonej po zewnętrznej stronie śródbłonna oraz stopnia rozwoju różnych elementów przydanki.

Warunkiem przeprowadzenia klasyfikacji kapilar było nagromadzenie dużej liczby informacji opartych o znajomość ultrastruktury kapilar różnych narządów kręgowców. Pierwszą wyczerpującą próbę uporządkowania wiedzy o submikroskopowej organizacji naczyń włosowatych dali Bennett, Luft i Hampton w roku 1959 [30]. Opierając się na trzech zasadniczych kryteriach, uwzględniających organizację blaszki podstawnej, komórek śródbłonna oraz przydanki, autorzy ci dokonali następującego podziału kapilar:

- A. kapilary z ciągłą i kompletną blaszką podstawną,
- B. kapilary z niekompletną blaszką podstawną lub nie mające jej w ogóle,
 1. kapilary z ciągłą warstwą śródbłonka,
 2. kapilary ze śródendotelialnymi otworami w postaci okienek (fenestry) lub kanalików (pory),
 3. kapilary z międzykomórkowymi otworami,
 - α — kapilary niecałkowicie otoczone przez komórki przynaczyniowe,
 - β — kapilary szczelnie otoczone przez komórki przynaczyniowe.

Klasyfikacja ta nie przyjęła się powszechnie, gdyż opisywała kapilary w sposób zbyt rozwlekły lub przeciwnie, skrócony do trójstopniowej symboliki. I tak, dla przykładu, kapilarom mięśni, mózgu oraz zatokom wątroby odpowiada następująca symbolika: A - 1 - α , A - 1 - β i B - 3 - α . Mimo pewnych zawiłości przytoczonych zasad klasyfikacji, publikacja Bennetta i wsp. [30] spełniła nader istotną rolę, gdyż jasno sprecyzowała kryteria morfologiczne, przydatne w analizie ultrastruktury kapilar, stosowane po dzień dzisiejszy.

Obecnie stosujemy inne podziały kapilar [211, 574, 647]. Fawcett [574] podzielił wszystkie kapilary na trzy grupy, wyróżniając kapilary typu (1) mięśniowego, (2) trzewnego oraz (3) zatoki. Ten prosty i bardzo ogólny podział naczyń włosowatych zyskał powszechną aprobatę i jest wciąż stosowany, lecz w miarę przybywania informacji o coraz to nowych szczegółach budowy kapilar podział ten wymagał zmian. Na przykład Rhodin [575], opierając się przede wszystkim na zróżnicowanej ultrastrukturze komórek śródbłonka, wyróżnił pięć typów naczyń włosowatych, a mianowicie:

1. kapilary o ciągłym i grubym śródbłonku (typ mięśniowy),
2. kapilary o ciągłym, lecz cienkim śródbłonku (typ płucno - mózgowy),
3. kapilary o cienkim śródbłonku z okienkami (typ trzewny),
4. kapilary o nieciągłym śródbłonku (typ zatokowy) oraz
5. kapilary tętnicze i żyłne.

Jest to najpełniejszy podział naczyń włosowatych z wszystkich dotychczas stosowanych, ale również i on zalicza w niektórych przypadkach do wspólnej kategorii kapilary zasługujące z różnych względów na osobne omówienie, jak np. kapilary płuc i mózgu. Zachowując w naszym opracowaniu podział naczyń włosowatych zaproponowany przez Rhodina, wyróżniamy jednak szereg odmian tych naczyń, charakterystycznych dla poszczególnych narządów.

3.3. ULTRASTRUKTURA WARSTWY WEWNĘTRZNEJ KAPILAR

Warstwa wewnętrzna kapilar składa się z komórek śródbłonka, które w większości naczyń tworzą różnej grubości warstwę ciągłą. Komórki śródbłonka, po raz pierwszy obserwowane w mikroskopie elektronowym przez Paladego w 1953 r. [513], są ograniczone przez błonę komórkową. Struktura tej błony jest zmieniona tylko lokalnie, mianowicie na obszarze połączeń komórek (rys. 2) oraz w miejscach odpowiadających okienkom (rys. 3). Na podstawie liczebności i rozmieszczenia rozmaitych organelli, w komórkach śródbłonka wielu naczyń włosowatych, np. w sercu, przeponie, trzustce i kosmkach jelita, można wyróżnić cztery obszary. Są nimi (1) obszar leżący bezpośrednio przy połączeniach komórek, (2) obszar brzeżny, (3) obszar organelli i (4) obszar jądra komórkowego [645].

Do poznania topografii komórek śródbłonka, a zwłaszcza wyglądu, budowy i rozmieszczenia struktur powierzchniowych, przyczynił się w dużym stopniu rozwój techniki umożliwiającej oglądanie w transmisyjnym mikroskopie elektronowym powierzchni preparatów łupanych, tzw. techniki freeze - etching [227, 228, 406, 455, 492, 597, 645], a także rozwój mikroskopii skaningowej [3, 478, 653].

Błona komórkowa ograniczająca śródbłonek naczyń włosowatych tworzy szereg wyspecjalizowanych struktur, jak mikrokosmki, mikrofałdy, płatki brzeżne, kaweole oraz wypustki palczaste, nawiązujące połączenia z perycytami warstwy środkowej. Odpowiednio zmodyfikowane okolice błony komórkowej tworzą przegrody okienkowe (diafragmy), zamykające okienka, niektóre kaweole i kanaliki w ścieniałych częściach komórek śródbłonka. Obecność lub brak tych struktur, ich liczba i rozmieszczenie wiążą się z typem naczyń włosowatych oraz budową i czynnością narządów. Jedne z nich mogą być obecne po obu stronach komórek śródbłonka, jak np. kaweole i mikrofałdy, podczas gdy płatki brzeżne występują tylko po stronie światła naczyń, a wypustki nawiązujące łączność z perycytami — po stronie zewnętrznej.

W kapilarach licznych narządów, np. płuc, mózgu, gruczołów dokrewnych i in., części peryferyczne komórek śródbłonka są silnie ścieniałe. Za wyjątkiem pęcherzyków plazmolemalnych są one niemal zupełnie pozbawione organelli cytoplazmatycznych, których większość jest zazwyczaj skupiona w obszarze przyjądrowym cytoplazmy (obszar organelli). Cytoplazma komórek śródbłonka jest stosunkowo uboga w organelle pod względem ilościowym, jednak w zasadzie występuje w niej pełny zestaw organelli charakterystycznych dla komórek zwierzęcych, jak jądro, mitochondria, aparat Golgiego, siateczka śródplazmatyczna, rybosomy, centriole, ciała wielopęcherzykowe i pęcherzyki włochate, mikrofilamenty i mikrotubule, ziarna glikogenu, pęcherzyki i wakuole plazmolemalne

oraz struktury związane ze złączami komórek. W cytoplazmie komórek śródbłonna stwierdzono również obecność polimorficznych, otoczonych błoną struktur zwanych ogólnie ciałami Weibela-Paladego. Wymienione organelle występują także w komórkach śródbłonna hodowanych *in vitro* [244, 274].

3.3.1. Specjalizacja plazmolemy komórek śródbłonna

Na podstawie przyżyciowych obserwacji naczyń włosowatych Chambers i Zweifach [110] postulowali w 1940 r. występowanie na powierzchni błony komórek śródbłonna, zwróconej do światła naczyń, cienkiej warstewki substancji, nazwanej przez tych autorów warstwą wewnątrzkapilarną. Spostrzeżenia te potwierdził po upływie wielu lat Luft [429]. Wprowadzając do naczyń czerwień rutenu, służącą botanikom do uwiadczenia pektyny, autor ten wykazał, że zastosowany barwnik tworzy cienką warstwę na powierzchni komórek śródbłonna oraz wnika w przestrzenie międzykomórkowe. Czerwień rutenu wyznacza obecność kwaśnych mukopolisacharydów, które w interpretacji Lufta są syntetyzowane przez komórki śródbłonna i odkładane na ich powierzchni zwróconej do światła naczyń i międzykomórkowych złączy. Podczas rutynowego przygotowywania preparatów do obserwacji w mikroskopach świetlnym lub elektronowym substancje te z reguły ulegają zniszczeniu. Spostrzeżenia Lufta zostały potwierdzone przez innych autorów [640], którzy wykryli w tym samym położeniu PAS - pozytywną warstewkę substancji o grubości 50–60 Å. Wykazano w ten sposób podstawność znacznie wcześniejszych obserwacji i postulatów dotyczących „warstwy wewnątrzkapilarnej” oraz „międzykomórkowego cementu”. Powstała równocześnie potrzeba skorygowania wyników niektórych badań nad ultrastrukturą naczyń, zaprzeczających istnieniu wymienionych produktów komórek śródbłonna.

3.3.1.1. Mikrokosmki. Są to nitkowate, zapewne nieruchome wypustki wolnych powierzchni komórek nabłonkowych. W naczyniach włosowatych występują na powierzchni komórek graniczących ze światłem naczyń. Submikroskopowa organizacja tych struktur jest wyjątkowo uboga, gdyż są one zbudowane z plazmolemy i substancji podstawowej cytoplazmy.

Jak dotąd, obecność mikrokosmków stwierdzono w kapilarach nie-licznych narządów, jak zwoje Gassera i jądra szczura [236], przysadka nerwowa myszy albinotycznej [549], szyszynka szynszyla [452], narząd podsklepieniowy kota [586], ciało szkliste ropuchy [396] i stożek oczny jaszczurki [322]. W ciele szklistym ropuchy i stożku ocznym jaszczurki maczugowate lub nieregularne wypustki wybiegają także z zewnętrznej

powierzchni komórek śródbłonna. Niektóre obserwacje wskazują jednak [653], że szersze zastosowanie skaningowego mikroskopu elektronowego do badań wewnętrznej powierzchni naczyń włosowatych wykaże zapewne bardziej powszechne występowanie mikrokosmków, niżby to wynikało z badań prowadzonych za pomocą transmisyjnego mikroskopu elektronowego.

Zagęszczenie i rozmiary mikrokosmków śródbłonna są rozmaite. W przypadku wymienionych narządów szczura ich liczba wynosi 8–9/1 μm^2 powierzchni śródbłonna, końce mikrokosmków leżą nie dalej niż 1,1 μm od głównej płaszczyzny błony komórkowej, natomiast przeciętna średnica tych tworów wynosi 950 Å.

Nie wiemy nic bliższego na temat czynnościowego znaczenia mikrokosmków kapilar. Przy dużym zagęszczeniu, w istotnym stopniu zwiększają powierzchnię plazmolemy ograniczającą światło naczyń, co może wpływać na efektywność procesów absorpcji, wydzielania lub dyfuzji. Mikrokosmki mogą również wywierać mechaniczny wpływ na krążenie krwi w kapilarach; w opinii niektórych autorów [236] są strukturalnym przystosowaniem śródbłonna, porównywalnym z okienkami kapilar trzewnych. Wbrew pozorom, ostatnia sugestia nie przybliżyła nas do wyjaśnienia rzeczywistej funkcji mikrokosmków. Warto w tym miejscu powołać się na badania Gunna i wsp. [256], którzy wykazali, że naczynia włosowate zwojów Gassera i jąder szczura są selektywnie wrażliwe na toksyczne działanie soli kadmu.

3.3.1.2. Mikrofałdy i płatki brzeżne. Mikrofałdy komórek śródbłonna są silnie spłaszczonymi wypustkami o szerokiej podstawie i różnej wysokości. Zazwyczaj wznoszą się z powierzchni śródbłonna zwróconej do światła naczyń, a w odosobnionych przypadkach występują po obu stronach tych komórek. Mikrofałdy związane z brzegami połączeń międzykomórkowych, zwróconymi do wnętrza naczyń, noszą nazwę płatków brzeżnych. Podobnie jak mikrokosmki, mikrofałdy i płatki brzeżne są utworzone przez plazmolemę i substancję podstawową cytoplazmy.

Mikrofałdy, jeśli występują, są zazwyczaj nieliczne, przy czym najczęściej spotyka się je w kapilarach typu mięśniowego. Duża liczba wypustek śródbłonna o zróżnicowanej morfologii, skierowanych do światła naczyń oraz do przestrzeni wokółwłośniczkowej, jest charakterystyczną cechą niedojrzałych kapilar mózgu [10], skóry i mięśni [674] oraz naczyń regenerujących [617]. Jedną z funkcji mikrofałdów, przypisywaną również płatkom brzeżnym [211, 213], jest ich udział w formowaniu wakuol i transporcie płynów poprzez komórki śródbłonna. Kapilary z wyjątkowo licznymi mikrofałdami, w dodatku występującymi po obu stronach komórek śródbłonna i wielokrotnie zwiększającymi ich powierzchnię, wystę-

pują w grzebieniu ocznym ptaków (rys. 4) [314, 321]. Ten osobliwy typ naczyń włosowatych omawiamy szerzej w punkcie 5.2.3.

Płatki brzeżne są bardzo charakterystyczną strukturą śródbłonka kapilar [211, 434]. Występują po jednej lub obu stronach połączeń międzykomórkowych i sterczą swobodnie do światła naczyń. Płatki brzeżne nie towarzyszą jednak wszystkim połączeniom międzykomórkowym. Na przykład w kapilarach mięśnia brzuchatego łydki psa tylko 36% połączeń ma te struktury [105]. Zdaniem niektórych autorów [236], płatki brzeżne mogą być po części artefaktem, gdyż są szczególnie typowe dla naczyń zapadniętych.

3.3.1.3. Połączenia komórek śródbłonka z perycytami. Na podstawie niektórych elektronogramów, zamieszczanych w różnych publikacjach dotyczących ultrastruktury naczyń włosowatych, można stwierdzić obecność palczastych lub buławkowatych wypustek wybiegających z części podstawowej komórek śródbłonka. Części dystalne wypustek, leżące w odpowiednich wgłębieniach perycytów, tworzą z nimi tzw. połączenia śródbłonkowo - perycytalne. Przez dłuższy czas struktury te uchodziły uwadze badaczy, toteż brak jest jakichkolwiek danych eksperymentalnych, które wskazywałyby na ich znaczenie czynnościowe. Szczególnie charakterystyczne dla małych tętniczek, zwłaszcza dla ich odcinków przedkapilarnych, są analogiczne połączenia śródbłonkowo - mięśniowe (rys. 5). Wypustki śródbłonka przechodzą przez okienka w blaszce podstawnej i sąsiadują bezpośrednio z błoną komórek mięśni gładkich lub perycytów, oddzielone od niej jedynie wąską szczeliną, podobną do przestrzeni międzykomórkowej połączeń otwartych. Połączenia takie obserwowaliśmy w tętnicach skrzelowych i odcinkach tętnicznych sieci dziwnych pęchera pławnego ryb, a także w naczyniach stożka ocznego jaszczurki [324]. Według przypuszczeń Rhodina [575], połączenia te mogą służyć komórkom śródbłonka do przekazywania impulsów sąsiadującym z nimi perycytom lub komórkom mięśni gładkich, wywoływanych przez serotoninę i histaminę. W podobnym kierunku idą przypuszczenia wyrażone przez Matsusaka [449], który na podstawie obserwacji kapilar siatkówki i naczyniówki człowieka wyróżnił trzy morfologiczne typy połączeń międzykomórkami śródbłonka i perycytami.

3.3.1.4. Pęcherzyki plazmolemalne. Pęcherzyki plazmolemalne oraz ich formy otwarte na powierzchnię błony komórkowej, tzw. kaweole, należą do najbardziej licznych struktur komórek śródbłonka naczyń (rys. 2 i 6). Przez analogię do podobnych struktur występujących w różnych typach komórek i związanych ze zjawiskiem pinocytozy, opisanym po raz pierwszy w 1931 r. przez Lewisa [417], nazwano je pęcherzykami (mikro)pinocytarnymi i nazwa ta utrzymuje się nadal w większości pu-

blikacji. Wiele danych wskazuje jednak, że struktury te służą do transportu substancji przez komórki śródbłonka. Skoro funkcją ich nie jest pinocytoza, względnie nie jest ona funkcją jedyną, przeto wydaje się słuszne stosowanie dla nich szerszej nazwy pęcherzyków plazmolemalnych. Moore i Ruska [447] zaproponowali, aby termin „pinocytoza” zarezerwować dla aktywnego pobierania płynu przez komórki, służącego własnym potrzebom metabolicznym, natomiast dla procesu pobierania płynu przez małe pęcherzyki i przeprowadzania go porcjami przez komórki śródbłonka ukuli termin „cytopempsis”. Inną proponowaną nazwą dla tego samego procesu jest „diacytoza” [307].

Pierwszy opis pęcherzyków plazmolemalnych w komórkach śródbłonka zawdzięczamy Palademu [513]. Autor ten sugerował, że pęcherzyki plazmolemalne są morfologicznym odzwierciedleniem submikroskopowej formy pinocytozy, lecz wkrótce dostrzegł możliwość ich udziału w przeprowadzaniu substancji ze światła naczyń na zewnątrz [516, 517]. W tym samym kierunku zmierzała interpretacja innych badaczy [28, 30, 457, 477]. Potwierdzeniem tej koncepcji było wykazanie udziału pęcherzyków plazmolemalnych w transporcie koloidów [330, 516, 755], jak również dwukierunkowego ruchu pęcherzyków [54].

Na podstawie różnych cech morfologicznych oraz przestrzennego rozmieszczenia w komórkach, pęcherzyki plazmolemalne można podzielić na (1) pęcherzyki otwarte czyli kaweole i (2) pęcherzyki zamknięte albo wolne, swobodnie zanurzone w cytoplazmie komórek. Błona pęcherzyków otwartych jest bezpośrednią kontynuacją plazmolemy komórek śródbłonka [30, 223, 477, 513, 516, 517]. Pęcherzyki otwarte występują w trzech postaciach: jedne z nich mają kształt sferyczny, leżą blisko plazmolemy i uchodzą na zewnątrz komórki szerokimi ujściami, inne mają kształt butelkowaty i otwierają się na zewnątrz zwężoną szyjką o średnicy 150–400 Å, wreszcie część pęcherzyków sferycznych o szerokich ujściach jest oddzielona od światła naczynia lub przestrzeni okołowłósczkowej cienką błoną (diafragma). Dwie pierwsze kategorie pęcherzyków otwartych reprezentują różne stadia ich powstawania i napełniania wnętrza, natomiast z trzecią kategorią pęcherzyków wiążemy usuwanie zawartości na zewnątrz komórki. Pęcherzyki wolne są formą transportującą substancje przez cytoplazmę komórek [65, 187, 428].

Drobiazgowa analiza oparta na seryjnych skrawkach wykazała, że pęcherzyki otwarte stanowią około 70%, pęcherzyki zamknięte około 30%, a niespełna 1% całej populacji pęcherzyków kontaktuje się bezpośrednio z błoną komórek śródbłonka [519]. Pośród tych ostatnich można wyróżnić cztery następujące po sobie formy, prowadzące od zwykłego przylegania błon do takiego ich przekształcenia, które umożliwia usunięcie zawartości na zewnątrz komórki. Po przejściu przez cytoplazmę,

błona pęcherzyków przywiera do wewnętrznej powierzchni błony komórkowej; początkowo styka się z nią, a następnie łączy, czemu towarzyszy eliminacja poszczególnych warstw połączonych błon pęcherzyków i komórki. W wyniku tego procesu zawartość pęcherzyków jest oddzielona od środowiska zewnętrznego komórek śródbłonka przez przegrody o budowie odpowiadającej błonie komórkowej. Następnie trójwarstwowe przegrody ulegają zniekształceniu, aby w końcu utworzyć jednowarstwowe przegrody, zazwyczaj zgrubiałe w części środkowej. Łączenie się błon i progresywna eliminacja tworzących je warstw jest zjawiskiem powszechnym. W komórkach śródbłonka umożliwia usuwanie zawartości pęcherzyków plazmolemalnych, łączenie się dwóch lub większej liczby pęcherzyków, względnie powstawanie okienek w ściętych częściach komórek.

W kapilarach o silnie ściętych obszarach brzeżnych śródbłonka, pojedyncze pęcherzyki plazmolemalne mogą zespalać się z obu przeciwnymi błonami komórek. W rezultacie powstają krótkie kanaliki o obu ujściach zamkniętych jednowarstwowymi przegrodami. Kanaliki takie opisano początkowo w kapilarach jelita i rdzenia nadnerczy [187, 428], a następnie obserwowano je w naczyniach innych narządów.

Bardziej złożone kanaliki występują w naczyniach włosowatych, zbudowanych z grubszego śródbłonka. Powstają one w wyniku łączenia się i odpowiednich przekształceń dwóch lub większej liczby pęcherzyków plazmolemalnych [276, 371, 496, 519, 646, 783]. W kapilarach przepony szczura pęcherzyki zespolone w łańcuchy zachowują kształt sferyczny, toteż w miejscach połączeń średnica ich światła zwęża się mniej więcej do 100 Å. W śródbłonku kapilar płuc opisano zespoły kanalikowo - pęcherzykowe o średnicy przewężeń 300–500 Å [496]. Polimorfizm tych kanalików, zarówno ze względu na ilość tworzących je pęcherzyków, jak również układ przestrzenny, sugeruje, że powstają one w następstwie przypadkowych kolizji i łączenia się wolnych pęcherzyków. Zapewne są strukturami nietrwałymi, ich powstawanie towarzyszy nasilonemu transportowi substancji o określonych rozmiarach drobin. Kapilary o śródbłonku przebitym licznymi kanalikami o średnicy jednakowej na całej długości obserwowaliśmy w gruczole naczyniówkowym szczupaka [323].

Zgodnie z hipotezą Paladego [65, 66, 515, 518], transport płynu przez komórki śródbłonka wiąże się z następującym szeregiem zjawisk: (1) wskutek inwaginacji plazmolemy, pojawiają się kieszonki odpowiadające pęcherzykom otwartym, czyli kaweolom, (2) zmiana kształtu kaweol na butelkowaty, a następnie oddzielanie się od błony komórki prowadzi do powstania wolnych (zamkniętych) pęcherzyków plazmolemalnych, (3) przesuwanie się wolnych pęcherzyków wskroś cytoplazmy śródbłonka,

(4) łączenie się pecherzyków z plazmolemą przeciwległej powierzchni komórki i (5) progresywna eliminacja składników plazmolemy komórki i pecherzyków, umożliwiającą w efekcie usunięcie zawartości pecherzyków do światła naczynia lub na zewnątrz śródbłonna.

Zależnie od gatunku zwierzęcia, typu naczynia oraz narządu, średnica wolnych pecherzyków plazmolemalnych może wykazywać pewne różnice. Na przykład w kapilarach szyszynki myszy, szczura i chomika wynosi ona 700–1200 Å [452]. Na 1 μm^2 powierzchni śródbłonna kapilar serca myszy, szczura i świnki morskiej przypada średnio 38 pecherzyków [406]. Stwierdzono ponadto, że zagęszczenie pecherzyków jest bardzo podobne na obu powierzchniach części ściętych śródbłonna i niezbyt różni się od liczby stwierdzonej w części przyjądrowej komórek. W obszarach peryferycznych śródbłonna kapilar mięśni, trzustki i jelita pecherzyki plazmolemalne stanowią około 16% objętości cytoplazmy, ich zawartość odpowiada 7% objętości cytoplazmy, udział zaś błon pecherzyków wyliczono na około 8,5%. Liczba pecherzyków otwierających się na 1 μm^2 powierzchni kapilar mięśnia sercowego, przepony, trzustki i jelita wynosi odpowiednio 89, 78, 25 i 10 [645].

Simionescu i wsp. [645] zgromadzili informacje dotyczące liczby pecherzyków przypadających na 1 μm^3 cytoplazmy śródbłonna kapilar różnych narządów szczura. W przeponie, mięśniach szkieletowych, sercu, trzustce i jelicie wynoszą one odpowiednio 617–883, 200–2250, 766, 154 i 118. Według danych Casley - Smitha [92], pecherzyki plazmolemalne zajmują 25–35% objętości bezjądrowych części komórek śródbłonna, przy czym jednemu μm^2 wewnętrznej powierzchni naczyń odpowiada około 0,04 μm^3 pecherzyków. Ostatnio autor ten [105] opublikował wyniki morfometrycznych badań ultrastruktury kapilar mięśnia brzuchatego łydki psa (*m. gastrocnemius*), podając m. in. następujące dane liczbowe: ilość pecherzyków wolnych wynosi około $1,1 \times 10^{14}/100$ g mięśnia, $5,73 \times 10^9/1$ cm^2 powierzchni śródbłonna oraz $4,18 \times 10^{14}/1$ cm^3 cytoplazmy śródbłonna, ilość kaweol zaś wynosi około $2,5 \times 10^{14}/100$ g mięśnia, $9,5 \times 10^9/1$ cm^2 powierzchni śródbłonna i $4,26 \times 10^{14}/1$ cm^3 cytoplazmy.

Z przytoczonych danych wynika, że liczba pecherzyków plazmolemalnych przypadających na jednostkę powierzchni śródbłonna lub objętości cytoplazmy zależy m. in. od typu kapilar, przy czym jest znacznie wyższa w kapilarach mięśniowych w zestawieniu z trzewnymi, a dalej od grubości komórek śródbłonna i prawdopodobnie od stanu czynnościowego naczyń i narządów.

We wczesnych latach sześćdziesiątych panowało jeszcze przeświadczenie o ścisłości połączeń między brzegami stykających się komórek śródbłonna oraz nieprzepuszczalnością połączeń dla cząstek substancji i to

bez względu na ich rozmiary. W rezultacie, przeceniano udział i znaczenie pęcherzyków plazmolemalnych w transporcie substancji przez ściany naczyń. Następnie, stosując różne techniki badawcze wykazano, że w kapilarach o ciągłej budowie śródbłonna pęcherzyki plazmolemalne mają rzeczywiście znaczny udział w transportowaniu cząsteczek różnych substancji [24, 55, 65, 66, 85, 88, 89, 94, 95, 98, 102, 123, 223, 224, 239, 251, 272, 329, 330, 337, 342, 343, 355, 434, 516, 517, 561, 564, 636, 637, 644, 662, 694, 755]. Niektóre obserwacje i eksperymenty zdają się jednak przeczyć udziałowi pęcherzyków plazmolemalnych w transporcie substancji. Na przykład wykazano, że liczby pęcherzyków w okresach wzmożonej i zwolnionej wymiany substancji przez ściany naczyń włosowatych nie odpowiadają liczbom spodziewanym [444]. Co więcej, pęcherzyki plazmolemalne są znakowane ferrytyną bez względu na to, czy badane tkanki zostały uprzednio utrwalone, czy też nie [371]. Aczkolwiek obserwacje te poddają w wątpliwość uniwersalny udział pęcherzyków w transporcie substancji przez komórki śródbłonna, nie wyklucza to jednak, iż mogą one służyć do selektywnego transportu określonych cząsteczek. Shirahama i Cohen [640] zwrócili uwagę, że obecność warstewki kompleksu polisacharydowo - białkowego na dośrodkowej powierzchni komórek śródbłonna prawdopodobnie wywiera wpływ na tempo powstawania pęcherzyków plazmolemalnych i może rozstrzygać o selektywnym pobieraniu przez nie substancji. Wpływ glikokaliks na selektywne pobieranie określonych cząstek i jonów przez pęcherzyki plazmolemalne sugerowali również inni autorzy [29, 116, 303]. Niejednokrotnie wypowiedziano też opinię uznającą pęcherzyki plazmolemalne za strukturalny ekwiwalent systemu „dużych porów” [7, 344], których obecność w barierze kapilarnej postulował Pappenheimer i wsp. [526-528, 562, 563]. Nie odmawiając pęcherzykom ważnej, choć bliżej nieokreślonej roli w fizjologii kapilar, część autorów wyrażała się dość powściągliwie o spełnianiu przez te struktury roli przypisywanej hipotetycznym porom [28, 477].

Pęcherzyki plazmolemalne funkcjonują we właściwy dla siebie sposób również przy braku aktywności komórek, np. wobec wysokiej koncentracji inhibitorów oksydacyjnych i glikolitycznych. Spełniane przez nie czynności nie wymagają więc nakładów energii [94, 329]. W opinii licznych autorów, wędrówka pęcherzyków plazmolemalnych wskroś cytoplazmy komórek zachodzi pod wpływem ruchów Browna [65, 66, 86, 92, 94, 95, 98, 251, 346, 519, 635-637]. W proponowanym ujęciu transport pęcherzykowy byłby odpowiednikiem dyfuzji, z tą wszakże różnicą, że materiał przechodzi przez cytoplazmę komórek porcjami, jest zamknięty w pęcherzykach i nie dyfunduje w postaci odrębnych cząstek. Mimo obiekcji niektórych badaczy [636], Casley - Smith [92] wykazał, że również oddzielanie się pęcherzyków od błony śródbłonna może zachodzić

pod działaniem sił Browna, przeto i ono nie wymaga specjalnych nakładów energii. Obecnie toczy się dyskusja nad wymienionymi zagadnieniami wędrówki pęcherzyków plazmolemalnych [102, 105, 251, 635], toteż wyprowadzanie w tym zakresie definitywnych wniosków byłoby przedwcześnie.

Czas, w jakim pęcherzyki plazmolemalne przechodzą przez cytoplazmę komórek śródbłonka (turnover time), miał wynosić wedle kalkulacji Renkina [561] około 300 s. Bruns i Palade [66] nazwali go „czasem połowicznym” albo „czasem przejścia” (half-cycle, traverse time), podając dlań wartość około 24 s. Natomiast Casley - Smith [92], uwzględniając dwukierunkowy ruch pęcherzyków i działające na nie siły Browna wyliczył, że pęcherzyki pokonują odległość między przeciwległymi błonami komórki w około 0,5–1 s (połowiczny czas transportu). Ponadto autor ten podaje, że średni czas trwania pęcherzyków w stanie wolnym wynosi około 1,5 s, podczas gdy średni czas zespolenia pęcherzyków z błoną komórki wynosi około 2,5 s. Z przytoczonej pracy wynika, że na 1 μm^2 powierzchni śródbłonka przypada około 125 pęcherzyków przytwierdzonych po każdej z obu stron komórki oraz około 175–300 pęcherzyków wolnych. W każdej sekundzie błony komórek śródbłonka tracą i zyskują po około 50 pęcherzyków/1 μm^2 . Stosując różne wyznaczniki elektronowo gęste (markery), jak ferrytyna, peroksydaza chrzanowa i in., Casley - Smith i Chin [102] wykazali, że czas medialny przechodzenia pęcherzyków przez śródbłonek grubości 0,3–0,5 μm wynosi 3–5 s. W tym stosunkowo krótkim czasie połowa oznakowanych pęcherzyków przechodzi wskroś cytoplazmy komórek śródbłonka.

Badania histochemiczne wykazały, że w ścianach małych naczyń krwionośnych zachodzi hydroliza substratów nukleotydowych: ATP, ADP i AMP. Wykazując selektywną obecność ATPazy w pęcherzykach plazmolemalnych kapilar, Marchesi i Barrnett [441] sformułowali hipotezę mówiącą o obecności w tych strukturach enzymów hydrolizujących nukleotydy adeninowe, ATP, ADP i AMP. Autorzy ci przytoczyli również wyniki badań wskazujących, że kapilary różnych tkanek mogą wykazywać różną aktywność i lokalizację enzymów. Na przykład stwierdzono brak aktywności fosfatazy nukleotydowej w pęcherzykach plazmolemalnych kapilar mózgu, natomiast wykazano jej obecność w blaszce podstawowej oraz w wypustkach komórek glejowych otaczających te naczynia.

Oprócz małych pęcherzyków plazmolemalnych, w cytoplazmie komórek śródbłonka występują także większe, lecz mniej liczne pęcherzyki, nazywane wakuolami pinocytotycznymi [211, 213], wakuolami brzeżnymi [215], pęcherzykami makropinocytotycznymi [665] lub pęcherzykami fagocytarnymi [102]. W kapilarach żaby średnica tych wakuol wynosi

1000–7500 Å [665], a w kapilarach gruczołu naczyniówkowego ryby męklawki, *Amia calva*, może przekraczać 1 μm [215].

Duże pęcherzyki powstają przy współdziałaniu mikrofałdów i płatek brzeżnych, których brzegi zaginając się, łączą się z błoną komórki śródbłonka i zamykają w pęcherzyki. Wprowadzają one do wnętrza komórek śródbłonka kropelki plazmy krwi i przeprowadzają je prawdopodobnie na zewnątrz naczyń. Zjawisko to, dość powszechne w naczyniach niektórych narządów niższych kręgowców, opisano również w kapilarach ssaków, u których występuje w szczególnie nasilonej postaci w warunkach patologicznych, np. w następstwie doświadczalnie wywołanego obrzęku mózgu [430, 432].

Między ścianami niektórych wakuol i plazmolemą komórki tworzą się okienka zamknięte pojedynczymi przegrodami. Znaczenie czynnościowe takich połączeń między wnętrzem wakuol i światłem naczyń włosowatych jest nieznane. Nasuwa się przypuszczenie, dla którego nie mamy jednak dowodu, że przegrody okienek mogą umożliwiać selektywną zmianę zawartości wakuol, wypełnionych kroplami osocza krwi (rys. 7).

3.3.1.5. Okienka śródbłonka (fenestry). Ścieniały śródbłonek kapilar trzewnych, występujących w ścianach przewodu pokarmowego, w gruczołach zewnątrzwydzielniczych (rys. 6) i dokrewnych oraz w szeregu innych narządów (rys. 8), jest przebity przez mniej lub bardziej liczne okienka o różnej średnicy [65, 123, 187, 197, 227, 228, 249, 426, 428, 452, 571, 575, 597, 644, 645, 665], zamknięte zazwyczaj cienką przegrodą (diaphragma) o grubości 40–50 Å [99, 100, 228, 677, 754]. Obecność cienkich przegród w okienkach naczyń postulowano od dawna [186, 197, 571, 764, 776], choć nie brakowało głosów przeczących ich istnieniu [526]. Okienka śródbłonka kapilar trzewnych są kolejną strukturą, obok pęcherzyków plazmolemalnych, umożliwiającą przechodzenie drobin różnych substancji przez barierę krew–tkanki i również kandydują do roli strukturalnych odpowiedników porów.

Okienka i ich przegrody powstają wskutek łączenia się przeciwległych błon silnie ścieniałych części komórek śródbłonka i stopniowej eliminacji kolejnych warstw złączonych błon, aż do utworzenia jednowarstwowej przegrody [519]. W grubszych częściach śródbłonka, okienka mogą powstawać w wyniku łączenia się pęcherzyków plazmolemalnych [370].

Na temat przegród okienek wypowiedziano wiele odmiennych sądów. Na przykład Wissig [756] uważał okienka za rzeczywiste otwory, przegrody zaś za tangencjalnie przekrojone brzegi okienek. W domniemiach autorów zakładających obecność przegród okienkowych, struktury te miały mieć budowę białkową bez udziału tłuszczu [187], względnie polisacharydową [426]. Wolff i Merker [764], którzy rozpatrując genezę

okienek śródbłonna sugerowali dlań mechanizm fuzji błon, w odniesieniu do przegród wypowiedzieli opinię, iż są one cienką warstwą złożoną z białek osocza krwi.

Obecność przegród w okienkach włóściczek trzewnych nie ulega obecnie wątpliwości [277, 228, 349, 455, 519, 554, 571, 597, 645, 678]. Jednak w czasie rutynowego przygotowywania tkanek do obserwacji w mikroskopie elektronowym często ulegają one zniszczeniu. Nie wyklucza to istnienia okienek bezprzegrodowych, których obecność wiążemy najczęściej z kapilarami ciałek nerkowych i zatokami wątroby.

Oglądanie powierzchni naczyń w mikroskopie elektronowym w połączeniu z techniką rozłupywania zamrożonych tkanek (freezing - etching) umożliwiło zbadanie trójwymiarowej struktury kapilar trzewnych [227, 228]. Badania te wykazały m.in., że części środkowe przegród okienkowych są wyraźnie zgrubiałe. Średnica tych zgrubień wynosi wedle różnych autorów 100 Å [571], 150–200 Å [187] lub 150–250 Å [455]. Na szczególną uwagę zasługuje publikacja Maula [455], w której autor ten ustalił szereg dalszych szczegółów morfologicznej organizacji przegród. Tak więc okazało się, że wiele okienek i przegród ma kształt ośmiokątny. Zgrubienia przegród są zbudowane z kilku podjednostek, a mianowicie z dwóch pierścieni i 8 włókien, promieniście rozmieszczonych między obu pierścieniami. Wewnętrzna średnica pierścienia środkowego wynosi 25–100 Å, pierścienia zewnętrznego 150–250 Å, średnica zaś włókien 20–40 Å. Wykorzystując fakt obecności zgrubień z jednym pierścieniem autor spekuluje, iż w przypadku występowania pierścienia zewnętrznego, który może rozszerzać się pod wpływem ciśnienia hydrostatycznego, przegrody takie mogą odpowiadać postulowanym przez fizjologów dużym porom.

Na podstawie obserwacji kapilar jelita [426, 428] i rdzenia nadnerczy [187] ustalono, że przegrody okienek nie odpowiadają pod względem strukturalnym błonie elementarnej (unit membrane), lecz są zbudowane z pojedynczej, gęstej blaszki będącej przedłużeniem zewnętrznej warstwy plazmolemy. Brak budowy warstwowej, zwłaszcza brak środkowej warstwy plazmolemy wskazuje, że przegrody są zbudowane z błonki białkowo-polisacharydowej i brak im ciągłej warstwy hydrofobowej. Z taką budową przegród wiążemy zwiększoną przepuszczalność tych struktur w porównaniu z błoną komórkową [123]. Nasuwa to przypuszczenie, że przegrody okienek mogą być strukturalnym odpowiednikiem porów. Clementi i Palade [123] zastrzegli się jednak, że hipoteza ta wymaga wykazania, że (1) w przegrodach występują otwory o średnicy około 90 Å i stosunkowo dużej liczebności (15–20/1 μm^2), co wynika z postulatów zgłoszonych pod adresem małych porów oraz (2) nieznaczna część okienek, niespełna 0,3% całej ich populacji, jest okienkami

bezprzegrodowymi o średnicy około 500 Å. Ten ostatni warunek wpływa z postulatów dotyczących tzw. dużych porów (zob. str. 427).

Szereg faktów i obserwacji wskazuje na strukturalne i czynnościowe związki okienek i pęcherzyków plazmolemalnych. Na przykład Wolff [762] zwrócił uwagę, że liczba pęcherzyków w śródbłonku naczyń włosowatych szczurów z usuniętą przysadką jest odwrotnie proporcjonalna do liczby okienek. Między innymi na tej podstawie rozpatrywano znaczenie pęcherzyków plazmolemalnych w ewentualnej transformacji śródbłonka ciągłego w okienkowaty i na odwrót [764].

Simionescu i wsp. [645] zwrócili uwagę, że obszar zajmowany w kapilarach trzewnych przez okienka jest znacznie większy od postulowanego dla dużych porów. Dysproporcja ta może być prawdopodobnie wyjaśniona obecnością przegród w okienkach, zmniejszających efektywną średnicę okienek, a także obecnością w komórkach pęcherzyków plazmolemalnych transportujących duże cząsteczki. Jednak w przypadku kapilar jelita rola pęcherzyków w transporcie substancji wielkocząsteczkowych jest przypuszczalnie drugorzędna. Wskutek różnic strukturalnych, okienka mogą być odpowiednikiem obu typów „porów”: dużych i małych.

Możliwość oglądania w mikroskopie elektronowym powierzchni preparatów rozłupanych dała wgląd w rozmieszczenie okienek w komórkach śródbłonka, bez potrzeby uciekania się do nad wyraz zmutnej metody rekonstrukcji ultracienkich skrawków. Ryan i wsp. [597] wykazali, że w kapilarach kory i rdzenia nadnerczy chomika okienka układają się w pasmach rozdzielonych przez zgrubiałe części śródbłonka. Te ostatnie są rozmieszczone promieniście i łączą część przyjądrową ze zgrubiałymi brzegami komórki. Na 1 μm^2 powierzchni komórki przypada 35 okienek, których średnica w kapilarach rdzenia i kory nadnerczy wynosi odpowiednio 525–780 Å i 570–1660 Å. Części bezokienkowe śródbłonka zawierają kaweole i wolne pęcherzyki plazmolemalne.

Zagęszczenie i rozmiary okienek różnią się zależnie od narządu i gatunku zwierzęcia. W kapilarach jelita, trzustki i nerek szczura oraz w nerce myszy liczba okienek przypadających na 1 μm^2 powierzchni naczyń wynosi odpowiednio 26, 15, 60 i 30, co stanowi 9,5, 6,0, 14–25 i 35% powierzchni naczyń. Natomiast średnica okienek w kapilarach jelita, trzustki i nerki szczura oraz w jelicie i nerce myszy wynosi 670 Å, 660 Å, 950 Å oraz 350–450 Å i 600–700 Å. Kapilary o największym zagęszczeniu i rozmiarach okienek występują w ciałkach nerkowych.

Zagęszczenie okienek nie jest równomierne na całej długości naczyń włosowatych. Liczba tych struktur jest znacznie wyższa w odcinkach żylnych sieci kapilarnej, co wykazano np. w kapilarach sieci dziwnej nerek [420], kosmków jelita [97], splotu rzęskowego [103], pęcherza pławnego [211] oraz w kapilarach podskórnych [573]. Odcinki żyłne kapi-

lar kory nadnerczy myszy mają około 4,3 razy więcej okienek w porównaniu z odcinkami tętniczymi [554]. Obecność okienek stwierdzono także w początkowych odcinkach żyłek. W żyłkach ślinianek myszy ich średnica wynosi około 700 Å, a odległość między środkami najbliższych sobie okienek wynosi 1300 Å [678]. Wreszcie w naczyniach niektórych narządów, np. w szyszynce ssaków [452], typowe okienka z przegrodami pojawiają się w najmniej spodziewanych miejscach, jak mikrokosmki, fałdy i płatki brzeżne oraz ściany dużych wakuol. Na koniec należy podkreślić, że nadal brak jest eksperymentalnych dowodów umożliwiających rozstrzygnięcie, czy okienka śródbłonka są elementami stałymi, czy też liczba ich zmienia się zależnie od nasilania transportu substancji przez ściany naczyń włosowatych. W związku z tym interesujące są spostrzeżenia, które wskazują na zależność między obecnością przegród w okienkach oraz lokalną koncentracją jonów wapnia [123].

3.3.2. Jądra komórek śródbłonka

Kształt jądra w komórkach śródbłonka zależy od stanu czynnościowego naczyń oraz od czynników mechanicznych działających wewnątrz komórek. W naczyniach rozkurczonych jądra są silnie spłaszczone, wskutek czego mają na przekrojach kształt wydłużony. W naczyniach skurczonych przyjmują kształt owalny, mniej lub bardziej zbliżony do sferycznego. Skurcz jądra i zajmowanie przezeń minimalnej przestrzeni wiąże się z fałdowaniem osłonki jądrowej. Silne fałdowanie jąder komórkowych śródbłonka stwierdzono np. w naczyniach o wyraźnie zwiększonej przepuszczalności [436]. Podobny efekt wywołuje podawanie zwierzętom niektórych biologicznie aktywnych substancji, jak histamina, serotoninina lub bradykinina [336, 439]. Jądra śródbłonka, zdeformowane w wyniku działania tych związków, wykazują zależnie od stopnia zniekształcenia: (1) szerokie zagłębienia, (2) głębokie szczeliny, (3) obszerne zagłębienia zwężone przy powierzchni jądra, względnie (4) wgłębienia o ujściach zamkniętych na skutek zetknięcia się ograniczającej je osłonki, co może mieć miejsce przy powierzchni lub w głębi jądra.

Kształt jądra, a ściślej stopień jego deformacji, jest dobrym wykładnikiem skurczu komórek śródbłonka [435]. Deformacja jądra jest rezultatem zdolności komórek do ograniczonego kurczenia się, co z kolei wywołuje zmiany w przepuszczalności kapilar. Temat ten rozwijamy nieco szerzej w kolejnej części opracowania.

3.3.3. Mikrowłókienka i kurczliwość śródbłonka

Zdolność komórek śródbłonka ssaków do aktywnego kurczenia się była powszechnie kwestionowana. Zaciskanie średnicy kapilar wiązano w przeszłości z percytami [35, 379, 594, 711, 778]. Równocześnie nie

brakowało też głosów odmawiających perycytom zdolności do kurczenia się [31, 120]. Dyskusja ta oraz związane z nią kontrowersje przetrwały do czasów współczesnych.

Zwolennicy koncepcji przypisującej kapilarom zdolność zmniejszania średnicy wiązali tę właściwość z aktywnością komórek śródbłonna, wykonywaniem przez nie ruchów ameboidalnych, zmianami ciśnienia wewnątrz i na zewnątrz kapilar, względnie z pęcznieniem komórek śródbłonna, które nie wywołuje zmian w zewnętrznej średnicy naczyń.

Większość autorów współczesnych jest zdania, że śródbłonek kapilar nie ma zdolności kurczliwych w takim znaczeniu, jakie nadajemy mięśniom gładkim [277]. Badania ultrastruktury naczyń wykazały jednak obecność w komórkach śródbłonna delikatnych mikrofilamentów [108, 270, 405, 573, 575]. Średnica włókienek w kapilarach płazów wynosi 60–80 Å. Leżą one równolegle do powierzchni komórek i nie łączą się z błoną komórki, względnie z jej wyspecjalizowanymi obszarami tworzącymi połączenia międzykomórkowe [267]. Na kurczliwy charakter mikrofilamentów wskazują pośrednie badania Beckera i Murphyego [23], którzy wykazali obecność w cytoplazmie komórek śródbłonna białek kurczliwych (aktomiozyna). Obecnie przypuszcza się, że dzięki mikrofilamentom komórki śródbłonna mają ograniczone zdolności kurczenia się i odłączania od komórek sąsiednich. Rezultatem tych zdolności jest powstawanie między komórkami szczelin o lokalnym zasięgu, tzn. nie na całym obwodzie komórki. Zjawisku temu towarzyszy zmiana kształtu komórek, deformacja jąder oraz zwiększona przepuszczalność kapilar. Efekt taki można wywołać eksperymentalnie przez podawanie zwierzętom mediatorów typu histaminy [436, 437, 439]. Obserwacje prowadzone *in vivo* wykazały, że pod wpływem histaminy następuje czasowe (20–30 s) zgrubienie komórek śródbłonna [336].

Po zastosowaniu odpowiedniego utrwalacza (aldehyd glutarowy), wykazano w cytoplazmie komórek śródbłonna obecność mikrotubul [665]. Jak dotąd, znaczenie czynnościowe tych struktur w komórkach naczyń jest nie znane. Być może, iż pełnią funkcję cytoszkieletu, na co zdają się wskazywać obserwacje Mollera i Philpotta [472], wykazujące obecność mikrotubul w wypustkach cytoplazmatycznych komórek śródbłonna lancetnika.

3.3.4. Ciała Weibela–Paladego

W cytoplazmie komórek śródbłonna opisano obecność elektronowo gęstych ziarnistości szczególnie charakterystycznych dla naczyń tętniczych, ale występujących także w naczyniach włosowatych. Pierwszy opis tych struktur jest zazwyczaj przypisywany Weibelowi i Palademu [734],

którzy zwrócili uwagę na obecność pręcikopodobnych ciał tubularnych (rodshaped tubulated bodies) w śródbłonku kapilar płuc, małych tętnic szczura i larw aksolotla. W literaturze specjalistycznej utarło się nawet określanie tych organelli ciałami Weibela–Paladego. Jednak pierwsze wzmianki o ziarnistościach w cytoplazmie śródbłonka naczyń pojawiły się we wcześniejszych publikacjach [68, 211, 357, 513, 540].

Ciała Weibela–Paladego mają różny kształt, od sferycznego po owalny lub wydłużony, różną wielkość, zwykle od 0,1 do 0,5 μm średnicy lub długości, występują w różnym zagęszczeniu, wreszcie charakteryzują się różną organizacją. U niższych kręgowców wewnątrz tych struktur wypełnia drobnoziarnista substancja o różnej gęstości elektronowej, natomiast u ssaków — zazwyczaj struktury tubularne [600]. Opisano je w śródbłonku różnych naczyń krwionośnych człowieka zdrowego i chorego [188, 233, 253, 283, 285, 286, 292, 352, 353, 445, 486, 601, 632, 693, 707, 708, 777], licznych innych ssaków [72, 222, 626, 668, 671, 698, 722] oraz u przedstawicieli pozostałych kręgowców [42, 43, 49, 665, 668], a także u lancetnika [472]. Jak wykazali Handenschild i wsp. [274], ciała Weibela–Paladego występują w 30–70% komórek śródbłonka żyły pępkowej człowieka hodowanych *in vitro*.

Na temat genezy ciał Weibela–Paladego wypowiedziano wiele opinii o charakterze przypuszczeń. Tak więc wskazywano na ich podobieństwo do mitochondriów [167, 514], sugerowano związek z aparatem Golgiego [676], uważano je za odpowiednio zmienione pochodne siateczki śródplazmatycznej [112, 160], względnie wiązano z aktywnością wydzielniczą komórek śródbłonka [487]. W odniesieniu do kapilar siatkówki proponowano dla nich funkcję organelli wrażliwych na światło [301], część autorów zaś utożsamia je z wirusami [340, 364].

Informacje dotyczące znaczenia czynnościowego ciał Weibela–Paladego są skąpe, lecz bardziej spójne. Burri i Weibel [72] przypuszczali, że mogą one zawierać prekursorzy substancji koagulujących. Bertini i Santolaya [42] wyosobnili z homogenatu aorty ropuchy *Bufo arenarum* czynnik podnoszący ciśnienie krwi. W rok później ci sami autorzy skonstatawali wzrost ciśnienia krwi u szczurów, którym wstrzyknięto frakcję ziarnistości z aorty *Bufo arenarum* [43]. Inni badacze [381, 445] wykazali wzrost liczebności tych ciał w kapilarach tęczówki pacjentów z zaburzeniami krążenia. Dalsze badania idące w tym kierunku powinny wykazać, czy rezultaty uzyskane przez Bertiniego i Santolaya mają bardziej uniwersalne znaczenie.

3.3.5. Połączenia komórek śródbłonka

Większość kapilar mięśniowych ma na przekrojach poprzecznych po dwa połączenia międzykomórkowe. Oznacza to, że światło tych naczyń

jest ograniczone dwiema komórkami śródbłonka. Większość kapilar jelita ma tylko jedno połączenie, a zatem warstwa śródbłonkowa tych naczyń jest utworzona zazwyczaj przez pojedyncze komórki rozmieszczone szeregowo [645]. W mięśniu sercowym, przeponie, płucach, tłuszczu brunatnym i mięśniach gładkich pęcherza moczowego królika i szczura [761] oraz w mózgu szczura [763] opisano odcinki naczyń włosowatych bez widocznych połączeń międzykomórkowych. W takich przypadkach światło naczyń nie jest ograniczone przez jedną lub większą liczbę komórek, lecz tworzy kanały przeszywające komórki śródbłonka (rys. 9, 10 i 11).

W sieci naczyń włosowatych kory mózgowej szczura około 15–30% przypada na kapilary bezpołączeniowe. Wprawdzie część tych naczyń może reprezentować na preparatach przekroje styczne, ale co najmniej połowa kapilar jest rzeczywiście pozbawiona połączeń międzykomórkowych [763]. Bezpołączeniowe naczynia włosowate występują dość licznie w miejscach przechodzenia kapilar w najmniejsze żyłki [761]. Zdaniem niektórych autorów [126, 617, 745], kapilary bezpołączeniowe powstają z odpowiednio zmienionych przestrzeni międzykomórkowych. Wolff i Bär [763] zakwestionowali jednak możliwość takiej genezy omawianych naczyń i zaproponowali bardziej przekonującą hipotezę. Mianowicie autorzy ci zwrócili uwagę, że na końcach pączków rosnących naczyń powstają w komórkach śródbłonka wgłębienia, które mogą łączyć się z obecnymi w cytoplazmie wakuolami. Po nawiązaniu kontaktu przez koniec rosnącego naczynia z inną kapilarą lub żyłką, wakuole szczytowe zapewne otwierają się i łączą światła obu naczyń. Hipoteza ta wyjaśnia fakt częstego występowania kapilar bezpołączeniowych na przejściu włosniczek w żyłki oraz zależność między liczbą tych naczyń i gęstością sieci kapilar.

W kapilarach o budowie typowej, brzegi komórek śródbłonka stykają się ze sobą płasko, stają się cieńsze i nakładają się na siebie na różnej długości, względnie są sfałdowane i przetykają się wzajemnie. Między zewnętrznymi warstwami błony elementarnej graniczących komórek utrzymuje się przestrzeń międzykomórkowa o różnej szerokości. Obserwacje rozmaitych narządów jamistych, gruczołów i nabłonków wykazały istnienie trzech typów złączy międzykomórkowych, które ograniczają bądź zamykają całkowicie przestrzenie międzykomórkowe. Są to: (1) połączenia zwarte czyli obwódki zamykające (*zonulae occludentes*), (2) połączenia otwarte, inaczej zwane połączeniami pośrednimi lub obwódkami przylegania (*zonulae adherentes*) oraz (3) desmosomy, czyli plamki przylegania (*maculae adherentes*) [203]. Obecność wszystkich trzech typów połączeń potwierdzono również dla śródbłonka naczyń włosowatych [342]. W naczyniach włosowatych niższych kręgowców spotykane są wszystkie trzy typy złączy międzykomórkowych, natomiast u wyższych kręgowców,

zwłaszcza u ssaków, najczęściej występują połączenia pośrednie, w kapilarach niektórych narządów stwierdzono obecność połączeń zwartych, obecność desmosomów zaś należy do rzadkości (rys. 2).

Połączenia zwarte charakteryzują się zetknięciem lub fuzją zewnętrznych listków sąsiadujących ze sobą błon śródbłonka, dzięki czemu przestrzenie międzykomórkowe są zamknięte. Obszary zespolonych błon tworzą taśmy opasujące naczynia włosowate, których szerokość wynosi zwykle 0,2–0,5 μm . Stosując rozmaite elektronowo gęste wyznaczniki (markery) wykazano, że połączenia zwarte stwarzają barierę dla tych substancji, bez względu na średnicę i ciężar cząsteczkowy użytych substancji. Połączenia zwarte są szczególnie charakterystyczne dla kapilar większości obszarów mózgu, gdzie stanowią strukturalne podłoże tzw. bariery krew–mózg [342, 484, 544, 560, 582, 784].

W początkowym okresie badań ultrastruktury naczyń włosowatych sądzono, że większość połączeń międzyśródbłonkowych charakteryzuje się ścisłą apozycją błon, stwarzającą barierę dyfuzyjną dla substancji o niskim ciężarze cząsteczkowym. Stanowisko takie zdawały się potwierdzać wyniki eksperymentów, w których zwierzętom doświadczalnym podawano dożylnie ferrytynę, białko o ciężarze cząsteczkowym około 500 000 i średnicy około 110 Å. Nieprzepuszczalność przestrzeni międzykomórkowych dla ferrytyny była podstawą wniosku o występowaniu w tej strefie połączeń zwartych. Dopiero zastosowanie jako wyznacznika peroksydazy chrzanowej, białka o ciężarze cząsteczkowym równym 40 000 i średnicy około 40 Å, przy równoczesnym zastosowaniu dużych powiększeń wykazało, że białko to opuszcza światło naczyń przez przestrzenie międzykomórkowe. Większość złączy między komórkami śródbłonka należy do kategorii otwartych (pośrednich), w których najmniejsza odległość sąsiadujących błon wynosi około 40 Å. Jednak według obliczeń Casley - Smitha i wsp. [105], dotyczących kapilar mięśniowych psa, połączenia pośrednie osiągają długość 21 km/100 g mięśnia ($2,14 \times 10^6$ cm/100 g), natomiast połączenia zwarte aż 430 km/100 g mięśnia ($4,26 \times 10^7$ cm/100 g).

Desmosomy są strukturami nieciągłymi, w kształcie owalnych lub okrągłych tarczek. Służą do zespolenia komórek i nie wywierają istotnego wpływu na przepuszczalność kapilar. Opisano je m. in. w naczyniach włosowatych pęcherza pławnego ryb [210, 327].

Połączenia międzykomórkowe wywierają zasadniczy wpływ na przepuszczalność naczyń dla drobin różnych substancji. Wcześniejsze badania submikroskopowe kładły nacisk na funkcji adhezyjnej połączeń [208, 210, 266, 494, 765], natomiast na ich związek z przepuszczalnością naczyń zwrócono uwagę w nieco późniejszych badaniach [200, 201, 354, 356, 465, 484, 532]. Szerokie zastosowanie w ostatnich latach drobnocząstecz-

kowych markerów pozwoliło ustalić ponad wątpliwość, że przestrzenie międzykomórkowe śródbłónka kapilar, zwłaszcza należących do typu mięśniowego, stancwią główną i najszybszą drogę przenikania substancji przez ściany naczyń i są strukturalnym odpowiednikiem systemu małych porów. Udział i znaczenie przestrzeni międzykomórkowych w wymianie substancji przez śródbłonek omawiamy obszerniej w rozdziale 4.

3.4. ULTRASTRUKTURA WARSTWY ŚRODKOWEJ KAPILAR

Warstwa środkowa naczyń krwionośnych włosowatych składa się z heterogenicznej błony podstawnej śródbłónka (*membrana basalis*) i otaczanych przez nią perycytów. Powierzchnie komórek sąsiadujących z kapilarami powleka błona podstawna parenchymatyczna. Między obu błonami rozciąga się łącznotkankowa przestrzeń okołowłoścniczkowa o różnej szerokości. Leżą w niej, a w niektórych przypadkach wypełniają całkowicie, składniki nieciągłej warstwy wewnętrznej włoścniczek. W ciałkach nerkowych, a lokalnie również w innych narządach, śródbłonek naczyń jest oddzielony od komórek parenchymy pojedynczą, wspólną błoną podstawną, przestrzeń okołowłoścniczkowa zaś w takich przypadkach nie występuje. W przeciwieństwie do kapilar krwionośnych, ściany kapilar limfatycznych nie mają błony podstawnej.

3.4.1. Błona (blaszka) podstawna śródbłónka

Błona podstawna śródbłónka naczyń oraz innych struktur nabłonkowych składa się z trzech warstw o różnej gęstości elektronowej, a mianowicie z blaszki luźnej wewnętrznej (*lamina rara interna*), środkowej blaszki zbitej (*lamina densa*) i blaszki luźnej zewnętrznej (*lamina rara externa*) [27, 209, 211, 667, 770]. W miejsce nazwy błona podstawna, nowsze publikacje z zakresu ultrastruktury naczyń włosowatych coraz częściej stosują określenie blaszka podstawna (*lamina basalis*), służące do opisywania dobrze zarysowanej na elektronogramach blaszki zbitej. Obie te nazwy należy zatem uważać za synonimy.

Błona podstawna jest zbudowana z delikatnych mikrowłókienek, opisanych i lepiej widocznych w obu blaszkach luźnych [206, 518]. Pod względem budowy chemicznej, błona podstawna składa się z białek podobnych do kolagenu i węglowodanów [237, 242, 358, 359, 388, 404, 407, 593, 658, 659]. W powstającej błonie podstawnej kapilar, która jest wytworem komórek śródbłónka oraz — prawdopodobnie — perycytów, wykazano obecność kolagenu - podobnych polipeptydów i kwaśnych mukopolisacharydów [458].

Kompletna blaszka podstawna otacza śródbłonek kapilar mięśni szkieletowych i mięśnia sercowego [477, 513], nerek (rys. 12) [260, 512, 535, 536, 567, 568, 770], gruczołów dokrewnych (rys. 11) [697], systemu nerwowego [163, 457], płuc (rys. 13) [13, 347, 421, 422], narządów elektrycznych ryb [30] i in. (rys. 14). Natomiast nieciągła blaszka podstawna, względnie zupełny jej brak, charakteryzuje naczynia włosowate zatokowe wątroby (rys. 15), śledziony i szpiku kostnego oraz włóściczki serca żaby [30, 197, 207, 211, 517, 666, 735].

Grubość blaszki podstawnej śródbłonek wykazuje znaczną rozpiętość i zależy od wielu czynników, w tym od gatunku zwierzęcia [27, 36, 37, 48, 198, 205, 290], wieku [27, 45, 48, 70, 171, 205, 335, 363, 411, 412, 457, 505], ciężaru ciała [413, 414], płci [363, 651], położenia i typu naczyń [27, 30, 36, 37, 48, 171, 197, 198, 205, 229, 290, 400, 457, 552, 568, 715, 746] oraz od obwodu kapilar [414] i różnych czynników patogennych [22]. Blaszkę podstawną o wyjątkowo dużej grubości w warunkach fizjologicznych opisano m. in. w kapilarach mięśni szkieletowych [709], skóry, siatkówki człowieka [290] oraz w kapilarach mięśni i jelita prostego diabetyków [196]. W porównaniu z grubością blaszki podstawnej kapilar mięśni szczurów, wynoszącą 300–500 Å, grubość blaszki podstawnej kapilar mięśni szkieletowych człowieka wynosi 1500–4400 Å, w kapilarach siatkówki zaś 500–4000 Å. We włóścizkach jelita prostego osobników zdrowych i diabetyków grubość blaszki podstawnej wynosi odpowiednio $947 \text{ Å} \pm 96$ i $1531 \text{ Å} \pm 590$. Obecność kapilar o wyjątkowo grubej blaszce podstawnej stwierdzono również u niższych kręgowców, np. w języku rzekotki *Hyla caerulea*, u której struktura ta osiąga grubość 1500 Å [667]. Kilkakrotnie cytowana już praca Casley - Smitha i wsp. [105] podaje, iż w 100 g mięśnia brzuchatego łydki kota łączna powierzchnia blaszki podstawnej kapilar wynosi około 2,5 m².

W niektórych narządach neurohemalnych, jak wyniosłość przyśrodkowa podwzgórza, płat nerwowy przysadki lub narząd naczyniowy blaszki końcowej (*organon vasculosum laminae terminalis*), blaszka podstawna naczyń tworzy liczne rozgałęzienia wciśnięte w tkanki tych narządów. Powstaje w ten sposób silnie rozbudowany system labiryntowy blaszki podstawnej, zwiększający wydatnie powierzchnię obszaru kontaktowego między zakończeniami aksonów neurocytów wydzielniczych i naczyniami krwionośnymi [313, 320, 503, 549, 585].

Wcześniejsze badania ultrastruktury naczyń włosowatych kwestionowały obecność blaszki podstawnej na końcach rosnących włóściczek, interpretując to jako czynnik podnoszący ich przepuszczalność [126, 617]. Obserwacje dotyczące rozwoju osobniczego naczyń włosowatych zarodków kurcząt [663] i szczurów [10] potwierdziły, że różnicujące się kapilary nie mają początkowo blaszki podstawnej. Nie wytwarzają jej również ko-

mórki śródbłonka hodowane *in vitro* [274]. McKinney i Panner [458] wykazali wprawdzie obecność blaszki podstawnej w naczyniach włosowatych regenerujących tkanek ran, ale w świetle badań Bära i Wolffa [10] wydaje się, że istniejące w literaturze rozbieżności mogą mieć swe źródło w obserwacjach dotyczących różnych stadiów rozwojowych naczyń, z których wysuwano zbyt ogólne wnioski. Badając różnicowanie się naczyń włosowatych w kresomózgowiu zarodków szczurów Bär i Wolff stwierdzili, iż zależnie od stopnia rozwoju blaszki podstawnej śródbłonka, należy wyróżnić cztery stadia rozwojowe tych naczyń. Stadium pierwsze charakteryzuje się obecnością lokalnych skupisk delikatnych włókienek rozmieszczonych między śródbłonkiem i parenchymą narządu. W stadium drugim, sieć włókienek jest przytwierdzona do komórek śródbłonka oraz do błon perycytów i komórek glejowych. W miarę dalszego różnicowania (stadium trzecie) pojawia się cienka *lamina densa* o włóknach leżących stycznie do powierzchni śródbłonka oraz *lamina rara*, zawierająca nieliczne włókna o prostopadłym przebiegu włókienek w stosunku do powierzchni naczyń. W końcowym stadium czwartym *lamina densa* ulega silnemu zgrubieniu.

Pierwotnie sądzono, że blaszka podstawna śródbłonka jest luźną siatką włókien z dużymi otworami, nie wywierającą wpływu na przepuszczalność naczyń. Studia nad ultrastrukturą naczyń wykazały jednak, że w większości kapilar jest ona strukturą zwartą, tworzącą wokół zewnętrznej powierzchni śródbłonka ciągłą i niemal jednolitą warstwę. Ograniczając swobodne przenikanie przez ściany kapilar krwinek, płytek krwi i drobin o średnicy przekraczającej 200 Å, współtworzy barierę krew-tkanki [124, 713, 714, 784] (zob. też str. 434). Blaszka podstawna jest również elementem wzmacniającym ściany kapilar [124, 538, 547].

3.4.2. Perycyty

Są one jedynym składnikiem komórkowym środkowej warstwy ścian naczyń krwionośnych włosowatych (rys. 16). W kapilarach limfatycznych nie występują w ogóle. Perycyty wykazują szereg podobieństw do fibroblastów i włókien mięśni gładkich [217, 273, 434, 470, 480], przy czym z ostatnimi tworzą formy przejściowe pod względem cech morfologicznych [218, 290, 470, 480, 707]. Mimo tych podobieństw oraz wyraźnych sugestii, wedle których perycyty są zmodyfikowanymi komórkami mięśniowymi gładkimi [344], brak jest dowodów fizjologicznych na obecność komórek mięśniowych w ścianie naczyń włosowatych [782, 784].

Wobec podobieństw zachodzących między perycytami i innymi komórkami przynaczyniowymi, ważną rolę spełniają ustalone przez Weibella [730] kryteria odróżniające perycyty. Podkreślają one, że (1) kadłuby

perycytów leżą blisko śródbłonka i są otoczone blaszką podstawną naczyń, (2) większe wypustki perycytów są również otoczone przez blaszkę podstawną, (3) najmniejsze rozgałęzienia tych komórek przechodzą przez otwory w blaszce podstawnej i nawiązują ściślejszy kontakt ze śródbłonkiem naczyń, (4) w cytoplazmie perycytów występują dwie strefy z których jedna, zwrócona ku śródbłonkowi, zawiera gęstą sieć mikrofilamentów, druga zaś, leżąca po stronie zewnętrznej, obfituje w pęcherzyki mikropinocytarne, wreszcie (5) w cytoplazmie perycytów występują również nieliczne lizosomy. Ponadto zwrócono uwagę, że perycyty są dłuższe od komórek śródbłonka [434], silniej rozgałęzione w porównaniu z fibroblastami [573], unerwione za pośrednictwem nielicznych i delikatnych włókien nerwowych, aczkolwiek na obrazach uzyskiwanych w mikroskopie elektronowym nie wykazują oznak kurczenia się [439]. Bezpośrednie kontakty między wypustkami sąsiednich perycytów należą jednak do rzadkości, natomiast częstym rysem tych komórek jest występowanie po wewnętrznej stronie plazmolemy tzw. „pół-desmosomów” [573].

Wiele sądów i przypuszczeń wypowiedziano odnośnie fizjologicznego znaczenia perycytów, ale nie wszystkie mają silne oparcie w rezultatach doświadczeń. Jedną z domniemych funkcji perycytów jest zdolność do syntezy własnej błony podstawnej oraz udział w tworzeniu blaszki podstawnej kapilar. Prawdopodobnie są również elementem stabilizującym ściany kapilar, szczególnie istotnym w odcinkach żylnych tych naczyń. Zgodnie z obserwacjami licznych autorów [132, 437, 438, 573], perycyty wespół z blaszką podstawną są częścią bariery krew-tkanki, ograniczającą przenikanie krwinek przez ściany naczyń. Stwierdzono, że np. podczas ekstrawazacji erytrocytów i diapedezy leukocytów krwinki te wykazywały tendencję do pozostawania między śródbłonkiem i środkową warstwą ścian naczyń włosowatych [573]. Kolejna prawdopodobna funkcja perycytów wiąże się z ich wrażliwością na fizyczne zmiany zachodzące w przynaczyniowych obszarach tkanek i narządów. Przypuszczenie to zostało potwierdzone szeregiem obserwacji. Tak więc, podczas rozwoju naczyń w okresie zarodkowym lub na obszarach zablizniających się ran, wypustki perycytu zwrócone w kierunku tkanki łącznej nadają odpowiedni kierunek rosnącym naczyniom, działając zapewne jako detektory wrażliwe na środowisko hormonalne i jonowe. Dzięki kontaktom nawiązywanym przez wypustki perycytów z błoną komórek śródbłonka oraz fibroblastami istnieje możliwość, że przekazują one tym komórkom stany pobudzenia, wywoływane działaniem takich substancji, jak histamina lub serotonina. Wprawdzie dokładny charakter reakcji perycytów jest nie znany, ale przypuszcza się, iż może on być oparty na reakcji jonowej, która zmieniając potencjał błony perycytów umożliwia

przenoszenie sygnałów na komórki śródbłonka. Niektóre obserwacje wskazują na prostą zależność między liczbą perycytów towarzyszących naczyń oraz ich wrażliwością na wymienione aminy. Stwierdzono mianowicie, iż najwyższą wrażliwość na mediatory uwalniane przez tkankę łączną (histamina, serotonina) wykazują żyłki o średnicy 20–30 μm , których ściany mają najwięcej perycytów [437, 438]. Kolejną cechą przypisywaną perycytom są ich zdolności morfogenetyczne. Pomijając drobne różnice interpretacyjne, szereg autorów wyraziło przekonanie, iż perycyty dzielają cechy właściwe komórkom mezenchymatycznym i podobnie jak te ostatnie mogą się przekształcać w określonych warunkach w inne typy komórek [182, 480, 573]. Na koniec należy przypomnieć starą koncepcję, popieraną przez część badaczy współczesnych [65, 434, 706], przypisującą perycytom zdolności kurczliwe, umożliwiające kapilarom zmiany średnicy. Jeżeli jest tak w istocie, to na szczególną uwagę zasługują połączenia między perycytami i komórkami śródbłonka (zob. str. 407).

3.5. ULTRASTRUKTURA WARSTWY ZEWNĘTRZNEJ KAPILAR

Warstwa zewnętrzna kapilar (przydanka) składa się z fibroblastów, leukocytów, limfocytów, makrofagów, komórek tucznych i plazmatycznych oraz z istoty pozakomórkowej tkanki łącznej włóknistej. Jest warstwą wysoce nieciągłą i labilną, gdyż większość jej składników komórkowych ma zdolność do pełzania i zmiany położenia. Wymienione komórki zajmują „strategiczne” położenie na peryferiach bariery krew–tkanki; znaczna ich część wchodzi w skład układu obronnego i odpornościowego organizmów kręgowców. O uznaniu przydanki za część ściany naczyń włosowatych zdecydował m. in. związek jej składników z czynnością kapilar. Makrofagi i inne fagocyty przydanki kontrolują płyny przenikające przez ściany naczyń, wychwytyjąc obce cząsteczki. Komórki tuczne wydzielają prawdopodobnie aminy, które wywołują zmiany w przepuszczalności naczyń [46, 657]. Obłonione ciała elektronowo gęste, będące zapewne uwolnionymi ziarnami komórek tucznych, obserwowano w przestrzeni okołowłósniczkowej kapilar tęczówki człowieka [707]. Fibroblasty przydanki syntetyzują włókna kolagenowe i prawdopodobnie uczestniczą w tworzeniu blaszki podstawnej śródbłonka. Ilość włókien kolagenowych przydanki wiąże się z typem kapilar i budową narządów, wyraźnie wzrasta pod wpływem niektórych czynników patogennych. Kapilary o wyjątkowo silnie rozbudowanej przydance, w której włókna kolagenowe tworzą dwa dużej grubości okołonaczyniowe cylindry, opisano w tęczówce człowieka [707]. Ogiś wypowiedziano pogląd, że fibroblasty i blaszka podstawna tworzą „zewnętrzną rurę kapilar” (outer capillary tube),

w przeciwieństwie do śródbłonkowej „wewnętrznej rury kapilar” (inner capillary tube), która oprócz zadań mechanicznych pełni rolę bariery dyfuzyjnej.

Ultrastruktura poszczególnych składników przydanki naczyń włosowatych jest znana powszechnie, odpowiednie zaś opisy makrofagów, fibroblastów, komórek tucznych i plazmatycznych można znaleźć w licznych opracowaniach podręcznikowych i monograficznych. W tym miejscu ograniczamy się jedynie do wyliczenia charakterystycznych cech strukturalnych fibroblastów, odróżniających je od perycytów i włókien mięśni gładkich. Do cech właściwych fibroblastom zaliczamy brak mikrofilamentów, ciał gęstych i pęcherzyków mikropinocytarnych, jak również brak zewnątrzkomórkowej błony podstawnej. Natomiast włókna mięśni gładkich różnią się od perycytów m. in. niemal zupełnym brakiem rozgałęzień i wypustek, mniejszą ilością cystern szorstkiej siateczki śródplazmatycznej oraz większą ilością mikrofilamentów i ciał gęstych.

4. BARIERA KREW-TKANKI I PRZEPUSZCZALNOŚĆ KAPILAR

Zróznicowana przepuszczalność naczyń w rozmaitych narządach znana była od dawna. Na przykład zdawano sobie sprawę, że tempo filtracji i rozmiary drobin przenikających przez kapilary kłębków nerwowych są większe niż w kapilarach mięśni. Jednak badania prowadzone za pomocą mikroskopu świetlnego nie mogły wykazać strukturalnych podstaw tego zjawiska.

Pod koniec ubiegłego stulecia Starling [660, 661] sformułował hipotezę dotyczącą przechodzenia płynu i drobnocząsteczkowych substancji przez ściany kapilar na zasadzie procesu biernego, którego kierunek i nasilenie zależą od sił hydrostatycznych i osmotycznych. Koncepcja Starlinga zakładała, że śródbłonek kapilar swobodnie przepuszcza gazy, wodę i krystaloidy o ciężarze cząsteczkowym poniżej 10 000, stanowiąc równocześnie nieprzepuszczalną barierę dla większych cząsteczek i koloidów, jak np. białka osocza krwi. Wybiórcza przepuszczalność śródbłonka dla drobin różnych substancji wywołuje odpowiednie ciśnienie osmotyczne krwi, dzięki czemu absorbuje ona z przestrzeni międzykomórkowych wodę i krystaloidy. Ten sam autor wykazał jednak, że kapilary takich narządów jak wątroba lub jelita są przepuszczalne dla koloidów. Podobną właściwość wykazują również kapilary skórne żab [174].

Aczkolwiek sugestie o aktywnej roli śródbłonka w fizjologii kapilar wypowiedziano jeszcze w ubiegłym stuleciu, tym niemniej większość badaczy nie dostrzegała początkowo udziału komórek śródbłonka w procesach przenikania substancji, uważając je wyłącznie za element ograni-

czający płynącą krew i wytwarzający cement międzykomórkowy. Dopiero znacznie późniejsze badania, dotyczące submikroskopowej struktury kapilar, wykazały złożoność ich budowy oraz wskazały na obecność w cytoplazmie śródbłonka szeregu organelli, a także struktur utworzonych przez plazmolemę tych komórek, sugerujących aktywny udział śródbłonka w procesach transportu płynów i drobin różnych substancji. Tak więc wskazywano, iż w zależności od budowy kapilar i rozmiarów cząsteczek, do roli submikroskopowych struktur umożliwiających transport śródkomórkowy oraz pozakomórkowych dróg przenikania substancji, mogą kandydować małe pęcherzyki plazmolemalne, kanaliki śródendoelialne, wakuole, okienka (fenestry) oraz przestrzenie międzykomórkowe śródbłonka.

4.1. TEORIA PORÓW

Pappenheimer i wsp. [394, 526–528, 562, 563] szerzej uzasadnili i rozbudowali hipotezę Starlinga. Badając metodami fizjologicznymi przepuszczalność łożyska naczyniowego kończyn ssaków, gdzie występują kapilary typu mięśniowego o ciągłym śródbłonku i z kompletną blaszką podstawną, autorzy ci ustalili, że podstawą szybkiej wymiany małych drobin między osoczem krwi i tkankami jest proces dyfuzji. Sformułowali tzw. teorię porów, zakładającą istnienie w śródbłonku naczyń włosowatych, wypełnionych wodą, cylindrycznych kanałów o promieniu 40–45 Å, zajmujących niespełna 0,1% powierzchni kapilar, co odpowiadałoby $1-2 \times 10^9$ porów/cm² ściany tych naczyń. Postulowany system małych porów miałby umożliwiać przechodzenie przez śródbłonek naczyń substancji o ciężarze cząsteczkowym od 1000 do 90 000, przy czym wzrostowi ciężaru cząsteczkowego drobin winno towarzyszyć stopniowe ograniczanie dyfuzji. Niewielka łączna powierzchnia małych porów nasunęła przypuszczenie, że funkcję ich spełniają prawdopodobnie szczeliny międzykomórkowe śródbłonka. Przenikanie przez ściany naczyń substancji o ciężarze cząsteczkowym przekraczającym 90 000 oraz rozmiarach drobin większych od średnicy hipotetycznych małych porów wiązano z domniemanym istnieniem nielicznych dużych porów, dla których przewidywano promień około 250 Å [254, 456], względnie z transportem pęcherzykowym [456, 561].

Badania dotyczące regionalnych różnic w przepuszczalności kapilar ssaków dla makrocząsteczek rozpuszczalnych w wodzie ustaliły, że wzrost przepuszczalności zachodzi w następującym porządku: kapilary kończyn (typ mięśniowy), kapilary jelita (typ trzewny), kapilary wątroby (typ zatokowy) [254, 394, 456, 561]. Otrzymane rezultaty tłumaczono obecnością w ścianach kapilar dwóch zestawów porów, małych o średnicy

około 90 Å i dużych o średnicy około 500 Å oraz wzrostem liczebności porów dużych w wymienionym kierunku. Wyliczono mianowicie, że stosunek liczbowy porów dużych do małych wynosi 1 : 30 000 w kapilarach kończyn i szyi oraz 1 : 340 w zatokach wątroby. Według wyliczeń Mayer-sona i wsp. [456], średnica małych porów w kapilarach jelita winna wynosić około 220 Å, w kalkulacji Grotta [254] zaś tylko 70 do 90 Å, natomiast stosunek liczbowy porów dużych do małych winien być mniejszy niż 1 : 340, co odpowiadałoby mniej niż 1 dużemu porowi/17 μm^2 powierzchni śródbłonna. Wykorzystując zdolność przechodzenia białek oraz drobin innych substancji z osocza krwi do chłonki [135, 456, 511, 717, 718], za miarę przepuszczalności kapilar przyjęto w badaniach fizjologicznych stosunek koncentracji obu płynów tkankowych. W ten sposób wykazano m. in., że tempo przenikania jest proporcjonalne do rozmiarów drobin, np. albuminy opuszczają naczynia 1,6 razy szybciej niż globuliny, przy czym ładunek elektryczny drobin prawdopodobnie nie wpływa na tempo transportu.

Badając przepuszczalność kapilar szyi, jelita i wątroby psa dla dekstranów o ciężarze cząsteczkowym od 10 600 do 412 000 Mayerson i wsp. [456] również wykazali obecność w tych naczyniach co najmniej dwóch systemów porów: małych, być może odpowiadających szczelinom międzykomórkowym śródbłonna, umożliwiających przechodzenie drobin o ciężarze do 250 000 oraz dużych, przepuszczalnych dla drobin do 400 000. Autorzy ci wyliczyli, że obszar zajmowany przez pory małe i duże w kapilarach szyi, jelita i wątroby wynosi odpowiednio 95,6% i 4,4%, 78,4% i 21,6% oraz 33,3% i 66,7%. Skoro większość kapilar szyi należy do typu mięśniowego o grubym i ciągłym śródbłonku, kapilary jelita charakteryzują się ścieniałym śródbłonkiem i obecnością okienek, natomiast międzykomórkami śródbłonna kapilar wątroby występują obszerne przerwy o różnej szerokości, przeto hipotetyczne duże pory odpowiadają zapewne okienkom w kapilarach jelita i międzykomórkowym rozstępom w zatokach wątroby, zwiększając ich przepuszczalność dla makrocząsteczek.

Konfrontacja postulatów wypływających z badań fizjologicznych z obserwacjami struktury naczyń włosowatych, przeprowadzanymi za pomocą mikroskopu elektronowego, nie potwierdziła początkowo teorii porów.

Stosowane naonczas markery, przede wszystkim ferrytyna, nie przenikają przez przestrzeń międzykomórkową śródbłonna, co sugerowało obecność połączeń zwartych (*zonulae occludentes*), natomiast transport przez pęcherzyki plazmolemalne okazał się zbyt wolny, aby mógł kandydować do roli hipotetycznych małych porów. Dopiero zastosowanie jako markera peroksydazy chrzanowej, enzymatycznego białka roślinnego o znacznie mniejszym ciężarze cząsteczkowym (40 000) i mniejszej śred-

TABELA 2. Charakterystyka markerów stosowanych w morfologicznych badaniach przepuszczalności kapilar

Nazwa	Średnica cząstki [Å]	Ciężar cząsteczkowy	Autorzy
Hemo-8-peptyd	20	1500	Simionescu et al. [646]
Hemo-11-peptyd	20	1900	Simionescu et al. [646]
Peroksydaza chrzanowa	40, 50	40000	Graham i Karnovsky [248, 249] Karnovsky [431, 342] Bruns i Palade [123] Clementi i Palade [123]
Ferrytyna	100, 110	500000	Palade [513, 516, 517] Palade i Bruns [518] Jennings et al. [330] Florey [224, 225] Majno i Palade [437] Kaye et al. [355]
Dekstran 75	125	75000	Simionescu et al. [643]
Dekstran 250	225	250000	Simionescu et al. [643]
Glikogen	200, 300		Simionescu et al. [643]

nicy (40–50 Å), którego produkt reakcji z dwuaminobenzydyną jest elektronowo gęsty i widoczny w mikroskopie elektronowym, wykazało, że śródbłonek większości naczyń włosowatych charakteryzuje się obecnością połączeń otwartych, które z racji przechodzenia przez nie drobnocząsteczkowych substancji spełniają postulaty ustalone dla małych porów [248, 249, 342]. Zamieszczona tabela 2 podaje podstawowe informacje dotyczące najczęściej stosowanych markerów w badaniach przepuszczalności kapilar. Tytułem uzupełnienia należy nadmienić, że cząstki hemo-peptydów uzyskano przez enzymatyczną hydrolizę cytochromu C [646]. W badaniach przepuszczalności kapilar stosowano również szereg innych, nie wymienionych w tabeli wyznaczników, jak katalaza [614], heomoglobina [545], cytochrom C [344] i inne.

4.2. UDZIAŁ PRZESTRZENI MIĘDZYKOMÓRKOWYCH W PRZEPUSZCZALNOŚCI KAPILAR

Mimo początkowych niepowodzeń w poszukiwaniach morfologicznego odpowiednika systemu małych porów [203, 204, 225, 329, 330, 434, 484, 544, 665], zastosowanie peroksydazy chrzanowej jako wyznacznika cytochemicznego wykazało przenikanie drobin tej substancji przez przestrzenie międzykomórkowe [248, 249, 341, 342]. Potwierdzono tym samym wcześniejsze postulaty upatrujące w szczelinach międzykomórkowych śródbłonna odpowiednika systemu małych porów [110, 111, 394, 526].

W kapilarach mięśniowych przestrzenie międzykomórkowe zajmują około 0,02% powierzchni naczyń. Wprawdzie Pappenheimer postulował, że pory te winny zajmować około 0,1% powierzchni kapilar, ale wychodził on z założenia, że kanały umożliwiające przechodzenie drobin przez ścianę kapilar mają długość około 1 μm . Jeśli uwzględnimy, iż głębokość przestrzeni międzykomórkowych śródbłonna wynosi kilkaset Å, to można stwierdzić, że przestrzenie międzykomórkowe również i pod tym względem spełniają postulaty fizjologów sformułowane w odniesieniu do małych porów.

Liczne eksperymenty wykazały, że przez szczeliny międzykomórkowe zachodzi szybki transport małych cząsteczek i jonów, co jednak nie wyklucza możliwości śródkomórkowego przenikania niskocząsteczkowych substancji za pośrednictwem pęcherzyków plazmolemalnych [91, 134, 239, 329, 342, 343, 345]. Spostrzeżenia te dotyczą przede wszystkim kapilar typu mięśniowego, charakteryzujących się ciągłym i grubym śródbłonkiem oraz obecnością otwartych połączeń międzykomórkowych. Jak podkreślił Karnovsky [342], połączenia zwarte w kapilarach mięśniowych mają charakter lokalny i nie opasują naczyń pełnym pierścieniem. Autor ten sugerował również możliwość występowania w pozornie nieprzepuszczalnych połączeniach zwartych szczelin o średnicy 20–40 Å. Rozwinięciem tej sugestii są badania, które dostarczyły dowodów na możliwość zmian przepuszczalności połączeń międzykomórkowych w różnych warunkach fizjologicznych [696], a także wykazanie, iż połączenia zwarte kapilar mózgu i siatkówki, nieprzepuszczalne dla substancji drobnocząsteczkowych, nie tworzą bariery dla jonów [93]. Zdaniem Casley - Smitha [93], połączenia zwarte zawierają sieć włókienek zanurzonych w polisacharydach. Różnice w liczbie i orientacji przestrzennej włókienek mogą być przyczyną różnej przepuszczalności tych połączeń.

Obecnie dysponujemy bezpośrednimi dowodami potwierdzającymi przenikanie drobnocząsteczkowych substancji przez szczeliny międzykomórkowe [19, 461, 696]. Tym niemniej, Clementi [122] skrytykował wyniki doświadczeń nad przepuszczalnością połączeń międzykomórkowych dla peroksydazy chrzanowej. Wskazując na enzymatyczny charakter markera, autor ten sugeruje możliwość otwierania połączeń międzykomórkowych przez peroksydazę. Jednak obserwacje dotyczące transportu peroksydazy w pęcherzykach plazmolemalnych nie potwierdzają tych obiekcji.

Szczeliny międzykomórkowe kapilar mięśniowych są nieprzepuszczalne dla takich substancji jak ferrytyna [66], dekstran i glikogen [643], mioglobina [644] lub hemoglobina [465]. Badania posługujące się wielkocząsteczkowymi markerami wskazują na śródkomórkowe przechodzenie tych substancji [346].

4.3. UDZIAŁ PĘCHERZYKÓW PLAZMOLEMALNYCH W PRZEPUSZCZALNOŚCI KAPILAR

Palade [513, 516, 517] oraz wielu innych autorów wskazywało na możliwość transportu płynów i wielkocząsteczkowych substancji przez ściany kapilar za pośrednictwem pęcherzyków plazmolemalnych. Na podstawie doświadczeń z ferrytyną uznano je w kapilarach mięśniowych za strukturalny odpowiednik systemu dużych porów [66]. Równocześnie jednak zwracano uwagę, iż jest nieprawdopodobne, aby pęcherzyki plazmolemalne reprezentowały duże pory we wszystkich typach kapilar. W kapilarach typu trzewnego system dużych porów wiązano z okienkami śródbłonna.

Zastosowanie jako markera peroksydazy chrzanowej wykazało, że w kapilarach mięśniowych drobnocząsteczkowe substancje pokonują barierę krew-tkanki nie tylko przez przestrzenie międzykomórkowe, lecz również za pośrednictwem śródendotelialnego transportu pęcherzykowego [341, 343, 345]. Jednakże znaczenie tego rodzaju transportu w szybkim przeprowadzaniu przez ściany naczyń substancji drobnocząsteczkowych niejednokrotnie poddawano w wątpliwość [212, 226]. W przypadku kapilar mózgu peroksydaza jest wprawdzie pobierana przez pęcherzyki, lecz nie przechodzi na przeciwną stronę śródbłonna [560].

Udział pęcherzyków plazmolemalnych w przeprowadzaniu przez śródbłonek kapilar mięśnia sercowego dużych i małych drobin oraz tempo tego procesu ilustrują dane liczbowe zaczerpnięte z publikacji Casley-Smitha i China [102] (tabela 3).

Wielokrotnie donoszono również o śródendotelialnym transporcie ferrytyny za pośrednictwem wakuol [66, 371, 640, 683]. Sugerowano przy

TABELA 3. Liczba i tempo przesuwania się oznakowanych pęcherzyków plazmolemalnych w poprzek śródbłonna

Marker i upływ czasu od jego podania	Liczba pęcherzyków przytwierdzonych do błony graniczącej ze światłem naczynia	Liczba wolnych pęcherzyków w różnej odległości (w μm) od światła naczynia				
		0,1	0,2	0,3	0,4	0,5
Ferrytyna						
4 s	17	33	39	5	7	
8 s	31	29	22	5	5	
12 s	622	1045	942	548	284	155
Peroksydaza						
4 s	31	28	24	15	10	8
8 s	41	32	32	25	19	10
12 s	303	489	377	248	172	67

tym, że wakuole zawierające ferrytynę mogą być wakuolami litycznymi, ciałami wielopęcherzykowymi, względnie ciałami gęstymi. Występowanie we wnętrzu wakuol markerów może być wyrazem makroendocytozy, opisaney przez Fawcetta [211]. W dyskusji dotyczącej udziału pęcherzyków plazmolemalnych w śródendotelialnym transporcie substancji na szczególną uwagę zasługuje publikacja Simionescu i wsp. [646]. Badając przepuszczalność kapilar przepony szczura dla małych cząsteczkowych substancji, a mianowicie hemo-peptydów o ciężarze molekularnym 1500 i 1900 oraz średnicy cząsteczek wynoszącej w obu przypadkach około 20 Å, autorzy ci stwierdzili, że pęcherzyki plazmolemalne były strukturami zawierającymi produkt reakcji, natomiast w przestrzeniach międzykomórkowych śródbłonna zastosowane markery nie pojawiły się w ogóle. Oznakowane pęcherzyki były izolowanymi jednostkami, względnie tworzyły łańcuszkowate kanaliki przebiegające w poprzek komórek śródbłonna. Te ostatnie powstają z dwóch lub większej liczby pęcherzyków, przy czym między kolejnymi ich odcinkami, odpowiadającymi poszczególnym pęcherzykom, średnica światła kanalików jest zwężona przeciętnie do 100 Å, przy rozpiętości w granicach 80–150 Å. Z badań tych wynika, że w kapilarach mięśniowych przepony substancje o ciężarze cząsteczkowym około 1500–2000 przechodzą przez ściany naczyń głównie, a być może wyłącznie, za pośrednictwem pęcherzyków plazmolemalnych i struktur pochodnych. Dzięki zwężeniom średnicy, kanaliki śródendotelialne spełniają funkcję małych porów. Również w odniesieniu do kapilar ciała szklistego ropuchy *Bufo marinus* wykazano, że jedyną drogą przechodzenia substancji przez ściany naczyń jest dyfuzja i transport za pośrednictwem pęcherzyków plazmolemalnych [396]. Podobne spostrzeżenia poczyniono w przypadku kapilar prążka naczyniowego, *stria vascularis*, świnki morskiej. Wprawdzie na przepuszczalność tych naczyń dla peroksydazy chrzanowej wskazywano w szeregu publikacji [180, 507, 748], tym niemniej dopiero Gorgas i Jahnke [247] stwierdzili nieprzepuszczalność połączeń międzykomórkowych śródbłonna oraz obecność markera w pęcherzykach plazmolemalnych.

W oparciu o znaczne rozmiary pęcherzyków plazmolemalnych sądzono pierwotnie, że nie mogą one zapewniać selektywnego transportu, natomiast tempo dyfuzji substancji zamkniętych w pęcherzykach byłoby zbyt powolne, aby stanowiły efektywną drogę przenikania małych cząsteczek przez barierę krew-tkanki. Dane ilościowe związane z transportem pęcherzykowym omówiliśmy w innym miejscu. Natomiast w zagadnieniu wybiórczości transportu pęcherzykowego, która jak dotąd nie jest w pełni rozwiązana, należy zwrócić uwagę na kilka wpływających nań czynników. W odniesieniu do drobnocząsteczkowych substancji czynnikami ograniczającymi transport pęcherzykowy mogą być (1) wybiórcze

własności adsorpcyjne cienkiej warstewki glikokaliksu, pokrywającej wewnętrzną powierzchnię śródbłónka, (2) obecność cienkościennych przegród o określonych własnościach fizycznych i chemicznych, zamykających przeciwne końce kanalików powstających z pojedynczych lub większej liczby pęcherzyków, a także (3) przewężenia tych kanalików, zmniejszające lokalnie ich światło. Czynniki rozstrzygające o selektywności transportu wielkocząsteczkowych substancji przez pęcherzyki plazmolemalne były przedmiotem rozważań Casley - Smitha [92]. Większość tych czynników ma charakter mechaniczny i dotyczy (1) zwiększonych szans dużych drobin na odbijanie się od lejkowatego zagłębienia plazmolemy otaczającego wejście do szyjki kaweol, (2) większego tarcia dużych drobin o ścianę szyjki kaweol oraz (3) prawdopodobnych zmian w średnicy szyjki podczas formowania się kaweol. Wreszcie dalszym czynnikiem podniesionym przez Casley - Smitha jest naturalna skłonność drobin niektórych substancji do adhezji, co może prowadzić do łączenia się wolnych pęcherzyków w większe wakuole, które przestają przesuwac się w poprzek śródbłónka.

Na koniec możemy stwierdzić, że śródendotelialny transport pęcherzykowy nie budzi obecnie wątpliwości. W kapilarach serca i mięśni szkieletowych pęcherzyki plazmolemalne są morfologicznym ekwiwalentem systemu dużych porów, natomiast w kapilarach przepony i niektórych innych narządów umożliwiają transport dużych i małych drobin, i dzięki odpowiedniemu układowi przestrzennemu oraz określonym szczegółom budowy spełniają kryteria dużych i małych porów. Naturalnie, nie wyklucza to *a priori* możliwości przechodzenia mikrocząsteczek o odpowiednio małej średnicy poprzez przestrzenie międzykomórkowe tych naczyń.

4.4. UDZIAŁ OKIENEK ŚRÓDBŁÓNKA W PRZEPUSZCZALNOŚCI KAPILAR

Badania przepuszczalności kapilar trzewnych dla peroksydazy chrzanowej i ferrytyny — markerów o średnicach cząstek umożliwiających testowanie systemu małych i dużych porów — wykazały, że obie kategorie porów są zlokalizowane w okienkach śródbłónka [123]. Peroksydaza opuszcza światło kapilar poprzez przegrody okienek. Po upływie minuty od wprowadzenia jej do krwiobiegu osiąga przestrzenie wokółwłośniczkowe, przy czym największe zagęszczenie markera występuje w sąsiedztwie okienek. Wprawdzie produkt reakcji pojawia się również w pęcherzykach plazmolemalnych, ale transport śródkomórkowy jest zbyt powolny, aby miał istotne znaczenie w przeprowadzaniu mikrocząsteczek przez ściany kapilar trzewnych. Nie można również wykluczyć przechodzenia peroksydazy przez szczeliny międzykomórkowe kapilar

trzewnych, ale i w tym przypadku byłby to proces znacznie powolniejszy od zachodzącego przez przegrody okienek.

Tą samą drogą, choć wolniej, opuszcza światło naczyń ferrytyna. W przestrzeniach wokółwłośniczkowych pojawia się po 3–4 min. od wprowadzenia jej do krwiobiegu. Początkowo wykazuje gradient zagęszczenia, przy czym — podobnie jak w przypadku peroksydazy — największe zagęszczenie drobin tego markera występuje *vis a vis* okienek.

Przytoczone badania sugerują, że przegrody okienek w kapilarach trzewnych są strukturalnym odpowiednikiem systemu małych porów, natomiast funkcję dużych porów mogą spełniać stosunkowo nieliczne okienka bezprzegrodowe. W tym kontekście interesujące są badania, wedle których szereg związków chemicznych, a w ich rzędzie również histamina, usuwa częściowo lub całkowicie przegrody okienek, zwiększając tym samym przepuszczalność naczyń dla makrocząsteczek [124, 361, 583, 669, 781]. Istnieje zatem możliwość, że podobny mechanizm działa w warunkach fizjologicznych, regulując liczebność okienek bezprzegrodowych. Część autorów wiąże oba systemy porów z przegrodami okienek [455]. Stanowisko to zakłada, że obserwowane w mikroskopie elektronowym okienka bezprzegrodowe są artefaktami i nie występują w warunkach fizjologicznych.

4.5. UDZIAŁ BLASZKI PODSTAWNEJ W PRZEPUSZCZALNOŚCI KAPILAR

Każda warstwa ściany kapilar ma określony udział w przepuszczalności naczyń dla drobin różnych substancji. Badania dotyczące kapilar mięśni, skóry i innych narządów wykazały, że blaszka podstawna jest dodatkowym elementem czynnościowym bariery krew-tkanki [132, 133, 438, 440, 479]. Wprawdzie strukturalne odpowiedniki małych i dużych porów są zlokalizowane wyłącznie w śródbłonku kapilar, ale zgodnie z sugestią Clamenti i Paladego [124], w blaszce podstawnej kapilar występują kanały o średnicy równej lub większej od 700 Å. Obserwacje tych autorów ustaliły, że odpowiedniki dużych porów w śródbłonku i blaszce podstawnej tylko wyjątkowo sąsiadują ze sobą. W rezultacie, drobinę substancji o średnicy przekraczającej 200 Å po przejściu przez pory śródbłonka muszą dyfundować w przestrzeni podśródbłonkowej na znaczną odległość, zanim dotrą do kanałów o odpowiedniej średnicy w blaszce podstawnej. Jak podają Casley - Smith i wsp. [105], przepuszczalność blaszki podstawnej dla płynów w kapilarach mięśniowych kota jest 2×10^3 większa w porównaniu z połączeniami pośrednimi tych naczyń.

*
* *
*

Pojęcie bariery krew-tkanki wiąże się z wybiórczą i zróżnicowaną przepuszczalnością kapilar dla drobin różnych substancji. Znajduje ono zastosowanie we wszystkich typach morfologicznych włosniczek z wyłączeniem kapilar zatokowych (zob. str. 461). Fizjologowie mikrokrażenia postulowali istnienie w ścianach naczyń włosowatych dwóch zestawów porów, małych i dużych, umożliwiających przechodzenie mikro- i makrocząstek. Badania ultrastruktury naczyń z zastosowaniem różnych markerów, zwłaszcza peroksydazy chrzanowej i ferrytyny, potwierdziły podstawowe założenia teorii porów oraz wskazały na ich morfologiczne odpowiedniki. W zależności od typu naczyń i narządów, funkcje porów spełniają przestrzenie międzykomórkowe śródbłonka, pęcherzyki plazmolemalne, kanaliki śródkomórkowe, okienka śródbłonka i ich przegrody. Oprócz śródbłonka, również pozostałe warstwy naczyń włosowatych są funkcjonalną częścią bariery krew-tkanki. Przepuszczalność kapilar dla drobin różnej wielkości wykazano stosując rozmaite metody badań, np. wyznaczniki złożone z kompleksu białka i związków fluorescencyjnych [277]. Ze względu na związek śródbłonka z przepuszczalnością kapilar, Intaglietta i de Plomb [300] zaproponowali podział tych naczyń na dwie formy czynnościowe. Jedną z nich miałyby być kapilary „rurowe” o ciągłym śródbłonku ograniczającym transport śródbłonkowy, w których funkcję urządzeń kontrolujących przepuszczalność bariery krew-tkanki spełniałyby połączenia międzykomórkowe. Drugą formę kapilar nazwano „tunelowymi” i zaliczono tu włosniczki o cienkim i okienkowatym śródbłonku, którego wpływ na przepuszczalność bariery krew-tkanki jest nieznaczny. W przypadku tych naczyń, filtracja i dyfuzja miałyby zależeć od właściwości otaczających tkanek.

5. TYPY KAPILAR I ICH ULTRASTRUKTURA

5.1. KAPILARY O CIĄGŁYM I GRUBYM ŚRÓDBŁONKU (TYP MIĘŚNIOWY)

Występują one w mięśniach szkieletowych i trzewnych [30, 65, 575, 774], w sercu [52, 65, 508, 688], narządach elektrycznych [30], ścięgnach [217], krezce [442] i skórze [297]. Wchodzą również w skład sieci naczyńniowych jąder, jajników i niektórych innych narządów. Charakteryzują się najbardziej typową budową spośród wszystkich naczyń włosowatych. W ich ścianach można zwykle wyróżnić wszystkie trzy warstwy, a mianowicie wewnętrzną, środkową i zewnętrzną. Składniki te omówiono w miarę dokładnie w początkowej części opracowania, toteż ponowne rozwijanie tego tematu nie jest konieczne.

Grubość śródbłonka kapilar typu mięśniowego wynosi 0,2–0,5 μm , przy czym w okolicy przyjądrowej znacznie wzrasta i może osiągać

1–5 μm . W cytoplazmie komórek śródbłonna oraz przy obu ich powierzchniach występują liczne pęcherzyki plazmolemalne, swobodnie zanurzone w cytoplazmie (pęcherzyki wolne), względnie zespolone z błoną komórek i otwarte do światła naczyń lub do przestrzeni podśródbłonkowej (kaweole) (rys. 17). Większość organelli komórkowych skupia się w strefie przyjądrowej (cytocentrum), natomiast w peryferycznych częściach komórek występują — oprócz pęcherzyków plazmolemalnych — nieliczne cysterny szorstkiej siateczki śródplazmatycznej, mitochondria, grupki wolnych rybosomów oraz mikrofilamenty i mikrotubule. Powierzchnia śródbłonna zwrócona do światła naczyń tworzy krótkie mikrokosmki, zwykle nieliczne, natomiast w sąsiedztwie części połączeń międzykomórkowych występują płatki brzeżne. Brzegi graniczących ze sobą komórek stykają się ze sobą, względnie nakładają się na siebie lub tworzą mniej lub bardziej liczne zafalowania. Między zewnętrznymi listkami plazmolemy utrzymuje się przestrzeń międzykomórkowa o szerokości około 100–200 Å. Zbliżenia obu listków, zawężające tę przestrzeń do 40 Å, odpowiadają obwódkom przylegania (*zonulae adherentes*), czyli połączeniom pośrednim. Anversa i wsp. [6] wykazali regionalne różnice przepuszczalności kapilar serca szczura. Wiążą się one zapewne z różnicami w rozmiarach szczelin międzyśródbłonkowych kapilar podścielających wsierdzie i nasierdzie. W pierwszym przypadku szerokość zwężonych odcinków szczelin wynosi $32,3 \pm 5,9$ – $39,2 \pm 12,8$ Å, w drugim zaś $29,3 \pm 12,2$ – $31,3 \pm 6,9$ Å [243]. Tłumaczy to szybsze przenikanie markerów przez ściany kapilar podwsierdziowych w porównaniu z kapilarami podnasierdziowymi. Lokalne połączenia zewnętrznych listków plazmolemy zamykają przestrzeń międzykomórkową i odpowiadają obwódkom zamykającym (*zonulae occludentes*), czyli połączeniom zwartym. Oba typy połączeń występują w kapilarach mięśniowych miejscowo, tzn. zawężają, względnie zamykają przestrzeń międzykomórkową nie na całej ich głębokości. Ponadto, połączenia zwarte nie mają charakteru ciągłych taśm opasujących brzegi komórek na całej ich długości, lecz składają się z różnej długości odcinków [105]. W związku z tym, słuszniejszą wydaje się dla nich nazwa *maculae occludentes*. Tym niemniej obecność ciągłych połączeń zwartych w kapilarach mięśnia sercowego sugerują m.in. badania Themanna i wsp. [688]. Autorzy ci wykazali bowiem, iż podana dożylnie peroksydaza chrzanowa wnika w przestrzenie międzykomórkowe włósniczek tylko na pewną głębokość. Natomiast wszystkie stadia transportu tego markera zachodzą za pośrednictwem pęcherzyków plazmolemalnych.

Rozmaite obserwacje i eksperymenty wskazują, że ilość połączeń zwartych w kapilarach mięśniowych jest zmienna, stanowiąc jeden z elementów regulujących stopień przepuszczalności naczyń. Interesującego

przykładu w tym zakresie dostarczyły wyniki badań dotyczące przepuszczalności kapilar serca myszy *Acomys cahirhinus* dla peroksydazy chrzanowej [52]. Obserwacje przeprowadzone na osobnikach kontrolnych i odwodnionych wykazały niejednakowe tempo przenikania peroksydazy ze światła naczyń włosowatych serca do przestrzeni okołowłośniczkowej, świadczące o zmniejszonej przepuszczalności kapilar u zwierząt odwodnionych. Wprawdzie obecność połączeń zwartych stwierdzono w naczyniach obu grup badanych ssaków, jednak liczniej występowały one u zwierząt odwodnionych. Tak więc dehydracja organizmu wywołuje zamknięcie części połączeń międzyendotelialnych kapilar, ograniczające przepuszczalność naczyń dla drobnocząsteczkowych białek [504] i umożliwiające utrzymanie odpowiedniego ciśnienia osmotycznego osocza krwi [292]. Podobny system kontroli przepuszczalności naczyń występuje prawdopodobnie w mózgu ssaków [60].

Osobliwie zbudowane kapilary typu mięśniowego stwierdzono w tkance podskórnej wielbłąda, charakteryzujące się wyjątkowo grubym śródbłonkiem i wąskim światłem [476]. Jak wiadomo, ssaki te wykazują dużą tolerancję na odwodnienie, lecz w przeciwieństwie do innych kręgowców ubytek wody z osocza krwi jest u nich niewspółmiernie mniejszy w porównaniu z ubytkiem płynów tkankowych. Tak więc podczas ostrego odwodnienia ciężar ciała wielbłąda może obniżyć się o przeszło 20%, ale ubytek wody z krwi wynosi wówczas zaledwie 5% jej całkowitego ciężaru. Przypuszcza się, że czynnikiem zapobiegającym odwodnieniu i koncentracji krwi, prowadzącym nieuchronnie do letalnej hipertermii, jest budowa naczyń włosowatych skóry.

Kapilary typu mięśniowego występują również w niektórych strukturach gałki ocznej kręgowców. Większość posiadanych informacji dotyczy ultrastruktury i przepuszczalności kapilar oczu ssaków, w tym człowieka [298, 393, 449, 555, 579, 692, 695, 707], małp [695, 704–706], psa [641], szczura [148] i świni [598]. Mimo ogólnych podobieństw, naczynia tęczówki, siatkówki i naczyniówki wykazują pewne zróżnicowanie morfologiczne, dotyczące przede wszystkim organizacji połączeń międzykomórkowych śródbłonka oraz stopnia rozwoju kolagenowego składnika przydanki. Na przykład w kapilarach tęczówki człowieka i małp [706, 707] oraz w kapilarach naczyniówki szczura [148] wykazano obecność połączeń zwartych, potwierdzoną również w doświadczeniach z peroksydazą chrzanową. Połączeń zwartych nie wykazano jednak w kapilarach tęczówki świni [598]. Przydanka kapilar tęczówki człowieka, złożona głównie z włókien kolagenowych, osiąga grubość nie spotykaną w innych naczyniach włosowatych. Dzieli się na dwie wyraźne strefy, z których dośrodkowa jest utworzona z włókien o średnicy około 300 Å, natomiast średnica włókien strefy zewnętrznej wynosi przeciętnie 1000 Å.

Obie strefy tworzą grube wokółnaczyniowe walce, połączone ze sobą wskutek częściowej wymiany włókien [555, 707].

5.2. KAPILARY O CIĄGLYM I CIENKIM ŚRÓDBŁONKU (TYP PŁUCNO-MÓZGOWY)

Występują one w płucach, ośrodkowym układzie nerwowym, nerwach (tętniczki proste) i innych narządach. Charakteryzują się silnie ścieniałym śródbłonkiem o przeciętnej grubości 0,1 μm , małą liczbą pęcherzyków plazmolemalnych, obecnością połączeń pośrednich lub zwartych, ciągłą blaszką podstawną oraz małą liczbą perycytów. Różnice w organizacji połączeń międzykomórkowych, stopniu rozwoju blaszki podstawnej i struktur powierzchniowych komórek śródbłonka uzasadniają wyodrębnienie kilku odmian tych naczyń.

5.2.1. Kapilary oraz bariera powietrze-krew

Głównym zadaniem czynnościowym płuc i rozmieszczonego w nich łożyska naczyń włosowatych jest wymiana tlenu i dwutlenku węgla, zachodząca przez struktury tworzące barierę powietrze-krew. Nie jest to bynajmniej jedyna funkcja tych narządów. Poprzez tę barierę organizm kręgowców, zwłaszcza wyższych, traci znaczne ilości ciepła i wody, a także innych substancji, które w temperaturze około 37°C lub wyższej mają postać lotną, przechodzą do fazy gazowej pęcherzyków płucnych lub innych jednostek morfologicznych płuc i usuwane są na zewnątrz organizmu wraz z wydychanym powietrzem. Płuca tworzą również wrota, przez które mogą być usuwane niektóre elementy morfotyczne krwi, jak granulocyty, monocyty i limfocyty. Przez barierę powietrze-krew przedostają się również do krwiobiegu substancje wywierające wpływ na czynność naczyń i krążenia, jak histamina, serotonina, bradykinina i in., bądź usuwane z organizmu, jak np. prostoglandyny [281, 575].

Podstawową jednostką czynnościową płuc ssaków są pęcherzyki płucne, których ścianki tworzą tzw. przegrody międzypęcherzykowe, albo błony pęcherzykowo - kapilarne, zbudowane z (1) wewnętrznej wyściółki pęcherzykowej, (2) kapilar płucnych i (3) interstycjalnej przestrzeni łącznotkankowej (rys. 18). W skład wyściółki pęcherzykowej wchodzi trzy rodzaje komórek nabłonkowych, tzw. pneumocyty I-III oraz makrofagi osiadłe, czyli komórki pyłowe. W kapilarach płucnych można wyróżnić śródbłonek, blaszkę podstawną oraz nieliczne perycyty. Również składniki interstycjalnej przestrzeni łącznotkankowej, a mianowicie fibroblasty, makrofagi, wędrujące krwinki oraz włókna kolagenowe i elastyczne możemy uznać za część ściany naczyń, odpowiadającą warstwie zewnętrznej kapilar.

Wymienione składniki tworzą barierę powietrze-krew, której submikroskopową organizację opisał wielu autorów [13, 348, 422, 423, 551, 553, 624, 720]. Znaczenie tej bariery polega m.in. na tym, że stawia ona określony opór dyfundującym gazom oraz metabolizuje część tlenu przenikającego z pęcherzyków płucnych do erytrocytów krwi. O rozmiarach obu czynników można wnosić na podstawie budowy, grubości, ukształtowania powierzchni i składu morfologicznego bariery [733]. Początkowo mierzono powierzchnię pęcherzyków i kapilar płucnych [719, 720, 732], względnie wykonywano pomiary najcieńszych części bariery, których grubość wynosi 0,1–0,2 μm . Zastosowanie metod morfometrycznych umożliwiło objęcie analizą wszystkich obszarów bariery powietrze-krew, bez względu na ich grubość [733]. Za ich pomocą ustalono m.in., że w płucach szczura średnia grubość bariery wynosi 1,25 μm , przy czym jest ona utworzona w 30% z komórek nabłonkowych, w 40% z tkanki interstycjalnej oraz w 30% z komórek śródbłonna naczyń.

Pneumocyty błoniaste (typ I) wyściełają większą część powierzchni pęcherzyków płucnych. Można w nich wyróżnić małe kadłuby zawierające jądro i inne wewnątrzkomórkowe organelle oraz rozległe, płaskie wypustki peryferyczne, sięgające od kadłuba komórki na odległość 50 μm lub większą. Oprócz pęcherzyków plazmolemalnych, nie zawierają innych organelli cytoplazmatycznych. Z każdej komórki wybiegają po dwie ścienne wypustki, co ogranicza liczbę jąder oraz obniża grubość bariery powietrze-krew. Przez dłuższy czas sądzono, że wewnątrz pęcherzyków płucnych wyściełają ścienne płytki bezjądrowe (non-nucleated plates). Zastosowanie mikroskopu elektronowego do badań struktury płuc wyjaśniło to nieporozumienie [421, 422, 727, 729, 731].

Pneumocyty ziarniste (typ II) są to duże, brylaste komórki o cytoplazmie obfitującej w wewnątrzkomórkowe organelle, pośród których występują osmofilne, otoczone błoną ziarnistości, zawierające materiał uformowany w postaci blaszek. Noszą one nazwę ciał blaszkowatych, zbudowane są prawdopodobnie z fosfolipidów. Z wolnych powierzchni pneumocytów ziarnistych wybiegają liczne, lecz stosunkowo krótkie mikrokosmki o średnicy około 0,1 μm . Bogactwo organelli cytoplazmatycznych świadczy pośrednio o wysokim udziale tych komórek w metabolizmie płuc. Wskazuje na to również duża zawartość enzymów z grupy oksydaz [599, 701, 702].

Wydzielina pneumocytów ziarnistych pokrywa cienką warstwą powierzchnię nabłonka oddechowego, zmniejszając napięcie powierzchniowe i wygładzając powierzchnię komórek. Stosując odpowiednią technikę utrwalania płuc, obecność tego dodatkowego składnika bariery powietrze-krew wykazano również w płucach ryb dwudysznych i płazów.

W płucach ssaków występują również nieliczne pneumocyty szczo-

teczkowe (typ III), których nazwa nawiązuje do pokrycia szczytowej powierzchni komórek przez mikrokosmki [460, 729]. Cytoplazma pneumocytów szczoteczkowych nie zawiera ziarn osmofilnych, natomiast obfituje w glikogen. Prawdopodobnie są to komórki zmysłowe, gdyż przypominają morfologicznie chemoreceptory smakowe kręgowców.

W zewnątrzkomórkowej warstwie wydzieliny pokrywającej nabłonek pęcherzyków płucnych występują makrofagi osiadłe, fagocytujące obce substancje i mikroorganizmy, zwane komórkami pyłowymi (dust cells). Zainteresowanych tym tematem odsyłamy do publikacji [729].

Pierwsze obserwacje ultrastruktury naczyń płucnych przeprowadził Low [421, 422], po czym temat ten podjęło wielu innych badaczy [13, 18, 33, 113, 169, 302, 347, 348, 550, 611, 623, 624, 655, 681, 719–721, 724, 726, 729–733, 768]. W ich wyniku ustalono, że śródbłonek naczyń płucnych jest bardzo silnie spłaszczony, ciągły i całkowicie pozbawiony okienek (fenestrów). W niektórych okolicach cienieje do 200 Å, gdzie zbudowany jest z błon komórkowych i substancji podstawowej cytoplazmy, pozbawionej organelli. Stopień maksymalnego ścienienia śródbłonna zależy zapewne od rozmiarów płuc. W płucach człowieka i psa nie osiąga tak niskich wartości, jakie obserwowano u małych gryzoni (mysz, szczur), a zwłaszcza u ryjówki etruskiej, będącej najmniejszym ssakiem [728, 729]. Mimo silnego spłaszczenia komórek śródbłonna, okienka w normalnych warunkach nie występują [347, 519], natomiast mogą się pojawiać w stanach patologicznych. Na przykład eksperymentalnie wywołanej fibrozie płuc u chomika towarzyszy pojawienie się fenestrów o średnicy około 700 Å, przy zupełnym ich braku u zwierząt zdrowych [675].

Jądra komórek śródbłonna leżą w ścianach przegród międzypęcherzykowych, toteż nie utrudniają wymiany gazów. Od zewnątrz śródbłonek naczyń jest otoczony ciągłą blaszką podstawną i perycytami. W miejscach gdzie brak jest tkanki interstycjalnej, blaszka podstawna kapilar łączy się z blaszką podstawną nabłonna oddechowego pęcherzyków (rys. 13 i 19). Obszary te tworzą najcieńsze (0,1–0,2 μm) i najbardziej efektywne części bariery powietrze–krew. Wprawdzie początkowe obserwacje wskazywały na brak perycytów w kapilarach płucnych [573], ale następnie wykazano ich obecność w kapilarach płuc człowieka, psa, świnki morskiej i szczura oraz potwierdzono brak tych komórek w kapilarach płuc ryjówki etruskiej *Suncus etruscus* [730].

Wobec silnego spłaszczenia peryferycznych części komórek śródbłonna, organelle wewnątrzkomórkowe są skupione niemal wyłącznie w wąskiej strefie przyjądrowej. W częściach ścieniałych komórek występują wolne pęcherzyki plazmolemalne i kaweole, umożliwiające śródkomórkowy transport makrocząsteczek [34, 65, 66, 125, 613, 614]. Smith i Ryan

[652] dostarczyli nowych, istotnych szczegółów dotyczących submikroskopowej organizacji oraz funkcji kaweol śródbłonna kapilar płucnych szczura. Mianowicie w miejscu przechodzenia plazmolemy komórek śródbłonna w plazmolemę kaweol występują elektronowo gęste pierścienie, których przypuszczalnym zadaniem jest zapewnianie integralności przegrodom zamykającym szyjki kaweol. Ponadto, na wewnętrznej powierzchni plazmolemy kaweol występują regularnie rozmieszczone struktury ziarniste, odpowiadające prawdopodobnie zgrupowaniom enzymów, względnie wyspecjalizowanym miejscom selektywnego wiązania substancji. Autorzy referowanych obserwacji przypuszczają, że pęcherzyki plazmolemalne kapilar płucnych mogą mieć zdolność metabolizowania substancji naczyniowo - ruchowych obecnych w krwi, jak bradykinina lub angiotenzyna I.

Połączenia komórek śródbłonna w kapilarach płuc myszy i innych ssaków mają podobną organizację jak w kapilarach mięśni szkieletowych i serca. Połączenia zwarte występują tylko lokalnie, toteż możemy je określić jako *maculae occludentes*, natomiast większość przestrzeni międzykomórkowych pozostaje otwarta. Miejscowe zbliżenia ograniczających je błon zawężają szczeliny międzykomórkowe śródbłonna w sposób charakterystyczny dla połączeń pośrednich (*zonulae adherentes*) [613]. W strefie cytoplazmy leżącej w sąsiedztwie połączeń występują delikatne mikrofilamenty. Zdaniem niektórych autorów [439], mogą one zwiększać przepuszczalność naczyń poprzez rozszerzanie przestrzeni międzykomórkowych śródbłonna.

Średnica kapilar płucnych ssaków wynosi 7–10 μm . Przeciętna grubość bariery powietrze–krew wykazuje stosunkowo małe różnice, które nie odzwierciedlają znacznych rozpiętości w ciężarze ciała ssaków. Średnia grubość tej bariery w płucach psa wynosi 1,52 μm i jest większa od bariery powietrze–krew szczura zaledwie o 10%. Znacznie większą zależność od ciężaru ciała wykazują inne parametry płuc, jak objętość, powierzchnia pęcherzyków płucnych, powierzchnia kapilar oraz ich łączna objętość. U psa o ciężarze ciała 23 kg wartość tych parametrów przedstawia się następująco: objętość płuc — 1500 ml, powierzchnia pęcherzyków — 90 m², powierzchnia kapilar — 72 m², objętość kapilar — 120 ml [642].

Wnętrze przegród międzypęcherzykowych wypełniają naczynia włosowate, tkanka łączna włóknista oraz osiadłe makrofagi i wędrujące krwinki. Pomijając naczynia, elementami dominującymi są włókna elastyczne i pęczki włókien kolagenowych [424, 592]. W przeciwieństwie do płazów i młodych ssaków, u których kapilary płucne leżą w dwóch szeregach, w przegrodach międzypęcherzykowych ssaków dorosłych naczynia włosowate są rozmieszczone w jednym szeregu [168, 235, 654,

720]. Wskutek zygzakowatego przebiegu, naczynia te przechodzą z jednej strony przegrody na drugą, na przemian z elementami tkanki interstycjalnej. Wbrew sugestiom niektórych autorów [596], włókna tej tkanki nie tworzą jednolitej warstwy oddzielającej ściany kapilar płucnych od komórek nabłonka oddechowego, lecz mają postać sieci, splecionej z kapilarami. Taką organizację przestrzenną składników przegród międzypęcherzykowych potwierdziły zarówno badania stereologiczne [723], jak również obserwacje w mikroskopie skaningowym [383]. W miejscach gdzie brak jest tkanki interstycjalnej, kapilary leżą w bezpośrednim sąsiedztwie nabłonka oddechowego, a blaszki podstawne obu składników są ze sobą zespolone, toteż w konsekwencji grubość bariery powietrzekrew wykazuje najmniejsze wartości. W przegrodach międzypęcherzykowych płuc delfinów tkanka interstycjalna jest rozwinięta silniej niż w płucach innych ssaków, a łożysko naczyniowe jest utworzone z podwójnej sieci kapilar [195]. Ma to zapewne związek ze zdolnością tych ssaków do długotrwałych i głębokich zanurzeń.

Analiza submikroskopowej budowy przegród międzypęcherzykowych wskazuje na nieobecność w nich kapilar limfatycznych [401–403, 691]. Naczynia te pojawiają się dopiero na poziomie przewodników pęcherzykowych (*ductuli alveolares*), umożliwiając odprowadzanie nadmiaru płynu interstycjalnego, który dociera do tych naczyń poprzez przestrzenie wokółwłośniczkowe, zawierające blaszki podstawne. Taka interpretacja tłumaczy znikanie peroksydazy chrzanowej z blaszki podstawnej kapilar płucnych w kilkadziesiąt minut od dożylniej iniekcji tego markera. Natomiast potwierdzono dawne obserwacje wskazujące na występowanie włókien nerwowych i ich zakończeń w sąsiedztwie kapilar płucnych [219]. Niektóre kapilary otrzymują podwójne unerwienie motoryczne, o czym świadczy obecność w przegrodach międzypęcherzykowych zakończeń cholinergicznym i adrenergicznym. W związku z tym wysunięto przypuszczenie przypisujące perycytom kapilar płucnych funkcję elementów efektorowych.

Znajomość submikroskopowej organizacji naczyń oraz narządów służących niższemu kręgowcom do oddychania powietrzem atmosferycznym jest szczupła i fragmentaryczna. Wykazano np., że nabłonek płucny żab składa się z jednego typu komórek, które pod względem wielu cech morfologicznych odpowiadają pneumocytom ziarnistym ssaków. Kadłuby tych komórek leżą w głębi przegród między kapilarami, rozmieszczonymi w dwóch szeregach. Podobnie jak u ssaków, nabłonek oddechowy jest pokryty cienką warstwą substancji wyścielającej [168].

Rozpatrywanie ultrastruktury blaszek skrzelowych ryb przekracza granice zakreślone dla tego opracowania. Jednak skrzela nie są jedynym narządem oddechowym występującym u tych kręgowców. Niektóre ga-

tunki ryb oddychają powietrzem atmosferycznym, przy czym funkcję narządów oddechowych spełnia śluzówka komory skrzelowej, workowaty uchylek przełyku, narząd labiryntowy, pęcherz pławny, płuca, względnie końcowy odcinek jelita [294]. Kapilary narządu labiryntowego łańca *Anabas testudineus* mają budowę typową dla kapilar płucnych. Między sąsiednimi naczyniami leżą smukłe komórki kolumnowe, których części szczytowe tworzą silnie spłaszczone wypustki, oddzielające ściany naczyń od nabłonka oddechowego. Tak więc barierę powietrze–krew tworzą w narządzie labiryntowym łańca: nabłonek oddechowy, wypustki komórek kolumnowych, blaszka podstawna i śródbłonek.

Kapilary części oddechowej jelita piskorza *Misgurnus fossilis* także przypominają kapilary płucne (rys. 20). Charakteryzują się silnie ścięniętym śródbłonkiem i niemal zupełnym brakiem fenestrów. Naczynia te leżą między komórkami nabłonka, których części środkowe są płaskie i ułożone mniej więcej prostopadle do osi długiej jelita, natomiast części dystalne, również silnie spłaszczone, ograniczają światło jelita. Kapilary oddechowe mają wspólną blaszkę podstawną z komórkami nabłonka. Składniki przydanki w ogóle nie występują, w rezultacie minimalna grubość bariery powietrze–krew osiąga miejscami wartość poniżej 0,2 μm . Kolejnymi składnikami bariery powietrze–krew są w tym przypadku: bezjądrowe odcinki peryferyczne komórek nabłonka jelita, blaszka podstawna oraz śródbłonek kapilar [316, 319]. Minimalna grubość bariery powietrze krew w narządach oddechowych niszczuki *Lepisosteus*, prapłetwowca *Protopterus* i odmienia jaskiniowego *Proteus* wynosi odpowiednio 0,3, 0,52–0,54 i 1,85 μm [295]. Jak wykazują dotychczasowe badania, grubość tej bariery w narządach oddechowych kręgowców odzwierciedla zapotrzebowanie na tlen, względnie efektywność procesów oddychania.

Przepuszczalność bariery powietrze–krew dla związków o różnych rozmiarach drobin i właściwościach fizykochemicznych badano u ssaków laboratoryjnych, jak mysz, szczur i pies. Przedmiotem eksperymentów fizjologicznych była przepuszczalność tej bariery dla wody, jonów i związków rozpuszczalnych w wodzie, jak np. mocznik [114, 115, 147, 175, 625, 686]. W badaniach morfologicznych posługiwano się białkami oznakowanymi przez barwniki [175], katalazą, ferrytyną, peroksydazą chrzanową i hemoglobina [121, 496, 545, 613, 614], uzyskując szereg interesujących wyników. Stwierdzono m.in., że najefektywniejszym składnikiem bariery powietrze–krew nie jest śródbłonek naczyń, lecz nabłonek pęcherzyków płucnych, którego komórki są połączone za pośrednictwem *zonulae occludentes*, podobnie jak nabłonki innych narządów jamistych [203, 204]. W płucach szczura bariera ta charakteryzuje się naprzemiennie rozmieszczonymi obszarami o różnej grubości. Jak wy-

nika z analizy przeprowadzonej przez Weibela i Knighta [733], całkowita przepuszczalność gazów w sfałdowanym modelu bariery jest 2,2 razy większa w porównaniu z modelem bariery o jednolicie grubej błonie pęcherzykowo - kapilarnej. Bariera powietrze-krew swobodnie przepuszcza wodę, lecz równocześnie jest słabo przepuszczalna dla rozpuszczalnych w wodzie substancji drobnocząsteczkowych. Eksperymenty z peroksydazą wykazały, że kapilary płucne nie tworzą bariery dla substancji drobnocząsteczkowych. Bezpośrednio po dożylniej iniekcji tego enzymu, produkt reakcji obserwowano w świetle naczyń, a następnie w szczelinach między komórkami śródbłónka oraz w przestrzeniach wokółwłośniczkowych, natomiast nie stwierdzono jego obecności w szczelinach między komórkami nabłonka oddechowego. Peroksydaza chrzanowa opuszcza światło naczyń głównie przez szczeliny międzykomórkowe. Podobnie jak w kapilarach mięśni szkieletowych i serca, połączenia komórek śródbłónka kapilar płucnych należą do typu pośredniego o minimalnej szerokości szczelin równej 40 Å, stanowiąc morfologiczny odpowiednik systemu małych porów. W normalnych warunkach połączenia te są nieprzepuszczalne dla drobin substancji wielkocząsteczkowych, jak ferrytyna, katalaza lub hemoglobina. Wprowadzone do krwiobiegu zwierząt, substancje te nie pojawiają się w szczelinach międzykomórkowych śródbłónka kapilar. W kapilarach płucnych zachodzi również transport śródkomórkowy za pośrednictwem pęcherzyków plazmolemalnych śródbłónka. Zagadnienie to poruszyliśmy na str. 409.

Przechodzenie peroksydazy chrzanowej przez barierę śródbłónka kapilar płucnych jest uwarunkowane odpowiednio wysokim stężeniem tego enzymu [121]. Przepuszczalność szczelin międzykomórkowych zależy od objętości roztworu wprowadzonego wraz z odpowiednim markerem do krwiobiegu zwierząt. Zwiększona objętość roztworu (np. u myszy z 0,05 do 0,5 ml) podnosi ciśnienie wewnątrz naczyń, a co za tym idzie efektywność transportu markera, prawdopodobnie wskutek rozszerzania połączeń międzykomórkowych, względnie otwierania połączeń uprzednio zamkniętych [614]. Na zmienność rozmiarów szczelin międzykomórkowych w kapilarach płuc wskazują również badania przepuszczalności tych naczyń dla makromolekuł u zarodków oraz u jagniąt i dorosłych owiec [53]. Wykazano także, iż w warunkach odpowiednio wysokiego ciśnienia krwi, przekraczającego 50 mm Hg, szczeliny międzykomórkowe kapilar płucnych psa stają się dostępne dla makromolekuł hemoglobiny [545]. Również przepuszczalność bariery powietrze-krew, którą lokujemy w połączeniach zwartych nabłonka oddechowego, ulega wpływowi ze strony różnych czynników, zwłaszcza patogennych, jak hipertermia, promienie rtg i inne. Przeglądu piśmiennictwa dotyczącego tej problematyki dokonała Olędzka - Słotwińska [496].

5.2.2. Kapilary mózgu oraz bariera krew-mózg

Ultrastrukturę kapilar mózgu poznano najpełniej u ssaków [4, 9, 10, 50, 56, 59, 62, 67, 78, 149, 171, 230, 250, 275, 278, 342, 365, 382, 395, 457, 484, 491, 521, 523, 541, 544, 552, 557, 575, 581, 589, 690, 759, 760]. Znacznie mniej uwagi poświęcono pozostałym kręgowcom, lecz luka ta jest szybko zapełniana. Tak więc dysponujemy obecnie informacjami o submikroskopowej organizacji kapilar mózgu niektórych gatunków kręgowców [483], ryb [276, 419, 490], płazów [49] gadów [362, 489] i ptaków [157–159].

Typowe kapilary mózgowe charakteryzują się ciągłym, silnie ściętym i niefenestrowanym śródbłonkiem, w którego cytoplazmie występują nieliczne pęcherzyki plazmolemalne. Między sąsiadującymi komórkami śródbłonka występują połączenia zwarte. Po zewnętrznej stronie śródbłonka leży ciągła, lecz cienka blaszka podstawna, w której zanurzone są nieliczne perycyty. Wypustki tych komórek są szczególnie charakterystyczne dla początkowych odcinków kapilar. Niektóre z nich tworzą połączenia z błoną komórek śródbłonka [149], omówione szerzej na str. 407.

Kapilary mózgu z reguły nie graniczą wprost z neuronami i ich wypustkami. Otacza je zwykle kompletna warstwa spłaszczonych wypustek astrocytów, spiętych połączeniami zwartymi i pokrytych od strony naczyń własną blaszką podstawną. Przestrzeń okołowłósczkowa, ograniczona blaszkami podstawnymi kapilar i astrocytów, jest wyjątkowo wąska i wynosi 200–300 Å. Obie blaszki mogą łączyć się ze sobą, co pociąga za sobą zanik przestrzeni wokółwłósczkowej. Wobec małej liczby perycytów, blaszka podstawna jest jedyną strukturą oddzielającą śródbłonek kapilar od parenchymy mózgu.

Obecność połączeń zwartych jest jedną z najbardziej charakterystycznych cech kapilar mózgu. Powstają one w następstwie fuzji zewnętrznych listków sąsiadujących ze sobą błon plazmolemalnych. Tworzą ciągłe taśmy opasujące kapilary i stanowią morfologiczny składnik bariery krew-mózg, nieprzenikliwej dla substancji o ciężarze cząsteczkowym 40 000 lub większym [342]. Występowanie połączeń zwartych zostało dowiedzione w dziesiątkach publikacji dotyczących ultrastruktury kapilar mózgu ssaków i niższych kręgowców, z których większość dotyczy zwierząt dorosłych. Ostatnio Delorme [157] opisał rozwój połączeń zwartych w kapilarach mózgu zarodków kurcząt. Autor ten wykazał, że między komórkami śródbłonka nowo powstałych kapilar występują otwarte przestrzenie międzykomórkowe, w których stopniowo pojawiają się miejscowe zespolenia zewnętrznych listków plazmolemy sąsiadujących komórek. W miarę narastania liczby lokalnych zespożeń, przestrzeń międzykomórkowa ostatecznie zanika, izolowane zaś *maculae*

occludentes przekształcają się w nieprzerwane pasma *zonulae occludentes*. Połączenia zwarte kapilar mózgu mogą w pewnych warunkach ulegać otwarciu. Wykazali to Brightman i wsp. [62], podając zwierzętom dożylnie hiperosmotyczny (3M) roztwór mocznika. Przechodzenie w tych warunkach peroksydazy chrzanowej ze światła kapilar do otaczającego je neuropilu wskazuje, iż zastosowany stres osmotyczny znosi barierę krew-mózg i umożliwia przechodzenie białek z osocza krwi do płynu interstycjalnego mózgu.

Typowe kapilary mózgowe nie mają przestrzeni wokółwłośniczkowej [56, 171, 230, 457, 491, 523, 541, 589, 760]. Wokół kapilar mózgu występuje zazwyczaj pojedyncza blaszka podstawna rozdzielająca śródbłonek od tkanki nerwowej. Na przekroju poprzecznym ma ona postać pierścienia o jednolitej szerokości [78]. Przestrzeń wokólnaczyniowa, nazywana również przestrzenią Virchowa - Robina, zanika przed dotarciem do poziomu kapilar, w następstwie zespolenia się blaszek podstawnych naczyńkowej i glejowej [491, 557]. Takie pochodzenie blaszki podstawnej dojrzałych kapilar mózgu ssaków można stwierdzić jeszcze we wczesnym okresie postnatalnym, lecz po dziesiątym dniu od urodzenia warstwowa struktura blaszki podstawnej (szczur) jest już niewidoczna [10]. Między 3 i 4 tygodniem życia postnatalnego blaszka podstawna szybko grubieje [9], co zbiega się w czasie z ustanawianiem wokół kapilar bariery z wypustek astrocytów. W miejscach, gdzie jest ona obecna, blaszka podstawna jest bardziej zwarta. Natomiast z brakiem tej bariery wiąże się obecność przestrzeni wokółwłośniczkowej oraz luźna struktura blaszki [78]. Dojrzewanie kapilar kory mózgowej nie przebiega równomiernie, gdyż pewna ich liczba osiąga pełny rozwój już u noworodków.

W mózgu ssaków opisano również kapilary z niekompletną warstwą wypustek astrocytów, jak np. w korze mózdzku kota [395]. Kapilary o średnicy przekraczającej 10 μm zachowują u tego zwierzęcia przestrzeń wokółwłośniczkową, w której występują fibroblasty i włókna kolagenowe. Występuje ona również w innych obszarach mózgu, np. w narządzie podspoidłowym [50] oraz w międzymózgowiu szczura [690]. Brak przestrzeni wokółwłośniczkowych w mózgu wiąże się z reguły z charakterystyczną dla tego narządu barierą krew-mózg. W związku z tym, na szczególną uwagę zasługuje publikacja Bodenheimera i Brightmana [49], w której autorzy cię wykazali obecność tej bariery w mózgu płaza *Necturus*, mimo równoczesnej obecności przestrzeni wokółwłośniczkowej. Tak więc brak łącznotkankowej przestrzeni wokółwłośniczkowej nie jest niezbędnym warunkiem istnienia bariery krew-mózg.

Trzecim elementem składowym bariery krew-mózg są wypustki astrocytów, szczelnie otaczające większość kapilar mózgu i zespolone ze sobą przez połączenia zwarte. Obszary kapilar pozbawione osłony

z astrocytów mogą kontaktować się z gliocytami skąpowypustkowymi, natomiast rzadziej kontaktują się wprost z elementami nerwowymi. Rozmieszczenie astrocytów nasuwa przypuszczenie o ich udziale w transporcie substancji odżywczych z krwi do neuronów, a w przeciwnym kierunku — metabolitów. Nie można wykluczyć również ich pośrednictwa w przeprowadzaniu substancji z płynu mózgowo-rdzeniowego do krwi, ponieważ wypustki poszczególnych astrocytów tworzą kontakty zarówno z wyściółką komór mózgowych, jak również z kapilarami.

Mózg torbaczy i niektórych niższych kręgowców jest unaczyniony przez niezależne tętniczo - żyłne pętle kapilar (por. str. 398). Taka organizacja łożyska kapilarnego spełnia morfologiczne kryteria układu przeciwprądowego. Przy założeniu istnienia „ekonomiki naczyń”, przez co rozumie się obsługiwane przez poszczególne pętle kapilar określonych obszarów tkanki nerwowej, nie nakładających się na siebie, obecność układu przeciwprądowego prawdopodobnie zapewnia krwi stosunkowo stałą zawartość tlenu i substancji odżywczych we wszystkich odcinkach pętli, nie wyłączając odcinków dystalnych [137, 138, 145, 607]. Ultrastrukturę pętli kapilarnych w mózgu jaszczurek z rodzaju *Anolis* zbadali Kenny i Shivers [362]. Podobnie jak w mózgu ssaków, śródbłonek tych kapilar tworzy nieprzepuszczalną barierę dla ferrytyny i peroksydazy chrzanowej. Między komórkami śródbłonka występują połączenia zwarte. Wprawdzie w cytoplazmie występują dość liczne pęcherzyki plazmolemalne, ale i one nie uczestniczą w transporcie obu markerów. Błazka podstawna jest homogeniczna i gruba (1200 Å), wspólna dla obu ramion pętli. Przestrzeń wokółwłośniczkowa nie występuje. Między elementami tkanki nerwowej, otaczającymi kapilary, brak jest połączeń zwartych. Barierę krew-mózg tworzą w tych naczyniach śródbłonek i błazka podstawna.

Silnie rozbudowaną przestrzeń okołowłośniczkową, zawierającą prążkowane struktury złożone z włókien o średnicy 80 Å i periodycznym rozmieszczaniu prążków co 1200 Å, wykryto w kapilarach narządu podspoidłowego gekonów [489]. Podobnie zbudowane naczynia występują również w narządzie podspoidłowym ssaków [50]. Być może, iż jest to związane z wydzielniczą funkcją tego narządu kręgowców.

W porównaniu ze ssakami, znaczne różnice w budowie kapilar mózgowych stwierdzono u ryb spodoustych. Badając ultrastrukturę tych naczyń u *Galeorhinus japonicus*, *Triakis scyllia* i *Mustelus manazo*, Hashimoto [276] nie potwierdził wprawdzie sygnalizowanego przez innych autorów braku połączeń zwartych między komórkami śródbłonka [419], natomiast opisał silnie rozbudowany system pęcherzyków plazmolemalnych, wewnątrzkomórkowe kanały otwarte po obu stronach śródbłonka,

niekompletną blaszkę podstawną oraz połączenia zwarte między wokółnaczyniowymi wypustkami astrocytów. Autor ten wykazał ponadto, że peroksydaza chrzanowa opuszcza światło naczyń przez pęcherzyki i kanały wewnątrzśródbłonkowe, wypełnia przestrzeń wokółwłośniczkową, lecz nie pokonuje bariery astrocytów. W przypadku badanych ryb bariera krew-mózg dla drobnocząsteczkowych białek jest ograniczona tylko do jednego elementu strukturalnego (astrocyty) i leży poza ścianą naczyń. Zbliżoną organizację naczyń mózgowych mają również śluzice, *Myxine* [483].

Wprawdzie nieznaczna liczba naczyń mózgowych już w dniu urodzenia ssaków ma pełną dojrzałość, jednak większość kapilar uzyskuje ostateczną postać po trzech tygodniach życia postnatalnego [10, 78]. Przez początkowe 10 dni liczba drożnych naczyń jest bardzo niska, natomiast licznie występują prymitywne naczynia krwionośne o niekompletnej blaszce podstawnej, grubym śródbłonku i szczelinowatym świetle. Między komórkami śródbłonka występują już połączenia zwarte. Jednak niedojrzałe naczynia nie mają osłony z wypustek astrocytów. Rozwój tych elementów przebiega równocześnie z zanikiem obszernych przestrzeni wokółwłośniczkowych. Większość kapilar uzyskuje dojrzałość w 9 dniu, ale dopiero w 21 dniu od urodzenia wszystkie naczynia są otoczone kompletną osłoną wypustek astrocytów. U kurcząt kapilary kresomózgowia osiągają pełną dojrzałość w 20 dniu od wyklucia [158].

Dobłą ilustracją dojrzewania kapilar w korze mózgowej szczura są dane liczbowe. Stwierdzono mianowicie, że u noworodków liczba kapilar w polu 1 mm² tkanki wynosi 78, liczba komórek przypadających na jedno naczynie — 40, na przestrzeń wokółwłośniczkową zaś przypada 12% powierzchni przekrojów. Odpowiednie liczby w 21 dniu od urodzenia wynoszą natomiast 307, 1,7 oraz około 1%. Zastosowanie mikroskopu elektronowego do badań rozwoju kapilar kory mózgowej nie przyczyniło się do uzgodnienia poglądów na temat istnienia [73–78, 156, 166, 431] lub braku zewnątrzkomórkowych przestrzeni w niedojrzałych kapilarach [171, 525, 687, 712]. Jednak większość nowszych obserwacji potwierdza obecność tych przestrzeni, przy czym niektórzy badacze łączą ich zanik we wczesnym okresie życia pozamacicznego ze wzrastającą wrażliwością mózgu na niedobór tlenu [78].

U podstaw koncepcji bariery krew-mózg legły rezultaty doświadczeń Ehrlicha [183], który wprowadzając do krwiobiegu zwierząt kwaśne barwniki anilinowe, jak np. błękit trypanu, stwierdził, że substancje te nie przenikają z naczyń do większości obszarów mózgu, natomiast zabarwiają tkanki pozostałych narządów. Bariera krew-mózg, położona między światłem naczyń i tkanką nerwową, zapobiega przenikaniu do mózgu dożylnie podanych białek [64, 368], wielu związków występują-

cych w osoczu krwi oraz barwników przyżyciowych. Jak wykazał Tschirgi [699], te ostatnie wchodzą w połączenia z białkami krwi, toteż słuszniej jest mówić o barierze krew-mózg dla kompleksów barwnik-białko.

Barierę krew-mózg wiążemy przede wszystkim ze śródbłonkiem kapilar mózgu, którego komórki tworzą połączenia zwarte. Oglądane na preparatach przygotowanych techniką freeze - etching, połączenia te mają postać szeregowo rozmieszczonych, paciorkowatych wzniesień plazmolemy. W kapilarach mózgu o silnie rozbudowanych strefach połączeń, szeregi wzgórków plazmolemy tworzą silnie rozbudowane sieci opasujące brzegi komórek [165]. Określony wpływ na przepuszczalność kapilar mózgu wywiera brak okienek w śródbłonku, a ponadto homogeniczna i ciągła blaszka podstawna, brak lub bardzo wąska przestrzeń wokółwłośniczkowa (około 200 Å), jak również osłonka z wypustek astrocytów. Wyjątek stanowią kapilary *area postrema* [161, 276, 367, 382, 581], narządu podsklepieniowego [586], splotu naczyniówkowego komory III [57, 575, 752], wyniosłości przyśrodkowej i płata nerwowego przysadki (rys. 21) [12, 14, 25, 178, 275, 372, 373, 392, 446, 463, 521, 580, 753, 769], szyszynki wielu ssaków [117, 257, 304, 451, 452, 467, 575, 588, 759], narządu naczyniowego blaszki końcowej [742] oraz przysadki rdzeniowej ryb [490], które charakteryzują się obecnością okienek, w niektórych przypadkach licznych mikrokosmków lub mikrofałdów, a dalej licznych pęcherzyków plazmolemalnych oraz silnie rozwiniętej łącznotkankowej przestrzeni wokółwłośniczkowej (rys. 22). W efekcie, naczynia tych obszarów mózgu nie wykazują bariery krew-mózg; są przepuszczalne zarówno dla barwników przyżyciowych [490, 753], jak również dla peroksydazy chrzanowej [24, 58] i innych wyznaczników cytochemicznych [173]. Kapilary o cienkim i fenestrowanym śródbłonku należą do typu trzewnego, który omawiamy szerzej w punkcie 5.3.

Przytoczone przykłady nie mogą jednak służyć za podstawę dla zbyt śmiałych uogólnień. Stwierdzono bowiem, że w śródbłonku kapilar części nerwowej przysadki albinotycznych myszy [549] oraz śródbłonku naczyń szyszynki krowy, owcy, kota, świnki morskiej, szynszyla i niektórych innych ssaków [4, 179, 425, 452, 638, 716] okienka nie występują w ogóle.

Według niektórych autorów, błękit trypanu przenika również z kapilar do neurocytów jąder wydzielniczych podwzgórza [118, 410, 488, 510]. Wskazując na brak bariery krew-mózg na terenie podwzgórzowych ośrodków wydzielniczych, obserwacje te zwiększały wiarygodność wielokrotnie wypowiedzianych sugestii o możliwości uwalniania neurosekretu wprost z perykarionów komórek neurosekrecyjnych do naczyń kapilarnych. Jednak badania submikroskopowej organizacji kapilar jądra

nadwzrokowego myszy [631] i szczura [280] nie wykazały obecności fenestrów w śródbłonku tych naczyń. Stwierdzono natomiast brak osłony z wypustek astrocytów wokół kapilar jądra nadwzrokowego szczura [280]. Pełniejsze naświetlenie submikroskopowej organizacji łożyska naczyniowego podwzgórza, ważne i interesujące z wielu powodów, wymaga przeprowadzenia odpowiednich badań u przedstawicieli różnych kręgowców.

W różnych obszarach ośrodkowego układu nerwowego kręgowców występują kapilary wewnątrzkomórkowe, przebiegające wskroś neuronów oraz kapilary przyneuronowe, wciśnięte w powierzchnię neurocytów. Tak ścisły kontakt kapilar i komórek nerwowych opisano w neuronach nadrdzeniowych żabnicy *Lophius piscatorius* [232], samogłowa *Mola mola* [71] i najeżki *Diodon hystrix* [605, 609] oraz w wielkich neuronach motorycznych ryb elektrycznych [232], w komórkach neurosekrecyjnych podwzgórza [129, 610], w neuronach wydzielniczych rdzenia kręgowego ryb [38] oraz w komórkach Betza kory motorycznej człowieka [605] i królika [79]. Wbrew pozorom, kapilary wewnątrzneuronowe nie leżą w cytoplazmie komórek, lecz przebiegają w kanałach ograniczonych błoną komórek nerwowych, od której oddziela je ponadto jedno- lub kilkuwarstwowa osłona utworzona przez wypustki astrocytów. Śródbłonek kapilar ma typową budowę dla naczyń mózgu. Wprowadzony do krwiobiegu błękit trypanu nie opuszcza światła tych naczyń i nie zabarwia perykarionów neuronów [490]. Bliskość kontaktów naczyniowo - neuronalnych nie znosi bariery krew-mózg. W omawianym przypadku jest następstwem dużych rozmiarów i proporcjonalnie wysokich potrzeb metabolicznych komórek nerwowych.

Badania zmierzające do ustalenia morfologicznego odpowiednika bariery krew-mózg doprowadziły do wykrycia co najmniej trzech różnych hipotez. Jedna z nich wiąże tę barierę z wokólnaczyniową warstwą wypustek glejowych [163, 604, 656, 700]. Wypustki astrocytów tworzą połączenia zwarte, szczelnie otaczając naczynia włosowate [250, 544]. Dalsze obserwacje wykazały jednak, że wypustki astrocytów nie tworzą ciągłej bariery wokół naczyń [382, 560]. Według szacunków niektórych autorów [457], pokrywają one około 85% powierzchni kapilar ciała modzelowatego, a w korze mózdzku niespełna 50%. Co więcej, w mózgu myszy [58] i płaza *Necturus* [49] stwierdzono przechodzenie peroksydazy chrzanowej przez barierę astrocytów. Pozwala to wnosić, że wokólnaczyniowa osłona wypustek astrocytów (błona glejowa) ma ograniczony wpływ na przepuszczalność kapilar mózgu i nie jest strukturą warunkującą istnienie bariery krew-mózg.

Druga z hipotez łączy barierę krew-mózg z całkowitym brakiem lub wyjątkowo wąską przestrzenią wokółwłośniczkową, co uniemożliwia, względnie utrudnia dyfundowanie substancji ze światła naczyń na ze-

wnątrz [64, 166, 170, 181, 457, 485]. Wprawdzie rozległa przestrzeń wokółwłośniczkowa charakteryzuje kapilary mózgowe nie wykazujące bariery krew–mózg, tym niemniej kapilary mózgu *Necturus* wykazują tę barierę mimo równoczesnej obecności przestrzeni wokółwłośniczkowych [49]. Ponadto wykazano, że silnie zwężona przestrzeń wokółwłośniczkowa kapilar mózgu nie zapobiega przechodzeniu przez ściany naczyń substancji drobnocząsteczkowych [397] oraz cząstek koloidów [58, 590]. Tak więc obecność przestrzeni wokółwłośniczkowej niekoniecznie wiąże się z brakiem bariery krew–mózg, a z drugiej strony, brak silnie rozbudowanej przestrzeni wokółnaczyńniowej również nie stanowi o istnieniu tej bariery.

Kolejna hipoteza umiejscawia barierę krew–mózg w śródbłonku kapilar mózgu [63, 146, 152, 153, 584, 656]. Miejsce bariery jest zlokalizowane w zwartych połączeniach międzykomórkowych [473, 560], nieprzenikliwych dla ferrytyny [51, 176, 362, 683], peroksydazy chrzanowej [49, 50, 60, 276, 362, 500, 502, 560] oraz syntetycznej mikroperoksydazy o ciężarze cząsteczkowym wynoszącym zaledwie 2 000 [61, 216]. Ograniczona przepuszczalność kapilar mózgu wiąże się również z małą liczbą pęcherzyków plazmolemalnych występujących w cytoplazmie komórek śródbłonka. Hipoteza ta ma najlepsze oparcie w obserwacjach i eksperymentach i cieszy się obecnie największą liczbą zwolenników.

Istnienie bariery krew–mózg nie zapobiega przenikaniu przez ściany naczyń wszystkich substancji, stopień przepuszczalności zaś zmienia się zależnie od różnych czynników. Takie związki jak glukoza przechodzą przez ściany naczyń mózgowych w znacznych ilościach [408]. Podczas gdy podana dożylnie peroksydaza w ogóle nie opuszcza światła naczyń [560], to ferrytyna wnika do wnętrza komórek śródbłonka i akumuluje się w cytoplazmie, pęcherzykach plazmolemalnych i ciałach wielopęcherzykowych [226], a według doniesienia Joó i Várkonyi [334] może nawet osiągać blaszkę podstawną kapilar. Prawdopodobnym przeto wydaje się wniosek, że substancje o różnym ciężarze cząsteczkowym są zatrzymane przez rozmaite składniki ścian kapilar. Zwrócono też uwagę, iż niektóre stany patologiczne wywołują wzrost liczby pęcherzyków plazmolemalnych w komórkach śródbłonka, co sugeruje możliwość wzmożonego transportu śródkomórkowego [191, 284]. Wpływ na przepuszczalność bariery krew–mózg wywierają promienie rtg [565], antybiotyki [360] i mediatory synaptyczne, jak np. acetylocholina [252].

Kapilary, w których działa bariera krew–mózg, charakteryzują się aktywnością acetylocholinesterazy [374, 524]. Zahamowanie tej aktywności podnosi przepuszczalność naczyń mózgu. Jak wykazali Joó i Várkonyi [334] oraz Kása i Csillik [350], w pęcherzykach plazmolemalnych występuje butyrylocholinesteraza, natomiast aktywność acetylocholine-

sterazy jest ograniczona do blaszki podstawnej kapilar mózgu. Pierwszy z enzymów wpływa zapewne na transport śródkomórkowy, drugi natomiast oddziałuje na przepuszczalność blaszki podstawnej. Kapilary mózgu, w których bariera krew-mózg nie działa, nie wykazują również aktywności butyrylocholinesterazy [164, 245, 333, 334, 703].

Bez wątpienia, hipoteza lokująca barierę krew-mózg w śródbłonku kapilar wydaje się najbliższa prawdy. Równocześnie należy jednak mieć na uwadze kilka okoliczności: (1) Większość informacji dotyczących bariery krew-mózg uzyskano w badaniach struktury i przepuszczalności kapilar mózgu ssaków, zatem rozciąganie uzyskanych na tej drodze wyników na wszystkie kręgowce jest ryzykowne. (2) Uniwersalność śródbłonkowej bariery krew-mózg podważają np. obserwacje i wyniki eksperymentów przeprowadzonych na kapilarach mózgu śluzicy i ryb spodoustych. Mimo zwartych połączeń między komórkami śródbłonka, peroksydaza chrzanowa przechodzi ze światła tych naczyń do przestrzeni wokółwłośniczkowej przez wewnątrzśródbłonkowe kanały i pęcherzyki [276, 483]. Podobną sytuację opisano również u zarodków owcy [473]. (3) Połączenia zwarte między komórkami śródbłonka nie są jedynymi elementami strukturalnymi warunkującymi śródbłonkową barierę krew-mózg; składa się nań ponadto zespół czynników, które należy umiejscowić w samych komórkach śródbłonka. Jednym z argumentów przemawiających na rzecz takiego traktowania bariery krew-mózg są obserwacje wykazujące wzrost przepuszczalności kapilar mózgu w następstwie działania różnych czynników nie naruszających integralności międzykomórkowych połączeń zwartych. (4) Bariera krew-mózg jest rozwinięta u różnych kręgowców w stopniu niejednakowym: u ssaków najsilniej, gdyż oprócz śródbłonka naczyń zwykle uczestniczy w niej blaszka podstawna i astrocyty, natomiast u zbadanych dotychczas gadów dwa pierwsze składniki, a u śluzicy i ryb spodoustych rozstrzyga o niej jedynie wokółnaczyńowa osłona z wypustek astrocytów. Nasuwa to myśl o doskonaleniu bariery krew-mózg w procesie filogenezy. Szczupłość informacji w odniesieniu do niższych kręgowców nie pozwala jednak na sformułowanie wniosków przekraczających granicę przypuszczeń.

Liczba informacji dotyczących ultrastruktury i przepuszczalności kapilar obwodowego układu nerwowego jest bardzo skromna [497-499, 501]. Naczynia te należą do typu kapilar trzewnych, które omawiamy obszerniej w punkcie 5.3.

5.2.3. Kapilary grzebienia ocznego ptaków

Grzebień oczny ptaków jest narządem odżywczym, zaopatrującym w tlen wewnętrzne warstwy siatkówki [747]. Występuje w nim osobliwy

typ naczyń włosowatych o silnie sfałdowanej plazmolemie po obu stronach komórek śródbłonna (rys. 4 i 23). Ultrastrukturę kapilar grzebienia ocznego zbadał jako pierwszy Tanaka [682], a następnie szereg innych autorów [314, 321, 559, 627–629, 741, 747]. Część tych badaczy, a także Leiner [409], Kauth i Sommer [351] oraz O'Rahilly i Meyer [506], przeprowadziło obserwacje histochemiczne grzebienia ocznego. W ich wyniku stwierdzono m. in., że oprócz dostarczenia siatkówce tlenu, drugą równorzędną funkcją tego narządu jest prawdopodobnie usuwanie dwutlenku węgla z wnętrza gałki ocznej.

Szczególnie dokładnie znamy ultrastrukturę kapilar grzebienia ocznego wróbla domowego [314, 321]. Ściana kapilar składa się z dwóch warstw: wewnętrznej, utworzonej przez komórki śródbłonna oraz zewnętrznej, złożonej z blaszki podstawnej. Komórki śródbłonna są silnie spłaszczone. Z wyjątkiem obszaru przyjądrowego, ich grubość wynosi około 0,4 μm . Silnie sfałdowana plazmolema tworzy mikrofałdy wewnętrzne i zewnętrzne, skierowane odpowiednio do światła naczyń oraz ku blaszce podstawnej. Wysokość większości mikrofałdów wewnętrznych waha się w granicach 1,4–1,8 μm , natomiast wysokość mikrofałdów zewnętrznych jest nieco mniejsza i wynosi 1,3–1,6 μm . Przeciętna grubość mikrofałdów wynosi 700 Å. Leżą one gęsto obok siebie, rozdzielone szczelinami o szerokości około 500 Å. Szczeliny rozdzielające mikrofałdy wewnętrzne są częścią światła naczyń. Tak silne sfałdowanie plazmolemy komórek śródbłonna zwiększa ich powierzchnię co najmniej dwudziestokrotnie. Mikrofałdy zwiększają pozornie grubość śródbłonna, która mierzona między szczytami mikrofałdów wewnętrznych i zewnętrznych wynosi 3–4 μm . Zgrubiałe okolice przyjądrowe komórek tworzą krótsze i nieco rzadziej rozmieszczone mikrofałdy. W związku z tym centralne światło naczyń, dostępne dla elementów morfotycznych krwi, nie ulega wyraźnemu zwężeniu.

Kształt wielu mikrofałdów jest regularny i odpowiada z grubsza czworokątom, aczkolwiek licznie występują również mikrofałdy o zarysie trójkątów, względnie o kształtach nieregularnych. Wprawdzie przeważają mikrofałdy pojedyncze, tym niemniej występują także formy podwójne i potrójne, rozgałęziające się bezpośrednio u podstawy. Podstawa mikrofałdów jest z reguły krótsza od całkowitej ich długości. Tłumaczy to obecność na poprzecznych przekrojach naczyń licznych mikrofałdów nie połączonych z kadłubami komórek. Wreszcie uderzającą cechą kapilar grzebienia ocznego jest ułożenie większości mikrofałdów wewnętrznych i zewnętrznych w dwóch różnych płaszczyznach, prostopadłych w stosunku do siebie. Mikrofałdy wewnętrzne leżą zgodnie z osią kapilar, natomiast większość mikrofałdów zewnętrznych leży w płaszczyźnie poprzecznej naczyń. W cytoplazmie mikrofałdów brak jest

jakichkolwiek organelli. Są one skupione w spłaszczonych kadłubach komórek, głównie zaś w strefie cytoplazmy przyjądrowej. Brzegi sąsiadujących komórek śródbłonna stykają się płasko lub nakładają na siebie. Długość szczelin międzykomórkowych wynosi w pierwszym przypadku około 0,4–0,6 μm , w drugim zaś może dochodzić do 6 μm . Jedynym urządzeniem spinającym komórki są *zonulae adherentes*.

Komórki śródbłonna są otoczone od zewnątrz przez blaszkę podstawną, która graniczy z końcami dystalnymi mikrofałdów zewnętrznych. Składa się z dwóch warstw, z których wewnętrzna osiąga grubość do 0,3 μm , natomiast grubość bardziej zbitej blaszki zewnętrznej wynosi około 500 Å. Obie blaszki rozdziela wąska, elektronowo jasna przestrzeń. Wewnątrz grubszej warstwy wewnętrznej leżą nieliczne komórki śródścienne, być może homologiczne z perycytami. Warstwa zewnętrzna blaszki przechodzi miejscami w blaszkę wokółgrzebieniową i graniczy z ciałem szklistym gałki ocznej.

Drugim elementem strukturalnym grzebienia ocznego są komórki barwnikowe. Tworzą luźno upakowane grupy, rozmieszczone między kapilarami i blaszką wokółgrzebieniową. Między sąsiadującymi komórkami barwnikowymi występują obszerne przestrzenie międzykomórkowe, wypełnione w znacznej mierze przez sterczące w nich mikrokosmki. Podobne przestrzenie rozciągają się również między komórkami barwnikowymi i ścianami kapilar.

Dzięki silnemu sfaldowaniu plazmolemy oraz spłaszczeniu kadłubów komórek śródbłonna, kapilary grzebienia ocznego charakteryzują się maksymalnym zwiększeniem powierzchni. Mała grubość ścian i duża powierzchnia naczyń zapewniają prawdopodobnie wysoką efektywność dyfuzji tlenu i dwutlenku węgla. W przypadku grzebienia ocznego ptaków radykalne zwiększenie powierzchni naczyń nie pociąga za sobą zwiększenia rozmiarów całego narządu, co byłoby wysoce niekorzystne z uwagi na położenie grzebienia wewnątrz gałki ocznej.

Całkowity brak włókien nerwowych oraz włókien mięśni gładkich w grzebieniu ocznym sugeruje, że kapilary tego narządu nie wykazują reakcji naczyniowo - ruchowej. Niestety, brak jest informacji dotyczących przepuszczalności tych naczyń dla najczęściej używanych markerów, jak ferrytyna i peroksydaza chrzanowa. Jednak na podstawie organizacji połączeń międzykomórkowych można wnosić, iż prawdopodobnie są one przepuszczalne przynajmniej dla substancji drobnocząsteczkowych. Jak dotąd, stwierdzono jedynie przenikanie fluoresceiny przez ściany kapilar grzebienia ocznego [1, 26]. W związku z tym wysunięto hipotezę o udziale grzebienia ocznego w tworzeniu ciała szklistego gałki ocznej.

5.3. KAPILARY O CIENKIM I FENESTROWANYM ŚRÓDBŁONKU (TYP TRZEWNY)

Charakteryzują się one silnie ścieniałym śródbłonkiem, którego grubość wynosi około 800 Å, obecnością licznych i dość regularnie rozmieszczonych fenestrów (okienka) o średnicy 250–1000 Å i zagęszczeniu około $30/\mu\text{m}^2$, zwykle zamkniętych cienkościennymi przegrodami. Przegrody te nie występują jednak w większości okienek kapilar kłębkowych nerek. Między sąsiadującymi komórkami śródbłonka występują połączenia zwarte. Środkową warstwę naczyń tworzy blaszka podstawna i perycyty, które w większości kapilar trzewnych są nieliczne. Zależnie od narządu, warstwa zewnętrzna kapilar jest dobrze rozwinięta, względnie może nie występować w ogóle.

Obecność kapilar typu trzewnego wiąże się zazwyczaj z narządami wytwarzającymi lub chłoniącymi makrocząsteczki, względnie usuwającymi płyny o dużej zawartości białek [96, 97, 100, 101]. Występują one w tkance podśluzowej jelita [30, 104, 123, 197, 211, 306, 349, 428, 522, 566, 570, 677], żołądka [572], przełyku [677], jamy ustnej i nosowej [106, 107], w licznych gruczołach zewnątrzwydzielniczych, jak ślinianki [530, 677], gruczoły potowe [453], gruczoły łzowe [634], prostata [221], gruczoły solne ptaków [533] i trzustka [11], a dalej w nerkach (kapilary kłębków, kapilary warstwy korowej oraz żyłki proste) [36, 69, 241, 260, 261, 264, 265, 471, 482, 536, 568, 569, 575, 770], gruczołach dokrewnych, a mianowicie w przysadce mózgowej [177, 197, 234, 320, 326, 463, 520] i rdzeniowej [521], w nadnerczach [418, 776], tarczycy [162, 163, 184, 185, 415, 474, 756, 769], przytarczycach [697], grasicy [377] i wysepkach Langerhansa [391, 743]. Kapilary fenestrowane występują również w obwodowym układzie nerwowym [499], w ciałku rzęskowym [291] i naczyniówce oka [40, 41, 127, 128, 289, 290, 305, 447–450, 469, 575, 710], w splocie ślimaka [308], w torebkach stawowych [673] i przynasadowych okolicach kości [780], w narządzie szkliwotwórczym [238], w języku [519], węzłach limfatycznych [680], pochwie [587], woreczku żółciowym a dalej w obszarach mózgu nie wykazujących bariery krew–mózg (por. str. 449) oraz wyjątkowo w wątrobie owcy [255]. Ostatnio wykazano, że ścieniałe i fenestrowane obszary śródbłonka występują również w kapilarach mięśni szkieletowych [268, 375].

Istniejące źródła podają w niektórych przypadkach informacje o występowaniu w tych samych narządach różnych typów strukturalnych kapilar. Dotyczy to m. in. skóry, w której opisano zarówno kapilary fenestrowane [90, 453, 679], jak również kapilary o ciągłym śródbłonku [30, 495, 744]. Kapilary fenestrowane opisano również w gruczole tętnicy szyjnej królika i kota [44], aczkolwiek autorzy wcześniejszych publikacji nie stwierdzili obecności okienek w kapilarach tego narządu [155, 189,

240, 288, 416, 591]. Podobne rozbieżności dotyczą naczyń siatkówki [41, 575], śluzówki ucha środkowego [279, 299], grasicy [21, 258, 287, 339, 376, 377, 542, 546, 558, 738] i miazgi zębów [130, 131, 273, 387, 454, 576]. Powodów tych rozbieżności może być kilka, a mianowicie różnice gatunkowe, względnie dotyczące większych jednostek taksonomicznych, odmienna budowa kapilar w różnych okolicach tych samych narządów bądź też lokalnie zróżnicowanie budowy naczyń.

Wprawdzie kapilary trzewne są bardzo rozpowszechnionym typem naczyń, tym niemniej nie występują u wszystkich strunowców; brak ich stwierdzono u lancetnika [99] i śluzicy [101]. Brak miejsca nie pozwala na szczegółowe omówienie tych naczyń występujących we wszystkich wymienionych narządach. Nie możemy jednak pominąć nieco dokładniejszej analizy kapilar kosmków jelita, ciałek nerkowych oraz przysadki mózgowej.

5.3.1. Kapilary kosmków jelita

Ich ściany składają się z trzech warstw, a mianowicie wewnętrznej (fenestrowany śródbłonek), środkowej (blaszka podstawna) i zewnętrznej (przydanka). Kapilary leżące w mięśniówce jelita nie mają okienek i należą do włóściczek typu mięśniowego.

Śródbłonek kapilar trzewnych kosmków tworzy pojedynczą warstwę nierównomiernie spłaszczonych komórek, których zgrubiałe kadłuby są zwrócone ku środkowi kosmków. Oprócz jądra, zawierają one większość organelli cytoplazmatycznych. Ściany kapilar zwrócone ku nabłonkowi kosmków mają silnie ścieniały śródbłonek o grubości około $0,15 \mu\text{m}$, zawierający grupy okienek, z których większość jest zamknięta cienkimi przegrodami ($20\text{--}40 \text{ \AA}$). W wielu przegrodach występuje środkowe zgrubienie (około 150 \AA). Okienka mają kształt kolisty, a średnica ich wynosi $350\text{--}450 \text{ \AA}$ [123], $300\text{--}600 \text{ \AA}$ [30], względnie $200\text{--}700 \text{ \AA}$ [338]. Odległość między środkami fenestrów wynosi w jelicie myszy $750\text{--}1300 \text{ \AA}$. Obszar fenestrowany odpowiada około $\frac{1}{3}$ powierzchni kapilar, natomiast łączna powierzchnia fenestrów stanowi około $\frac{1}{10}$ całkowitej powierzchni naczyń [123]. Odmiennie przedstawiają się stosunki ilościowe w kosmkach jelita czczego kota [104]. Najwięcej fenestrów występuje w kapilarach części szczytowej kosmków, znacznie mniej w częściach podstawowych, najmniej zaś w warstwie mięśniowej. Liczby fenestrów obserwowane na przekrojach poprzecznych kapilar w wymienionych okolicach wynoszą odpowiednio 20,8, 0,857 i 0,222. W 100 g tkanek jelita czczego kota łączna długość kapilar wynosi około 70 km. Powierzchnia tych naczyń jest równa 1 m^2 , liczba oraz łączna powierzchnia fenestrów wynoszą odpowiednio 2×10^{12} oraz $51,2 \text{ cm}^2$, natomiast połączenia międzykomórkowe śródbłonek mają długość 161 km.

W spłaszczonych częściach komórek śródbłonka występują stosunkowo nieliczne pęcherzyki plazmolemalne oraz cylindryczne kanały, zamknięte po obu stronach przez typowe przegrody (diafragmy). Kanały te powstają prawdopodobnie wskutek łączenia się pęcherzyków plazmolemalnych, powstających po przeciwnych stronach śródbłonka (kaweole).

W szczelinach międzykomórkowych śródbłonka występuje jeden lub dwa wąskie obszary, w których zewnętrzne blaszki błon komórkowych przylegają do siebie, względnie są ze sobą połączone, tworząc połączenia zwarte.

Blaszka podstawna składa się z ciągłej warstwy drobnowłókienkowej substancji otaczającej śródbłonek kapilar oraz występujących w niej perycytów. Przydanka tworzy nieciągłą warstwę zewnętrzną naczyń. Graniczy z przestrzenią wokółwłośniczkową i zawiera makrofagi, plazmocyty, leukocyty, fibroblasty, komórki tuczne oraz pęczki włókien elastycznych i kolagenowych.

Studia nad przepuszczalnością kapilar jelita dla ferrytyny i peroksydazy wykazały, że oba markery przenikają ze światła naczyń do przestrzeni okołowłośniczkowej, przy czym w największym zagęszczeniu pojawiają się po stronie fenestrowanej części śródbłonka. Peroksydaza pokonuje barierę śródbłonka znacznie szybciej niż ferrytyna; pierwsza pojawia się w przestrzeni wokółwłośniczkowej po upływie jednej minuty od dożylnego wprowadzenia jej do organizmu, natomiast druga — po upływie 3–4 min. Przegrody fenestrów zawierają strukturalny element małych porów dostępnych dla substancji drobnocząsteczkowych, natomiast odpowiednikiem dużych porów, przepuszczalnych dla makrocząsteczek, są nieliczne fenestry bezprzegrodowe [123]. Wysunięto przypuszczenie, że rolę dużych porów mogą również spełniać pęcherzyki plazmolemalne [338].

5.3.2. Kapilary ciałek nerkowych

Pojedyncze ciało nerkowe wyższych kręgowców składa się z dwuściennej nabłonkowej torebki kłębka oraz kilku pętli naczyń włosowatych, tworzących kłębek, *glomerulus*. Zewnętrzną ścianę torebki tworzy jednowarstwowy płaski nabłonek ścienny (parietalny), który na biegunie naczyniowym ciała nerkowego przechodzi w nabłonek trzewny (wisceralny), utworzony przez podocyty. Te ostatnie mogą również uczestniczyć w budowie nabłonka ściennego. Między nabłonkami ściennym i trzewnym mieści się jama torebki, która u osobników dorosłych przyjmuje postać szczeliniastej przestrzeni podtorebkowej (rys. 12 i 24]. Jej kontynuacją jest światło kanalika krętego I rzędu i dalszych odcinków nefronu. Wypustki podocytów opierają się o blaszkę podstawną naczyń

włosowatych kłębka. Te ostatnie biorą swój początek z tętniczki doprowadzającej, natomiast opuszczając ciało nerkowe łączą się ponownie dając tętniczkę odprowadzającą. Elementami stabilizującymi pętle kapilar kłębka są komórki mezangium, tworzące tzw. kreskę naczyń. Śródbłonek kapilar, blaszka podstawna oraz nabłonek trzewny torebki (podocyty) składają się na barierę (błone) filtracyjną kłębka, której grubość w nerkach ssaków wynosi około 0,2 μm . Funkcją kapilar kłębków jest bierne filtrowanie osocza krwi. Krwinki oraz drobiny białek o ciężarze cząsteczkowym przekraczającym 70 000 nie przechodzą przez barierę filtracyjną kłębków.

Śródbłonek kapilar ciałek nerkowych ma silnie spłaszczone części peryferyczne, których grubość wynosi 300–1000 Å [570, 689]. Występują w nich liczne, okrągłe okienka, nadające tym częściom komórek charakter blaszki porowatej, *lamina fenestrata* [259]. Według różnych źródeł, średnica fenestrów wynosi 650 Å [227], 500–700 Å [187, 428, 571], około 800 Å [575], 250–1000 Å [206, 211, 259, 570, 689], względnie ponad 1000 Å [539], wykazując znaczne różnice osobnicze i międzygatunkowe (rys. 25 i 26). Oprócz obecności fenestrów o większej średnicy niż w innych kapilarach trzewnych, naczynia te charakteryzują się grubą blaszką podstawną, brakiem elementów przydanki oraz bliskim sąsiedztwem z mezangiocyty i wypustkami podocytów.

Pierwsze obserwacje porowatego śródbłonka kapilar kłębkowych nerek przeprowadzili w mikroskopie elektronowym Gautier i wsp. [241], potwierdzone następnie przez innych autorów [36, 259–261, 264, 265, 535, 568, 569]. Jednym z ważniejszych, lecz kontrowersyjnych spostrzeżeń było stwierdzenie braku przegród w okienkach śródbłonka. Rinehart [577], Miller [464] oraz Rhodin [570] wskazywali na występowanie w okienkach wyjątkowo cienkiej przegrody, pokazując ją nawet na elektronogramach. Zwrócono jednak uwagę, iż opisywana struktura może odpowiadać interfazie między osoczem krwi i blaszką podstawną naczyń [539]. Dodatkowymi argumentami świadczącymi przeciwko obecności przegród jest położenie wypustek mezangium w świetle niektórych okienek [202, 296, 481, 689, 770], jak również brak akumulacji egzogennej ferrytyny w sąsiedztwie tych otworów [5, 206]. Ostatecznie ustalono, że pojedyncze lub podwójne przegrody występują tylko w nielicznych okienkach, natomiast większość okienek stanowi niczym nie zamknięte otwory.

Zastosowanie techniki freezing - etching pozwoliło ustalić że okienka śródbłonka są okrągłe i rozmieszczone z dużą regularnością. Obszary fenestrowane są rozgraniczone promienistymi zgrubieniami cytoplazmy, biegnącymi od kadłubów komórek, które prawdopodobnie stanowią element wzmacniający spłaszczone części peryferyczne komórek [227]. Badania te wykazały, że zagęszczenie fenestrów między zgrubiałymi pro-

mieniami wynosi u myszy $60/\mu\text{m}^2$, co przy ich średnicy wynoszącej 650 \AA i powierzchni około $3300 \mu\text{m}^2$, odpowiada 20% powierzchni śródbłonna komórek. Uwzględniając obecność zgrubiałych, bezokienkowych części śródbłonna można przyjąć, iż okienka zajmują łącznie około 15% całkowitej powierzchni komórek. W oparciu o badania w transmisyjnym mikroskopie elektronowym, Rhodin [571] wyliczył łączną powierzchnię okienek na 35%. Wprawdzie rezultat ten jest zapewne zawyżony, tym niemniej nie można pominąć w tym miejscu postulatów niektórych autorów [764], wskazujących na dynamiczny charakter okienek, których liczba zmienia się jakoby zależnie od warunków fizjologicznych.

Kapilary kłębka są obleczone ciągłą blaszką podstawną o charakterystycznej trójwarstwowej strukturze (rys. 27) [259, 423, 770, 771]. Równocześnie jednak brak jest blaszki podstawnej między kadłubami komórek śródbłonna i komórkami mezangium [647–649]. W okolicy tej blaszka podstawna opuszcza sąsiedztwo śródbłonna i otacza od zewnątrz grupy mezangiocytów. Trójwarstwowa budowa blaszki podstawnej jest najlepiej widoczna na przekrojach poprzecznych. Położenie środkowe zajmuje *lamina densa*, a po obu jej stronach leżą warstwy o mniejszej gęstości, odpowiadające *lamina rara interna* i *l. r. externa*. Pierwsza z nich graniczy bezpośrednio z komórkami śródbłonna druga natomiast z wypustkami podocytów, które są w niej nieznacznie zanurzone. Grubość poszczególnych warstw blaszki podstawnej jest cechą gatunkową. *Lamina densa* u wszystkich gatunków ssaków grubieje wraz z wiekiem zwierząt [8, 27, 389, 457]. Wobec występowania w śródbłonku okienek oraz niezbyt szczelnego osłonięcia kapilar kłębków przez wypustki podocytów, blaszka podstawna spełnia zapewne funkcję głównego filtru w barierze rozdzielającej krew i przestrzeń moczową (podtorebkową). Zatrzymując makrocząsteczki o ciężarze cząsteczkowym przekraczającym 70 000, jest ona przepuszczalna dla wody, jonów i substancji drobnocząsteczkowych [539]. Zgodnie z sugestią Halla [262, 263], dyfuzja tych ostatnich jest prawdopodobnie regulowana przez zmianę odległości między wypustkami podocytów (hipoteza porów szczeliniastych, „slit-pore”). Nowsze badania, posługujące się takimi markerami jak rozmaite frakcje dekstranów o ciężarze cząsteczkowym 32 000–125 000 [199], potwierdziły funkcjonalny model kłębków nerkowych, zaproponowany w 1961 r. przez Paladego i grupę jego współpracowników [206]. Model ten, oparty na wynikach badań dotyczących przepuszczalności kapilar kłębków nerkowych dla ferrytyny, wiązał funkcję bariery filtracyjnej z blaszką podstawną, rolę śródbłonna określił mianem zastawki kontrolującej dostęp drobin substancji do elementu filtrującego, natomiast nabłonkowi trzewnemu i mezangiocytom przypisał odpowiednio funkcję odzyskiwania białek przechodzących przez blaszkę podstawną oraz funkcję odbudowy

i oczyszczania blaszki z akumulujących się na jej powierzchni składników przesącza.

Gwiaździste komórki podocytów tworzą niekonwencjonalny nabłonek trzewny torebki ciałek nerkowych. Cytoplazma podocytów jest silnie porozdzielana na liczne wypustki o zróżnicowanej długości i kształtach. Kadłuby podocytów leżą w przestrzeni podtorebkowej, a wysyłane przez nie wypustki, z których wiele oddaje szereg wtórnych odgałęzień, opierają się o warstwę zewnętrzną blaszki podstawnej kapilar [150, 241, 264, 265, 493, 535, 568]. Wypustki poszczególnych podocytów docierają do paru lub kilku kapilar, toteż każde z naczyń jest otoczone przez przemieszane ze sobą wypustki kilku tych komórek. Przeciętna szerokość przestrzeni rozdzielających wypustki podocytów na wysokości blaszki podstawnej (pory szczeliniaste, szczeliny moczowe) wynosi — wedle różnych autorów — 50 Å [575], 100 Å [262], około 250 Å [199] i 1250 Å [649]. W niedojrzałych kłębkach człowieka wypustki podocytów otaczają szczelnie naczynia włosowate, między sąsiednimi wypustkami występują połączenia zwarte, natomiast szczeliny moczowe — przepuszczalne dla przesącza kłębkowego — powstają wtórnie [203]. W cytoplazmie wypustek podocytów występują mikrofibryle i mikrotubule, spełniające zapewne rolę wspierającego cytoszkieletu. Znaczenie czynnościowe nabłonka trzewnego jest wielostronne, gdyż uczestniczy on w biogenezie blaszki podstawnej kapilar kłębków oraz w odzyskiwaniu części białek pokonujących barierę filtracyjną. Natomiast wypustki podocytów otaczające ściany kapilar są ważnym elementem mechanicznym, wspierającym blaszkę podstawną naczyń, a także ograniczającym swobodne przechodzenie cząstek o średnicy przekraczającej 250 Å [199].

W okolicy bieguna naczyniowego ciałek nerkowych występują grupy mezangiocytów, niewyspecjalizowanych komórek tkanki łącznej, tworzących kreskę naczyniową (mezangium) [515]. Komórki te, opisane po raz pierwszy przez Zimmermanna [779], występują szczególnie licznie u ptaków. Wspierają pętle kapilar oraz wykazują zdolności żerne. Autorzy początkowych publikacji dotyczących ultrastruktury ciałek nerkowych kwestionowali ich obecność, a następnie uważano je za komórki mięśni gładkich [462], przekształcone komórki śródbłonka [390] oraz komórki siateczki [202]. Na korzyść ostatniej hipotezy przemawia m. in. obecność w ich cytoplazmie organelli typowych dla komórek układu siateczkowo-śródbłonkowego, jak również zdolność do mikro- i makrofagocytozy.

Budowa kapilar kłębków nerkowych niższych kręgowców może odbiegać w szczegółach od stosunków typowych dla ssaków. Na przykład u kręgowców (śluzica) śródbłonek kapilar kłębków ma stosunkowo nie-liczne okienka, których średnica wykazuje duże zróżnicowanie. Blaszka podstawna śródbłonka jest cienka i brak jej ciągłości, natomiast mezan-

giocyty tworzą liczne wypustki, rozmieszczone między śródbłonkiem i wypustkami podocytów [385]. W skład bariery filtracyjnej ciałek nerkowych śluzicy wchodzi śródbłonek, nieciągła blaszka podstawna śródbłonka, miejscami wypustki komórek mezangium, blaszka podstawna podocytów oraz ich wypustki.

5.3.3. Kapilary przysadki mózgowej

W części nabłonkowej przysadki mózgowej, podobnie jak w innych gruczołach dokrewnych, występują kapilary trzewne. W miejscowo ściętych częściach śródbłonka o grubości 200–300 Å występują okienka o przeciętnej średnicy 300–500 Å. Światło okienek zamykają przegrody, będące kontynuacją obustronnej plazmolemy komórek. Między światłem kapilar i parenchymą gruczołu leży bariera krew-tkanki, utworzona przez śródbłonek, blaszkę podstawną śródbłonka, łącznotkankową przestrzeń wokólnaczyniową oraz blaszkę podstawną komórek gruczołowych. Wewnątrz przestrzeni wokólnaczyniowej występują makrofagi, plazmocyty, fibroblasty i elementy włókniste tkanki łącznej, tworząc warstwę zewnętrzną naczyń (przydanek). Przestrzeń wokólnaczyniowa ma niejednakową szerokość. W jednych miejscach jest ona silnie rozszerzona, w innych natomiast może całkowicie zanikać, wskutek zespolenia się blaszek podstawnych śródbłonkowej i parenchymatycznej. Rysem charakterystycznym kapilar przysadki jest duża i zmienna średnica. Nazywano je od dawna — lecz niesłusznie — zatokami, przypisując komórkom śródbłonka własności żerne [529, 639, 751], charakterystyczne dla układu siateczkowo - śródbłonkowego. W latach 1928–1929 trzech różni autorzy, a mianowicie Cappel [82], Sincle [650] oraz Sawade [603], wykazali jednak, że śródbłonek naczyń przysadki nie gromadzi barwników przyżyciowych, natomiast zdolność tę mają makrofagi przydanki [82, 556]. Zdolności żerne komórek przydanki zostały również potwierdzone przez badaczy submikroskopowej organizacji naczyń przysadki [197, 234, 463, 578]. Z obserwacji tych wynika, że śródbłonek kapilar przysadki mózgowej winien być wyłączony z układu siateczkowo - śródbłonkowego. Należą natomiast doń makrofagi przydanki. Komórki te gromadzą w swej cytoplazmie barwniki przyżyciowe. Ich wypustki mogą przedostawać się przez blaszkę podstawną i śródbłonek do wnętrza kapilar, co w przeszłości było źródłem błędnego określenia charakteru naczyń przysadki.

5.4. KAPILARY O NIECIĄGŁYM ŚRÓDBŁONKU (TYP ZATOKOWY)

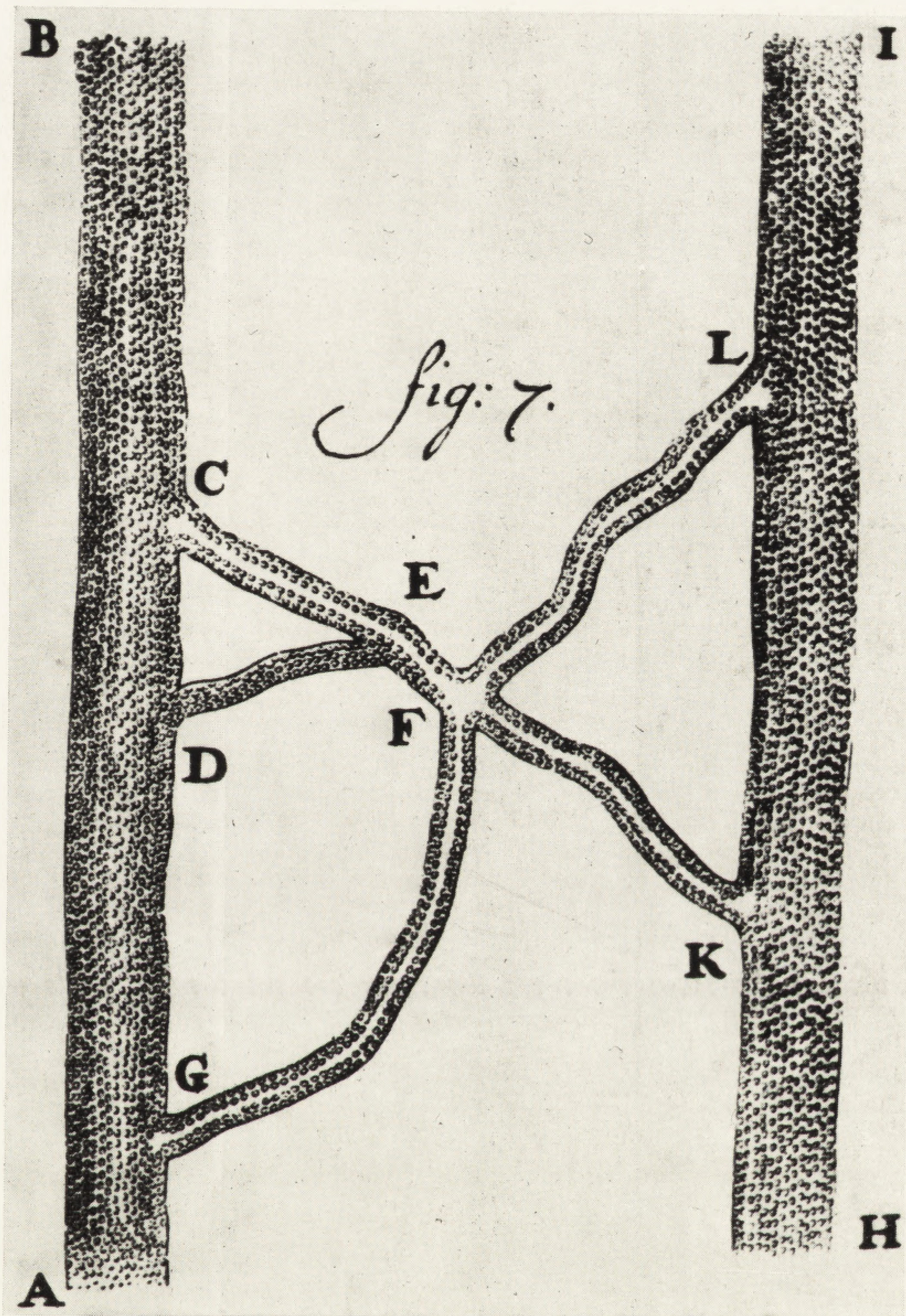
Opisał je po raz pierwszy Minot w 1900 r. [468]. Występują one w szpiku kostnym [80, 154, 293, 534, 537, 736, 737, 739, 740, 773, 775], w śledzionie niektórych gatunków ssaków [220, 531], a w postaci naj-

bardziej typowej w wątrobie kręgowców (rys. 15 i 28). Większość początkowych obserwacji ultrastruktury kapilar zatokowych wątroby, opublikowanych w latach 1955–1963, przeprowadzono niemal wyłącznie na rozmaitych gatunkach ssaków, jak szczur [163, 207, 595, 766], mysz [271], chomik [331], królik, pies i człowiek. Tylko nieliczne obserwacje odnosiły się do zarodków, np. świni i kur. Fawcett [207] opisał ultrastrukturę zatok w wątrobie żaby.

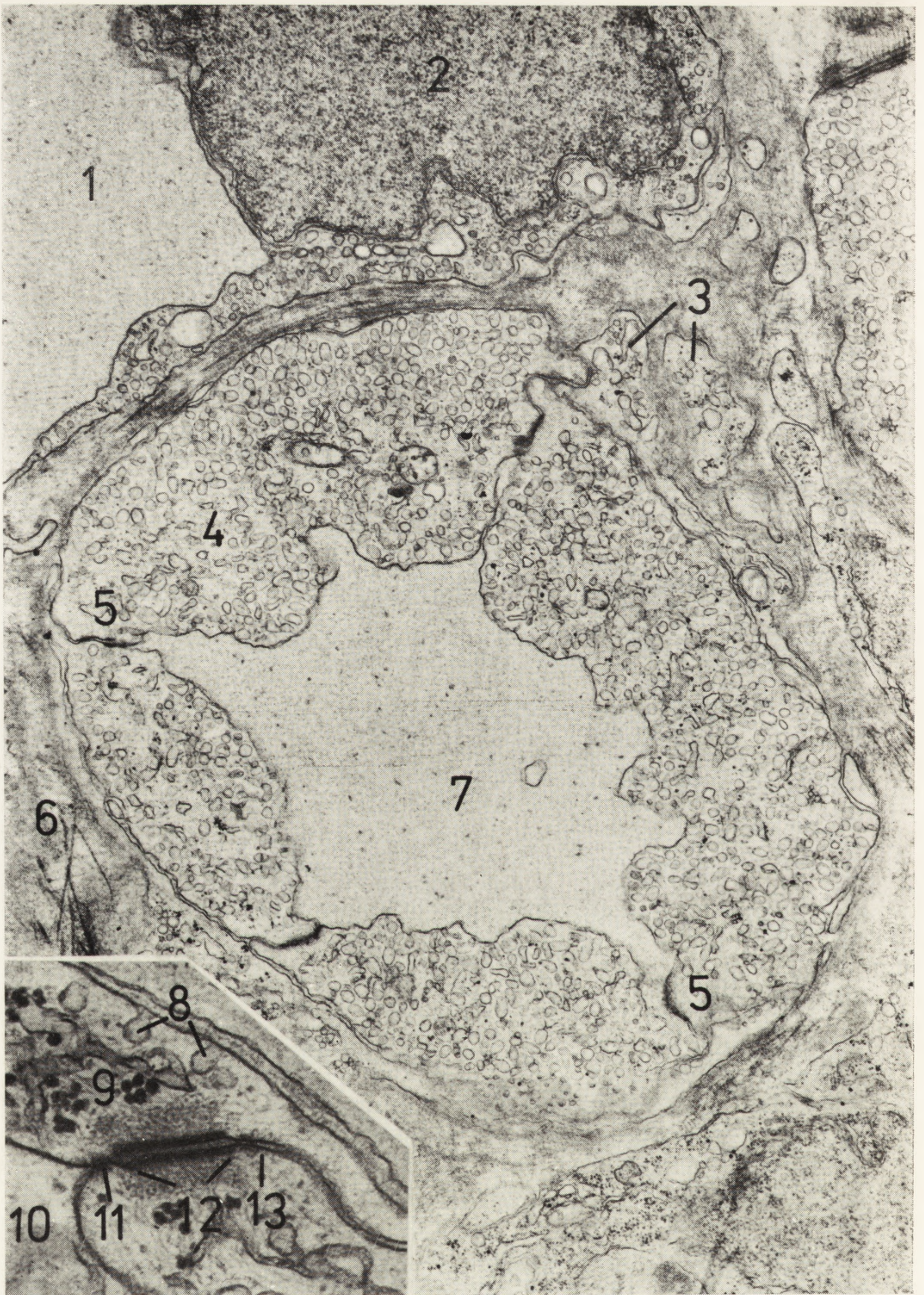
Kapilary zatokowe wątroby charakteryzują się (1) dużą i zmienną średnicą, (2) obecnością znacznych rozstępów między brzegami komórek śródbłonka, jak również fenestrów w ścieniałych częściach tych komórek, (3) brakiem blaszki podstawnej oraz (4) zdolnością komórek śródbłonka do fagocytozy, dzięki czemu zaliczamy je do układu siateczkowo-śródbłonkowego. Śródbłonek zatok wątroby graniczy z wokólnacyniową przestrzenią Dissego, w której świetle leżą liczne mikrokosmki wybiegające z wolnych powierzchni hepatocytów. Rozgałęzienia przestrzeni Dissego sięgają również między graniczące ze sobą hepatocyty, tworząc silnie rozbudowany labirynt szczelin międzykomórkowych. Wobec nieciągłej struktury śródbłonka oraz braku blaszki podstawnej, w zatokach wątroby nie ma strukturalnej bariery między krwią i płynem tkankowym wypełniającym przestrzenie Dissego.

Ścianę zatok wątroby budują silnie spłaszczone komórki śródbłonka przemieszane z komórkami Kupffera - Browicza, uważanymi za potencjalne fagocyty [369]. Pierwsze z tych komórek mają kształt blaszkowaty i elektonowo jasną cytoplazmę, w której występują dość liczne pęcherzyki plazmolemalne, słabo rozbudowana szorstka siateczka wewnątrzplazmatyczna oraz inne organelle. W najsilniej ścieniałych częściach śródbłonka występują liczne okienka, których średnica wynosi u szczura 0,1–1 μm . Jak wykazały obserwacje w mikroskopie skaningowym, w wielu okienkach występują beleczkowate przegrody, dzielące je na szereg mniejszych otworów [478]. Według niektórych autorów, śródbłonkowe otwory mogą być zamknięte cienkimi przegrodami, uszkodzonymi podczas utrwalania wątroby [398, 754].

Komórki Kupffera - Browicza tworzą liczne i długie wypustki sterzące do światła zatok. W cytoplazmie kadłubów tych komórek występują liczne cysterny szorstkiej siateczki wewnątrzplazmatycznej, lizosomy, fagosomy, pęcherzyki włochate i mikrotubule. Podobnie jak w śródbłonku, w komórkach Kupffera - Browicza występują liczne otwory. Część autorów podziela pogląd, iż oba rodzaje komórek należą do wspólnego typu, natomiast różnice w ich wyglądzie i submikroskopowej budowie odzwierciedlają jedynie odmienne stany czynnościowe. Aczkolwiek pogląd ten nie jest podzielany powszechnie, tym niemniej wybitne własności żerne mają zarówno komórki Kupffera - Browicza, jak również komórki

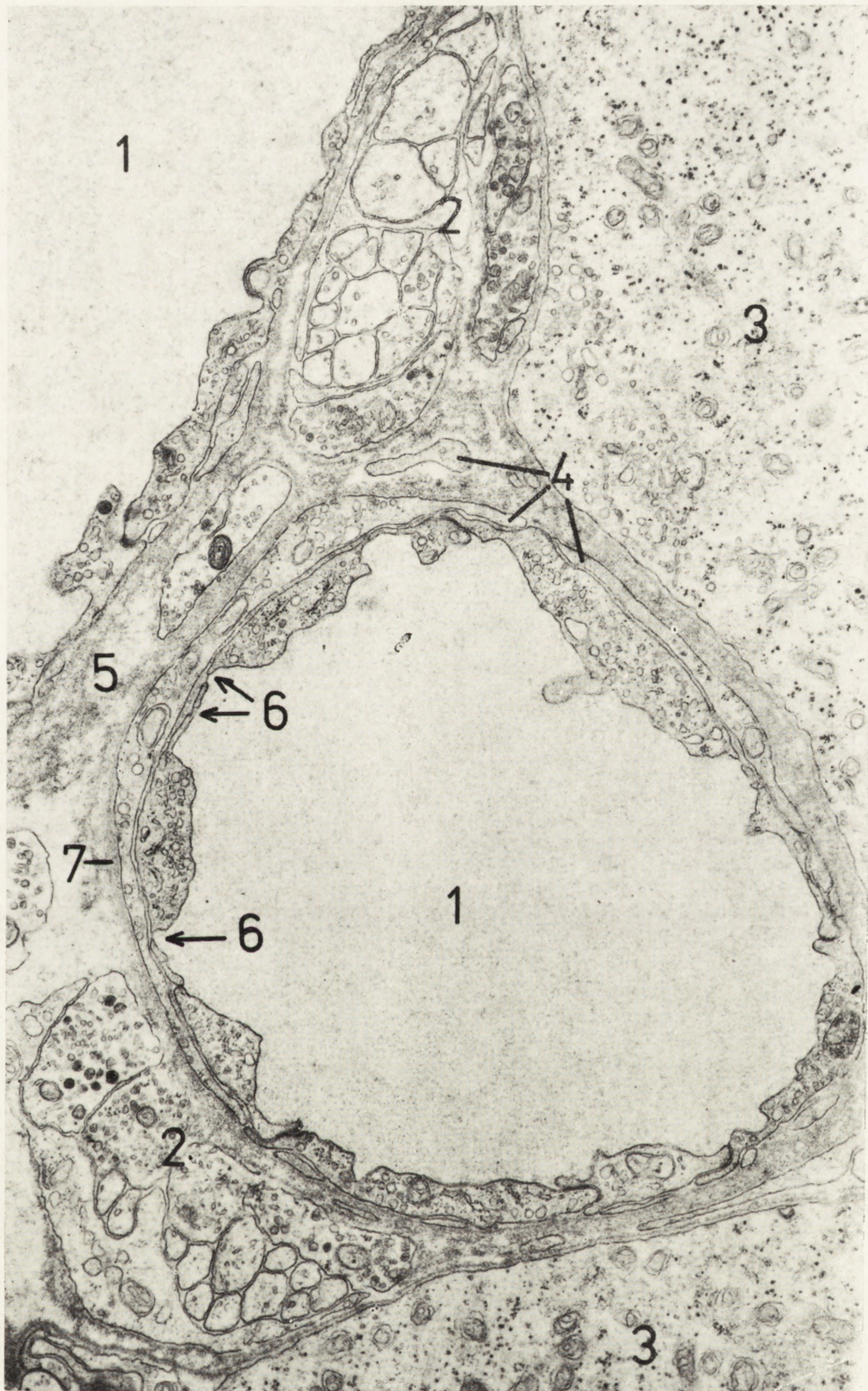


Rys. 1. Kopia rysunku wykonanego przez A. van Leeuwenhoecka, obrazującego przepływ krwi z tętnicy HI do żyły AB



Rys. 2. Kapilary sieci dziwnej gruczołu gazowego okonia, *Perca fluviatilis*. $\times 16700$. Wstawka pokazuje wyspecjalizowane połączenie między komórkami śródbłonna w kapilarze sieci dziwnej pęcherza pławnego piskorza, *Misgurnus fossilis*, w pow. 55150. (Wg A. Jasińskiego i W. Kilarskiego — Acta Anat. 78, 1971).

1 — światło kapilary żylniej, 2 — jądro komórki śródbłonna, 3 — wypustki perycytów, 4 — pęcherzyki plazmolemalne, 5 — połączenie międzykomórkowe, 6 — łącznotkankowa przestrzeń wokółwłośniczkowa z włóknami kolagenowymi, ograniczona przez blaszki podstawne naczyń, 7 — światło kapilary tętniczej, 8 — kaweole, 9 — ziarna 10 — światło kapilary, 11 — połączenie glikogenu, zwarte, 12 — desmosom, 13 — połączenie pośrednie



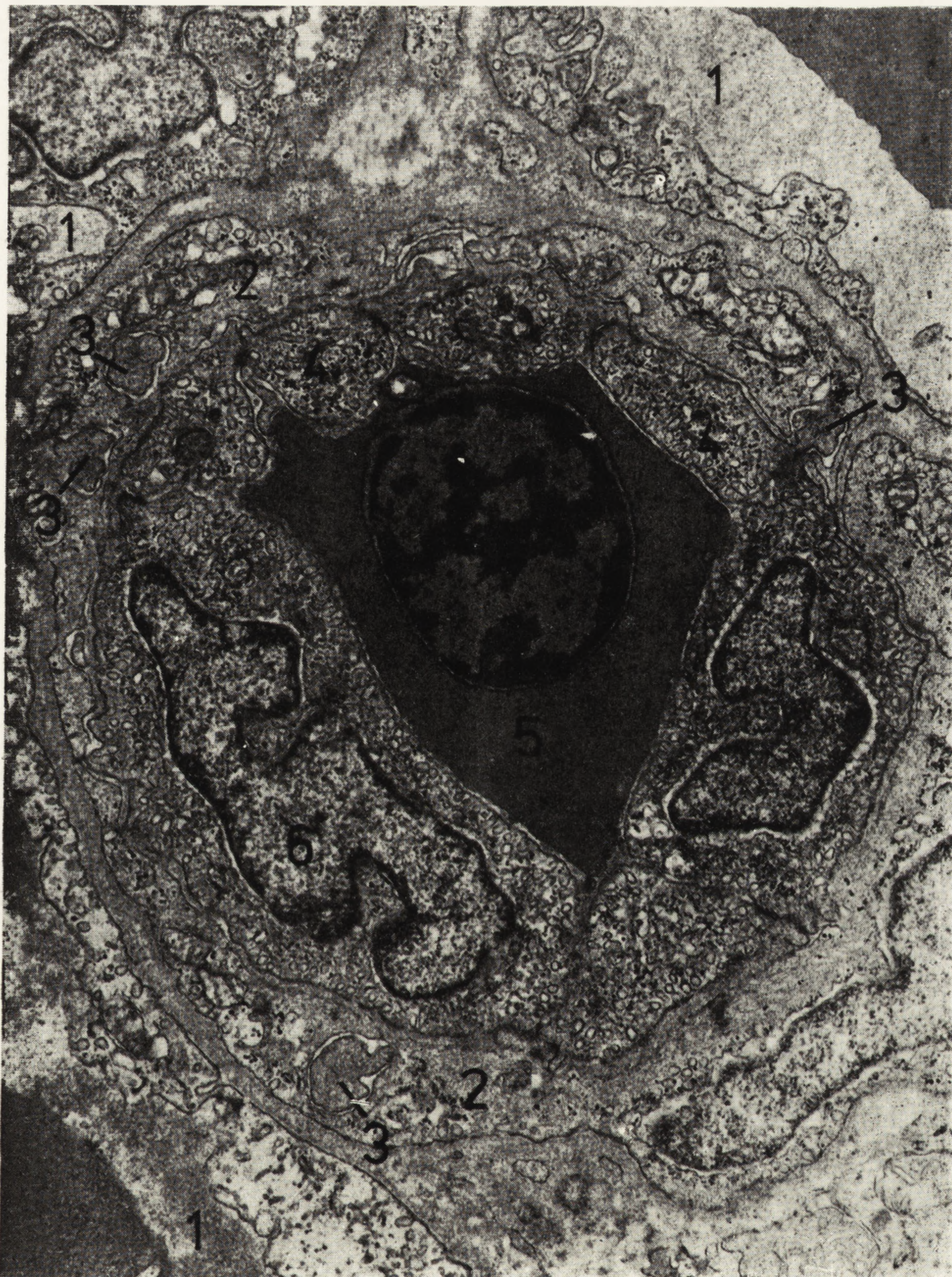
Rys. 3. Kapilary gruczołu gazowego okonia, *Perca fluviatilis*. $\times 13000$. (Wg A. Jasińskiego i W. Kilarskiego — Acta Anat. 78, 1971).

1 — światło kapilary, 2 włókna nerwowe adrenergiczne i ich zakończenia, 3 — komórka gruczołu gazowego, 4 — wypustki perycytów, 5 — przestrzeń wokółwłośniczkowa, 6 — okienka z przegrodami, 7 — blaszka podstawna śródbłonna



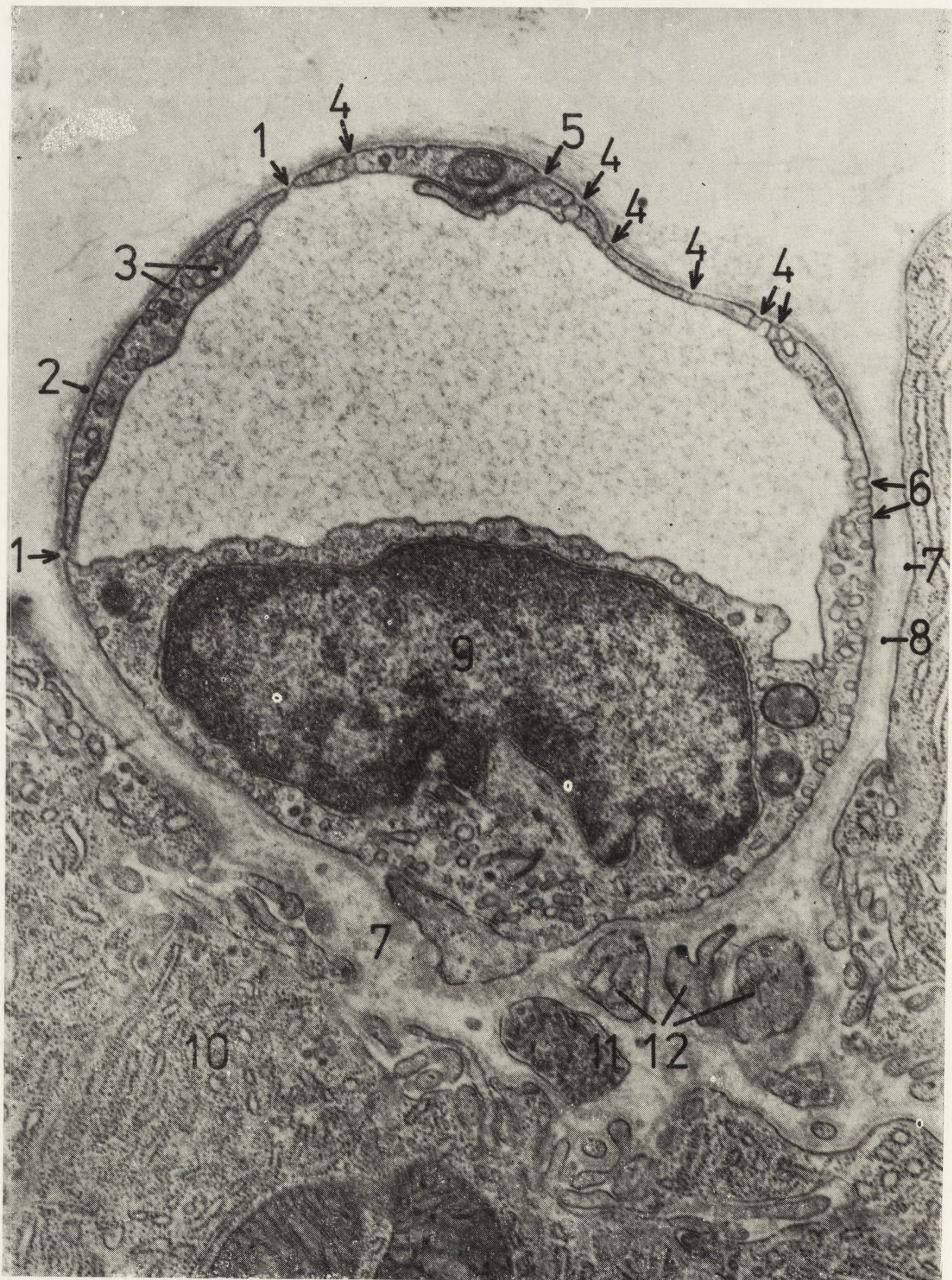
Rys. 4. Śródbłonek kapilary z grzebienia ocznego wróbla. $\times 20350$. (Wg A. Jasińskiego — Z. Zellforsch. 146, 1973).

1 — światło kapilary, 2 — mikrofałdy wewnętrzne, 3 — część ściana komórki śródbłonna, 4 — mikrofałdy zewnętrzne, 5 — blaszka podstawna, 6 — ciało szkliste, 7 — połączenie komórek



Rys. 5. Tętniczka z sieci dziwnej pęcherza pławnego szczupaka, *Esox lucius*.
 × 14520.

1 — światło kapilary żylniej, 2 — włókno mięśniowe gładkie, 3 — wypustka komórki śródbłonna nawiązująca kontakt z włóknem mięśniowym, 4 — śródbłonek, 5 — erytrocyt wypełniający światło tętniczki, 6 — jądro w kadłubie komórki śródbłonna

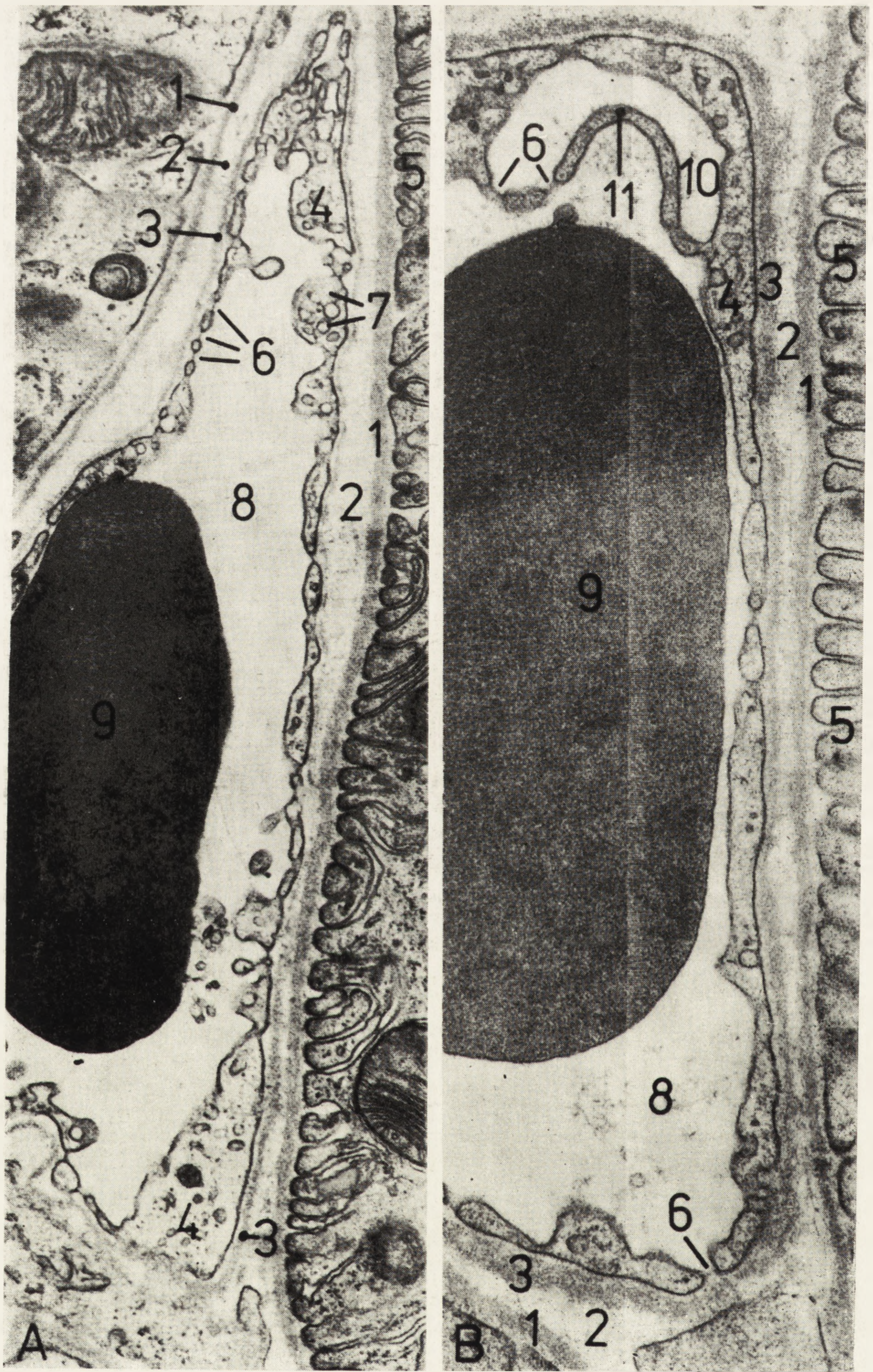


Rys. 6. Kapilara trzustki zewnątrzwydzielniczej nietoperza. $\times 21600$.

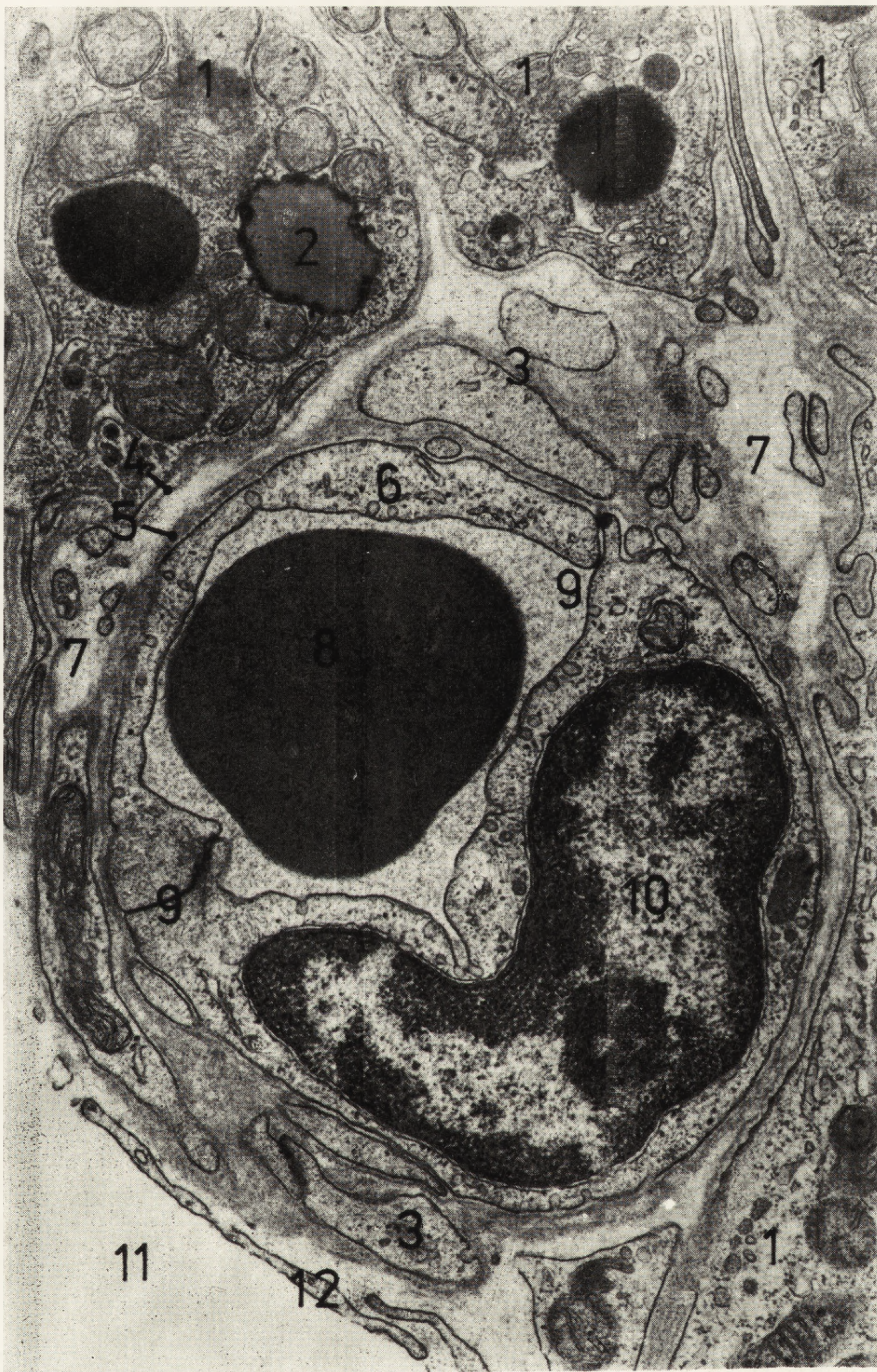
1 — okienko śródbłonna, 2 — blaszka podstawna śródbłonna, 3 — wolne pęcherzyki plazmolemalne, 4 — kanalik wewnątrzśródbłonkowy zamknięty przegrodami, 5 — połączenie międzykomórkowe, 6 — kawiole, 7 — blaszka podstawna parenchymy, 8 — przestrzeń wokółnaczyniowa, 9 — jądro w kadłubie komórki śródbłonna, 10 — komórka pęcherzykowa trzustki, 11 — zakończenie włókna nerwowego, 12 — wypustki perycytów



Rys. 7. Kapilara trzustki zewnątrzwydzielniczej nietoperza. $\times 17000$.
 1 — światło wakuoli, 2 — okienko z przegrodą, 3 — światło kapilary, 4 — mikrofałd, 5 — śródbłonek, 6 — erytrocyt, 7 — włókno nerwowe, 8 — wakuole powstałe z fałdów śródbłonek z okienkami, 9 — wolne pęcherzyki plazmolemalne, 10 — kaweole, 11 — blaszka podstawna parenchymy, 12 — blaszka podstawna śródbłonek, 13 — wypustki perycytów, 14 — przestrzeń wokółwłośniczkowa, 15 — część przynaczyniowa komórki pęcherzykowej trzustki

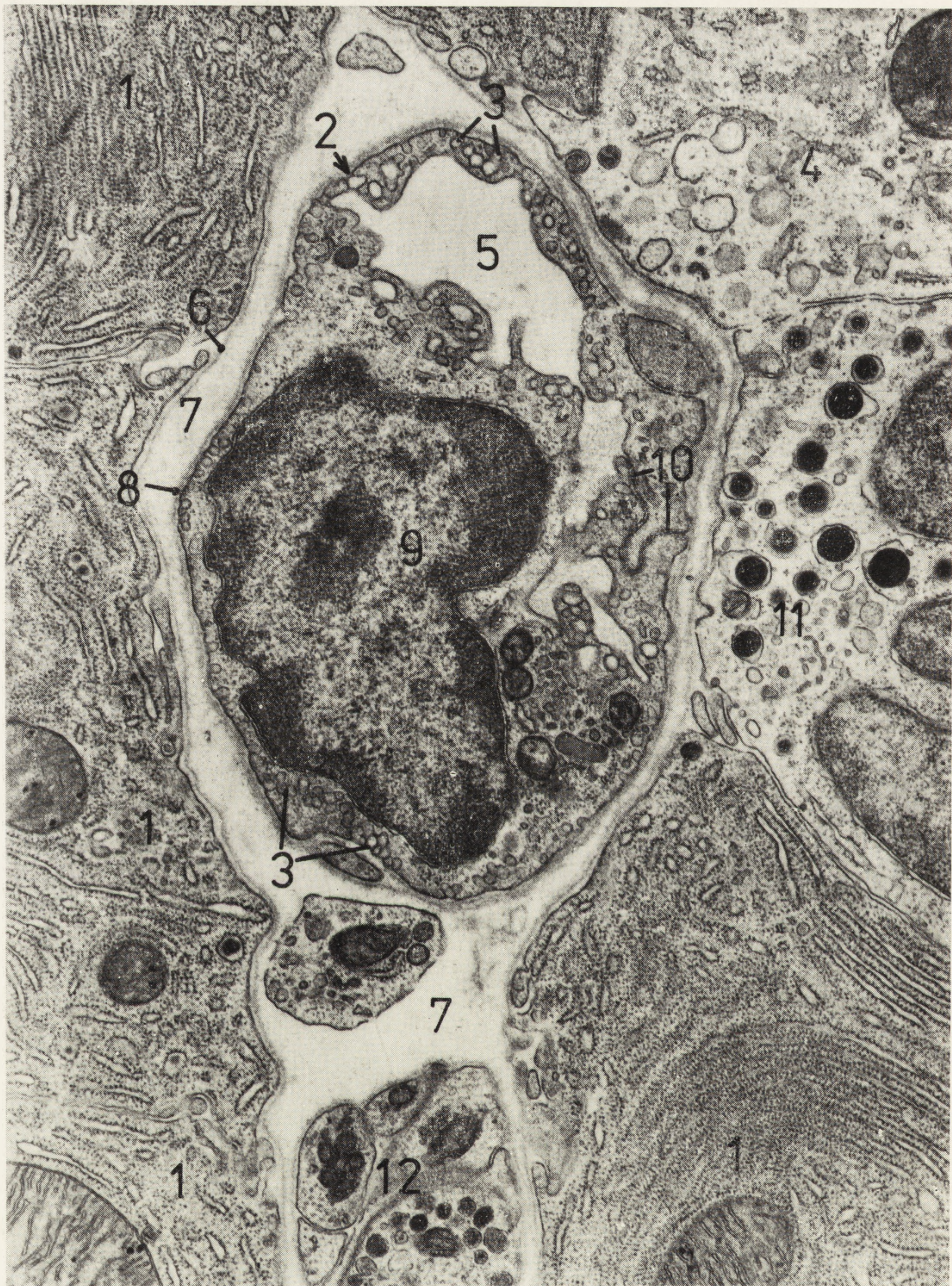


Rys. 8. Kapilary perytubularne nerki nietoperza. A — $\times 15080$, B — $\times 23300$.
 1 — blaszka podstawna parenchymatyczna, 2 — przestrzeń wokółwłośniczkowa, 3 — blaszka podstawna śródbłonna, 4 — śródbłonek, 5 — część podstawowa komórek kanalika krętego I rzędu, 6 — okienka śródbłonna zamknięte przegrodami, 7 — pęcherzyki plazmolemalne, 8 — światło kapilary, 9 — erytrocyt, 10 — wakuola, 11 — mikrofałd



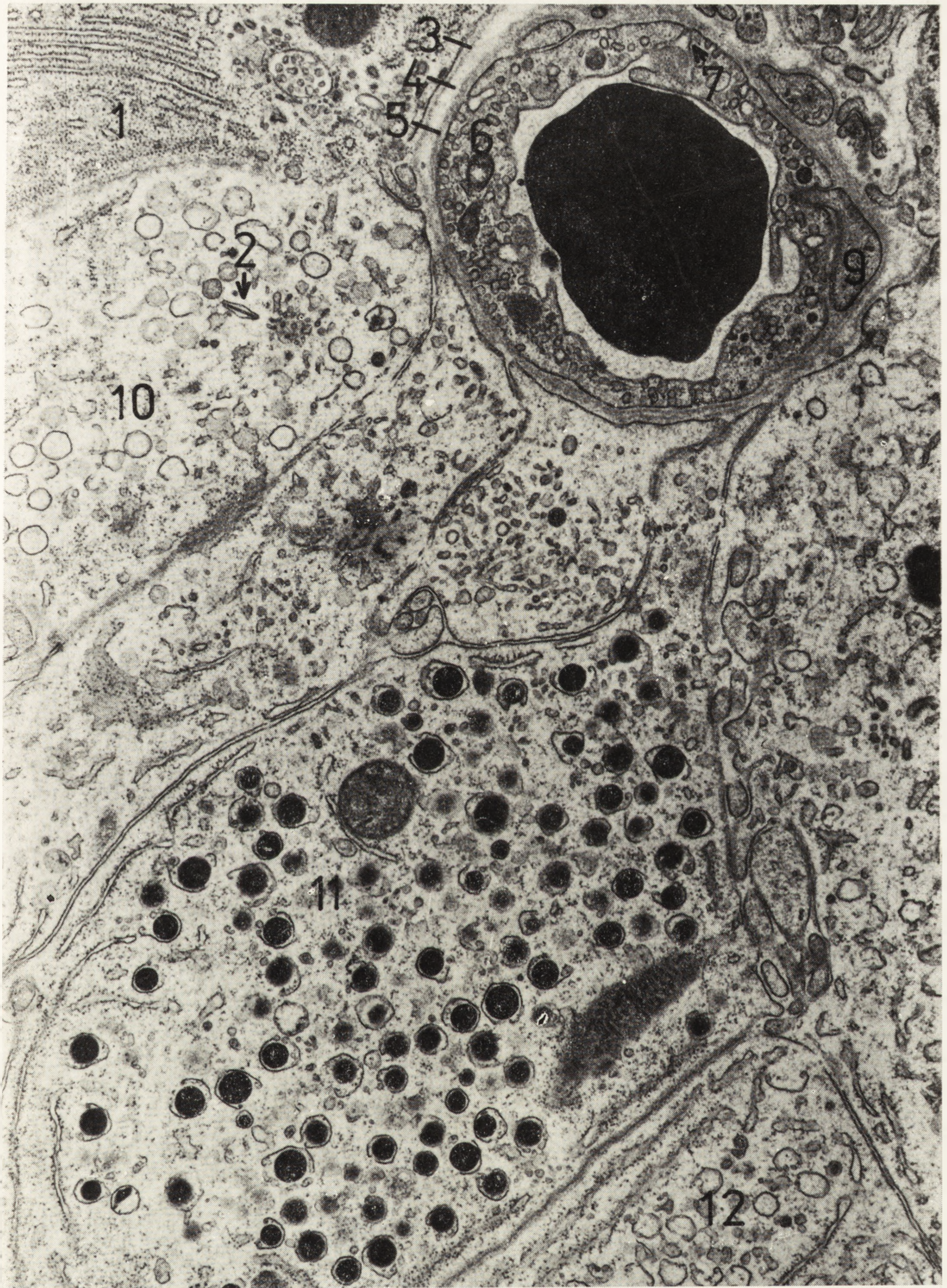
Rys. 9. Kapilara z tkanki śródmiąszowej jądra nietoperza z dwoma połączeniami międzykomórkowymi. $\times 20600$.

1 — komórka śródmiąszowa Leydiga, 2 — kula tłuszczu, 3 — wypustki perycytów, 4 — blaszka podstawna parenchymy, 5 — blaszka podstawna śródbłonna, 6 — śródbłonek, 7 — przestrzeń wokółwłośniczkowa, 8 — erytrocyt w świetle kapilary, 9 — połączenie międzykomórkowe, 10 — jądro w kadłubie komórki śródbłonna, 11 — przestrzeń limfatyczna, 12 — śródbłonek kapilary limfatycznej



Rys. 10. Kapilara trzustki nietoperza z pojedynczym połączeniem międzykomórkowym. $\times 18900$.

1 — komórka pęcherzykowa, 2 — kanalik wewnątrzśródbłonkowy zamknięty dwoma przegrodami, 3 — grupa pęcherzyków plazmolemalnych, 4 — komórka wysepkowa alfa, 5 — światło kapilary, 6 — blaszka podstawna parenchymy, 7 — przestrzeń wokółwłośniczkowa, 8 — blaszka podstawna śródbłonka, 9 — jądro w kadłubie komórki śródbłonka, 10 — połączenie międzykomórkowe, 11 — komórka wysepkowa beta, 12 — włókna nerwowe



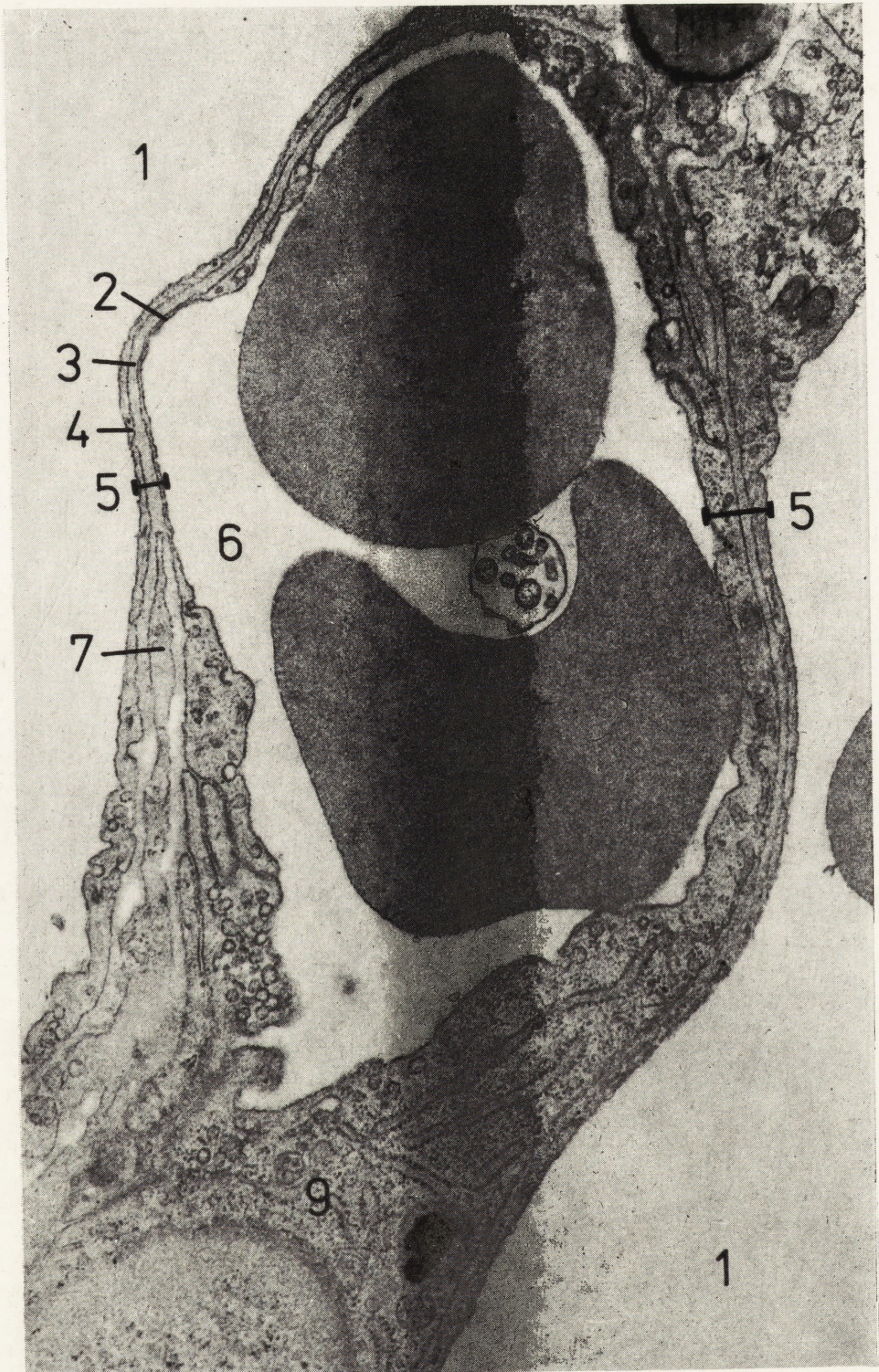
Rys. 11. Kapilara trzustki wysepkowej nietoperza bez widocznych połączeń międzykomórkowych. $\times 12480$.

1 — komórka pęcherzykowa trzustki, 2 — ziarno wydzieliny z pręcikowatą częścią rdzenną, 3 — blaszka podstawna parenchymy, 4 — przestrzeń wokółwłośniczkowa, 5 — blaszka podstawna śródbłonna, 6 — śródbłonek, 7 — okienko przegrodowe śródbłonna, 8 — erytrocyt, 9 — wypustka pericytu, 10 — komórka wysepkowa alfa, 11 — komórka wysepkowa beta, 12 — komórka wysepkowa C

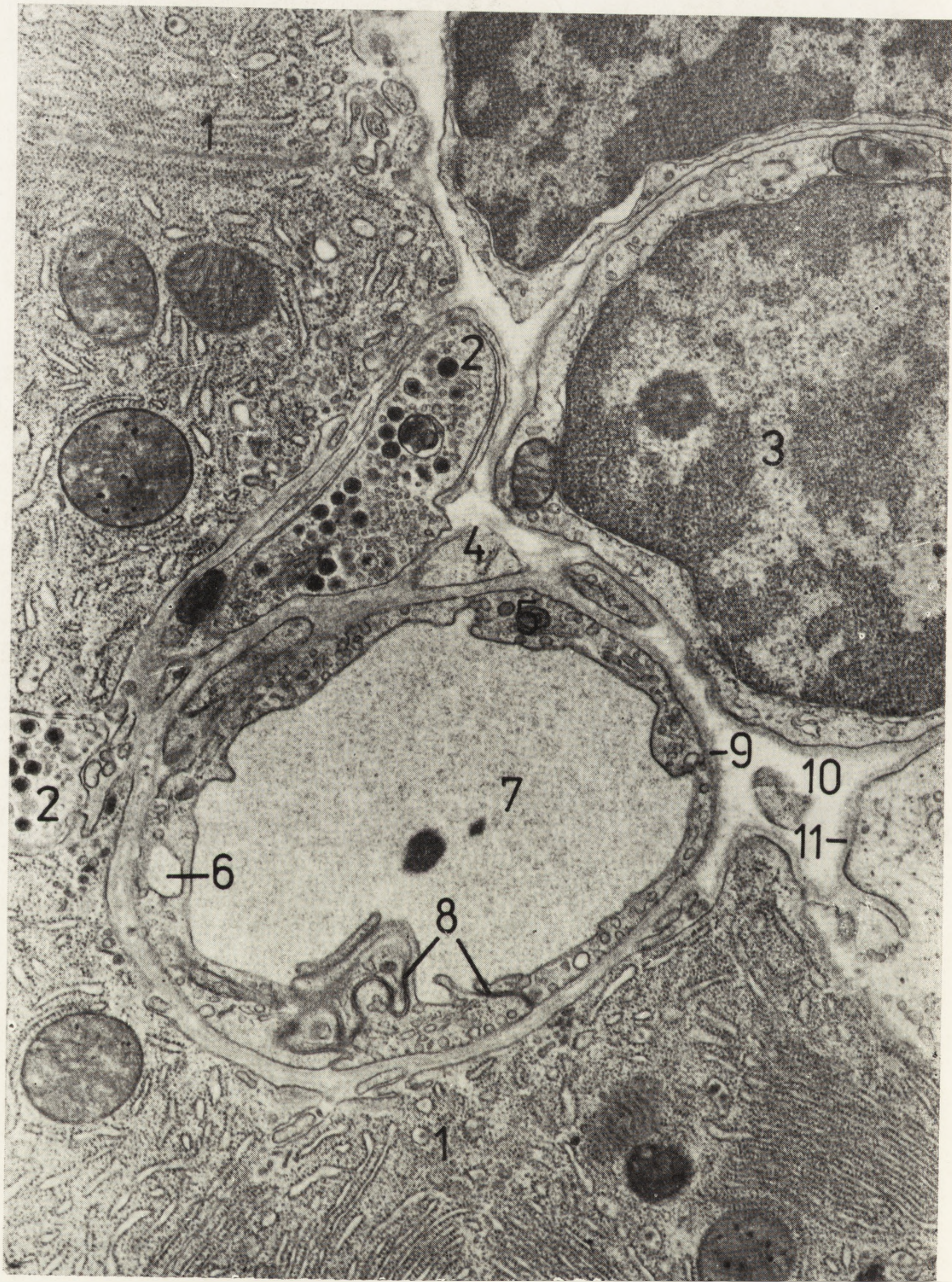


Rys. 12. Fragment kłębka nerkowego nietoperza. $\times 18750$.

1 — światło kapilary, 2 — erytrocyt, 3 — przestrzeń podtorebkowa (moczowa), 4 — duże wypustki podocytów, 5 — pory szczelne między końcowymi wypustkami podocytów, 6 — końcowe wypustki podocytów, 7 — blaszka podstawna



Rys. 13. Fragment przegrody międzypęcherzykowej w płucu myszy. $\times 25000$.
 1 — światło pęcherzyka płucnego, 2 — śródbłonek, 3 — blaszka podstawna, 4 — wypustka pneumocytu błoniastego, 5 — bariera powietrze-krew, 6 — światło kapilary, 7 — wypustka perycytu, 8 — erytrocyt, 9 — kadłub komórki śródbłonka



Rys. 14. Kapilara trzustki zewnątrzwydzielniczej nietoperza. $\times 18200$.

1 — komórka pęcherzykowa trzustki, 2 — zakończenie adrenergicznego włókna nerwowego, 3 — jądro perycytu, 4 — wypustki perycytów, 5 — śródbłonek, 6 — wakuola, 7 — światło kapilary, 8 — połączenia międzykomórkowe, 9 — blaszka podstawna śródbłonna, 10 — przestrzeń wokółwłośniczkowa, 11 — blaszka podstawna parenchymy

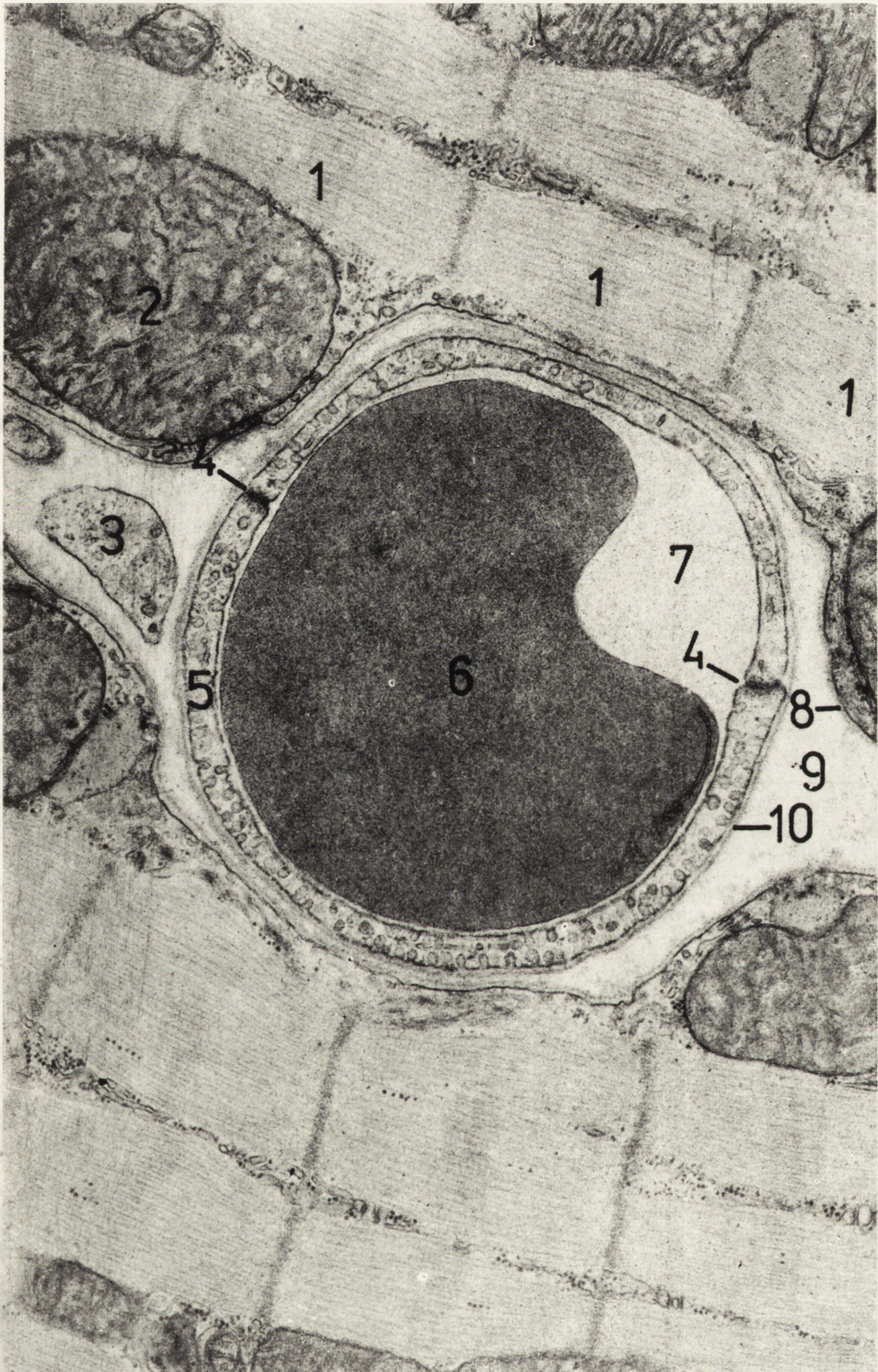


Rys. 15. Fragment bariery krew-przestrzeń Dissego w wątrobie nietoperza.
 × 25000.

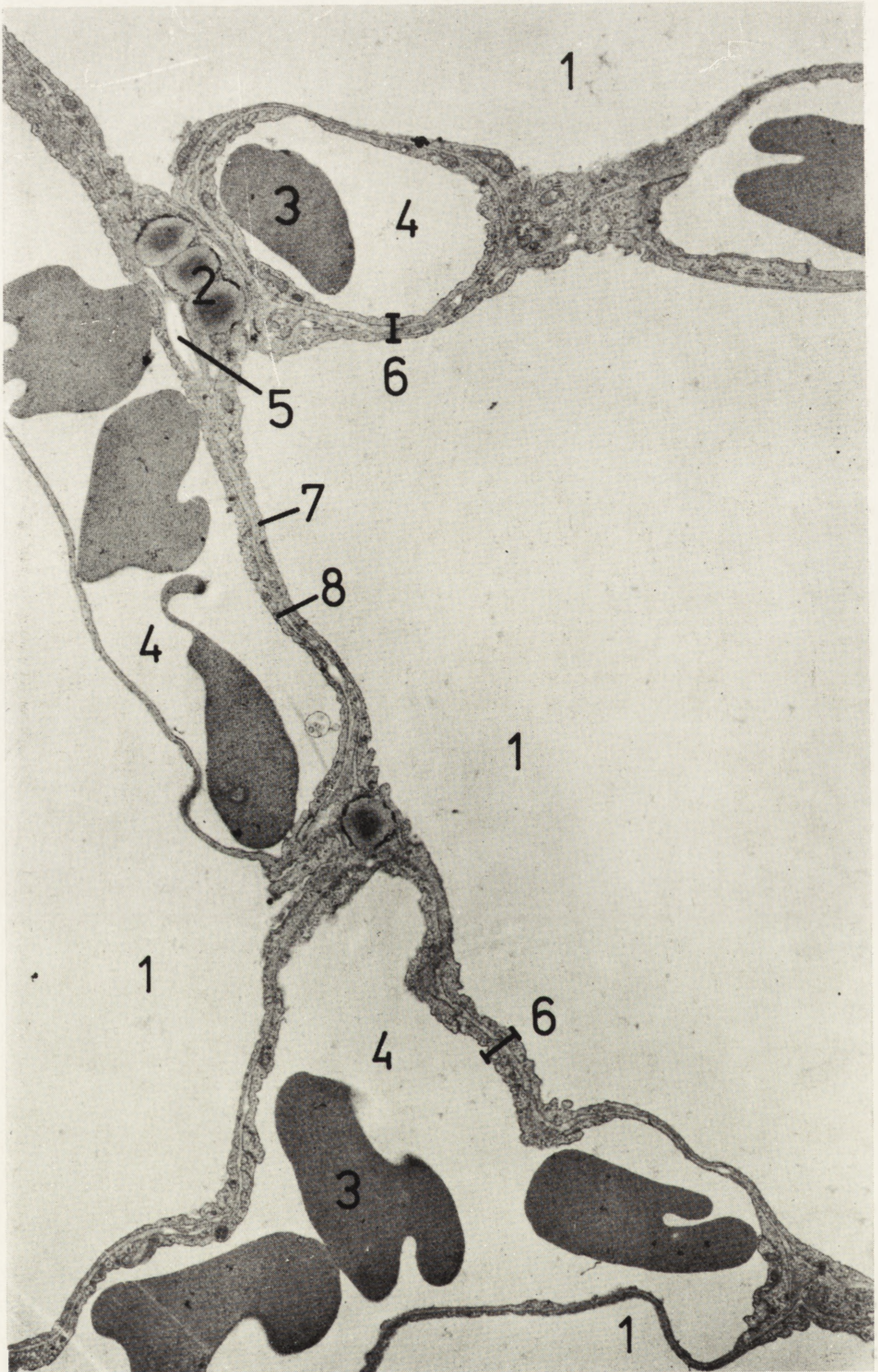
1 — śródbłonek, 2 — mikrokosmki hepatocytów, 3 — hepatocyt, 4 — połączenie między komórkami śródbłonka, 5 — okienko w śródbłonku, 6 — erytrocyt, 7 — światło kapilary zatokowej, 8 — przestrzeń Dissego, 9 — fragment lipocytu



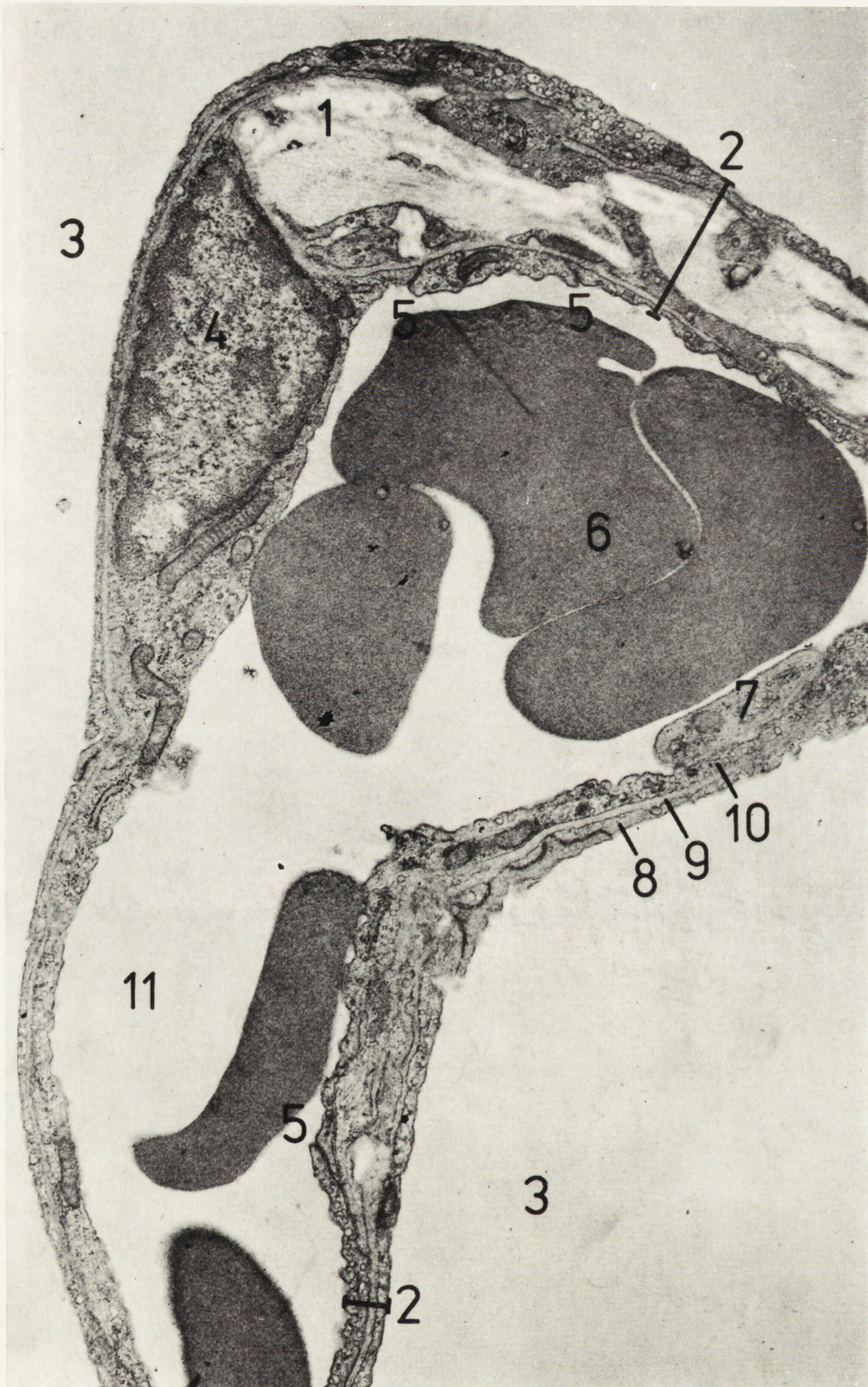
Rys. 16. Kapilara tkanki śródmiąższowej jądra nietoperza. $\times 21780$.
1 — kadłub perycytu z jądrem, mitochondriami i innymi organellami, 2 — połączenie międzykomórkowe, 3 — wypustka perycytu otaczająca komórki śródbłonki, 4 — światło kapilary, 5 — śródbłonek, 6 — błaszka podstawna śródbłonki



Rys. 17. Kapilara w mięśniu pierścieniowo - tarczowym nietoperza. $\times 25000$.
 1 — kolejne sarkomery włókna mięśniowego, 2 — mitochondrion, 3 — wypustka perycytu,
 4 — połączenie międzykomórkowe, 5 — śródbłonek 6 — erytrocyt, 7 — światło kapilary, 8 —
 błazka podstawna włókna mięśniowego, 9 — przestrzeń wokółwłośniczkowa, 10 — błazka
 podstawna śródbłonka

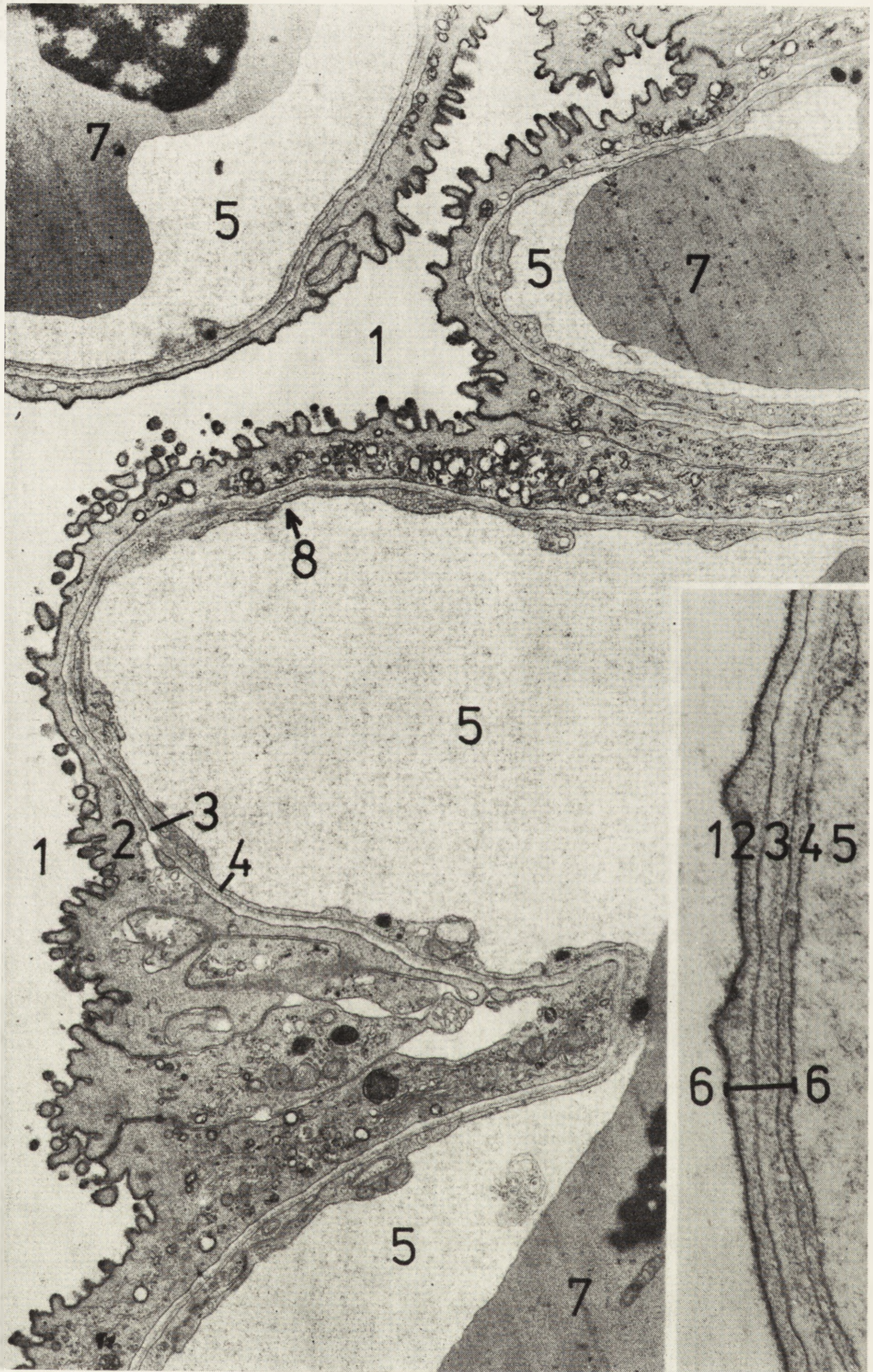


Rys. 18. Fragment kilku pęcherzyków płucnych myszy. $\times 5500$.
 1 — światło pęcherzyka płucnego, 2 — kule tłuszczu, 3 — erytrocyt, 4 — światło kapilary,
 5 — przestrzeń interstycjalna z włóknami tkanki łącznej, 6 — bariera powietrze-krew,
 7 — płaska wypustka pneumocytu błoniastego, 8 — śródbłonek



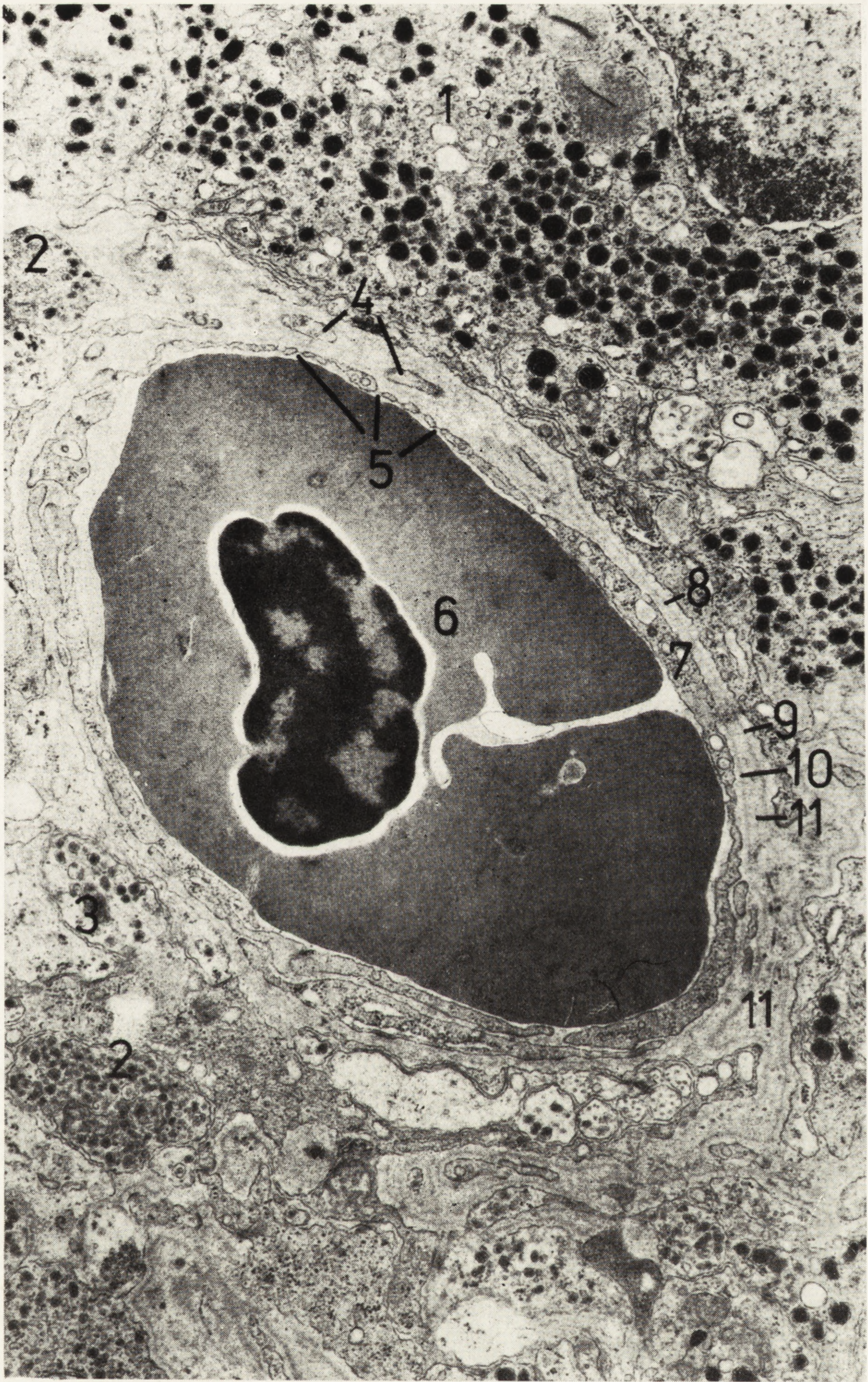
Rys. 19. Fragment przegrody międzypęcherzykowej w płucu myszy. $\times 10500$.

1 — łącznotkankowa przestrzeń interstycjalna z włóknami kolagenowymi i wypustkami fibroblastów, 2 — bariera powietrze-krew, 3 — światło pęcherzyka płucnego, 4 — jądro komórki śródbłonka, 5 — połączenie międzykomórkowe, 6 — erytrocyty, 7 — trombocyt, 8 — wypustka pneumocytu błoniastego, 9 — blaszka podstawna, 10 — śródbłonek, 11 — światło kapilary



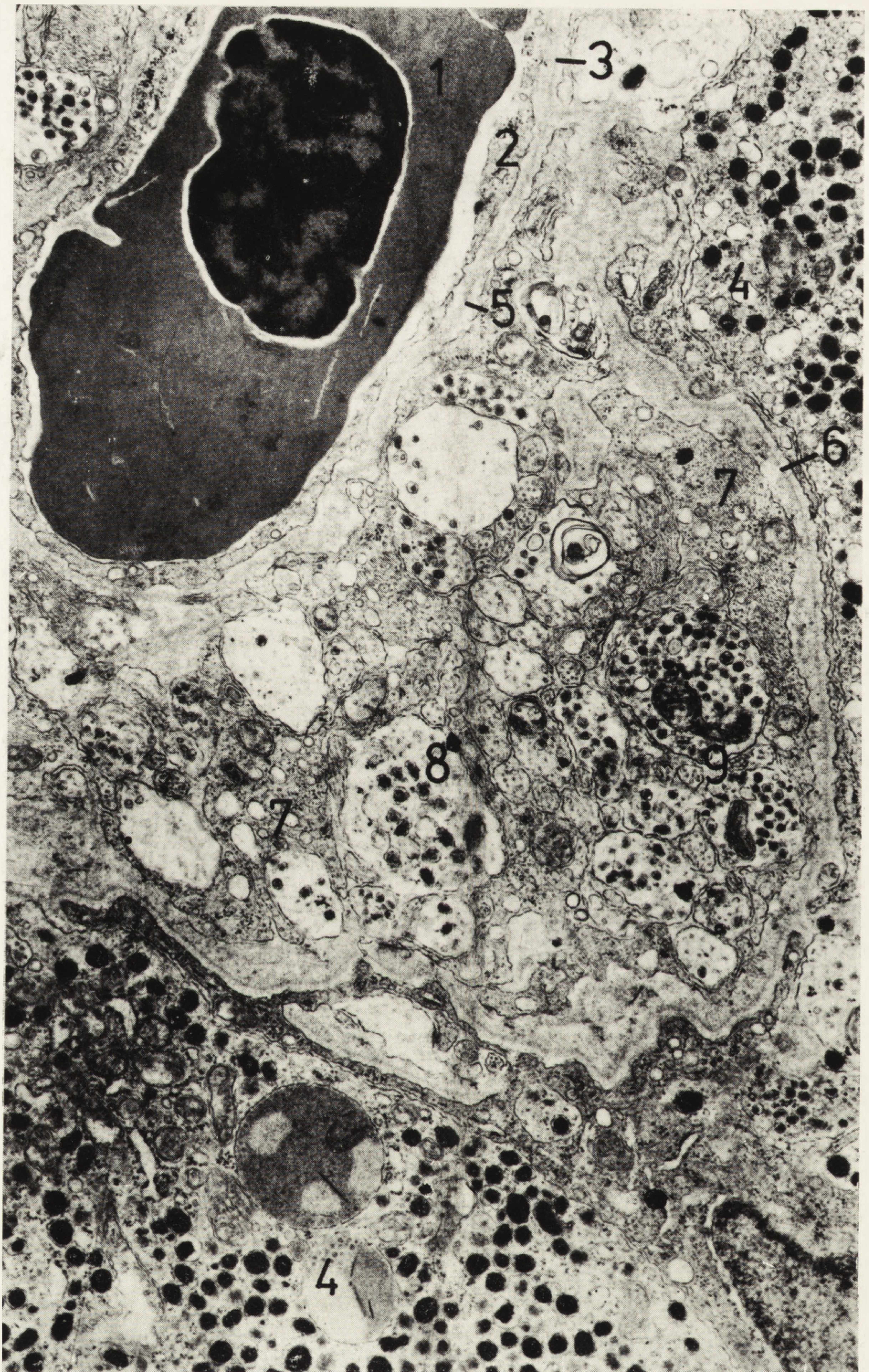
Rys. 20. Naczynia kapilarne w jelicie oddechowym piskorza, *Misgurnus fossilis*.
 × 9370. Wstwka pokazuje fragment bariery powietrze-krew w pow. 38200 (Wg
 A. Jasińskiego — Acta Anat. 86, 1973).

1 — światło jelita, 2 — ścienie wypustki komórek nabłonka jelita, 3 — blaszka pod-
 stawna, 4 — śródbłonek kapilar, 5 — światło kapilar, 6 — bariera powietrze-krew, 7 —
 erytrocyty, 8 — okienko przegrodowe śródbłonna



Rys. 21. Kapilara płała nerwowo - pośredniego przysadki mózgowej piskorza, *Misgurnus fossilis*. $\times 13500$.

1 — komórka części pośredniej przysadki, 2 — zakończenie aminergicznego włókna neurosekrecyjnego zawierające obłonione ziarna wydzieliny i pęcherzyki synaptyczne, 3 — peptydergiczne włókno neurosekrecyjne, 4 — wypustki perycytów, 5 — okienka przegrodkowe śródbłonna, 6 — erytrocyt w pełniający światło kapilary, 7 — śródbłonek, 8 — blaszka podstawna zespolona, 9 — blaszka podstawna parenchymy, 10 — blaszka podstawna śródbłonna, 11 — przestrzeń wokółwłośniczkowa



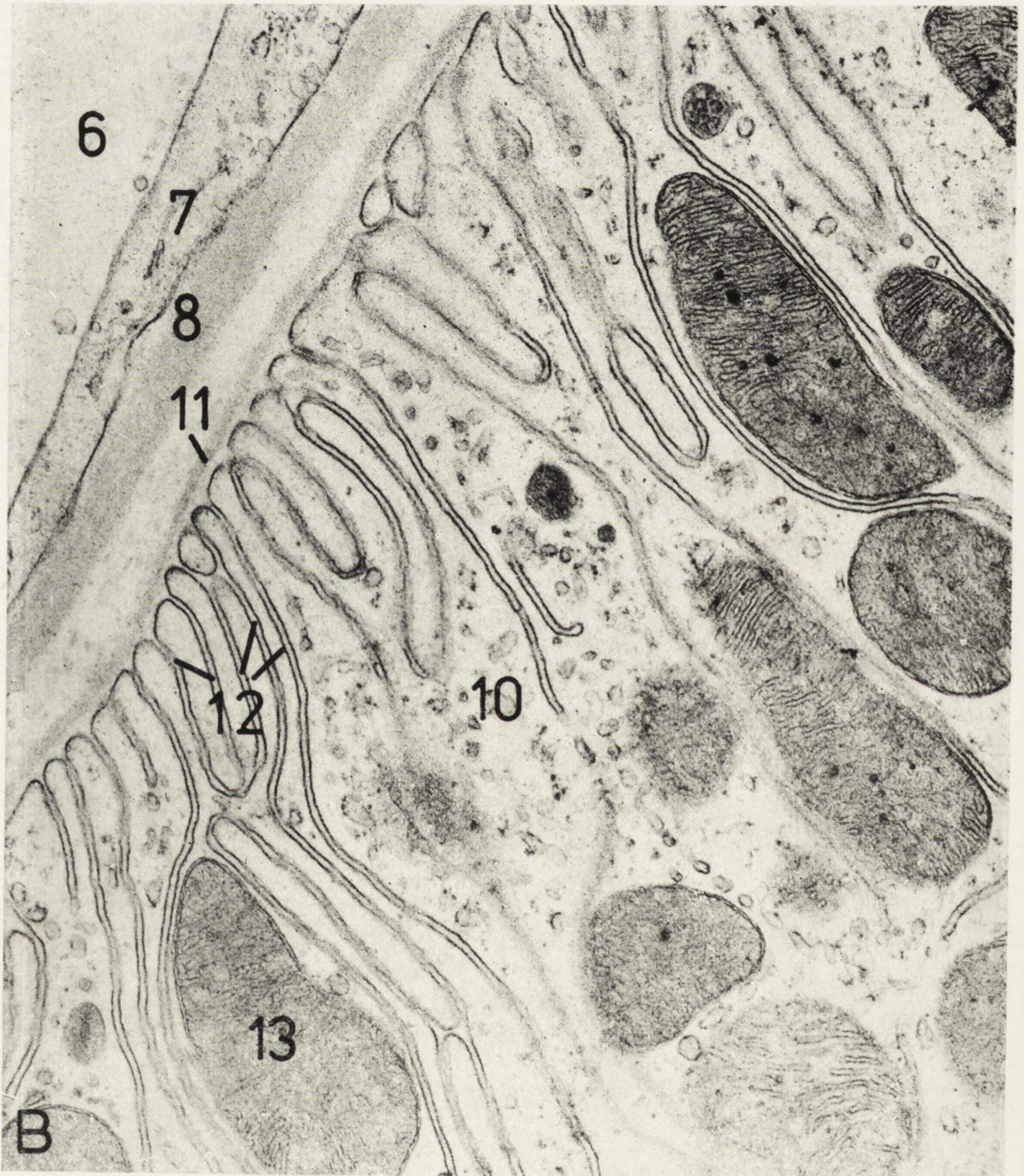
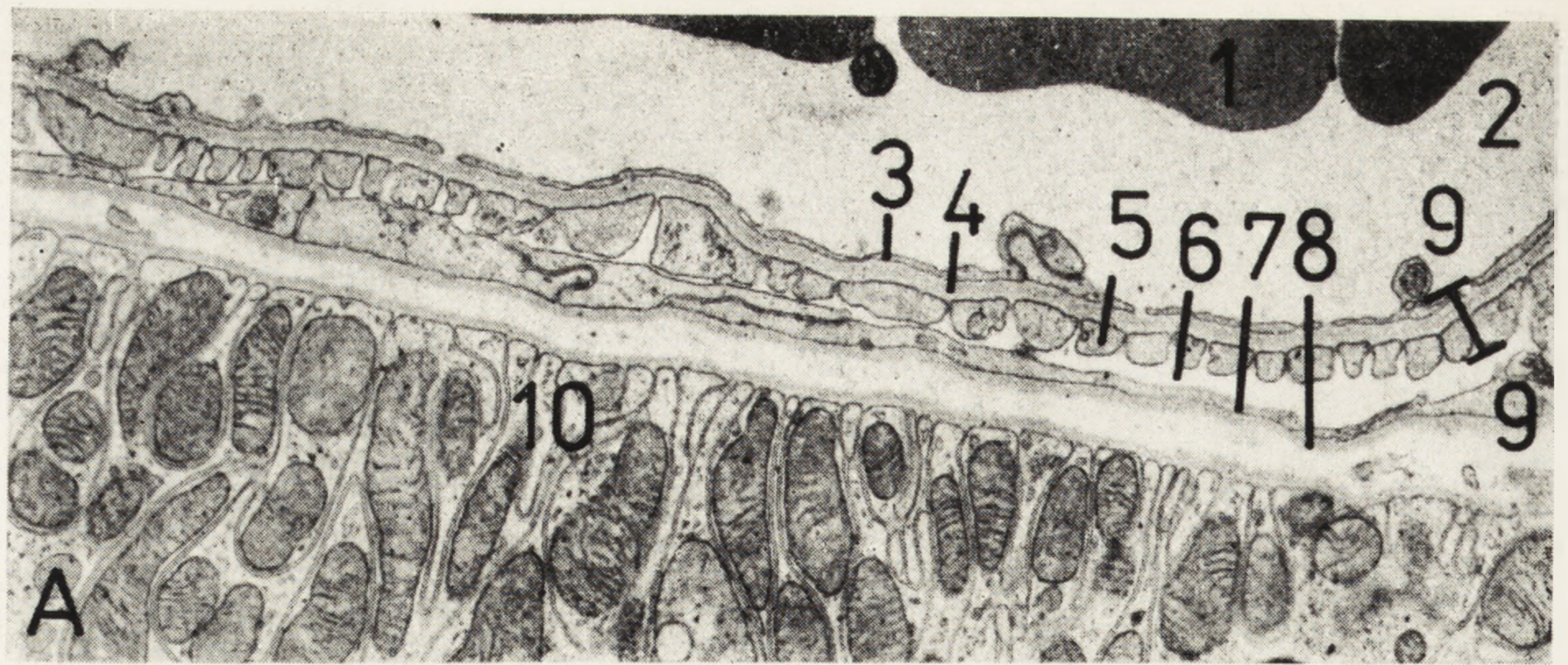
Rys. 22. Przestrzeń wokółwłośniczkowa w płacie nerwowo - pośrednim przysadki mózgowej piskorza, *Misgurnus fossilis*. $\times 13500$.

1 — erytrocyt wypełniający światło kapilary, 2 — śródbłonek, 3 — blaszka podstawna zespolona, 4 — komórka części pośredniej przysadki, 5 — blaszka podstawna śródbłonka, 6 — blaszka podstawna parenchymy, 7 — wypustki pituicytów, 8 — zakończenie peptydergicznego włókna neurosekrecyjnego, 9 — zakończenia aminergiczných włókien neurosekrecyjnych



Rys. 23. Kapilara grzebienia ocznego wróbla, *Passer domesticus*. $\times 9900$ (Wg A. Jasińskiego — Z. Zellforsch. 146, 1973).

1 — mikrokosmki w szczelinie między komórkami barwnikowymi grzebienia, 2 — ziarno pigmentu, 3 — mitochondria, 4 — jądro komórki śródbłonka, 5 — mikrofałdy wewnętrzne, 6 — mikrofałdy zewnętrzne, 7 — połączenie komórek, 8 — część ścianiała komórki śródbłonka, 9 — światło kapilary, 10 — erytrocyt, 11 — kadłub komórki śródściennej, 12 — blaszka podstawna śródbłonka



Ryc. 24. Składniki ściany ciała nerkowego (A) oraz część podstawowa komórki kanalika krętego I rzędu (B). Nietoperz. A — $\times 12500$, B — $\times 31250$.

1 — eryocyty, 2 — światło kapilary, 3 — śródbłonek kapilary kłębkowa, 4 — blaszka podstawna, 5 — wypustki nabłonka trzewnego, (podocyty), 6 — przestrzeń podtorebkowa (moczowa), 7 — nabłonek ścienny, 8 — blaszka podstawna nabłonka ściennego, 9 — błona filtracyjna, 10 — część podstawowa komórek kanalika krętego I rzędu, 11 — blaszka podstawna kanalika krętego I rzędu, 12 — sfaldowania błony komórkowej, 13 — mitochondria



Rys. 25. Kapilara trzewna kłębka nerkowego myszy. $\times 20900$.

1 — blaszka podstawna nabłonka ściennego, 2 — nabłonek ścienny torebki kłębka, 3 — przestrzeń podtorebkowa, 4 — kadłub podocyty, 5 — ściana część śródbłonka z okienkami bezprzegrodowymi, 6 — blaszka podstawna, 7 — wypustki podocytów wspierające blaszkę podstawną, 8 — światło kapilary, 9 — jądro komórki śródbłonka



Rys. 26. Kapilara trzewna kłębka nerkowego nietoperza. $\times 15000$.

1 — przestrzeń podtorebkowa (moczowa) ciała nerkowego, 2 — wypustki podocytów, 3 — błazka podstawna, 4 — śródbłonek, 5 — światło kapilary, 6 — erytrocyt, 7 — okienka bezprzegrodowe śródbłonka, 8 — duża wypustka podocytu, 9 — wypustki mezangiocytów

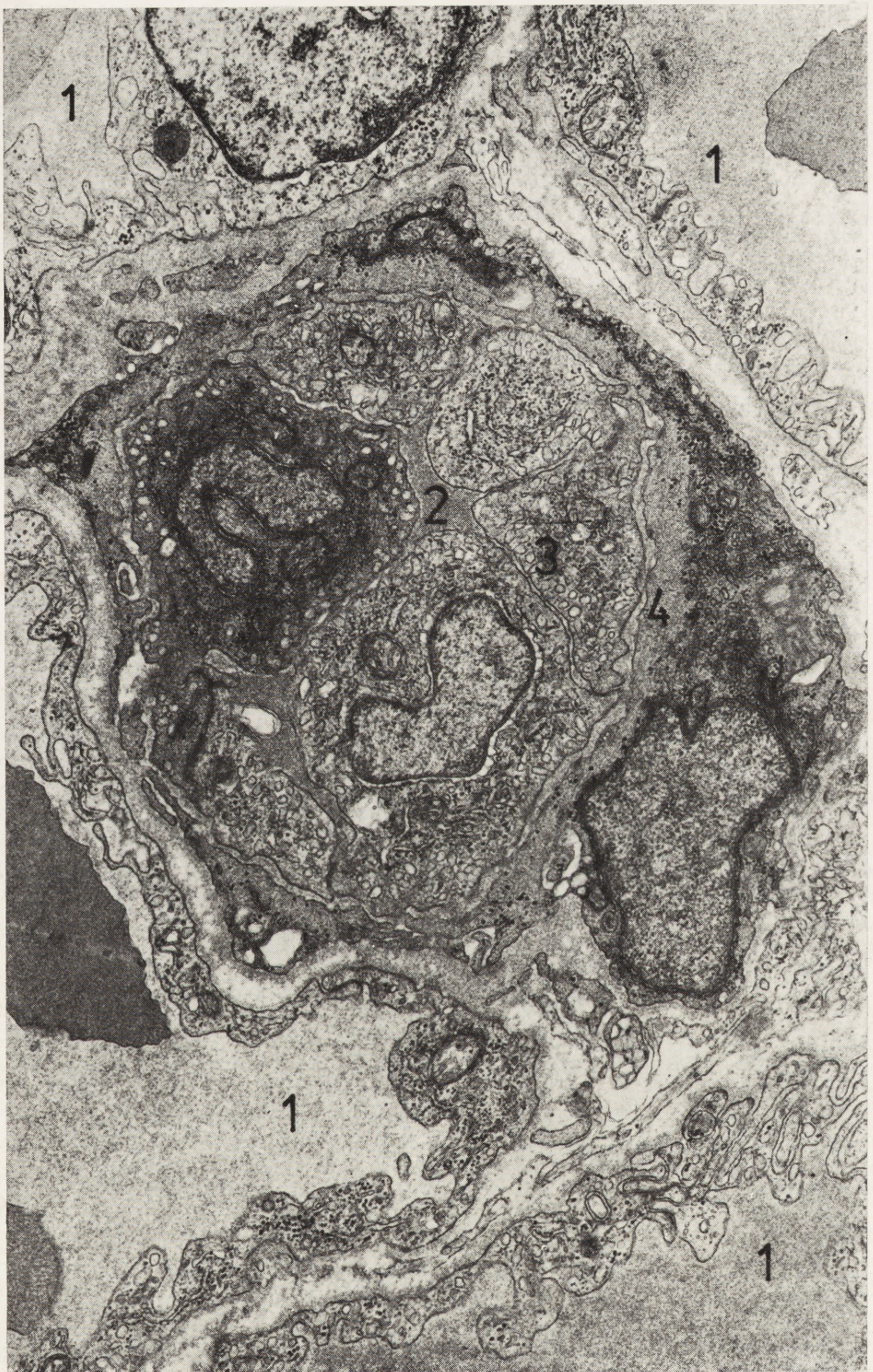


Rys. 27. Przekrój styczny przez ścianę kapilary trzewnej kłębka nerkowego myszy. $\times 27100$.

1 — wypustki podocytów, 2 — lamina rara externa, 3 — lamina densa, 4 — lamina rara interna, 5 — przestrzeń podtorebkowa, 6 — przekrój styczny przez bezprzegrodowe okienka śródbłonka, 7 — przekrój poprzeczny bezprzegrodowych okienek śródbłonka, 8 — duża wypustka podocytu; w cytoplazmie widoczne są m. in. aparaty Golgiego, mitochondria oraz cysterny szorstkiej siateczki śródplazmatycznej, 9 — przekrój skośny przez błonę filtracyjną, 10 — przekrój poprzeczny przez błonę filtracyjną, 11 — pory szczelinowe między wypustkami podocytów



Rys. 28. Przekrój poprzeczny przez kapilarę zatokową wątroby nietoperza. $\times 26200$.
 1 — hepatocyty, 2 — przestrzeń Dissego, 3 — mikrokosmki hepatocytów, 4 — śródbłonek, 5 — okienka śródbłonka, 6 — światło kapilary, 7 — kadłub komórki śródbłonka, 8 — tłuszcz



Rys. 29. Fragment tętniczo - żylny sieci dziwnej w pęcherzu pławnym szczupaka, *Esox lucius*. $\times 16200$.
1 — światło kapilary żylny, 2 — światło tętniczki, 3 — śródbłonek, 4 — włókno mięśniowe gładkie

śródbłonka, toteż jedne i drugie należą do układu siateczkowo - śródbłonkowego [575].

Brzegi komórek tworzących ściany zatok wątroby mają zarys falisty. Na poprzecznych przekrojach tych naczyń można zaobserwować, że nakładają się na siebie, stykają, względnie tworzą szczeliny, których szerokość może dochodzić do 0,4 μm , zależnie od gatunku zwierzęcia, stanu czynnościowego narządu lub zastosowanej metody utrwalania tkanek. W miejscach bezpośredniego kontaktu komórek brak jest struktur spinających, toteż połączenia są otwarte. Rezultaty badań submikroskopowej organizacji połączeń międzykomórkowych śródbłonka wykazały, że lokalne połączenia zwarte występują również w zatokach wątroby. Ich obecność wykazano zarówno w zatokach wątroby zarodków [475, 772], jak również u ssaków dorosłych [109, 231, 246, 378]. Na podstawie obserwacji preparatów przygotowanych techniką freeze - etching, Yee i Revel [772] wyrazili przypuszczenie, iż połączenia występujące w zatokach wątroby zarodków szczurów reprezentują nowy typ połączeń, względnie poronną postać połączeń zwartych.

Początkowo sądzono, że komórki śródbłonka zatok wątroby tworzą syncycjum, ponieważ próby wysrebrzenia granic komórek nie udawały się. Dopiero mikroskop elektronowy wykazał komórkową budowę śródbłonka zatok [595].

Wielu autorów zwracało uwagę na występowanie w przestrzeni okołozatokowej (Dissego) izolowanych pęczków substancji przypominającej „tworzywo” blaszki podstawnej. W przestrzeni tej mogą również występować włókna siateczki oraz komórki magazynujące tłuszcz, zwane lipocytami lub komórkami Ito. Prawdopodobnie są one słabo zróżnicowanymi komórkami mezenchymy, które w określonych warunkach mogą się przekształcać w komórki tłuszczowe lub w erytroblasty, a w warunkach patogennych w fibroblasty.

Utrwalony w piśmiennictwie obraz ultrastruktury kapilar zatokowych wątroby powstał głównie na podstawie badań drobnych gryzoni laboratoryjnych. Badania zatok wątroby przeżuwaczy wykazały, że w wątrobie owcy występują kapilary typu trzewnego [255], natomiast zatoki wątroby cieląt i kozy domowej są otoczone przez ciągłą blaszkę podstawną [766]. W obu przypadkach istnieje zatem strukturalna bariera krew-przestrzeń okołozatokowa (Dissego), z pewnością wywierająca wpływ na wymianę substancji między osoczem krwi i płynem międzykomórkowym wątroby.

5.5. KAPILARY TĘTNICZE I ŻYLNIE

W niektórych tkankach i narządach początkowe i końcowe odcinki sieci kapilar mają różną budowę i noszą nazwy kapilar tętniczych i żylnych.

nych. Występują m. in. w skórze i tkance łącznej jąder [575], a w postaci szczególnie typowej w tętniczo - żylnych sieciach dziwnych pęcherza pławnego ryb (rys. 2 i 29) [172, 192, 211, 214, 327, 618, 757], mięśniach tułowia i ogona nielicznych ryb kostnoszkieletowych (*Thunnus thynnus*, *T. albacares*, *Katsuwonus pelamis*) i spodoustych (*Isurus oxyrinchus*, *Lamna nasus*, *Carcharodon carcharias*) [84, 366, 602], w naczyniówce oczu ryb, zwłaszcza głębinowych [2, 15, 211, 758] oraz w części rdzeniowej nerek [420].

Śródbłonek kapilar żylnych jest miejscami silnie ścięta, przy czym średnica światła naczyń przewyższa mniej więcej dwudziestokrotnie grubość ich ścian. W obszarach tych występują okienka zamknięte cienkimi przegrodami. Natomiast kapilary tętnicze mają śródbłonek znacznie grubszy i ciągły, w którego komórkach występują liczne pęcherzyki plazmolemalne [573]. Pierwsze z tych naczyń można zaliczyć do typu trzewnego, drugie zaś przypominają najbardziej typ mięśniowy kapilar. Obecność kapilar tętniczych i żylnych na przeciwnych końcach sieci kapilarnych może mieć związek z regionalnymi różnicami w przepuszczalności kapilar. W sieciach kapilarnych stwierdzono bowiem obecność gradientu przepuszczalności, który poczynając od najmniejszych tętniczek, rośnie wzdłuż kapilar, osiągając najwyższe wartości na granicy kapilar i żyłek, po czym spada stopniowo wzdłuż żył.

Sieci dziwne tworzą przeciwprądowe generatory (gazów), względnie przeciwprądowe wymienniki (ciepła), których zasady strukturalno - czynnościowe sformułował Schollander [618, 619].

Przeciwprądowe generatory są zbudowane z naczyń kapilarnych o średnicy około 0,01 mm i układzie pętlowatym. Obie grupy naczyń mają prosty przebieg i są dokładnie przemieszane. Każda z kapilar żylnych lub tętniczych sąsiaduje z 2, 4 lub 6 naczyniami prowadzącymi krew w kierunku przeciwnym. Przeciwprądowe generatory gazów działają przeciw gradientowi stężenia i wymagają nakładów energii. Występują w pęcherzu pławnym i naczyniówce oczu ryb. W warunkach środowiska wodnego, w którym ciśnienie parcjalne gazów nie przewyższa 1 atm., wprowadzają do pęcherza pławnego gaz pod ciśnieniem równoważącym ciśnienie hydrostatyczne, które u gatunków głębinowych może osiągać setki atmosfer [311, 443]. Przeciwprądowy i pętlowaty układ naczyń stwarzają pułapkę dla narastającego ciśnienia gazów. Wysokie ciśnienie parcjalne tlenu stwierdzono także w oczach ryb, którego wartość wiąże się ze stopniem rozwoju sieci dziwnej [758]. Dzięki klasycznym pracom Kuhna i wsp. [386], Steena [664], Schollandera i Van Dama [621], Kuhna i Marti [384], mechanizm działania przeciwprądowego generatora gazów w pęcherzu pławnym ryb nie kryje obecnie większych tajemnic [311].

Zasadę działania przeciwprądowych wymienników ciepła sformułował Claude Bernard w 1876 r. zwracając uwagę, iż krew tętnicza napływająca do kończyn przekazuje zapewne część ciepła chłodniejszej krwi żyłnej, płynącej w sąsiedztwie tętnicy. Przypuszczenie to potwierdzono empirycznie [20]. Przeciwprądowe wymienniki ciepła mogą być zbudowane z naczyń tętniczych i żylnych o średnicy około 1 mm. Struktura pętlowata nie jest w tym przypadku konieczna, jedynym zaś warunkiem niezbędnym dla funkcjonowania układu jest zachowanie zasady przeciwprądów, a zatem bliskie sąsiedztwo naczyń tętniczych i żylnych. Wymienniki ciepła działają zgodnie z gradientem temperatury i nie wymagają nakładów energii: strumienie krwi tętniczej oddają ciepło chłodniejszej krwi żyłnej powracającej z dystalnych odcinków kończyn, z naczyń skórnych tułowia lub innych narządów. Przeciwprądowe wymienniki ciepła występują w częściach proksymalnych kończyn ptaków brodzących, niektórych ssaków arktycznych i tropikalnych oraz w kończynach płetwonogich i waleni. Przez wymienniki ciepła dociera również krew do skóry waleni i syren oraz do jąder i mózgu niektórych ssaków. Sieci dziwne występujące w mięśniach tułowia i ogona niektórych ryb również spełniają funkcję przeciwprądowych wymienników ciepła, z tym jednak, że ciepło traci krew żylna, ogrzana ciepłem metabolicznym mięśni, podnosząc w ten sposób temperaturę krwi tętniczej napływającej do mięśni lokomocyjnych [17, 83, 84, 151, 317, 318, 612, 619, 620, 622, 633, 684, 685]. Przeciwprądowe wymienniki ciepła umożliwiają niwelowanie różnicy temperatur między powierzchnią ciała i środowiskiem zewnętrznym, zapobiegając nadmiernej utracie ciepła przez organizm zwierząt, ochładzanie krwi tętniczej płynącej do mózgu u ssaków tolerujących okresowo hipertermię, względnie utrzymywanie odpowiedniej temperatury jąder, optymalnej dla prawidłowego przebiegu spermatogenezy itd.

Z uwagi na znaczną średnicę naczyń oraz odpowiednio dużą grubość ich ścian, przeciwprądowe wymienniki ciepła nie są efektywnymi wymiennikami tlenu. W przeciwnym bowiem razie tkanki zaopatrywane w krew przepływającą uprzednio przez wymienniki ciepła byłyby pozbawione dopływu tlenu. Jak wynika z obliczeń przeprowadzonych przez Schmidt - Nielsena, przy 99% wydajności wymiennika ciepła, zaledwie 2% tlenu przenika na terenie sieci dziwnej z krwi tętniczej do żyłnej, toteż cała reszta tlenu (98%) dociera do naczyń narządów obwodowych.

U niektórych kręgowców występują również przeciwprądowe wymienniki gazów. Ich wymiana nie zachodzi jednak między dwoma strumieniami krwi, lecz między krwią i wodą, jak w skrzelach ryb, względnie między krwią i powietrzem, jak w płucach ptaków.

LITERATURA

- [1] ABELSDORFF G., WESSELY K., Vergleichendphysiologische Untersuchungen über den Flüssigkeitswechsel des Auges in der Wirbeltierreihe, I. Vögel, *Augenheilk.*, **64**: 65, 1909.
- [2] ALBERS J. A. A., Über das Auge des Kabeljau *Gadus morrhua*, und die Schwimmblase der Seeschwalb, *Trigla hirude*, *Götting gelehrte Anz.*, **2**: 681, 1806.
- [3] ALEXANDER I. G. S., RITCHIE B. C., MALONEY J. E., Scanning electron microscopy of pulmonary alveolar capillary vessels, *Thorax*, **28**: 222, 1973.
- [4] ANDERSON E., The anatomy of bovine and ovine pineals. Light and electron microscopic studies, *J. Ultrastr. Res., Suppl.*, **8**: 1, 1965.
- [5] ANDRES G. A., MORGAN C., HSU K. C., RIFKIND R. A., SEEGAL K. C., Electron microscopic studies of experimental nephritis with ferritin - conjugated antibody. The basement membranes and cisternae of visceral epithelial cells in nephritic rat glomeruli, *J. Exptl. Med.*, **115**: 929, 1962.
- [6] ANVERSA P., GIACOMELLI F., WIENER J., Regional variation in capillary permeability of ventricular myocardium, *Microvasc. Res.*, **6**: 273, 1973.
- [7] ARTURSON G., Effect of colloids on transcapillary exchange, [w] *Hemodilution*, red. Messmer K., Schmid - Schönbein H., Karger, Basel, 84, 1972.
- [8] ASHWORTH C. T., ERDMANN R. R., ARNOLD R. S., Age changes in the renal basement membranes in rats, *Am. J. Pathol.*, **36**: 165, 1960.
- [9] BÄR Th., Über die Morphogenese der kapillären Basalmembran während der Gefässentwicklung im Cerebralcortex der Ratte, *Inaugural Dissertation*, med. Fak. Freie Univ., Berlin, 1971.
- [10] BÄR Th., WOLFF, J. R., The formation of capillary basement membranes during internal vascularization of the rat's cerebral cortex, *Z. Zellforsch.*, **133**: 231, 1972.
- [11] BARADI A. F., BRANDIS D. J., Observations on the morphology of pancreatic secretory capillaries, *Z. Zellforsch.*, **101**: 568, 1969.
- [12] BARER R., The ultrastructure of small blood vessels of the posterior pituitary gland in relation to neurosecretion, *Bibl. Anat.*, **7**: 304, 1965.
- [13] BARGMANN W., KNOOP A., Vergleichende elektronenmikroskopische Untersuchungen der Lungenkapillaren, *Z. Zellforsch.*, **44**: 263, 1956.
- [14] — Elektronmikroskopische Beobachtungen an der Neurohypophyse, *Z. Zellforsch.*, **46**: 242, 1957.
- [15] BARNETT C. H., The structure and function of the choroidal gland of teleostean fish, *J. Anat.*, **85**: 113, 1951.
- [16] BARNETT R. J., Circulatory system, [w] *Histology*, red. Greep R. O., McGraw - Hill, New York, 1966.
- [17] BARNETT, C. H., HARRISON R. J., TOMLISON J. D. W., Variations of the venous system of mammals, *Biol. Rev.*, **33**: 442, 1958.
- [18] BARTLETT D. Jr., REMMERS J. E., Effects of high altitude exposure on the lungs of young rats, *Resp. Physiol.*, **13**: 116, 1971.
- [19] BASSINGTHWAIGHTE J. B., Blood flow and diffusion through mammalian organs, *Science*, **167**: 1347, 1970.
- [20] BAZETT H. C., LOVE L., NEWTON M., EISENBERG L., DAY R., FORSTER R., Temperature changes in blood flowing in arteries and veins in man, *J. Appl. Physiol.*, **1**: 3, 1948.
- [21] BEARMAN R. M., BENSCH K. G., LEVINE G. D., The normal human thymic vasculature: An ultrastructural study, *Anat. Rec.*, **183**: 485, 1975.

- [22] BEAUCHEMIN M. L., ANTILLE G., LEUENBERGER P. M., Capillary basement membrane thickness: a comparison of two morphometric methods for its estimation, *Microvasc. Res.*, **10**: 76, 1975.
- [23] BECKER C. G., MURPHY G. E., Demonstration of contractile protein in endothelium and cells of the heart valves, endocardium, intima, arteriosclerotic plaques, and Aschoff bodies of rheumatic heart disease, *Am. J. Pathol.*, **55**: 1, 1969.
- [24] BECKER N. A., NOVIKOFF A. B., ZIMMERMAN H. M., Fine structural observations of the uptake of intravenously injected peroxidase by the rat choroid plexus, *J. Histochem. Cytochem.*, **15**: 160, 1967.
- [25] BELENKII M. A., CZETWIERUCHIN W. K., Ultrastruktura kapillarow naruznoj zony sredinnowo wozwyszenija ljaguszki *Rana temporaria* w processie metamorfoza, *Dokl. Ak. Nauk SSSR*, **209**: 1232, 1973.
- [26] BELLHORN R. W., BELLHORN M. S., The avian pecten. I. Fluorescein permeability, *Ophthalm. Res.*, **7**: 1, 1975.
- [27] BENCOSME S. A., BERGMAN B. J., The ultrastructure of human and experimental glomerular lesions, *Int. Rev. Exp. Pathol.*, red. Richter G. W., Epstein M. A., **1**: 139, 1962.
- [28] BENNETT H. S., The concept of membrane flow and membrane vesiculation as mechanisms for active transport and ion pumping, *J. Biophys. Biochem. Cytol., Suppl.*, **2**: 99, 1956.
- [29] — Morphological aspects of extracellular polysaccharides, *J. Histochem. Cytochem.*, **11**: 2, 1963.
- [30] BENNETT H. S., LUFT J. H., HAMPTON J. C., Morphological classification of vertebrate blood capillaries, *Am. J. Physiol.*, **196**: 381, 1959.
- [31] BENNINGHOFF A., Ueber die Formenreihe der glatten Muskulatur und die Bedeutung der Rougetschen Zellen an der Kapillaren, *Z. Zellforsch.*, **4**: 125, 1926.
- [32] — Blutgefäße und Herz, [w] *Handbuch der mikroskopische Anatomie des Menschen*, red. Möllendorf W. v., Springer, Berlin, 6/1, 1930.
- [33] BENSCH K. G., Electron microscopy in the study of the lung, [w] *The Lung*, red. Liebow A. A., Smith D. E., *Int. Acad. Pathol. Monogr.*, **8**: 323, 1967.
- [34] BENSCH K. G., DOMINGUEZ E., LIEBOW A. A., Absorption of intact protein molecules across the pulmonary air-tissue barrier, *Science*, **157**: 1204, 1967.
- [35] BENSLEY R. R., VIMTRUP B., On the nature of the Rouget cells of capillaries, *Anat. Rec.*, **39**: 37, 1928.
- [36] BERGSTRAND A., Electron microscopic investigations of the renal glomeruli, *Lab. Invest.*, **6**: 191, 1957.
- [37] BERGSTRAND A., BUCHT H., Anatomy of the glomerulus as observed in biopsy material from young and healthy human subjects, *Z. Zellforsch.*, **48**: 51, 1958.
- [38] BERN H. A., TAKASUGI N., The caudal neurosecretory system of fishes, *Gen. comp. Endocr.*, **2**: 96, 1962.
- [39] BERNARD C., An introduction to the study of experimental medicine (Trans. Greene H. C.), Dover, New York, 1957.
- [40] BERNSTEIN M. H., Functional architecture of the retinal epithelium, [w] *The Structure of the Eye*, Academic Press, New York, 139, 1961.

- [41] BERNSTEIN M. H., HOLLENBERG M. J., Fine structure of the chorio-capillaries and retinal capillaries, [w] *Vascular Disorders of the Eye*, C. V. Mosby Co., St. Louis, 44, 1966.
- [42] BERTINI F., SANTOLAYA R. C., Granulos de células endoteliales en aorta de *Bufo arenarum* y su relación con la actividad hipertensora de homogenados de esa arteria, II. Jor. Argent. Zool. Santa Fé, Argentina, Resumen de Comunicaciones, 1969.
- [43] — A novel type of granules observed in toad endothelial cells and their relationship with blood pressure active factors, *Experientia*, **26**: 522, 1970.
- [44] BISCOE T. J., STEHBENS W. E., Ultrastructure of the carotid body, *J. Cell Biol.*, **30**: 563, 1966.
- [45] BLOODWORTH J. M. Jr., ENGERMAN R. L., CAMERINI - DAVALOS R. A., POWERS K. L., Variations in capillary basement membrane width produced by aging and diabetes mellitus, [w] *Early Diabetes*, red. Camerini - Davalos R. A., Powers K. L., Academic Press, New York, 279, 1970.
- [46] BLOOM G. D., Structural and biochemical characteristics of mast cells, [w] *The Inflammatory Process*, red. Zweifach B. W., Grant L., McCluskey R. T., Academic Press, New York, 355, 1965.
- [47] BLOOM W., FAWCETT D. W., *A textbook of Histology*, Saunders, Philadelphia, 1968.
- [48] BLOOM P. M., HARTMAN J. F., VERNIER R. L., An electron microscopic evaluation of the width of normal glomerular basement membrane in man at various ages, *Anat. Rec.*, **133**: 251, 1959.
- [49] BODENHEIMER T. S., BRIGHTMAN M. W., A blood-brain barrier to peroxidase in capillaries surrounded by perivascular spaces, *Am. J. Anat.*, **122**: 249, 1968.
- [50] BOMHARD von K., KÖHL W., SCHINKO I., WETZSTEIN R., Feinbau und Passageverhalten der Capillaren im Subcommissuralorgan der Ratte, *Z. Anat. Entwickl. - Gesch.*, **144**: 101, 1974.
- [51] BONDAREFF W., Distribution of ferritin in the cerebral cortex of the mouse revealed by electron microscopy, *Expl. Neurol.*, **10**: 377, 1964.
- [52] BORUT A., HOROWITZ M., CASTEL M., Blood volume regulation in the spiny mouse: capillary permeability changes due to dehydration [w] *Comparative Physiology of Desert Animals*, red. Maloiy G. M. O., Symp. Zool. Soc. Lond., **31**: 175, 1972.
- [53] BOYD R. D. H., HILL J. R., HUMPHREYS P. W., NORMAND I. C. S., REYNOLDS E. O. R., STRANG L. B., Permeability of the lung capillaries to macromolecules in foetal and newborn lambs and sheep, *J. Physiol.*, **201**: 567, 1969.
- [54] BRANDT P. W., A study of pinocytosis in muscle capillaries, *Anat. Rec.*, **142**: 219, 1962.
- [55] BRANDT P. W., PAPPAS G. D., An electron microscopic study of pinocytosis in ameba — I. The surface attachment phase, *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, **8**: 675, 1960.
- [56] BRIGHTMAN M. W., The distribution within the brain of ferritin injected into cerebrospinal fluid compartments. II. Parenchymal distribution, *Am. J. Anat.*, **117**: 193, 1965.
- [57] — The intracerebral movement of proteins injected into blood and cerebrospinal fluid of mice, [w] *Progress in Brain Res.*, red. Kajtha A., Ford D. H., **29**: 19, 1967.

- [58] — Intracerebral movement of proteins injected into the blood and cerebrospinal fluid, *Anat. Rec.*, **157**: 219, 1967.
- [59] BRIGHTMAN M. W., PALAY S. L., The fine structure of ependyma in the brain of the rat, *J. Cell Biol.*, **19**: 415, 1963.
- [60] BRIGHTMAN M. W., REESE T. S., Junctions between intimately apposed cell membranes in the vertebrate brain, *J. Cell Biol.*, **40**: 648, 1969.
- [61] BRIGHTMAN M. W., REESE T. S., FEDER N., Assessment with the electron microscope of the permeability to peroxidase of cerebral endothelium and epithelium in mice and sharks, [w] *Capillary Permeability*, red. Crone C., Lassen N. A., Academic Press, New York, 483, 1970.
- [62] BRIGHTMAN M. W., HORI M., RAPOPORT S. I., REESE T. S., WESTERGAARD E., Osmotic opening of tight junctions in cerebral endothelium, *J. Comp. Neurol.*, **152**: 317, 1973.
- [63] BROMAN T., The permeability of the cerebrospinal fluid vessels in normal and pathological conditions, Ejnar Munksgaard, Copenhagen, 1/7, 1949.
- [64] BROWN P., Albumin, connective tissue, and the blood-brain barrier, *Bull. Johns Hopkins Hosp.*, **108**: 161, 1961.
- [65] BRUNS R. R., PALADE G. E., Studies on blood capillaries, I. General organization of muscle capillaries, *J. Cell Biol.*, **37**: 224, 1968.
- [66] — Studies on blood capillaries. II. Transport of ferritin molecules across the wall of muscle capillaries, *J. Cell Biol.*, **37**: 277, 1968.
- [67] BUBIS J. J., LUSE S. A., An electron microscopic study of the cerebral blood vessels of the opossum, *Z. Zellforsch.*, **62**: 16, 1964.
- [68] BUCK R. C., The fine structure of endothelium of large arteries, *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, **4**: 187, 1958.
- [69] BULGER R. E., NAGLE R. B., Ultrastructure of the interstitium in the rabbit kidney, *Am. J. Anat.*, **136**: 183, 1973.
- [70] BURDITT A. F., CAIRD F. I., DRAPER G. J., The natural history of diabetic retinopathy, *Quart. J. Med.*, **37**: 303, 1968.
- [71] BURR H. S., The central nervous system of *Orthogoriscus mola*, *J. Comp. Neurol.*, **45**: 33, 1928.
- [72] BURRI P. H., WEIBEL E. R., Beeinflussung einer spezifischen cytoplasmatischen Organelle von Endothelzellen durch Adrenalin, *Z. Zellforsch.*, **88**: 426, 1968.
- [73] CALEY D. W., Light and electron microscopic study of the developing rat cerebral cortex, *Anat. Rec.*, **154**: 325, 1966.
- [74] — An electron and light microscope study of the postnatal development of rat cerebral cortex, Dissert. on file at Univ. of California at Los Angeles, 1966.
- [75] — Ultrastructural differences between central and peripheral myelin sheath formation in the rat, *Anat. Rec.*, **157**: 223, 1967.
- [76] CALEY D. W., MAXWELL D. S., An electron microscopic study on neurons during postnatal development of rat cerebral cortex, *J. Comp. Neurol.*, **133**: 17, 1968.
- [77] — An electron microscopic study of the neuroglia during postnatal development of the rat cerebrum, *J. Comp. Neurol.*, **133**: 45, 1968.
- [78] — Development of the blood vessels and extracellular spaces during postnatal maturation of rat cerebral cortex, *J. Comp. Neurol.*, **138**: 31, 1970.
- [79] CAMMERMEYER J., Intraneuronal capillary, *Anat. Rec.*, **147**: 415, 1963.
- [80] CAMPBELL F. R., Ultrastructural studies of transmural migration of blood

- cells in the bone marrow of rats, mice and guinea pigs, *Am. J. Anat.*, **135**: 521, 1972.
- [81] — Ultrastructure of the sinus wall of *Murine* bone marrow myelogenous leukemia, *Am. J. Anat.*, **142**: 319, 1975.
- [82] CAPPELL D. F., Intravital and supravital staining. II. Blood and organs. *J. Pathol. Bact.*, **32**: 629, 1929.
- [83] CAREY F. G., TEAL J. M., Heat conservation in tuna fish muscle, *Proc. Natn. Acad. Sci. USA*, **56**: 1464, 1966.
- [84] — Mako and Porbeagle; warm blooded sharks, *Comp. Biochem. Physiol.*, **28**: 199, 1969.
- [85] CARTER R. D., JOYNER W. L., RENKIN E. M., Effects of histamine and some other substances on molecular selectivity of the capillary wall to plasma proteins and dextran, *Microvasc. Res.*, **7**: 31, 1974.
- [86] CASLEY - SMITH J. R., Pinocytic vesicles: An explanation of some of the problems associated with the passage of particles into and through cells via these bodies, *J. Australian Soc. Med. Res.*, **1**: 58, 1963.
- [87] — Pinocytic vesicles: An explanation of some of the problems associated with the passage of particles into and through cells via these bodies, *Med. Res.*, **1**: 58, 1963.
- [88] — Endothelial permeability — the passage of particles into and out of diaphragmatic lymphatics, *Quart. J. Exp. Physiol.*, **49**: 365, 1964.
- [89] — Endothelial permeability. II. The passage of particles through the lymphatic endothelium of normal and injured ears, *Br. J. Exp. Pathol.*, **46**: 35, 1965.
- [90] — Electron microscopical observations on the dilated lymphatics in oedematous regions and their collapse following hyaluronidase administration, *Br. J. Exp. Pathol.*, **48**: 680, 1967.
- [91] — An electron microscopical study of the passage of ions through the endothelium of lymphatic and blood capillaries, and through the mesothelium, *Quart. J. Exp. Physiol.*, **62**: 105, 1967.
- [92] — The dimensions and numbers of small vesicles in cells, endothelial and mesothelial and the significance of these for endothelial permeability, *J. Micr.*, **90**: 251, 1969.
- [93] — An electron microscopical demonstration of the permeability of cerebral and retinal capillaries to ions, *Experientia*, **25**: 845, 1969.
- [94] — Endocytosis: the different energy requirements for the uptake of particles by small and large vesicles into peritoneal macrophages, *J. Microsc.* **90**: 15, 1969.
- [95] — The dimensions and numbers of small vesicles in endothelial and mesothelial cells, and the significance of these for endothelial permeability, *J. Microsc.*, **90**: 251, 1969.
- [96] — Endothelial fenestrae: their occurrence and permeabilities, and their probable physiological roles, [w] *Proc. 7th Int. Congr. Electron Micr.*, 3/49, 1970.
- [97] — The functioning of endothelial fenestrae on the arterial and venous limbs of capillaries, as indicated by the differing directions of passage of proteins, *Experientia*, **26**: 852, 1970.
- [98] — The transport of large molecules by the small vesicles through the endothelium, [w] *Progress in Lymphology II*, red. Viamonte M., Georg Thieme, Stuttgart, 255, 1970.

- [99] — The fine structure of the vascular system of *Amphioxus*: implications in the development of lymphatics and fenestrated blood vessels, *Lymphology*, **4**: 79, 1971.
- [100] — Endothelial fenestrae in intestinal villi: differences in their numbers, etc., between the arterial and venous ends of the capillaries, *Microvasc. Res.*, **3**: 49, 1971.
- [101] — The role of the endothelial intercellular junctions in the functioning of the initial lymphatics, *Angiologica*, **9**: 106, 1972.
- [102] CASLEY - SMITH J. R., CHIN J. C., The passage of cytoplasmic vesicles across endothelial and mesothelial cells, *J. Micr.*, **93**: 167, 1971.
- [103] CASLEY - SMITH J. R., MART P. E., The relative antiquity of fenestrated blood capillaries and lymphatics, and their significance for the uptake of large molecules: an electron microscopical investigation in an elasmobranch, *Experientia*, **26**: 508, 1970.
- [104] CASLEY - SMITH J. R., O'DONOGHUE P. J., CROCKER K. W. J., The quantitative relationships between fenestrae in jejunal capillaries and connective tissue channels: proof of "tunnel - capillaries", *Microvasc. Res.*, **9**: 78, 1975.
- [105] CASLEY - SMITH J. R., GREEN H. S., HARRIS J. L., WADEY P. J., The quantitative morphology of skeletal muscle capillaries in relation to permeability, *Microvasc. Res.*, **10**: 43, 1975.
- [106] CAUNA N., Electron microscopy of the nasal vascular bed and its nerve supply, *Ann. Otol. Rhinol. Laryngol.*, **79**: 443, 1970.
- [107] CAUÑA N., HINDERER K. H., Fine structure of blood vessels of the human nasal respiratory mucosa, *Ann. Otol. Rhinol. Laryngol.*, **78**: 865, 1969.
- [108] CECIO A., Ultrastructural features of cytofilaments within mammalian endothelial cells, *Z. Zellforsch.*, **83**: 40, 1967.
- [109] CHALCROFT J. P., BULLIVANT S., An interpretation of liver cell membrane and junction structure based on observations of freeze - fracture replicas of both sides of the fracture, *J. Cell Biol.*, **47**: 49, 1970.
- [110] CHAMBERS R., ZWEIFACH B. W., *Cyt. za Karnovsky M. J.* [342]. *J. Cell. Comp. Physiol.*, **15**: 255, 1940.
- [111] — Intercellular cement and capillary permeability, *Physiol. Rev.*, **27**: 431, 1947.
- [112] CHANDRA S., Undulating tubules associated with endoplasmic reticulum in pathologic tissues, *Lab. Invest.*, **18**: 422, 1968.
- [113] CHASE W. H., Distribution and fine structure of elastic fibers in mouse lung, *Exptl. Cell Res.*, **17**: 121, 1959.
- [114] CHINARD F. P., Exchanges across the alveolar - capillary barrier, [w] *The Pulmonary Circulation and Interstitial Space*, red. Fishman A. P., Hecht H. H., Univ. of Chicago Press, Chicago, 79, 1969.
- [115] CHINARD F. P., ENNS T., NOLAN M. F., The permeability characteristics of the alveolar - capillary barrier, *Trans. Assoc. Am. Physicians*, **75**: 253, 1962.
- [116] CHOI J. K., The fine structure of the urinary bladder of the toad *Bufo marinus*, *J. Cell Biol.*, **16**: 53, 1963.
- [117] CLABOUGH J. W., Ultrastructural features of the pineal gland in normal and light deprived golden hamsters, *Z. Zellforsch.*, **114**: 151, 1971.
- [118] CLARA M., Beiträge zur Morphobiologie des nucleus supraopticus und nucleus paraventricularis, *Anat. Anz.*, **102**: 86, 1955.

- [119] CLARK E. R., CLARK E. L., The development of adventitial (Rouget) cells on the blood capillaries of amphibians larvae, *Am. J. Anat.*, **35**: 239, 1925.
- [120] — The relation of Rouget cells to capillary contraction, *Am. J. Anat.*, **35**: 265, 1925.
- [121] CLEMENTI F., Effect of horseradish peroxidase on mice lung capillaries permeability, *J. Histochem. Cytochem.*, **18**: 887, 1970.
- [122] — Further data on horseradish peroxidase as permeability tracer. VII., *Intern. Congr. Electron Micr.*, **3**: 45, 1970.
- [123] CLEMENTI F., PALADE G. E., Intestinal capillaries. I. Permeability to peroxidase and ferritin, *J. Cell Biol.*, **41**: 33, 1969.
- [124] — Intestinal capillaries. II. Structural effects of EDTA and histamine, *J. Cell Biol.*, **42**: 706, 1969.
- [125] CLEMENTS, J. A., Pulmonary surfactant, *Am. Rev. Resp. Diseases*, **101**: 984, 1970.
- [126] CLIFF W. J., Observation on healing tissue: A combined light and electron microscopic investigation, *Trans. Roy. Soc. B*, **246**: 305, 1963.
- [127] COHEN A. I., The ultrastructure of the rods of the mouse retina, *Am. J. Anat.*, **107**: 23, 1960.
- [128] — The fine structure of the extrafoveal receptors of the rhesus monkey, *Exp. Eye Res.*, **1**: 128, 1961.
- [129] COLLIN R., Sur une disposition peri- et endocellulaire remarquable des capillaires sanguins dans le tuber cinereum chez le cabaye, *C. R. Soc. Biol. (Paris)*, **107**: 713, 1931.
- [130] CORPRON R. E., AVERY J. K., LEE S. D., Ultrastructure of capillaries in the odontoblastic layer, *J. Dental Res.*, **52**: 393, 1973.
- [131] — Ultrastructure of terminal pulpal blood vessels in mouse molars, *Anat. Rec.*, **179**: 527, 1974.
- [132] COTRAN R. S., The delayed and prolonged vascular leakage in inflammation. II. An electron microscopic study of the vascular response after thermal injury, *Am. J. Pathol.*, **46**: 589, 1965.
- [133] — Studies on inflammation. Ultrastructure of the prolonged vascular response induced by *Clostridium oedematiensis* toxin, *Lab. Invest.*, **17**: 39, 1967.
- [134] COTRAN R. S., KARNOVSKY M. J., Ultrastructural studies on the permeability of the mesothelium to horseradish peroxidase, *J. Cell Biol.*, **37**: 123, 1968.
- [135] COURTICE F. C., MORRIS B., The exchange of lipids between plasma and lymph of animals, *Quart. J. Exptl. Physiol.*, **40**: 138, 1955.
- [136] COWDRY E. V., *A Textbook of Histology*, Lea and Febiger, Philadelphia, 1938.
- [137] CRAIGIE E. H., The blood vessels of the brain substance in some amphibians, *Proc. Am. Philos. Soc.*, **78**: 615, 1938.
- [138] — The blood vessels in the central nervous system of the kangaroo, *Science*, **88**: 359, 1938.
- [139] — Vascularity in the brains of tailed amphibians. I. *Ambystoma tigrinum* (Green), *Proc. Am. Philos. Soc.*, **81**: 21, 1939.
- [140] — Vascularity in the brains of tailed amphibians. II. *Necturus maculosus* Rafinesque, *Proc. Am. Philos. Soc.*, **82**: 395, 1940.
- [141] — The capillary bed of the central nervous system of *Dermophis (Amphibia, Gymnophiona)*, *J. Morph.*, **67**: 477, 1940.

- [142] — Vascularization in the brains of reptiles. II. The cerebral capillary bed in *Sphenodon punctatum*, J. Morph., **69**: 263, 1941.
- [143] — The capillary bed of the central nervous system in a member of a second genus of *Gymnophiona* — *Siphonops*, J. Anat., **76**: 56, 1941.
- [144] — The architecture of the cerebral capillary bed in lungfishes, J. Comp. Neurol., **79**: 19, 1943.
- [145] — The architecture of the cerebral capillary bed, Biol. Rev., **20**: 133, 1945.
- [146] CRONE C., The permeability of brain capillaries to non - electrolytes, Acta Physiol. Scand., **64**: 407, 1965.
- [147] CROSS C. E., RIEBEN P. A., SALISBURY P. F., Urea permeability of alveolar membrane; hemodynamic effects of liquid in the alveolar spaces, Am. J. Physiol., **198**: 1029, 1960.
- [148] CUNHA - VAZ J. G., SHAKIB M., ASHTON N., Studies on the permeability of the blood - retinal barrier. I. On the existence, development, and site of a blood - retinal barrier, Br. J. Ophthalm., **50**: 441, 1966.
- [149] DAHL E., The fine structure of intracerebral vessels, Z. Zellforsch., **145**: 577, 1973.
- [150] DALTON A. J., Structural details of some epithelial cell types in the kidney of the mouse as revealed by the electron microscope, J. Natl. Cancer Inst., **11**: 1163, 1951.
- [151] DANIEL P. M., DAWES J. D. K., PRICHARD M. M. L., Studies on the carotid rete and its associated arteries, Phil. Trans. Roy. Soc. Lond. B, **237**: 173, 1953.
- [152] DAVSON H., Physiology of the ocular and cerebrospinal fluids, J. and A. Churchill Ltd., London, 6/152, 1956.
- [153] — Physiology of the Cerebrospinal Fluid, J. and A. Churchill, London, 1967.
- [154] DE BRUYN P. P. H., MICHELSON S., THOMAS T. B., The migration of blood cells of the bone marrow through the sinusoidal wall, J. Morph., **133**: 417, 1971.
- [155] DE KOCK L. L., BUNN A. E. G., Ultrastructure of carotid body tissue as seen in serial sections, Nature, **202**: 821, 1964.
- [156] DELCERRO M. P., SNIDER R. S., Ultrastructural aspects of the developing cerebellar cortex. Preliminary observations, Anat. Rec., **157**: 234, 1967.
- [157] DELORME P., Différentiation ultrastructurale des junctions intercellulaires de l'endothélium des capillaires télencéphaliques chez l'embryon de poulet, Z. Zellforsch., **133**: 571, 1972.
- [158] DELORME P., GRIGNON G., GAYET J., Ultrastructure des capillaries dans le télencéphale du poulet au course de l'embriogenèse et de la croissance postnatale, Z. Zellforsch., **87**: 592, 1968.
- [159] — Étude en microscopie électronique de l'histogenèse des capillaires du télencéphale chez l'embryon de poulet et le poussin et de leur perméabilité à la peroxydase, Bull. Ass. Anat., **149**: 725, 1970.
- [160] DE MARTINO C., ACCINI L., ANDRES G. A., ARCHETTI I., Tubular structures associated with the endothelial endoplasmic reticulum in glomerular capillaries of rhesus monkey and nephritic man, Z. Zellforsch., **97**: 502, 1969.
- [161] DEMPSEY E. W., Neural and vascular ultrastructure of the *area postrema* in the rat, J. Comp. Neurol., **150**: 177, 1973.
- [162] DEMPSEY E. W., PETERSON R. R., Electron microscopic observations on the thyroid glands of normal, hypophysectomized and cold exposed and thiouracil - treated rats, Endocrinology, **56**: 46, 1955.

- [163] DEMPSEY E. W., WISLOCKI G. B., The use of silver nitrate as a vital stain and its distribution in several mammalian tissues as studied with the electron microscope, *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, **1**: 111, 1955.
- [164] — An electron microscopic study of the blood-brain barrier in the rat, employing silver nitrate as a vital stain, *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, **1**: 245, 1955.
- [165] DERMIETZEL R., Junctions in the central nervous system of the cat. IV. Interendothelial junctions of cerebral blood vessels from selected areas of the brain, *Cell Tiss. Res.*, **164**: 45, 1975.
- [166] DE ROBERTIS E., GERSCHENFELD H. M., Submicroscopic morphology and function of glial cells, [w] *Intern. Rev. Neurobiol.*, red. Pfeiffer C. C., Smythies J. R., Academic Press, New York, 3/1, 1961.
- [167] DE ROBERTIS E., SABATINI D. D., Mitochondrial changes in the adrenocortex of normal hamsters, *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, **4**: 667, 1958.
- [168] DIERICHS R., Elektronenmikroskopische Untersuchungen an der Froschlunge. I. Darstellung der Alveolar-Grenzschicht (Surfactant), *Z. Zellforsch.*, **137**: 553, 1973.
- [169] DIVERTIE M. B., BROWN A. L. Jr., The fine structure of the normal human alveolocapillary membrane, *J.A.M.A.*, **187**: 938, 1964.
- [170] DOBBING J., The blood-brain barrier: some recent developments, *Guy's Hosp. Rep.*, **112**: 267, 1963.
- [171] DONAHUE S., PAPPAS G. D., The fine structure of capillaries in the cerebral cortex of the rat at various stages of development, *Am. J. Anat.*, **108**: 331, 1961.
- [172] DORN E., Über den Feinbau der Schwimmblase von *Anguilla vulgaris* L. Licht- und Elektronenmikroskopische Untersuchungen, *Z. Zellforsch.*, **55**: 849, 1961.
- [173] DRETZKI J., Licht- und Elektronenmikroskopische Untersuchungen zum Problem der Blut-Hirn-Schranke circumventriculärer Organe der Ratte nach Behandlung mit Myofer, *Z. Anat. Entwickl. - Gesch.*, **134**: 278, 1971.
- [174] DRINKER C. K., The permeability and diameter of the capillaries in the web of the brown frog (*R. temporaria*) when perfused with solutions containing pituitary extracts and horse serum, *J. Physiol.*, **63**: 249, 1927.
- [175] DRINKER C. K., HARDENBERGH E., Absorption from the pulmonary alveoli, *J. Exptl. Med.*, **86**: 7, 1947.
- [176] DROMMER W., Permeation von Ferritin an normalen und durch Calitoxin geschädigten Gefäßen in zentralen Nervensystem des Schweines, *Acta Neuropathol.* **24**: 30, 1973.
- [177] DUBOIS P., GIROD C., Ultrastructure des capillaires du lobe antérieur de l'hypophyse chez le Hamster doré (*Mesocricetus auratus* Waterh.), *C. R. Soc. Biol.*, **159**: 377, 1965.
- [178] DUFFY P. E., MENEFFEE M., Electron microscopic observation of neurosecretory granules, nerve and glial fibres, and blood vessels in the median eminence of the rabbit, *Am. J. Anat.*, **117**: 251, 1965.
- [179] DUNCAN D., MICHELETTI G., Notes on the fine structure of the pineal organ of cats, *Texas Rep. Biol. Med.*, **24**: 576, 1966.
- [180] DUVAL A. J., QUICK C. A., SUTHERLAND C. R., Horseradish peroxidase in the lateral cochlear wall, *Arch. Otolaryng.*, **93**: 304, 1971.
- [181] EDSTRÖM R., Recent developments on the blood-brain barrier concept, *Int. Rev. Neurobiol.*, **7**: 153, 1964.

- [182] EHRICH W. E., Die Entzündung, [w] Handbuch der Allgemeinen Pathologie, Springer, Berlin, 7, 1956.
- [183] EHRLICH P., Das Sauerstoff Bedürfnis des Organismus. Eine farbenanalytische Studie, Hirschwald, Berlin, 1885.
- [184] EKHOLM R., The ultrastructure of the blood capillaries in the mouse thyroid gland, Z. Zellforsch., 46: 139, 1957.
- [185] EKHOLM R., EDLUND Y., Ultrastructure of the human exocrine pancreas, J. Ultrastr. Res., 2: 453, 1959.
- [186] EKHOLM R., SJÖSTRAND F. S., The ultrastructural organization of the mouse thyroid gland, J. Ultrastr. Res., 1: 178, 1957.
- [187] ELFVIN L. G., The ultrastructure of the capillary fenestrae in the adrenal medulla of the rat, J. Ultrastr. Res., 12: 687, 1965.
- [188] ELLIOTT R. L., ARHELGER R. B., Fine structure of parathyroid adenomas: with special reference to annulate lamellae and septate desmosomes, Arch. Pathol., 81: 200, 1966.
- [189] ENGSTRÖM H., HAMBERGER C. - A., HOLMER M., RIGNELL N. S., The carotid body, Acta Otolaryngol., 48: 379, 1957.
- [190] ERIKSSON E., ERIKSSON L. E., MYRHAGE R., Vascular morphology in cat skeletal muscle, Bibl. Anat., 11: 389, 1973.
- [191] ETO T., OMAE T., YAMAMOTO T., An electron microscope study of hypertensive encephalopathy in the rat with renal hypertension, Arch. Histol. Japon., 33: 133, 1971.
- [192] FAHLÉN G., Morphology of the gas bladder of *Coregonus lavaretus* L., Acta Univ. Lund., 28: 1, 1967.
- [193] FÄNGE R., The structure and function of the gas bladder in *Argentina silus*, Quart. J. Micr. Sci., 99: 95, 1958.
- [194] FÄNGE R., MATTISSON A., The gas secretory structures and the smooth muscles of the swim bladder of cyprinids, [w] Zoological Papers dedicated to Bertil Handström, 153, 1956.
- [195] FANNING J. C., The structure of the pulmonary alveoles in the South Australian *Tursiops truncatus*, [w] Functional Anatomy of Marine Mammals, red. Harrison R. J., Academic Press, London, 1973.
- [196] FARID N. R., WILKINSON E., CONSTABLE F. L., ANDERSON J., Basement membrane thickness of rectal capillaries in diabetes, Lancet, 8: 37, 1973.
- [197] FARQUHAR M. G., Fine structure and function in capillaries of the anterior pituitary gland, Angiology, 12: 270, 1961.
- [198] — Glomeruli permeability investigated by electron microscopy, [w] Small Blood Vessels Involvement in Diabetes Mellitus, The Am. Inst. of Biol. Sci., 31, 1964.
- [199] — The primary glomerular filtration barrier — basement membrane or epithelial slits?, Kidney International, 8: 197, 1975.
- [200] FARQUHAR M. G., PALADE G. E., Glomerular permeability. II. Ferritin transfer across the glomerular capillary wall in nephrotic rats, J. Exp. Med., 114: 699, 1961.
- [201] — Tight intercellular junctions, Abstr. of papers., First Ann. Meet. Am. Soc. Cell Biol., Chicago, 51, 1961.
- [202] — Functional evidence for the existence of a third cell type in the renal glomerulus. Phagocytosis of filtration residues by a distinctive third cell, Am. J. Pathol., 13: 55, 1962.

- [203] — Junctional complexes in various epithelia, *J. Cell Biol.*, **17**: 375, 1963.
- [204] — Cell junctions in amphibian skin, *J. Cell Biol.*, **26**: 263, 1965.
- [205] FARQUHAR M. G., VERNIER R. L., GOOD R. A., An electron microscope study of the glomerulus in nephrosis, glomerulonephritis, and lupus erythematosus, *J. Exp. Med.*, **106**: 649, 1957.
- [206] FARQUHAR M. G., WISSIG S. L., PALADE G. E., Glomerular permeability. I. Ferritin transfer across the normal glomerular capillary wall, *J. Exp. Med.*, **113**: 47, 1961.
- [207] FAWCETT D. W., Observations on the cytology and electron microscopy of hepatic cells, *J. Nat. Cancer Inst.*, **15**: 1475, 1955.
- [208] — Structural specialization of the cell surface, [w] *Frontiers in Cytology*, red. Palay S. L., Yale Univ. Press, New Haven, 19, 1958.
- [209] — The fine structure of capillaries, arterioles and small arteries, [w] *The Microcirculation*, red. Reynolds S. R. M., Zweifach B. W., Univ. of Illinois Press, Urbana, 1, 1959.
- [210] — Intercellular bridges, *Exp. Cell Res., Suppl.*, **8**: 174, 1961.
- [211] — Comparative observations of the fine structure of blood capillaries, [w] *The Peripheral Blood Vessels*, red. Orbison J. L., Smith D. E., Williams and Wilkins Co., Baltimore, 2/17, 1963.
- [212] — Surface specialization of absorbing cells, *J. Histochem. Cytochem.*, **13**: 75, 1965.
- [213] — An atlas of fine structure. The cell. Its organelles and inclusions, Saunders Co., Philadelphia and London, 1966.
- [214] FAWCETT D. W., WITTENBERG J., The fine structure of capillaries in the rete mirabile of the swim bladder of *Opsanus tau*, *Anat. Rec.*, **133**: 274, 1959.
- [215] — Structural specialization of endothelial cell junctions, *Anat. Rec.*, **142**: 231, 1962.
- [216] FEDER N., REESE T. S., BRIGHTMAN M. W., Microperoxidase, a new tracer of low molecular weight. A Study of the interstitial compartments of the mouse brain, *J. Cell Biol.*, **43**: 35A, 1970.
- [217] FERNANDO N. V. P., MOVAT H. Z., The fine structure of the terminal vascular bed. III. The capillaries, *Exptl. Mol. Pathol.*, **3**: 87, 1964.
- [218] — The fine structure of the terminal vascular bed. II. The smallest arterial vessels: Terminal arterioles and metarterioles, *Exptl. Mol. Pathol.*, **3**: 1, 1964.
- [219] FILLENZ M., Innervation of pulmonary capillaries, *Experientia*, **25**: 842, 1969.
- [220] FLEMING W. W., PARPART A. K., Structure of the intermediate circulation of the rat spleen, *Angiology*, **10**: 28, 1959.
- [221] FLICKINGER C. J., The fine structure of the interstitial tissue of the rat prostate, *Am. J. Anat.*, **134**: 107, 1972.
- [222] FLORENTIN R. A., NAM S. C., DAOUD A. S., JONES R., SCOTT R. F., MORRISON E. S., KIM D. N., LEE K. T., THOMAS W. A., DODDS W. J., MILLER K. D., Dietary induced atherosclerosis in miniature swine, *Exp. Mol. Pathol.*, **8**: 263, 1968.
- [223] FLOREY H. W., Exchange of substances between the blood and tissues, *Nature*, **192**: 908, 1961.
- [224] — The transport of materials across the capillary wall, *Quart. J. Exptl. Physiol.*, **49**: 117, 1964.

- [225] — The endothelial cell, *Br. Med. J.*, **2**: 487, 1966.
- [226] — The uptake of particulate matter by endothelial cells, *Proc. Roy. Soc. Biol.*, **166**: 383, 1967.
- [227] FRIEDERICI H. H. R., The tridimensional ultrastructure of fenestrated capillaries, *J. Ultrastr. Res.*, **23**: 444, 1968.
- [228] — On the diaphragm across fenestrae of capillary endothelium, *J. Ultrastr. Res.*, **27**: 373, 1969.
- [229] FRIEDERICI H. H. R., TUCKER W. R., SCHWARTZ T. B., Observations on small blood vessels of skin in the normal and diabetic patients, *Diabetes*, **15**: 233, 1966.
- [230] FREDERICKSON R. G., LOW F. N., Blood vessels and tissue space associated with the brain of the rat, *Am. J. Anat.*, **125**: 123, 1969.
- [231] FRIEND D. S., GILULA N. B., Variations in tight and gap junctions in mammalian tissues, *J. Cell Biol.*, **53**: 758, 1972.
- [232] FRITSCH G., Ueber einige bemerkenswerthe Elemente des Centralnervensystems von *Lophius piscatorius* L., *Arch. Mikr. Anat.*, **27**: 13, 1886.
- [233] FUCKS U., Die feinmikroskopische Structur des kapillaren Hamangioms des Menschen, *Beitr. Pathol.*, **135**: 309, 1967.
- [234] FUJITA H., KATAOKA K., Capillary endothelial cells of the anterior pituitary should be excluded from the reticulo-endothelial system. Light and electron microscopic observations on rabbits and rats, *Z. Anat. Entwickl.-Gesch.*, **128**: 318, 1969.
- [235] FUNG Y. C., SOBIN S. S., Theory of sheet flow in lung alveoli, *J. Appl. Physiol.*, **26**: 472, 1969.
- [236] GABBIANI G., MAJNO G., Endothelial microvilli in the vessels of the rat Gasserian ganglion and testis, *Z. Zellforsch.*, **97**: 111, 1969.
- [237] GANG N. F., KALANT N., Nephrotoxic serum nephritis. I. Chemical, morphologic and functional changes in the glomerular basement membrane during the evolution of nephritis, *Lab. Invest.*, **22**: 531, 1970.
- [238] GARANT P. R., GILLESPIE R., The presence of fenestrated capillaries in the papillary layer of the enamel organ, *Anat. Rec.*, **163**: 71, 1969.
- [239] GARLICK D. G., RENKIN E. M., Transport of large molecules from plasma to interstitial fluid and lymph in dogs, *Am. J. Physiol.*, **219**: 1595, 1975.
- [240] GARNER C. M., DUNCAN D., Observations on the fine structure of the carotid body, *Anat. Rec.*, **130**: 691, 1958.
- [241] GAUTIER A., BERNHARD W., OBERLING C., Sur l'existence d'un appareil lacunaire péri-capillaire du glomérule de Malpighi, révélée par le microscope électronique, *Comp. rend. Soc. Biol.*, **144**: 1605, 1950.
- [242] GERSH I., CATCHPOLE H. R., The organization of ground substance and basement membrane and its significance in tissue injury, disease, and growth, *Am. J. Anat.*, **85**: 457, 1949.
- [243] GIACOMELLI F., ANVERSA P., WIENER J., Interendothelial gap size of subendocardial vs subepicardial capillaries, *Microvasc. Res.*, **10**: 38, 1975.
- [244] GIMBRONE M. A. Jr., COTRAN R. S., FOLKMAN J., Human vascular endothelial cells in culture. Growth and DNA synthesis, *J. Cell Biol.*, **60**: 673, 1974.
- [245] GOLDMAN E. E., *Vitalfärbung am Zentralnervensystem*, Georg Reimer, Berlin, 1913.
- [246] GOODENOUGH D. A., REVEL J. P., A fine structural analysis of intercellular junctions in the mouse liver, *J. Cell Biol.*, **45**: 272, 1970.

- [247] GORGAS K., JAHNKE K., The permeability of blood vessels in the guinea pig cochlea. II. Vessels in the spiral ligament and the stria vascularis, *Anat. Embryol.*, **146**: 33, 1974.
- [248] GRAHAM R. C., KARNOVSKY M. J., The early stages of absorption of injected horseradish peroxidase in the proximal tubules of mouse kidney: ultrastructural cytochemistry by new technique, *J. Histochem. Cytochem.*, **14**: 291, 1966.
- [249] — Glomerular permeability: Ultrastructural cytochemical studies using peroxidases as protein tracers, *J. Exptl. Med.*, **124**: 1123, 1966.
- [250] GRAY E. G., Ultrastructure of synapses of cerebral cortex and of certain specialization of neuroglial membranes, [w] *Electron Microscopy in Anatomy*, red. Boyd J. D., Johnson F. R., Lever J. D., Edward Arnold and Co., London, 54, 1961.
- [251] GREEN H. S., CASLEY - SMITH J. R., Calculation of the passage of small vesicles across endothelial cells by Brownian motion, *J. Theoret. Biol.*, **35**: 103, 1972.
- [252] GRIEG M. E., HOLLAND W. G., Increased permeability of the hemato-encephalic barrier produced by physostigmine and acetylcholine, *Science*, **110**: 237, 1949.
- [253] GRIMLEY P. M., GLENNER G. G., Histology and ultrastructure of carotid body paragangliomas. Comparison with the normal gland, *Cancer*, **20**: 1473, 1966.
- [254] GROTTÉ G., Passage of dextran molecules across the blood - lymph barrier, *Acta Chir. Scand.*, Suppl., **211**: 84, 1956.
- [255] GRUBB D. J., JONES A. L., Ultrastructure of hepatic sinusoids in sheep, *Anat. Rec.*, **170**: 75, 1971.
- [256] GUNN S. A., GOULD T. C., ANDERSON W. A., The selective injurious response of testicular and epididymal blood vessels to cadmium and its prevention by zinc, *Am. J. Pathol.*, **42**: 685, 1963.
- [257] GUSEK W., SANTORO A., Zur Ultrastruktur der Epiphysis cerebri der Ratte, *Endokrinologie*, **41**: 105, 1961.
- [258] HAAR J. L., Light and electron microscopy of the human fetal thymus, *Anat. Rec.*, **179**: 463, 1974.
- [259] HALL C. U., Studies on normal glomerular structure by electron microscopy, Proc. 5th Ann. Conf. Nephrotic Syndrome, Philadelphia, New York, 39, 1953.
- [260] HALL B. V., Studies of normal glomerular structures by electron microscopy, Proc. 5th Conf. Nephrotic Syndrome, Philadelphia, New York, 1, 1954.
- [261] — Observations on the number, size, and structure of rat glomerular capillaries, *Anat. Rec.*, **118**: 425, 1954.
- [262] — The protoplasmic basis of glomerular ultrafiltration, *Am. Heart J.*, **54**: 1, 1957.
- [263] — A slit-pore theory of glomerular filtration based on dimensional data provided by electron micrographs of the glomerular capillary wall, *Anat. Rec.*, **136**: 205, 1960.
- [264] HALL B. V., ROTH E., JOHNSON V., The ultramicroscopic structure and minute functional anatomy of the glomerulus, *Anat. Rec.*, **115**: 315, 1953.
- [265] — Electron microscopy of the rat kidney, *Anat. Rec.*, **115**: 427, 1953.
- [266] HAMA K., The fine structure of the desmosomes in frog mesothelium, *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, **7**: 575, 1960.

- [267] — On the existence of filamentous structures in endothelial cells of the amphibian capillary, *Anat. Rec.*, **139**: 437, 1961.
- [268] HAMMERSEN F., Poren - und Fenster - Endothelien der Kapillaren in der Skelettmuskulatur der Ratte, *Z. Zellforsch.*, **69**: 296, 1966.
- [269] — The pattern of the terminal vascular bed and the ultrastructure of capillaries in skeletal muscle, [w] *Oxygen Transport in Blood and Tissue*, red. Lübbers D. - W., Luft U. C., Thews G., Witzleb E., Georg Thieme, Stuttgart, 184, 1968.
- [270] — Endothelial filaments and intercellular gaps — a sufficient evidence for contractility?, *Bibl. Anat.*, **12**: 159, 1973.
- [271] HAMPTON J. C., Electron microscopic study of extrahepatic biliary obstruction in the mouse, *Lab. Invest.*, **10**: 502, 1961.
- [272] HAMPTON J. C., ROSARIE B., The passage of exogenous peroxidase from blood capillaries into the intestinal epithelium, *Anat. Rec.*, **159**: 159, 1967.
- [273] HAN S. S., AVERY J. K., The ultrastructure of capillaries and arterioles of hamster dental pulp, *Anat. Rec.*, **145**: 549, 1963.
- [274] HANDENSCHILD C. C., COTRAN R. S., GIMBRONE M. A. Jr., FOLKMAN J., Fine structure of vascular endothelium in culture, *J. Ultrastr. Res.*, **50**: 22, 1975.
- [275] HARTMANN J. F., Electron microscopy of the neurohypophysis in normal and histamine - treated rats, *Z. Zellforsch.*, **48**: 291, 1958.
- [276] HASHIMOTO P. H., Intercellular channels as a route for protein passage in the capillary endothelium of the shark brain, *Am. J. Anat.*, **134**: 41, 1972.
- [277] HAUCK G., Physiology of blood and lymph, *Angiologica*, **8**: 129, 1971.
- [278] HAUW J. J., BERGER B., ESCOUROLLE R., Ultrastructural observations on human cerebral capillaries in organ culture, *Cell Tiss. Res.*, **163**: 133, 1975.
- [279] HAYE R., The capillaries of the middle ear mucosa in the guinea pig. Ultrastructure permeability, *Z. Zellforsch.*, **143**: 517, 1973.
- [280] HAYWARD J. N., Hypothalamic input to supraoptic neurons, [w] *Progress in Brain Res.*, Elsevier, Amsterdam, London, New York, **38/145**, 1972.
- [281] HEINEMANN H. O., FISHMAN A. P., Nonrespiratory functions of mammalian lung, *Physiol. Rev.*, **49**: 1, 1969.
- [282] HIBBS R. G., BURCH G. E., PHILLIPS J. H., The fine structure of the small blood vessels of normal human dermis and subcutis, *Am. Heart J.*, **56**: 662, 1958.
- [283] HIGHTON T. C., CAUGHEY D. E., RAYNS D. G., A new inclusion body in rheumatoid synovia, *Ann. Rheum. Dis.*, **25**: 149, 1966.
- [284] HIRANO A., BECKER N. H., ZIMMERMAN H. M., Pathological alterations in the cerebral endothelial cell barrier to peroxidase, *Arch. Neur.*, **20**: 300, 1969.
- [285] HIRANO A., TOMIYASU U., ZIMMERMAN H. M., The fine structure of blood vessels in chromophobe adenoma, *Acta Neuropathol.*, **22**: 200, 1972.
- [286] HIRANO A., GHATAK N. R., ZIMMERMAN H. M., The fine structure of ependymoblastoma, *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, **32**: 144, 1973.
- [287] HIROWAKA K., Electron microscopic observation of the human thymus of the fetus and the newborn, *Acta Pathol. Jap.*, **19**: 1, 1969.
- [288] HOFFMAN H., BIRRELL J. H. W., The carotid body in normal and anoxic states: an electron microscopic study, *Acta Anat.*, **32**: 297, 1958.

- [289] HOGAN M. J., ALVARADO J., Studies on the human macula: IV. Aging changes in Bruch's membrane, *Arch. Ophthalmol.*, **77**: 410, 1967.
- [290] HOGAN M. J., FEENEY L., The ultrastructure of the retinal vessels. II. The small vessels, *J. Ultrastr. Res.*, **9**: 29, 1963.
- [291] HOLMBERG A., The ultrastructure of the capillaries in the ciliary body, *Arch. Ophthalmol.*, **62**: 949, 1959.
- [292] HOROWITZ M., The physiological adaptations of the blood system of desert animals to dehydration, Ph. D. Thesis, Hebrew Univ., Jerusalem, 1971.
- [293] HUDSON G., YOFFEY J. M., The passage of lymphocytes through the sinusoidal endothelium of guinea pig bone marrow, *Proc. Roy. Soc., B*, **165**: 486, 1966.
- [294] HUGHES G. M., Comparative physiology of vertebrate respiration, Heinemann, London, 1965.
- [295] — Ultrastructure of the air-breathing organs of some lower vertebrates, *Congr. Int. Micr. Electr.*, Grenoble, 599, 1970.
- [296] HUHN H. D., STEINER J. W., MOVAT H. Z., The fine structure of the mesangium of the glomerulus of dogs and mice, *Z. Zellforsch.*, **56**: 213, 1962.
- [297] HURLEY J. V., XEROS N., Electron microscopic observations on the emigration of leucocytes, *Australian J. Exptl. Biol.*, **39**: 609, 1961.
- [298] IKUI H., MIMATSU T., MAEDA J., TOMITA I., Fine structure of the blood vessels in the iris. Light and electron microscopic studies Kyushu, *J. Med. Sci.*, **11**: 113, 1960.
- [299] ILBERG C., ARNOLD W., Pathologische Veränderungen an der menschlichen Mittelohrschleimhaut bei chronischer nichteitriger Mittelohrentzündung, *Arch. klin. exp. Ohr. - Nas. u. Kehlk. Heilk.*, **202**: 650, 1972.
- [300] INTAGLIETTA M., de PLOMB E. P., Fluid exchange in tunnel and tube capillaries, *Microvasc. Res.*, **6**: 153, 1973.
- [301] ISHIKAWA T., Fine structure of retinal vessels in man and in the macaque monkey, *Invest. Ophthalm.*, **2**: 1, 1963.
- [302] ITAKI K., Electron microscopic observations of pulmonary alveolar structure, *Acta Tuberc. Jap.*, **122**: 35, 1955.
- [303] ITO, S., The surface coating of enteric microvilli, *Anat. Rec.*, **148**: 294, 1964.
- [304] ITO T., MATSUSHIMA S., Electron microscopic observations on the mouse pineal, with particular emphasis on its secretory nature, *Arch. Histol. Jap.*, **30**: 1, 1968.
- [305] IWAKI S., The electron microscopic study of the fine structure of retinal pigment epithelium and choriocapillary layer, *Acta Soc. Ophthalmol. Jap.*, **62**: 995, 1958.
- [306] JACOBSON L. F., NOER H. J., The vascular pattern of the intestinal villi in various laboratory animals and man, *Anat. Rec.*, **114**: 85, 1952.
- [307] JACQUES P. J., Endocytosis, [w] *Lysosomes in Biology and Pathology*, red. Dingle J. T., Fell H. B., North-Holland Publ. Co., Amsterdam, 2/395, 1969.
- [308] JAHNKE K., GORGAS K., The permeability of blood vessels in the guinea pig cochlea. I. Vessels of the modiolus and spiral vessel, *Anat. Embryol.*, **146**: 21, 1974.
- [309] JASIŃSKI A., Krążenie wrotne w przysadce mózgowej, *Wszechświat*, **10**: 231, 1963.

- [310] — Weberian apparatus and swim-bladder of the pond-loach (*Misgurnus fossilis* L.), *Acta Biol. Crac., Zool.*, **7**: 11, 1964.
- [311] — Gruczoły gazowe ryb, *Wszechświat*, **6**: 150, 1969.
- [312] — Vascularization of the hypophysial region in lower vertebrates (cyclostomes and fishes), [w] *Progress in Comparative Endocrinology*, red. Prasad M. R. N., Academic Press, New York, 510, 1969.
- [313] — Neurosekrecja podwzgórzowa ryb. Zarys morfologii czynnościowej, *Kosmos, A*, **6**: 607, 1969.
- [314] — Fine structure of capillaries in the pecten oculi of the sparrow, *Passer domesticus*, *Z. Zellforsch.*, **116**: 281, 1973.
- [315] — Electron microscopic study of pars distalis of the hypophysis of the pond-loach, *Misgurnus fossilis* L., *Acta Anat.*, **86**: 228, 1973.
- [316] — Air-blood barrier in the respiratory intestine of the pond-loach, *Misgurnus fossilis* L. An ultrastructural study, *Acta Anat.*, **86**: 376, 1973.
- [317] — Strukturalne przystosowania ssaków do skrajnych temperatur środowiska, *Wszechświat*, **5**: 122, 1973.
- [318] — Ryby ciepłokrwiste, *Wszechświat*, **11**: 295, 1973.
- [319] — Fine structure of capillaries in the respiratory intestine of the pond loach, *Misgurnus fossilis* L., *Ann. Med. Sect. Pol. Acad. Sci.*, **18**: 74, 1973.
- [320] — Fine structure of the anterior neurohypophysis of the pond-loach, *Misgurnus fossilis* L., with reference to the neurosecretory innervation of intrinsic cells of the pars distalis, *Acta Anat.*, **87**: 193, 1974.
- [321] — Ultrastructural organization of endothelial cells in the capillaries of the avian pecten oculi, *Ann. Med. Sect. Pol. Acad. Sci.*, **19**: 113, 1974.
- [322] — Fine structure of capillaries in the conus papillaris of the legless lizard *Ophisaurus apodus* (*Anguillidae, Lacertilia*), (w przygotowaniu).
- [323] — Interendothelial canaliculi in choroid capillaries of spike, *Essox lucius* (*Teleostei*). Electron microscope observations, (w przygotowaniu).
- [324] — The occurrence and fine structural organization of cytoplasmic junctions between endothelial and perivascular cells, (w przygotowaniu).
- [325] JASIŃSKI A., KILARSKI W., The gas gland in the swimbladder of the burbot (*Lota lota* L.) and stone-perch (*Acerina cernua* L.), its macro- and microscopic structure based on observations of electron microscopy, *Acta Biol. Crac., Zool.*, **7**: 111, 1964.
- [326] — Fine structure of the neuro-intermediate lobe of the hypophysis in fish, *Misgurnus fossilis*, *Z. Zellforsch.*, **105**: 259, 1970.
- [327] — Capillaries in the rete mirabile and the gas gland of the swim bladder in fishes, *Perca fluviatilis* L. and *Misgurnus fossilis* L.: An electron microscopic study, *Acta Anat.*, **78**: 210, 1971.
- [328] — Gas secretory cells in the rear chamber of the swimbladder of the pond-loach, *Misgurnus fossilis* L. An electron microscopic study, *Z. Zellforsch.*, **134**: 273, 1972.
- [329] JENNINGS M. A., FLOREY H. W., An investigation of some properties of endothelium related to capillary permeability, *Proc. Roy. Soc., B*, **167**: 39, 1967.
- [330] JENNINGS M. A., MARCHESI V. T., FLOREY H. W., The transport of particles across the walls of small blood vessels, *Proc. Roy. Soc., B*, **156**: 14, 1962.
- [331] JONES A. L., FAWCETT D. W., Hypertrophy of the agranular endoplasmic

- reticulum in hamster liver induced by phenobarbital, *J. Histochem. Cytochem.*, **14**: 215, 1966.
- [332] JONES F. R., MARSHALL N. B., The structure and functions of the Teleostean swimbladder, *Biol. Rev.*, **28**: 16, 1953.
- [333] JOÓ F., CSILLIK B., Topographic correlation between the hematoencephalic barrier and the cholinesterase activity of brain capillaries, *Exp. Brain Res.*, **1**: 147, 1966.
- [334] JOÓ F., VÁRKONYI T., Correlation between the cholinesterase activity of capillaries and the blood - brain barrier in the rat, *Acta Biol. Hung.*, **20**: 359, 1969.
- [335] JORDAN S. W., PERLEY M. J., Microangiopathy in diabetes mellitus and aging, *Arch. Pathol.*, **93**: 261, 1972.
- [336] JORIS I., MAJNO G., RYAN G. B., Endothelial contraction in vivo: a study of the rat mesentery, *Virchows Arch. Abt. B., Zellpath.*, **12**: 73, 1972.
- [337] JOYNER W. L., CARTER R. D., RAIZES G. S., RENKIN E. M., Influence of histamine and some other substances in blood - lymph transport of plasma protein and dextran in dog paw, *Microvasc. Res.*, **7**: 19, 1974.
- [338] KALIMA T. V., KALIMA S. H., The significance of ultrastructural details in blood capillaries and initial lymphatics in regard to intestinal absorption, *Abstr. of V Intern. Congr. Lymphology*, 101, 1975.
- [339] KAMEYA T., WATANABE Y., Electron microscopic observations on human thymus and thymoma, *Acta Pathol. Jap.*, **15**: 223, 1965.
- [340] KANAMITSU M., KASAMAKI A., OGAWA M., KASAHARA S., IMAMURA M., Immunofluorescent study on the pathogenesis of oral infection of poliovirus in monkey, *Jap. J. Med. Sci. Biol.*, **20**: 175, 1967.
- [341] KARNOVSKY M. J., Vesicular transport of exogenous peroxidase across capillary endothelium into the T system of muscle, *J. Cell Biol.*, **27**: 49A, 1965.
- [342] — Ultrastructural basis of capillary permeability studied with peroxidase as a tracer, *J. Cell Biol.*, **35**: 213, 1967.
- [343] — The ultrastructural basis of transcapillary exchanges, *J. Gen. Physiol.*, **52**: 64S, 1968.
- [344] — Morphology of capillaries with special reference to muscle capillaries, [w] *Capillary Permeability*, red. Crone C., Lassen N. A., Academic Press, New York, 341, 1970.
- [345] KARNOVSKY M. J., COTRAN R. S., The intercellular passage of exogenous peroxidase across endothelium and mesothelium, *Anat. Rec.*, **154**: 365, 1966.
- [346] KARNOVSKY M. J., SHEA S. M., Transcapillary transport by pinocytosis, *Microvasc. Res.*, **2**: 353, 1970.
- [347] KARRER H. E., The ultrastructure of the mouse lung, *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, **2**: 241, 1956.
- [348] — Electron microscopic study of the phagocytosis process in the lung, *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, **7**: 357, 1960.
- [349] KARRER H. E., COX J., The striated musculature of blood vessels. II. Cell interconnections and cell surface, *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, **8**: 135, 1960.
- [350] KÁSA P., CSILLIK B., Electron microscopic localization of cholinesterase by a copper - lead - thiocholine technique, *J. Neurochem.*, **13**: 1345, 1966.
- [351] KAUTH H., SOMMER H., Das Ferment Kohlensäureanhydrase im Tierkörper. IV. Über die Funktionen des Pecten im Vogelauge, *Biol. Zbl.*, **72**: 196, 1953.

- [352] KAWAMURA J., GARCIA J. H., KAMIJYO Y., Cerebellar hemangioblastoma: a histogenesis of stroma cells, *Cancer*, **31**: 1528, 1973.
- [353] KAWAMURA J., KAMIJYO Y., SUNAGA T., NELSON E., Tubular bodies in vascular endothelium of a cerebellar neoplasm, *Lab. Invest.*, **30**: 358, 1974.
- [354] KAYE G. I., PAPPAS G. D., Studies on the cornea. I. The fine structure of the rabbit cornea and the uptake and transport of colloidal particles by the cornea in vivo, *J. Cell Biol.*, **12**: 457, 1962.
- [355] KAYE G. I., PAPPAS G. D., DONN A., An electron microscopic study of the rabbit corneal epithelium in relation to its uptake and transport of colloidal particles, *Anat. Rec.*, **139**: 244, 1961.
- [356] KAYE G. I., PAPPAS G. E., DONN A., MALLET N., Studies on the cornea. II. The uptake and transport of colloidal particles by the living rabbit cornea in vitro, *J. Cell Biol.*, **12**: 481, 1962.
- [357] KEECH M. K., Electron microscopic study of the normal rat aorta, *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, **7**: 533, 1960.
- [358] KEFALIDES N. A., Current comment: the chemistry and structure of basement membranes, *Arthritis Rheum.*, **12**: 427, 1969.
- [359] KEFALIDES N. A., DENDUCHIS B., Structural components of epithelial and endothelial basement membranes, *Biochemistry*, **8**: 4613, 1969.
- [360] KELENTEI B., FÖLDES I., Studies on the hematoencephalis barrier. III. The effect on the barrier of drugs acting on the parasympathetic nervous system, with special reference to antibiotics, *Acta Physiol. Acad. Sci. Hung.*, **6**: 433, 1954.
- [361] KELENYI G., KASZA J., The local oedema producing effect of disodium ethylenediamine tetraacetate (Na₂EDTA), *Experientia*, **15**: 56, 1959.
- [362] KENNY T. P., SHIVERS R. R., The blood - brain barrier in a reptile, *Anolis carolinensis*, *Tissue and Cell*, **6**: 319, 1974.
- [363] KILO C., VOGLER N., WILLIAMSON J. R., Muscle capillary basement membrane changes related to aging and to diabetes mellitus, *Diabetes*, **21**: 881, 1972.
- [364] KIM K. S., BOATMAN E. S., Electron microscopy of monkey kidney cell cultures infected with rubella virus, *J. Virol.*, **1**: 205, 1967.
- [365] KING J. S., SCHWYN R. C., The fine structure of neuroglial cells and pericytes in the primate red nucleus and *substantia nigra*, *Z. Zellforsch.*, **106**: 309, 1970.
- [366] KISHINOUE K., Contributions to the comparative study of the so - called Scombroid fishes, *Univ. Facul. Agric. Bull., Tokyo*, **8**: 283, 1923.
- [367] KLARA P. M., BRIZZEE, K. R., The ultrastructural morphology of the squirrel monkey *area postrema*, *Cell Tiss. Res.*, **160**: 315, 1975.
- [368] KLATZO I., MIGUEL I., OTENASEK R., The application of fluorescein labeled serum proteins (FLSP) to the study of vascular permeability in the brain, *Acta Neuropathol.*, **2**: 144, 1962.
- [369] KNISELY M. H., BLOCH E. H., WARNER L., Selective phagocytosis. I. Microscopic observations concerning the regulation of the blood flow through the liver and other organs and the mechanism and rate of phagocytic removal of particles from the blood, *Kgl. Danske Videnskab. Selskab Biol. Skrifter*, **4**: 1, 1948.
- [370] KOBAYASHI S., Some observations on the capillary vesicles and the pores, *J. Electr. Micr.*, **17**: 322, 1968.

- [371] — Ferritin labeling in the fixed muscle capillary. A doubt on the tracer experiments as the basis for the vesicular transport theory, *Arch. Hist. Jap.*, **32**: 81, 1970.
- [372] KOBAYASHI T., KOBAYASHI T., YAMAMOTO K., INATOMI M., Electron microscopic observation on the hypothalamo - hypophyseal system in the rat. I. The ultrafine structure of the contact region between the external layer of the *infundibulum* and *pars tuberalis* of the anterior pituitary, *Endocr. Jap.*, **10**: 69, 1963.
- [373] KOBAYASHI H., OOTA Y., UEMURA H., HIRANO T., Electron microscopic and pharmacological studies on the rat median eminence, *Z. Zellforsch.*, **71**: 387, 1966.
- [374] KOELLE G. B., The histochemical localization of cholinesterases in the central nervous system of the rat, *J. Comp. Neurol.*, **100**: 211, 1954.
- [375] KORNELIUSSEN H., Fenestrated blood capillaries and lymphatic capillaries in rat skeletal muscle, *Cell Tiss. Res.*, **163**: 169, 1975.
- [376] KOSTOWIECKI M., Development of the so - called double - walled blood vessels of the thymus, *Z. Mikr. Anat. Forsch.*, **77**: 401, 1967.
- [377] KRAMARSKY B., SIEGLER R., RICH M. A., Presence of endothelial fenestrations in thymic capillaries of mice, *J. Cell Biol.*, **35**: 464, 1967.
- [378] KREUTZIGER G. O., Freeze - etching of intercellular junctions in the mouse liver, *Proc. 36th Electron Microsc. Soc. Amer.*, Baton Rouge, Louisiana, 234, 1968.
- [379] KROGH A., *Anatomy and Physiology of Capillaries*, Yale Univ. Press, New Haven, 1929.
- [380] KROGH A., VIMTRUP B., The capillaries, [w] *Special Cytology*, red. Cowdry E. V., Paul B. Hoeber Inc., New York, 476, 1932.
- [381] KRSTIĆ R., POŠTIĆ G., Ultrastructure of specific endothelial organelles (SEO) of the iris capillaries in *glaucoma simplex*, *Microvasc. Res.*, **5**: 141, 1973.
- [382] KUFFLER S. W., NICHOLLS J. G., The physiology of neuroglial cells, *Ergebnisse der Physiol.*, **57**: 1, 1966.
- [383] KUHN C., FINKE E. H., The topography of the pulmonary alveolus: scanning electron microscopy using different fixations, *J. Ultrastr. Res.*, **38**: 161, 1972.
- [384] KUHN H. J., MARTI E., The active transport of oxygen and carbon dioxide into the swim - bladder of fish, *J. Gen. Physiol.*, **49**: 1209, 1966.
- [385] KÜHN K., STOLTE H., REALE E., The fine structure of the kidney of the hagfish (*Myxine glutinosa* L.). A thin section and freeze - fracture study, *Cell Tiss. Res.*, **164**: 201, 1975.
- [386] KUHN W., RAMEL A., KUHN H. J., MARTI E., The filling mechanism of the swimbladder. Generation of high gas pressures through hairpin counter-current multiplication, *Experientia*, **19**: 497, 1963.
- [387] KUKLETOVA M., Submicroscopic structure of blood vessels in calf dental pulp, *Scripta Medica*, **43**: 109, 1970.
- [388] KURTZ S. M., The fine structure of the lamina densa, *Lab. Invest.*, **10**: 1189, 1961.
- [389] KURTZ S. M., FELDMAN J. D., Experimental studies of the formation of the glomerular basement membrane, *J. Ultrastr. Res.*, **6**: 19, 1962.
- [390] KURTZ S. M., McMANUS J. F. A., The fine structure of the human glomerular basement membrane, *J. Ultrastr. Res.*, **4**: 81, 1960.
- [391] LACY P. E., Electron microscopy of the normal islet of Langerhans, *Diabetes*, **6**: 498, 1957.

- [392] LAGIOS M. D., The median eminence of the bowfin, *Amia calva* L., Gen. Comp. Endocrinol., **15**: 453, 1970.
- [393] LAI Y. L., The electron microscopic studies on human iris vessels, Bull. Yamaguchi School., **14**: 329, 1967.
- [394] LANDIS E. M., PAPPENHEIMER J. R., Exchange of substances through the capillary walls, [w] Handbook of Physiology, Circulation, red. Hamilton W. H., Dow P., Am. Physiol. Soc., Washington, D. C., 2/961, 1963.
- [395] LANGE W., HALATA Z., Die Ultrastruktur der Kapillaren der Kleinhirnrinde und das perikapilläre Gewebe, Z. Zellforsch., **128**: 83, 1972.
- [396] LASANSKY T., The pathway between hyaloid blood and retinal neurons in the toad. Structural observations and permeability to tracer substances, J. Cell Biol., **34**: 617, 1967.
- [397] LASANSKY A., WALD F. J., The extracellular space in the toad retina as defined by the distribution of ferrocyanide — a light and electron microscope study, J. Cell Biol., **14**: 463, 1963.
- [398] LASCHI R., CASANOVA S., Fenestrae closed by a diaphragm in the endothelium of liver sinusoids, J. de Microscopie, **8**: 1037, 1969.
- [399] LASSEN N. A., TRAP - JENSEN J., Estimation of the fraction of the inter-endothelial slit which must be open in order to account for the observed transcapillary exchange of small hydrophilic molecules in skeletal muscle in man, [w] Capillary Permeability, red. Crone C., Lassen N. A., Academic Press, New York, 647, 1970.
- [400] LATTA H., MAUNSBACH A. B., MADDEN S. C., The centrilobular region of the renal glomerulus studied by electron microscopy, J. Ultrastr. Res., **4**: 455, 1960.
- [401] LAUWERYNS J. M., The blood and lymphatic microcirculation of the lung, [w] Pathology Annual, red. Sommers S. C., Meredith, New York, 1971.
- [402] — Stereomicroscopic funnel-like architecture of pulmonary lymphatic valves, Lymphology, **4**: 125, 1971.
- [403] LAUWERYNS J. M., BOUSSAUW L., The ultrastructure of pulmonary lymphatic capillaries of newborn rabbits and of human infants, Lymphology, **2**: 108, 1969.
- [404] LAZAROW A., SPEIDEL E., The chemical composition of the glomerular basement membrane and its relationship to the production of diabetic complications, [w] Small Blood Vessel Involvement in Diabetes Mellitus, red. Siperstein M. D., Calwell A. R. Sr., Meyer K., Am. Inst. Biol. Sci., Washington D. C., 127, 1964.
- [405] LEAK L. V., Electron microscopic observations on lymphatic capillaries and the structural components of the connective tissue-lymph interface, Microvasc. Res., **2**: 361, 1970.
- [406] — Frozen-fractured images of blood capillaries in heart tissue, J. Ultrastr. Res., **35**: 127, 1971.
- [407] LEE P. A., BLASEY K., GOLDSTEIN I. J., PIERCE G. B., Basement membranes: carbohydrates and x-ray diffraction, Exp. Mol. Pathol., **10**: 323, 1969.
- [408] Le FEVRE P. G., PETERS A. A., Evidence of mediated transfer of monosaccharides from blood to brain in rodents, J. Neurochem., **13**: 35, 1966.
- [409] LEINER M., Über die Bedeutung des Pecten im Vogelauge, Verh. Dtsch. Zool. Ges., Suppl., **15**: 117, 1951.
- [410] LEONHARDT H., Die Neurohypophyse, ein Resorptionsorgan, Acta Neuroveg., **12**: 41, 1955.

- [411] LEUENBERGER P. M., Ultrastructure of the aging retinal vascular system with special reference to quantitative and qualitative changes of capillary basement membranes, *Gerontologia*, **19**: 1, 1972.
- [412] LEUENBERGER P. M., BABIEL J., FULL C., Width of retinal capillary basement membrane of spiny mice (*Acomys cahirinus*) at various ages, *Doc. Ophthalmol.*, **28**: 191, 1970.
- [413] LEUENBERGER P. M., CAMERON D., STAUFFACHER W., RENOLD A. E., BABEL J., Ocular lesions in rats rendered chronically diabetic with streptozotocin, *Ophthalmol. Res.*, **2**: 189, 1971.
- [414] LEUENBERGER P. M., BEAUCHEMIN M. L., BABEL J., Experimental diabetic retinopathy, *Arch. Ophthalmol.*, **34**: 289, 1974.
- [415] LEVER J. D., The subendothelial space in certain endocrine tissues, *J. Biophys. Biochem. Cytol., Suppl.*, **2**: 293, 1956.
- [416] LEVER J. D., LEWIS P. R., BOYD J. D., Observations of the fine structure and histochemistry of the carotid body in the cat and rabbit, *J. Anat.*, **93**: 478, 1959.
- [417] LEWIS W. H., Pinocytosis, *Bull. Johns Hopkins Hosp.*, **49**: 17, 1931.
- [418] LONG J. A., JONES A. L., The fine structure of the zona glomerulosa and the zona fasciculata of the adrenal cortex of the opossum, *Am. J. Anat.*, **120**: 463, 1967.
- [419] LONG D. M., BODENHEIMER T. S., HARTMANN J. F., KLATZO I., Ultrastructural features of the shark brain, *Am. J. Anat.*, **122**: 209, 1968.
- [420] LONGLEY J. B., BANFIELD W. G., BRINDLEY D., Structure of the rete mirabile in the kidney of the rat as seen with the electron microscope, *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, **7**: 103, 1960.
- [421] LOW F. N., Electronmicroscopy of the rat lung, *Anat. Rec.*, **113**: 437, 1952.
- [422] — The pulmonary alveolar epithelium of laboratory mammals and man, *Anat. Rec.*, **117**: 241, 1953.
- [423] — The extracellular portion of the human blood - air barrier and its relation to tissue space, *Anat. Rec.*, **139**: 105, 1961.
- [424] — Extracellular components of the pulmonary alveolar wall, *Arch. Internal Med.*, **127**: 847, 1971.
- [425] LUES G., Die Feinstruktur der Zirbeldrüse normaler, trachtiger und experimentaler beeinflusster Meerschweinchen, *Z. Zellforsch.*, **114**: 38, 1971.
- [426] LUFT J. H., Fine structure of the diaphragm across capillary "pores" in mouse intestine, *Anat. Rec.*, **148**: 307, 1964.
- [427] — Electron microscopy of cell extraneous coats as revealed by ruthenium red, *J. Cell Biol.*, **23**: 54A, 1964.
- [428] — The ultrastructural basis of capillary permeability, [w] *The Inflammatory Processes*, red. Zweifach B., Grant L., McCluskey R., Academic Press, New York, 3/121, 1965.
- [429] — Fine structure of capillary and endocapillary layer as revealed by ruthenium red, *Federation Proc.*, **25**: 1773, 1966.
- [430] LUSE S. A., Histochemical implications of electron microscopy of the central nervous system, *J. Histochem. Cytochem.*, **8**: 398, 1960.
- [431] — Electron microscopic observations of the central nervous system, [w] *Inhibition in the Nervous System and Gammaaminobutyric Acid.*, red. Roberts E., New York, 29, 1960.
- [432] LUSE S. A., HARRIS B., Electron microscopy of the brain in experimental edema, *J. Neurosurg.*, **17**: 439, 1960.

- [433] MAI J. V., EDGERTON V. R., BARNARD R. J., Capillary of red, white and intermediate muscle fibres in trained and untrained guinea pigs, *Experientia*, **26**: 1222, 1970.
- [434] MAJNO G., Ultrastructure of the alveolar membrane, [w] *Handbook of Physiology, Circulation*, red. Hamilton W. F., Dow P., Am. Physiol. Soc. Washington D. C., 64/2293, 1965.
- [435] — Two endothelial "novelties": endothelial contraction; collagenase digestion of the basement membrane, [w] *Vascular Factors and Thrombosis*, red. Brinkhous K. M., F. K. Schattauer Verlag, Stuttgart, New York, 23, 1970.
- [436] MAJNO G., LEVENTHAL M., Pathogenesis of "histamine - type" vascular leakage, *Lancet*, **2**: 99, 1967.
- [437] MAJNO G., PALADE G. E., Studies on inflammation: I. The effect of histamine and serotonin on vascular permeability: an electron microscopic study, *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, **11**: 571, 1961.
- [438] MAJNO G., PALADE G. E., SCHOEFL G. I., Studies on inflammation. II. The site of action of histamine and serotonin along the vascular tree: a topographic study, *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, **11**: 607, 1961.
- [439] MAJNO G., SHEA S. M., LEVENTHAL M., Endothelial contraction induced by histamine - type mediators. An electron microscopic study, *J. Cell Biol.*, **42**: 647, 1969.
- [440] MARCHESI V. T., The passage of colloidal carbon through inflamed endothelium, *Proc. Roy. Soc. Biol.*, **156**: 550, 1962.
- [441] MARCHESI V. T., BARNETT R. J., The demonstration of enzymatic activity in pinocytic vesicles of blood capillaries with the electron microscope, *J. Cell Biol.*, **17**: 547, 1963.
- [442] MARCHESI V. T., FLOREY H. W., Electron microscopic observations on the emigration of leucocytes, *Quart. J. Exptl. Physiol.*, **45**: 343, 1960.
- [443] MARSHALL N. B., Swimbladder structure of deep - sea fishes in relation to their systematics and biology, *Discovery Rep.*, **31**: 1, 1960.
- [444] MARQUART K. - H., CAESAR R., Quantitative study of the so-called pinocytic vesicles in the capillary endothelium, *Virchows Arch. B*, **6**: 220, 1970.
- [445] MATSUDA H., SUGIURA S., Ultrastructure of "tubular body" in the endothelial cells of the ocular blood vessels, *Invest. Ophthalmol.*, **9**: 919, 1970.
- [446] MATSUI T., Fine structure of the posterior median eminence of the pigeon, *Columba livia domestica*, *J. Fac. Sci. Univ. Tokyo*, **11**: 49, 1966.
- [447] MATSUSAKA T., Undescribed endothelial processes of the choriocapillaries extending to the retinal pigment epithelium of the chick, *Br. J. Ophthalmol.*, **52**: 887, 1968.
- [448] — Ultrastructural differences between the choriocapillaries and retinal capillaries on the human eye, *Jap. J. Ophthalmol.*, **14**: 59, 1970.
- [449] — Tridimensional views of the relationship of pericytes to endothelial cells of capillaries in the human choroid and retina, *J. Electr. Micr.*, **24**: 13, 1975.
- [450] — Normal and dynamic aspects of Bruck's lamina as revealed by ruthenium red staining, *Jap. J. Ophthalmol.*, **19**: 166, 1975.
- [451] MATSUSHIMA S., REITER R. J., Comparative ultrastructural studies of the pineal gland of rodents, [w] *Ultrastructure of Endocrine and Reproductive Organs*, red. Hess M., J. Wiley and Sons, New York, 335, 1975.
- [452] — Ultrastructural observations of pineal gland capillaries in four rodent species, *Am. J. Anat.*, **143**: 265, 1975.
- [453] MATSUZAWA T., KUROSUMI K., The ultrastructure, morphogenesis and

- histochemistry of the sweat glands in the rat foot pads as revealed by electron microscopy, *J. Electronmicroscopy*, **12**: 175, 1963.
- [454] MATTHEWS J. L., DORMAN H. I., BISHOP J. G., Fine structure of the dental pulp, *J. Dent. Res.*, **38**: 940, 1959.
- [455] MAUL G. G., Structure and formation of pores in fenestrated capillaries, *J. Ultrastr. Res.*, **36**: 768, 1971.
- [456] MAYERSON H. S., WOLFRAM C. G., SHIRLEY H. H. Jr., WASSERMAN K., Regional differences in capillary permeability, *Am. J. Physiol.*, **198**: 155, 1960.
- [457] MAYNARD E. A., SCHULTZ R. L., PEASE D. C., Electron microscopy of the vascular bed of rat cerebral cortex, *Am. J. Anat.*, **100**: 409, 1957.
- [458] McKINNEY R. Jr., PANNER B. J., Regenerating capillary basement membrane in skeletal muscle wounds. Ultrastructural and histochemical study, *Lab. Invest.*, **26**: 100, 1972.
- [460] MEYRICK B., REID L., The alveolar brush cell in rat lung — a third pneumocyte, *J. Ultrastr. Res.*, **23**: 71, 1968.
- [461] MICHEL C. C., Direct observations of sites of permeability to ions and small molecules in mesothelium, [w] *Capillary Permeability*, red. Crone C., Lassen N. A., Academic Press, New York, 628, 1970.
- [462] MICHIELSEN P., *De intercapillaire cellen de glomerulus*, Presses Acad. Européennes, Bruxelles, 1962.
- [463] MIKAMI S., OKSCHE A., FARNER D. S., VITUMS A., Fine structure of the vessels of the hypophysial portal system of the white-crowned sparrow, *Zonotrichia leucophrys gambelii*, *Z. Zellforsch.*, **106**: 155, 1970.
- [464] MILLER F., Orthologie und Pathologie der Zelle im elektronenmikroskopischen Bild, *Verhandl. deut. Ges. Pathol.*, **42**: 261, 1958.
- [465] — Hemoglobin absorption by the cells of the proximal convoluted tubule in mouse kidney, *J. Biophysic. Biochem. Cytol.*, **8**: 689, 1960.
- [466] MILLER W. S., The structure of the lung, *J. Morph.*, **8**: 165, 1893.
- [467] MILOFSKY A. H., The fine structure of the pineal in the rat, with special reference to parenchyma, *Anat. Rec.*, **127**: 435, 1957.
- [468] MINOT C. S., On a hitherto unrecognized form of blood circulation without capillaries in the organs of *Vertebrata*, *Proc. Boston Soc. Nat. Hist.*, **29**: 185, 1900.
- [469] MISSOTTEN L., Étude des capillaires de la rétine et de la choriocapillaire au microscope électronique, *Ophthalmologica*, **144**: 1, 1962.
- [470] MOFFAT D. B., The fine structure of the blood vessels of the renal medulla with particular reference to the control of the medullary circulation, *J. Ultrastr. Res.*, **19**: 532, 1967.
- [471] MOFFAT D. B., FOURMAN J., The vascular pattern of the rat kidney, *J. Anat.*, **97**: 543, 1963.
- [472] MOLLER P. C., PHILPOTT Ch. W., The circulatory system of *Amphioxus* (*Branchiostoma floridae*). I. Morphology of the major vessels of the pharyngeal area, *J. Morph.*, **139**: 389, 1973.
- [473] MØLLGÅRD K., SAUNDERS N. R., Complex tight junctions of epithelial and of endothelial cells in early foetal brain, *J. Neurocytol.*, **4**: 453, 1975.
- [474] MONROE B. G., Electron microscopy of the thyroid, *Anat. Rec.*, **116**: 345, 1953.
- [475] MONTESANO R., Junctions between sinusoidal endothelial cells in fetal rat liver, *Am. J. Anat.*, **144**: 387, 1975.

- [476] MONTGOMERY P. O. B., ASHWORTH C. T., FONTAINE P., The camel capillary, *Nature*, **201**: 624, 1964.
- [477] MOORE D. H., RUSKA H., The fine structure of capillaries and small arteries, *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, **3**: 457, 1957.
- [478] MOTTA P., PORTER K. R., Structure of the rat liver sinusoids and associated tissue spaces as revealed by scanning electron microscopy, *Cell Tiss. Res.*, **148**: 111, 1974.
- [479] MOVAT H. Z., FERNANDO N. V., Allergic inflammation. I. The earliest fine structural changes at the blood tissue barrier during antigen - antibody interaction, *Am. J. Pathol.*, **42**: 41, 1963.
- [480] — The fine structure of the terminal vascular bed. IV. The venules and their perivascular cells (pericytes, adventitial cells), *Exp. Molec. Pathol.*, **3**: 98, 1964.
- [481] MOVAT H. Z., STEINER J. W., HUHNS D., The fine structure of the glomerulus in acute glomerulonephritis, *Lab. Invest.*, **11**: 117, 1962.
- [482] MUELLER C. B., The structure of the renal glomerulus, *Am. Heart J.*, **55**: 304, 1958.
- [483] MUGNAINI E., WALBERG F., The fine structure of the capillaries and their surroundings in the cerebral hemispheres of *Myxine glutinosa* (L.), *Z. Zellforsch.*, **66**: 333, 1965.
- [484] MUIR A. R., PETERS A., Quintuple - layered membrane junctions at terminal bars between endothelial cells, *J. Cell Biol.*, **12**: 443, 1962.
- [485] MUNGER B. L., Intercellular spaces in the posterior pituitary as related to the type of preservation, *J. Cell Biol.*, **31**: 79A, 1966.
- [486] MUNGER B. L., ROTH S. I., The cytology of the normal parathyroid gland of man and virgin deer: a light and electron microscopic study with morphologic evidence of secretory activity, *J. Cell Biol.*, **16**: 379, 1963.
- [487] MUNROE J. S., SHIPKEY F., ERLANDSON R. A., WINDLE W. F., Tumors induced in juvenile and adult primates by chicken sarcoma virus, *Nat. Cancer Inst. Monogr.*, **17**: 356, 1964.
- [488] MURAKAMI M., BAN F., Über die Vitalfärbung der neurosekretorischen Zellen im Hypothalamus des *Gecko Japonicus*, *Kurume Med. J.*, **3**: 129, 1956.
- [489] MURAKAMI M., NAKAYAMA N., TANAKA H., Fine structure of the perivascular space of the *Gecko Japonicus* subcommissural organ, *Experientia*, **25**: 522, 1969.
- [490] NAKAJIMA Y., PAPPAS G. D., BENNETT M. V. L., The fine structure of the supramedullary neurons of the puffer with special reference to endocellular and pericellular capillaries, *Am. J. Anat.*, **116**: 471, 1965.
- [491] NELSON E., BLINZINGER K., HAGER H., Electron microscopic observations on subarachnoid and perivascular spaces of the Syrian hamster brain, *Neur.*, **11**: 285, 1961.
- [492] NICKEL E., GRIESHABER E., Elektronenmikroskopische Darstellung der Muskelkapillaren im Gefrierätzbild, *Z. Zellforsch.*, **95**: 445, 1965.
- [493] OBERLING C., GAUTIER A., BERNHARD W., La structure des capillaires glomérulaires vue au microscope électronique, *Presse Méd.*, **59**: 938, 1951.
- [494] ODLAND G. F., The fine structure of the interrelationship of cells in the human epidermis, *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, **4**: 529, 1958.
- [495] — The fine structure of cutaneous capillaries, [w] *Advances in Biology of*

- Skin. Blood Vessels and Circulation, red. Montagna W., Ellis R. E., Pergamon Press, New York, 57, 1961.
- [496] OLEŃDZKA - SŁOTWIŃSKA H., Ultrastruktura a przepuszczalność barier tkankowych. Badania w mikroskopie elektronowym z zastosowaniem wyznaczników cytochemicznych, *Ann. Acad. Med. Stet., Supl.* 5: 1, 1972.
- [497] OLSSON Y., Studies on vascular permeability in peripheral nerves. I. Distribution of circulatory fluorescent serum albumin in normal, crushed and sectioned rat sciatic nerve, *Acta Neuropath.*, 7: 1, 1966.
- [498] — Topographical differences in the vascular permeability of the peripheral nervous system, *Acta Neuropath.*, 10: 26, 1968.
- [499] — Studies on vascular permeability i peripheral nerves. IV. Distribution of intravenously injected protein tracers in the peripheral nervous system of various species, *Acta Neuropath.*, 17: 114, 1971.
- [500] OLSSON Y., HASSMAN K. A., Fine structural localization of exudated protein tracers in the brain, *Acta Neuropath.*, 16: 103, 1970.
- [501] OLSSON Y., REESE T. S., Inaccessibility of the endoneurium of mouse sciatic nerve to exogenous proteins, *Anat. Rec.*, 163: 319, 1969.
- [502] OLSSON Y., CROWELL R. M., KLATZO I., The blood - brain barrier to protein tracers in focal cerebral ischemia and infarction caused by occlusion of the middle cerebral artery, *Acta Neuropath.*, 18: 89, 1971.
- [503] OOTA Y., KOBAYASHI H., NISHIOKA R. S., BERN H. A., Relationship between neurosecretory axon and ependymal terminals on capillary walls in the median eminence of several vertebrates, *Neuroendocrinology*, 16: 127, 1974.
- [504] ORCI L., MATTER A., ROUILLER Ch., A comparative study of freeze - each replicas and thin sections of rat liver, *J. Ultrastr. Res.*, 35: 1, 1971.
- [505] ORCI L., STAUFFACHER W., AMHERDT M., PICTET R., RENOLD A. E., ROUILLER C., The kidney of spiny mice (*Acomys cahirinus*): Electron microscopy of glomerular changes associated with aging and tubular glycogen accumulation during hyperglycemia, *Diabetologia*, 6: 343, 1970.
- [506] O'RAHILLY R., MEYER D. B., The development and histochemistry of the pecten oculi, [w] *The Structure of the Eye*, red. Smelser G. K., Academic Press, New York, London, 207, 1961.
- [507] OSAKO S., HILDING D. A., Electron microscopic studies of capillary permeability in normal and Ames waltzer deaf mice, *Acta Oto - laryng.*, 71: 365, 1971.
- [508] OŠTÁDAL B., SCHIEBLER T. H., Die terminale Strombahn im Herzen der Schildkröte (*Testudo Hermannii*), *Z. Anat. Entwickl. - Gesch.*, 134: 111, 1971.
- [509] — Über die terminale Strombahn in Fischherzen, *Z. Anat. Entwickl. - Gesch.*, 134: 101, 1971.
- [510] OTSUKA N., TAKAHASHI S., MIYAWAKI K., Über den Befund der Vitalfärbung im Hypothalamus - Hypophysensystem, *Arch. Hist. Jap.*, 11: 11, 1956.
- [511] PAGE I. H., LEWIS L. A., PLAHL G., The lipoprotein composition of dog lymph, *Circulation Res.*, 1: 87, 1953.
- [512] PAK POY R. K. F., ROBERTSON J. S., Electron microscopy of the avian renal glomerulus, *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, 3: 183, 1957.
- [513] PALADE G. E., Fine structure of blood capillaries, *J. Appl. Physics*, 24: 1424, 1953.

- [514] — An electron microscope study of the mitochondrial structure, *J. Histochem. Cytochem.*, **1**: 188, 1953.
- [515] — Transport in quanta across the endothelium of blood capillaries, *Anat. Rec.*, **130**: 467, 1958.
- [516] — Transport in quanta across the endothelium of blood capillaries, *Anat. Rec.*, **136**: 254, 1960.
- [517] — Blood capillaries of the heart and other organs, *Circulation*, **24**: 368, 1961.
- [518] PALADE G. E., BRUNS R. R., Structure and function in normal muscle capillaries, [w] *Small Blood Vessels Involvement in Diabetes Mellitus*, red. Siperstein M. D., Colwell A. R., Meyer K., Am. Inst. Biol. Sci., Washington, D. C., 45, 1964.
- [519] — Structural modulation of plasmalemmal vesicles, *J. Cell Biol.*, **37**: 633, 1968.
- [520] PALAY S. L., An electron microscope study of the neurohypophysis in normal, hydrated and dehydrated rats, *Anat. Rec.*, **121**: 348, 1955.
- [521] — The fine structure of the neurohypophysis, [w] *Ultrastructure and Cellular Chemistry of Neural Tissue*, red. Waelsch H. Paul B. Hoeber, New York, 2/31, 1957.
- [522] PALAY S. L., KARLIN L. J., An electron microscopic study of the intestinal villus. I. The fasting animal., *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, **5**: 363, 1959.
- [523] PALAY S. L., MCGEE - RUSSEL S. M., GORDON S., GRILLO M. A., Fixation of neural tissues for electron microscopy by perfusion with solutions of osmium tetroxide, *J. Cell Biol.*, **12**: 385, 1962.
- [524] PALMER A. C., ELLERKER A. R., Histochemical localization of cholinesterases in the brain stem of sheep, *Quar. J. Exp. Physiol.*, **46**: 344, 1961.
- [525] PAPPAS G. D., PURPURA D. P., Electron microscopy of immature human and feline neocortex, [w] *Progress in Brain Research*, red. Purpura D. P., Schade J. P., Elsevier, New York, 4/126, 1964.
- [526] PAPPENHEIMER J. R., Passage of molecules through the capillary walls, *Physiol. Rev.*, **33**: 387, 1953.
- [527] PAPPENHEIMER J. R., SOTO - RIVERA A., Effective osmotic pressure of the plasma proteins and other quantities associated with the capillary circulation in the hindlimbs of cats and dogs, *Am. J. Physiol.*, **152**: 471, 1948.
- [528] PAPPENHEIMER J. R., RENKIN E. M., BORRERO L. M., Filtration, diffusion and molecular sieving through peripheral capillary membranes. A contribution to the pore theory of capillary permeability, *Am. J. Physiol.*, **167**: 13, 1951.
- [529] PARI G. A., Über die Verwendbarkeit vitaler Karmineinspritzungen für die pathologische Anatomie, *Frankfurt Z. Pathol.*, **4**: 1, 1910.
- [530] PARKS H. F., On the fine structure of the parotid gland of mouse and rat, *Am. J. Anat.*, **108**: 303, 1961.
- [531] PARPART A. K., WHIPPLE A. O., CHANG J., The microcirculation of the spleen of the mouse, *Angiology*, **6**: 350, 1955.
- [532] PEACHEY L. D., RASMUSSEN H., Structure of the tead's urinary bladder as related to its physiology, *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, **10**: 529, 1961.
- [533] PEAKER M., LINZELL J. L., *Salt Glands in Birds and Reptiles*, Cambridge Univ. Press, Cambridge, London, New York, Melbourne, 1975.
- [534] PEASE D. C., Marrow cells seen with the electron microscope after ultrathin sectioning, *Rev. Hématol.*, **10**: 300, 1955.

- [535] — Electron microscopy of the vascular bed of the kidney cortex, *Anat. Rec.*, **121**: 701, 1955.
- [536] — Fine structure of the kidney seen by electron microscopy, *J. Histochem. Cytochem.*, **3**: 295, 1955.
- [537] — An electron microscopic study of red bone marrow, *Blood*, **11**: 501, 1956.
- [538] — The basement membrane: substratum of histological order and complexity, [w] *Fourth Int. Conf. on Electronmicroscopy*, Springer Verlag, Berlin, 2/139, 1960.
- [539] — Renal circulation. Microscopic and submicroscopic anatomy, [w] *Blood Vessels and Lymphatics*, red. Abramson D. I., Academic Press, New York and London, 395, 1962.
- [540] PEASE D. C., PAULE W. J., Electron microscopy of elastic arteries; the thoracic aorta of the rat, *J. Ultrastr. Res.*, **3**: 469, 1960.
- [541] PEASE D. C., SCHULTZ R. L., Electron microscopy of rat cranial meninges, *Am. J. Anat.*, **102**: 301, 1958.
- [542] PEREIRA G., CLERMONT Y., Distribution of an web - containing epithelial reticular cells in the rat thymus, *Anat. Rec.*, **169**: 613, 1971.
- [543] PERL W., Modified filtration - permeability model of transcapillary transport — a solution of the Pappenheimer pore puzzle?, *Microvasc. Res.*, **3**: 233, 1971.
- [544] PETERS A., Plasma membrane contacts in the central nervous system, *J. Anat.*, **96**: 237, 1962.
- [545] PIETRA G. G., SZIDON J. P., LEVENTHAL M. M., FISHMAN M. M., Hemoglobin as a tracer in hemodynamic pulmonary edema, *Science*, **166**: 1643, 1969.
- [546] PINKEL D., Ultrastructure of human fetal thymus, *Am. J. Dis. Child.*, **115**: 222, 1968.
- [547] PLENK H., Über argyrophile Fasern (Gitterfasern) und ihre Bildungszellen, *Ergeb. Anat. Entwicklungsgesch.*, **27**: 302, 1927.
- [548] — Perizyten an Kapillaren des Zentralnervensystems, *Anat. Anz.*, **66**: 369, 1928.
- [549] POLENOV A. I., BELENKII M. A., Electron microscopic investigation of relationship between neurosecretory elements and capillaries in neurohypophysis in albino mice, *Tsitologiya*, **6**: 346, 1964.
- [550] POLICARD A., COLLET A., GILTAIRE - RALYTE L., Etude au microscope électronique de la cellule alvéolaire de Mammifère, *C. R. Acad. Sci.*, **239**: 573, 1954.
- [551] POLICARD A., COLLET A., PREGERMAIN S., Apports de la microscopie électronique à la connaissance histophysiologique de la paroi alvéolaire, *J. Physiol. Paris*, **48**: 687, 1956.
- [552] — Étude au microscope électronique des capillaires pulmonaires, *Acta anat.*, **30**: 624, 1957.
- [553] — Recherches au microscope électronique sur les cellules pariétales alvéolaires du poumon des mammifères, *Z. Zellforsch.*, **50**: 561, 1959.
- [554] PUDNEY B. J., CASLEY - SMITH J. R., Differences in the numbers of fenestrae between the arterial and venous ends of capillaries in the adrenal cortex, *Experientia*, **26**: 398, 1970.
- [555] PURTSCHER E., Elektronenmikroskopische Untersuchungen zur Unterscheidung der Gefässadventitia von der Gefässscheide in der menschlichen Iris, *A. v. Graefes Arch. Klin. Exp. Ophthal.*, **170**: 349, 1966.

- [556] RACHMANOW A., Beiträge zur vitalen Färbung des Zentralnervensystems, *Folia Neurobiol.*, **7**: 750, 1913.
- [557] RASCOL M., IZARD J., La jonction cortico - pie - mérienne et la pénétration des vaisseaux dans le cortex cérébral chez l'Homme. Structure et ultrastructure, *Z. Zellforsch.*, **123**: 337, 1972.
- [558] RAVIOLA E., KARNOVSKY M. J., Evidence for a blood - thymus barrier using electron - opaque tracers, *J. Exp. Med.*, **136**: 446, 1972.
- [559] RAVIOLA E., RAVIOLA G., A light and electron microscopic study of the pecten of the pigeon eye, *Am. J. Anat.*, **120**: 427, 1967.
- [560] REESE T. S., KARNOVSKY M. J., Fine structural localization of a blood - brain barrier to exogenous peroxidase, *J. Cell Biol.*, **34**: 207, 1967.
- [561] RENKIN E. M., Transport of large molecules across capillary walls, *Physiologist*, **7**: 13, 1964.
- [562] RENKIN E. M., PAPPENHEIMER J. R., Wasserdurchlässigkeit und Permeabilität der Kapillarwände, *Ergebn. Physiol.*, **49**: 59, 1957.
- [563] — Exchange of substances through the capillary walls, [w] *Handbook of Physiology, Circulation*, red. Hamilton W. F., Dow P., Am. Physiol. Soc., Washington, D. C., 2/961, 1963.
- [564] RENKIN E. M., CARTER R. D., JOYNER W. L., Mechanism of the sustained action of histamine and bradykinin on transport of large molecules across capillary walls in the dog paw, *Microvasc. Res.*, **7**: 49, 1974.
- [565] REYNERS H., GIANFELICI de REYNERS E., JADIN J. M., MAISIN J. R., An ultrastructural quantitative method for the evaluation of the permeability to horseradish peroxidase of cerebral cortex endothelial cells of the rat, *Cell Tiss. Res.*, **157**: 93, 1975.
- [566] REYNOLDS D. G., BRIM J., SHEEHY T. W., The vascular architecture of the monkey (*Macaca mulatta*), *Anat. Rec.*, **159**: 211, 1967.
- [567] RHODIN J., Correlation of ultrastructural organization and function in normal and experimentally changed proximal convoluted tubule cells of the mouse kidney, Thesis. Dept. of Anatomy, Karolinska Institutet, Stockholm 1954.
- [568] — Electron microscopy of the glomerular capillary wall, *Exp. Cell Res.*, **8**: 572, 1955.
- [569] — Electron microscopy of the kidney, *Am. J. Med.*, **24**: 661, 1958.
- [570] — The fine structure of vascular walls in mammals with special reference to the smooth muscle component, *Physiol. Rev.*, *Suppl.* **5**: 48, 1962.
- [571] — The diaphragm of capillary endothelial fenestrations, *J. Ultrastr. Res.*, **6**: 171, 1962.
- [572] — *An Atlas of Ultrastructure*, Saunders, Philadelphia, 1963.
- [573] — Ultrastructure of mammalian venous capillaries, venules, and small collecting veins, *J. Ultrastr. Res.*, **25**: 452, 1968.
- [574] — Fine structure of capillaries, [w] *Topics in the Study of Life, The Bio Source Book*, red. Ris H., Harper and Row, New York, 215, 1971.
- [575] — *Histology. A text and atlas*, Oxford Univ. Press, New York, London, Toronto, 1974.
- [576] RIEDEL H., FROMME H. G., TALLEN B., Elektronenmikroskopische Untersuchungen zur Frage der Kapillarmorphologie in der menschlichen Zahnpulpa, *Arch. Oral Biol.*, **11**: 1049, 1966.
- [577] RINEHART J. F., Fine structure of renal glomerulus as revealed by electron microscopy, *A. M. A. Arch. Pathol.*, **59**: 439, 1955.

- [578] RINEHART J. F., FARQUHAR M. G., The fine vascular organization of the anterior pituitary gland. An electron microscopic study with histochemical correlations, *Anat. Rec.*, **121**: 207, 1955.
- [579] RINGVOLD A., Light and electron microscopy of the wall of iris vessels in eyes with and without exfoliation syndrome (Pseudoexfoliation of the lens capsula), *Virchows Arch. Abt. A. Pathol. Anat.*, **349**: 1, 1970.
- [580] RINNE U. K., ARSTILA A. U., Ultrastructure of the neurovascular link between the hypothalamus and anterior pituitary gland in the median eminence of the rat, *Neuroendocrinology*, **1**: 214, 1965/1966.
- [581] RIVERA - POMAR J. M., Die Ultrastruktur der Kapillaren in der Area Postrema der Katze, *Z. Zellforsch.*, **75**: 542, 1966.
- [582] ROBERTSON J. D., Ultrastructure of excitable membranes and the crayfish median - giant synapse, *Ann. New York Acad. Sci.*, **94**: 339, 1961.
- [583] ROCHA e SILVA M., Action of histamine upon circulatory apparatus, [w] *Handbook of Experimental Pharmacology*, 238, 1966.
- [584] RODRIGUEZ L. A., Experiments on the histologic locus of the hematoencephalic barrier, *J. Comp. Neurol.*, **102**: 27, 1955.
- [585] RÖHLICH P., WENGER T., Elektronenmikroskopische Untersuchungen am *Organon vasculosum laminae terminalis* der Ratte, *Z. Zellforsch.*, **102**: 483, 1969.
- [586] ROHR V. U., Zum Feinbau des Subfornikal - organs der Katze. I. Der Gefäß - Apparat, *Z. Zellforsch.*, **73**: 246, 1966.
- [587] ROIG C. E., BURGOS M. H., Contribution to the study of leucocyte migrations, *Quart. J. Exp. Physiol.*, **49**: 129, 1964.
- [588] ROMIJN H. J., Structure and innervation of the pineal gland of the rabbit, *Oryctolagus cuniculus* (L.). II. An electron microscopic investigation of the pinealocytes, *Z. Zellforsch.*, **141**: 545, 1973.
- [589] ROSEN W. C., BASOM C. R., GUNDERSON L. L., A technique for the light microscopy of tissues fixed for fine structure, *Anat. Rec.*, **158**: 223, 1967.
- [590] ROSENBLUTH J., WISSIG S. L., The distribution of exogenous ferritin in toad spinal ganglia and the mechanism of its uptake by neurons, *J. Cell Biol.*, **23**: 307, 1964.
- [591] ROSS L. L., Electron microscopic observations of the carotid body of the cat, *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, **6**: 253, 1959.
- [592] ROSS R., BENDITT E. P., Wound healing and collagen formation. V. Quantitative electron microscope radioautographic observations of proline - H³ utilization by fibroblasts, *J. Cell Biol.*, **27**: 83, 1965.
- [593] ROTHBARD S., WATSON R. F., Comparison of reactions of antibodies to rat collagen and to rat kidney in the basement membranes of rat renal glomeruli, *J. Exp. Med.*, **129**: 1145, 1969.
- [594] ROUGET C., Mémoire sur le developpement la structure et les propriétés physiologiques des capillaries sanguins et lymphatiques, *Arch. Physiol. Norm. Pathol.*, **5**: 603, 1873.
- [595] RÜTTNER J. R., VOGEL A., Elektronenmikroskopische Untersuchungen an der Lebersinusoidwand, *Verhandl. Deut. Ges. Pathol.*, **41**: 314, 1957.
- [596] RYAN S. F., The structure of the interalveolar septum of the mammalian lung, *Anat. Rec.*, **165**: 467, 1969.
- [597] RYAN U. S., RYAN J. W., SMITH D. S., WINKLER H., Fenestrated endo-

- thelium of the adrenal gland: freeze - fracture studies, *Tissue and Cell*, **7**: 181, 1975.
- [598] SAARI M., Fine structure of the microcirculatory bed of the pig iris, *Ann. Med. Exp. Biol. Fenniae*, **50**: 12, 1972.
- [599] SAID S. I., The lung as a metabolic organ, *New Engl. J. Med.*, **279**: 1330, 1968.
- [600] SANTOLAYA R. C., BERTINI F., Fine structure of endothelial cells of vertebrates. Distribution of dense granules, *Z. Anat. Entwickl. - Gesch.*, **131**: 148, 1970.
- [601] SARBACKER J. D., MICHELSON H. E., ZELICKSON A. S., Tubular cytoplasmic organelle in sarcoidosis, *Acta Derm. Venereol.*, **48**: 53, 1968.
- [602] SATCHELL G. H., *Circulation in Fishes*, Cambridge Univ. Press, 1971.
- [603] SAWADE A., Gehören die Kapillar - Endothelien des Hirnanhangs zum retikulo - endothelialen System?, *Frankfurt Z. Pathol.*, **37**: 506, 1929.
- [604] SCHALTENBRAND G., BALLEY P., Die perivaskuläre Plagiamembrane des Gehirns, *J. Psychol. Neurol.*, **35**: 199, 1928.
- [605] SCHARRER E., Gefäß und Nervenzelle, *Ztschr. Fd. D. Ges. Neurol. Psychiat.*, **158**: 93, 1937.
- [606] — The functional significance of the capillary bed in the brain of the opossum, *Anat. Rec.*, **75**: 319, 1939.
- [607] SCHARRER E., The blood vessels of the nervous tissue, *Quart. Rev. Biol.*, **19**: 308, 1944.
- [608] — The capillary bed of the central nervous system of certain invertebrates, *Biol. Bull.* **87**: 52, 1944.
- [609] — Functional organization of the brain, [w] *Neuropharmacology*, red. Abramson H. A., The Josiah Macy Jr. Foundation, New York, 90, 1954.
- [610] SCHARRER E., SCHARRER B., Sutory cells within the hypothalamus, *Assoc. Res. Nerw. Ment. Dis.*, **20**: 170, 1940.
- [611] SCHLIPKOETER H. W., Elektronenoptische Untersuchungen ultradünner Lungenschnitte, *Deut. Med. Wochschr.*, **79**: 1658, 1954.
- [612] SCHMIDT - NIELSON K., *How animals work*, Cambridge Univ. Press, 1972.
- [613] SCHNEEBERGER - KEELEY E. E., KARNOVSKY M. J., The ultrastructural basis of alveolar - capillary membrane permeability to peroxidase used as a tracer, *J. Cell Biol.*, **37**: 781, 1968.
- [614] SCHNEEBERGER E. E., KARNOVSKY M. J., The influence of intravascular fluid volume on the permeability of newborn and adult mouse lungs to ultrastructural protein tracers, *J. Cell Biol.*, **49**: 319, 1971.
- [615] SCHÖBL J., Über eine eigenthümliche Schleifenbildung der Blutgefäße im Gehirn und Rückenmark der Saurier, *Arch. Mikrosk. Anat. Entw. Mech.*, **15**: 60, 1878.
- [616] — Über die Blutgefäße des cerebrospinalen Nervensystems der Urodelen, *Arch. Mikr. Anat.*, **20**: 87, 1882.
- [617] SCHOEFL G. I., Studies on inflammation. III. Growing capillaries: Their structure and permeability, *Virchows Arch. Parhol. Anat.*, **337**: 97, 1963.
- [618] SCHOLANDER P. E., Secretion of gases against high pressures in the swim bladder of deep sea fishes. II. The rete mirabile, *Biol. Bull.*, **107**: 260, 1954.
- [619] — Counter current exchange. A principle in biology, *Hvalrådets Skrifter*, **44**: 1, 1958.
- [620] SCHOLANDER P. F., KROG J., Countercurrent heat exchange and vascular bundles in sloth, *J. Appl. Physiol.*, **10**: 405, 1957.

- [621] SCHOLANDER P. F., VAN DAM L., Secretion of gases against high pressures in the swimbladder of deep-sea fishes. I. Oxygen dissociation in blood, *Biol. Bull.*, **107**: 247, 1954.
- [622] SCHOLANDER P. F., HOCK P., WALTERS V., JOHNSON F., IRVING L., Heat regulation in some arctic and tropical mammals and birds, *Biol. Bull.*, **99**: 237, 1950.
- [623] SCHULZ H., Elektronenoptische Untersuchungen der normalen Lunge und der Lunge bei Mitralstenose, *Virchows Arch. Pathol. Anat. Physiol.*, **328**: 582, 1956.
- [624] — The submicroscopic anatomy and pathology of the lung, Springer Verlag, Berlin, Göttingen, Heidelberg, 1959.
- [625] SCHULTZ A. L., GRISNER J. T., WADA S., GRANDE F., Absorption of albumen from alveoli of perfused dog lungs, *Am. J. Physiol.*, **207**: 1300, 1964.
- [626] SCOTT R. F., JONES R., DAOUD A. S., ZUMBO O., COULSTON F., THOMAS W. A., Experimental atherosclerosis in rhesus monkeys. II. Cellular elements of proliferative lesions and possible role of cytoplasmic degeneration in pathogenesis as studied by electron microscopy, *Exp. Mol. Pathol.*, **7**: 34, 1967.
- [627] SEAMAN A. R., A correlated light and electron microscope study of the pecten oculi in the adult chicken (*Gallus domesticus*), *Anat. Rec.*, **142**: 277, 1962.
- [628] SEAMAN A. R., HIMELFARB T. M., Correlated ultrafine structural changes of the avian pecten oculi and ciliary body of *Gallus domesticus*, *Am. J. Ophthalm.*, **56**: 278, 1963.
- [629] SEAMAN A. R., STORM H., A correlated light and electron microscope study on the pecten oculi of the domestic fowl (*Gallus domesticus*), *Exp. Eye Res.*, **2**: 163, 1963.
- [630] SEJERSEN P., Convention and diffusion of inert gases in cutaneous, subcutaneous, and skeletal muscle tissue, [w] *Capillary Permeability*, red. Crone C., Lassen N. A., Academic Press, New York, 586, 1970.
- [631] SENCZIK Ju. I., Wzaimootnoszenija niejrosekretornych kletok supraopticzeskowo jadra s kapilljarami, *Dokł. Ak. Nauk SSSR*, **200**: 745, 1971.
- [632] SENDEL A., STOEJNER P., Golgi origin of tubular inclusions in endothelial cells, *J. Cell Biol.*, **44**: 223, 1970.
- [633] SETCHELL B. P., WAITERS G. M. H., Pulse attenuation and countercurrent heat exchange in the internal spermatic artery of some Australian marsupials, *J. Reprod. Fert.*, **20**: 165, 1969.
- [634] SHABO A. L., KENYON K. R., FRANKLIN R. M., Electron microscopic localization of a blood-tear barrier to tracer protein in the primate lacrimal gland, *Lab. Invest.*, **28**: 185, 1973.
- [635] SHEA S. M., BOSSERT W. H., Vesicular transport across endothelium: a generalized diffusion model, *Microvasc. Res.*, **6**: 305, 1973.
- [636] SHEA S. M., KARNOVSKY M. J., Brownian motion: a theoretical explanation for movement of vesicles across the endothelium, *Nature*, **212**: 353, 1966.
- [637] SHEA S. M., KARNOVSKY M. J., BOSSERT W. H., Vesicular transport across endothelium: simulation of a diffusion model, *J. Theor. Biol.*, **24**: 30, 1969.
- [638] SHERIDAN M. N., REITER R. J., The fine structure of the pineal gland in the pocket gopher, *Geomys bursarius*, *Am. J. Anat.*, **136**: 363, 1973.
- [639] SHIMADA I., Studies on the reticulo-endothelial system of the hypophysis, *Niigata Med. J.*, **67**: 630, 1952.

- [640] SHIRAHAMA T., COHEN A. S., The role of mucopolysaccharides in vesicle architecture and endothelial transport, *J. Cell Biol.*, **52**: 198, 1972.
- [641] SHIVELY J. N., EPLING G. P., Fine structure of the canine eye: Iris, *Am. J. Vet. Res.*, **30**: 13, 1969.
- [642] SIEGWART B., GEHR P., GIL J., WEIBEL E. R., Morphometric estimation of pulmonary diffusion capacity. IV. The normal dog lung, *Resp. Physiol.*, **13**: 141, 1971.
- [643] SIMIONESCU N., SIMIONESCU M., PALADE G. E., Permeability of intestinal capillaries. Pathway followed by dextrans and glycogens, *J. Cell Biol.*, **53**: 365, 1972.
- [644] — Permeability of muscle capillaries to exogenous myoglobin, *J. Cell Biol.*, **57**: 424, 1973.
- [645] — Morphometric data on the endothelium of blood capillaries, *J. Cell Biol.*, **60**: 128, 1974.
- [646] — Permeability of muscle capillaries to small heme-peptides. Evidence for the existence of patent transendothelial channels, *J. Cell Biol.*, **64**: 586, 1975.
- [647] SIMON G., Ultrastructure des capillaires, *Angiologica*, **2**: 370, 1965.
- [648] — Ueber die Struktur der Kapillarwand. Elektronenmikroskopische Untersuchung, *Muench. Med. Wochschr.*, **108**: 1281, 1966.
- [649] SIMON G., CHATELANAT F., Ultrastructure of the normal and pathological glomerulus, [w] *The Kidney. Morphology, Biochemistry, Physiology*, red. Rouiller Ch., Muller A. F., Academic Press, New York and London, 1/261, 1969.
- [650] SINCLEE G., Über die Zugehörigkeit der Kapillarendothelien des Hirnanhangs zum retikuloendothelialen System. Experimentelle Untersuchung, nebst Bemerkungen zur Vitalfärbung, *Z. Ges. Exp. Med.*, **63**: 223, 1928.
- [651] SIPERSTEIN M. D., UNGER R. H., MADISON L. L., Studies on muscle capillary basement membranes in normal subjects, diabetic and prediabetic patients, *J. Clin. Invest.*, **47**: 1937, 1968.
- [652] SMITH U., RYAN J. W., Substructural features of pulmonary endothelial caveolae, *Tissue and Cell.*, **4**: 49, 1972.
- [653] SMITH U., RYAN J. W., MICHIE D. D., SMITH D. S., Endothelial projections as revealed by scanning electron microscopy, *Science*, **173**: 925, 1971.
- [654] SOBIN S. S., TREMER H. M., FUNG Y. C., Morphometric basis of the sheet-flow concept of the pulmonary alveolar microcirculation in the cat, *Circulation Res.*, **26**: 397, 1970.
- [655] SOROKIN S. P., Respiratory system, [w] *Histology*, red. Greep R. O., McGraw-Hill, New York, 1966.
- [656] SPATZ H., Die Bedeutung der vitalen Färbung für die Lehre von Stoffaustausch zwischen dem Zentralnervensystem und dem Zentralnervensystem und dem übrigen Körper, *Arch. Psychiat. Nervenkrankh.*, **101**: 267, 1933.
- [657] SPECTOR W. G., WILLOUGHBY D. A., Chemical mediators, [w] *The Inflammatory Process*, red. Zweifach B. W., Grant L., McCluskey R. T., Academic Press, New York, 427, 1965.
- [658] SPIRO R. G., Biochemistry of complex polysaccharides in ground substance, [w] *Wound Healing*, red. Levenson S. M., Stein J. M., Grossblatt N., Nat. Ac. Sci. - Nat. Res. Council, Washington, D. C., 75, 1966.
- [659] — Studies on the renal glomerular basement membrane: preparation and chemical composition, *J. Biol. Chem.*, **242**: 1915, 1967.
- [660] STARLING E. H., The influence of mechanical factors on lymph production,

- J. Physiol., **16**: 224, 1894.
- [661] — On the absorption of fluid from the connective tissue spaces, J. Physiol., **19**: 312, 1896.
- [662] STAUBESAND J., Zur Histiophysiologie des Herzbeutels. II. Elektronmikroskopische Untersuchungen über die Passage von Metallsolen durch mesotheliale Membranen, Z. Zellforsch., **58**: 915, 1963.
- [663] STEARNER S. P., SANDERSON M. H., Microvasculature and loose connective tissue in freeze - fracture preparations, Z. Zellforsch., **114**: 301, 1971.
- [664] STEEN J. B., The physiology of the swimbladder in the eel *Anguilla vulgaris*. III. The mechanism of gas secretion, Acta Physiol. Scand., **59**: 221, 1963.
- [665] STEHBENS W. E., Ultrastructure of vascular endothelium in the frog, Quart. J. Exptl. Physiol., **50**: 375, 1965.
- [666] STEHBENS W. E., MEYER E., Ultrastructure of endothelium of the frog heart, J. Anat., **99**: 127, 1965.
- [667] STEHBENS W. E., SILVER M. D., Unusual development of basement membrane about small blood vessels, J. Cell Biol., **26**: 669, 1965.
- [668] STEINSIEPE K. F., WEIBEL E. R., Elektronenmikroskopische Untersuchungen an spezifischen Organellen von Endothelzellen des Frosches (*Rana temporaria*), Z. Zellforsch., **108**: 105, 1970.
- [669] STERN P., The relation of histamine to inflammation, [w] Handbook of Experimental Pharmacology, **18/1**, 892, 1966.
- [670] STERZI G., Die Blutgefäße des Rückenmarks. Untersuchungen über ihre vergleichende Anatomie und Entwicklungsgeschichte, Anat. Hefte Abt. 1, **24**: 1, 1904.
- [671] SUN C. N., GHIDONI J. J., Membrane - bound microtubular and crystalline structures in endothelial cells of normal canine aorta, Experientia, **25**: 301, 1969.
- [672] SUNDERLAND S., The vascular pattern in the central nervous system of the monotremes and Australian marsupials, J. Comp. Neurol., **75**: 123, 1941.
- [673] SUTER E. R., MAJNO G., Ultrastructure of the joint capsule in the rat: presence of two types of capillaries, Nature, **202**: 920, 1964.
- [674] — Passage of lipid across vascular endothelium in newborn rats. An electron microscopic study, J. Cell Biol., **27**: 163, 1965.
- [675] SUZUKI Y., Fenestration of alveolar capillary endothelium in experimental pulmonary fibrosis, Lab. Invest., **21**: 304, 1969.
- [676] TABUCHI H., YAMAMOTO T., Specific granules in the endothelia of blood and lymphatic vessels in the cardiac valves of dogs, Arch. Histol. Jap., **37**: 217, 1974.
- [677] TAKADA M., Fenestrated capillaries seen in most organs of the digestive system, Nagoya Med J., **15**: 29, 1969.
- [678] — Fenestrated venules of the large salivary glands, Anat. Rec., **166**: 605, 1970.
- [679] TAKADA M., HATTORI S., Presence of fenestrated capillaries in the skin, Anat. Rec., **173**: 213, 1972.
- [680] TAKADA M., KATO F., CHAYA I., Capillary endothelial fenestrations of the popliteal lymph nodes of the rabbit, Nagoya Med. J., **12**: 211, 1966.
- [681] TAKAHASHI K., KAWANO A., OTA O., OTSUKA S., Electron microscopic studies of the lung tissue, Tokushima J. Exptl. Med., **8**: 149, 1961.

- [682] TANAKA A., Electron microscopic study of the avian pecten, *Zool., Mag., Tokyo*, **69**: 314, 1960.
- [683] TANI E., EVANS J. P., Electron microscopic studies of cerebral swelling. I. Studies on the permeability of brain capillaries, using ferritin molecules as tracers, *Acta Neuropathol.*, **4**: 507, 1965.
- [684] TAYLOR C. R., The eland and the oryx, *Sci. Am.*, **220**: 88, 1969.
- [685] — Dehydration and heat: effects on temperature regulation of East African ungulates, *Am. J. Physiol.*, **219**: 1136, 1970.
- [686] TAYLOR C. E., GUYTON A. C., BISHOP V. S., Permeability of the alveolar membrane to solutes, *Circulation Res.*, **16**: 353, 1965.
- [687] TENNYSON V. M., PAPPAS G. D., An electron microscope study of ependymal cells of the fetal and early postnatal and adult rabbit, *Z. Zellforsch.*, **56**: 595, 1962.
- [688] THEMANN H., KENKER G., WESTPHOL U., Elektronenmikroskopische Untersuchungen zur Permeation exogener Peroxidase durch das Endothel der Herzmuskelkapillaren, *Cytologie*, **3**: 13, 1971.
- [689] THOENES W., Feinstruktur des normellen und des funktiongestörten Nephron, *Verhadl. Deut. Ges. Pathol.*, **49**: 14, 1965.
- [690] TIGGERS M., TIGGERS J., Extracellular perivascular connective tissue space in the medial terminal nucleus of the accessory optic system in rats, *Z. Zellforsch.*, **125**: 289, 1972.
- [691] TOBIN C. E., Lymphatics in the pulmonary alveoli, *Anat. Rec.*, **120**: 625, 1954.
- [692] TOMITA I., Electron microscopic studies on the fine structure of blood vessels in the human iris, *Acta Soc. Ophthal. Jap.*, **64**: 1447, 1960.
- [693] TOMIYASU U., HIRANO A., ZIMMERMAN H. M., Fine structure of human pituitary adenoma, *Arch. Pathol.*, **95**: 287, 1973.
- [694] TOMLIN S. G., Vesicular transport across endothelial cells, *Biochem. Biophys. Acta*, **183**: 559, 1969.
- [695] TOUSIMIS A. J., FINE B. S., Ultrastructure of the iris. An electron microscopic study, *Am. J. Ophthal.*, **48**: 397, 1959.
- [696] TRAP - JENSEN J., LASSEN N. A., Restricted diffusion in skeletal muscle capillaries in man, *Am. J. Physiol.*, **220**: 371, 1971.
- [697] TRIER J. S., The fine structure of the parathyroid gland, *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, **4**: 13, 1958.
- [698] TS'AO C., SPAET T. H., Ultramicroscopic changes in the rabbit inferior vena cava following partial constriction, *Am. J. Pathol.*, **51**: 789, 1967.
- [699] TSCHIRGI R. D., Protein complexes and the impermeability of the blood-brain barrier to dyes, *Am. J. Physiol.*, **163**: 756P, 1950.
- [700] — The blood-brain barrier, [w] *Biology of Neuroglia*, red. Windle W. F., Charles C. Thomas, Springfield, 1958.
- [701] TYLER W. S., PEARSE A. G. E., Oxidative enzymes of the intraalveolar septum of the rat, *Thorax*, **20**: 149, 1965.
- [702] TYLER W. S., PEARSE A. G. E., RHATIGAN P., Histochemistry of the equine lung: oxidative enzymes of the interalveolar septum, *Am. J. Vet. Res.*, **26**: 960, 1955.
- [703] VAN BREEMEN V. L., CLEMENTI C. D., Silver deposition in the central nervous system and the hematoencephalic barrier studied with the electron microscope, *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, **1**: 161, 1955.
- [704] VEGGE T., An epithelial blood-aqueous barrier to horseradish peroxidase

- in the ciliary processes of the vervet monkey (*Cercopithecus aethiops*), Z. Zellforsch., **114**: 309, 1971.
- [705] — An electron microscopic study of the permeability of iris capillaries to horseradish peroxidase in the vervet monkey (*Cercopithecus aethiops*), Z. Zellforsch., **121**: 74, 1971.
- [706] — A study of the ultrastructure of the small iris vessels in the vervet monkey (*Cercopithecus aethiops*), Z. Zellforsch., **123**: 195, 1972.
- [707] VEGGE T., RINGVOLD A., Ultrastructure of the wall of human iris vessels, Z. Zellforsch., **94**: 19, 1969.
- [708] VENKATACHALAM M. A., GREALLY J. G., Fine structure of glomus tumor: similarity of glomus cells to smooth muscle, Cancer, **23**: 1176, 1969.
- [709] VICK N. A., Skeletal muscle capillary basement membranes in humans, Acta Neuropath., **17**: 1, 1971.
- [710] VILLEGAS G. M., Ultrastructure of the human retina, J. Anat., **98**: 501, 1964.
- [711] VIMTRUP B., Beiträge zur Anatomie der Capillaren. I. Ueber contractile Elemente in der Gefäßwand der Blutcapillaren, Z. Ges. Anat., **65**: 150, 1922.
- [712] VOELLER K., PAPPAS G. D., PURPURA D. P., Electron microscope study of development of cat supperficial neocortex, Exp. Neurol., **7**: 107, 1963.
- [713] VOITKEVICH A. A., DEDOV I. I., Pericapillary space — a zone of functional mediation between blood and tissue cells, Arch. Anat. Gistol. Embriol., **57**: 3, 1969.
- [714] — Subendothelial spaces of capillary blood vessels, Dokl. Akad. Nauk SSSR, **186**: 697, 1969.
- [715] VRACKO R., Skeletal muscle capillaries in diabetes: A quantitative analysis, Circulation, **41**: 271, 1970.
- [716] WARTENBERG H., The mammalian pineal organ: electron microscopic studies on the fine structure of pinealocytes, glial cells and on the perivascular compartment, Z. Zellforsch., **86**: 74, 1968.
- [717] WASSERMAN K., MAYERSON H. S., Dynamics of lymph and protein exchange, Cardiologia, **21**: 296, 1952.
- [718] — Plasma, lymph and urine studies after dextran infusions, Am. J. Physiol., **171**: 218, 1952.
- [719] WEIBEL E. R., Morphometrische Bestimmung von Zahl, Volumen und Oberfläche der Alveolen und Kapillaren der menschlichen Lunge, Z. Zellforsch., **57**: 648, 1962.
- [720] — Morphometry of the Human Lung, Springer and Academic Press, Berlin, Göttingen, Heidelberg, New York, 1963.
- [721] — Morphometrics of the lung, [w] Handbook of Physiology, Respiration, Am. Physiol. Soc., Washington, D. C., 1/285, 1964.
- [722] — Neue cytoplasmatische Komponenten von Endothelzellen, Acta Anat., **59**: 390, 1964.
- [723] — Structure in space and its appearance on sections, [w] Proc. Intern. Congr. Stereology, red. Elias H., Springer, New York, 15, 1967.
- [724] — The ultrastructure of the alveolar - capillary membrane or barrier, [w] The Pulmonary Circulation and Interstitial Space, red. Fishman A. P., Hecht H. H., Univ. of Chicago Press, Chicago, 9, 1969.
- [725] — Stereological principles for morphometry in electron microscopic cytology, Intern. Rev. Cytol., **26**: 235, 1969.

- [726] — Anatomical distribution of air channels, blood vessels, and tissue in the lung, *Panminerva Med.*, 242, 1970.
- [727] — The mystery of "non-nucleated plates" in the alveolar epithelium of the lung explained, *Acta Anat.*, 78: 425, 1971.
- [728] — Stereological techniques for electron microscopic morphology, [w] *Principles and Techniques of Electron Microscopy*, red. Hayat M. A., Van Nostrand Reinhold, New York, 1972.
- [729] — Morphological basis of alveolar-capillary gas exchange, *Physiol. Rev.*, 53: 419, 1973.
- [730] — On pericytes, particularly their existence on lung capillaries, *Microvasc. Res.*, 8: 218, 1974.
- [731] WEIBEL E. R., GIL J., *Morphologie der Alveolaroberfläche*, *Pneumologie*, 144: 159, 1971.
- [732] WEIBEL E. R., GOMEZ D. M., *Architecture of the human lung*, *Science*, 137: 577, 1962.
- [733] WEIBEL E. R., KNIGHT B. W., A morphometric study of the thickness of the pulmonary air-blood barrier, *J. Cell Biol.*, 21: 367, 1964.
- [734] WEIBEL E. R., PALADE G. E., New cytoplasmic components in arterial endothelia, *J. Cell Biol.*, 23: 101, 1964.
- [735] WEISS L., A study of the structure of the splenic sinuses in man and the rat with the light microscope and the electron microscope, *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, 3: 599, 1957.
- [736] — The organization of the connective tissue elements in bone marrow. I. Fat cells, *Anat. Rec.*, 133: 439, 1959.
- [737] — The organization of the connective tissue elements in bone marrow. II. Reticular cells, *Anat. Rec.*, 136: 300, 1960.
- [738] — Electron microscopic observations of the vascular barrier in the cortex of the thymus of the mouse, *Anat. Rec.*, 145: 413, 1963.
- [739] — The structure of bone marrow. Functional interrelationships of vascular and hematopoietic compartments in experimental hemolytic anemia. An electron microscopic study, *J. Morph.*, 117: 467, 1965.
- [740] — Transmural cellular passage in vascular sinuses of rat bone marrow, *Blood.*, 36: 189, 1970.
- [741] WELSCH U., *Enzymhistochemische und feinstrukturelle Beobachtungen am Pecten oculi von Taube (*Columba livia*) und Lachmöwe (*Larus ridibundus*)*, *Z. Zellforsch.*, 132: 231, 1972.
- [742] WENGER T., TÖRK I., *Studies on the organon vasculosum laminae terminalis*. II. Comparative morphology of the *organon vasculosum laminae terminalis* of fishes, amphibia, reptilia, birds and mammals, *Acta biol. Acad. Sci. Hung.*, 19: 83, 1968.
- [743] WESTEMARK P., *Ultrastructure of capillaries and interstitial cells in human pancreatic islets*, *Upsala J. Med. Sci.*, 78: 22, 1973.
- [744] WHITE J. G., CLAWSON C. C., *Blood cells and blood vessels*, [w] *Ultrastructure of Normal and Abnormal Skin*, red. Zelickson A. S., Lea and Febiger, Philadelphia, 261, 1967.
- [745] WIENER J., SPIRO D., *Electron microscope studies in experimental thrombosis*, *Exp. Moles. Path.*, 1: 554, 1962.
- [746] WILLIAMSON J. R., VOGLER N. J., KILO C., *Regional variations in the width of the basement membrane of muscle capillaries in man and giraffe*, *Am. J. Pathol.*, 63: 359, 1971.

- [747] WINGSTRAND K. G., MUNK O., The pecten oculi of the pigeon with particular regard to its function, *Biol., Skr. Dan. Vid. Selsk.*, **14**: 1, 1965.
- [748] WINTHER F. Ø., The permeability of the guinea pig cochlear capillaries to horseshadish peroxidase, *Z. Zellforsch.*, **114**: 193, 1971.
- [749] WISLOCKI G. B., The unusual mode of development of the blood vessels of the opossum's brain, *Anat. Rec.*, **74**: 409, 1939.
- [750] WISLOCKI G. B., CAMPBELL A. C. P., The unusual manner of vascularization of the brain of the opossum, *Anat. Rec.*, **67**: 177, 1937.
- [751] WISLOCKI G. B., KING L. S., The permeability of the hypophysis and hypothalamus to vital dyes, with a study of the hypophyseal vascular supply, *Am. J. Anat.*, **58**: 421, 1936.
- [752] WISLOCKI G. B., LADMAN A. J., The fine structure of the mammalian choroid plexus, [w] *Ciba Foundation Symp. on the Cerebrospinal Fluid*, red. Walstenholme G., O'Conner C., Little, Brown and Co., Boston, **55**, 1952.
- [753] WISLOCKI G. B., LEDUC E. H., Vital staining of the hematoencephalic barrier by silver nitrate and trypan blue, and cytological comparisons of the neurohypophysis, pineal body, area postrema, intercolumnar tubercle, and supraoptic crest, *J. Comp. Neurol.*, **96**: 371, 1952.
- [754] WISSE E., An electron microscopic study of the fenestrated endothelial lining of rat liver sinusoids, *J. Ultrastr. Res.*, **31**: 125, 1970.
- [755] WISSIG S. L., An electron microscope study of the permeability of capillaries in muscle, *Anat. Rec.*, **130**: 467, 1958.
- [756] — The anatomy of secretion in the follicular cells of the thyroid gland: I. The fine structure of the gland in the normal rat, *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, **7**: 419, 1960.
- [757] WITTENBERG J. B., WITTENBERG B. A., The secretion of oxygen into the swimbladder of fish, *J. Gen. Physiol.*, **44**: 527, 1961.
- [758] — Active secretion of oxygen into the eye of fish, *Nature*, **194**: 106, 1962.
- [759] WOLFE D. E., The epiphyseal cell: an electron - microscopic study of its intercellular relationships and intracellular morphology in the pineal body of the albino rat, *Progr. Brain Res.*, **10**: 332, 1965.
- [760] WOLFF J., Beiträge zur Ultrastruktur der Kapillaren in der normalen Grosshirnrinde, *Z. Zellforsch.*, **60**: 409, 1963.
- [761] — Ein Beitrag zur Ultrastruktur der Blutkapillaren: Das nahtlose Endothel, *Z. Zellforsch.*, **64**: 290, 1964.
- [762] — Elektronenmikroskopische Untersuchungen über die Vesikulation im Kapillarendothel. Lokalisation, Variation und Fusion der Vesikel, *Z. Zellforsch.*, **73**: 143, 1966.
- [763] WOLFF J., BÄR T., "Seamless" endothelia in brain capillaries during development of the rat's cerebral cortex, *Brain Res.*, **41**: 17, 1972.
- [764] WOLFF J., MERKER H. - J., Ultrastruktur und Bildung von Poren in Endothel von perösen und geschlossenen Kapillaren, *Z. Zellforsch.*, **73**: 174, 1966.
- [765] WOOD R. L., Intercellular attachment in the epithelium in *Hydra* as revealed by electron microscopy, *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, **6**: 343, 1959.
- [766] — Evidence of species differences in the ultrastructure of the hepatic sinusoid, *Z. Zellforsch.*, **58**: 679, 1963.
- [767] WOODLAND W. N. F., On the structure and function of the gas gland and retia mirabilia associated with the gas bladder of some teleostean fishes, with notes on the teleost pancreas, *Proc. Zool. Soc. London* **1**: 183, 1911.

- [768] WOODSIDE G. L., DALTON A. J., Ultrastructure of lung tissue from newborn and embryo mice, *J. Ultrastr. Res.*, 2: 28, 1958.
- [769] WORTHINGTON W. C. Jr., The blood vessels of the pituitary and the thyroid, [w] *Blood Vessels and Lymphatics*, red. Abramson D. I., Academic Press, New York and London, 428, 1962.
- [770] YAMADA E., The fine structure of the renal glomerulus of the mouse, *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, 1: 551, 1955.
- [771] — The fine structure of the renal glomerulus of the mouse, *J. Histochem. Cytochem.*, 3: 309, 1955.
- [772] YEE A. G., REVEL J. P., Endothelial cell junctions, *J. Cell Biol.*, 66: 200, 1975.
- [773] YOFFEY J. M., Structural peculiarities of the blood vessels of the bone marrow, *Bibl. Anat.*, 7: 298, 1965.
- [774] ZACKS S. I., Basement membrane thickening in muscle capillaries, [w] *Small Blood Vessels Involvement in Diabetes Mellitus*, red. Siperstein M. D., Colwell A. R. Sr., Meyer K., Am. Inst. Biol. Sci., Washington, D. C., 119, 1964.
- [775] ZAMBONI L., PEASE D. C., The vascular bed of red bone marrow, *J. Ultrastr. Res.*, 5: 65, 1961.
- [776] ZELANDER T., Ultrastructure of mouse adrenal cortex, *J. Ultrastr. Res.*, 3, Suppl. 2: 1, 1959.
- [777] ZELICKSON A. S., A tubular structure in the endothelial cells and pericytes of human capillaries, *J. Invest. Dermatol.*, 46: 167, 1966.
- [778] ZIMMERMAN K. W., Der feinere Bau der Blutkapillaren, *Z. Anat. Entwickl.*, 68: 29, 1923.
- [779] — Ueber den Bau des Glomerulus der Säugerniere. Weitere Mitteilungen, *Z. Mikr. - Anat. Forsch.*, 32: 176, 1933.
- [780] ZINKERNAGEL R., RIEDE U. N., SCHENK R. K., Ultrastrukturelle Untersuchungen der juxtaepiphysären Kapillaren nach Perfusionsfixation, *Experientia*, 28: 1205, 1972.
- [781] ZWEIFACH B., Microcirculatory aspects of tissue injury, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 116: 831, 1964.
- [782] — Local regulation of capillary pressure, *Circ. Res.*, 28, Suppl. 1: 129, 1971.
- [783] — Capillary filtration and mechanisms of edema formation, *Pflügers Arch. Eur. J. Physiol.*, 336: 81S, 1972.
- [784] — Microcirculation, *Ann. Rev. Physiol.*, 35: 117, 1973.

*Adres autorów: Zakład Anatomii Porównawczej
Instytut Zoologii UJ,
ul. Krupnicza 50, 30-060 Kraków.*

Warunki prenumeraty kwartalnika

POSTĘPY BIOLOGII KOMÓRKI

Cena prenumeraty krajowej:

rocznie zł 80.— półrocznie zł 40.—

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

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

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

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

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

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

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

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

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

SPIS TREŚCI

J. NOWAK, Receptory powierzchniowe limfocytów. I. Badania powierzchniowych immunoglobulin	287
K. KOZŁOWSKA, Powierzchniowe transferazy glikozylowe i ich rola we wzajemnym oddziaływaniu komórek	305
R. OLIŃSKI i Z. WALTER, Zagadnienie ciągłości łańcucha polidezoksyrybofosforanowego w DNA eukariotów	317
U. RAFAŁOWSKA, Wewnątrzkomórkowa regulacja metabolizmu cytrynianu	325
A. WOŹNY i F. MŁODZIANOWSKI, Tylakoidy sinie	343
Z. POJDA, H. STRÓŻYŃSKI i R. OSIECKA, Nowe metody badania wymian siostrzanych chromatyd	357
M. SCHMIDT, A. HORST i W. M. STOLZMAN, Mapowanie ludzkiego genomu	369
A. HINEK, Efekty biologiczne działania cytochalazyn	383
A. JASIŃSKI i W. KILARSKI, Ultrastruktura naczyń włosowatych kręgowców. Morfologiczne podstawy mikrokrazenia i przepuszczalności	393