

**POLSKIE
TOWARZYSTWO
ANATOMICZNE**

TOM 1 NR 3-4

1974 (277-344)

**Postępy
Biologii
Komórki**

PWN – WARSZAWA

Kwartalnik
Polskiego Towarzystwa Anatomicznego
wydawany z pomocą finansową
Polskiej Akademii Nauk

Redaguje Kolegium

Jerzy KAWIAK, Wincenty KILARSKI, Jan MICHEJDA, Maria OLSZEWSKA

Komitet Redakcyjny

Jadwiga ACKERMANN, Leszek CIECIURA, Jerzy KAWIAK, Wincenty KILARSKI,
Jan MICHEJDA, Maria OLSZEWSKA, Stanisław ZAWISTOWSKI

Adres Redakcji

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

Państwowe Wydawnictwo Naukowe — Oddział Wrocław 1974

Wydanie I. Nakład 294 + 126 egz. Ark. wyd. 5,25. Ark. druk. 4 $\frac{1}{4}$. Papier druk. sat. III kl. 80 g,
70 × 100 cm. Oddano do składania 19 VIII 1974. Podpisano do druku w listopadzie 1974. Druk
ukończono w grudniu 1974. Zam. 832/74 — P-10. Cena zł 40,—

Wrocławska Drukarnia Naukowa, Wrocław ul. Lelewela 4

BADANIA NAD MORFOLOGIĄ I FUNKCJĄ KOMÓREK NACZYNIOWYCH

Aleksander HINEK

III klinika Chirurgiczna i Zakład Histologii Instytutu Biostruktury
Akademia Medyczna, Warszawa

Streszczenie. W artykule przedstawiono budowę histologiczną tętnicy głównej człowieka i innych ssaków. Omówiono dotychczasowe osiągnięcia z zakresu badań ultrastruktury, histochemii i metabolizmu komórek ściany naczyniowej, ze szczególnym uwzględnieniem naczyniowych miocytów gładkich. Podkreślono odrębności metabolizmu tych komórek oraz ich udział w produkcji substancji międzykomórkowej ściany naczyniowej. W drugiej części artykułu przedstawiono aktualny stan badań nad komórkami naczyniowymi w warunkach hodowli in vitro. Omówiono również metodę enzymatycznej izolacji komórek naczyniowych oraz dotychczasowe wyniki badań morfologicznych i metabolicznych przeprowadzonych na izolowanych komórkach naczyniowych.

Coraz częściej jako jedną z głównych przyczyn powodujących występowanie zmian chorobowych w naczyniach krwionośnych wymienia się lokalne zaburzenia metabolizmu komórek naczyniowych. Dlatego w ostatnich latach komórki naczyń są częstym obiektem badań histologicznych i biochemicznych. Najczęstszym modelem badań nad morfologią i funkcją komórek naczyniowych jest ściana aorty.

BUDOWA ŚCIANY AORTY

W badaniach mikroskopowo-elektronowych ustalono, że skład normalnej błony wewnętrznej aort ludzi i innych ssaków wchodzi następujące typy komórek: komórki śródbłonkowe, leżące pod śródbłonkiem komórki Langhansa, niezróżnicowane komórki mezenchymatyczne, miocyty gładkie oraz mniej liczne histiocyty, komórki tłuszczne i plazmocyty. Błona ta zawiera także substancję międzykomórkową, złożoną z włókien kolagenowych sprężystych i bezpostaciowego materiału złożonego głównie z mukopolisacharydów [3, 17, 23, 45, 63, 92].

Błona środkowa aorty składa się z mocnych blaszek sprężystych tworzących tzw. struktury torsyjne, nie obejmują one w całości ściany naczyniowej, lecz są szczipione ze sobą przez wymianę swych włókien. Nie są również ciągle na całym swoim przebiegu, mają bowiem okienkowate otwory, których układ ułatwia dyfuzję substancji odżywczych i produktów przemiany materii. Stwierdzono [98, 99], że w obrębie błony środkowej aort większości zwierząt i człowieka można wyodrębnić podjednostki strukturalne, które składają się z powtarzalnej liczby blaszek sprężystych — są to rejony unaczynione przez pojedyncze vasa vasorum. Liczba i rozmieszczenie vasa vasorum w aorcie zależy od grubości jej ściany i jest różna u różnych gatunków zwierząt. W ścianie aort zwierząt, których ciężar nie przekracza 6 kg istnieją tylko pojedyncze vasa vasorum. U większych zwierząt i człowieka naczynia te rozmieszczone są regularnie. Strefa beznaczyniowa u dorosłego człowieka wynosi 0,4–0,5 mm lub około 29 blaszek sprężystych [99]. Przestrzenie między blaszkami sprężystymi zajęte są przez inne składniki substancji międzykomórkowej (włókna kolagenowe, srebrnochłonne, pojedyncze włókna sprężyste, bezpostaciową substancję złożoną z mukopolisacharydów) oraz przez miocyty gładkie i mniej liczne komórki o bogato rozwiniętej siateczce śródplazmatycznej szorstkiej, które przez niektórych autorów uważane są za fibroblasty [3, 44, 45], przez innych zaś za komórki macierzyste miocytów gładkich — mioblasty [16, 33, 34, 89]. Przydanka aorty jest wąską, łącznotkankową błoną składającą się z pęczków włókien kolagenowych ułożonych przeważnie równoległe do długiej osi naczynia, nielicznych włókien sprężystych tworzących śrubowate skręty, między którymi leżą fibroblasty, pojedyncze miocyty, liczne naczynia naczyń, pęczki włókien nerwowych oraz czasem małe zwoje wegetatywne.

Mimo że schemat aorty przedstawiony powyżej jest ogólnie przyjęty, istnieje jeszcze wiele niejasności związanych z pochodzeniem, różnicowaniem i funkcjami komórek obecnych w ścianie aorty. Trudna jest również ich ostateczna klasyfikacja cytologiczna. Nie udało się bowiem dotychczas wykazać specyficznych markerów morfologicznych lub histochemicznych dla poszczególnych komórek naczyniowych. Sprawia to, że często o klasyfikacji określonej komórki przesądza jej topograficzne ułożenie w ścianie naczynia, co może być błędne, zwłaszcza, że udowodniono możliwość migracji komórek z jednej warstwy ściany naczynia do drugiej. Ten stan rzeczy jest źródłem rozbieżności poglądów na naturę poszczególnych komórek ściany naczynia. Dotyczy to przede wszystkim leżących podśródbłonkowo komórek opisanych przez Langhans. Komórki te przez niektórych badaczy uważane są za makrofagi [81, 83], przez innych za fibroblasty [3]. Sugeruje się również, że są to komórki mezenchymatyczne o szerokich możliwościach różnicowania się.

Komórkami najliczniej występującymi w ścianach dużych naczyń są miocyty. Błona komórkowa tych owalnych lub wrzecionowatych komórek pokryta jest mukoproteidową błoną podstawną (w literaturze anglosaskiej — basement membrane). Obecność tej amorficznej lub ziarnisto-włóknistej struktury jest cechą charakterystyczną pozwalającą odróżnić komórki mięśniowe już we wczesnych okresach ich różnicowania się od fibroblastów i komórek mezenchymatycznych [86]. Błona komórkowa miocytów wytwarza długie wypustki, zlokalizowane na biegunach komórki oraz liczne wpuklenia wnikające w obszar cytoplazmy. W okolicy wpukleń zlokalizowane są tzw. ciała ciemne — gęste elektronowo wrzecionowane twory o długości dochodzącej do kilkuset nanometrów (200–900 nm). Uważa się [86], że ciała ciemne są urządzeniami uchwytowymi zakotwiczającymi do błony komórkowej obecne w cytoplazmie miocytów miofilamenty. Druga koncepcja dotycząca natury ciałek ciemnych uważa je za zagęszczenie materiału kurczliwego lub rejonu, w których zachodzi interakcja między aktyną i miozyną — dwoma kurczliwymi białkami, których obecność w miocytach naczyniowych stwierdzono biochemicznie [37, 86]. Strukturalne rozmieszczenie tych dwóch białek kurczliwych na terenie miocytów nie jest jeszcze dostatecznie jasne [22]. Dojrzałe miocyty naczyniowe charakteryzują się obecnością dużej liczby cienkich 8–10 nm miofilamentów, które zawierają aktynę [14, 24]. Strukturalna organizacja miozyny jest jeszcze problemem dyskusyjnym. Sugeruje się, że miozyna w komórce rozluźnionej istnieje w stanie koloidu, a tylko w czasie skurczu nietrwale polimeryzuje do formy włóknistej. Istnieją nieliczne doniesienia sugerujące, że jest ona zlokalizowana w grubych włókienkach, o szerokości kilkudziesięciu nanometrów, których obecność można wykazać po zastosowaniu pewnych procedur wstępnych lub specjalnych sposobów utrwalania [13, 64, 80]. Autor obserwował pojawienie się grubych włókienek o grubości 25–30 nm w niektórych miocytach izolowanych enzymatycznie z aort dorosłych królików [29]. Pomędzy cienkimi miofilamentami ułożonymi najczęściej regularnie, równoległe do długiej osi komórki leżą organelle komórkowe: aparat Golgiego, błony gładkie i szorstkie, lizosomy, mitochondria, mikrotubule. Liczba organelli i ich rozmieszczenie wynika ze stopnia zróżnicowania miocytów oraz ich aktywności metabolicznej. Ogólny schemat ultrastruktury miocytów naczyniowych podlega jednak pewnej zmienności wynikającej z ich umiejscowienia w określonym segmencie drzewa naczyniowego i z umiejscowienia na określonej głębokości w ścianie naczyniowej. Miocyty aortalne są zwykle nieco dłuższe od miocytów ścian tętniczek i mają słabiej rozwinięty system miofilamentów i ciałek ciemnych. W aortach indyka zaobserwowano wyraźne morfologiczne zróżnicowanie miocytów. Opisywano tam oprócz typowych miocytów, komórki mięśni gładkich, które z racji bardzo rozwiniętej siateczki śródplazmatycznej

i rzadziej występujących miofilamentów nazwano fibroblastopodobnymi [85]. Zmienność morfologiczną miocytów aortalnych królika zaznaczającą się z wiekiem zwierzęcia obserwował również autor [29]. Wykazano także zmiany w ogólnej ultrastrukturze miocytów aorty będące efektem starzenia się ściany naczyniowej [87].

Wyniki badań histochemicznych miocytów dotyczące obecności poszczególnych enzymów, obejmujące wykrywanie ATPazy, fosfatazy kwaśnej, fosfatazy zasadowej, dehydrogenazy bursztynianowej, cholinesterazy, lipazy, oksydazy cytochromowej, aldolazy i dehydrogenazy mleczanowej, wykazały różnice gatunkowe oraz różnice wynikające z wieku badanego osobnika i miejsca zajmowanego przez poszczególne miocyty w ścianie tętnicy głównej [27, 52, 65, 79, 86].

Miocyty naczyniowe uważane są za komórki wieloczynnościowe, które oprócz funkcji mechanicznych, mają zdolność syntezy wielu składników substancji międzykomórkowej.

W badaniach mikroskopowo-elektronowych, autoradiograficznych i biochemicznych, udowodniono, że produkują one mukopolisacharydy [17, 31], cholesterol [6, 19, 51], kwasy tłuszczowe [19], fosfolipidy [10, 88], kolagen [25, 31] i elastynę [31, 76, 77, 89, 90], oraz że nasilenie tych syntez zmienia się z wiekiem. Do niedawna rola miocytów w produkcji elastyny — głównego składnika włókien i blaszek sprężystych — wydawała się dyskusyjna. Rolę elastoblastów w ścianie naczyń przypisywano tylko fibroblastom [45]. Badania Karrera [33, 34], a następnie Takagi [89, 90] wyjaśniły, że komórki o morfologii fibroblastów pojawiające się w ścianie aorty już we wczesnych okresach życia zarodkowego, przekształcają się z czasem w typowe miocyty. Koncepcję traktującą mioblasty i miocyty jako elastoblasty naczyniowe potwierdziły badania mikroskopowo-elektronowe [25, 76], przeprowadzone na aortach i tętnicach typu sprężystego zwierząt doświadczalnych i ludzi w różnym wieku. Wykazano również [25, 75], że miocyty produkują elastynę i kolagen w miejscach uszkodzenia ściany naczyniowej oraz, że są one komórkami odpowiedzialnymi za produkcję elastyny i innych składników substancji międzykomórkowej w ogniskach miażdżycowych [40–42]. Badania morfologiczne potwierdzone zostały badaniami biochemicznymi [90] oraz autoradiograficznymi [76]. Włókna i błony sprężyste występujące w ścianie tętnicy głównej składają się z białka — elastyny, związanych z nim strukturalnie mukopolisacharydów kwaśnych i obojętnych oraz niewielkiej ilości lipidów i soli nieorganicznych [20, 78]. Dla celów mikroskopii świetlnej można je wybarwiać rezorcynofuksyną lub orceiną. Na podstawie obserwacji mikroskopowo-elektronowych stwierdzono, że włókna sprężyste zbudowane są z dwóch odrębnych składników — bezpostaciowych rdzeni oraz otaczających je cienkich włókienek o średnicy około

11 nm. Przy rutynowym kontrastowaniu ultraskrawków za pomocą roztworów kationowych — octanu uranylu i cytrynianu ołowiu, rdzenie mają niewielką gęstość elektronową, a włókienka są ciemne. Przy barwieniu kwasem fosforowolframowym rdzenie również stają się gęste elektronowo.

Podobne rezultaty można uzyskać, stosując związek specyficznie związany tylko przez elastynę jakim jest kompleks jonów srebra lub złota z siarczanem tetrafenyloporfiryny [1]. W ścianach naczyniowych obok pojedynczych włókien sprężystych występują błony sprężyste, w obrębie których wyróżnia się również 11 nm włókienka oraz składnik bezpostaciowy.

ELASTOGENEZA

Śledząc procesy elastogenetyczne w ścianie aorty [20, 33, 34, 76, 77, 89, 90] stwierdzono, że powstawanie włókien sprężystych jest procesem kilkietapowym, przebiegającym pozakomórkowo. Synteza prekursorów z których pozakomórkowo formują się włókna sprężyste zachodzi w cytoplazmie elastoblastów, którymi w ścianie aorty są mioblasty i miocyty. Komórki te produkują niskocząsteczkowe białka prekursorów składników włókna sprężystego, które zostają zgromadzone w cysternach endoplazmatycznych i w małych pęcherzykach otoczonych błoną szorstką zwanych akantosomami. Prekursory te zostają następnie uwolnione z cystern i pęcherzyków do przestrzeni okołokomórkowej. W obrębie błon podstawnych elastoblastów następuje polimeryzacja uwolnionych niskocząsteczkowych białek oraz łączenie się ich z produkowanymi przez te same komórki mukopolisacharydami i lipidami. Jednym z prekursorów włókien sprężystych jest tropoelastyna. Wykazano, że tropoelastyna jest rozpuszczalnym prekursorem elastyny o masie cząsteczkowej 70 000, a jej skład aminokwasowy różni się od dojrzałej elastyny większą zawartością lizyny i całkowitym brakiem dezmozyny.

Pierwsze etapy pozakomórkowego tworzenia się włókien sprężystych przejawiają się pojawieniem małych, gęstych elektronowo ziarenek, które następnie łączą się w cienkie włókienka o średnicy około 11 nm. W dalszym etapie formowania się włókna sprężystego, pojedyncze włókienka układają się równolegle względem siebie tworząc wiązki stanowiące szkielet włókna. Analiza biochemiczna tych włókienek wykazała, że swym składem aminokwasowym różnią się one od elastyny, a ich własności fizykochemiczne i podatność na trawienie enzymami proteolitycznymi świadczą również, że składają się z innego białka niż elastyna [78]. Wykazano, że w skład tych włókienek wchodzi również cukry — heksoza i heksozamina.

W obrębie wiązek pojawiają się i poszerzają terytorialnie, wraz z upływem czasu, rejony bezpostaciowe odpowiadające rdzeniom włókna. Pojawienie się bezpostaciowego materiału jest morfologicznym wykładnikiem wbudowywania się komponenty elastynowej do nowo powstającego włókna sprężystego oraz polimeryzacji jej cząsteczek w długie łańcuchy tzw. alfa-elastyny. Cząsteczka alfa-elastyny jest zbudowana z 17 aminolańcuchów polipeptydowych zawierających po 35 aminokwasów. Łańcuchy te łączą się ze sobą wiązaniami krzyżowymi.

Elastyna różni się składem aminokwasowym od kolagenu i innych białek włóknistych. W porównaniu z kolagenem zawiera mniej hydroksyproliny, a więcej proliny i waliny. Aminokwasem wykazującym najbardziej stały poziom w różnych preparatach elastyny jest hydroksyprolina. Jej zawartość oraz prawie stały stosunek hydroksyprolina/prolina = 0,1 mogą być wskaźnikami czystości preparatów elastyny [20].

W preparatach elastyny stwierdzono obecność specyficznych połączeń aminokwasów: desmozyny, izodesmozyny, merodesmozyny i lizynonorleucyny [20, 67]. Udowodniono, że właśnie te związki tworzą wiązania krzyżowe pomiędzy poszczególnymi łańcuchami polipeptydowymi cząsteczki elastyny. Liczba wiązań krzyżowych wzrasta z wiekiem. Lizynonorleucyna powstaje w wyniku kondensacji dwóch cząsteczek, a desmozyna, izodesmozyna i merodesmozyna czterech cząsteczek lizyny, z których każda zlokalizowana jest w innym łańcuchu polipeptydowym. Kondensacja cząsteczek lizyny jest procesem kilkietapowym i zachodzi po ich enzymatycznej oksydatywnej dezaminacji.

Procesy prowadzące do powstawania wiązań krzyżowych w elastynie zachodzą pozakomórkowo, co sugeruje, że odpowiednie enzymy muszą być wydzielane do przestrzeni międzykomórkowej przez prawdopodobnie te same komórki, które produkują prekursor elastyny. Brak tych enzymów, wydzielanie ich w niedostatecznej ilości lub niedobór jonów miedzi, które są ich aktywatorami, prowadzi do powstawania niepełnowartościowych włókien sprężystych (latyryzm, Zespół Marfana). Wydaje się, że niedobory enzymów kondensujących wiązania krzyżowe w elastynie, występujące lokalnie w ścianach niektórych tętnic mogą być przyczyną odkładania się związków lipidowych w obrębie blaszek sprężystych, które wiązane są przez wolne grupy aminowe aminokwasów polarnych [40–42].

METABOLIZM ŚCIANY NACZYNIOWEJ

Metabolizm ściany naczyniowej stanowi szczególny przedmiot zainteresowania, ponieważ jego lokalne zaburzenia mogą odgrywać dużą rolę w powstawaniu zmian miażdżycowych. Mimo rozległych badań, wiado-

mości z tego zakresu są niepełne, a wyniki uzyskane na podstawie badań biochemicznych fragmentów ścian naczyniowych *in vitro* często kontrowersyjne. W badaniach *in vitro* ustalono dotychczas tylko ogólny charakter procesów metabolicznych w ścianach dużych naczyń. Wiadomo, że współczynnik oddechowy QO_2 ścian tych naczyń jest niski w porównaniu z innymi tkankami. Według Lehningera [50] QO_2 w aorcie zwierząt doświadczalnych i człowieka waha się w granicach 0,7–1,0 w przeliczeniu na gram suchej tkanki. Według Kresse i wsp. [43] QO_2 fragmentów aorty wołu = -2,4, co jest około 8 razy mniejszą wartością niż QO_2 tkanki wątrobowej. Niskie wartości tych wyliczeń wynikają z faktu, że komórki aorty stanowią tylko 20–30% suchej masy tkanki naczyniowej. W aorcie dwuletniego wołu znajduje się np. około $4,5 \times 10^7$ komórek na 1 g suchej masy ściany naczyniowej.

Głównym źródłem energii ścian naczyniowych jest glikoliza. Proces ten przebiega w warunkach tlenowych i beztlenowych. Glikoliza beztlenowa jest odpowiedzialna za 91% ogólnego zużycia glukozy [18, 19, 68, 95]. Wydaje się, że ten typ metabolizmu wynika z adaptacji komórek naczyniowych uciśniętych przez substancję międzykomórkową do złych warunków odżywiania i utleniania jakie panują w ścianie dużych naczyń. Ale zupełny brak tlenu wywołuje znaczne zmiany metaboliczne. Zauważono m. in. pięciokrotny wzrost wbudowywania C^{14} z glukozy do lipidów i trójglicerydów [43] w czasie inkubacji fragmentów aorty w atmosferze N_2/CO_2 . Wydaje się, że u podstawy zaobserwowanych zjawisk leży proces wydłużania się łańcucha kwasów tłuszczowych, który kontrolowany jest przez stosunek NADH/NAD (stymulacja przy wzroście tej proporcji). W czasie hipoksji wzrasta zużycie NADH dla syntezy łańcucha kwasów tłuszczowych. W czasie anoksji synteza kwasów tłuszczowych jest formą odkładania się grup acetylowych. Jednoczesna redukcja procesu syntezy glikozaminoglikanów wynikać może z faktu, że w czasie hipoksji poziom ATP w tkankach naczyniowych spada prawie o 60% wartości kontrolnej. Zauważono również wzrost zawartości trójglicerydów w aorcie królików hodowanych 12 tygodni w atmosferze, w której stężenie tlenu zmniejszono do 10% [96]. Doświadczenia te wydają się potwierdzać wniosek, że przewlekłe niedotlenienie trzeba uważać za jeden z czynników prowadzących do zmian miażdżycowych. Dalším przyczynkiem potwierdzającym przystosowanie komórek naczyniowych do trudnych warunków odżywiania jest fakt, że komórki te zużywają w procesie glikolizy przede wszystkim glukozę pochodzącą z rozkładu endogenego glikogenu. Sugerowano nawet, że glukoza, która zostaje im dostarczona z zewnątrz w proces glikolizy wchodzi dopiero po wyczerpaniu zapasów endogenego glikogenu [53, 54, 95].

W badaniach biochemicznych, w których śledzono losy egzogennej znakowanej węglem C^{14} glukozy dodanej do środowiska inkubacyjnego *in vitro*, wykazano, że obecne w ścianie aorty wołu komórki intensywnie wcielają glukozę (ok. 30% stężenia wyjściowego w czasie 6 godz.) oraz że około 80% glukozy jest metabolizowane po tym okresie do mleczanu, 0,47% do CO_2 , 2,8% wcielane jest do glikogenu, 0,78% do związków lipidowych a 0,38% do glikozaminoglikanów. Radioaktywność właściwa tych związków jest znacznie mniejsza niż radioaktywność dodanej C^{14} -glukozy, co może świadczyć o jednoczesnym zużywaniu glukozy endogennej. Energia uzyskana w procesie glikolizy jest zużywana przez komórki naczyniowe w czasie pracy mechanicznej (skurcz) oraz w procesach syntezy. W badaniach metabolicznych przeprowadzonych na fragmentach ścian naczyniowych wykazano istotne zmiany metaboliczne zależne od wieku lub stopnia zaawansowania procesów miażdżycowych [15, 18, 30, 45].

Większość wyników prac biochemicznych przedstawiających zużycie lub wydalanie określonej substancji przez badany fragment naczyniowy była przedstawiona w przeliczeniu na gram suchej tkanki lub, w nowszych badaniach, na ilość DNA obecnego w badanym fragmencie ściany naczyniowej. Bezwzględne wartości takich wyników nie są jednak ścisłymi wykładnikami aktywności metabolicznej komórek naczyniowych, są one bowiem zmodyfikowane przez niewątpliwy wpływ substancji międzykomórkowej obecnej w badanych fragmentach ścian naczyniowych. Badania Kirka i Laursena [36], Kramscha i Hollandera [42] oraz Hruzy i wsp. [30] wykazały wyraźny wpływ jakościowego składu substancji międzykomórkowej na stopień dyfuzji cholesterolu i innych związków lipidowych przez ścianę naczyniową, których lokalnie zwiększone stężenie wpływa na stopień syntez endogennych w komórkach ściany naczyniowej.

Kramsch i wsp. [40, 41] oraz Kramsch i Hollander [42] w serii doświadczeń *in vitro* i *in vivo* udowodnili wyraźny wpływ stopnia dojrzałości elastyny na gromadzenie związków lipidowych w ścianach naczyniowych. Niedojrzała forma elastyny pojawiająca się w obrębie ognisk miażdżycowych, zawierająca dużo wolnych grup polarnych aminokwasów przyłącza 14 razy więcej estrów cholesterolu, 8 razy więcej wolnego cholesterolu, 5 razy więcej fosfolipidów i 3 razy więcej trójglicerydów niż elastyna blaszek normalnych dojrzałych, zawierająca dużo wiązań krzyżowych. Udowodniono, że 30% ogólnej zawartości cholesterolu obecnego w blaszkach miażdżycowych związana jest z elastyną. Kolagen ściany naczyń wiąże również około 8% ogólnej zawartości cholesterolu. Gromadzenie w ścianie naczyniowej związków lipidowych może wpływać na zmianę pewnych cech metabolicznych miocytów gładkich, najliczniej reprezentowanych w populacji komórek naczyniowych,

może zmieniać kierunek różnicowania się komórek mezenchymatycznych, mioblastów i komórek śródbłonna (przekształcanie w makrofagi i komórki piankowe), może wreszcie spowodować wiele zmian degeneracyjnych w komórkach śródbłonna i miocytach [7–11, 51].

HODOWLE KOMÓREK NACZYNIOWYCH

Morfologia i właściwości metaboliczne komórek naczyniowych były badane również w hodowlach tkankowych *in vitro* [5, 7, 9, 15, 30, 31, 35, 38, 39, 46, 47, 49, 51, 58–60, 69, 70–72, 74]. Ustalono, że w hodowlach pierwotnych, w których materiałem wyjściowym były fragmenty ścian naczyniowych, można było uzyskać migrację wolnych komórek spomiędzy substancji międzykomórkowej. Z eksplantów ścian zdrowych aort i innych tętnic typu sprężystego uzyskano migrację komórek śródbłonkowych, miocytów gładkich i fibroblastów, a z eksplantów tętnic zmienionych miażdżycowo migrowały także komórki obładowane złogami tłuszczu, nazywane często aterofilami, komórkami tłuszczonośnymi (fat laden cells) lub komórkami piankowatymi (foam cells). Na podstawie opisów podanych przez Koide i Pollaka [38], Kassai i Pollaka [35] i Pollaka [70] komórki naczyniowe obecne w hodowli mają następującą morfologię:

Komórki śródbłonna są okrągłe lub wielokątne, ich przeciętna wielkość wynosi 30–40 μm . Komórki te posiadają duże centralnie ułożone jądro z 2–4 jąderkami, wąską homogeną cytoplazmą, gęstszą w strefie przyjądrowej i jaśniejszą na obwodzie. Na podstawie badań w mikroskopie elektronowym ustalono, że aparat Golgiego zlokalizowany jest w strefie przyjądrowej, a liczne mitochondria, dość duża ilość ergastoplazmy, pojedyncze lizosomy rozproszone są równomiernie w całej cytoplazmie. Porównując komórki śródbłonna królicze i ludzkie w hodowli stwierdzono [69], że śródbłonek aort ludzkich tylko nieznacznie różni się od króliczego — jądra komórek ludzkich zawierają mniej chromatyny i barwią się jaśniej. Stwierdzono również, że nie ma istotnych różnic w morfologii komórek śródbłonkowych w hodowli pobranych z różnych miejsc aorty od ludzi i królików w różnym wieku. Komórki śródbłonna w hodowli tkanek przeżywają do 4 tygodni, potem ulegają degeneracji lub całkowicie zmieniają swoją morfologię.

Mikrokinematograficznie udowodniono, że komórki śródbłonna w hodowli mają zdolność do wykonywania ruchów ameboidalnych oraz zdolność podziałów. Kassai i Pollak [35] stwierdzili, że pełny czas mitozy tych komórek trwa 20–30 min. Koide i Pollak [38] sugerują, że istnieje również możliwość podziałów amitotycznych.

Fibroblasty — fibrocyty są wrzecionowatymi komórkami o wymiarach 18–120 μm . Zawierają jedno owalne jądro z 2–4 jąderkami. Cytoplazma ich homogenicznie jasnoniebieska, przy barwieniu Giemsy zawiera

nieliczne różowe ziarnistości. Błona komórkowa tworzy zwykle biegunowo umieszczone długie, czasem rozdwojone wypustki. W obrazie mikroskopowo-elektronowym widoczne są: aparat Golgiego, leżący blisko jednego z biegunów jądra, nieliczne, rozproszone mitochondria i dobrze rozwinięta ergastoplazma.

Fibroblasty naczyniowe są zwykle nieco większe niż fibroblasty ścięgniętego samego osobnika. W hodowli mają zdolność poruszania się, dzielą się mitotycznie, mitozą trwa 20–30 min. Są komórkami o największych możliwościach rozrostowych. W hodowlach 10–12 dniowych stanowią dziewięćdziesiąt kilka procent wszystkich komórek.

Miocyty naczyniowe obserwowane w hodowli, to wrzecionowate komórki o wymiarach 20–160 μm zawierające jedno duże jądro z 1–3 jąderkami i homogenną kwasochłonną cytoplazmę, w której widoczne są równoległe przebiegające miofilamenty. Już w kilkudniowych hodowlach nie różnią się one morfologicznie od fibroblastów. Pollak [70] twierdzi jednak, że w hodowlach sześciotygodniowych stanowią około 4% populacji komórkowej.

Komórki obładowane tłuszczem — w mikroskopie świetlnym nie różnią się morfologicznie od tłuszczonośnych makrofagów z jamy otrzewnej. Są to owalne lub okrągłe komórki o wymiarach 20–40 μm . Często mają cienkie wypustki błony komórkowej w kształcie kolców lub nibynózek. Duże jądro położone centralnie zawiera jedno jąderko. Cytoplazma kwasochłonna lub obojętnochłonna z licznymi kwasochłonnymi ziarnistościami zawiera bardzo liczne złogi lipidowe, które w obrazach mikroskopowo-elektronowych przedstawiają się jak duże, puste elektro-nowo wakuole, spychające na obwód nieliczne organelle komórkowe. Obecność wakuoli lipidowych obserwowano również na terenie jądra. Lazarini [46] stwierdził, że komórki te mogą przeżywać w hodowli do 6 dni. Pollak i Adacchi [69] obserwowali komórki obładowane tłuszczem uzyskane z eksplantów małych tętnic ludzkich nawet w 28 dniu hodowli. Ogólnie uważa się [70], że komórki te pochodzą z przekształcenia się komórek śródbłonna i są identyczne z opisywanymi in situ komórkami piankowatymi.

HISTOCHEMIA KOMÓREK NACZYNIOWYCH W HODOWLI

Wyniki prac zajmujących się histochemią komórek naczyniowych w hodowli nie są jednoznaczne, a przedstawiane rezultaty są często sprzeczne. Doniesiono również o zmianach aktywności niektórych enzymów, jakie zachodzą w tej samej hodowli komórek naczyniowych w czasie jej trwania [38].

Komórki śródbłónka charakteryzują się wg Pollaka [70], lekko dodatnią reakcją PAS zlokalizowaną w strefie przyjądrowej, lekko dodatnią reakcją z Sudanem czarnym, lekko dodatnią reakcją na fosfatazę kwaśną i adenozynotrójfosfatazę. Reakcja na dehydrogenazę bursztynianową jest zmiennie dodatnia a reakcja na fosfatazę zasadową ujemna. Według Lazariniego [46] komórki śródbłónka dają dodatnią reakcję na fosfatazę kwaśną, esterazę cholinową i enzymy cyklu Krebsa. Koide i Pollak [38] donoszą, że komórki te dają intensywnie dodatnią reakcję na dehydrogenazę bursztynianową. Lazarini [46] twierdzi, że reakcja ta jest dodatnia tylko wtedy, kiedy komórki śródbłónka zawierają lipidy. W komórkach śródbłónka opisano dodatnią reakcję na katepsyny, uważa się, że nasilenie tej reakcji jest oznaką przekształcania się komórek śródbłónka w komórki piankowate [69].

Komórki piankowate charakteryzują się obecnością tłuszczów wykrywanych reakcją z Sudanem czarnym lub czerwienią olejową, wybitnie dodatnią reakcją PAS, dodatnimi reakcjami na fosfatazę kwaśną, oksydazę cytochromową, dehydrogenazę bursztynianową i esterazę karboksylową. Kassai i Pollak [35] opisali w tych komórkach również dodatnie reakcje na fosfatazę zasadową i adenozynotrójfosfatazę.

Fibrocyty — fibroblasty i miocyty wg Pollaka [70] nie wykazują charakterystycznych barwień i reakcji histochemicznych, które pozwoliłyby odróżnić je od komórek śródbłónka. Miocyty identyfikowano [37] metodą immunohistochemiczną stosując znakowaną fluoresceiną globulinę antymiozynową. Metoda ta okazała się niepewna z chwilą stwierdzenia obecności miofibryli w komórkach śródbłónka [21].

BADANIA METABOLICZNE KOMÓREK NACZYNIOWYCH W HODOWLI

Większość badań metabolicznych została przeprowadzona na wtórnych hodowlach komórek naczyniowych uzyskanych przez wydzielenie ich ze strefy wzrostu hodowli pierwotnych.

Stwierdzono [15, 68, 71], że komórki aort króliczych pobierają aminokwasy zawarte w pożywkach oraz, że są one zdolne do produkcji białek. Wykazano, że w pierwszych dniach hodowli najintensywniej zużywana jest treonina, a po 4 dniach hodowli wzrasta wybitnie zużycie kwasu asparaginowego, metioniny, cysteiny, kwasu glutaminowego i glicyny. Stwierdzono również istotne ilościowe różnice w zużywaniu aminokwasów przez komórki uzyskane z hodowli naczyń normalnych i naczyń zmienionych miażdżycowo [71]. Wykazano, że komórki naczyniowe mogą produkować *in vitro* kolagen [25, 31]. Obecność włókien kolagenowych stwierdzono również w substancji międzykomórkowej wytworzonej przez wolne miocyty przeszczepione w komorach dyfuzyjnych

do jamy otrzewnej królików. Posługując się techniką autoradiografii i mikroskopii elektronowej stwierdzono, że miocyty aort zwierząt doświadczalnych mogą w warunkach hodowli produkować elastynę [31, 77, 82]. Stosunkowo dużo badań poświęcono metabolizmowi związków lipidowych, które uważane są przez wielu badaczy za główny czynnik miażdżycorodny. Związki lipidowe obecne w pożywce wcielane są bardzo szybko do wnętrza komórek. Włączanie lipidów do komórek naczyniowych zależne jest jednak od poziomu lipidów w otaczającym je środowisku, od rodzaju związków lipidowych, stanu ich rozproszenia oraz od długości czasu działania związków lipidowych na komórki [2, 39, 49]. Przechodzenie lipidów przez błony komórkowe, procesy ich gromadzenia oraz synteza wewnątrzkomórkowa związków lipidowych są w komórkach naczyniowych procesami wzajemnie od siebie zależnymi. Zaobserwowano, że przy inkubacji komórek naczyniowych w mieszaninie znakowanego trytem cholesterolu i znakowanych J^{131} różnych związków białkowych, wnikanie cholesterolu do tych komórek było dwa razy większe niż pobieranie białek (w przeliczeniu na cząsteczkę znakowanego związku [74]). Udowodniono, że szybkie wnikanie lipidów, zwłaszcza do komórek śródbłonna po inkubacji w pożywkach o wysokim stężeniu lipidów i cholesterolu jest odwracalne, jeżeli przeniesie się hodowlę do płynu nie zawierającego lipidów. Istnieją sugestie, że transport lipidów ze środowiska do komórek naczyniowych i odwrotnie zależy od różnicy stężeń tych związków po obu stronach błony komórkowej [49]. Zjawisko to zależne jest jednak od dostępności tlenu. Lazzarini-Robertson [48] badając włączanie znakowanego trytem cholesterolu oraz znakowanych węglem C^{14} jego prekursorów, octanu sodu i DL-mewalonianu do komórek śródbłonna, uzyskanych z hodowli klonalnej stwierdził, że wraz z obniżeniem stężenia tlenu w środowisku hodowlanym zmniejszało się wcielanie znakowanych węglem prekursorów cholesterolu, a wzrastało włączanie znakowanego trytem egzogenego cholesterolu. W podobnym doświadczeniu stwierdzono, że w atmosferze zawierającej stężenie tlenu około 10% wzrastało wbudowywanie alfa 2 i beta lipoproteidów do komórek śródbłonna, podczas, gdy jednocześnie malało zużycie przez nie octanu. Przy stężeniu tlenu poniżej 5% zużycie octanu zmniejszało się o około 80%.

Wykazano, że synteza cholesterolu endogenego ze znakowanego octanu sodu maleje wraz ze zwiększaniem się stężenia lipidów dodanych do pożywki hodowlanej [58]. Sugeruje to istnienie zjawiska dynamicznej równowagi opartej na sprzężeniu zwrotnym pomiędzy gromadzeniem cholesterolu a jego uwalnianiem przez komórki naczyniowe.

Wykazano również wpływ niektórych hormonów na wybrane parametry gospodarki lipidowej komórek naczyniowych. Dotyczy to przede wszystkim hormonów sterydowych. Branwood [4] zauważył, że alfa estra-

diol zapobiegał wcielaniu lipidów do komórek śródbłonna hodowanego w środowisku z dodatkiem surowicy hiperlipemicznej. Progesteron i heksosterol również znacznie obniżały włączanie cholesterolu. Curtis i Galvin [9] stwierdzili, że testosteron, gonadotropina surowicy ludzkiej, stilbestrol i prednizolon nie wykazywały żadnego efektu na wcielanie cholesterolu do hodowanych komórek naczyniowych. ACTH, L-tyroksyna, insulina, adrenalina i noradrenalina nie wykazywały wpływu na włączenie C^{14} octanu przez komórki i aorty kurczęcia. Curtis i Galvin wykazali, że kortyzol (0,1 mg/ml) znacznie zwiększał podejmowanie egzogennych lipidów przez hodowle komórek aort ludzkich. Murata [58] wykazał zwiększenie endogennych syntez lipidów o 30–35% w komórkach aorty kurczęcia hodowanych w pożywce zawierającej 10 μ g/ml serotoniny.

Lazzarini-Robertson [48, 49] stwierdził, że komórki aorty absorbujące z zawiesin cholesterol obniżają swe procesy utleniania i jednocześnie zwiększają produkcję mukopolisacharydów. Autor ten zasugerował, że jest to pewien proces obrony zmniejszający wcielanie lipidów przez komórki naczyniowe. Mukopolisacharydy wytworzone przez te komórki lub dodane do pożywki wykazują bowiem wyraźny wpływ obniżający wcielanie związków lipidowych. Zauważono również efekt oczyszczania hodowanych komórek aorty kurczęcia z lipidów po dodaniu do pożywki hodowlanej ekstraktu z aort cielęcych bogatych w mukopolisacharydy.

Wykazano [56] znaczne zmniejszenie się włączania lipidów do komórek naczyniowych w hodowli po dodaniu do pożywki chondroitynosiarczanu A, jak również wyciągu z aorty cielęcej bogatej w ten związek. Takiego efektu nie obserwowano po dodaniu chondroitynosiarczanu B. Murata [59] doniósł, że dodanie chondroitynosiarczanu A do hodowli komórek kurczęcia spowodowało wzrost syntezy lipidów wewnątrzkomórkowych o 10–20%, a dodanie chondroitynosiarczanu C o 10%. Wzrost syntezy lipidów endogennych przebiegać miałby tu jednocześnie z redukcją wcielania lipidów zewnątrzkomórkowych przez komórki naczyniowe pod wpływem tych mukopolisacharydów. Doświadczenia Lazzariniego [47] oraz Curtisa i Galvina [9] wykazały, że liczba ziarenek lipidowych w hodowanych komórkach aort ludzkich była znacznie mniejsza, jeżeli do środowiska hodowlanego zawierającego cholesterol dodawano jednocześnie heparynę. Takiego efektu nie udało się uzyskać, jeżeli heparyna była dodawana do zawiesin komórkowych dopiero w 14-tej godzinie inkubacji z cholesterolem. Branwood [4] stwierdzał jednak szybki efekt oczyszczania komórek aorty ludzkiej z lipidów zawartych w pożywce z dodatkiem hypercholesterolowej surowicy po zmianie pożywki na zawierającą 5 mg/ml heparyny. Uważa się, że heparyna i mukopolisacharydy jako związki o dużym ciężarze cząsteczkowym, niskim ciśnieniu osmotycznym i silnym ładunku elektrycznym ujemnym działają kon-

kurencyjnie w stosunku do cząsteczek cholesterolu w procesie przenikania przez błony komórkowe komórek naczyniowych. Stwierdzono, że podobnego efektu nie da się jednak uzyskać po dodaniu cystyny i cysteiny. Wykazano również niewątpliwy wpływ na gospodarkę lipidową komórek naczyniowych w hodowli takich związków jak: ATP, pirydoksyna, kwas cholowy, penicylina i trypsyna. Związki te obniżały znacznie wnikanie cholesterolu z pożywki do wnętrza komórek. Zwiększały jednak syntezę endogennych lipidów [9, 46, 70]. Podobny, ale znacznie słabiej nasilony efekt, uzyskano dodając do inkubowanych z cholesterollem komórek naczyniowych związków nieorganicznych takich jak KCl i $MgSO_4$. Murata [60] wykazał, że trzygodzinna inkubacja komórek naczyniowych w środowisku hodowlanym zawierającym puromycynę powodowała obniżenie syntezy steroli o 47% w porównaniu z kontrolą a syntezą tłuszczów obojętnych o 18%. Stwierdzono, że puromycyna i aureomycyna hamowały przechodzenie komórek śródbłonna w komórki piankowe. Związki te wpływały na obniżenie syntez wewnątrzkomórkowych związków tłuszczowych jak i włączanie tłuszczów egzogennych do komórek śródbłonna.

Technika hodowli tkankowych, pozwalając na badania morfologiczne komórek naczyniowych wolnych od substancji międzykomórkowej, dostarczyła wielu informacji o możliwościach metabolicznych komórek uzyskanych z normalnych i zmienionych miażdżycowo ścian naczyniowych. Wydaje się jednak, że rezultaty badań przeprowadzonych na komórkach hodowlanych przez wiele pokoleń nie mogą dokładnie przedstawić możliwości metabolicznych komórek znajdujących się w ścianie naczynia. Komórki w hodowli nie odzwierciedlają bowiem ani ilościowo ani jakościowo populacji komórek badanego naczynia. Komórki te pochodzą tylko z tej części populacji komórek naczyniowych, która w warunkach hodowli pierwotnej była zdolna do migracji z eksplanta i podziałów, a ponadto mogą one ulegać selekcji przy dłuższym trwaniu hodowli [70, 72].

BADANIA NAD KOMÓRKAMI NACZYNIOWYMI IZOLOWANYMI ENZYMATYCZNIE

Wydaje się, że lepszą metodą pozwalającą na szybkie wyizolowanie wolnych komórek ze ścian naczyniowych jest trawienie enzymatyczne badanych fragmentów ściany naczynia. Zasadą tej metody jest inkubacja fragmentu naczynia w roztworze enzymów (najczęściej stosuje się trypsynę, kolagenazę, elastazę, pronazę, papainę i hialuronidazę), co pozwala na strawienie elementów substancji międzykomórkowej i uwolnienie otoczonych nią komórek. Udowodniono, że niezbyt długie traktowanie

tkanek odpowiednio dobrymi stężeniami tych enzymów nie powoduje znaczniejszych uszkodzeń uwalnianych komórek. Moscona [57] stwierdził, że uszkodzona przez długie trawienie trypsyną otoczka powierzchniowa komórek może być zregenerowana przez komórki po kilkudziesięciu minutach przebywania w środowisku odżywczym, a komórki uzyskane metodą enzymatyczną po inkubacji w pożywce są zdolne do agregacji. Overton [62] w badaniach mikroskopowo-elektronowych nie wykazał zmian ultrastrukturalnych w komórkach nabłonkowych przebywających przez kilka godzin w roztworze trypsyny. Komórki te przeniesione do środowiska odżywczego fagocytowały pozostałe po ich rozdzieleniu półdesmosomy i odnawiały swoją otoczkę powierzchniową. Podobnie Meller i wsp. [55] badając komórki izolowane trypsyną ze spłotu naczyniówkowego nie stwierdzali w nich zmian ultrastrukturalnych. Shimms [84] doniósł, że krótkie trawienie trypsyną fragmentów aorty ułatwiało późniejszą migrację komórek z hodowli tkankowej. Morison i wsp. [56] stwierdzili, że inkubacja fragmentów wewnętrznej aorty w 1-procentowym roztworze trypsyny przez 14 godz. w 20°C ułatwiała oddzielenie się komórek śród-błonka od elementów łącznotkankowych.

Roztwory kolagenazy, elastazy i hialuronidazy stosowano do uwalniania komórek ze zmian miażdżycowych indukowanych dietą wysokocholesterolową u różnych zwierząt. Newman i wsp. [61], Ymamoto i wsp. [94], Day i wsp. [10–12] izolowali komórki piankowate ze zmian miażdżycowych aorty królika. Stwierdzili, że komórki te uzyskane za pomocą trawienia kolagenazą, elastazą i hialuronidazą są żywe i zdolne do syntezy fosfolipidów i innych związków lipidowych *in vitro*. Robertson i Insull [73], stosując ciągły przepływ 0,25% trypsyny lub pronazy przez wypreparowane w 5 godzin po zgonie aorty ludzkie, uzyskali komórki zmienionych miażdżycowo błon wewnętrznych. Peters i wsp. [66], posługując się techniką trawienia enzymatycznego, uzyskali zawiesiny komórek z aort króliczych. Autczy ci stosowali ciągle 2,5-godzinne trawienie fragmentów ściany aortalnej mieszaniną enzymów: kolagenazy (1,5 mg), elastazy (0,7 mg) i hialuronidazy (1,5 mg) na 1 ml płynu Hanksa. 60% uzyskanych tą metodą komórek barwiło się jednak błękitem trypanu, tzn. było martwych. Hinek i Moskalewski [28] uzyskali zupełne strawienie substancji międzykomórkowej aorty króliczej i uwolnienie kilkunastu milionów komórek stosując frakcjonowane trawienie roztworem enzymów kolagenazy (2,5 mg), trypsyny (2,5 mg) i DNAazy (0,5 mg) na 1 ml płynu Hanksa. Dla izolacji komórek z aorty dorosłego królika stosowano 4 zmiany roztworu enzymatycznego, które wykonywano co 30 min. Testy żywotności z błękitem trypanu czerwienią obojętną i octanem fluoresceiny wykazały, że uzyskane zawiesiny komórkowe składały się w 90–95% z komórek żywych. Wykazano również, że komórki takie

mają zdolność agregacji *in vitro* oraz że w warunkach hodowli produkują kolagen i elastynę. Badania metaboliczne *in vitro* przeprowadzone na komórkach izolowanych enzymatycznie z aort królików i z naczyń wieńcowych świń wykazały, że komórki te intensywnie wcielają glukozę i wolne kwasy tłuszczowe dodane do środowiska inkubacyjnego oraz że procesy znacznie wzmagają się w obecności insuliny [29, 93]. Wykazano również, że fenylloetylobiguanid (fenformina), związek stosowany w klinice jako przeciwcukrzycowy lek o działaniu hipoglikemicznym, nie wpływa na zużycie glukozy i kwasu palmitynowego przez izolowane komórki naczyń wieńcowych świni. Wiadomo [101], że w podobnych warunkach izolowane komórki tłuszczowe reagowały na ten lek zwiększeniem stopnia zużycia tych substratów. Stwierdzenie areaktywności komórek naczyniowych na fenylloetylobiguanid może mieć pewne znaczenie kliniczne. Badając izolowane komórki pod mikroskopem elektronowym [29] wykazano, że metoda enzymatyczna nie wywołuje zmian ultrastrukturalnych w uzyskanych komórkach oraz że nie powoduje ona selektywnej eliminacji komórek, co pozwala na uzyskanie reprezentatywnej populacji komórek zawartych w ścianie badanego naczynia. Metoda ta pozwala na szybszą i dokładniejszą analizę dużej liczby komórek naczyniowych niż ultraskrawki małych fragmentów ściany naczynia i jest szczególnie przydatna dla oceny komórek, których w ścianie naczyniowej jest mało i które są w niej rozproszone. Klasyfikacja cytologiczna wolnych od substancji międzykomórkowej komórek naczyniowych jest problemem trudnym ze względu na brak „markerowych” cech morfologicznych lub histochemicznych izolowanych komórek naczyniowych. Po porównaniu morfologii komórek izolowanych z obrazami ultrastrukturalnymi komórek obecnych w ścianie aorty *in situ* można jednak sklasyfikować je w kategoriach cytologicznych.

Po analizie morfologicznej komórek izolowanych z aort zdrowych dojrzałych królików stwierdzono, że oprócz kilku typów miocytów, fibroblastów i komórek śródbłonna udało się wykazać wśród nich obecność komórek gromadzących lipidy, które były podobne do komórek piankowatych opisywanych tylko w ścianach naczyń zmienionych miażdżycowo. Spostrzeżenie może świadczyć o możliwości spontanicznego występowania zmian komórkowych uważanych za charakterystyczne dla miażdżycy u królików, co pozwoliłoby traktować doświadczalną miażdżycę tych zwierząt jako zmianę ilościową, a nie jakościową. Wśród komórek izolowanych ze ścian aort króliczych oprócz komórek „typowych”, fibroblastów, miocytów czy komórek śródbłonna widywano również komórki o pośrednich cechach morfologicznych, np. formy przejściowe pomiędzy fibroblastem i miocytem czy komórki śródbłonkowe z wyraźnymi wiązkami miofilamentów pod błoną komórkową. Spostrzeganie takich pośrednich komó-

rek wydaje się popierać hipotezy [97] traktujące wszystkie komórki naczyniowe jako komórki potomne multipotencjalnych komórek mezenchymatycznych, których cechy morfologiczne wynikają z ich aktualnych funkcji pełnionych w ścianie naczyniowej. Wiadomo jednak, że funkcje te mogą się zmieniać pod wpływem wielu czynników ogólnoustrojowych lub miejscowych. Istnieje jednak jeszcze wiele nie wyjaśnionych problemów związanych zarówno z funkcją poszczególnych komórek naczyniowych, jak i z ich pochodzeniem i różnicowaniem. Rozwiązanie tych problemów jest niezbędne dla zrozumienia procesów starzenia się ściany naczyniowej oraz lepszego poznania mechanizmów doprowadzających do powstawania zmian miażdżycowych.

Wydaje się, że dużą rolę w rozwiązaniu tych problemów będą odgrywać nadal badania komórek naczyniowych *in vitro*.

LITERATURA

- [1] ALBERT E. N., FLEISCHER E., 1970 — A new electron-dense stain for elastic tissue, *J. Histochemistry and Cytochemistry*, **18**: 697–708.
- [2] BAILEY J. M. — Lipid metabolism in cultured cells. I. Factors affecting cholesterol uptake, *Proc. Soc. Exp. Biol.*, **107**: 30–35.
- [3] BIERING F., KOBAYASI T., 1964 — Electron microscopy of the normal rabbit aorta, *Acta Pathol. Microbiol. Scand.*, **57**: 154–168.
- [4] BRANWOOD A. W., 1961 — Growth pattern of arterial endothelium in tissue culture and the effect of lipids, heparin and oestradiol on tissue cells, *Cardiovascular Tissue Conf. Dover, Del., USA*.
- [5] BUDDECKE E., WERRIES E., 1965 — Reinigung und Eigenschaften der beta-Acetylglucosaminidase aus der aorta des Rindes, *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, **340**: 257–272.
- [6] CHOBANIAN A. V., 1968 — Sterol synthesis in the human arterial intima, *J. Clin. Invest.*, **47**: 595–603.
- [7] CHOI B. H., FLORENTIN R. A., LEEN S. K., 1968 — Damaging effect of hypercholesterolemic swine serum in tissue culture, *Fed. Proc.*, **27**: 575.
- [8] COOKE P. H. SMITH S., 1968 — Smooth muscle cells: The source of foam cells in atherosclerotic with carneau pigeons, *Exp. Molec. Pathol.*, **8**: 171–189.
- [9] CURTIS R. G., GALVIN M. P., 1963 — Application of tissue culture technique to screen compounds for the prevention of lipid deposition in aorta cells, *Austr. J. Exp. Biol. Med. Sci.*, **41**: 687–694.
- [10] DAY A. J., NEWMAN H. A. I., ZILVERSMIT D. B., 1966 — Synthesis of phospholipid by foam cells isolated from rabbit atherosclerotic lesions, *Circulat. Res.*, **19**: 122–131.
- [11] DAY A. J., WILKINSON J., 1967 — Incorporation of C¹⁴-labelled acetate into lipid by isolated foam cells and by atherosclerotic arterial intima, *Circulat. Res.*, **21**: 593–598.
- [12] DAY A. J., TUME R. K., 1969 — *In vitro* incorporation of C¹⁴-labelled oleic acid into combined lipid by foam cells isolated from a rabbit atheromatous lesions, *J. Atheroscler.*, **9**: 141–149.
- [13] DEVINE C. E., SOMLYO A. P., 1971 — Thick filaments in vascular smooth muscle, *J. Cell Biol.*, **49**: 639–649.

- [14] DEVINE C. E., SOMLYO A. P., 1970 — Ultrastructure of vascular smooth muscle stria studied with lanthanum, *Fed. Proc.*, **29**: 455.
- [15] ELLIOTT G. F., 1967 — Variations of the contractile apparatus in smooth and striated muscle, *J. Gen. Physiol.*, **50**: Suppl. 171.
- [16] EVANS D. H. L., EVANS E. M., 1964 — The membrane relationships of smooth muscles An EM study, *J. Anatom.*, **98**: 37-46.
- [17] ENGEL U. R., 1971 — Glycosaminoglycans in the aorta of six animal species. A chemical and morphological comparison of their topographical distribution, *Atherosclerosis*, **13**: 450-460.
- [18] FONTAINE R., MANDEL P., PONTESCO V., KEMPF E., 1960 — The metabolism of the arterial wall and its variations during the ageing process, *J. Cardiovasc. Surg.*, **1**: 605-605.
- [19] FOSTER D. W., SIPERSTEIN M. D., 1960 — Effects of diabetes on cholesterol and fatty acid synthesis in the rat aorta, *Amer. J. Physiol.*, **198**: 25-28.
- [20] FRANZBLAU C., 1971 — Elastin, [w] Extracellular and supporting structures — *Comprehensive Biochemistry*, t. 26 C, wyd. Elsevier, 659-712.
- [21] GIACOMELLI F., WIENER J., SPIRO D., 1970 — Cross-striated arrays of filaments in endothelium, *J. Cell. Biol.*, **45**: 188-192.
- [22] HANSON J., LOWY J., 1964 — The problem of the location of myosin in vertebrate smooth muscle, *Proc. Roy. Soc. Ser. Biol.*, **160**: 523-531.
- [23] HAM K. N., 1962 — The fine structure of normal aorta, *Aus. J. Exp. Biol. Med. Sci.*, **40**: 341-352.
- [24] HANSON J., LOWY J., 1960 — The structure of F-actin and actin filaments isolation from muscle, *J. Molec. Biol.*, **6**: 46-60.
- [25] HAUST M. D., MORE R. H., MOVAT H. Z., 1960 — The role of smooth muscle cells in the fibrogenesis of arteriosclerosis, *Amer. J. Pathol.*, **37**: 377-389.
- [26] HAUST M. D., MORE R., 1963 — Significance of the smooth muscle cell in atherosclerosis, [w:] *Evolution of the atherosclerotic plaque*, — red. R. J. Jones, University of Chicago Press. Chicago London.
- [27] HESS R., STAUBLI W., 1963 — Vergleichende histochemische und elektronenmikroskopische Untersuchungen von Aortaveränderungen bei experimenteller Lipoidose, *Verh. Deutsch. Ges. Pathol.*, **47**: 369-373.
- [28] HINEK A., MOSKALEWSKI S., 1972 — Isolation of aortic cells of rabbits of various age, *Folia Biologica*, 1-2; 111-120.
- [29] HINEK A., 1973 — Badania nad morfologią i niektórymi parametrami metabolizmu komórek izolowanych ze ścian aorty i naczyń wieńcowych, *Praca doktorska A. M. Warszawa*.
- [30] HRUZA Z., BABICKY A., HLAVACKOWA V., 1967 — Bildung of cholesterol to the rat aorta and collagen fibers during ageing and atherosclerosis in vitro, *Exp. Geront.*, **2**: 101-107.
- [31] JARMOLYCH J. A. S., DAOUD J., LANDAU K. B., FRITZ R. Mc ELVENE E., 1968 — Aortic media explants. Cell proliferation and production of mucopolisacharides, collagen and elastic tissue, *Expl. Mol. Pathol.*, **9**: 171-192.
- [32] KAMINER B., BELL A. L., 1966 — Myosin filamentogenesis effects of pH and ionic concentration, *J. Molec. Biol.*, **20**: 391-401.
- [33] KARRER H. E., 1961 — Electron microscope study of developing chick embryo aorta, *J. Ultrastruc. Res.*, **4**: 420-454.
- [34] KARRER H. E., 1961 — An electron microscope study of the aorta in young and ageing mice, *J. Ultrastruc. Res.*, **5**: 1-27.

- [35] KASSAI T., POLLAK O. J., 1964 — Smooth muscle cells in aortic cultures of untreated and cholesterol-fed rabbits, *Z. Zellforsch.*, **62**: 743–752.
- [36] KIRK J. E., LAURSEN T. J., 1955 — Diffusion coefficients of various solutes for human aortic tissue with special reference to variation in tissue permeability with age, *J. Geront.*, **10**: 288–302.
- [37] KNIRIEM H. W., KAO C., WISSLER R. W., 1968 — Demonstration of smooth muscle cells in bovine arteriosclerosis, *J. Atherosclerosis Res.*, **8**: 125–136.
- [38] KOIDE R., POLLAK O. J., 1963 — Cytochemical studies of rabbit aortic cells in tissue culture, *J. Histochem. Cytochem.*, **11**: 267–272.
- [39] KOKUBU T., POLLAK O. J., 1961 — In vitro cultures of aortic cells of untreated and of cholesterol-fed rabbits, *J. Atheroscler. Res.*, 229–239.
- [40] KRAMSCH D. M., HOLLANDER W., FRANSBLAU C., 1970 — The role of arterial elastin in the lipid accumulation in human atherosclerotic arteries, [w] *Atherosclerosis-Second International Symposium*, red. R. J. Jones, Springer Verlag New York.
- [41] KRAMSCH D. M., FRANZBLAU C., HOLLANDER W., 1971 — The protein and lipid composition of arterial elastin and its relationship to lipid accumulation in the atherosclerotic plaque, *J. Clin. Invest.*, **50**: 1666–1675.
- [42] KRAMSCH D. M., HOLLANDER W., 1973 — The interaction of serum and arterial lipoproteins with elastin of the arterial intima and its role in lipid accumulation in atherosclerotic plaque, *J. Clin. Invest.*, **52**: 236–247.
- [43] KRESSE H., FILIPOWIC I., ISERLOH A., BUDDECKE E., 1970 — Comparative studies on the chemistry and the metabolism of arterial and venous tissue, *Angiologica*, **7**: 321–332.
- [44] LANG J., 1965 — Mikroskopische Anatomie der Arterien, *Angiologica*, **2**: 225–284.
- [45] LANSING A. J., 1959 — The arterial wall. Aging structure and chemistry, The Williams and Wilkins Co. Baltimore.
- [46] LAZZARINI A. A., 1960 — Histochemical and microscopic studies on cholesterol absorption by human atheromatous plaque, *Abstract Circulation*, **22**: 656.
- [47] LAZZARINI-ROBERTSON A. Jr, 1961 — Effects of heparin on the uptake of lipids by isolated human and animal endothelial type cells, *Angiology*, Baltimore, **12**: 525–534.
- [48] LAZZARINI-ROBERTSON A. Jr, 1961 — Effects of the oxygen tension on the uptake of labeled lipoproteins by human atheromatous plaque, *Abstract Circulation*, **24**: 1096–1097.
- [49] LAZZARINI-ROBERTSON A. Jr, 1962 — Lipid uptake versus synthesis in isolated human arterial intima, *Abstract Circulation*, **26**: 660.
- [50] LEHNINGER A. L., 1959 — The metabolism of the arterial wall, [w] *The arterial wall*, red. Lansing V. A., 220–246.
- [51] LOFLAND H. B. Jr, 1965, MOURY D. M., HOFFMAN C. W., CLARKSON T. B., 1965 — The lipid metabolism in pigeon aorta during atherogenesis, *J. Lipid. Res.*, **6**: 112–118.
- [52] LOJDA Z., ZEMPLENYJ Z., 1961 — Histochemistry of some enzymes of vascular wall in experimental rabbit atheromatosis, *J. Atheroscler. Res.*, **1**: 101–120.
- [53] LUNDHOLM L., MOHME-LUNDHOLM F., 1966 — The carbohydrate metabolism and tone of smooth muscle, *Acta Pharmacologica Toxycol.*, **15**: 371–388.

- [54] LUNDHOLM L., MOHME-LUNDHOLM F., 1963 — Contraction and glycolysis of smooth muscle, *Acta Physiol. Scand.*, **57**: 125–129.
- [55] MELLER K., WAGNER H. H., BREIPOHL W., 1969 — Das Verhalten trypsynierter *Plexus chorioideus* — Zellen in Gevebekulturen, *Z. Zellforsch.*, **97**: 392–402.
- [56] MORRISON L. M., MURATA K., QUILLIGAN J. J., SCHJEJDE O. A., FREEMAN L., 1965 — Growth stimulating effects of acid mucopolisacharides, *Proc. Soc. Exp. Biol. N. Y.*, **118**: 770–772.
- [57] MOSCONA A. A., 1965 — Recombination of dissociated cells and the development of cell aggregates in cells and tissue culture, [w] *Methods Biology and Physiology*, red. E. N. Wolmer, Academic Press London, and New York, 489–529.
- [58] MURATA K., 1968 — Synthesis and transport of cholesterol in aortic cells; radio-isotopic studies in cell culture, *Experientia*, **24**: 1111–1112.
- [59] MURATA K., QULLIGAN J. J., MORRISON L. M., 1967 — Suppressing effects of histamine on lipid synthesis in chick aortic cells, *Nature*, London, **213**: 1030–1031.
- [60] MURATA K., QUILLIGAN J. J., MORRISON L. M., 1967 — Inhibition of lipid synthesis by puromycin in chick aortic cells, *Biochim. Biophys. Acta.*, **144**: 473–475.
- [61] NEWMAN H. A. L., NURAD T. M., GEER J. C., 1971 — Foam cells of rabbits atheromatous lesions. Identification and cholesterol uptake in isolated cells, *Lab. Invest.*, **25**: 586–592.
- [62] OVERTON J., 1968 — The fate of desmosomas in trypsynized tissue, *J. Exp. Zool.*, **168**: 203–215.
- [63] PEASE D. C., PAULE W. J., 1960 — Electron microscopy of elastic arteries the thoracic aorta of the rat, *J. Ultrastruc. Res.*, **3**: 469–483.
- [64] PANNER B. J., HONNING C. R., 1967 — Filament ultrastructure and organisation in vertebrate smooth muscle. Contraction hypothesis based of localisation of actin and myosin, *J. Cell Biol.*, **45**: 303–321.
- [65] PARKER F., ODLAND G. F., 1966 — The corelative histochemical biochemical and electron microscopic studies of experimental atherosclerosis in rabbit aorta with special reference to two myointimal cells, *Amer. J. Pathol.*, **48**: 197–239.
- [66] PETERS T. J., MULLER M., De DUVE, 1972 — Lysosomes of the arterial wall, *J. Exp. Med.*, **136**: 1117–1139.
- [67] PARTRIDGE S. M., 1966 — Biosynthesis and nature of elastin structure, *Fed. Proc.*, **26**: 1023–1029.
- [68] POLLAK O. J., 1968 — Recent advances in the metabolism of arteries. Tissue cultures, homogenates and slices, *Progr. Biochem. Pharmacol.*, (Karger, Basel and New York), **4**: 265–269.
- [69] POLLAK O. J., ADACHI M., 1968 — Human and rabbit arterial cells compared in tissue cultures, *Progr. Biochem. Pharmacol.*, (Karger), **4**: 294–304.
- [70] POLLAK O. J., 1969 — Tissue cultures. Monographs on atherosclerosis, Karger Basel and New York.
- [71] POLLAK O. J., ENGEL A. F., KOKUBU T., MORROW P., 1960 — Amino acid patterns in healthy and diseased aorte of rabbits. New approaches to the study of aging and of atherosclerosis, *Abst. 5th Int. Congr. Gerontology*, San Francisco.
- [72] PRIEST R. E., PRIEST J. H., 1964 — Redifferentiation of connective tissue cells in serial cultures, *Science*, **145**: 1053–1054.

- [73] ROBERTSON A. L., INSULL W., 1967 — Dissection of normal and atherosclerotic human artery with proteolytic enzymes in vitro, *Nature, London*, **214**: 821–822.
- [74] ROBERTSON A. L., 1965 — Metabolism and ultrastructure of the arterial wall in atherosclerosis, *Cleveland Clin. Quart.*, **32**: 99–117.
- [75] ROSNOWSKI A., 1966 — Badania doświadczalne elastoplazji, Praca habilitacyjna, Wyd. AM. Warszawa.
- [76] ROSS R., KLEBANOFF S. J., 1971 — The smooth muscle cell (In vivo synthesis of connective tissue proteins.), *J. Cell. Biol.*, **50**: 159–171.
- [77] ROSS R., 1971 — The smooth muscle. II Growth of smooth muscle in culture and formation of elastic fibers, *J. Cell. Biol.*, **50**: 172–186.
- [78] ROSS R., 1973 — The elastic fiber, *J. Hist. Cytoch.*, **21**: 199–208.
- [79] SANDLER M., BOURNE S. M., 1962 — Some histochemical observation on human aortic atheroma, *J. Amer. Med. Ass.*, **179**: 43–46.
- [80] SCHOENBERG C. F., RUEGG J. C., NEDHAM D. M., SCHIRMOR R. H., NEMTSCHKEK-GANSLER H., 1966 — A biochemical and EM study of the contractile proteins in vertebrate smooth muscle, *Biochem., Z.*: 345–355.
- [81] SCHOENFELDER M., 1969 — Orthologie und Pathologie der Langhans Zellen der Aorten-intima des Menschen, *Path et Microb.*, **33**: 129–145.
- [82] SCHWARZ W., 1964 — Elektronenmikroskopische Untersuchungen über die Bildung elastischer in der Gevebekultur, *Zeitsch. Zelforsch.*, **XX. 63**: 639–643.
- [83] SEIFERT K., 1963 — Über experimentale Atheromatose der Kanichenaorta, *Zeitschrift für Zellforsch.*, **61**: 276–316.
- [84] SHIMMS H. S., 1937 — The stimulating action of trypsinized on fresh adult tissue, *J. Gen. Physiol.*, **20**: 603–620.
- [85] SIMPSON C. F., HARMS R. H., 1968 — The nature of the atherosclerotic plaque of the aorta of turkeys, *J. Atheroscler. Res.*, **8**: 143–153.
- [86] SOLMYO A. P., SOLMYO A. V., 1968 — Vascular smooth muscle. Normal structure, pathology, biochemistry and biophysics, *Pharmacol. Rev.*, **20**: 197–272.
- [87] STADELI H., 1966 — Der Einfluss des Lebensalters auf die Wandstruktur der isolierten, künstlich gedahnten Aorta thoracalis des Meerschweinchens, *Angiologica*, **3**: 213–225.
- [88] STEIN O., RACHMILEWITZ D., EISENBERG S., STEIN Y., 1970 — Aortic phospholipids. A biochemical, radioautographic and morfologic study of phospholipids localication in normal adult aorta, *Israel. J. Med. Sci.*, **6**: 53–71.
- [89] TAKAGI K., 1969 — Electron microscopial and biochemical studies of the elastogenesis in embryo chick aorta, *Kumamoto Med. J.*, **22**: 1–15.
- [90] TAKAGI K., 1969 — On elastins isolated from the subcellular fractions of embryonic chick aorta, *Kumamoto Med. J.*, **22**: 15–27.
- [91] TUME R. K., BRADLEY T. R., DAY A. J., 1969 — An investigation by tissue culture techniques an the growth of foam cells isolated form rabbit, *J. Atheroscler. Res.*, **9**: 151–157.
- [92] TOMASZEWSKI J., HANZLIK J., ŁOPATYŃSKI I., GILATOWSKA B., 1971 — Badania nad składem chemicznym ściany naczyniowej, *Pol. Arch. Med. Wew.*, **57**: 51–59.
- [93] TATOŃ J., HINEK A., WISNIEWSKA A., 1972 — Badania nad zużyciem glukozy przez izolowane komórki naczyń wieńcowych, *Pamiętnik XXI. Konf. Sekcji Diabetol. Tow. Int. Pol.*, **20**.
- [94] YAMAMOTO H. S., SPARARNGE C., HAMEL H., 1971 — Colonisation of

- lipid-laden cells from aortic intima of cholesterol-fed rabbits, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **138**: 901-908.
- [95] WAHL P., SANWALD R., 1963 — The oxygen, glucose and fructose consumption of the rat aorta in differed substrate concentration, *J. Ather. Res.*, **3**: 237-241.
- [96] WHEREAT A. F. 1966 Fatty acids synthesis in cell-free system from rabbit aorta, *J. Lipid. Res.*, **7**: 671-677.
- [97] WISSLER R. W., 1968 — The arterial medial cells, smooth muscle or multi-functional mesenchyme?, *J. Atheroscler. Res.*, **8**: 201-213.
- [98] WOLINSKY H., GLAGOV S., 1967 — A lamelar unit of aortic medial structure and function in mamals, *Circ. Res.*, **20**: 99-111.
- [99] WOLINSKY H., GLAGOV S., 1967 — Nature of species differences in the medial distribution of aortic vasa vasorum in mammals, *Circ. Res.*, **20**: 409-421.
- [100] WEISS L., 1966 — Studies on cells deformability effects of some proteolytic enzyme, *J. Cell Biol.*, **1**: 39-43.
- [101] WIŚNIEWSKA A., 1972 — Praca doktorska, A. M. Warszawa.

Otrzymano: maj, 1974.

Przyjęto: czerwiec, 1974.

*Adres autora: III Klinika Chirurgiczna AM, ul. Lindleya 4,
02-005 Warszawa.*

ROLA PRZECIWCIAŁ ODPORNOŚCIOWYCH W INDUKOWANIU CYTOTOKSYCZNYCH WŁAŚCIWOŚCI LIMFOCYTÓW IN VITRO

Henryk SKURZAK

Zakład Immunologii, Instytut Onkologii, Warszawa

Streszczenie. Wyniki badań immunologicznych poza ustrojem dowodzą, że normalne, nieuczulone limfocyty w obecności swoistych przeciwciał mogą stać się cytotoksyczne w stosunku do komórki docelowej. Limfocyty zaangażowane w reakcji cytotoksycznej odznaczają się znacznym powinowactwem do kompleksów antygen-przeciwciało oraz obecnością na swej powierzchni receptora dla komplementu. Warunkiem zapoczątkowania reakcji cytotoksycznej jest obecność receptora Fc na powierzchni komórki efektorowej. Fakty doświadczalne wskazują, że limfocyty, które stają się cytotoksyczne w obecności przeciwciał, różnią się od komórek linii T i mimo że mają na swej powierzchni wyznaczniki charakterystyczne dla komórek typu B, nie ma bezpośrednich dowodów, że są to komórki B lub ich prekursorzy. Z dotychczasowych badań wynika również, że kompleksy antygen-przeciwciało indukują cytotoksyczność limfocytów, natomiast wolne przeciwciała nie mają takich właściwości.

W ostatnich latach uzyskano wiele dowodów doświadczalnych wskazujących, że komórki limfoidalne, w warunkach pozaustrojowych, są zdolne do niszczenia właściwych komórek docelowych. Efekt cytotoksycznego działania limfocytów jest, przy zastosowaniu rozmaitych modeli doświadczalnych, immunologicznie swoisty i stanowi prawdopodobnie wyraz aktywnego działania komórek efektorowych in vivo w procesach takich jak odrzucenie alloprzeszczepu lub kontrola wzrostu nowotworu. Jeżeli zjawisko reaktywności komórkowej w badaniach in vitro znajduje swoje odzwierciedlenie w procesach zachodzących w organizmie, jest sprawą niezwykle istotną rozwijanie badań mających na celu zrozumienie mechanizmu reakcji komórka efektorowa — komórka docelowa oraz badań nad sterowaniem aktywnością limfocytów.

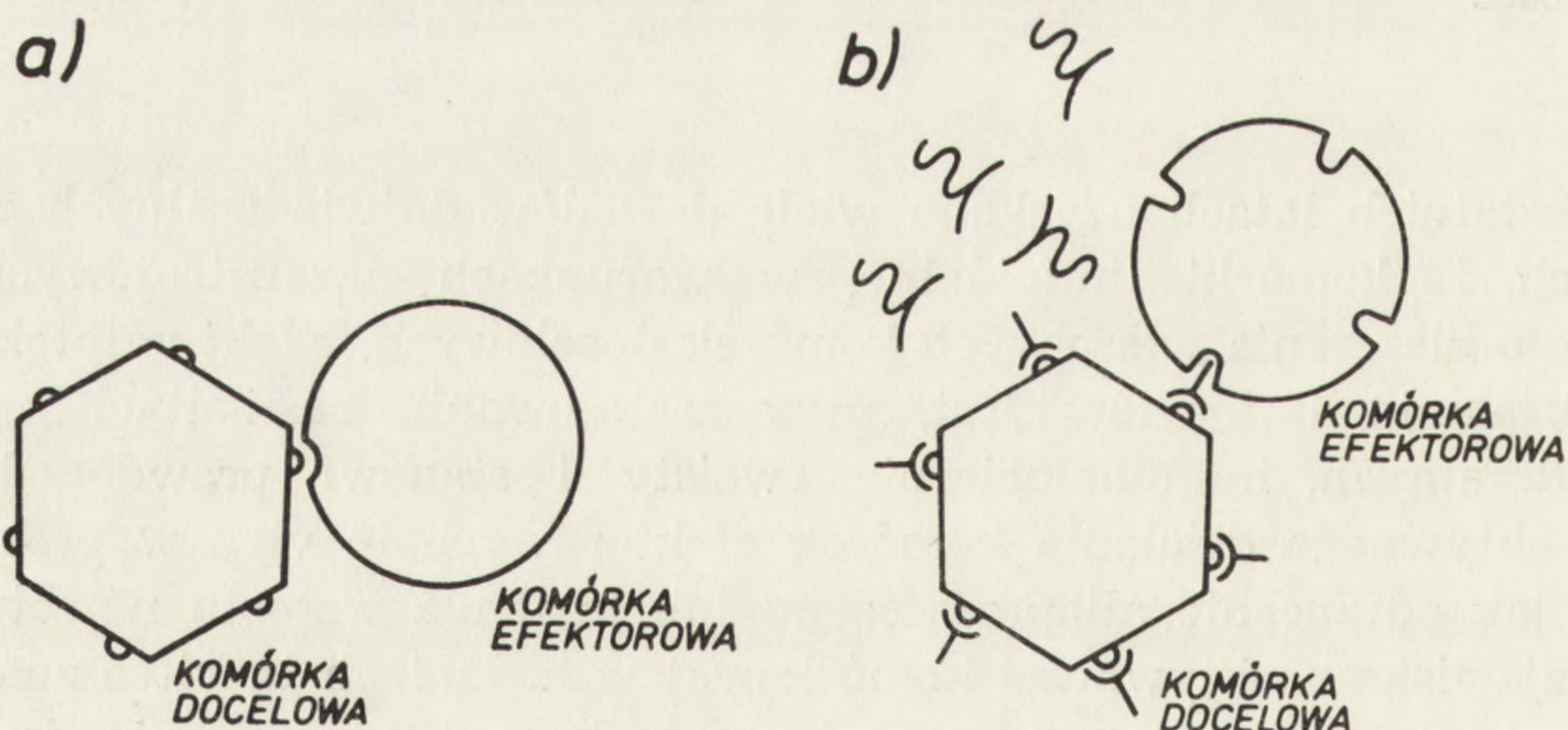
W niniejszym artykule zostaną przedstawione niektóre ostatnio uzyskane fakty doświadczalne, pozwalające bliżej zrozumieć: 1) sposób indu-

kowania cytotoksyczności limfocytów przez przeciwciała swoiste wobec antygenów komórkowych oraz 2) właściwości komórek efektorowych biorących udział w takiej indukcji.

TYP LIMFOCYTÓW ZAANGAŻOWANYCH W IMMUNOLOGICZNIE SWOISTEJ REAKCJI NISZCZENIA KOMÓREK

W doskonałym artykule przeglądowym Perlmanna i Holma [22] zostało przedstawionych wiele obserwacji wskazujących, że cytotoksyczność limfocytów *in vitro*, wykazana w różnych układach doświadczalnych, ma wszelkie cechy swoistości immunologicznej. Obecnie jest wiadomo, że co najmniej dwie drogi prowadzą do niszczenia komórki docelowej w reakcjach odpornościowych.

Po pierwsze w mechanizmach odpornościowych zaangażowane są limfocyty rozpoznające swoiste antygeny na powierzchni komórki docelowej. Rozpoznanie to odbywa się prawdopodobnie przy bezpośrednim zeknięciu się komórki efektorowej i komórki docelowej. Komórkami efektorowymi są limfocyty grasiczo-pochodne określane jako komórki T i jak to zostało doświadczalnie stwierdzone, biorą one udział w reakcjach odpornościowych związanych z antygenami zgodności tkankowej [6, 7, 30]. Schemat takiej reakcji przedstawiono na rys. 1a. Istnieją ponadto dowody wskazujące, że komórki T współpracują w reakcjach immunologicznych z innymi rodzajami limfocytów [20].



Rys. 1. a) Cytotoksyczny limfocyt T reagujący swoiście z antygenami komórki docelowej; b) Cytotoksyczny limfocyt B reagujący z komórką docelową na drodze aktywacji przez immunoglobuliny związane z antygenami komórkowymi. Wolne przeciwciała nie mają powinowactwa do komórki cytotoksycznej B i ich związek z antygenami jest konieczny dla zapoczątkowania reakcji cytotoksycznej (wg MacLennana [14]).

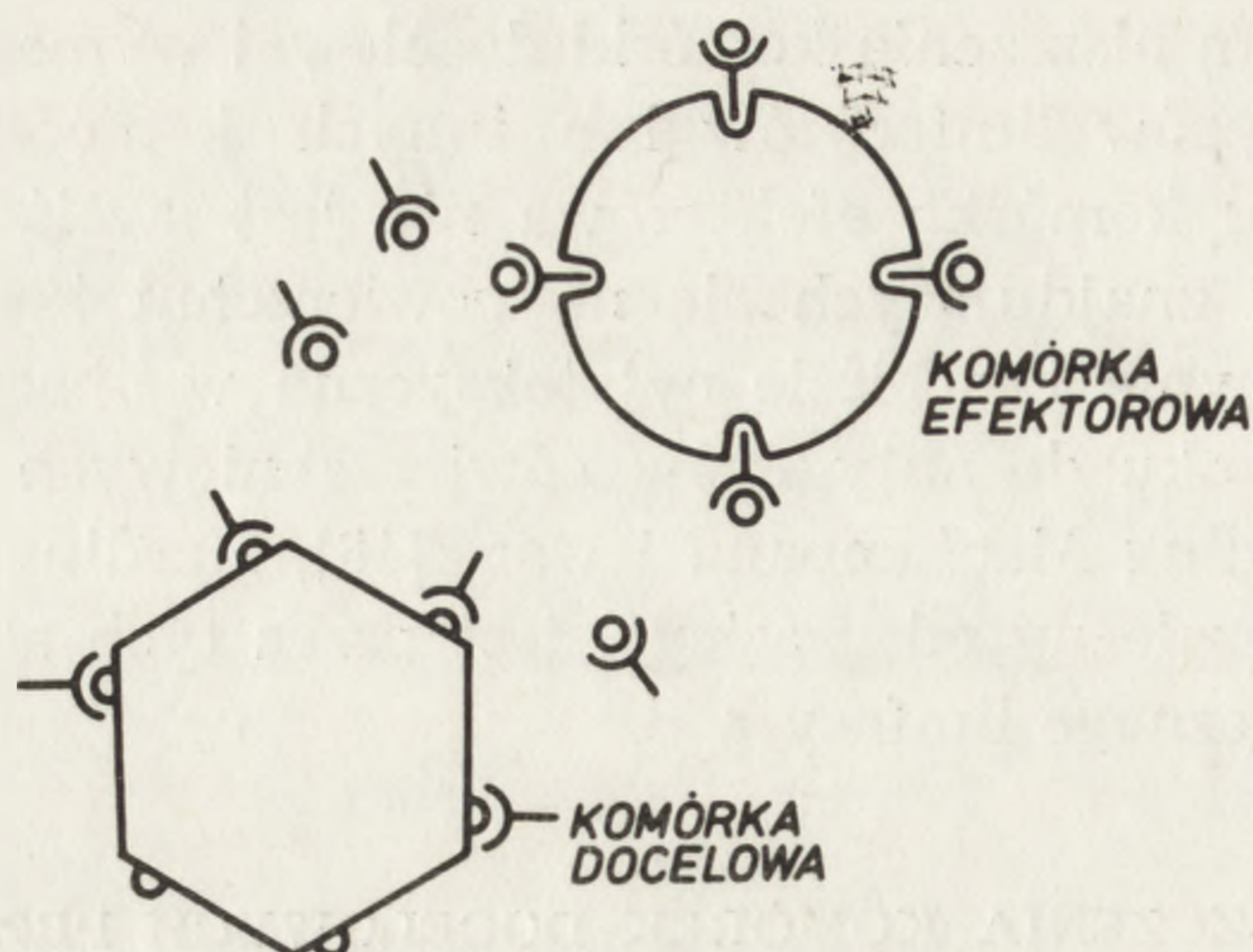
Inny mechanizm niszczenia komórki docelowej wymaga udziału dwóch a nawet trzech typów limfocytów lub innych komórek efektorowych. W tym przypadku komórka efektorowa nie jest swoiście cytotoksyczna wobec antygenów znajdujących się na powierzchni komórki docelowej, ale staje się aktywnie i swoiście cytotoksyczna w obecności przeciwciał swoistych w stosunku do antygenów powierzchniowych komórki docelowej (rys. 1b). Według MacLennana i wsp. [18], Hardinga i wsp. [8] limfocyt taki jest niezależny od grasicy i jest przez tych autorów określany mianem cytotoksycznego limfocyta B.

PRZYKŁADY NISZCZENIA KOMÓREK DOCELOWYCH PRZEZ LIMFOCYTY W OBECNOŚCI SWOISTYCH PRZECIWCIAŁ

Po raz pierwszy Perlmann i Holm [23] przedstawili jednoznaczne doświadczenia wskazujące, że swoiste przeciwciała skierowane przeciwko antygenom komórki docelowej stymulują nieuczulone limfocyty do reakcji cytotoksycznej. W doświadczeniach tych komórką docelową były erytrocyty kurczęcia opłaszczony antygenem tuberkuliny (PPD). Komórki śledzionowe świnki morskiej uczulonej B.C.G. były toksyczne wobec komórek docelowych, ale również cytotoksyczne stawały się limfocyty pochodzące od zwierząt nieuodpornionych, jeżeli do środowiska zawierającego komórki docelowe dodawano surowicy odpornościowej od zwierząt immunizowanych. Dalsze przykłady tego typu cytotoksyczności nieuczulonych limfocytów w stosunku do komórek docelowych i w obecności surowicy odpornościowej zostały opisane w układach syngenicznych, allogenicznych i ksenogenicznych [5, 11, 17, 28, 34].

HAMOWANIE REAKCJI CYTOTOKSYCZNYCH LIMFOCYTÓW

Według MacLennana i wsp. [19] przeciwciała, które uczulają komórki docelowe mają bardzo słabe powinowactwo do limfocytów. Natomiast wolne kompleksy antygen-przeciwciało mogą łączyć się bardzo silnie z limfocytami cytotoksycznymi [25]. Tak więc dochodzić może do konkurencyjnego łączenia się receptorów limfocytów z wolnymi kompleksami antygen-przeciwciało lub też z przeciwciałami opłaszczającymi komórki docelowe [13]. Tego rodzaju kompetencyjne łączenie się kompleksów antygen-przeciwciało z limfocytami prowadzi do zahamowania reakcji cytotoksycznych [16]. Na rys. 2 przedstawiono schematycznie mechanizm tego zjawiska. Efekt hamowania, albo, jak to się obecnie częściej określa, blokowania immunologicznych reakcji komórkowych skierowanych przeciwko antygenom komórkowym, znajduje swoje szerokie implikacje szczególnie w procesie rozwoju i wzrostu tkanki nowotworowej.



Rys. 2. Konkurencyjne łączenie się wolnych kompleksów antygen-przeciwciało oraz przeciwciało związanych z antygenami komórkowymi z determinantami dla immunoglobulin na powierzchni limfocyta cytotoksycznego (wg MacLennana [14]).

Zagadnienie powyższe, będące przedmiotem aktualnie prowadzonych badań w wielu ośrodkach naukowych, stanowić może przedmiot osobnego opracowania.

WŁAŚCIWOŚCI PRZECIWCIAŁ STYMULUJĄCYCH CYTOTOKSYCZNOŚĆ LIMFOCYTÓW

Interesującą właściwością surowic odpornościowych indukujących cytotoksyczność limfocytów jest to, że w pewnych układach doświadczalnych są często aktywne w bardzo niskich stężeniach [9, 18]. W rozcieńczeniach takich, jak $1:10^6$ surowice odpornościowe były nietoksyczne w obecności komplementu, zachowując właściwości indukowania cytotoksyczności limfocytów przeciwko komórkom docelowym [19]. Perlmann i wsp. [15, 26] w doświadczeniach z krwinkami kurczęcia potrafili wykazać, że niektóre surowice od królików hiperimmunizowanych krwinkami są aktywne i zdolne do indukowania cytotoksyczności nieuczulonych limfocytów w rozcieńczeniu dochodzącym do $10^{-9} - 10^{-11}$. Oznacza to, że w określonych warunkach doświadczalnych kilkaset molekuł przeciwciała na jedną krwinkę wystarcza, aby wywołać efekt cytotoksyczny przy udziale nieuczulonych limfocytów. Rozdział surowic odpornościowych na swoiste frakcje pozwolił stwierdzić, że jedynie przeciwciała klasy IgG są aktywne we wzbudzaniu cytotoksyczności limfocytów [16, 24].

Faza indukcji wymaga obecności niezmienionych fragmentów Fc, podczas gdy fragmenty $F(ab')_2$ i Fab odgrywają jedynie rolę w zahamowaniu reakcji cytotoksycznych prowokowanych przez niezmienione przeciwciała [21, 12]. Wyniki badań szeregu autorów [14, 12, 21] wskazują, że

receptory dla fragmentów Fc przeciwciał na komórkach efektorowych, istotne w fazie indukcji reakcji cytotoksycznej, reagują z IgG pochodzącymi od różnych gatunków i to niezależnie od klasy tej frakcji immunoglobulin z wyjątkiem IgG4.

ZNACZENIE KOMPLEKSÓW ANTYGEN-PRZECIWCIAŁO W INICJOWANIU CYTOTOKSYCZNOŚCI LIMFOCYTÓW

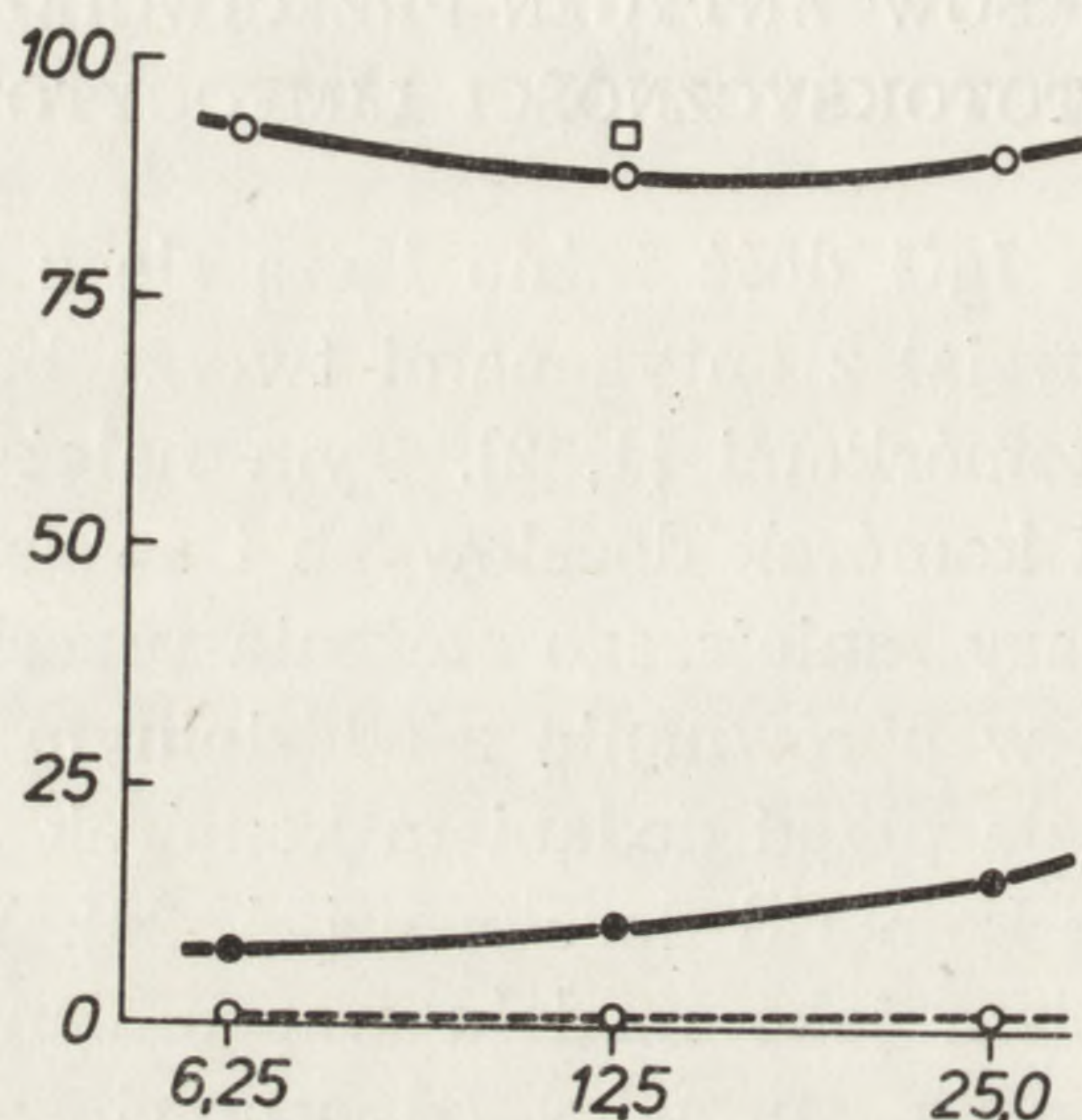
Wolne przeciwciała IgG dość luźno łączą się z limfocytami, podczas gdy kompleksy przeciwciał z antygenami tworzą bardziej trwałe wiązania z tymi samymi komórkami [1, 2]. Tym należy tłumaczyć fakt, że limfocyty w obecności komórek docelowych i swoistych przeciwciał wymagają około 10 000 razy mniejszego stężenia przeciwciał dla wywołania reakcji cytotoksycznej w porównaniu z oddzielnym traktowaniem limfocytów przez przeciwciała przed dodaniem komórek efektorowych do środowiska zawierającego komórki docelowe [24, 25]. W interesujących doświadczeniach, z użyciem jako modelu wspomnianych uprzednio krwinek czerwonych kurczęcia, surowicy odpornościowej i limfocytów nieuczulonych, Perlmann i wsp. [25] wykazali, że przeciwciała związane z antygenem są głównym elementem w inicjowaniu cytotoksyczności limfocytów, podczas gdy wolne przeciwciała mają pod tym względem znacznie mniejsze znaczenie.

CHARAKTERYSTYKA LIMFOCYTÓW AKTYWNYCH W NISZCZENIU KOMÓREK DOCELOWYCH UCZULONYCH SWOISTYMI PRZECIWCIAŁAMI

W poprzednim rozdziale, na podstawie badań Perlmana i wsp. [25, 26] oraz innych autorów stwierdziliśmy, że obecność receptorów Fc na komórkach efektorowych odgrywa istotną rolę w cytotoksyczności limfocytów, indukowanej przeciwciałami odpornościowymi. Obecność receptorów Fc stwierdzono na makrofagach, monocytach, granulocytach [3, 10] oraz na limfocytach szpikowych [1, 2]. Limfocyty grasicze nie mają receptorów Fc na swej powierzchni [1, 2]. Ponadto Van Boxel i wsp. [4] wykazali, że limfocyty z receptorami dla komplementu są aktywnie zaangażowane w reakcji cytotoksycznej, wzbudzonej obecnością przeciwciał odpornościowych.

Wykorzystując fakt, że limfocyty szpiko-pochodne oprócz receptorów Fc mają na swej powierzchni immunoglobuliny [27], Perlmann i wsp. [25, 26], posługując się techniką opisaną przez Wigzella i wsp. [31], izolowali takie komórki, badając następnie właściwości cytotoksyczne pozostałej frakcji komórkowej w obecności przeciwciał odpornościowych. W skrócie technika izolacji limfocytów z immunoglobulinami na po-

wierzchni polega na inkubacji wyjściowej populacji limfocytów w kolumnach zawierających szklane kulki opłaszczone anty-immunoglobulinami. Frakcja komórek uzyskanych po wypłukaniu kolumny nie zawiera limfocytów posiadających na powierzchni immunoglobuliny. Przykładem doświadczenia przeprowadzonego przez Perlmana i wsp. [26] jest rys. 3.

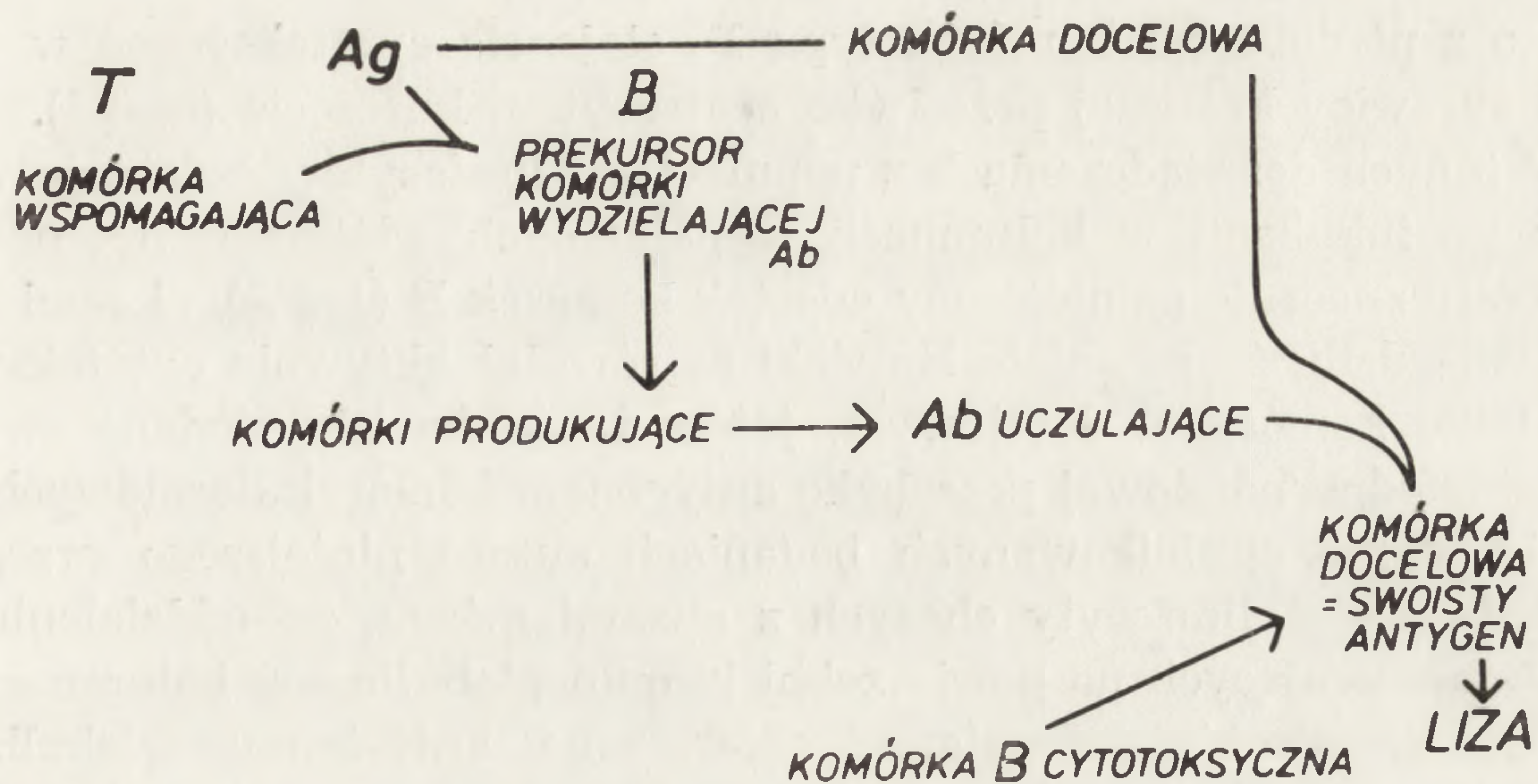


Rys. 3. Cytotoksyczność limfocytów po przepuszczeniu przez kolumny zawierające anty-immunoglobuliny. ●-● limfocyty wypłukane z kolumny zawierającej anty-Ig; ○-○ limfocyty wypłukane z kolumny zawierającej Ig; □-□ limfocyty wypłukane z kolumny nie zawierającej immunoglobulin.

$1,25 \times 10^6$ limfocytów inkubowano ze zmienną liczbą erytrocytów kurczenia znakowanych Cr^{51} w obecności surowicy króliczej anty-krwinkowej (linia ciągła), lub normalnej surowicy (linia przerywana). Czas inkubacji 20 godz. Surowice inaktywowane. Odcięta: stosunek liczby limfocytów na jeden erytrocyt w różnych próbach testowych; rzędna: ilość uwalnianego Cr^{51} w odsetkach skorygowane odsetkiem uwolnionego Cr^{51} w próbach bez limfocytów (2,0-3,3%) (wg Perlmana i wsp. [26])

Populacja komórek przed frakcjonowaniem, oczyszczona z monocytów i granulocytów, jest silnie cytotoksyczna wobec krwinek opłaszczonych swoistymi przeciwciałami, podczas gdy frakcja komórek uzyskana po wypłukaniu z kolumny anty-Ig wykazuje wyraźny zanik właściwości cytotoksycznych w obecności swoistych przeciwciał.

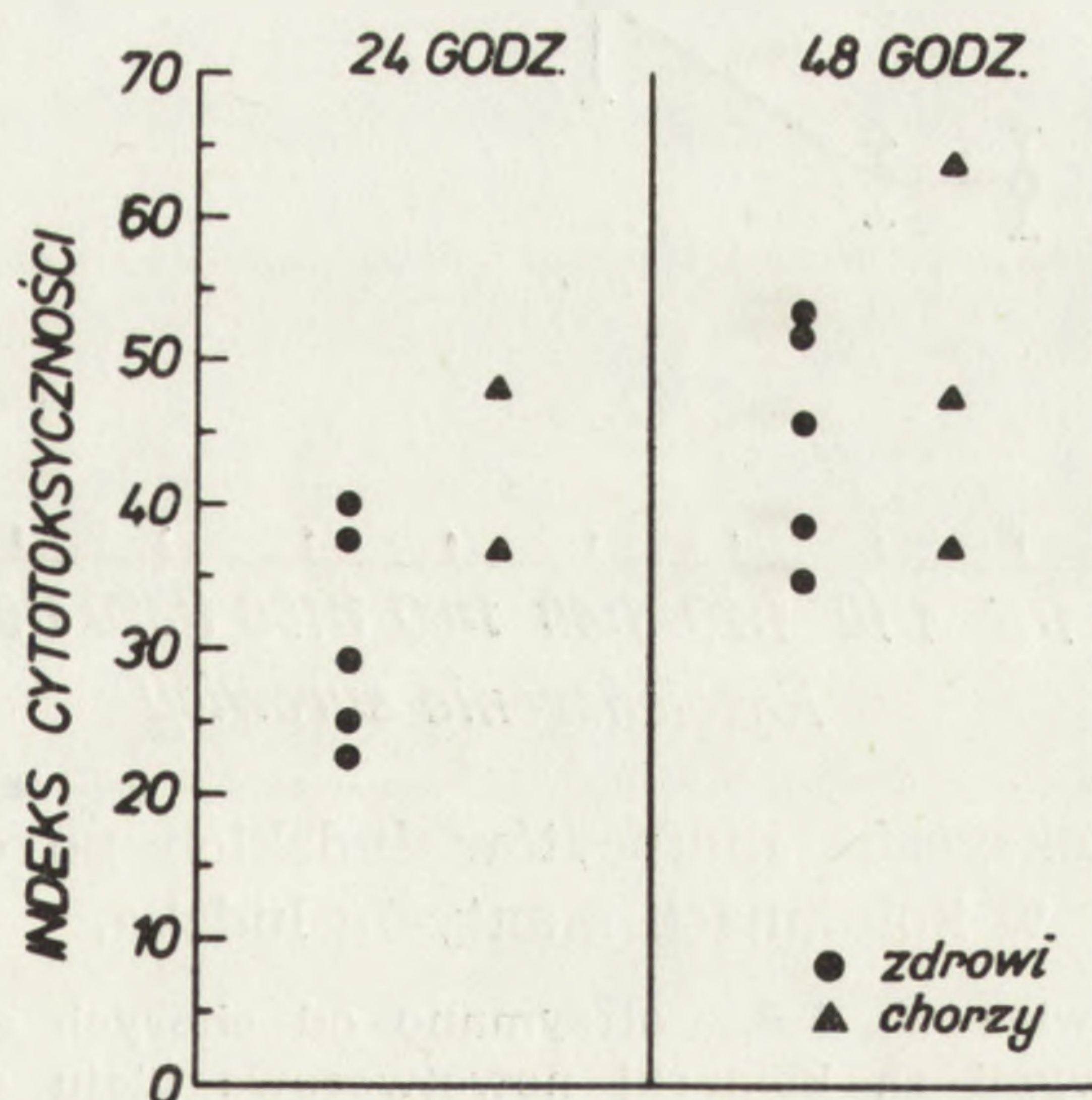
Dalsze badania nad określeniem właściwości komórek efektorowych cytotoksycznych wobec komórek docelowych uczulonych przeciwciałami przeprowadził m. in. MacLennan [14]. Ze względu na obszerny materiał doświadczalny, ograniczę się jedynie do przedstawienia wniosków wynikających z tych badań. Mc Lennan stwierdził, że komórki efektorowe, które stają się cytotoksyczne w obecności przeciwciał, nie mają właściwości przylegania do szkła i nie mają zdolności do fagocytozy. Ponadto komórki te nie wymagają obecności grasicy i są różne od komórek produkujących przeciwciała lub ich prekursorów. Aktywne komórki efektorowe MacLennan [14] określił mianem cytotoksycznych limfocytów B, proponując przedstawiony na rys. 4 schemat mechanizmu aktywacji komórek efektorowych przez przeciwciała.



Rys. 4. Mechanizm reakcji komórkowej prowadzący do cytotoksyczności limfocytów w stosunku do komórki docelowej.

Schemat zaproponowany przez MacLennana na podstawie doświadczeń modelowych na szczurach z użyciem komórek Changa (linia ludzkich komórek wątrobowych hodowanych in vitro). Ag — antygeny komórek Changa; Ab — przeciwciała odpornościowe przeciwko komórkom Changa (wg MacLennana [14])

Istnieją również nieliczne doniesienia, z których wynika, że przy braku limfocytów na powierzchni których znajdują się immunoglobuliny, pozostała populacja komórek staje się również cytotoksyczna w obecności przeciwciał swoistych przeciwko komórkom docelowym. Wisloff i Froland [33], posługując się modelem doświadczalnym opisanym przez Perlmana i Perlmana [25, 26] z erytrocytami ptasimi jako komórkami docelowymi, stwierdzili, że limfocyty chorych z agammaglobulinemią,

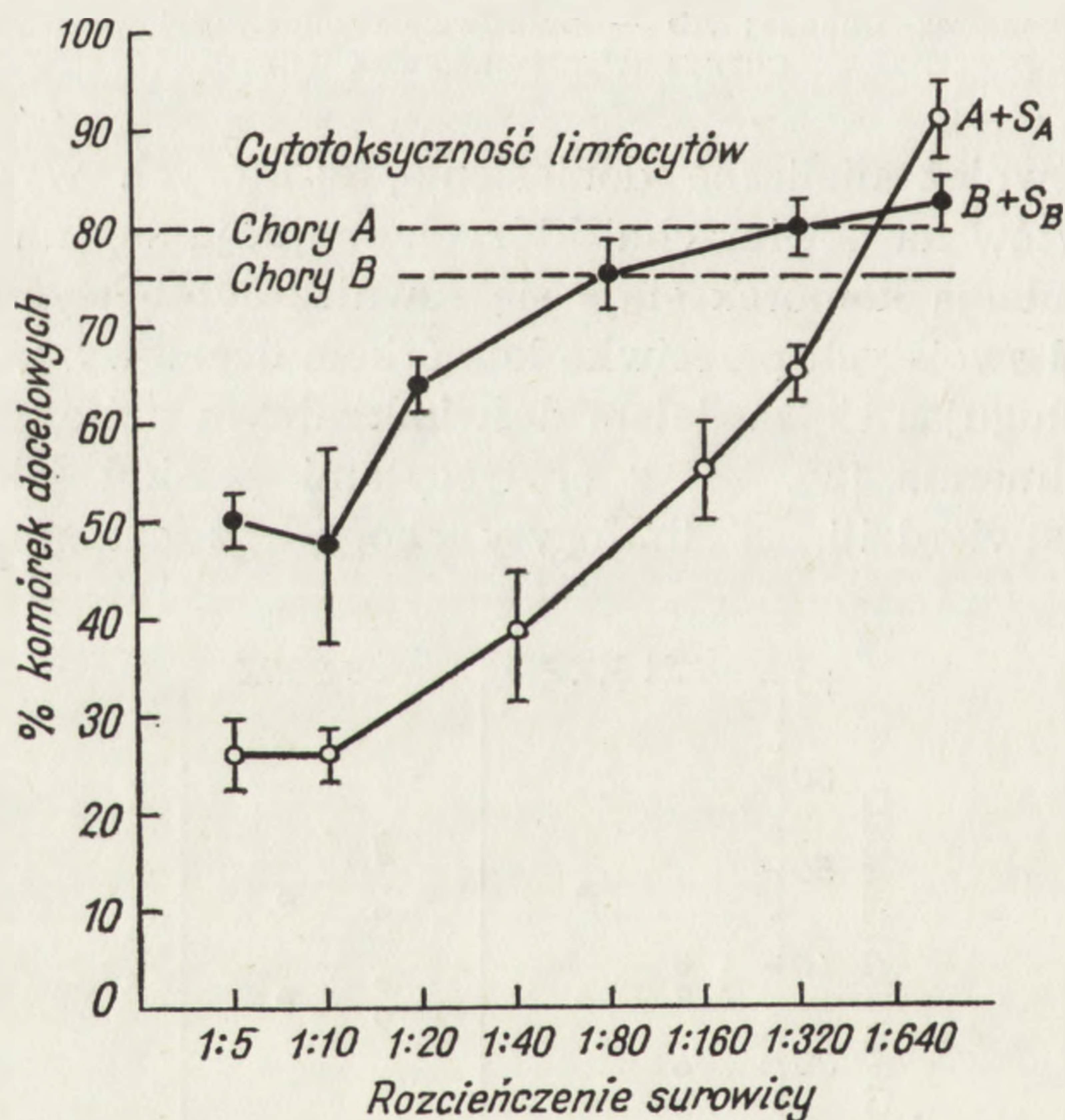


Rys. 5. Aktywność cytotoksyczna limfocytów od zdrowych dawców oraz dawców z niedoborem limfocytów B (agammaglobulinemia)

Komórkami docelowymi są erytrocyty kurczęcia znakowane Cr^{51} i opłaszczane surowicą odpornościową króliczą antykrwinkową. Indeks cytotoksyczny skorygowany wynikami uzyskanymi z normalną surowicą króliczą. Czas inkubacji 24 i 48 godz. (wg Wisloff i wsp. [33]).

a więc z niedoborem komórek typu B, stają się cytotoksyczne w obecności surowicy króliczej przeciwko erytrocytom kurczęcia (rys. 5).

W innych doświadczeniach z populacjami limfocytów ludzi zdrowych, które po inkubacji w kolumnach wypełnionych włóknami nylonowymi zawierały znacznie zmniejszony odsetek komórek B (1-6%), ci sami autorzy stwierdzili, że pozostałe komórki są również aktywnie cytotoksyczne przeciwko komórkom docelowym, jeżeli do środowiska dodano swoistej surowicy odpornościowej przeciwko antygenom komórek docelowych. Podobnie w nie opublikowanych badaniach autora niniejszego przeglądu stwierdzono, że limfocyty chorych z guzami mózgu, po oddzieleniu komórek zawierających na powierzchni immunoglobuliny w kolumnach zawierających drobiny degalanu, opłaszczone anty-immunoglobulinami, stają się bardziej cytotoksyczne przeciwko nowotworowym komórkom gleju *in vitro* w obecności surowic własnych chorych (rys. 6). W przytoczonych powyżej badaniach populacje limfocytów, mimo oczyszczenia,



Rys. 6. Aktywność cytotoksyczna limfocytów ludzkich po oddzieleniu komórek B w kolumnach z anty-Ig ludzką.

Limfocyty A i B oraz surowice S_A i S_B otrzymano od chorych z rozpoznaniem Astrocytoma III. Komórkami docelowymi są komórki nowotworowe gleju przystosowane do wzrostu *in vitro*. Linie poziome przerywane określają cytotoksyczność samych limfocytów, natomiast linie ciągłe wyznaczają cytotoksyczność tych samych limfocytów po opłaszczeniu komórek docelowych odpowiednimi surowicami autologicznymi. Cytotoksyczność limfocytów wyrażano jako odsetek komórek docelowych pozostałych w płytkach testowych po zakończeniu doświadczenia w odniesieniu do kontroli nie zawierającej limfocytów ani surowicy. Same surowice pozostawały bez wpływu na ilość komórek docelowych (z badań własnych dotychczas nie opublikowanych)

zawierały ciągle nieznaczny odsetek (1–6%) komórek z immunoglobulinami na powierzchni. Być może, że ten niewielki odsetek komórek B był wystarczający do zapoczątkowania reakcji pozostałych limfocytów przeciwko komórkom docelowym uczulonym swoistymi przeciwciałami. Jeżeli jednak, jak to wynika z cytowanych poprzednio badań, obecność receptorów Fc na komórkach efektorowych jest niezbędna do wzbudzenia cytotoxycznosci w obecności swoistych przeciwciał to należy wspomnieć o badaniach Yoshidy i Anderssona [35]. Badacze ci stwierdzili mianowicie obecność receptorów Fc na uczulonych limfocytach grasiczo-pochodnych u myszy.

ROLA IMMUNOGLOBULIN ZNAJDUJĄCYCH SIĘ NA POWIERZCHNI LIMFOCYTÓW W REAKCJACH CYTOTOKSYCZNYCH

Fracja limfocytów wywodzących się ze szpiku kostnego określanych jako komórki B charakteryzuje się m. in. obecnością immunoglobulin na swej powierzchni [22, 29, 32]. Komórkom B przypisuje się istotne znaczenie w reakcjach cytotoxycznych indukowanych obecnością swoistych przeciwciał [14, 26]. Rezultaty doświadczeń z usuwaniem komórek B z badanej populacji wskazują na ich udział w reakcjach cytotoxycznych, ale otwartym zostaje pytanie jakie jest znaczenie immunoglobulin na powierzchni komórki efektorowej. W celu rozstrzygnięcia wątpliwości Perlmann i wsp. [26] przeprowadzili doświadczenia, w których porównywali zdolność do hamowania reakcji cytotoxycznej przeciwciał przeciw fragmentom Fab i F(ab')₂ uzyskanym trawieniem trypsyną. Zahamowanie reakcji cytolytycznych otrzymywano jedynie z surowicami anti-Fab, co zdaniem autorów przeczy udziałowi immunoglobulin komórkowych w reakcji cytotoxycznej limfocytów przeciwko komórkom docelowym. Zahamowanie cytotoxyczności limfocytów przez IgG anti-Fab może być wynikiem blokowania receptorów Fc różnych w swych właściwościach od immunoglobulin znajdujących się na powierzchni limfocytów [2].

Podsumowując rozdział dotyczący charakterystyki limfocytów aktywnych cytotoxycznie przeciwko komórkom docelowym w obecności swoistych przeciwciał można stwierdzić, że komórki takie różnią się od komórek typu B identyfikowanych na podstawie obecności Ig na powierzchni i że komórki te różnią się również od limfocytów typu T reagujących poprzez kontakt ze swoistym antygenem.

LITERATURA

- [1] BASTEN A., MILLER J. E. A. P., SPRENT J., PYE J., 1972 — A receptor for antibody on B lymphocytes. I. Method of detection and functional significance, *J. Exp. Med.* **135**: 610.
- [2] BASTEN A., WARNER W. L., MENDEL T., 1972 — A receptor for antibody

- on B lymphocytes. II. Immunochemical and electronmicroscopy characteristics, *J. Exp. Med.* **135**: 627.
- [3] BERKEN A., BENNACERRAF B., 1966 — Properties of antibodies cytophilic for macrophages, *J. Exp. Med.* **123**: 119.
- [4] BOXEL I. A., PAUL W. E., FRANK M. M., GREEN I., 1973 — Antibody dependent lymphoid cell mediated cytotoxicity: role of lymphocytes bearing a receptor for complement, *J. Immunol.*, **110**: 1027.
- [5] BUBENIK J., PERLMANN P., HASEK M., 1970 — Induction of cytotoxicity of lymphocytes from tolerant donors by antibodies to target cell alloantigens, *Transplantation*, **10**: 290.
- [6] CEROTTINI J. C., NORDIN A. A., BRUNNER K. T., 1970 — Specific in vitro cytotoxicity of thymus derived lymphocytes sensitised to all antigens, *Nature*, **228**: 1308.
- [7] GOLDSTEIN P., WIGZELL H., BLOMGREN H., SVEDMYR E. A. J., 1972 — Cell mediating specific in vitro cytotoxicity. II. Probable autonomy of Thymus-processed lymphocytes (T cells) for the killing of allogeneic target cells, *J. Exp. Med.*, **135**: 890.
- [8] HARDING B., PUDIFIN D. J., GOTCH F., MacLENNAN I. C. M., 1971 — Cytotoxic lymphocytes from rats depleted of Thymus processed cells, *Nature*, (Lond) **232**: 80.
- [9] HOLM G., PERLMANN P., 1969 — Cytotoxicity of lymphocytes and its suppression, *Antibiot. et Chemother. (Basel)* **15**: 295.
- [10] HUBER H., DOUGLAS S. D., FUDENBERG H. H., 1969 — The IgG receptor; an immunological marker for the characterization of mononuclear cells, *Immunology*, **17**: 7.
- [11] LAMON E. W., SKURZAK H., KLEIN E., WIGZELL H., 1972 — In vitro cytotoxicity by a nonthymus-processed lymphocyte population with specificity for a virally determined tumor cell surface antigen, *J. Exp. Med.* **136**: 1072.
- [12] LARSON A., PERLMANN P., 1972 — Study of Fab and F(ab)₂ from rabbit IgG for capacity to induce lymphocyte mediated target cell destruction, *Intern. Arch. Allergy*, **43**: 80.
- [13] MacLENNAN I. C. M., 1972 — Competition for receptors for immunoglobulin on cytotoxic lymphocytes, *Clin. Exp. Immunol.*, **10**: 275.
- [14] MacLENNAN I. C. M., 1972 — Antibody in the induction and inhibition of lymphocyte cytotoxicity, *Transpl. Rev.* **13**: 67.
- [15] MacLENNAN I. C. M., HARDING B., 1970 — Failure of certain cytotoxic lymphocytes to respond mitotically to phytohaemagglutinin, *Nature (Lond)*, **227**: 1246.
- [16] MacLENNAN I. C. M., HOWARD A., 1972 — Evidence for correlation between charge and antigenic specificity of human IgG, *Immunology*, **22**: 1043.
- [17] MacLENNAN I. C. M., LOEWI G., 1968 — The effect of specific antibody to target cells on their specific and non-specific interactions with lymphocytes, *Nature (Lond)* **219**: 1069.
- [18] MacLENNAN I. C. M., LOEWI G., HARDING B., 1970 — The role of immunoglobulins in lymphocyte — mediated cell damage in vitro. I. Comparison of the effects of target cell specific antibody and normal serum factors on cellular damage by immune and non-immune lymphocytes, *Immunology*, **18**: 397.
- [19] MacLENNAN I. C. M., LOEWI G., HOWARD A., 1969 — A serum immuno-

- globulin with specificity for certain homologous target cells, which induced target cell damage by normal human lymphocytes, *Immunology*, **17**: 887.
- [20] MILLER J. F. A. P., BASTEN A., SPRENT J., CHEERS C., 1971 — Review. Interaction between Lymphocytes in immune responses, *Cell. Immunol.*, **2**: 469.
- [21] MÖLLER G., SVEHAG S. E., 1972 — Specificity of lymphocyte mediated cytotoxicity induced by in vitro antibody — coated target cells, *Cell. Immunol.* **4**: 1.
- [22] PERLMANN P., HOLM G., 1968 — Studies on the mechanism of lymphocyte cytotoxicity [w] Mechanisms of Inflammation Induced by Immune Reactions, red. P. Miescher, P. Graber, s. 325.
- [23] PERLMANN P., HOLM G., 1969 — Cytotoxic effects of lymphoid cells in vitro, *Advanc. Immunol.* **2**: 117.
- [24] PERLMANN P., PERLMANN H., 1970 — Contactual lysis of antibody coated chicken erythrocytes by purified lymphocytes, *Cell. Immunol.*, **1**: 300.
- [25] PERLMANN P., PERLMANN H., BIBERFLED P., 1972 — Specifically cytotoxic lymphocytes produced by pre-incubation with antibody complexed targeted cells, *J. Immunol.*, **108**: 558.
- [26] PERLMANN P., PERLMANN H., WIGZELL H., 1972 — Lymphocyte-mediated cytotoxicity in vitro. Induction and inhibition by humoral antibody and nature of effector cells, *Transpl. Rev.*, **13**: 91.
- [27] PERNIS B., FORNI L., AMANTE L., 1970 — Immunoglobulin spots on the surface of rabbit lymphocytes, *J. Exp. Med.* **132**: 1001.
- [28] POLLACK S., 1973 — Specific „arming” of normal lymph-node cells by sera from tumor bearing mice, *Int. J. Cancer*, **11**: 138.
- [29] RAFF M. C., 1971 — Surface antigenic markers for distinguishing T and B lymphocytes in mice, *Transplant. Rev.*, **6**: 52.
- [30] ROUSE B. T., ROLLINGHOFF M., WARNER N. L., 1973 — Tumor immunity to murine plasma cell tumors II. Essential role of T lymphocytes in immune response, *Eur. J. Immunol.*, **3**: 218.
- [31] WIGZELL H., GOLDSTEIN P., SVEDMYR E. A. J., JONDAL M., 1972 — Impact of fractionation procedures on lymphocyte activities in vitro and in vivo. Separation of cells with high concentrations of surface immunoglobulin, *Transplant. Proc.* **4**: 311.
- [32] WILSON J. D., NOSSAL G. J. V., 1971 — Identification of human T and B lymphocytes in normal peripheral blood and in chronic leukaemia, *Lancet*, **2**: 788.
- [33] WISLÖFF E., FRÖLAND S. S., 1973 — Antibody-dependent lymphocyte-mediated cytotoxicity in man: no requirement for lymphocytes with membrane-bound immunoglobulin, *Scand J. Immunol.*, **2**: 151.
- [34] WUNDERLICH J. R., ROSENBERG E. B., CONNOLLY J. M., 1972 — Human lymphocyte dependent cytotoxic antibody and mechanisms of target cell destruction in vitro. *Progr. Immunol.*, **1**: 473.
- [35] YOSHIDA T. O., ANDERSSON B., 1972 — Evidence for a receptor recognizing antigen complexed immunoglobulin on the surface of activated mouse thymus lymphocytes, *Scand. J. Immunol.*, **1**: 401.

Otrzymano: czerwiec, 1974

Przyjęto: lipiec, 1974

Adres autora: ul. Wawelska 15, 02-034 Warszawa.

Enzym podobny do trypsyny aktywuje materiał genetyczny?

Czynniki inicjujące odblokowywanie materiału genetycznego w jądrze komórkowym były od dawna obiektem zainteresowań biologów.

Przekonywający model aktywacji materiału genetycznego otrzymano dokonując fuzji erythrocytu kury z innymi aktywnymi pod względem produkcji RNA i DNA komórkami (przegląd tych prac: M. Kawalec „Hybrydy somatycznych komórek zwierzęcych”, [w] red. J. Kawiak, Z. Osuchowska, A. Przełęcka, „Ultrastruktura i funkcja komórki” PWN, 1973; H. Harris „Jądro i cytoplazma”, PZWL, 1973). Erythrocyty ptaków, a także gadów i płazów mają jądra całkowicie nieaktywne w tym znaczeniu, że nie są one zdolne do syntezy RNA i DNA. Istnienie całkowicie nieaktywnych jąder w erythrocytach tych gromad kręgowców jest alternatywą do całkowitej eliminacji jądra w erythrocytach ssaków.

Gdy erythrocyt kury ulegnie fuzji np. z komórką HeLa, która ma zdolność syntezy DNA i RNA, to następuje ciekawa sekwencja zdarzeń zwana aktywacją jądra erythrocytu. Aktywacja polega m. in. na tym, że jądro takie włącza radioaktywne prekursorzy RNA i DNA. Posługując się takim modelem doświadczalnym udało się Z. Darżynkiewiczowi i wsp. (Proc. Natl. Acad. Sci USA 71, 644-647, 1974) wykazać, że aktywację jądra erythrocytu można w znaczny sposób zahamować hodując hybrydy komórkowe w obecności dobrze przenikających przez błonę inhibitorów trypsyny, przy czym najskuteczniejszy okazał się tosylo-lizylo-chlorometyloketon (TLCK). Podobnego działania nie miały inhibitory innych proteaz, a TLCK nie upośledzał włączania radioaktywnych prekursorów do jąder komórek HeLa, które nie uległy fuzji. Badania te, wskazujące na możliwość aktywacji materiału genetycznego przez enzym lub enzymy podobne do trypsyny, z pewnością zainicjują serię badań nad tym zjawiskiem. Prace M. Burgera (Fed. Proc. 32, 91-101, 1973) sugerują, że czynnik hamowany przez TLCK może powodować zmiany podobne do transformacji nowotworowej komórek, a M. Pieńkowski i wsp. (Exp. Cell Res. 85, 424-428, 1974) wykazali, że trypsyna pobudza *in vitro* wzrost i różnicowanie się zarodków mysich. Udowodniono też, że wbrew utartym poglądom, trypsyna może wnikać do wnętrza komórek (Hodges i wsp. J. Cell Sci., 12, 887-902, 1973).

M. Kawalec

ZAGADNIENIE ROZMIARÓW KOMÓREK ZWIERZĄT KRĘGOWYCH

Henryk SZARSKI

Zakład Anatomii Porównawczej, Instytut Zoologii, Uniwersytet Jagielloński, Kraków

Streszczenie. W artykule omówiono związki łączące rozmiary komórek z rozmiarami ich jąder, z zawartością DNA jądrowego i z innymi cechami komórek i organizmów kręgowców. Zależności te usprawiedliwiają wykorzystywanie pomiarów jednej z porównywanych wielkości do wnioskowania o dwu pozostałych, a także do przypuszczania, że okoliczności sprzyjające w ewolucji zmianom jednej z nich zmieniały harmonijnie wszystkie trzy właściwości. Rozmiary komórek bliskie komórkom kręgowców pierwotnych i pierwotną zawartość jądrowego DNA zachowały ryby spouste, *Latimeria* i niektóre inne ryby pierwotne. U ryb dwudysznych rozmiary komórek powiększyły się ogromnie. Wśród *Teleostei* wiele linii ewolucyjnych charakteryzował proces odwrotny — zmniejszanie rozmiarów komórek i zawartości DNA. Wśród płazów, wzrost rozmiarów komórek, u niektórych form ogromny, charakteryzuje *Urodela*. U gadów, a jeszcze wyraźniej u ptaków, komórki uległy zmniejszeniu. Rozmiary komórek ssaków nie odbiegają, jak się wydaje, znacznie od stanu pierwotnego dla kręgowców. Niewielkie wahania rozmiarów komórek wśród ptaków wróblowatych i stosunkowo jednolita hierarchia wielkości komórek poszczególnych tkanek rozmaitych gotunków wskazują, że dobór naturalny nie toleruje większych odchyień. U ssaków regularności te są znacznie mniej wyraźne, u gromad pozostałych mają, o ile wiadomo, jeszcze mniejsze znaczenie. Dobór naturalny mógł wpływać na obniżenie rozmiarów komórek w ewolucji, jeśli sprzyjał intensywności przemiany materii, szybkości rozwoju zarodkowego i larwalnego, zmniejszaniu rozmiarów ciała i odrzucaniu zbędnej informacji genetycznej. Zwiększanie rozmiarów komórek pod działaniem doboru mogło nastąpić przy preferowaniu większych rozmiarów organizmu, oszczędności materiału budulcowego, wzrostu tolerancji komórek na wahania w składzie środowiska wewnętrznego.

WSTĘP

Wiadomo, że komórki z których są zbudowane organizmy są na ogół niewielkie. Wiadomo też, że istnieją szczególne komórki olbrzymie, jak np. jaja ptaków i ryb spoustych lub (jeśli uwzględnić długość ich wypustek) niektóre neurony. Pomimo znajomości wielu faktów brak jednak ciągle dostatecznie przekonujących hipotez, porządkujących nagromadzoną wiedzę.

Rozmiary komórek były przedmiotem licznych badań w końcu dziewiętnastego i na początku bieżącego stulecia. Wyniki ówczesne zestawiają dwie publikacje: Levi (1925) i Teissier (1939). Praca Teissiera zawiera prawie wyłącznie tablice cyfrowe, Levi zaś w swym obszernym opracowaniu stara się o odnalezienie ogólnych reguł i o wyjaśnienie dostrzeżonych faktów. Upływ czasu spowodował, że rozumowania Leviego budzą dziś u czytelnika rozmaite zastrzeżenia. Levi, podobnie do wielu sobie współczesnych biologów, usiłował sformułować prawa obowiązujące powszechnie, tak jak powszechnie obowiązuje prawo ciężenia, lub prawo stałości masy w reakcjach chemicznych. Cytuje on na przykład obserwacje jednego autora, który stwierdził, że z małych jaj pewnego gatunku żaby rozwijają się zarodki zbudowane z mniejszych komórek od komórek zarodków tego samego gatunku, powstałych z jaj większych i uważa te spostrzeżenia za sprzeczne z wynikami innego badacza, który pisze, że niektóre gatunki ślimaków morskich z rodzaju *Crepidula* mają komórki podobnej wielkości, pomimo tego że jaja tych gatunków różnią się bardzo rozmiarami. W tym samym ustępie pracy, Levi przytacza dane Driescha, który dostrzegł, że z jednego z dwu izolowanych blastomerów jeżowca powstaje larwa zbudowana z komórek o wymiarach normalnych, lecz o połowę mniej licznych.

Biolog współczesny nie oczekuje, aby takie same mechanizmy regulacyjne działały w rozwoju zarodkowym i w ewolucji rozmaitych gatunków, nie dziwi się też, że w budowie kręgowców, ślimaków i szkarłupni istnieją daleko idące rozbieżności. Obecnie staramy się najpierw o zebranie informacji dotyczących organizmów pokrewnych, aby tworzyć uogólnienia wstępne, które być może uda się później szerzej sformułować.

Wykorzystanie danych odnoszących się do rozmiarów komórek rozproszonych w ogromnej literaturze cytologicznej jest bardzo utrudnione, a często uniemożliwione z powodu ich niejednorodności. Wiadomo, że rozmiary i proporcje komórek zmieniają się pod wpływem wielu czynników: wieku zwierzęcia, stanu odżywienia, momentu w cyklu aktywności komórki, czasami płci, itd. Sposób dokonywania pomiarów wpływa bardzo na uzyskiwane wyniki. Aby formułować uogólnienia należy więc dysponować danymi, które uzyskano posługując się jednolitą metodą, na organizmach znajdujących się w tym samym okresie cyklu życiowego, podobnie odżywionych itd. Informacji tego typu jest jednak w literaturze niewiele. Ogromna większość autorów ograniczała się do jednego narządu, zwykle u pojedynczego gatunku. Nieraz brak wiadomości o rozmiarach zwierząt, o ich stanie fizjologicznym itp. Wskutek tego orientacja w nagromadzonym materiale jest trudna. Muszę się więc zastrzec, że być może nie uwzględniłem prac, które na to zasługiwały.

Po drugiej wojnie światowej rozmiarom komórek poświęcano niewiele uwagi. Nawrót zainteresowań nastąpił dopiero w ostatnim okresie. Wynika on z dwu przyczyn. Zrozumienie funkcji DNA w przekazywaniu informacji genetycznej zwróciło uwagę na ogromne różnice zawartości tej substancji w komórkach rozmaitych zwierząt. Pojawiły się teorie kojarzące obfitość DNA w genotypie ze stanowiskiem ewolucyjnym taksonu (np. [78, 31, 67, 68]). Zawartość DNA w komórce stoi zaś w ścisłym związku z jej rozmiarami [40]. Z drugiej strony notujemy rozwój stereometrii, której metody pozwalają na precyzyjne określanie morfologicznych stosunków ilościowych w komórkach i tkankach, także na poziomie ultrastruktury. Istnieje potrzeba interpretowania zdobytych na tej drodze obserwacji. Autor niniejszego artykułu wypowiadał się na ten temat parę razy [88–90]. Sądzi on, że nagromadzenie nowych faktów usprawiedliwia kolejną próbę zreferowania poglądów na rozmiary komórek kręgowców.

ZRÓŻNICOWANIE ROZMIARÓW KOMÓREK W ORGANIZMIE KRĘGOWCA

Jak już wspomniano, największą masę mają pośród komórek kręgowców na pewno jaja niektórych ptaków; do ich rozmiarów zbliżają się także jaja niektórych płaszczyk; można przypuszczać, że podobne rozmiary miały też jaja wielkich wymarłych gadów. Jaja, to jednak komórki szczególne. Jedną z definicji gamet jest brak pełnienia przez nie funkcji w tkankach. Dlatego wyciąganie wniosków dotyczących komórek wchodzących w skład organizmów wielokomórkowych, na podstawie rozmiarów i proporcji jaj jest trudne, jeśli nie niemożliwe.

Bardzo wielkie rozmiary mają też niektóre włókna mięśniowe. Długość ich może przekraczać 100 mm, szerokości są mniejsze, ale nieraz też pokaźne. Interpretacja rozmiarów włókien mięśniowych również nie jest łatwa. Istnieje ogromna różnorodność rozmiarów, związana z odmiennością struktury wewnętrznej i właściwości funkcjonalnych. Tak np. u *Rana esculenta* niektóre włókna mają poniżej 9 μm średnicy [65], podczas gdy w mięśniach nóg tylnych średni rozmiar średnicy sięga 121 μm [21]. Ponadto ilościowe dane dotyczące struktury komórek mięśniowych są jeszcze bardzo skąpe [46, 47]. Włókna mięśniowe są wielojądrowe, pokrywająca je błona wnika głęboko do wnętrza tkanek tworząc tzw. system T. Stąd proporcje włókien mięśniowych mogą bardzo odbiegać od proporcji komórek innych tkanek.

W wielu narządach komórki mają kształty bardzo nieregularne, co utrudnia ich mierzenie. Stąd pochodzi np. brak danych dotyczących komórek wielu tkanek łącznych. Najwięcej zebranych informacji dotyczy rozmiarów krwinek, komórek gruczołowych i neuronów, jednak z wy-

jątkiem erytrocytów, większość danych ogranicza się do tkanek ssaków.

Według tablic Teissiera (1939) największe komórki w ciele ssaka, to niektóre neurony. Wśród neuronów znajdują się też komórki bardzo małe, być może najmniejsze. Bardzo małe są również erytrocyty. Porównanie krwinek czerwonych z innymi komórkami nie jest jednak łatwe, gdyż większość autorów podaje tylko dwa wymiary tych komórek, a rachunki obliczone na podstawie hematokrytu mają tak odmiennie pochodzenie, że zestawianie ich z inaczej uzyskanymi pomiarami komórek może budzić wątpliwości.

CZY WZGLĘDNA WIELKOŚĆ KOMÓREK RÓŻNYCH TKANEK JEST IDENTYCZNA U RÓŻNYCH KRĘGOWCÓW

Na pytanie to odpowiedź musi być negatywna. Hierarchia wielkości komórek różnych tkanek jest odmienna nie tylko gdy się porównuje gatunki należące do rozmaitych gromad, ale nawet w obrębie jednej gromady, np. wśród ssaków. Od ssaków rozpoczniemy rozpatrywanie zagadnienia, gdyż najwięcej informacji zebrano w obrębie tej gromady.

Według danych zawartych w pracach Leviego (1925) i Teissiera (1939), które podają w większości tylko pomiary powierzchni przekrojów komórek i jąder komórkowych, nie można wskazać ssaków, mających komórki wszystkich narządów jednolicie duże lub jednolicie małe. Nie dostrzega się też zależności między rozmiarami komórek i rozmiarami ciała, z wyjątkiem neuronów, gdzie niekiedy ta zależność jest dostrzegalna. Neurony są wyraźnie większe u wielkich ssaków, choć także i tutaj natrafiamy na odstępstwa od regularności. Na przykład komórki piramidowe kory mózgowej kota są większe od odpowiadających im komórek bydła domowego, zaś te same komórki *Balaenoptera* są mniejsze niż u człowieka.

Jeśli pominąć neurony, komórki lisa są na ogół małe, natomiast komórki świnki morskiej są duże, lecz regularności tego typu są ograniczone. Weźmy pod uwagę np. wielkość komórek kilku tkanek ssaka owadożernego *Suncus etruscus*, najmniejszego z żyjących ssaków, którego ciężar wynosi 1,5 do 2 g. U zwierzęcia tego powierzchnia przekrojów komórek kształtuje się następująco: nabłonek języka — $95 \mu\text{m}^2$ (podczas gdy u lisa ta sama wielkość wynosi $36,5 \mu\text{m}^2$, u myszy domowej $69 \mu\text{m}^2$, u krowy $88,4 \mu\text{m}^2$), komórki surowicze ślinianek — $91,76 \mu\text{m}^2$ (natomiast u lisa $74,29 \mu\text{m}^2$, u *Sorex* $80 \mu\text{m}^2$, u krowy $118,4 \mu\text{m}^2$), hepatocyty — $331,0 \mu\text{m}^2$ (natomiast u ryjówki $147,4 \mu\text{m}^2$). Komórki kanalika prostego nerki *S. etruscus* są jednak najmniejsze, ich powierzchnia przekroju wynosi $66,7 \mu\text{m}^2$, nieco większe są też te komórki u kota — $78,8 \mu\text{m}^2$, największe zaś spośród zbadanych występują u królika — $151,2 \mu\text{m}^2$.

Popatrzmy z kolei na rozmiary komórek ssaka średniej wielkości,

jakim jest kot domowy. U tego zwierzęcia rozmiary średnie mają komórki nabłonka języka, komórki śluzowe gruczołów ślinowych, komórki tarczycy. Natomiast poniżej średniej są rozmiary komórek nabłonka tchawicy, dwunastnicy i kanalików nerki. Wreszcie u tego gatunku komórki surowicze gruczołów ślinowych, komórki Purkiniego w mózdzku, komórki piramidowe kory mózgowej i komórki warstwy pasmowatej nadnerczy — są największe spośród odpowiednich komórek ssaków. W tablicach, z których zaczerpnięto przytoczone dane brak jednak porównań między gatunkami bliskimi sobie. Byłoby rzeczą interesującą dowiedzieć się np. jak wyglądają komórki kilku gatunków kotów, różniących się wielkością lub rozmiary komórek różnych antylop o odmiennych rozmiarach i rozmaitym trybie życia. Być może wystąpiłyby wówczas korelacje, których nie można dostrzec porównując komórki ssaków daleko z sobą spokrewnionych. Stwierdzano niejednokrotnie, że rasy zwierząt hodowlanych, różniąc się rozmiarami ciała, mają odpowiednio różne rozmiary komórek [11, 37, 38]. Z drugiej strony nie brak przykładów na różnice w rozmiarach ciała osobników wynikające z odmiennych liczebności komórek [79, 51] lub też zarówno z liczebności, jak i z rozmiarów komórek [61].

Z informacji zawartych w tablicach Teissiera (1939) wynika, że komórki ssaków mają rozmiary na ogół wzajemnie do siebie zbliżone. Tablice te zawierają wprawdzie, jak już wspomniano, pomiary powierzchni przekrojów komórek, wobec czego wnioskowanie o objętości komórek może zawierać błędy, jednak stwierdza się, że stosunki objętości małych i dużych komórek ssaków mieszczą się na ogół w granicach 1 : 2, rzadko osiągają 1 : 4. Wyjątkiem są w tym względzie neurony, gdzie stosunek wielkości komórek gatunku małego i dużego osiąga 11 : 1 (*Bos taurus* i *Suncus etruscus*).

Zupełnie odmiennie przedstawiają się stosunki wielkościowe komórek ptasich. Kaufman [43, 44] stwierdziła, że różnice w rozmiarach ciała gołębia i kury są proporcjonalne do różnic w rozmiarach komórek tych zwierząt. Dąbrowski [23] przekonał się, że u ptaków krukowatych rozmiary erytrocytów są skorelowane z wielkością ciała. Potwierdził to także Nitecki [62, 63] zbadawszy rozmiary komórek sześciu narządów u sześciu gatunków ptaków wróblowatych, różniących się wielkością, mianowicie u mysikrólika, rudzika, drozda śpiewaka, kawki, gawrona i wrony siwej. U tych ptaków we wszystkich badanych tkankach komórki gatunków większych były większe niż komórki gatunków mniejszych. Różnice w rozmiarach komórek nie wystarczają jednak do przyjęcia, że liczba komórek u gatunków różniących się wielkością jest podobna. Przeciwnie, wynika z nich, że gatunki duże są zbudowane z większej liczby komórek.

Rozmiary komórek poszczególnych tkanek można ustawić pod względem wielkości w sposób prawie identyczny u badanych ptaków. U wszystkich gatunków największe są komórki wątroby, a najmniejsze komórki tarczycy. Mniejsze od komórek wątroby są komórki nabłonka dwunastnicy, później następują komórki kanalików proksymalnych nerki, wreszcie komórki chrząstki i komórki warstwy twórczej naskórka. Rozmiary tych dwu ostatnich kategorii komórek są zbliżone. U gawrona, rudzika i mysikrólika komórki naskórka są nieco większe od chondrocytów. Zapewne jeszcze mniejsze od wymienionych komórek są krwinki. Nitecki nie podaje jednak ich objętości, a więc dokonanie dokładnego porównania nie jest możliwe.

Największe rozrzuty w wielkości komórek, szczególnie jeśli chodzi o rozmiary komórek wątroby dostrzegł Nitecki u dużych ptaków krukowatych, najmniejsze zaś u maleńkiego mysikrólika. Różnice w komórkach wątroby i dwunastnicy są mniejsze w obrębie tej samej rodziny, niż u ptaków należących do odmiennych rodzin (*Corvidae*, *Turdidae*, *Regulidae*). Komórki okazów starych są większe od komórek ptaków dorosłych, lecz jeszcze młodych.

Autor nie zdołał zebrać prawie żadnych danych dotyczących gadów. W pracy Szarskiego i Czopkowej [94] podane są wymiary erytrocytów ośmiu gatunków żółwi. Pomimo tego, że zwierzęta różnią się bardzo rozmiarami, powierzchnie ich erytrocytów na rozmazach są bardzo zbliżone. Najmniejsze komórki ma *Chrysemys picta* ($206,3 \mu\text{m}^2$). Największe *Chelydra serpentina* ($282,5 \mu\text{m}^2$). Ten ostatni gatunek jest największy, jednak gatunki małe, jak *Clemmys guttata* i *Sternotherus odoratus* mają krwinki średniej wielkości (oba $228,7 \mu\text{m}^2$).

Istnieją dane pozwalające na porównanie rozmiarów komórek wątroby [93], komórek kanalików proksymalnych nerki (Siankowa, nie publikowane) i erytrocytów [94] niektórych gatunków płazów. Wynika z nich, że wszystkie trzy rodzaje komórek są większe u płazów ogoniastych, a mniejsze u płazów bezogonowych. W obrębie rzędów poszczególne gatunki różnią się uszeregowaniem komórek według rozmiarów, chociaż erytrocyty są nieodmiennie najmniejszymi komórkami. Komórki wątroby są większe od komórek nerki u *Rhyacotriton olympicus*, *Batrachoseps attenuatus*. Natomiast komórki nerki są większe od komórek wątroby u *Amphiuma means*, *Siren intermedia*, *Desmognathus quadramaculatus* i *Rana catesbeiana*. Inne są proporcje między komórkami nerki i wątroby, nawet u tych gatunków, u których uszeregowanie jest takie samo. Tak na przykład u *Amphiuma* oba rodzaje komórek mają prawie tę samą objętość ($20\,720 \mu\text{m}^3$ i $18\,155 \mu\text{m}^3$), zaś u *Rana catesbeiana* komórka nerki jest prawie trzy razy większa od hepatocytu ($3200 \mu\text{m}^3$ i $1150 \mu\text{m}^3$).

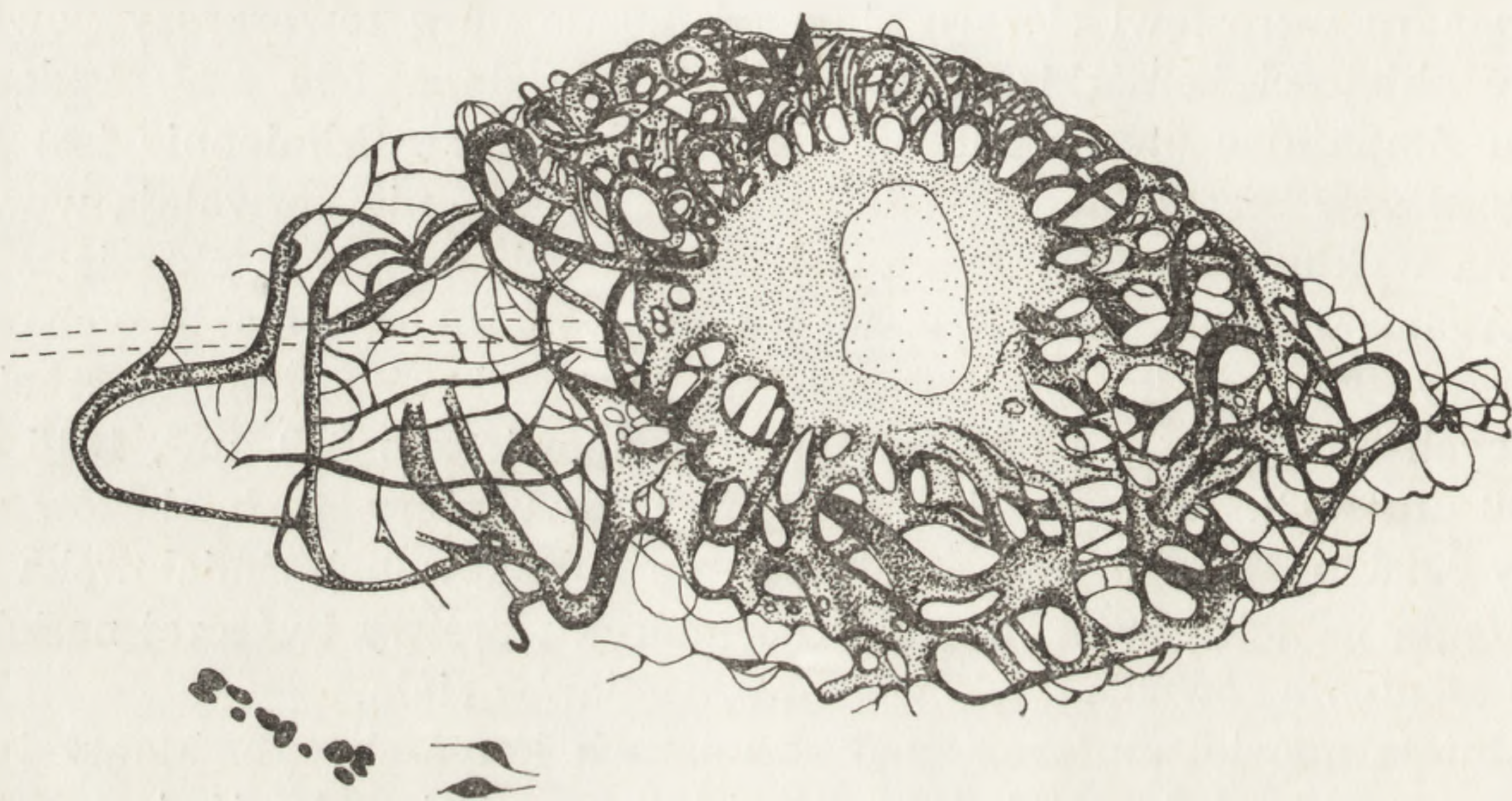
W danych o rozmiarach komórek płazów zwraca uwagę ogromna zmienność indywidualna. Komórki poszczególnych okazów różnią się wyraźnie, tak np. średnie objętości komórek wątroby u dwu osobników *Salamandra salamandra* o ciężarach 28 g i 36 g, wynosiły odpowiednio $6361 \mu\text{m}^3$ i $14\,503 \mu\text{m}^3$. Różnice między erytrocytami nigdy nie są tak duże. Pomiary przeprowadzono na niewielkiej liczbie osobników, jest więc rzeczą bardzo prawdopodobną, że zmierzenie komórek wielu osobników doprowadziłoby do odmiennych średnich.

U niektórych płazów ogoniastych stwierdzono zwiększanie się rozmiarów komórek wątroby w okresie wzrostu ciała. Tak np. u *Salamandra salamandra* wzrostowi ciężaru ciała od 4,5 do 36 g towarzyszy powiększenie objętości komórki od około $3000 \mu\text{m}^3$ do $14\,500 \mu\text{m}^3$. Podobnie jest u *Amphiuma means* i u *Aneides lugubris* [93]. Odmiennie jest jednak u płazów bezogonowych. Nieliczne obserwacje nie pozwalają wprowadzić na wykluczenie pewnego zwiększenia się komórek w okresie wzrostu organizmu, nie dostrzega się jednak wyraźnej korelacji tych dwu procesów. Tak np. komórki wątroby u trzech okazów *Rana catesbeiana* ważących 5,1 g, 273 g i 559 g mierzyły odpowiednio $919 \mu\text{m}^3$, $1315 \mu\text{m}^3$ i $1080 \mu\text{m}^3$ [93]. Rozmiary komórek nerki dwu pierwszych okazów wynosiły $3396 \mu\text{m}^3$ i $3025 \mu\text{m}^3$ (Siankowa, nie publikowane). Śmiałowska [95] dostrzegła jednak wzrost rozmiarów komórek warstwy twórczej naskórka *Rana esculenta* równoległe do wzrostu rozmiarów ciała.

Istnieje niewiele informacji o rozmiarach komórek ryb. Mamy tylko dane o rozmiarach krwinek [105, 74]. Można z nimi zestawić dane o rozmiarach hepatocytów niewielu gatunków. Tak np. rozmiary erytrocytów ryby dwudysznej *Protopterus aethiopicus* wynoszą $23,7 \times 8,4 \mu\text{m}$, zaś objętość hepatocytu u pokrewnego gatunku *P. dolloi* liczy $11,090 \mu\text{m}^3$ [92]. Erytrocyty innej ryby dwudysznej, *Lepidosiren paradoxa* mierzą $21,2 \times 11,1 \mu\text{m}$, zaś hepatocyt ma objętość $28,373 \mu\text{m}^3$ [18]. Można z tego wyciągnąć wniosek, że u ryb dwudysznych zarówno krwinki, jak i komórki wątroby są ogromne oraz że rodzaj mający większe erytrocyty ma także większe hepatocyty. Ten ostatni wniosek nie jest jednak pewny, gdyż wymiary komórek *Protopterus* mierzono u dwu różnych gatunków. Dudek i wsp. [26] porównali rozmiary jąder neuronów sekrecyjnych trzech gatunków ryb z rozmiarami erytrocytów. Praca nie zawiera niestety danych o rozmiarach korpusów neuronów. Przyczyną jest trudność precyzyjnego pomiaru objętości neuronu. Rozmiary jąder są jednak u większości zwierząt dostatecznie skorelowane z rozmiarami komórek, aby móc ocenić istnienie ewentualnych współzależności. Wśród badanych ryb najmniejsze krwinki miała płoć, której jądra neuronów są największe. Największe erytrocyty ma kleń, którego jądra neuronów mają wielkość średnią, wyraźnie mniejszą niż u płoci. Okoń ma największe jądra

neuronów i średnie erytrocyty. Na tym skąpym materiale stwierdzono więc zupełny brak związku między rozmiarami dwu rodzajów komórek ryb.

Levi (1925) opisał ogromne różnice rozmiarów neuronów ryb, harmonizujące z różnicami w ciężarze osobników. Tak na przykład stosunek objętości neuronu *Orthogoriscus mola*, wążącego 80 kg do neuronu małej ryby (ciężar nie podany) *Latrunculus pellucidus* wynosi 100:0,025 (rys. 1). Zbadanie rozmiarów komórek większej liczby tkanek ryb wydaje się bardzo potrzebne.



Rys. 1. U góry ogromny neuron ze zwoju międzykręgowego ryby *Orthogoriscus mola* (ciężar okazu 80 kg), u dołu po lewej homologiczne komórki małych ryb *Latrunculus pellucidus* i *Syngnathus abaster*. Powiększenie 145 razy (wg Leviego, prze-rysowane).

Podsumowując informacje obecne o rozmiarach komórek ryb stwierdzić można, że erytrocyty są zawsze mniejsze od komórek innych tkanek, komórki ryb dwudysznych są zawsze większe od komórek ryb kostnoszkieletowych, nie dostrzeżono jednak regularności w układzie wielkościowym komórek *Teleostei*.

ZWIĄZKI MIĘDZY ROZMIARAMI KOMÓREK I ICH JĄDER

Stosunki objętościowe jądra i cytoplazmy były przedmiotem wielkiej liczby badań. Stosunki te zmieniają się w zależności od czynności komórki, toteż znaczna większość badaczy mierzących jądra komórkowe czyniła to w tym celu, aby uzyskać wiadomości o stanie czynnościowym komórek (patrz np. [72]). Szczególnie często badano rozmiary jąder komórek gruczołowych, aby na podstawie wyników wnioskować o pracy gruczołów.

Zmienność jądra pod wpływem rozmaitych czynników nie wyklucza jednak celowości porównania rozmiarów jąder i stosunku jądra do plazmy w rozmaitych komórkach różnych gatunków, należy tylko postarać się o pobranie materiału ze zwierząt znajdujących się w tych samych warunkach, aby uzyskać dane porównywalne. Już Hertwig [40] stwierdzał, że rozmiary komórek są związane z rozmiarami jąder. Wiele danych zawierają także prace Leviego (1925) i Teissiera (1939). Nie powtarzając i nie dyskutując szerzej zawartych tam liczb można stwierdzić, że stosunek plazmo-jądrowy stosuje się na ogół do prawidłowości zarysowanych najwyraźniej w komórkach ptasich [64].

Porównując mianowicie komórki różnych rozmiarów z rozmaitych tkanek tego samego gatunku, stwierdza się, że im komórki większe, tym bardziej stosunek plazmo-jądrowy jest przesunięty na korzyść cytoplazmy. Tak np. objętość jąder neuronów królika jest proporcjonalna do powierzchni komórek [28]. U ptaków objętość komórki tarczycy gawrona jest 7,5 razy większa od objętości jej jądra, a objętość znacznie większego hepatocytu tego ptaka przewyższa objętość jądra aż 13,2 razy [64]. Wy tłumaczenie tej zależności wydaje się proste. Jeśli bowiem objętość jądra ma związek z rozmiarami genomu, który u kręgowców jest taki sam w rozmaitych tkankach, to rozmiary jąder komórek małych i dużych tego samego organizmu będą się od siebie mniej różnić od rozmiarów komórek, co doprowadzi do stwierdzonej prawidłowości stosunku plazmo-jądrowego.

Jeśli natomiast rozpatruje się stosunek plazmo-jądrowy komórek homologicznych, lecz pochodzących od różnych gatunków, dostrzega się tendencję, by w komórkach większych był on przesunięty na korzyść jądra. Tendencja ta jest dość wyraźna u ptaków [64], zwracał też na nią uwagę Kucias [53, 54], porównując komórki aksolotla, *Xenopus*, myszy, szczura i świnki morskiej. Ten ostatni autor dowodzi, że stosunek plazmo-jądrowy można uznać za miarę średniego metabolizmu komórki. W komórkach o niskim metabolizmie stosunek ten miałby być przesunięty na korzyść jąder.

Wiemy, że metabolizm tkanek gatunków większych jest niższy od metabolizmu tkanek pochodzących z mniejszych gatunków pokrewnych [39, 75]. Wiemy też, że komórki ptaków większych są większe od komórek ptaków mniejszych [62], wynika stąd że przytoczone dane są zgodne z hipotezą Kuciasa. Jednak szersze uogólnianie powyższej prawidłowości nie wydaje się uzasadnione. Tak np. stosunek plazmo-jądrowy hepatocytów ryb dwudysznych wynosi 12,5 do 14,4 [18], zaś ta sama wartość u ptaków waha się od 10,2 do 5,9 [64], nie ulega zaś wątpliwości, że metabolizm tkanek ptaków jest wielokrotnie aktywniejszy od metabolizmu *Dipnoi*. Spotykamy tu znowu podobne fakty, na jakie zwrócono uwa-

gę w rozdziałach poprzednich: porównywanie danych odnoszących się do gatunków blisko spokrewnionych i prowadzących podobny tryb życia pozwala na dostrzeganie pewnych prawidłowości. Branie pod uwagę gatunków bardzo odmiennych nagromadza tyle różnych zmiennych, że wyciąganie wniosków staje się niemożliwe.

Warto jednak podkreślić jedno istotne uogólnienie, mianowicie że stosunek plazmo-jądrowy w komórkach kręgowców waha się w dość wąskich granicach, wynosząc na przykład 5,3 w komórkach warstwy twórczej naskórka u kawki i wrony, natomiast 14,4 w hepatocytach *Protopterus dolloi* [92], a 15,9 w hepatocytach rudzika [64]. Równocześnie można stwierdzić, że rozmiary jąder komórkowych są związane ściśle z zawartością DNA, pomimo tego że oczywiście DNA nie jest jedynym składnikiem jądra komórkowego oraz że zarówno rozmiary jądra, jak i nawet zawartość w nim DNA mogą ulegać dość znacznym wahaniom w zależności od stanu czynnościowego komórki. Sparrow i wsp. [84] uważają, że u wielu roślin związek między ilością jądrowego DNA i rozmiarami jądra jest stały, a u organizmów pozostałych waha się w ciasnych granicach. Kowtunowicz [52] stwierdził korelację rozmiarów jąder z zawartością w nich DNA w rozwoju żaby trawnej. Stąd wynika, że dopuszczalne jest wnioskowanie o zawartości DNA w genomie na podstawie pomiarów rozmiarów komórek, tak na przykład jak to czyni Thomson [96], a także wyciąganie wniosków o rozmiarach genomu na podstawie pomiarów wielkości komórek, jeśli tylko pamięta się, że wnioskowanie to jest obarczone dość znacznym marginesem błędu.

Pomiary objętości jąder komórkowych pozwalają niekiedy na wyróżnienie dość ostro zarysowanych klas wielkości. Od dawna przypuszczano, że niektóre komórki tkanek kręgowców zawierają jądra poliploidalne. Badania zawartości DNA w jądrach potwierdziły to przypuszczenie wielokrotnie (np. [6]). Komórki poliploidalne są u większości gatunków nieliczne, występują w wątrobie, naskórku, u ssaków w łożysku (np. [107, 108]).

ZAWARTOŚĆ DNA W KOMÓRKACH KRĘGOWCÓW

Współczesne zainteresowanie DNA wynikające ze stwierdzenia, że substancja ta jest nosicielem informacji genetycznej, spowodowało wykonanie wielu badań, których celem było określenie zawartości DNA w jądrach komórkowych rozmaitych zwierząt. Literatura na ten temat jest bardzo obszerna, nie można jej tutaj szczegółowo omawiać. Najkompletniejsze, świeże zestawienia zawierają prace: Hinegardner i Rosen [41] — ryby, Rees i Jones [77] m. in. rośliny, Sparrow i wsp. [84], Wallace i Morowitz [104] — drobnoustroje. Liczba przebadanych gatunków

zapewne znacznie przekracza tysiąc. W tabeli 1 zamieszczono więc tylko niektóre bardziej charakterystyczne dane. Przeglądając ją warto pamiętać, że na podstawie zawartych w niej liczb można wyciągnąć dość precyzyjne wnioski o średnich rozmiarach komórek wymienionych w tabeli gatunków.

Tabela 1. Zawartość DNA w jądrach komórkowych kręgowców

Gatunek	Przynależność systematyczna	pg	Uwagi	Źródło
Różne gatunki	<i>Elasmobranchii</i>	3–15		[97]
<i>Latimeria chalumnae</i>	<i>Crossopterygii</i>	13,2		[97]
<i>Lepidosiren</i> sp.	<i>Dipnoi</i>	241,4		[96]
<i>Protopterus</i> sp.	<i>Dipnoi</i>	284,1		„
<i>Neoceratodus</i> sp.	<i>Dipnoi</i>	160,3		„
<i>Polypterus palmas</i>	<i>Brachiopterygii</i>	11,7		[8]
<i>Acipenser sturio</i>	<i>Chondrostei</i>	3,2		[59]
<i>Amia</i> sp.	<i>Holostei</i>	2,3		[67]
<i>Lepisosteus productus</i>	<i>Holostei</i>	2,8		„
Znaczna większość gatunków	<i>Teleostei</i>	ok. 1,—		[41]
<i>Cyprinus carpio</i>	<i>Teleostei</i>	3,4	tetrapl. ?	„
<i>Carassius auratus</i>	<i>Teleostei</i>	4,—	„	„
<i>Oncorhynchus tshawytscha</i>	<i>Teleostei</i>	6,6	polipl. ?	„
Różne gatunki	<i>Gymnophiona</i>	7,4–27,9		[71]
<i>Hynobius</i> sp.	<i>Urodela</i>			
	„ (<i>Hynobiidae</i>)	32,9–40,9		„
Różne gatunki	„ (<i>Ambystomatidae</i>)	43,7–105,—		„
Różne gatunki	„ (<i>Plethodontidae</i>)	20,0–72,—		„
<i>Necturus maculosus</i>	„ (<i>Proteidae</i>)	190,—		„
<i>Proteus anguineus</i>	„ „	73,—		„
<i>Leiopelma archeyi</i>	<i>Anura (Ascaphidae)</i>	12,7		„
<i>Bombina bombina</i>	„ (<i>Discoglossidae</i>)	18,7		„
<i>Pelobates fuscus</i>	„ (<i>Pelobatidae</i>)	8,9		„
<i>Scaphiopus</i> sp.	„ „	1,6–3,8		„
Różne gatunki	„ (<i>Leptodactylidae</i>)	2,6–7,—		„
<i>Ceratophrys dorsata</i>	<i>Anura (Leptodactylidae)</i>	10,9	polipl.	[71]
Różne gatunki	„ (<i>Bufonidae</i>)	5,—15,—		„
Różne gatunki	„ (<i>Ranidae</i>)	7,—15,—		„
Różne gatunki	<i>Testudines</i>	4,9–5,2		[101]
<i>Alligator</i> sp.	<i>Crocodylia</i>	4,98		„
Różne gatunki	<i>Serpentes</i>	2,8–5,—		„
Różne gatunki	<i>Aves</i>	ca. 3,5		[9]
Różne gatunki	<i>Mamalia</i>	ca. 7,—		[4]

Ogromne różnice w zawartości DNA jądrowego kręgowców komentowało kilku autorów. Ohno [67, 68, 69] sądzi, że obfitość DNA pozwala na większą plastyczność ewolucyjną. Jego zdaniem genom zwierząt o znacznej zawartości DNA może zawierać zapisy nieczynne, uruchamiane w ra-

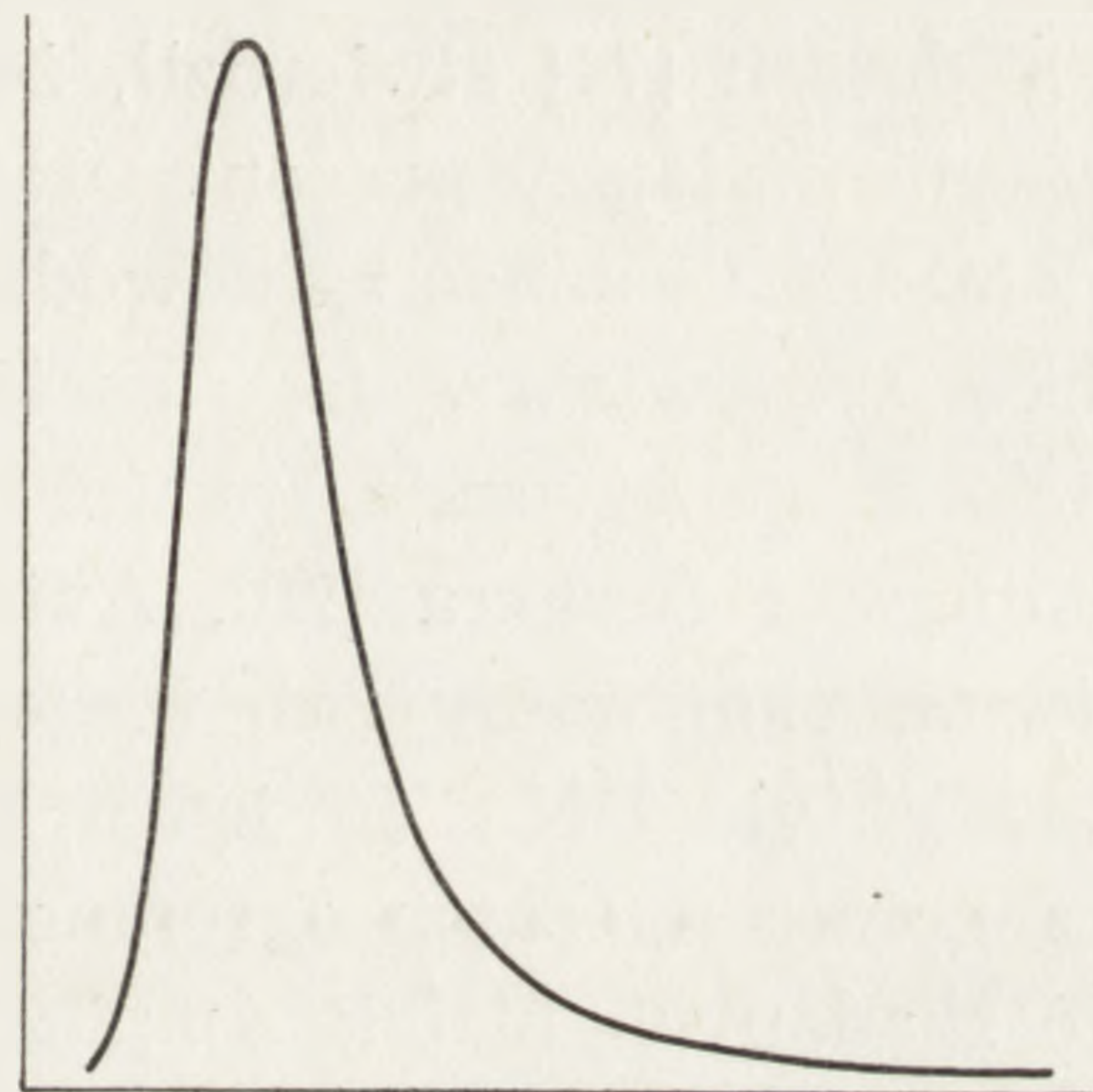
zie potrzeby wynikającej ze zmiany w niszy ekologicznej gatunku. Wąska specjalizacja łączy się zdaniami Ohno z redukcją w ilości DNA. Zbliżone poglądy głoszą również Goin i Goin [31], Kogan [49], a także Hinegardner i Rosen [41]. Natomiast Stebbins [86] stwierdził, że u roślin naczyniowych postęp ewolucyjny wiąże się z redukcją zawartości DNA jądrowego. Podobne wnioski sformułował Bier i Müller [12] na podstawie badań genomu owadów, a także Ebeling i wsp. [27], którzy przekonali się, że u ryb wielkich głębin, a więc żyjących w środowisku zachowawczym, zawartość DNA w jądrach komórkowych wynosi około 270% zawartości stwierdzonej u pokrewnych gatunków zamieszkujących wody płytkie. Na tej podstawie sądzą oni, że zwierzęta, u których pewne odcinki genomu uległy zwielokrotnieniu, mają obniżoną plastyczność ewolucyjną. Natomiast, zdaniem Bachmanna i wsp. [8], ewolucją zawartości DNA w jądrze kierują dwie przeciwstawne tendencje. Wzrost zawartości DNA dostarcza materiału do zwiększenia plastyczności ewolucyjnej, zaś redukcja DNA idzie w parze ze specjalizacją do wąskich nisz ekologicznych. Hipotezy te omówimy w dalszej części artykułu, uwzględniając związek, między zawartością DNA w jądrze i rozmiarami komórki, który mógł odegrać poważną, jeśli nie decydującą rolę w przemianach obu tych cech [88, 90].

ROLA DNA W KOMÓRCIE

Stwierdzenie, że DNA zawiera zapis informacji genetycznej było zasadniczą przesłanką niektórych przytoczonych poglądów. Jednak nie ulega obecnie wątpliwości, że zapis genów strukturalnych i regulujących nie wyczerpuje funkcji DNA jądrowego. Zwracano niejednokrotnie uwagę, że długość łańcucha DNA organizmów wielokomórkowych jest wielokrotnie większa niżby to wynikało z konieczności zapisania budowy rozmaitych rodzajów RNA. King i Jukes [48] sądzą na przykład, że do tego celu wystarczyłoby 0,01 realnej zawartości DNA jądrowego. Zdaniem Ohno [69] najwyżej 10% ludzkiego DNA zawiera informację, reszta zaś to „rozmaite śmiecie” (junk or garbage of various sorts). Trudno uwierzyć w słuszność tego ostatniego twierdzenia. O'Brien [66] wątpi w słuszność poglądów oceniających nisko liczbę genów strukturalnych u zwierząt wielokomórkowych i sądzi, że znacznie więcej DNA niż sądzą King i Jukes oraz Ohno, jest zajęte przez aktywny zapis genetyczny. O'Brien nie przypuszcza, by cały DNA jądra był nośnikiem genów, można jednak spodziewać się, że pozostała część łańcucha musi również pełnić ważną rolę w komórce. Przekonywającego argumentu dostarczają Hinegardner i Rosen [41]. Narysowali oni krzywą obrazującą związek między zawartością DNA jądrowego a liczbą gatunków ryb. Krzywa ta jest bardzo

silnie asymetryczna (rys. 2). U znacznej większości gatunków *Teleostei* zawartość DNA w genomie haploidalnym wynosi około 1pg. Bardzo niewiele gatunków ma poniżej 0,6 pg, u żadnego zawartość nie spada poniżej 0,4 pg. Zdaniem Hinegardnera i Rosena dowodzi to, że 0,5 pg stanowi dolną granicę zawartości DNA w genomie haploidalnym poniżej której zejść nie można.

Rys. 2. Zależność liczby gatunków wśród *Teleostei* (oś pozioma) od ilości DNA w jądrze komórkowym (oś pionowa) (wg Hinegardnera i Rosena [41], przerysowane).



Funkcje DNA jądrowego są rozmaite [15, 14, 87, 29, 22, 50]. Każdy genom Eukariota zawiera odcinki DNA występujące pojedynczo. Odcinki te mieszczą zapis struktury większości białek oraz związane z genami strukturalnymi geny regulacyjne. Wielokrotnie powtarzają się w DNA zapisy struktury rRNA i tRNA, a także histonów — do 1200 razy. Ponadto u wszystkich Eukariota występuje DNA satelitarny, w którym odcinki zawierające tę samą sekwencję nukleotydów powtarzają się z większą częstością, dochodzącą do miliona w jednym genomie. Funkcja powtarzalnego DNA jest niejasna. Wiemy, że występuje on we wszystkich chromosomach, pomiędzy sekwencjami pojedynczymi. Wchodzi w skład centromerów [55]. Zapisuje RNA, który pozostaje w jądrze, nie przedostając się do cytoplazmy [73]. Powtarzalny DNA odgrywa rolę łączników między replikonami, zapewne buduje odcinki łańcucha inicjujące i hamujące transkrypcję [76]. Powtarzalny DNA jest ogromnie różny u poszczególnych gatunków. Nawet w obrębie tego samego rodzaju, blisko spokrewnione gatunki wykazują radykalne różnice w budowie satelitarnego DNA. Tak np. jest on zupełnie swoisty u każdego z siedmiu zbadanych gatunków z rodzaju *Apodemus* [29]. Dowodzi to, że zmiany ewolucyjne struktury powtarzalnego DNA będą niezwykle szybko, większość zmian losowych musi być obojętna dla doboru naturalnego. Zagadką jest

mechanizm zapewniający jednolitość satelitarnego DNA w obrębie genomu, pomimo szybkich zmian ewolucyjnych.

Zdaniem Reesa i Jonesa [77] istnieje ogromne podobieństwo, jeśli nie identyczność między satelitarnym DNA i heterochromatyną. Ten ostatni DNA obejmuje jednak DNA o rozmaitej funkcji. Tak np. dla morfologa typowym przykładem heterochromatyny jest jeden z chromosomów X w komórkach samicy ssaka, zaś DNA zawarty w tym chromosomie zapisuje zarówno geny strukturalne, jak i regulacyjne, obok łańcuchów satelitarnych.

Pedersen [74] stwierdził, że im więcej DNA zawiera jądro komórkowe, tym mniejszy procent DNA zajmują geny kodujące RNA rybosomowe. Można to uznać za dowód, że im większa jest zawartość DNA w komórce, tym większą jego część zajmują odcinki o znaczeniu strukturalnym, a genetycznie puste. Podobnie można interpretować wyniki Comingsa i Bergera [20]. Autorzy ci badali polimorfizm białek u *Amphiuma*, pamiętamy zaś, że jądro komórkowe tego płaza zawiera około 28 razy tyle DNA co jądro komórkowe ssaka. Jest więc dość miejsca w genomie na zapis ogromnej liczby rozmaitych białek. Pomimo tego, pięć zbadanych białek *Amphiuma* nie wykazuje bynajmniej szczególnej zmienności. Natomiast w jądrze *Amphiuma* występuje wyjątkowa obfitość heterochromatyny, co zgadza się z założeniem, że duża część DNA jest genetycznie nieczynna. Ohno [67] pisze, że *Salmonidae*, mające więcej DNA jądrowego od pozostałych ryb, mają równocześnie dwa razy tyle loci genowych, ryby te są przypuszczalnie niedawnymi poliploidami, u których jeszcze nie doszło do unieczynnienia informacji redundantnej.

Podsumowując można naszkicować następujący zarys jądrowego DNA. Część łańcuchów obejmuje geny strukturalne wraz z odcinkami regulującymi syntezę różnych kategorii RNA. Niektóre z tych odcinków nie są zapewne nigdy czynne w życiu osobnika, gdyż zawierają geny, które straciły znaczenie wobec zmian w innych częściach genotypu lub w niszy ekologicznej gatunku. Tak na przykład być może genotyp hipopotama zawiera jeszcze geny odpowiedzialne za wytworzenie futra. Geny takie mogły również zostać już wyeliminowane. Oprócz genów strukturalnych i regulacyjnych, łańcuch DNA zawiera odcinki nie biorące żadnego udziału w produkcji RNA, lecz będące budulcem chromosomów. Flamm [29] sugeruje, że odcinki te grają ważną rolę przy układaniu się w pary chromosomów homologicznych podczas mitozy i mejozy. Jest rzeczą wątpliwą czy odcinki te mogą zmieniać się na DNA genetycznie czynny. Różnice w zawartości jądrowego DNA u różnych kręgowców wynikają przede wszystkim z różnic w ilości DNA nie niosącego zapisu genetycznego.

ZWIĄZKI MIĘDZY ROZMIARAMI KOMÓREK
A INNYMI CECHAMI KOMÓREK I ORGANIZMÓW

Zwracano od dawna uwagę, że rozmiary komórek mogą być związane z poziomem ich metabolizmu. Stosunek powierzchni do masy brył podobnych wyraża wzór

$$s = bV^{0,66},$$

we wzorze tym s oznacza powierzchnię, V objętość, b współczynnik, zależny od kształtu bryły, jego wartość jest najmniejsza dla kuli, dla której wynosi około 4,83. Dzięki zależności wyrażonej wzorem im bryła jest większa tym mniej jednostek powierzchni przypada na jednostkę jej objętości. Jeśli komórki są bryłami podobnymi, zależność ta również ich dotyczy, skoro wymiana materii odbywa się przez powierzchnię komórki rozmiary powierzchni komórek dużych mogą być czynnikiem ograniczającym ich metabolizm.

Za słusnością tego rozumowania przemawia wiele faktów. Na przykład Levi (1925) wielokrotnie zwracał uwagę, że duże neurony nie mają bynajmniej kształtów podobnych do neuronów małych. Ich błona komórkowa jest bogato pofałdowana (rys. 1), co zwiększa bardzo ich powierzchnię. Komplikacje te przypisywał Levi konieczności zwiększenia powierzchni dużych komórek.

Smith [82] stwierdził na siedmiu gatunkach płazów, że im rozmiary krwinek danego gatunku są większe, tym poziom metabolizmu osobnika jest niższy. Vernberg [102, 103] porównał dwa gatunki rodzaju *Plethodon* i przekonał się, że *P. cinereus* ma wyższy poziom glukozy we krwi, jest bardziej aktywny i równocześnie ma mniejsze komórki niż *P. glutinosus*. Srivastava i Griffith [85] przytaczają wyniki prac kilku autorów świadczące, że u ryb małe rozmiary erytrocytów korelują z wysoką ruchliwością. Szarski i Czopek [93] porównali rozmiary komórek płazów z uciążeniem powierzchni oddechowych badanych gatunków, wychodząc z założenia, że długość naczyń oddechowych na jednostkę masy ciała można uznać za wskaźnik metabolizmu. Korelacja tak porównanych parametrów jest niezupełna. Wprawdzie płazy o dużej liczbie naczyń oddechowych na jednostkę masy mają bez wyjątku małe komórki, ale wśród gatunków o małej liczbie naczyń oddechowych są formy zarówno o komórkach bardzo dużych (*Rhyacotriton*, *Amphiuma*) i o komórkach o rozmiarach poniżej średniej wartości (*Siren*). Zwrócono już uwagę, że dane Niteckiego można uznać za przykłady korelacji rozmiarów komórek z metabolizmem. Autor ten stwierdza bowiem występowanie najmniejszych komórek u najmniejszych gatunków, które zapewne mają najwyższy poziom metabolizmu [39]. Ponadto dysponujemy bezpośrednimi po-

miarami metabolizmu zebranych przez Goniakowską [34–36] oraz przez Monnickendam i Balls [59a]. Goniakowska mierzyła metabolizm erytrocytów sześciu gatunków płazów, których komórki różnią się wielkością i przekonała się, że zużycie tlenu przez jednostkę objętości erythrocytu jest tym większe im erythrocyt jest mniejszy. Krwinki *Hyla arborea*, najmniejsze z badanych, o objętości $1235 \mu\text{m}^3$ zużywają w temp. 20°C od $4,75$ do $10,2 \times 10^{-9} \mu\text{l O}_2$ na godzinę i μm^3 erythrocytu, zależnie od płci i pory roku. Natomiast zużycie tlenu przez erythrocyty największe liczące $3604 \mu\text{m}^3$ z *Salamandra salamandra* wyrażone w tych samych jednostkach wynosi od $0,74$ do $1,04$, a więc około dziesięć razy mniej. Goniakowska-Witalińska uczyniła przy tym jedno niespodziewane spostrzeżenie. Stwierdziła mianowicie, że stosunek powierzchni do objętości erythrocytów wszystkich badanych płazów jest prawie taki sam, wynosząc od $1,60$ u *H. arborea*, do $1,64$ u *S. salamandra* i $1,68$ u *Triturus alpestris*. Dzieje się tak dlatego, że im dłuższe są dwie osie wyznaczające owal erythrocytu, tym krótsza jest trzecia oś, określająca wysokość krwinki. Ogromne krwinki salamandry są równocześnie najbardziej spłaszczone. Wobec tego nie można twierdzić, że ograniczenie przemiany materii wielkich erythrocytów płazów jest bezpośrednią konsekwencją niekorzystnego stosunku powierzchni do objętości. Cytowana autorka wysuwa następujące przypuszczenie. Rozmiary erythrocytów są związane z rozmiarami pozostałych komórek ciała. Te zaś zachowują kształt podobny niezależnie od rozmiarów (np. komórki wątroby [93]). Wobec tego stosunek powierzchni do objętości ogranicza metabolizm większości komórek, a więc także całego organizmu. Intensywność przemiany materii wszystkich komórek organizmu jest sterowana centralnie przez te same czynniki. Podlega jej także przemiana materii erythrocytów, jest więc niska u organizmów zbudowanych z dużych komórek.

Szybkość oddychania erythrocytów jest według Goniakowskiej-Witalińskiej ściśle skorelowana z liczbą mitochondriów w krwince. Na przekroju krwinki *H. arborea* znajdowała ona od $6,00$ do $8,00$ mitochondriów, zależnie od płci i pory roku, zaś w krwince *Triturus alpestris* od $1,92$ do $5,30$ mitochondriów.

Równocześnie z Goniakowską-Witalińską, podobne wyniki uzyskali Monnickendam i Balls [59a], którzy badali metabolizm komórek w hodowli pięciu gatunków płazów. Autorzy ci ograniczyli się do zmierzenia średnic erythrocytów badanych gatunków, milcząco zakładając, że rozmiary erythrocytów są ściśle skorelowane z rozmiarami tkanek pozostałych. Wyniki ich badań dowodzą, że komórki największe pochodzące z *Amphiuma means* oddychają najwolniej, zaś najmniejsze z badanych komórek, z *Xenopus laevis* oddychają najszybciej — około 3–10 razy szybciej, zależnie od rodzaju tkanki. Komórki trzech pozostałych gatun-

ków, mające rozmiary pośrednie oddychają też z pośrednią intensywnością. Hierarchia rozmiarów erytrocytów niezupełnie jednak zgadza się z hierarchią metabolizmu. *Ambystoma* ma nieco większe krwinki od krwinek *Diemyctylus* i *Triturus*, jednak jej tkanki mają wyższy metabolizm od tkanek tych dwu rodzajów.

Wobec istnienia korelacji między intensywnością metabolizmu i nagromadzeniem mitochondriów w komórce, wydaje się rzeczą interesującą porównanie liczby mitochondriów z rozmiarami zawierających je komórek. Niektóre fakty są znane od dawna, przyjmuje się np. powszechnie podział włókien fazowych mięśni prążkowanych kręgowców na grube, pośrednie i cienkie, o odmiennych właściwościach fizjologicznych. Włókna grube zawierają najmniej mitochondriów, włókna cienkie najwięcej. Godula [30] porównał liczbę mitochondriów w komórkach wątroby aksolotla i *Xenopus laevis*. Okazało się, że średnia liczba mitochondriów w hepatocycie aksolotla wynosi 743, zaś w hepatocycie *Xenopus* 217. Komórki aksolotla są znacznie większe, przeliczenie liczby mitochondriów na $1 \mu\text{m}^3$ cytoplazmy daje wynik prawie identyczny w obu gatunkach. Godula zwraca uwagę, że mitochondria *Xenopus* zawierają znacznie więcej grzebieni niż mitochondria aksolotla. Za miarę metabolizmu należałoby więc uznać raczej nie liczbę mitochondriów, lecz powierzchnię ich grzebieni. Niestety nie mamy takich danych.

Godula obliczył natomiast powierzchnię siateczki śródplazmatycznej szorstkiej w badanych komórkach, stwierdzając, że w dużych komórkach aksolotla na $1 \mu\text{m}^2$ cytoplazmy przypada $0,2 \mu\text{m}^2$ siateczki, zaś w mniejszych komórkach *Xenopus* na tę samą objętość cytoplazmy przypada $0,7 \mu\text{m}^3$ siateczki. Wyniki te świadczą, że w małych komórkach *Xenopus*, synteza białek biegnie trzy razy intensywniej niż w dużych komórkach aksolotla.

Edström i Pigoń [28] stwierdzili odnośnie do komórek różnej wielkości, a należących do tego samego organizmu, że zawartość RNA w bardzo różnej wielkości neuronach ($25\,000 \mu\text{m}^3$ – $5\,000\,000 \mu\text{m}^3$) jest wprost proporcjonalna do powierzchni komórki, co oznacza, że w neuronach większych jednostka cytoplazmy zawiera mniej RNA. Wyniki Goduli są więc podobne. Według Kilarzkiego [47] w mięśniach ocznych linia objętość siateczki cytoplazmatycznej jest około dwa razy większa we włóknach grubych, niż we włóknach cienkich. Oznacza to, że odległość między siateczką, a włókienkami jest znacznie mniejsza we włóknach grubych. Włókna grube kurczą się szybciej, ponieważ zaś siateczka śródplazmatyczna stanowi rezerwuar jonu wapniowego, współdziałającego w skurczu, dane te są zgodne z oczekiwaniem.

Goniakowska-Witalińska [35, 36] przekonała się, że liczba mikrotubul jest skorelowana z rozmiarami krwinek, dochodząc do 200 w wielkich

erytrocytach salamandry. Obserwacja ta zgadza się z założeniem, że funkcją mikrotubul jest między innymi wzmacnianie struktury komórki.

Badacze radzieccy w szeregu prac dowiedli [24], że szybkość podziałów komórek u zarodka ryb i płazów w okresie bruzdkowania jest odwrotnie proporcjonalna do zawartości DNA jąder komórkowych. Zależność ta nie występuje w rozwoju ptaków i ssaków. Do podobnych wniosków doszli Goin i wsp. [32] porównując szybkość rozwoju płazów z ilością DNA w jądrach komórkowych. Trudność polegała w tym przypadku na znalezieniu wskaźnika szybkości rozwoju. Autorzy oparli się na długości trwania stadium larwy. Czas ten wynosi 14 dni u *Scaphiopus holbrooki*, który zawiera tylko 4,5 jednostek umownych DNA w jądrze, zaś u *Rana catesbeiana*, u której jądro zawiera 26,0 jednostek, stadium larwy trwa około roku. Jednak nie u wszystkich badanych gatunków można dostrzec tę regularność. Tropikalny gatunek *Pseudis paradoxa* zawiera 4,95 pg DNA w jądrach komórkowych, zaś jego kijanki osiągają rekordowe rozmiary, a więc ich rozwój larwalny musi być dość długi. Dokładnymi danymi niestety nie dysponujemy. Goin i wsp. [32] piszą, że kijanka *P. paradoxa* żyje w wysychających zbiornikach, jej wzrost musi więc być szybki, co zgadzałoby się z niską zawartością DNA w jądrze.

Długość trwania interfazy wykazuje bardzo wyraźną korelację z obfitością DNA w komórkach roślinnych [100]. Stebbins [86] wskazał na odwrotną zależność między szybkością rozwoju i ilością DNA w jądrach komórkowych roślin. Goin i wsp. [32], łącząc spostrzeżenia, dochodzą do wniosku, że szybkość podwajania się DNA w interfazie jest u rozmaitych organizmów podobna w jednakowej temperaturze, a więc zwiększanie zawartości DNA w jądrze przedłuża okres S interfazy.

Autor niniejszego artykułu przypuszczał już wcześniej [88, 89] że duże komórki łatwiej znoszą wahania w składzie płynów ustrojowych. Wobec mniejszej powierzchni w stosunku do objętości zużywają mniej energii na utrzymanie wewnętrznej homeostazy. Próbę sprawdzenia tej hipotezy podjęła Goniakowska-Witalińska [34, 35], podając erytrocyty płazów działaniu roztworów NaCl o różnym stężeniu. Wyniki były niespodziewane. U pięciu gatunków stwierdzono, że im mniejsza jest krwinka, tym jest odporniejsza na roztwór hipotoniczny, jednak wielkie krwinki salamandry są równie odporne co krwinki najmniejsze, *Hyla arborea*.

Gdyby pominąć wyniki uzyskane na krwinkach salamandry — zakładając, że gatunek ten ma jakieś szczególne adaptacje — obserwacje Goniakowskiej-Witalińskiej można by tłumaczyć uwzględniając inne spostrzeżenie tej autorki [36]. Dowiodła ona, że dodatek glukozy do płynu eksperymentalnego równocześnie wzmacnia i odporność krwinek na hipotonię i ich metabolizm. Wiemy, że małe krwinki mają wyższą przemianę

materii, stąd wniosek, że odporność krwinek jest związana z poziomem ich metabolizmu wydaje się słuszny. Obserwacje Goniakowskiej-Witalińskiej można też wykorzystać do interpretacji spostrzeżeń Srivastavy i Griffitha [85]. Badacze ci stwierdzili, że słodkowodne gatunki ryb z rodzaju *Fundulus* mają większe krwinki od krwinek gatunków słonawowodnych tego samego rodzaju. Sądzą oni, że wynika to z gorszych warunków tlenowych jakie panują w słonawowodnych środowiskach. Można jednak także przypuszczać, że krwinki gatunków słonawowodnych muszą znosić większe wahania stężenia osmotycznego osocza, co wymaga wzrostu odporności błony, ta zaś powiększa się przy intensywnym metabolizmie do jakiego są zdolne małe komórki.

Można by sądzić, że obfitość DNA w komórce może stanowić zabezpieczenie przed pomyłkami replikacji. Wielokrotne powtórzenie informacji genetycznej mogło by umożliwić produkcję niezbędnego białka, nawet po zniekształceniu niektórych kopii [89]. Wbrew tym przypuszczeniom liczne badania dowiodły, że wrażliwość na promieniowanie gatunków należących do pokrewnych jednostek systematycznych jest wprost proporcjonalna do zawartości DNA w jądrze (np. [98, 83, 1]) zarówno wśród roślin, jak i wśród zwierząt.

Fakt ten przemawia za słusznością następującego rozumowania. Uszkodzenie genotypu przez promieniowanie jest tym prawdopodobniejsze, im łatwiej jest trafić w jądro DNA, to zaś zależy od jego ilości. Cały DNA jądrowy pełni jakieś funkcje, naruszenie jakiegokolwiek fragmentu powoduje uszkodzenie komórki. Zdolność komórki do zastępowania naruszonego odcinka DNA przez inną kopię jest albo niewielka, bądź nie istnieje.

WNIOSKI

REGUŁY ROZUMOWANIA

Zwrócono uwagę na wstępie na przyczyny trudności, na jakie natrafiali niektórzy starsi autorzy zajmujący się rozmiarami i proporcjami komórek. Badacze ci nie uwzględniali różnicy między prawami fizyki i chemii a regułami biologicznymi. Prawa fizyczne i chemiczne porównują wielkości, między którymi istnieją bezpośrednie zależności. Istnieje na przykład bezpośredni związek między ciśnieniem gazu i temperaturą, między masą ciała a siłą potrzebną do nadania przyspieszenia, itd. Większość reguł biologicznych opisuje zaś zależności między wielkościami powiązаныmi jedynie za pośrednictwem doboru naturalnego. Tak na przykład większe i cięższe gatunki ssaków mają grubsze kości kończyn. Związek między budową kończyny i ciężarem zwierzęcia nie jest by-

najmniej bezpośredni, lecz wynika z przeciwnego działania dwu okoliczności: kończyna zbyt masywna utrudnia szybkość biegu, kończyna zbyt wysmukła jest narażona na uszkodzenie. Wymienionej prawidłowości nie będzie więc można dostrzec porównując ssaki wodne z lądowymi czy z nietoperzami. Nawet rozmaite gatunki ssaków lądowych, żyjąc w rozmaitych środowiskach — w zaroślach, na stepie, na mokradłach, mogą się spotykać z bardzo odmiennymi warunkami. Dobór naturalny może więc preferować różne proporcje nawet wśród rozmaitych populacji tego samego gatunku, jeśli żyją one w odmiennych środowiskach.

Gdyby ktoś nawet stwierdził, porównując dwa gatunki ssaków odmiennej wielkości, że w badanym przypadku gatunek większy ma kości smuklejsze od gatunku mniejszego, nie powinien stąd wyciągać wniosku, że ciężar ciała nie ma wpływu na budowę kończyny ssaka. Wpływ ten na pewno istnieje, lecz proporcje budowy kończyn podlegają nie tylko tej jednej zależności, gdyż są pod równoczesnym wpływem wielu innych czynników.

Podobnie reguła Bergmanna stwierdza, że wśród kręgowców stałocieplnych mniejsze formy występują bliżej równika, a większe bliżej biegunów. Wynika to z trudności zachowania stałej temperatury ciała w klimacie chłodnym przez zwierzęta drobne. Reguła Bergmanna podkreśla ważny fakt i nie można jej obalić stwierdzeniem, że mysikrólik jest mniejszy od afrykańskiego strusia. Wszystkie fakty biologiczne są zależne od ogromnej ilości rozmaitych czynników. Rozmiary ciała gatunku mogą być np. zależne od rozmiarów innych zwierząt konkurujących o podobną niszę ekologiczną, od sposobów polowania obecnych w danym środowisku drapieżników, od sposobu zdobywania pożywienia (np. żyrafa), od temperatury i wilgotności środowiska, itd. Stąd nie można się spodziewać, by można było dostrzec regularność wiążącą w każdym przypadku rozmiary ciała z którymkolwiek z czynników, co jednak bynajmniej nie oznacza, że nie ma on wpływu na rozmiary ciała gatunku.

DOSTRZEŻONE REGULARNOŚCI

Opierając się na streszczonych faktach możemy formułować następujące wnioski:

U gatunków zbudowanych z dużych komórek jądra komórkowe są bardzo duże. Stosunek plazmo-jądrowy jest przesunięty wyraźnie na korzyść jądra. Być może słuszne jest przypuszczenie Kuciasa [54], że grubość warstwy cytoplazmy, otaczającej jądro nie może być zbyt duża, gdyż powierzchnia osłonki jądrowej nie może się zbyt oddalić od błony komórkowej, bez upośledzenia funkcji jądra. Zwykle duże jądra zawierają wiele DNA.

Jeśli porównać stosunek plazmo-jądrowy komórek rozmaitych tkanek tego samego gatunku, stwierdza się, że w komórkach dużych stosunek jest przesunięty na korzyść plazmy. Wynika to z faktu, że zawartość podstawowego składnika jądra — DNA, jest we wszystkich komórkach diploidalnych danego gatunku jednakowa, możliwe jest więc tylko niewielkie powiększenie jądra w komórkach dużych.

Najkrótszy czas trwania interfazy jest wprost proporcjonalny do rozmiarów komórek i zawartości DNA. Zależność ta jest być może bezpośrednia, wynikając z małych wahań szybkości, z jaką następuje replikowanie łańcucha DNA. Również bezpośredni związek zachodzi między rozmiarami komórki i wrażliwością jej aparatu genetycznego na uszkodzenia promieniowaniem. Prawdopodobieństwo trafienia wzrasta bowiem proporcjonalnie do rozmiarów celu.

Komórki duże mają niski metabolizm. Stąd wzrostowi metabolizmu w filogenezie towarzyszy zmniejszenie rozmiarów komórek. Jednak istnieją komórki małe, o metabolizmie przypuszczalnie niskim (*Siren*, *Rana catesbeiana*, duże gatunki żółwi). Można przypuszczać, że w tych przypadkach obniżenie metabolizmu będące skutkiem powiększenia rozmiarów ciała jest zjawiskiem wtórnym, zaś przodkowie tych zwierząt mieli mniejsze rozmiary i wyższą przemianę materii.

Duże komórki zawierają w jednostce objętości mniej mitochondriów niż komórki małe lub też ich mitochondria mają słabiej rozbudowane grzebienie. Powierzchnia siateczki śródplazmatycznej szorstkiej jest w jednostce objętości komórek dużych mniejsza niż w komórkach małych.

Błona jądrowa bardzo dużych neuronów jest w skomplikowany sposób pofałdowana, co znacznie zwiększa jej powierzchnię. Bardzo duże erytrocyty są najsilniej spłaszczone. Liczba mikrotubul w krwinkach jest zależna od rozmiarów krwinek.

U większości gromad kręgowców hierarchia wielkości komórek różnych tkanek jest odmienna u rozmaitych gatunków. Wyjątek stanowią ptaki wróblowate, wśród których hierarchia wielkości komórek wydaje się prawie jednolita u sześciu zbadanych gatunków.

Wobec istnienia związków między rozmiarami komórek, rozmiarami jąder komórkowych i zawartością DNA w jądrach, można wykorzystać łącznie rozmaite dane. Pozwala to na zarysowanie ogólnego obrazu rozmiarów komórek kręgowców.

Komórki kręgowców są zbliżone rozmiarami do komórek ssaków. Spodouste mają komórki podobne lub nieco większe. W grupie tej istnieją dość znaczne różnice między gatunkami, ale nie mamy wiele dokładnych informacji. Sądząc po ilości jądrowego DNA, kostołuskie i przejściowce mają komórki około połowę mniejsze od komórek ssaków,

lecz *Polypterus* ma komórki około dwa razy większe. Wśród ryb kostnoszkieletowych notujemy występowanie dość znacznych różnic w rozmiarach komórek. Komórki niektórych ryb łososiowatych są zbliżone rozmiarami do komórek ssaków. Jest rzeczą prawdopodobną, że ryby te wywodzą się z form tetraploidalnych. Większość kostnoszkieletowych ma komórki bardzo małe.

Ryby dwudyszne mają komórki olbrzymie, około sto razy większe od komórek ssaków. Podobnie wielkie są komórki niektórych płazów ogoniastych. Występują tu jednak znaczne różnice między gatunkami. Komórki różnych gatunków płazów bezogonowych różnią się dość wyraźnie rozmiarami. Najmniejsze są bliskie komórkom ssaków, największe są większe około dwa razy. Rozmiary komórek gadów są dość jednolite, są nieco mniejsze od komórek ssaków. Komórki tkanek różnych gatunków ptaków nie różnią się wyraźnie rozmiarami, są wyraźnie mniejsze od komórek ssaków.

Wszystkie ssaki są zbudowane z komórek o wielkości zbliżonej. Komórki ludzkie są nieznacznie większe od średniej. Charakterystyczną cechą ssaków są uderzająco małe bezjądrowe erytrocyty, szczególnie drobne u *Insectivora* i *Artiodactyla*.

Bachmann [5] nie ma na pewno racji, pisząc, że rozmiary komórek nie mają żadnego związku z rozmiarami ciała. Jest to zbyt szerokie uogólnienie obserwacji tego autora ograniczonych do gatunków rodzaju *Bufo*.

Wśród ptaków wróblowatych komórki gatunków większych są większe od komórek gatunków mniejszych. U pozostałych kręgowców nie dostrzega się na ogół tej regularności, choć występuje np. u niektórych ras zwierząt udomowionych. Powszechne wydaje się występowanie u dużych gatunków szczególnie wielkich neuronów i włókien mięśni prążkowanych. U niektórych kręgowców wzrostowi rozmiarów ciała osobnika w ontogenezie towarzyszy powiększanie się komórek. Przypuszczalnie u wszystkich kręgowców powiększają się w okresie wzrostu neurony i włókna mięśni prążkowanych. U płazów ogoniastych dostrzeżono także powiększanie się komórek wątroby, u innych zjawiska tego nie dostrzeżono.

PRZYCZYNY RÓŻNIC W ROZMIARACH KOMÓREK I PROPORCJACH ICH ORGANELLI

Jak już wspomniano zapewne większość opisanych prawidłowości powstała pod działaniem doboru naturalnego. Istnieją na pewno rozmaite, niezależne geny, z których jedne wpływają na wzrost wszystkich komórek organizmu, inne regulują rozmiary pewnych szczepów komórkowych (tak np. w genotypie ssaków znajdują się czynniki odpowiedzialne za

małe rozmiary krwinek), inne regulują stosunki ilościowe jądra i cytoplazmy, jeszcze odmienne decydują o liczbie mitochondriów w komórce, o obfitości siateczki śródplazmatycznej, itd. Wszystkie te geny podlegają mutacjom. Najraptowniejsze zmiany zarówno proporcji, jak i rozmiarów komórki wywołuje niewątpliwie poliploidyzacja. Sądono kiedyś, że poliploidy są wśród zwierząt wielką rzadkością, a wobec tego, że poliploidyzacja nie odegrała większej roli w ewolucji zwierząt. Dziś znamy wiele przykładów poliploidalności zwierząt (np. [45, 16]), nie wątpimy też w występowanie poliploidów wśród kręgowców (np. [10, 67, 68, 13]). Wielu badaczy sądzi więc, że poliploidyzacja wywarła doniosły wpływ na losy kręgowców nie wyłączając ssaków [19]. Jej rzadkość wśród wyższych kręgowców przypisuje się mechanizmom dziedziczenia płci, które poliploidyzacja zaburza, zwykle uniemożliwiając produkcję żywych gamet.

Przypadkowo powstała zygota poliploidalna musi się rozwijać sterowana przez te same mechanizmy, jakie są czynne w normalnych diploidach. Zmiany w proporcjach genów wywołane poliploidyzacją mogą te mechanizmy modyfikować, tak że w efekcie poliploid może się fenotypowo różnić od formy diploidalnej. Znane są przykłady zwiększenia rozmiarów komórek przez poliploidyzację (np. [99]). Jeśli poliploid zdoła dać początek nowemu szczepowi (często zapewne za pośrednictwem formy partenogenetycznej [2, 3]), dalsze mutacje mogą zmieniać proporcje organizmu, a dobór może je wykorzystywać. Siegel i wsp. [81] dostrzegli, że u ustalonych gatunków tetraploidalnych ilość DNA zapisującego rRNA w jądrze mało się różni od ilości zawartej w jądrach pokrewnych gatunków diploidalnych. Zapewne gatunki poliploidalne mogą wtórnie stracić niektóre odcinki łańcucha DNA. Z upływem czasu dobór będzie tak wykorzystywał nieustanną zmienność genomu, że ślady przeszłej poliploidyzacji mogą ulec zatarciu i staną się trudno dostrzegalne.

Niejednokrotnie opisywano też odchylenia mejozy prowadzące do włączania pojedynczych chromosomów nadliczbowych. Osobniki aneuploidalne mają często obniżoną żywotność, lecz zapewne niektóre z nich są zdolne do pozostawienia potomstwa, przez co może powstać linia o zwiększonej zawartości DNA w komórce. Tak np. u *Mus dunni* istnieje wewnątrzgatunkowa zmienność liczby chromosomów i ramion chromosomowych [28a] wśród płazów opisano podobny fakt u *Leiopelma hochstetteri* [60]. U niektórych roślin i zwierząt (np. u lisa) występują tzw. „chromosomy B”, czyli mikrochromosomy, ich liczba jest różna u poszczególnych osobników, zaś znaczenie biologiczne pozostaje nieznanne. Być może podobne polimorfizmy mogą doprowadzić do ustalenia się w obrębie gatunku dwu form o odmiennej zawartości DNA, z których jedna może się okazać lepiej przystosowana.

Innym możliwym sposobem powiększania zawartości DNA jądrowego jest „replikacja tandemowa”, prowadząca do włączenia w łańcuch DNA dodatkowego fragmentu. Ress i Jones [77] zamieszczają przekonujące obrazy koniugacji chromosomów, różniących się długością. Bachmann i wsp. [7] zwracają uwagę, że zmienność zawartości DNA w obrębie wielu gatunków daje krzywą normalną. Różnice nie mogą więc pochodzić ani z poliploidyzacji, ani z polinemii, natomiast prawdopodobne jest tandemowe powtarzanie się odcinków. MacLean [56] przypuszcza, że to zjawisko może wynikać z błędu w transkrypcji — zamiast powstania nici RNA tworzy się odcinek DNA, który zostaje włączony do genomu.

Błędy replikacji łańcucha DNA mogą oczywiście nie tylko wzbogacać jądro komórkowe DNA, ale również je zubażać. Mutanty o pomniejszonej zawartości DNA są zapewne w znacznej większości letalne, lub subwitalne, niektóre z nich musi jednak dobór niekiedy zachowywać, skoro w ewolucji następowała niejednokrotnie redukcja zawartości DNA w komórkach.

WPLYW SELEKCJI NA ZMIANY W ILOŚCI DNA I ROZMIARACH KOMÓREK

Jak wspomniano, zaburzenia replikacji chromosomów prowadzące do zwiększenia lub zmniejszenia zawartości DNA w genotypie i wobec tego do zmiany w rozmiarach komórki są w większości letalne lub obniżają witalność nosiciela, tak że jego potomstwo zostaje odrzucone przez dobór naturalny. Niekiedy mutanty są jednak zdolne do wytworzenia nowych szczepów, którym zapewne nie raz systematyk przypisałby rangę odrębnych gatunków, gdyż gamety o różnej zawartości DNA są rzadko zdolne do łączenia się w żywotne zygoty. Można się więc zastanawiać jakie znaczenie dla biologii organizmu może mieć rozmaita zawartość DNA w jądrze, a wobec tego, jakie są przyczyny, że niekiedy dobór naturalny utrwał jej zmniejszenie lub powiększenie.

Obecność specjalnego genu wpływającego na rozmiary komórki u *Drosophila* stwierdził Dobzhansky ([25] cyt. wg [58]). Wpływ genotypu na rozmiary komórek opisuje Musiałek [61] u myszy wykazujących efekt heterozji. Zapewne jednak dobór naturalny dostosowuje zawartość DNA do rozmiarów komórek, można więc przypuszczać, że każdy czynnik faworyzujący odchylenie jednego z tych parametrów będzie równocześnie zmieniał i drugi funkcjonalnie z nim związany.

Jedną z bardziej znanych hipotez tłumaczących ewolucję zawartości DNA sformułował Ohno [68, 70]. Autor ten sądzi, że przypadkowe zwiększenie ilości jądrowego DNA jest wielkim usprawnieniem ewolucyjnym, wywołując redundancję informacji genetycznej, która według niego jest konieczna do powstania zmian genotypu. Powstające dodatkowo kopie

genów są zdaniem Ohno nieczynne, mogą też podlegać dowolnym mutacjom, gdyż do życia organizmu wystarcza gen pierwotny. W ten sposób z upływem czasu w genotypie gromadzą się rozmaite geny, które w razie modyfikacji środowiska gatunku mogą się uczynniać, zastępując geny dotychczasowe. Zwiększenie zawartości DNA w komórce powiększałoby więc, według Ohno, plastyczność ewolucyjną szczepu.

Hipoteza Ohno budzi poważne zastrzeżenia. Zakłada ona, że do wytworzenia poważnych zmian genotypu konieczne jest uwolnienie jego fragmentów od nacisku selekcji. Nowy odcinek genotypu w myśl hipotezy Ohno tworzyłby się losowo, zupełnie bez działania doboru. Pogląd ten jest przeniesieniem teorii „hopeful monster” Goldschmidta na poziom molekularny. Wszystkie współczesne badania mechanizmów ewolucyjnych dowodzą jednak, że w obrębie każdej populacji utrzymuje się stale bogaty polimorfizm genów, w pełni wystarczający do zmiany cech gatunku, jeśli tylko działanie doboru zmieni się ze stabilizującego na skierowane. Istnienie odcinków DNA zupełnie nie podlegających selekcji nie wydaje się prawdopodobne. Zapewne niektóre odcinki łańcucha DNA pełnią tylko funkcje strukturalne, łącząc poszczególne zapisy. Jednak także i takie odcinki nie mogą ulegać niczym nie ograniczonej zmienności bez narażenia łańcucha na zaburzenie funkcji.

Hipoteza Ohno opiera się na przyjęciu, że geny strukturalne powtarzają się „tandemowo” w chromosomie jak twierdzi wielu autorów, np. Paul [73]. Jest to jednak wątpliwe. Davidson i Britten [22] stwierdzają, że wszystkie fakty przemawiają za tym, że zapis białka strukturalnego jest reprezentowany tylko przez jedną kopię w genomie haploidalnym.

Trudno sobie wyobrazić mechanizm, który mógłby w razie zmiany warunków życia uruchamiać zapis genetyczny, do tej chwili nieczynny. Teoria Ohno przypisuje też chyba zbyt dużą rolę konieczności pojawiania się w ewolucji nowych genów strukturalnych. Zapewne wzrost ilości DNA kodującego geny strukturalne i regulujące odegrał bardzo istotną rolę w ewolucji Prokariota [104], a także wielu grup Eukariota. Kręgowce mają wielokrotnie więcej jądrowego DNA od osłonicy i beczaszkowców. Zapis całkowitej informacji potrzebnej do wytworzenia ciała kręgowca nie mógłby się prawdopodobnie pomieścić na tej ilości DNA jaką zawiera jądro komórkowe osłonicy (0,2–0,4 pg). Jednak różnice w budowie ciała ssaka i ryby polegają przede wszystkim na odrębnościach proporcji. Tkanki ssaków są w zasadzie zbudowane z tych samych składników co tkanki ryb. Charakter różnic między niektórymi białkami np. między hemoglobinami sugeruje raczej, że są to wyniki kolejnego zastępowania jednych kwasów aminowych przez inne, w obrębie tej samej drobinicy białka, a nie skokowego zastąpienia jednego białka przez zupełnie odmienne. Wiele argumentów przemawia za tym, że podwojenie genu

strukturalnego odegrało istotnie nieraz ważną rolę w ewolucji. Na tej drodze zapewne powstały np. dwa łańcuchy hemoglobiny, a także i mioglobina. Jednak nowa kopia genu albo była czynna — a wówczas podlegała ewolucji i selekcji, tak jak geny pozostałe, albo też ulegała szybko eliminacji [57].

Przytoczone wyniki Comingsa i Bergera [20] nie dowodzą, aby organizmy o wysokiej zawartości DNA w jądrze miały genotyp bogatszy od genotypu organizmów o małej zawartości jądrowego DNA. Wreszcie grupy systematyczne odznaczające się dużą obfitością DNA zarówno wśród kręgowców, jak i wśród owadów i nawet roślin mają cechy konserwatywne i raczej odpowiadają charakterem „żywym skamieniałościom”, niż grupom będącym w trakcie szybkiego różnicowania [86, 12, 90, 97].

Biorąc to wszystko pod uwagę, sędzę, że hipoteza Ohno, w myśl której zwiększenie zawartości DNA w jądrze wzmacnia plastyczność ewolucyjną organizmu, wskutek uwolnienia odcinka genomu od nacisku selekcji, jest nieprzekonywająca. Powinniśmy więc starać się o sformułowanie innej hipotezy tłumaczącej różnicę w rozmiarach komórek i genomów kręgowców. Zestawione w początkowych rozdziałach dane sugerują, że jest rzeczą mało prawdopodobną, iż istnieje jeden czynnik odpowiedzialny za mechanizm zmian. Raczej wiele rozmaitych przyczyn mogło spowodować, że dobór naturalny zmieniał rozmiary komórek wpływając równocześnie na zawartość w nich DNA.

Zacznijmy od łatwiejszego zadania, jakim wydaje się wymienienie okoliczności sprzyjających zmniejszeniu rozmiarów komórek. Zmiana genotypu wywołująca zmniejszenie rozmiarów komórek może zostać utrwalona przez dobór w następujących okolicznościach:

1. Jeśli zmiana wywoła równocześnie zmniejszenie ogólnych rozmiarów organizmu, co może być w pewnych okolicznościach preferowane, np. u zwierząt żyjących pod ziemią lub często kryjących się w ziemi. Te okoliczności spowodowały może, że *Gymnophiona* mają komórki mniejsze niż *Urodela* i większość *Anura*.

2. Jeśli dobór popiera osobniki o wysokim metabolizmie, a dotychczasowe rozmiary komórek hamowały szybką przemianę materii. Rozmiary komórek nie są jedynym czynnikiem limitującym metabolizm. Tę samą rolę może pełnić także intensywność unaczynienia tkanek, budowa narządów oddechowych, brak podziału krwi w sercu czy trudność zdobycia pożywienia. Poszczególne czynniki anatomiczne i fizjologiczne ograniczające metabolizm są powiązane przez działanie doboru naturalnego, stąd komórki ptaków są mniejsze od komórek ssaków, itd. Zmniejszenie rozmiarów komórek w ewolucji ptaków było zapewne jednym

z czynników wchodzących w skład sieci sprzężeń zwrotnych w okresie wczesnej ewolucji ptaków [91].

3. Jeśli dobór popiera szybkość rozwoju zarodka i larwy. Przytoczono dowody, że ilość DNA w jądrze komórkowym wpływa na minimalny czas trwania interfazy. W tym zapewne należy upatrywać przyczyn, dla których rodzaj *Scaphiopus*, różni się tak wybitnie zawartością DNA od pozostałych płazów. Rodzaj ten żyje na terenach suchych, a jego zarodki i kijanki rozwijają się z wielką szybkością w wysychających zbiornikach słodkowodnych.

4. Jeśli część informacji zawartej w genomie nie zostaje nigdy wykorzystywana, odrzucenie genów zbytecznych może być korzystne, gdyż ilość DNA w jądrze jest wprost proporcjonalna do wrażliwości na uszkodzenie genomu przez czynniki mutagenne. Przykładem odrzucenia informacji zbędnej może być redukcja zawartości DNA u niektórych pasożytów [80]. Być może czynnik ten odegrał też rolę w zmniejszeniu zawartości DNA u *Teleostei*, które przystosowały się do stosunkowo wąskiej i mało zmiennej niszy ekologicznej.

Przejdźmy z kolei do wymienienia przyczyn, które mogły wpłynąć na zachowywanie przez dobór naturalny osobników o zwiększonych komórkach i dużej zawartości DNA w jądrze. Zwiększone rozmiary komórek mogą być preferowane przez dobór w następujących okolicznościach:

1. Jeśli powodują równoczesny wzrost rozmiarów ciała, a ten jest w danych przypadkach korzystny. Warto przypomnieć, że człowiek dobierając w hodowli zwierzęta o dużych rozmiarach ciała spowodował zwiększenie włókien mięśniowych. Wiemy też, że niektóre płazy ogooniaste i ryby dwudyszne, zbudowane z dużych komórek są pokaźnymi zwierzętami. Na pewno ewolucyjny wzrost wymiarów często był wynikiem zachowania przez selekcję genów wywołujących wzrost liczby komórek, w innych przypadkach dobór mógł jednak zachować osobniki mające większe komórki. Może to być szczególnie dodatnie w tych przypadkach, gdy ograniczenia pokarmowe utrudniały szybki przyrost masy. Budowa organizmu z niewielkiej liczby dużych komórek angażuje zapewne mniej cennego materiału niż wytworzenie dużej liczby drobnych komórek. Szczególnie kosztowne muszą być wszystkie błony, ze względu na udział w ich składzie lipidów.

2. Jeśli środowisko wewnętrzne organizmu ulega znacznym wahaniom równowagi osmotycznej lub chemicznej. Hipotezy tej wysuniętej przed paroma laty nie udało się dotychczas poprzeć wynikami doświadczeń, nie można jej jednak również uznać za obaloną. Goniakowska [34] badała bowiem wpływ zmniejszonego stężenia NaCl na erytrocyty, czynnikiem zaś, którego stężenie ulega największym zmianom w płynach

ustrojowych ryb dwudysznych i płazów jest mocznik. Autorowi tego artykułu nie są znane prace doświadczalne, które porównywałyby odporność na mocznik komórek o różnych rozmiarach. Burton [17] zwraca uwagę, że postęp w ewolucji regulacji osmotycznej polegał zapewne na wzroście izolacji środowiska wewnętrznego od otoczenia. Regulacja na powierzchni organizmu jest ekonomiczniejsza od regulacji na powierzchni poszczególnych komórek. Powiększanie rozmiarów komórek świadczyłoby, że w pewnych okolicznościach przebiegał proces odwrotny, polegający na zwiększeniu tolerancji na wahania składu środowiska wewnętrznego. Bodźcem mogły być korzyści, jakie przynosi zdolność do gromadzenia w ciele mocznika.

Pomimo tego, że brak dobrze udokumentowanych hipotez wyjaśniających ogromne różnice w rozmiarach komórek kręgowców, a szczególnie wyraźne ich powiększenie w ewolucji *Dipnoi* i *Urodela*, trudno przypuścić, aby fakty te nie miały znaczenia adaptacyjnego. Thomson ([96], str. 366) pisze: „cell size is usually thought to be adaptive and under strong selective pressure”. Zgadając się z zasadniczą częścią tego poglądu, autor niniejszego artykułu przypuszcza jednak, że pewne wahania rozmiarów komórek są dla doboru niedostrzegalne.

Warto przypomnieć brak stałej hierarchii wielkości komórek różnych tkanek ssaków lub różnice indywidualne w rozmiarach komórek płazów [93, 42]. Pamiętamy też, że u ptaków wróblowatych, których metabolizm przekracza wyraźnie szybkość przemiany materii pozostałych kręgowców [75], stwierdzono niewielki zakres wahań indywidualnych i znaczną stałość hierarchii w rozmiarach komórek poszczególnych tkanek rozmaitych narządów [63].

Autor tego artykułu sądzi więc, że allele wpływające na rozmiary i proporcje komórek dobór naturalny może dostrzegać, preferować lub odrzucać tylko u zwierząt o bardzo intensywnym metabolizmie lub też wówczas, gdy ich działanie jest bardzo dobitne. Jest zresztą oczywiście prawdopodobne, że allele te wpływają równocześnie na inne cechy organizmów i z tej racji podlegają działaniu doboru. Ewolucja erytrocytów ssaków, jest, zdaje się, zjawiskiem wyjątkowym. Po utracie jąder komórkowych powstała możliwość dalszej redukcji rozmiarów, co było zapewne aktywnie popierane przez dobór, gdyż w ten sposób funkcja transportowa krwi ulegała usprawnieniu. W ten sposób doszło do szczególnie drobnych krwinek u *Artiodactyla*. Wołk (w druku) stwierdziła u ryjówek, mających również bardzo drobne erytrocyty (liczba ich osiąga 23 miliony w 1 mm³ krwi), że erytrocyty noworodków mają większe rozmiary niż krwinki osobników wyrosniętych. Można by w tym dopatrywać się wskazówki, że zmniejszenie erytrocytów jest świeżą zdobyczą ewolucyjną.

Niewielkie rozbieżności wśród rozmiarów komórek i zawartości DNA u rozmaitych gadów, ptaków i ssaków można interpretować następująco:

Chromosomowy mechanizm dziedziczenia płci utrudnia pojawienie się poliploidyzacji. Ptaki i ssaki to grupy stosunkowo młode, podobieństwo może więc być spadkiem po niezbyt odległych przodkach. Stałocieplność tych zwierząt wymaga precyzyjnego zrównoważenia metabolizmu wszystkich narządów, dobór eliminuje więc mutacje naruszające tę harmonię działając jako czynnik konserwatywny. Te same przyczyny spowodowały u ptaków i ssaków ograniczenie czasowe wzrostu rozmiarów ciała osobnika. Dobór może jednak zachowywać te mutacje, które nie wywołują zaburzeń regulacji, prowadzą zaś do zmniejszenia rozmiarów komórek i redukcji zawartości w nich DNA, gdyż cechy te ułatwiają szybką przemianę materii.

LITERATURA

- [1] ABRAHAMSON S., BENDER M. A., CONGER A. C., WOLFF S., 1973 — Uniformity of radiation-induced mutation rates among different species, *Nature*, **245**: 460–462.
- [2] ASTAUROW B. L., 1969 — Experimental polyploidy in animals, *Ann. Rev. Genet.*, **3**: 99–126.
- [3] ASTAUROW B. L., 1972 — Experimental model of the origin of bisexual polyploid species in animals, *Biol. Zentralbl.*, **91**: 137–150.
- [4] BACHMANN K., 1972 — Genome size in mammals, *Chromosoma*, **37**: 85–93.
- [5] BACHMANN K., 1972 — Głos w dyskusji, *Evolution of genetic systems*, Brookhaven Symp. Biol. 23, London, s. 450.
- [6] BACHMANN K., GOIN O. B., GOIN C. J., 1966 — Hylid frogs: polyploid classes of DNA in liver nuclei, *Science*, **154**: 650–651.
- [7] BACHMANN K., GOIN O. B., GOIN C. J., 1972 — Nuclear DNA amount in vertebrates. *Evolution of genetic systems*, Brookhaven Symp. Biol., 23, London 419–450.
- [8] BACHMANN K., GOIN O. B., GOIN C. J., 1972 — The nuclear DNA of *Polypterus palmas*, *Copeia* 1972: 363–365.
- [9] BACHMANN K., HARRINGTON B. A., CRAIG J. P., 1972 — Genome size in birds, *Chromosoma*, **37**: 405–416.
- [10] BEÇAK W., GOISSIS G., 1971 — DNA and RNA content in diploid and tetraploid amphibians, *Experientia* **27**: 345–346.
- [11] BEREZOWSKI A., 1910 — Studien über die Zellgrösse. I. Über das Verhalten zwischen der Zellgrösse und der Gesamtgrösse des wachsenden Organismus, *Arch. Zellf.* **5**: 375–384.
- [12] BIER K., MÜLLER W., 1969 — DNA-Messungen bei Insekten und eine Hypothese über retardierte Evolution und besonderen DNS-Reichtum im Tierreich, *Biol. Zentralbl.*, **91**: 425–449.
- [13] BOGART J. P., WASSERMAN A. O., 1972 — Diploid-polyploid cryptic species pairs: a possible clue to evolution by polyploidization in anuran amphibians, *Cytogenetics*, **11**: 7–24.

- [14] BRITTEN R. J., DAVIDSON E. H., 1971 — Repetitive and non-repetitive DNA sequences and a speculation on the origins of evolutionary novelty, *Quart. Rev. Biol.*, **46**: 111–133.
- [15] BRITTEN R. J., KOHNE D. E., 1970 — Repeated segments of DNA, *Scient. Amer.*, **222**(4): 24–31.
- [16] BROWN D. S., WRIGHT C. A., 1972 — On a polyploid complex in freshwater snails (*Planorbidae: Bulinus*) in Ethiopia, *J. Zool. Lond.*, **167**: 97–132.
- [17] BURTON R. F., 1973 — The significance of ionic concentration in the internal media of animals, *Biol. Rev.*, **48**: 195–231.
- [18] BYCZKOWSKA-SMYK W., 1973 — Observations on the ultrastructure and size of the hepatocytes of the lungfish *Lepidosiren paradoxa* (Dipnoi, Pisces), *Acta Biol. Cracov. S. Zool.*, **16**: 247–255.
- [19] COMINGS D. E., 1972 — Evidence for ancient tetraploidy and conservation of linkage groups in mammalian chromosomes, *Nature*, **238**: 455–457.
- [20] COMINGS D. E., BERGER R. O., 1969 — Gene products of *Amphiuma*: an amphibian with excessive amount of DNA, *Biochem. Genet.*, **2**: 319–333.
- [21] CZOPEK G., 1963 — The distribution of capillaries in muscles of some Amphibia, *Studia Soc. Sci. Tor. S. E (Zool.)*, **7**: 61–98.
- [22] DAVIDSON E. H., BRITTEN R. J., 1973 — Organization, transcription and regulation in the animal genome, *Quart. Rev. Biol.*, **48**: 565–613.
- [23] DĄBROWSKI Z., 1968 — Quantitative characteristics of some elements of peripheral blood in the crow family (*Corvidae*), *Acta Biol. Cracov., S. Zool.*, **11**: 267–283.
- [24] DETTLAFF T. A., 1964 — Cell divisions, duration of interkinetic stages and differentiation in early stages of embryonic development. *Adv. Morphog.*, **3**: 323–363.
- [25] DOBZHANSKY T., 1929 — Roux' Arch. Entwickl., **115**: 363–379.
- [26] DUDEK A., DĄBROŚ W., SZARSKI H., 1972 — Dimensions of nuclei of the neurosecretory cells in some fishes and amphibians, *Bull. Ac. Polon. Sci. S. Sci. Biol.*, **20**: 389–396.
- [27] EBELING A. W., ATKIN N. B., SETZER P. Y., 1971 — Genome sizes of teleostean fishes: increases in some deep-sea species, *Amer. Natur.*, **105**: 549–561.
- [28] EDSTRÖM J. E., PIGOŃ A., 1958 — Relation between surface, ribonucleic acid content and nuclear volume in encapsulated spinal ganglion cells, *J. Neurochem.*, **3**: 95–99.
- [28a] FEDYK S., 1970 — Aberracje chromosomowe u ssaków i ich znaczenie w ewolucji kariotypu, *Mater. Konf. nauk. „Anomalie chromosomów autosomalnych”*. Białystok, 176–187.
- [29] FLAMM W. G., 1972 — Highly repetitive sequences of DNA in chromosomes, *Intern. Rev. Cytol.*, **32**: 1–52.
- [30] GODULA J., 1970 — Quantitative investigations of cellular organelles from the liver of Amphibia: *Xenopus laevis* (Daud.) and *Ambystoma mexicanum* (Cope), *Acta Biol. Cracov., S. Zool.* **13**: 225–236.
- [31] GOIN O. B., GOIN C. J., 1968 — DNA and the evolution of vertebrates, *Amer. Midl. Natur.*, **80**: 289–298.
- [32] GOIN O. B., GOIN C. J., BACHMANN K., 1968 — DNA and amphibian life history, *Copeia*, 1968: 532–540.
- [33] GONIAKOWSKA L., 1970 — The respiration of erythrocytes of some amphibians in vitro, *Bull. Ac. Polon. Sci. S. Sci. Biol.*, **18**: 793–797.

- [34] GONIAKOWSKA L., 1973 — Metabolism, resistance to hypotonic solutions, and ultrastructure of erythrocytes of five amphibian species, *Acta Biol. Cracov. S. Zool.*, **16**: 113–134.
- [35] GONIAKOWSKA-WITALIŃSKA L., 1974 — Respiration, resistance to hypotonic solutions and ultrastructure of erythrocytes of *Salamandra salamandra*, *Bull. Acad. Polon. Sci. S. Sci. Biol.*, **22**: 59–66.
- [36] GONIAKOWSKA-WITALIŃSKA L., 1974 — Glucose-dependent increase in erythrocyte metabolism correlated with greater resistance to hypotonic solutions, *Bull. Acad. Polon. Sci. S. Sci. Biol.*, **22**: 101–104.
- [37] GÓRSKI A., 1965 — Układ ważniejszych elementów w komórce mięśniowej u bydła rasy nizinnej czarno-białej i rasy czerwonej polskiej odmiany górskiej. *Zootechnika*, Wrocław, **13**: 37–45.
- [38] HANRAHAN J. P., HOOPER A. C., McCARTHY J. C., 1973 — Effects of divergent selection for body weight, fibre number and diameter in two mouse muscles, *Anim. Prod.*, **16**: 7–16.
- [39] HEMMINGSEN A., 1960 — Energy metabolism as related to body size and respiratory surface and its evolution, *Rep. Steno Hosp. Nord. Insulin Lab.*, **9**: 1–110.
- [40] HERTWIG R., 1903 — Über Korrelation von Zell- und Kerngrösse und ihre Bedeutung für die geschlechtliche Differenzierung und die Teilung der Zelle, *Biol. Zentralbl.*, **23**: 49–62.
- [41] HINEGARDNER R., ROSEN D. E., 1972 — Cellular DNA content and the evolution of teleostean fishes, *Amer. Natur.*, **106**: 621–644.
- [42] JERRETT D. P., MAYS C. E., 1973 — Comparative hematology of the hellbender, *Cryptobranchus alleganiensis* in Missouri, *Copeia*, 1973: 331–337.
- [43] KAUFMAN L., 1924 — Cell growth and body growth. Investigations on pigeons, *Bull. Acad. Polon. Sci. S. B.*, 1924: 281–295.
- [44] KAUFMAN L., 1930 — Innere und aussere Wachstumsfaktoren. Untersuchungen an Huhnern und Tauben, *Roux' Arch. Entw. Mech.*, **122**: 395–431.
- [45] KERR W. E., de SILVEIRA Z. V., 1972 — Karyotypic evolution of bees and corresponding taxonomic implications, *Evolution*, **26**: 197–202.
- [46] KILARSKI W., 1973 — Zarys ultrastruktury mięśni prążkowanych kręgowców, [w] *Ultrastruktura i funkcja komórki*, red. J. Kawiak, Z. Osuchowski, PWN, Warszawa, str. 227–239.
- [47] KILARSKI W., 1973 — Cytophotometry of sarcoplasmic reticulum in extrinsic eye muscles of the teleost (*Tinca tinca* L.), *Z. Zellforsch.*, **136**: 535–544.
- [48] KING J. L., JUKES T. H., 1969 — Non-Darwinian evolution, *Science*, **164**: 788–798.
- [49] KOGAN Z. M., 1969 — Ewolucja chromosomnego kompleksa w filogenezie chordowych zwierząt, *Citologia*, **11**: 917–932.
- [50] KOLATA G. B., 1973 — Repeated DNA: molecular genetics of higher organisms, *Science*, **182**: 1009–1011.
- [51] KORDYLEWSKA A., 1971 — Comparison of the cell number in internal organs of mice from two inbred strains and their F₁ hybrids, *Acta Biol. Cracov. S. Zool.*, **14**: 137–149.
- [52] KOWTUNOWICZ N. G., 1969 — Sopotawlenije razmierow kletocznych jader i koliczestwa DNK w nich na raznich stadiach embrionalnogo razwitia laguszek, *Citologia*, **11**: 1300–1305.
- [53] KUCIAS J., 1967 — Untersuchungen über die Beziehungen der Kern-Plasma-Relation zur Kerngrösse. V. Beispiel der Anwendung des Modells einer Be-

- ziehung zwischen der Stoffwechselaktivität und der Kern-Plasma-Relation bei Untersuchungen an Leberzellen, *Biol. Zentralbl.*, **86**: 735–743.
- [54] KUCIAS J., 1970 — Estimation of cell metabolism by microscopic measurements, *Pol. Arch. Hydrobiol.*, **17**: 283–288.
- [54a] LEVI G., 1925 — Wachstum und Körpergrösse bei vollausgebildeten und im Wachstum begriffenen Tieren *Erg. Anat. Entw.-Gesch.* **26**: 86–352.
- [55] MCGREGOR H. C., KEZER J., 1971 — The chromosomal localization of a heavy satellite DNA in the testis of *Plethodon c. cinereus*, *Chromosoma*, **33**: 167–182.
- [56] MacLEAN N., 1973 — Suggested mechanism for increase in size of the genome, *Nature New Biol.*, **246**: 205–206.
- [57] MAYO O., 1970 — The role of duplications in evolution, *Heredity*, **25**: 543–545.
- [58] MISIEK L., 1974 — Wielkość komórek a zawartość DNA jąder komórkowych kręgowców, *Kosmos A*, **23**: 15–21.
- [59] MIRSKY A. E., RIS H., 1951 — The desoxyrybonucleic acid of animal cells and its evolutionary significance, *J. Gen. Physiol.*, **34**: 451–462.
- [59a] MONNICKENDAM M. A., BALLS M., 1973 — The relationship between cell sizes, respiration rates and survival of amphibian tissues in long term organ cultures, *Comp. Biochem. Physiol.*, **44A**: 871–880.
- [60] MORESCALCHI A., 1968 — The karyotypes of two specimens of *Leiopelma hochstetteri* Fitz. (*Amphibia Salientia*), *Caryologia*, **21**: 37–46.
- [61] MUSIAŁEK B., 1974 — The effect of genotype and of environment on the size and number of cells in mouse organs, *Folia Biol. Kraków*, **22**: 175–210.
- [62] NITECKI C., 1972 — Correlations between the dimensions of cells of several organs in six species of passerine birds, *Bull. Acad. Polon. Sci. Sér. Sci. Biol.*, **20**: 241–248.
- [63] NITECKI C., 1973 — Rozmiary komórek kilku narządów u wybranych gatunków z rzędu *Passeriformes*, *Studia Soc. Sci. Torun. S. E (Zool.)*, **9**: 133–230.
- [64] NITECKI C., SZARSKI H., 1972 — Nucleocytoplasmic ration of tissue cells of six bird species, *Bull. Acad. Polon. Sci. S. Sci. Biol.*, **20**: 317–320.
- [65] NOWOGRODZKA-ZAGÓRSKA M., 1974 — The organization of extraocular muscles in *Anura*, *Acta Anat.*, **87**: 22–44.
- [66] O'BRIEN S. J., 1973 — On estimating functional gene numbers in Eucaryotes, *Nature New Biol.*, **242**: 52–54.
- [67] OHNO S., 1970 — The enormous diversity in genome sizes of fish as a reflection of Nature's extensive experiments with gene duplication, *Trans. Amer. Fish. Soc.*, **99**: 120–130.
- [68] OHNO S., 1970 — *Evolution by gene duplication*, Springer Verlag, New York.
- [69] OHNO S., 1972 — An argument for the genetic simplicity of man and other mammals, *J. Human Evol.*, **1**: 651–662.
- [70] OHNO S., 1973 — Ancient linkage groups and frozen accidents, *Nature*, **244**: 259–262.
- [71] OLMO E., 1973 — Quantitative variations in the nuclear DNA and phylogenesis of the *Amphibia*, *Caryologia*, **26**: 43–68.
- [72] PALKOVITS M., FISCHER J., 1968 — *Karyometric investigations*, Akadémiai Kiadó. Budapest.
- [73] PAUL J., 1972 — General theory of chromosome structure and gene activation in Eucaryotes, *Nature*, **238**: 444–446.
- [74] PEDERSEN R. A., 1971 — DNA content, ribosomal gene multiplicity and cell size in fish., *J. Exp. Zool.*, **117**: 65–78.

- [75] POCZOPKO P., 1971 — Metabolic levels in adult homeotherms, *Acta Theriol.*, **16**: 1–21.
- [76] PRZEŁĘCKA A., 1973 — Synteza RNA w chromatynie jądrowej [w] Ultrastruktura i funkcja komórki, red. J. Kawiak, Z. Osuchowska, Warszawa, PWN, str. 58–71.
- [77] REES H., JONES R. N., 1972 — The origin of the wide species variation in nuclear DNA content, *Int. Rev. Cytol.*, **32**: 53–92.
- [78] RENDEL J. M., 1965 — The effects of genetic change at different levels, "Ideas in modern biology", *Proc. XVI Int. Congr. Zool.* **6**: 285–295.
- [79] ROBINSON D. W., BROADFORD G. E., 1969 — Cellular response to selection for rapid growth in mice, *Growth*, **33**: 221–229.
- [80] SEARCY D. G., MacINNIS A. J., 1970 — Measurements by DNA renaturation of the genetic basis of parasitic reduction, *Evolution*, **24**: 796–806.
- [81] SIEGEL A., LIGHTFOOT D., WARD O. G., KEENER S., 1973 — DNA complementary to ribosomal RNA: relation between genomic proportion and ploidy, *Science*, **179**: 682–683.
- [82] SMITH H., 1925 — Cell size and metabolic activity in *Amphibia*, *Biol. Bull.*, **48**: 347–378.
- [83] SPARROW A. H., NAUMAN C. H., DONNELLY G. M., WILLIS D. L., BAKER D. G., 1970 — Radiosensitivity of selected amphibians in relation to their nuclear and chromosome values, *Radiat. Res.*, **42**: 353–371.
- [84] SPARROW A. H., PRICE H. J., UNDERBRINK A. G., 1972 — A survey of DNA content per cell and per chromosome of procaryotic and eucaryotic organisms: some evolutionary considerations. *Evolution of genetic systems*, *Brookhaven Symp. Biol.*, **23**: 451–494.
- [85] SRIVASTAVA A. K., GRIFFITH R. W., 1974 — Erythrocyte morphology and the ecology of species of *Fundulus*, *Copeia*, 1974: 136–141.
- [86] STEBBINS G. L., 1966 — Chromosomal variation and evolution, *Science*, **152**: 1463–1469.
- [87] SZALA S., CHORAŻY M., 1972 — Powtarzające się sekwencje DNA w genomie wyższych organizmów, Warszawa, PWN.
- [88] SZARSKI H., 1965 — Rozmiary komórek kręgowców, *Kosmos A*, **14**: 553–562.
- [89] SZARSKI H., 1968 — Evolution of cell size in lower vertebrates. *Nobel Symp.* **4**. Current problems of lower vertebrate phylogeny, Stockholm 445–453.
- [90] SZARSKI H., 1970 — Changes in the amount of DNA in cell nuclei during vertebrate evolution, *Nature*, **226**: 651–652.
- [91] SZARSKI H., 1972 — Mechanizmy ewolucji, Ossolineum, Wrocław.
- [92] SZARSKI H., CYBULSKA R., 1967 — Liver cell size in *Protopterus dolloi* Blng. (*Dipnoi*), *Bull. Acad. Polon. Sci. S. Sci. Biol.*, **15**: 217–220.
- [93] SZARSKI H., CZOPEK J., 1965 — Liver cell size in some species of *Amphibia*, *Zool. Polon.*, **15**: 51–64.
- [94] SZARSKI H., CZOPEK G., 1966 — Erythrocyte diameter in some amphibians and reptiles, *Bull. Acad. Polon. Sci. S. Sci. Biol.*, **14**: 433–437.
- [95] ŚMIAŁOWSKA M., 1972 — Studies on cell size in some tissues of *Rana esculenta*. *Acta Biol. Cracov., S. Zool.*, **15**: 1–8.
- [95a] TEISSIER G., 1939 — Biométrie de la cellule, *Tabulae Biologicae*, **19**: 1–64.
- [96] THOMSON K. S., 1972 — An attempt to reconstruct evolutionary changes in the cellular DNA content of lungfish, *J. exp. Zool.*, **180**: 363–372.
- [97] THOMSON K. S., GALL J. G., COGGINS L. W., 1973 — Nuclear DNA contents of coelacanth erythrocytes, *Nature*, **241**: 126.

- [98] UNDERBRINK A. G., SPARROW A. H., POND V., 1968 — Chromosomes and cellular radiosensitivity. II. Use of interrelationships among chromosome volume, nucleotide content and D_0 of 120 diverse organisms in predicting radiosensitivity, *Radiat. Bot.*, **8**: 205-238.
- [99] UZZELL T. M., 1964 — Relations of the diploid and triploid species of the *Ambystoma jeffersonianum* complex (Amphibia, Caudata), *Copeia*, 1964: 257-300.
- [100] Van'tHOF J., SPARROW A. H., 1963 — A relationship between DNA content, nuclear volume, and minimum mitotic cycle time, *Proc. Natl. Ac. Sci. USA*, **49**: 897-902.
- [101] VENDRELY R., 1955 — The deoxyribonucleic acid content of the nucleus. "The nucleic acids", Academic Press, New York **2**: 155-180.
- [102] VERNBERG F. J., 1955 — Hematological studies on salamanders in relation to their ecology, *Herpetologica*, **11**: 129-133.
- [103] VERNBERG F. J., 1955 — Correlation of physiological behavior indexes of activity in the study of *Plethodon cinereus* (Green) and *Plethodon glutinosus* (Green), *Amer. Midl. Nat.*, **54**: 382-393.
- [104] WALLACE D. C., MOROWITZ H. J., 1973 — Genome size and evolution, *Chromosoma*, **40**: 121-126.
- [105] WINTROBE M., 1934 — Variations in size and hemoglobin content of erythrocytes in the blood of various vertebrates, *Folia Haematol.*, **51**: 32-49.
- [106] WOŁK E., 1974 — Zmniejszenie wskaźników hematologicznych ryjówek (w druku).
- [107] ZHORNO L. J., OVCHINNIKOVA I. P., 1964 — A cytophotometric study of DNA in the cells of stratified squamous epithelium, *Folia Hist. Cytoch.*, **2**: 173-180.
- [108] ZUBINA E. V., 1963 — Citofotometriczeskoje opredelenije sodierżania DNK w jądrach gigantycznych kłetek trofoblasta, *Dokł. A. N. SSSR*, **153**: 1428-1431.

Otrzymano: lipiec 1974.

Przyjęto: lipiec 1974.

Adres Autora: ul. Krupnicza 50, 30-060 Kraków.

ERRATA

Str. wiersz	Jest	Powinno być
290 ¹⁴ 327 ₈	synteza cytoplazmatycznej jest	syntezy cytoplazmatycznej w jed- nostce objętości jest

Postępy Biologii Komórki, t. 1, nr 3/4, 1974

Warunki prenumeraty

Cena prenumeraty krajowej:

rocznie zł 80.— półrocznie zł 40.—

Instytucje państwowe, społeczne, zakłady pracy, szkoły itp., mogą zamawiać prenumeratę wyłącznie w miejscowych Oddziałach i Delegaturach RSW „Prasa-Książka-Ruch”.

Prenumeratory indywidualni mogą opłacać w urzędach pocztowych i u listonoszy lub dokonywać wpłat na konto NBP I OM nr 1641-6-1025, RSW „Prasa-Książka-Ruch”, Przedsiębiorstwo Upowszechnienia Prasy i Książki, ul. Hubska 8/14, 50-502 Wrocław (w terminie do 10 dnia miesiąca poprzedzającego okres prenumeraty).

Prenumeratę za zleceniem wysyłki zagranicę, która jest o 4% droższa od prenumeraty krajowej, przyjmuje RSW „Prasa-Książka-Ruch”, Biuro Kolportażu Wydawnictw Zagranicznych, ul. Wronia 23, 00-840 Warszawa, konto PKO nr 1-6-100024.

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

Egzemplarze zdezaktualizowane można również nabyć w RSW „Prasa-Książka-Ruch”, Przedsiębiorstwo Upowszechnienia Prasy i Książki, ul. Hubska 8/14, 50-502 Wrocław, konto NBP I OM nr 1641-6-1025.

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

Indeks 38703

SPIS TREŚCI

A. HINEK, Badania nad morfologią i funkcją komórek naczyniowych . . .	277
H. SKURZAK, Rola przeciwciał odpornościowych w indukowaniu cytotoksycznych właściwości limfocytów <i>in vitro</i>	299
H. SZARSKI, Zagadnienie rozmiarów komórek zwierząt kręgowych	311