

**POLSKIE
TOWARZYSTWO
ANATOMICZNE**

TOM 2 - NR 4

1975 (257 - 324)

Postępy Biologii Komórki

PWN - WARSZAWA

<http://rcin.org.pl>

Kwartalnik
Polskiego Towarzystwa Anatomicznego
wydawany z pomocą finansową
Polskiej Akademii Nauk

Redaguje Kolegium

Jerzy KAWIAK, Wincenty KILARSKI, Jan MICHEJDA, Maria OLSZEWSKA

Komitet Redakcyjny

Jadwiga ACKERMAN, Leszek CIECIURA, 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 1975

Wydanie I. Nakład 381 + 119 egz. Ark. wyd. 6. Ark. druk. 4,25 + 7/8 wkl. Papier druk. sat.
III kl. 80 g, 70 × 100 cm. Oddano do składania 22 VIII 1975 r. Podpisano do druku w listopadzie
1975 r. Druk ukończono w listopadzie 1975 r. Zam. 2385/75. A-18. Cena zł 20,—

Wrocławska Drukarnia Naukowa, Wrocław, ul. Lelewela 4

DZIAŁANIE CYTOKININ W PROCESIE RÓŻNICOWANIA SIĘ CHLOROPLASTÓW

Adam WOŹNY i Fortunat MŁODZIANOWSKI

Zakład Botaniki Ogólnej, Instytut Biologii
Uniwersytet im. Adama Mickiewicza Poznań

Streszczenie. Cytokininy wywołują szereg zmian w ontogenezie plastydów. Stymulują m. in. syntezę chlorofilu (najprawdopodobniej głównie chlorofilu b) poprzez zwiększenie syntezy białek enzymatycznych warunkujących ten proces. Substancje te wpływają także w szczególny sposób na powstawanie gran, co prawdopodobnie zachodzi poprzez pewne cząstki białkowe odpowiedzialne za fuzję tylakoidów.

Plastydy nie należą do struktur całkowicie autonomicznych pod względem genetycznym, gdyż znaczna część białek enzymatycznych i strukturalnych tych organelli powstaje na rybosomach 80S zgodnie z informacją zawartą w DNA jądrowym [73]. Szereg danych przemawia obecnie właśnie za układem cytoplazmatyczno-jądrowym jako miejscem działania cytokinin w ontogenezie chloroplastów. Z prostych reakcji cytochemicznych wynika także, że cytokininy wpływają tak na syntezę, jak i na mobilizację skrobi oraz na procesy podziałowe plastydów.

I. WSTĘP

Cytokininy — to nazwa całej grupy substancji wzrostowych, które są pochodnymi 6-aminopuryny, a których działanie wyraża się głównie stymulowaniem cytokinez [69]. Wpływ cytokinin na rośliny nie ogranicza się jednak tylko do stymulacji podziałów komórkowych, ale substancje te kontrolują cały szereg procesów fizjologicznych takich jak organogeneza, starzenie się, różnicowanie się chloroplastów, transport asymilatów, synteza RNA i białka oraz aktywność niektórych enzymów [37].

Stymulujący wpływ cytokinin na proces różnicowania się chloroplastów i towarzyszący temu różnicowaniu wzrost poziomu chlorofilu wykazało wielu autorów [2, 16, 20, 22, 52, 72, 75, 87]. Ten wpływ polega najprawdopodobniej na zwiększeniu syntezy RNA oraz białek i to

zarówno strukturalnych, jak i enzymatycznych [2, 6, 19, 20, 21, 42, 56–58, 63, 64, 71]. Czy jednak cytokininy wpływają na rozwój plastydów przez wzmożenie syntezy białka w plastydach, o których z literatury wiadomo, że zawierają nie tylko własny DNA, ale także cały aparat potrzebny do biosyntezy białka, czy też poprzez stymulację syntezy białek cytoplazmatycznych, nie zostało jeszcze do końca wyjaśnione. Kułajewa i Romanko [43] doniosły o wzroście pod wpływem cytokinin syntezy białka w izolowanych chloroplastach tytoniu, a Jakuszkina i Puszkinina [33] u siewek kukurydzy. Z drugiej jednak strony wykazano, że blokując np. u *Eugleny* syntezę białek cytoplazmatycznych, powoduje się hamowanie syntezy chlorofilu [39]. Hamowanie to wiązał Beale [3] z blokowaniem tworzenia syntetazy kwasu δ -aminolewulinowego. Fletcher i wsp. [21, 22] sądzą, że cytokininy wpływają na wzrost produkcji chlorofilu właśnie poprzez indukcję tego enzymu.

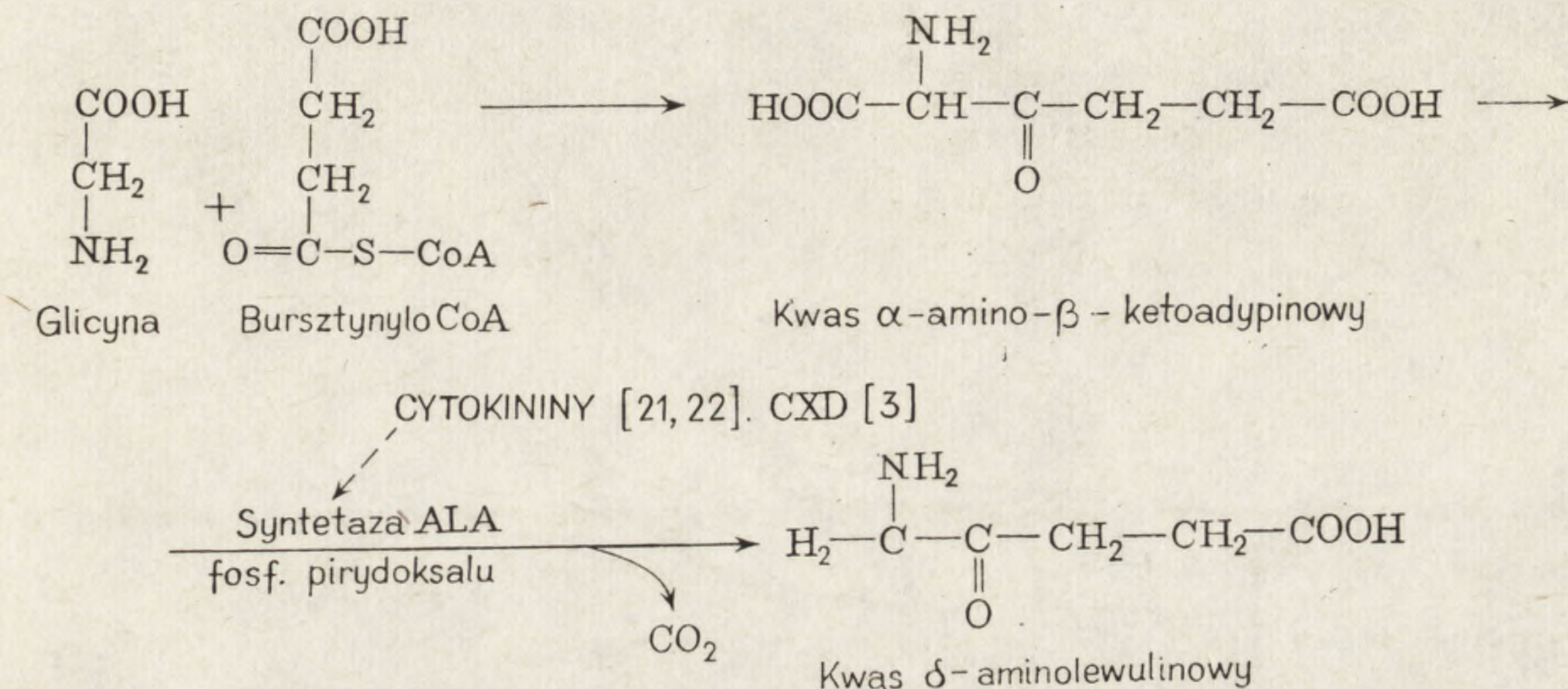
Stosując inhibitory blokujące dość specyficznie syntezę białka na rybosomach chloroplastowych (70 S), jak np. chloramfenikol [17, 82], czy na rybosomach cytoplazmatycznych (80 S), jak cykloheksimid [39] i analizując zawartość chlorofilu i ultrastrukturę plastydów z materiału traktowanego równocześnie cytokininą można uzyskać informację, czy wpływ cytokinin na ontogenezę chloroplastów odbywa się pośrednio przez cytoplazmę, czy bezpośrednio przez stymulację syntezy białka w plastydach.

II. SYNTEZA CHLOROFILU

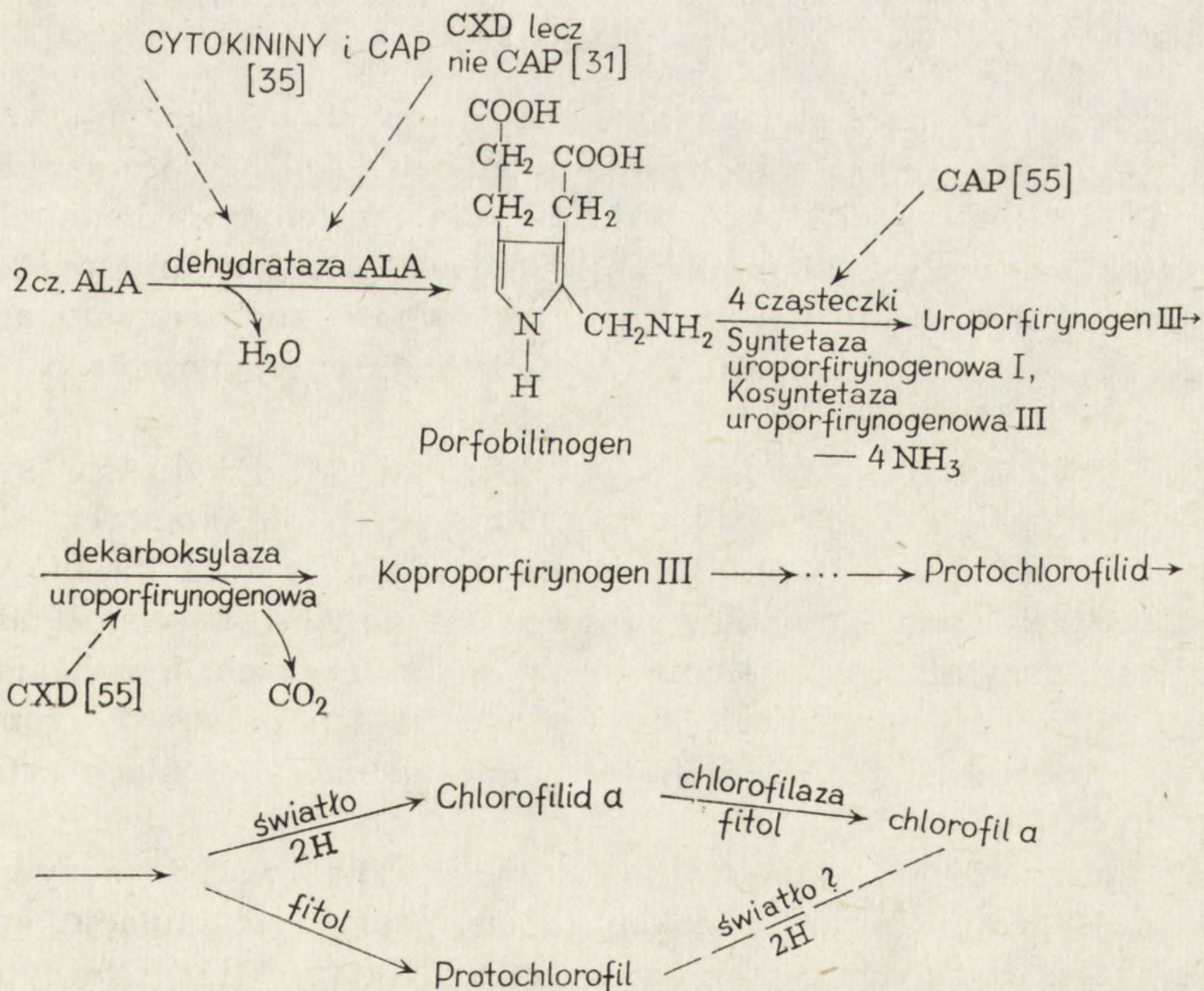
Pierwszym etapem biosyntezy chlorofilu jest kondensacja bursztyniło CoA i aminokwasu glicyny do nietrwałego kwasu α -amino- β -ketoaldypinowego, który po dekarboksylacji daje kwas δ -aminolewulinowy (ALA, [65]). Reakcja ta wymaga obecności kofaktora w postaci fosforanu pirydoksalu i katalizowana jest przez enzym — syntetazę kwasu δ -aminolewulinowego [24, 38] oraz rys. 1. W obecności enzymu dehydratazy kwasu δ -aminolewulinowego 2 cząsteczki ALA kondensują w cząsteczkę porfobilinogenu (monopirołu) z wydzieleniem 2 cząsteczek H_2O (rys. 2). Szczegółowy opis pozostałych etapów biosyntezy chlorofilu, z których ważniejsze zostały jedynie zaznaczone na rysunku, znajdzie czytelnik u Zurzyckiego [88], Devlina [15] oraz Rebeiza i Castelfranco [65].

Stymulujący efekt cytokinin na syntezę chlorofilu (rys. 3) jest najprawdopodobniej związany z ich wpływem na najwcześniejsze („ciemne”) etapy biosyntezy [2, 33]. Fletcher i McCullagh [21] i Fletcher i wsp. [22] na podstawie wyników uzyskanych z izolowanymi liścieniami ogórka uważają, że cytokininy wpływają na syntezę chlorofilu przez stymulację

syntezy syntetazy ALA. Na cytoplazmę jako miejsce syntezy tego enzymu wskazują wyniki uzyskane przez Beale'a [3]. Kiedy mianowicie do hodowli *Chlorella* akumulującej ALA w obecności kwasu lewulinowego (kompetycyjnego inhibitora dehydratazy ALA) dodano cykloheksimidu (Cxd), akumulacja ta zatrzymywała się w ciągu pół godziny, pod-

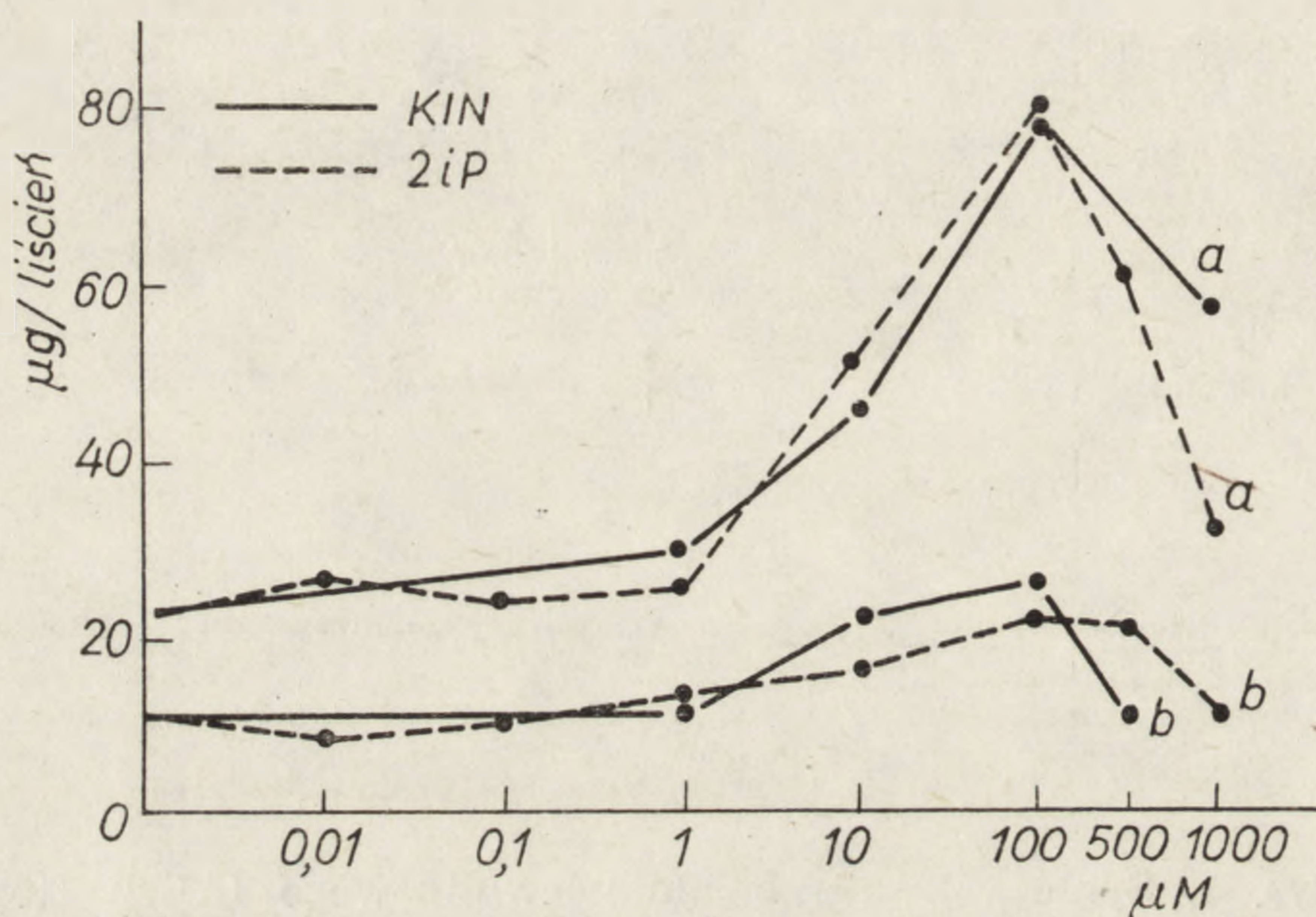


Rys. 1. Synteza kwasu δ -aminolewulinowego (ALA) [15]



Rys. 2. Ważniejsze etapy biosyntezy chlorofilu z zaznaczeniem miejsc, w których najprawdopodobniej działają cytokininy i antybiotyki (CAP i CXD) [15]

czas gdy synteza chlorofilu zachodziła jeszcze przez dalsze 6 godzin przy udziale ALA uprzednio nagromadzonego w komórce. Beale uważa, że u *Chlorella* synteza białka wymagana dla formowania chlorofilu jest syntezą labilnego enzymu włączonego do tworzenia ALA.



Rys. 3. Wpływ kinetyny (KIN) i Δ^6 -izopentyloaminopuryny (2iP) na syntezę chlorofilu w izolowanych liściach łubinu (a) i ogórka (b) po 24 godzinach wystawienia na światło

Wzrost aktywności pod wpływem kinetyny innego enzymu zaangażowanego w biosyntezie chlorofilu, a mianowicie dehydratazy kwasu δ -aminolewulinowego (ALAD) wykazali dla niezielonych komórek kaulusa tytoniu Kaul i Sabharwal [35]. Ponieważ zastosowany przez nich chloramfenikol (Cap) hamował wzrost aktywności tego enzymu autorzy ci sugerują, że kinetyna stymuluje syntezę białka na rybosomach chloroplastowych (70 S).

Całkowicie odmienną, niż Kaul i Sabharwal, lokalizację syntezy ALAD wykazali u *Eugleny* dla zazieleniających się komórek Hovenkamp-Obbema i wsp. [31]. Badając wpływ Cap i Cxd na biosyntezę dehydratazy kwasu δ -aminolewulinowego stwierdzili, że wzrost aktywności tego enzymu w zazieleniających się komórkach był hamowany przez Cxd, a Cap pozostawał bez wpływu na ten proces. W konkluzji autorzy stwierdzają, że ALAD jest formowana na rybosomach cytoplazmatycznych (80S).

Przytoczone wyżej dane wydają się więc wskazywać, że wpływ cytokinin na syntezę chlorofilu dokonuje się poprzez stymulację syntezy białek enzymatycznych na terenie cytoplazmy (rys. 1 i 2). Na cytoplazmatyczne miejsce działania cytokinin typu kinetyny wskazują także wyniki uzyskane przez Berridge'a i wsp. [4]. Wykazali oni pozytywną kore-

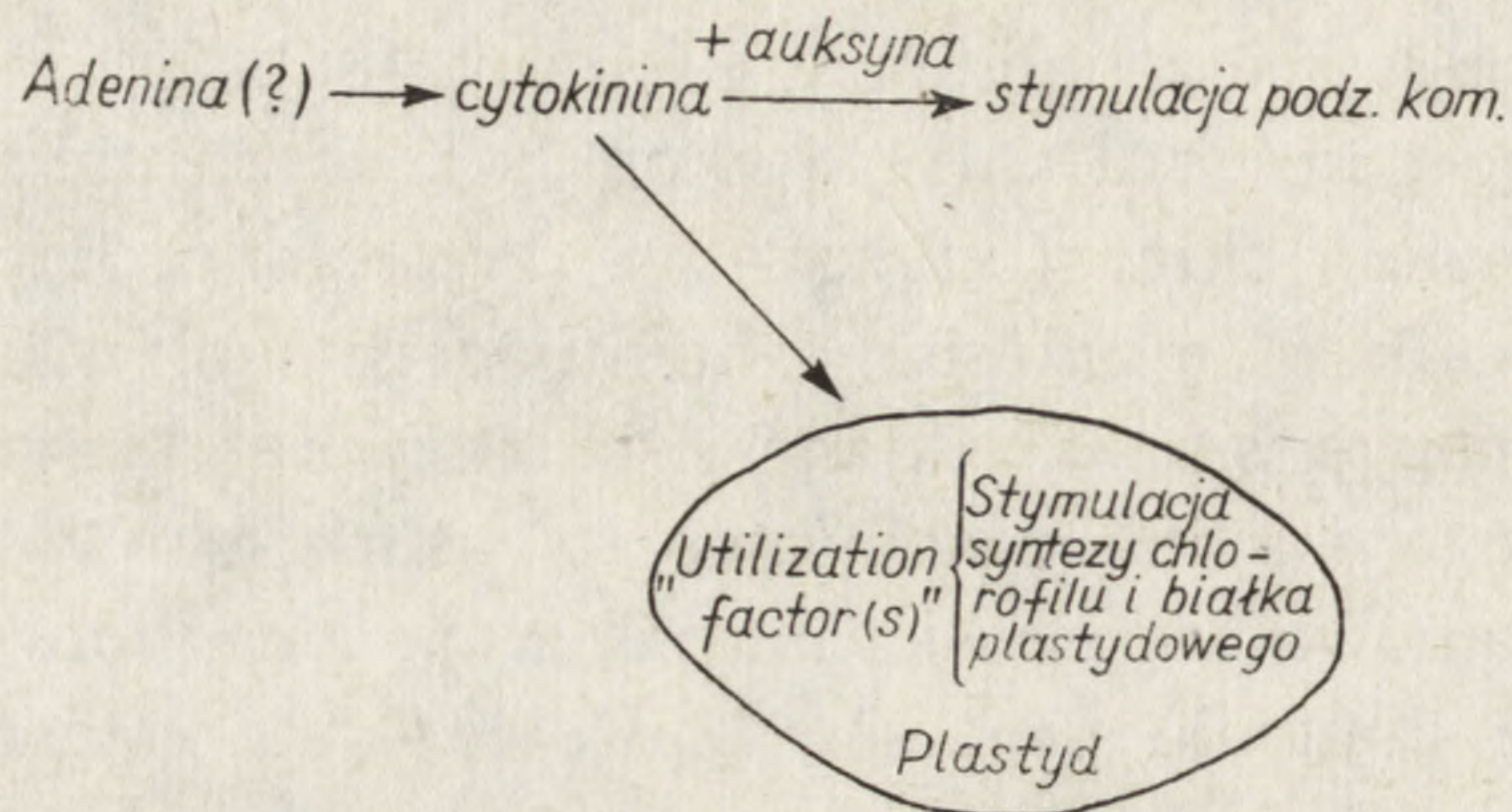
lację między biologiczną aktywnością cytokininy a zdolnością jej do wiązania się z rybosomami należącymi przede wszystkim do typu 80S. Również doświadczenia prowadzone z użyciem antybiotyków (Cap i Cxd) i kinetyny na liścieniach i splątku mchu wydają się wskazywać na cytoplazmę jako na miejsce działania cytokininy [86]. Zdolność jej do odwracania hamującego efektu antybiotyków była wyraźnie wyższa w przypadku Cxd — poziom chlorofilu wzrastał do poziomu kontroli — następowało tu więc całkowite zniesienie hamującego wpływu Cxd. Potwierdzeniem tej koncepcji są także dane z elektroforetycznych analiz RNA cytoplazmatycznego i chloroplastowego, z których wynika, że wpływ kinetyny na zahamowanie procesu starzenia się plastydów liści kalarepy zachodzi poprzez kontrolę procesów jądro - cytoplazmatycznych [45]. Pośrednio świadczą o poprawności tego wnioskowania także wyniki Choe i Thimanna [14], którzy badając szybkość starzenia mierzoną spadkiem poziomu chlorofilu i białka stwierdzili, że proces ten zachodzi znacznie wolniej w izolowanych chloroplastach niż w całych liściach. Na tej podstawie uważają, że czynnik odpowiedzialny za starzenie zlokalizowany jest na terenie cytoplazmy. Wiedząc z kolei, że cytokininy hamują procesy starzenia, można pośrednio wnioskować także o cytoplazmatycznym miejscu ich działania. Niezależnie od stymulowania syntezy białka enzymatycznego związanego bezpośrednio z syntezą chlorofilu, cytokininy mogą najprawdopodobniej wpływać na syntezę chlorofilu również pośrednio przez stymulację syntezy pewnych białek strukturalnych [33], których występowanie jest ściśle związane z obecnością chlorofilu [30, 40]. Interesującą hipotezę dotyczącą sposobu działania cytokinin na syntezę chlorofilu przedstawili Kamínek i Luštinec [36]. Według hipotezy tych autorów (rys. 4), związki te miałyby współdziałać z pewnym czynnikiem (utilization factor(s)) w plastydach. W wyniku tej interakcji następowałaby: 1. modyfikacja cytokinin do nowej formy działającej na plastydowy aparat syntezy białka, lecz nie zwiększającej wzrostu tkanki (cytokinina plastydowa) lub 2. przyłączanie cytokininy do odpowiedniego miejsca (miejsca) aktywnego w plastydzie. Przedstawiony pogląd jest jednak tylko wynikiem rozważań teoretycznych i wymaga bezpośredniego potwierdzenia doświadczalnego.

III. STRUKTURA PLASTYDOW W CZASIE ICH RÓŻNICOWANIA

Równoległe ze stymulowaniem syntezy chlorofilu, obserwuje się pod wpływem cytokinin przyspieszenie różnicowania struktury plastydów.

W tkance kalusowej tytoniu kinetyna wręcz warunkowała różnicowanie się chloroplastów z proplastydów. Powstałe pod wpływem kinetyny chloroplasty nie różniły się budową od typowych chloroplastów

liści tytoniu. Działanie kinetyny było wysoce specyficzne, tzn. żadnym innym czynnikiem łącznie ze światłem nie można było jej zastąpić [72], (rys. 5).

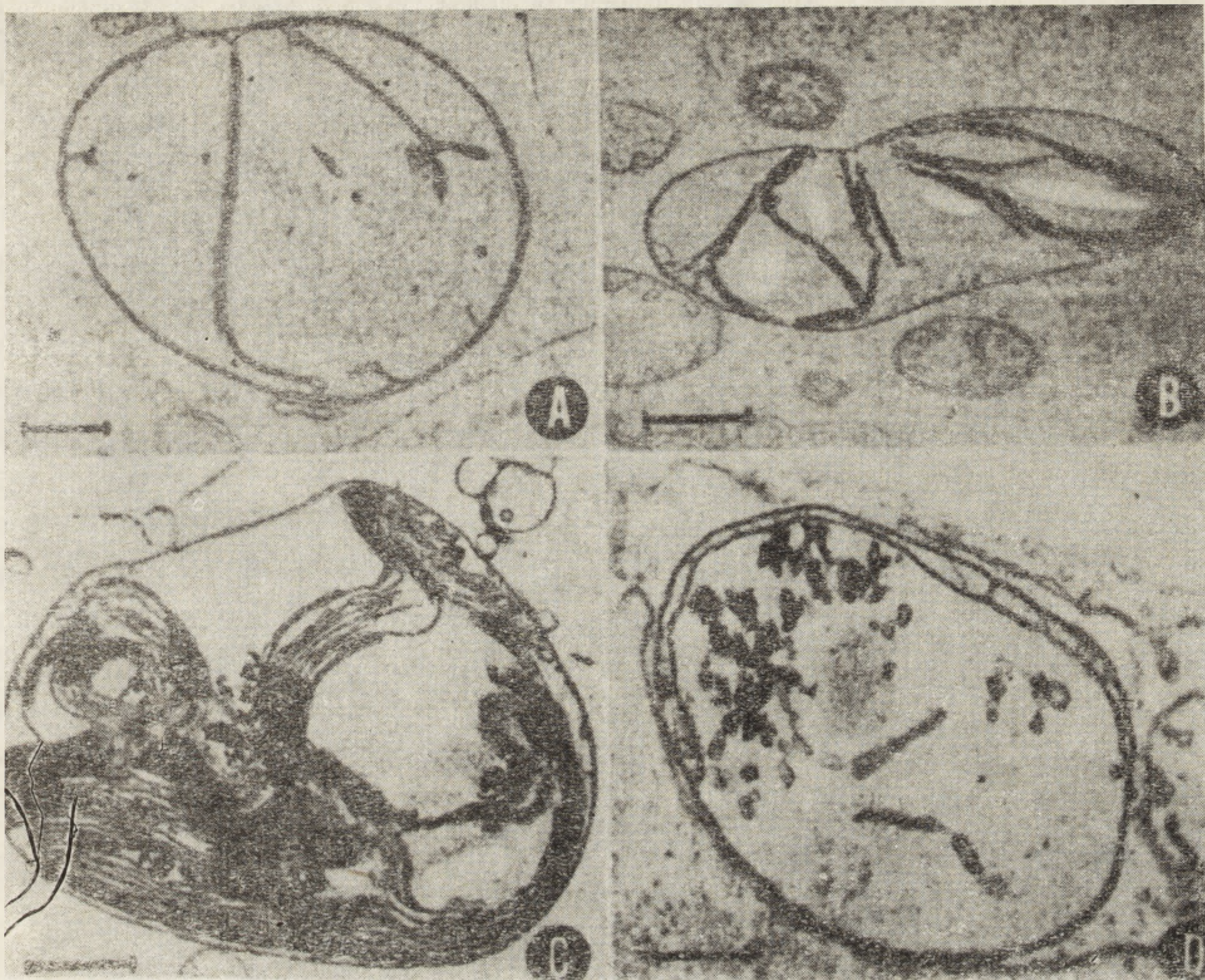


Rys. 4. Schemat działania cytokininy na wzrost i syntezę chlorofilu w tkance kalusowej tytoniu [36]

Szczególnie dogodnym obiektem badań dla wykazania działania cytokinin na różnicowanie się chloroplastów są etiolowane liście i liścienie. Plastydy bowiem tych organów, mimo że zawierają szereg elementów strukturalnych typowych dla chloroplastów [54], nie mają wykształconych gran, które tworzą się dopiero na świetle z ciała prolamellarnego, jak i chlorofilu, który powstaje również pod wpływem światła z protochlorofilu (idu) [88]. W izolowanych etiolowanych liścieniach grochu [18], dyni [13, 44, 47], łubinu (rys. 6–8) [52], ogórka [86], wystawionych na światło cytokininy przyspieszają różnicowanie się chloroplastów, stymulując wykształcanie się struktury tylakoidalnej, głównie gran i zwiększają wzrost plastydów [13].

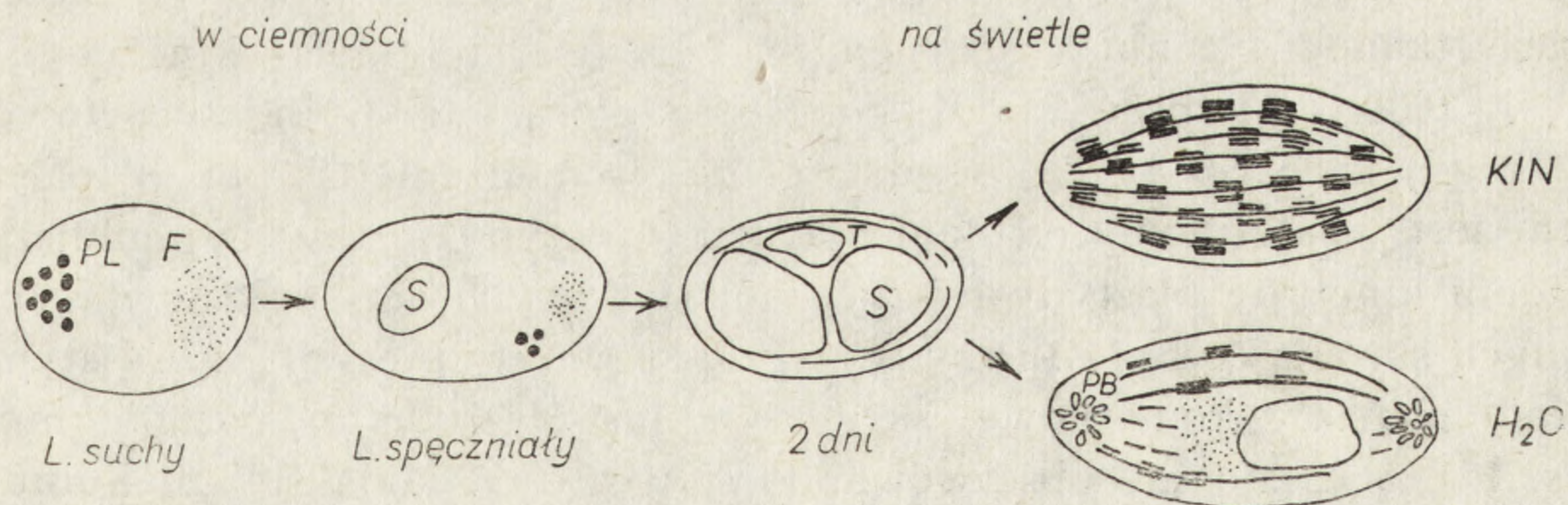
Oprócz wyraźnego przyspieszenia procesu różnicowania systemu tylakoidalnego, wpływowi cytokinin przypisuje się również szereg anormalności w rozwoju chloroplastów. Farinneau i Roussaux [18] obserwowali tworzenie się olbrzymich gran w liścieniach grochu. W liścieniach dyni i łubinu opisano zwiększenie się objętości całych plastydów i tworzenie licznych kulistych ciałek na ich obwodzie [13, 52] (rys. 9). Przy dłuższym działaniu kinetyny plastydy liścieni łubinu pęczniały i pękały, a uwolnione tylakoidy tworzyły pęcherzykowate uwypuklenia znacznej wielkości (rys. 10). Wnętrza tych tylakoidalnych rozcięć były w elektronogramach dla elektronów gęste, co mogłoby świadczyć o gromadzeniu się w nich jakiejś substancji.

Zmiany zachodzące w czasie zazieleniania się plastydów na poziomie molekularnym są przedmiotem wielu badań; m. in. Kirk [41] oraz Park i Sane ([50] i cyt. lit.) przedstawili dane dotyczące sekwencji tworzenia i rozmieszczenia w błonach jednostek fotosyntetycznych w trakcie tego procesu. W fotosyntezie biorą udział dwie reakcje fotochemicz-



Rys. 5. Elektronogramy plastydów kultury tkankowej tytoniu

A — Proplastyd z tkanki rosnącej w ciemności. Skala $0.1 \mu\text{m}$. B — Chloroplast z tkanki hodowanej na świetle przez 28 dni w obecności kinetyny. Obecne są dość liczne ziarna skrobi, natomiast rozwój gran jest stosunkowo słaby. Skala $0.1 \mu\text{m}$. C — Chloroplast z tkanki hodowanej na świetle przez 45 dni w obecności kinetyny. Skala $1.0 \mu\text{m}$. D — Plastyd z tkanki hodowanej na świetle przez 28 dni bez kinetyny. Skala $1.0 \mu\text{m}$ [72]



Rys. 6. Rozwój chloroplastów w izolowanych liścieniach łubinu

W liścieniach suchych proplastidy zawierały plastoglobule (PL) i fitoferrytynę (F). W czasie pęcznienia pojawiała się skrobia (S), a dopiero później pierwsze tylakoidy (T). W doświadczeniu liścienie izolowano po 2 dniach pęcznienia i kiełkowania nasion w ciemności i wystawiano na słabe światło (14 lux) w wodzie (H_2O) i roztworze kinetyny (KIN). Po 6 dniach w materiale kontrolnym występowały jeszcze ciała prolamellarne (PB), fitoferrytyna (F) i skrobia (S). W plastydach liścieni wyłożonych na roztworze kinetyny ciała te występowały tylko sporadycznie

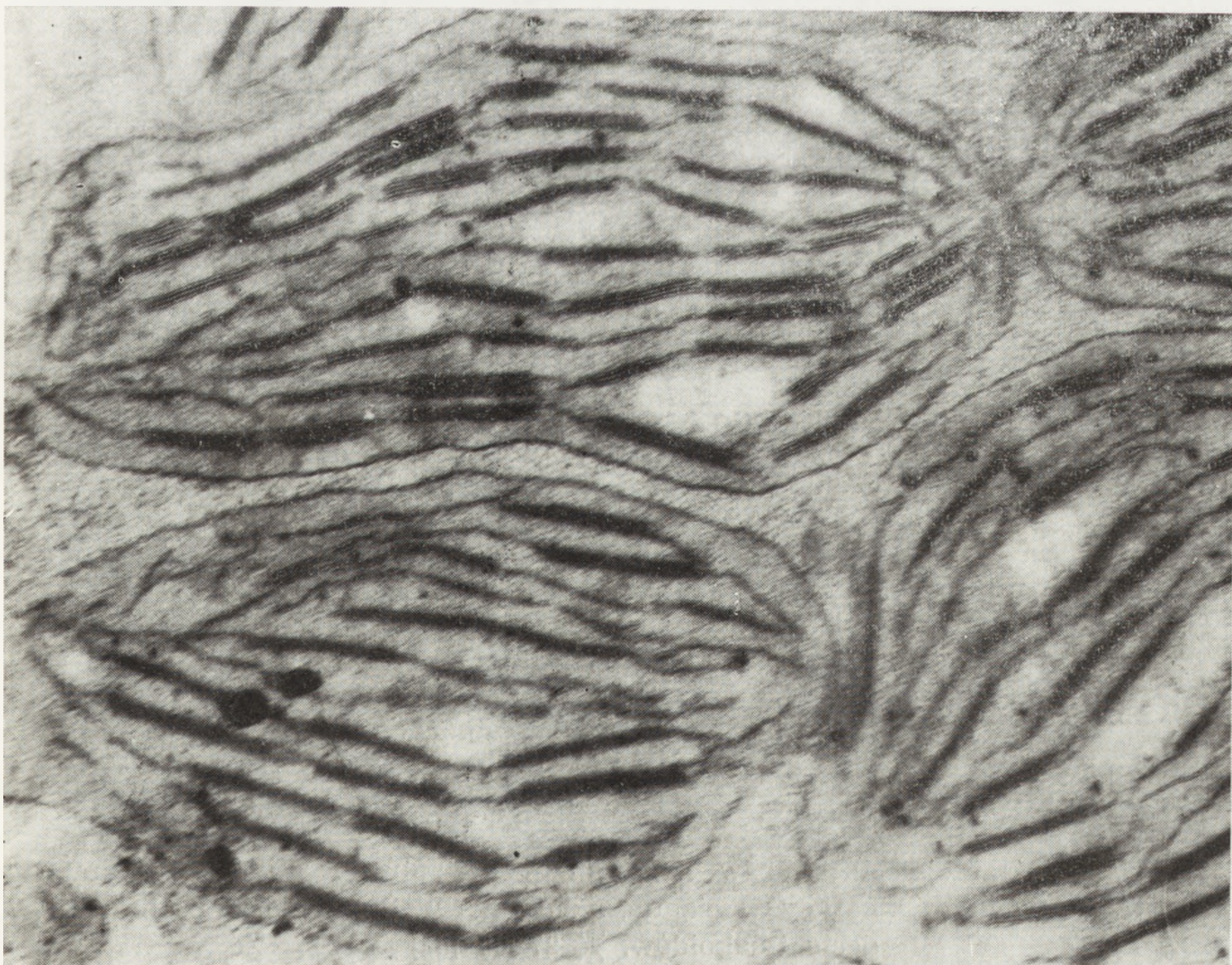
ne, w których uczestniczą dwa układy barwników, charakteryzujące się różnymi maksimami absorpcji. W pierwszej fazie zróżnicowania chloroplastów na świetle, kiedy występują tylakoidy pierwotne (długie, pojedyncze lamelle) aktywny jest fotosystem I z cykliczną fotofosforylacją, natomiast wraz z utworzeniem gran obserwuje się aktywność fotosystemu II z transportem elektronów z H_2O do NADP, przyswajanie CO_2 , wydzielanie O_2 i niecykliczną fotofosforylację. W pierwszej fazie zróżnicowania się chloroplastów wartość stosunku chlorofilu a do chlorofilu b jest wyższa niż w fazie drugiej [7, 28, 59, 60]. Ponieważ zwiększanie się poziomu chlorofilu b jest związane z tworzeniem się gran stymulowanym cytokininami, ciekawe było wykazanie wpływu tych substancji wzrostowych na syntezę chlorofilu b. Jak wynika z pracy Banerji i Lalorayi [2] z liścieniami dyni oraz Kaul i Sabharwala [34] z pewnym szczepem tkanki kalusowej tytoniu, kinetyna rzeczywiście stymulowała bardziej syntezę chlorofilu b niż a. Przyspieszanie przez cytokininy procesu rozwoju gran pozwala również pośrednio przypuszczać, że stymulują one syntezę pewnych cząstek białkowych, które według Goodenougha i Staehelina [26] są odpowiedzialne za zespalanie się tylakoidów w stosy.

IV. SYNTEZA I MOBILIZACJA SKROBI

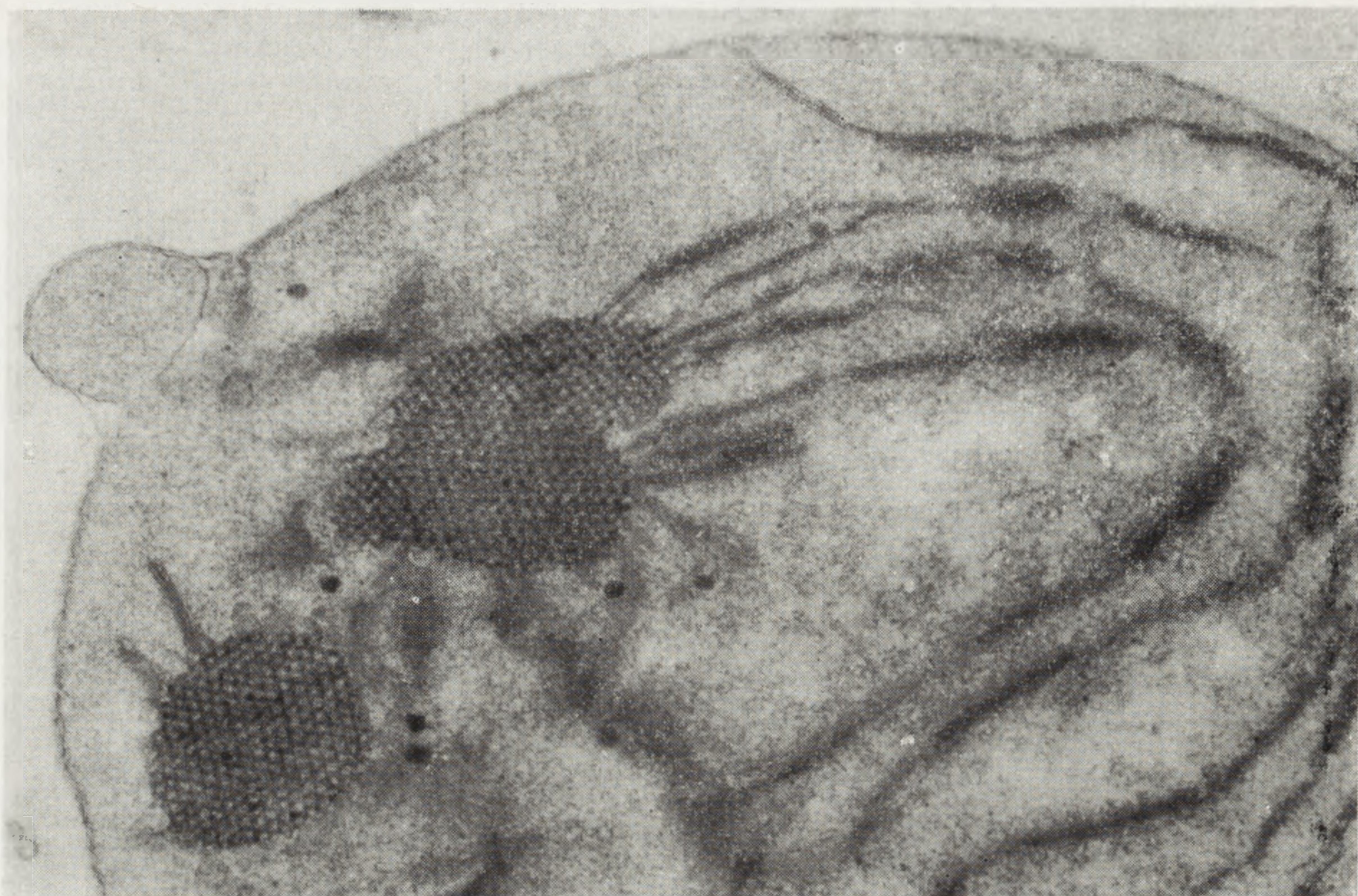
Ziarna skrobi spotyka się w plastydach już na etapie proplastydów. W izolowanych liścieniach łubinu kinetyna wyraźnie stymulowała degradację skrobi proplastydowej, co wykazano zarówno na poziomie mikroskopu świetlnego, jak i elektronowego [52, 84]. Dane te wydają się potwierdzać przypuszczenia, że cytokininy biorą udział w metabolizmie cukrowców [5, 11, 74,]. Również z obserwacji przeprowadzonych na kulturach tkanek tytoniu rosnących na różnych stężeniach kinetyny 10, 200 i 2000 $\mu g/l$ przy stałej koncentracji kwasu 3-indoliloctowego (0,2 mg/l) sacharozy (3%) wynikało, że gromadzenie skrobi w plastydach jest uzależnione od koncentracji kinetyny. Przy najmniejszym stężeniu kinetyny plastydy miały postać typowych amyloplastów wypełnionych skrobią (rys. 11). Przy wyższym stężeniu kinetyny, które stymulowało podziały komórkowe, skrobi w plastydach było znacznie mniej (rys. 12), a często nie obserwowano jej wcale. Wydaje się, że kumulowanie złogów skrobi w plastydach komórek tytoniu rosnących przy niskich stężeniach kinetyny ma związek z małą aktywnością metaboliczną i podziałową komórek. Skrobia w tym przypadku tworzyła się z cukrowca zawartego w pożywce, a nie była efektem fotosyntezy, ponieważ kultury rosły w miejscu zacienionym, a plastydy charakteryzowały się zredukowanym systemem błon [53]. Podobne zjawisko obserwo-



Rys. 7. Plastydy z izolowanego liścienia łubinu wyłożonego 6 dni na wodzie przy słabym świetle (14 lux). Widoczne ciała prolamellarne (PB) oraz tworzące się tylakoidy (T). Duże ziarna skrobi (S) oraz obszary nukleoidopodobne (strzałka). $\times 18\ 000$ [52]



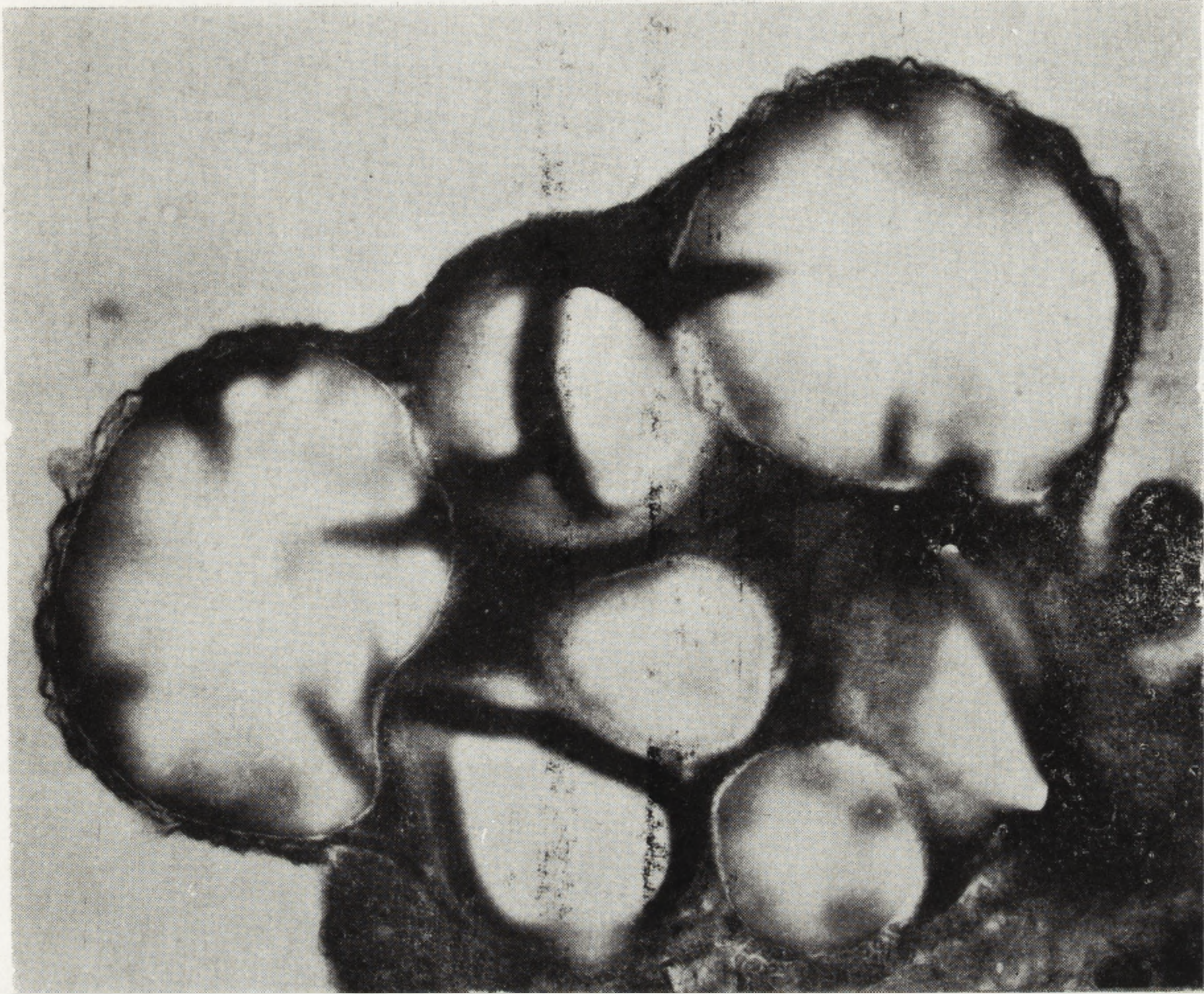
Rys. 8. Plastydy z izolowanego liścienia łubinu wystawionego przez 6 dni na wodnym roztworze kinetyny na słabe światło (14 lux). W porównaniu z kontrolą (rys. 7) widoczny dobrze rozwinięty system tylakoidalny, $\times 18\ 000$ [52]



Rys. 9. Fragment plastydu w izolowanym liścieniu łubinu inkubowanym w roztworze wodnym kinetyny w ciągu 6 dni na słabym świetle. Między błonami otoczki plastydowej widoczne jednobloniaste, kuliste ciała, $\times 24\ 000$ [52]



Rys. 10. Dezintegracja plastydu w izolowanym liścieniu łubinu inkubowanym w roztworze wodnym kinetyny w ciągu 12 dni na świetle. Widoczne silne rozdęcia tylakoidów. $\times 27\ 000$ [52]



Rys. 11. Chloroamyloplast z dużymi ziarnami skrobi w tkance tytoniu rosnącej na pożywce zawierającej niskie stężenie ($10 \mu\text{g/l}$) kinetyny, $\times 29\ 000$ [53].



Rys. 12. Plastyd o słabo zróżnicowanym systemie błon, z licznymi strukturami pęcherzykowymi, fitoferrytyną (F) i niewielkim ziarnie skrobi (S) w tkance tytoniu rosnącej na pożywce zawierającej wysokie stężenie ($2000 \mu\text{g/l}$) kinetyny, $\times 25\ 000$ [53].

wano w splątku mchu hodowanym w ciemności na pożywce zawierającej glukozę [50, 85]. Tasseron - de Jong i Veldstra [77], badając wpływ 6 - benzyloaminopuryny na wzrost liści u *Lemna minor* wykazali, że niższe stężenie tej cytokininy (10^{-6}) stymulowało wzrost liści, natomiast wysokie (10^{-4}) hamowało wzrost i powodowało jednocześnie znaczne nagromadzenie skrobi. Wpływ rozwijających się pączków jabłoni na rozkład skrobi można było zastąpić kinetyną u drzewek pozbawionych pąków [61].

Przeciwnie, Usciati i wsp. [80], jako jeden z pierwszych efektów działania 6 - benzyloaminopuryny, już po 4 godzinach pobudzającej śpiące pączki do rozwoju, obserwowali kumulację skrobi, co wskazywałoby na gromadzenie jej w komórkach o znacznej aktywności metabolicznej [12, 46, 79]. Nagromadzenie skrobi pod wpływem cytokinin obserwowano również w liściach pszenicy [48, 49], tumorach stolonów ziemniaka [70], eksplantatach rdzenia tytoniu [78], wierzchołkach korzeni pomidora [81], splątku i pączkach gametoforowych mchu [32]. Być może, że w doświadczeniach wyżej cytowanych gromadzenie skrobi było wynikiem ograniczenia przez cytokininy odprowadzania cukrów [1, 61], względnie efekt ten związany był z syntezą enzymów uczestniczących w tworzeniu skrobi [48, 49]. Ciekawą pracę wykazującą wpływ cytokinin na poziom skrobi, cukrów i różnych estrów, z zastosowaniem znakowanych prekursorów przedstawili dla krążków liściowych *Brassica pekiniensis* Berridge i Ralph [5]. Z badań ich wynikało, że kinetyna mobilizuje skrobię zapasową i zwiększa przepływ cukrowców potrzebnych do syntezy błon budujących struktury komórkowe i tworzenia ATP. Praca ta jak i szereg innych, omawiających przemieszczanie się cukrowców w różnych układach roślinnych [68, 84], potwierdza obserwacje cytologiczne, z których wynika ścisła zależność metabolizmu cukrowców od cytokinin dostarczonych z zewnątrz, których wpływ wyraża się zwiększoną mobilizacją skrobi. Obserwacje te są również zgodne z badaniami Gepstaina i Ilana [23] oraz Häggmana i Haapali [29], którzy wykazali, że cytokininy zwiększają aktywność amylazy. Według Sena i Sharmy [66], kinetyna i giberelina mogą kompensować nieobecność osi zarodka w izolowanych liścieniach *Merrenia aegyptia* w indukowaniu aktywności amylazy rozkładającej skrobię zapasową.

V. PODZIAŁ PLASTYDÓW

O stymulacji przez cytokininy podziałów plastydów w krążkach liści tytoniu wiadomo z badań Verbeek - Boasson [83], Boasson i Laetsch [8, 9] oraz Boasson i wsp. [10], a podziały izolowanych chloroplastów *Caulerpa* w obecności kinetyny obserwowali Giles i Sarafis [25], chociaż

Pssingham i Smith [62] licząc chloroplasty zmacerowanych komórek krążków liści szpinaku traktowanych trzema różnymi cytokininami nie potwierdzili tych obserwacji. Boasson i wsp. [10] tłumaczą wzmożoną replikację chloroplastów pod wpływem kinetyny zachowaniem lepszej „kondycji” przez komórkę w obecności tego związku, nie wykluczając jednocześnie możliwości bardziej specyficznego wpływu cytokininy na ten proces.

Autorzy dziękują Pani Prof. A. Szweykowskiej za krytyczne uwagi w przygotowywaniu niniejszego artykułu.

LITERATURA

- [1] ALLINGER V. P., MICHAEL G., MARTIN P., Einfluß von Cytokinin und anderen Wuchsstoffen auf die Stoffverlagerung in abgeschnittenen Blättern, *Flora*, **160**: 538-551, 1969.
- [2] BANERJI D., LALORAYA M. M., Chlorophyll formation in isolated pumpkin cotyledons in the presence of kinetin and chloramphenicol, *Plant Cell Physiol.*, **8**: 263-268, 1967.
- [3] BEALE S. I., Studies on the biosynthesis and metabolism of δ -aminolevulinic acid in *Chlorella*, *Plant Physiol.*, **48**: 316-319, 1971.
- [4] BERRIDGE M. V., RALPH R. K., LETHAM D. S., The binding of kinetin to plant ribosomes, *Biochem. J.*, **119**: 75-84, 1970.
- [5] BERRIDGE M. V., RALPH R. K., Kinetin and carbohydrate metabolism in chinese cabbage, *Plant Physiol.*, **47**: 562-567, 1971.
- [6] BHANDARI M. C., SEN D. N., Effects of cytokinins on seedling growth, excised cotyledons, chlorophylls and protein contents of *Citrullus lanatus* (Thumb.), *Biochem. Physiol. Pflanzen*, **162**: 481-488, 1971.
- [7] BOARDMAN N. K., Physical separation of the photosynthetic photochemical systems, *Ann. Rev. Plant Physiol.*, **21**: 115-140, 1970.
- [8] BOASSON R., LAETSCH W. M., Chloroplast replication and growth in tobacco, *Science*, **166**: 749-751, 1969.
- [9] — Stimulation of replication of mature tobacco chloroplasts by kinetin, *Amer. J. Bot.*, **57**: 734, 1970.
- [10] BOASSON R., BONNER J. J., LAETSCH W. M., Induction and regulation of chloroplast replication in mature tobacco leaf tissue, *Plant Physiol.*, **49**: 97-101, 1972.
- [11] BOOTHY D., WRIGHT S. T. C., Effects of kinetin and other plant growth regulators on starch degeneration, *Nature*, **196**: 389-390, 1962.
- [12] BROSSARD D., Évolution de la synthèse d'amidon durant l'organisation nodules puis des méristèmes primaires obtenus in vitro, a partir d'explants de moëlle de tabac. Comparaison avec le point végétatif de la plante entière, *C. R. Acad. Sci. Paris*, **271**: 56-58, 1970.
- [13] CHOCHŁOWA W. A., SWESZNIKOWA I. N., KUŁAJEWA O. N., Wlijanie fitogormonow na formirowanie struktury chloroplastow w izolowanych sem-jadolach tykwy, *Citoł.*, **13(9)**: 1074-1079, 1971.
- [14] CHOE H. T., THIMANN K. V., The senescence of isolated chloroplasts, *Planta*, **121**: 201-203, 1974.

- [15] DEVLIN R. M., Plant Physiology. Internat. Student Editions, Van Nostrand Reinhold Comp. New York, Cincinnati, London, Melbourne, 1969.
- [16] EL HINNAWY E., Effect of some growth regulating substances and carbohydrates on chlorophyll production in *Melilotus alba* (Desr.) callus tissue cultures, Z. Pflanzenphysiol., **74**(2): 95-105, 1974.
- [17] ELLIS R. J., Chloroplast ribosomes: stereospecificity of inhibition by chloramphenicol, Science, **163**: 477-478, 1969.
- [18] FARINEAU N., ROUSSAUX M. J., Influence de la 6-benzylaminopurine sur l'évolution des amyloplastés de cotylédons de pois cultivés in vitro, C. R. Acad. Sci. Paris, **271**: 188-191, 1970.
- [19] FEIERABEND J., Der Einfluß von cytokininen auf die Bildung von Photosyntheseenzymen in Roggenkeimlingen, Planta, **84**: 11-24, 1969.
- [20] FLETCHER R. A., McCULLAGH D., Cytokinin — induced chlorophyll formation in cucumber cotyledons, Planta **101**: 88-90, 1971 a.
- [21] — Benzyladenine as a regulator of chlorophyll synthesis in cucumber cotyledons, Can. J. Bot., **49**: 2197-2201, 1971 b.
- [22] FLETCHER R. A., TEO C., ALI A., Stimulation of chlorophyll synthesis in cucumber cotyledons by benzyladenine, Can. J. Bot., **51** (5): 937-939, 1973.
- [23] GEPSTAIN S. J., ILAN J. A., A promotive action of kinetin on amylase activity in cotyledons of *Phaseolus vulgaris*, Plant Cell Physiol., **11**: 819-822, 1970.
- [24] GIBSON K. D., LAVER W. G., NEUBERGER A., Initial stages in the biosynthesis of porphyrins. 2. The formation of δ -aminolevulinic acid from glycine and succinyl-coenzyme A by particles from chicken erythrocytes, Biochem. J., **70**: 71, 1958.
- [25] GILES K. L., SARAFIS V., Chloroplast survival and division in vitro, Nature New Biology, **236**(63): 56-57, 1972.
- [26] GOODENOUGH U., STAEHELIN A. L., Structural differentiation of stacked and unstacked chloroplast membranes. Freeze-etch electron microscopy of wild-type and mutant strains of *Chlamydomonas*, J. Cell Biol., **48**: 554-561, 1971.
- [27] GOODWIN T. W., Biosynthesis by chloroplasts, [w] Structure and function of chloroplasts (Red. M. Gibbs), Springer Verlag, Berlin, 1971, 215-276.
- [28] GYLDENHOLM A. O., WHATLEY F. R., The onset of photophosphorylation on chloroplasts isolated from developing bean leaves, New Phytol., **67**: 461-468, 1968.
- [29] HÄGGMAN J., HAAPALA H., The effect of 6-benzylaminopurine on the starch metabolism of *Stellaria media*, Physiol. Plant., **24**: 548-551, 1971.
- [30] HENNINGSEN K. W., Macromolecular physiology of plastids. VI. Changes in membrane structure associated with shifts in the absorption maxima of the chlorophyllous pigments, J. Cell Sci., **7**: 587-621, 1970.
- [31] HOVENKAMP - OBBEMA R., MOORMAN A., STEGWEE D., Aminolaevulinate dehydratase in greenings cells of *Euglena gracilis*. Z. Pflanzenphysiol., **72**: 277-286, 1974.
- [32] IDZIKOWSKA K., Ultrastruktura komórek podczas procesu indukcji gametoforów przez cytokininę u mchu *Ceratodon purpureus*, Zakład Botaniki Ogólnej, Poznań — praca doktorska, 1974.
- [33] JAKUSZKINA N. K., PUSZKINA G. P., Niekotoryje osobennosti wlijanija gibberelina i kinetina na sodierzhanie chlorofilla i na proces fotofosforilowania w prorostkach kukuruzy, Fiziol. Rast., **18**: 898-903, 1971.

- [34] KAUL K., SABHARWAL P. S., Effects of sucrose and kinetin on growth and chlorophyll synthesis in tobacco tissue cultures, *Plant Physiol.*, **47**: 691–695, 1971.
- [35] KAUL K., SABHARWAL P. S., Kinetin - induced changes in δ - aminolevulinic acid dehydratase of tobacco callus, *Plant Physiol.*, **54**: 644–648, 1974.
- [36] KAMÍNEK M., LUŠTINEC J., Reduced chlorophyll synthesis in cytokinin-autonomous strains of tobacco callus, *Z. Pflanzenphysiol.*, **73(1)**: 65–73, 1974.
- [37] KENDE H., The cytokinins, *Inter. Rev. Cytol.*, **31**: 301–338, 1971.
- [38] KIKUCHI G., KUMAR A., TALMADGE P., SHEMIN D., The enzymatic synthesis of δ - aminolevulinic acid, *J. Biol. Chem.*, **233**: 1214–1219, 1958.
- [39] KIRK J. T. O., ALLEN R. L., Dependence of chloroplast pigment synthesis on protein synthesis, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **21**: 523–530, 1965.
- [40] KIRK J. T. O., Studies on the dependence of chlorophyll synthesis on protein synthesis in *Euglena gracilis* together with a nomogram for determination of chlorophyll concentration, *Planta*, **78**: 200–207, 1968.
- [41] — Chloroplast structure and biogenesis, *Ann. Rev. Biochem.*, **40**: 161–196, 1971.
- [42] KNYPL J. S., Wpływ retardantów wzrostu, kumaryny, gibereliny i cytokinin na kiełkowanie nasion oraz syntezę i rozpad chlorofilu, białek i RNA w liściach i liścieniach, Uniwersytet Łódzki — praca habilitacyjna, 1970.
- [43] KUŁAJEWA O. N., ROMANKO R. G., Działanie 6 - benzilaminopurina na izolowane chloroplasty, *Dokł. Akad. Nauk SSR*, **177(2)**: 464–467, 1967.
- [44] KUŁAJEWA O. N., JERKIEJEW M. I., CHOCHŁOWA W. A., SWESZNIKOWA I. I., Gormonalna regulacja fizjologicznych procesów w izolowanych semjadłach tykwy, *Fiziol. Rast.*, **19(5)**: 1023–1033, 1972.
- [45] LEGOCKA J., SZWEYKOWSKA A., Effect of kinetin on nucleic acid synthesis in senescing and young leaves in *Brassica oleracea* L. var *gnogylodes* L., *Biochem. Physiol. Pflanzen*, w druku.
- [46] MARINOS N. G., Multifunctional plastids in the meristematic region of potato tuber buds, *J. Ultrastr. Res.*, **17**: 91–113, 1967.
- [47] MIKUŁOWICZ T. P., CHOCHŁOWA V. A., KUŁAJEWA O. N., SWESZNIKOWA I. N., Wpływ 6 - benzilaminopurina na izolowane semjadła tykwy, *Fiziol. Rast.*, **18(1)**: 98–106, 1971.
- [48] MITTELHEUSER C. J., VAN STEVENICK R. F. M., The ultrastructure of wheat leaves. I. Changes due to natural senescence and the effects of kinetin and ABA on detached leaves incubated in the dark, *Protoplasma*, **73**: 239–252, 1971.
- [49] — The ultrastructure of wheat leaves. II. The effects of kinetin and ABA on detached leaves incubated in the light, *Protoplasma*, **73**: 253–262, 1971.
- [50] MŁODZIANOWSKI F., WOŻNY A., The variability of plastid structure in *Funaria hygrometrica* as affected by environmental conditions, *Folia Histochem. Cytochem.*, **10(1)**: 51–56, 1972.
- [51] MŁODZIANOWSKI F., Wpływ cytokinin na strukturę organelli komórkowych, Uniwersytet im. A. Mickiewicza, Poznań — praca habilitacyjna, 1974.
- [52] MŁODZIANOWSKI F., GEZELA E., Effect of kinetin and chloramphenicol on chlorophyll synthesis and chloroplast development in detached lupin cotyledons under low light intensity, *Acta Soc. Bot. Pol.*, **43(1)**: 149–164, 1974.
- [53] MŁODZIANOWSKI F., BRELINSKA R., Ultrastructure of *Nicotiana tabacum* tissue grown on different kinetin concentrations, praca przyg. do druku.
- [54] MÜHLETHALER K., The ultrastructure of plastids, [w] Structure and function of chloroplasts (Red. M. Gibbs) Springer Verlag, Berlin 1971, 9–34.

- [55] OCHIAI - YANAGI S., MATSUKA M., HASE E., Studies on chlorophyll formation in *Chlorella protothecoides*. III. Effects of chloramphenicol, cycloheximide and ethionine on chlorophyll formation, *Plant Cell Physiol.*, **14**: 299-305, 1973.
- [56] OLSZEWSKA M., Études autoradiographiques de l'influence de la kinétine sur l'incorporation de l'adénine dans les cellules du méristème racinaire d'*Allium cepa*, *Exptl. Cell Res.*, **16**: 192-202, 1959 a.
- [57] — Études autoradiographiques de l'influence de la kinétine sur la synthèse des acides nucléiques et des protéines, *Acta Soc. Bot. Pol.*, **28(1)**: 175-183, 1959 b.
- [58] OSBORNE D. J., Effect of kinetin on protein and nucleic acid metabolism in *Xanthium leaves* during senescence, *Plant Physiol.*, **37**: 595-602, 1962.
- [59] PARK R. B., SANE P. V., Distribution of function and structure in chloroplast lamellae, *Ann. Rev. Plant Physiol.*, **22**: 395-430, 1971.
- [60] PHUNG-NHU-HUNG S., LACOURLY A., SARDA C., Etude de l'évolution en chloroplastes des plastes etiole's de'orge. I. Structure examinée par cryodécoupage, *Z. Pflanzenphysiol.*, **62**: 1-16, 1970.
- [61] PIENIAŻEK J., Rola regulatorów wzrostu w spoczynku zimowym jabłoni, Instytut Sadownictwa, Skierniewice, 1966.
- [62] POSSINGHAM J. V. SMITH J. W., Factors affecting chloroplast replication in spinach, *J. Exp. Bot.*, **23(77)**: 1050-1059, 1972.
- [63] RATAJCZAK W., SZWEYKOWSKA A., Bud inducing activity of kinetin and its effect on the synthesis and differentiation of proteins in the moss protonema, *Bull. Soc. Amis Sci.*, Poznań, w druku.
- [64] — Bud inducing effect of kinetin and the levels of nucleic acids and proteins in cultures of moss gametophytes, *Bull. Soc. Amis Sci.*, Poznań D, **14**: 25-31, 1973.
- [65] REBEIZ C. A., CASTELFRANCO P. A., Protochlorophyll and chlorophyll biosynthesis in cell-free systems from higher plants, *Ann. Rev. Plant Physiol.*, **24**: 129-172, 1973.
- [66] SEN D. N., SHARMA K. D., Role of cytokinins and certain growth regulators on excised cotyledons of *Merremia aegyptia* (Linn.) Urban., *Biochem. Physiol. Pflanzen*, **163**: 556-561, 1972.
- [67] SHINDY W. W., WEAVER R. J., Export of photosynthate affected when leaves are pretreated with growth substances, *Nature*, **227**: 301-302, 1970.
- [68] SHINDY W. W., KLIEWER W. M., WEAVER R. J., Benzyladenine-induced movement of ¹⁴C-labeled photosynthate into roots of *Vitis vinifera*, *Plant Physiol.*, **51**: 345-349, 1973.
- [69] SKOOG F., STRONG F. M., MILLER C. O., Cytokinins, *Science*, **148**: 532-533, 1965.
- [70] SMITH O. E., PALMER C. E., Cytokinin-induced tuber formation on stolons of *Solanum tuberosum*, *Physiol. Plant.*, **23**: 599-606, 1970.
- [71] SPYCHAŁA M., SCHNEIDER J., SZWEYKOWSKA A., Relationship between formation of gametophore buds in the protonema of mosses and increase in ribonuclease activity, *Acta Soc. Bot. Pol.*, w druku.
- [72] STETLER D. A., LAETSCH W. M., Kinetin-induced chloroplast maturation in cultures of tobacco tissue, *Science*, **149**: 1387-1388, 1965.
- [73] STRZAŁKA K., WIĘCKOWSKI S., Autonomia genetyczna chloroplastów w świetle badań biochemicznych, *Post. Biol. Kom.*, **1(2)**: 193-219, 1974.
- [74] SUGIURA M., UMEMURA K., OOTA Y., The effect of kinetin on protein level of tobacco leaf discs, *Plant Physiol.*, **15**: 457-464, 1962.

- [75] SUGIURA M., Promotion of chlorophyll synthesis by kinetin, *Bot. Mag. Tokyo*, **76**: 309–310, 1963.
- [76] SZWEYKOWSKA A., RATAJCZAK W., SCHNEIDER J., Studies on the activity of kinetin in cultures of *Funaria hygrometrica*. I. Bud-inducing activity of kinetin and protein synthesis, *Acta Soc. Bot. Pol.*, **37**: 145–155, 1968.
- [77] TASSERON - de JONG J. G., VELDSTRA H., Investigation on cytokinins. I. Effect of 6-benzylaminopurine on growth and starch content of *Lemna minor*, *Physiol. Plant.*, **24**: 235–238, 1971.
- [78] TETLEY R. M., IKUMA H., Effects of plant growth factors upon the starch content in cultured tobacco pith explants, *Plant Physiol.*, **46** (supl.), 1970.
- [79] THORPE T. A., MURASHIGE T., Some histochemical changes underlying shoot initiation in tobacco callus cultures *Can. J. Bot.*, **48**: 277–285, 1970.
- [80] USCIATI M., CODACCIONI M., GUERN J., Early cytological and biochemical events induced by a 6-benzylaminopurine application on inhibited axillary buds of *Cicer arietinum* plants, *J. Exp. Bot.*, **23(77)**: 1009–1020, 1972.
- [81] VASIL I. K., Morphogenetic, histochemical and ultrastructural effects of plant growth substances in vitro, *Biochem. Physiol. Pflanzen*, **164**: 58–71, 1973.
- [82] VASQUEZ D., Uptake and binding of chloramphenicol by sensitive and resistant organism, *Nature*, **203**: 257–258, 1964.
- [83] VERBEEK - BOASSON R., Thesis, State University, Groningen, 1969.
- [84] WESOŁOWSKA M., Cytochemiczne i ultrastrukturalne badania materiałów zapasowych w izolowanych liścieniach łubinu w czasie ich rozwoju na świetle z uwzględnieniem wpływu kinetyny, Zakład Botaniki Ogólnej, Poznań — praca magisterska, 1972.
- [85] WOŻNY A., MŁODZIANOWSKI F., Cytochemical studies on germinating spores and dark grown protonema of *Funaria hygrometrica*, *Bull. Soc. Amis Sci.*, Poznań **12/13**: 3–12, 1971/72.
- [86] WOŻNY A., SZWEYKOWSKA A., Effect of cytokinins and antibiotics on chloroplast development in cotyledons of *Cucumis sativus*, *Biochem. Physiol. Pflanzen*, w druku.
- [87] WOŻNY A., Wpływ cytokinin na rozwój plastydów w splotku *Ceratodon purpureus* (L. ap. Hedw.) Brid. i w liścieniach ogórka (*Cucumis sativus* L. cv. Monastyrski), Zakład Botaniki Ogólnej, Poznań — praca doktorska, 1975.
- [88] ZURZYCKI J., Wpływ światła na strukturę aparatu fotosyntetycznego, *Post. Biochem.*, **13(2)**: 233–260, 1967.

Otrzymano: maj 1975.

Przyjęto: 23 maja 1975.

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

DEGENERACJA CHLOROPLASTÓW I MOŻLIWOŚĆ JEJ ODWRACANIA

Fortunat MŁODZIANOWSKI i Adam WOŹNY

Zakład Botaniki Ogólnej Instytutu Biologii Uniwersytetu A. Mickiewicza w Poznaniu

Streszczenie. Według poglądu Frey - Wysslinga i wsp. [18] przekształcanie chloroplastów w chromoplasty jest nieodwracalnym procesem degeneracji (starzenia się). Przytoczono i omówiono szereg przykładów na możliwość nie tylko zahamowania, ale i odwrócenia tego procesu i tym samym dostarczono szeregu argumentów na poparcie starej hipotezy Schimpera [74] o wzajemnym przekształcaniu się różnych form plastydów, a więc i o możliwości przeróżnicowania się chromoplastów w chloroplasty.

W regulowaniu procesu starzenia się plastydów znaczną rolę odgrywa jądro komórkowe i cytoplazmatyczna synteza białka. Substancje wzrostowe, a szczególnie cytokininy, wykazują zdolność hamowania i odwracania procesu degeneracji chloroplastów.

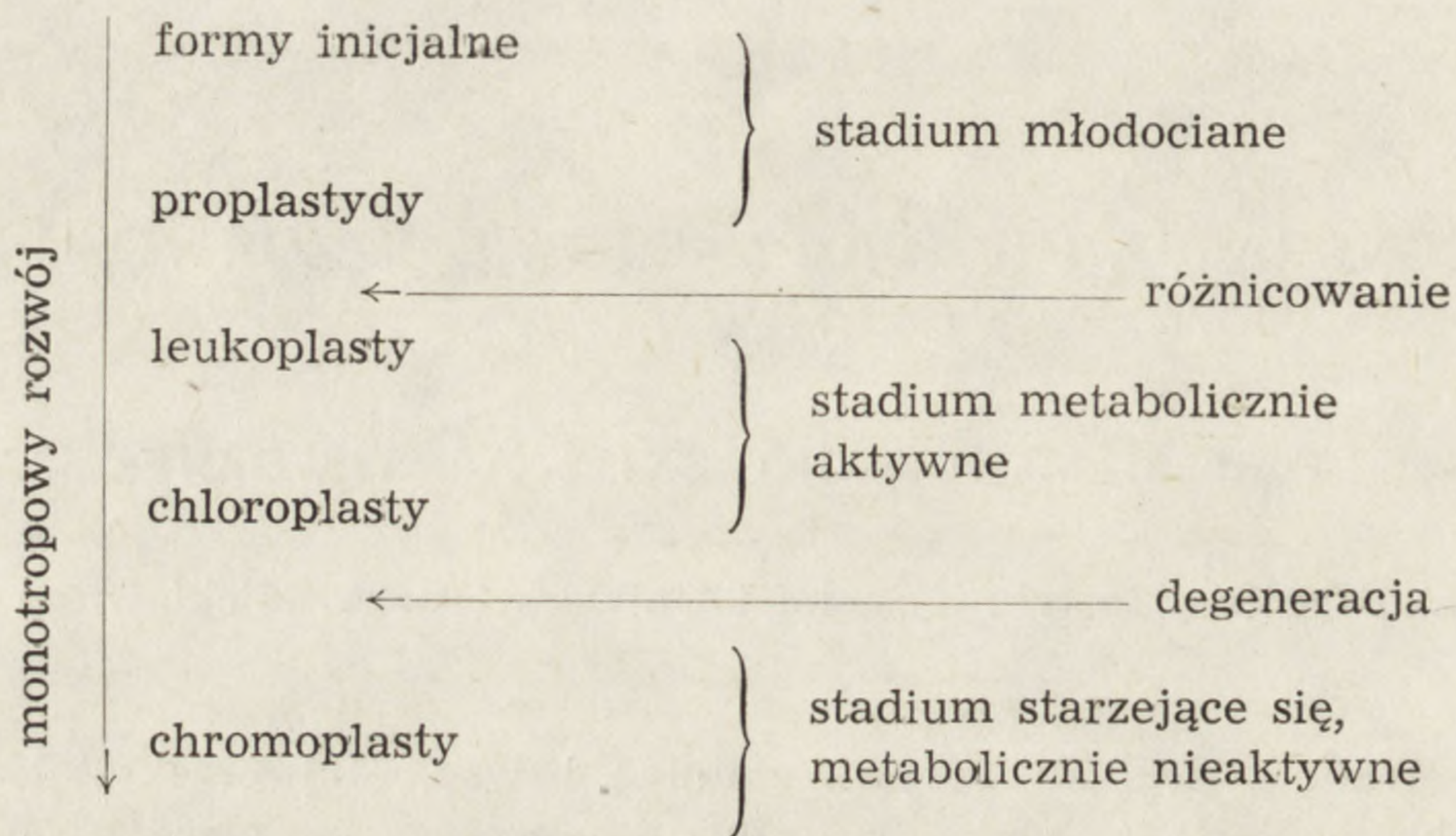
Przedstawiono poglądy na mechanizm indukowania starzenia się plastydów, jak i jego hamowania cytokininami.

1. MONOTROPOWY A CYKLICZNY ROZWÓJ PLASTYDÓW

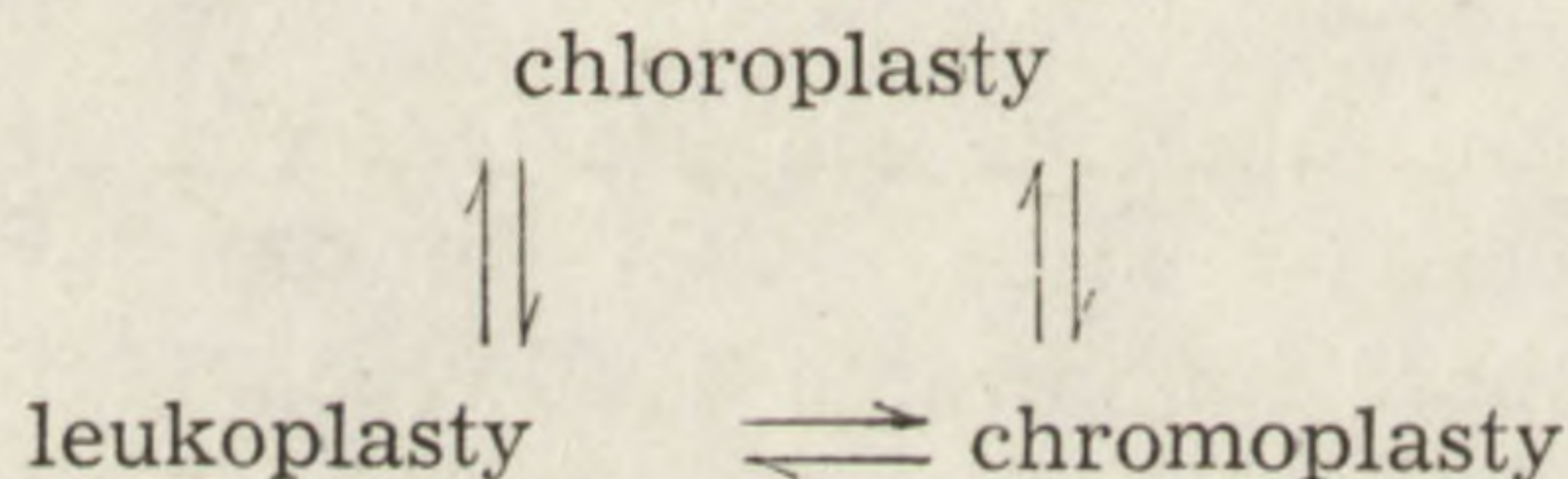
Według poglądu Frey - Wysslinga i wsp. [18], rozwój plastydów zachodzi podobnie jak wszystkich biologicznych obiektów i organelli komórkowych (z wyjątkiem jądra) od form młodocianych poprzez dojrzałe do starzejących, a więc w jednym kierunku. Ze schematu (rys. 1), który jest ilustracją tego poglądu o tzw. monotropowym rozwoju plastydów wynika, że przekształcanie chloroplastów w chromoplasty jest procesem degeneracji, a więc przejściem form metabolicznie aktywnych w formy nieodwracalnie pasywne.

Już jednak w roku 1885 Schimper [74] uważał, że różne rodzaje plastydów mogą wzajemnie przekształcać się w sposób przedstawiony na rys. 2. Zgodnie z tym poglądem o cyklicznym rozwoju plastydów, chromoplasty mogą przekształcać się również w chloroplasty.

Jakie można zająć stanowisko wobec tych przeciwstawnych poglądów na możliwość przeróżnicowania się chromoplastów w chloroplasty? Jest to jedno z podstawowych pytań, na które ma odpowiedzieć niniejszy artykuł.



Rys. 1. Monotropowy rozwój plastydów wg Frey - Wysslinga [18]



Rys. 2. Cykliczny rozwój plastydów, wg Schimpera [74]

2. PROCES PRZEKSZTAŁCANIA CHLOROPLASTÓW W CHROMOPLASTY

W procesie przekształcania chloroplastów w chromoplasty, będącym według Frey - Wysslinga i wsp. [18] degeneracją, zachodzi szereg zmian zarówno w składzie chemicznym, jak i w strukturze plastydów. Zjawisko to traktujemy w tym artykule szeroko, jako zachodzące zarówno w naturze, a więc w czasie normalnie przebiegającej ontogenezy, np. w żółknących jesienią liściach, jak i w wyniku działania czynników szkodliwych, np. różnego rodzaju infekcji prowadzących do stopniowego obumierania organów. Degenerację chloroplastów można również indukować w doświadczeniu, np. przez odcięcie liścia czy jego fragmentów i inkubowanie ich w ciemności w wodzie.

W literaturze termin „degeneracja chloroplastów” stosowany jest często zamiennie z terminem „starzenie się chloroplastów”. Również w tym artykule, niezależnie od warunków czy czynników prowadzących

do metamorfozy chloroplastów w chromoplasty, proces ten będziemy określać tymi pojęciami zamiennie.

Podczas degeneracji chloroplastów obniża się stopniowo poziom chlorofilu, białka i kwasów nukleinowych [6, 14, 76], choć DNA plastydowy jest dość stabilny i występuje w chromoplastach [25]. Najbardziej dla chloroplastów charakterystyczne struktury — tylakoidy, w których skupiony jest chlorofil, rozpadają się, a plastydy zmniejszają w czasie degeneracji znacznie swoją objętość. Profile przekrojów chromoplastów są często owalne i koliste w porównaniu z bardziej wrzecionowatymi profilami chloroplastów. Z procesem starzenia się chloroplastów związane jest tworzenie się dużych, sudano- i osmofilnych globul, zwanych plastoglobulami [38], w których kumulowane są produkty rozpadu tylakoidów [38, 40, 46]. W otrzymanej frakcji plastoglobul szpinaku wykryto różne plastochinony i karotenoidy [40, 41]. Chromoplasty zawierające duże plastoglobule są charakterystyczne dla żółtych liści ([13, 46, 86], rys. 5), ale występują również w owocach [7, 84], kwiatach [16, 33, 42–44] i u glonów [30].

Plastoglobule występują w większości chromoplastów, lecz mogą im towarzyszyć jeszcze inne struktury kumulujące karotenoidy [78], albo w wyniku odkładania karotenoidów tworzą się duże formy krystaliczne [1, 19, 22–24, 35, 72].

W degenerujących chloroplastach zanika także skrobia, a w pewnych przypadkach, jak np. w liściach lnu [9] i topoli [60] zainfekowanych grzybem, w miejscu skrobi żywiciela pojawiają się ziarnistości przypominające ziarna glikogenu, występujące normalnie jako materiał zapasowy u zwierząt i grzybów.

Matriks degenerujących chloroplastów zawiera czasami fitoferrytynę [54, 57], która jest kompleksem żelazowo-białkowym. Żelazo występuje w postaci fitoferrytyny zazwyczaj w proplastydach i zużywane jest do budowy aparatu fotosyntetycznego [26]. Wydaje się, że w czasie rozkładu tego aparatu żelazo może być również odkładane w takiej formie.

W czasie starzenia się liści obserwuje się stopniową redukcję liczby rybosomów plastydowych [11, 55, 57].

Przekształcanie się chloroplastów w chromoplasty jest procesem przebiegającym bardzo różnorodnie [57, 58, 59]. Należy podkreślić, że chromoplasty tworzą się nie tylko z chloroplastów, ale również bezpośrednio z proplastydów czy leukoplastów [17, 64]. Bezpośrednio z leukoplastów różnicują się np. chromoplasty owoców dyni w warunkach naturalnych. Chromoplasty o podobnej strukturze otrzymano z leukoplastów w izolowanych liścieniach ogórka inkubując je na świetle w chlorku (2 - chloroetylo - trójmetyloamoniowym (CCC)), [31, 50].

3. RODZAJE CHROMOPLASTÓW

Zdaniem Sittego [78,], chromoplasty należą do najbardziej heterogenicznej grupy plastydów. Autor ten niezależnie od pochodzenia chromoplastów, lecz na podstawie struktur kumulujących karotenoidy, wyróżnił 5 różnych typów tych plastydów:

a) Chromoplasty globularne, które gromadzą karotenoidy w plastoglobulach. Ten typ chromoplastów jest bardzo powszechny, scharakteryzowano go już szczegółowo wyżej oraz wyróżniono we wcześniejszych klasyfikacjach [17]. Do tej grupy chromoplastów zaliczono ostatnio również ciekawe formy tworzące najpierw plastoglobule, które następnie przekształcają się w całości w kryształy [78].

b) Chromoplasty błoniaste („Membranöse Chromoplasten”), które gromadzą karotenoidy w strukturach mielinopodobnych. Tego typu plastidy występują u narcyza [34, 45, 62], u pewnych form dyni [20], czasami u pomidorów [72], w epidermie kolb obrazkowatych [75], jak i w owocach papryki [80].

c) Chromoplasty tubularne (te plastidy określane były dotąd jako zawierające filamenty czy włókniste struktury [17, 64]. Zdaniem Sittego [78], dawniejsze określenia powinny być zastąpione nowymi, ponieważ okazało się, że filamenty i włókna są tubulami). Karotenoidy zlokalizowane są w wydłużonych, nierozgałęzionych tubulach, które na przekrojach poprzecznych są kanciaste, o średnicy ok. 15 μm . Ten typ chromoplastów występuje w owocach papryki [16, 29, 80] i róży ([91] cyt. za [78]) oraz w płatkach kwiatów ogórka [79].

d) Chromoplasty siatkowato - tubularne („Reticulotubulöse Chromoplasten”). Pigmenty występują w delikatnych, falistych, czasami rozgałęziających się, lecz nie przebiegających równolegle tubulach. Dotąd opisano tylko jeden przykład w kolbie *Typhonium divaricatum* [75].

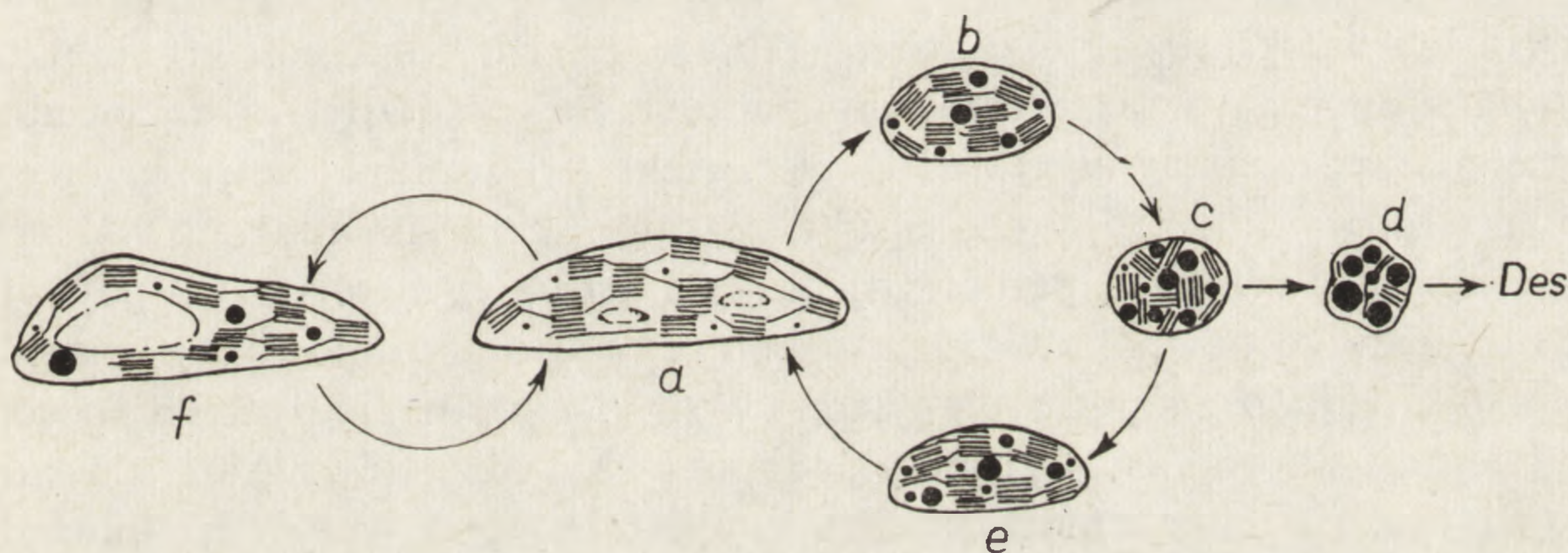
e) Chromoplasty krystaliczne, w których przez intensywną akumulację określonego pigmentu (β - karoten, likopen), dochodzi do wytworzenia dużych kryształów: płytek, igiełek, form śrubowatych. Przykładami na występowanie tych plastydów mogą być korzenie różnych odmian hodowlanych marchwi [1, 3, 19, 22, 90], owoce pomidorów [2, 23, 24, 72] i liścienie ogórka [50].

4. ODWRACANIE WZGLĘDNIE HAMOWANIE DEGENERACJI CHLOROPLASTÓW

W ostatnich latach dostarczono szereg przykładów na możliwość nie tylko hamowania procesu degeneracji chloroplastów, ale również na możliwość jego odwracania. Powtórne zazielenianie się chromoplastów obserwowano jak dotąd jedynie w globularnym i krystalicznym typie,

natomiast czy pozostałe, wymienione w poprzednim rozdziale rodzaje chromoplastów wykazują taką zdolność, będzie można stwierdzić dopiero w przyszłych badaniach [12].

Przykładem powtórnego zazieleniania się liści, a jednocześnie przekształcania się chromoplastów w chloroplasty może być tytoń. Żółknące i więdnące na łodydze liście tytoniu zazieleniają się powtórnie i uzyskują turgor, gdy ponad nimi zostanie odcięty pęd, a cała masa korzeni zaopatrzyje pozostałe liście w wodę, sole mineralne i pewne hormony [46]. Warunkiem jednak odwrócenia procesu degeneracji było nieprzekroczenie przez postępujące starzenie średniej fazy żółknięcia, w której plastydy obok dużych plastoglobul miały jeszcze częściowo zachowane grana. Chloroplasty o bardziej zaawansowanym stopniu degeneracji nie były już zdolne odtworzyć tylakoidów (rys. 3). Pierwszym objawem powtórnego



Rys. 3. Odnawianie struktury chloroplastów w powtórnie zazieleniających się liściach tytoniu. Chloroplast liścia zielonego (a), jasnozielonego (b) i żółknącego (c), którego stadium degeneracji pozwalało jeszcze na pełne odbudowanie chloroplastu. Plastydy o bardziej zaawansowanym stopniu degeneracji (d) nie były już zdolne odtworzyć tylakoidów. Chloroplasty liści powtórnie zazieleniających się (f) miały pod pewnymi względami struktury doskonalsze niż chloroplasty liści zielonych, będących materiałem wyjściowym w doświadczeniu (a). Ljubešić [46]

go zazieleniania się liści tytoniu na poziomie plastydów był wzrost ich objętości na skutek odtwarzania matriks. Następnie stosy gran połączone zostały utworzonymi na nowo tylakoidami stromy. Procesom tym towarzyszyła stopniowa redukcja dużych plastoglobul, choć część z nich pozostała, i tym chloroplasty powtórnie zazieleniających się liści różniły się od normalnych. Poza tym, w powtórnie zazieleniających się liściach chlorofilu i chloroplastów było średnio na komórkę nawet więcej niż w normalnie wyrosniętych liściach roślin zielonych. W odtworzonych chloroplastach było również więcej skrobi. Poszczególne etapy degeneracji i odbudowy chloroplastów przedstawione zostały na rys. 4 i 5.

- Swiesznikowa i wsp. [82] działając jedną z cytokinin (6-benzylo-

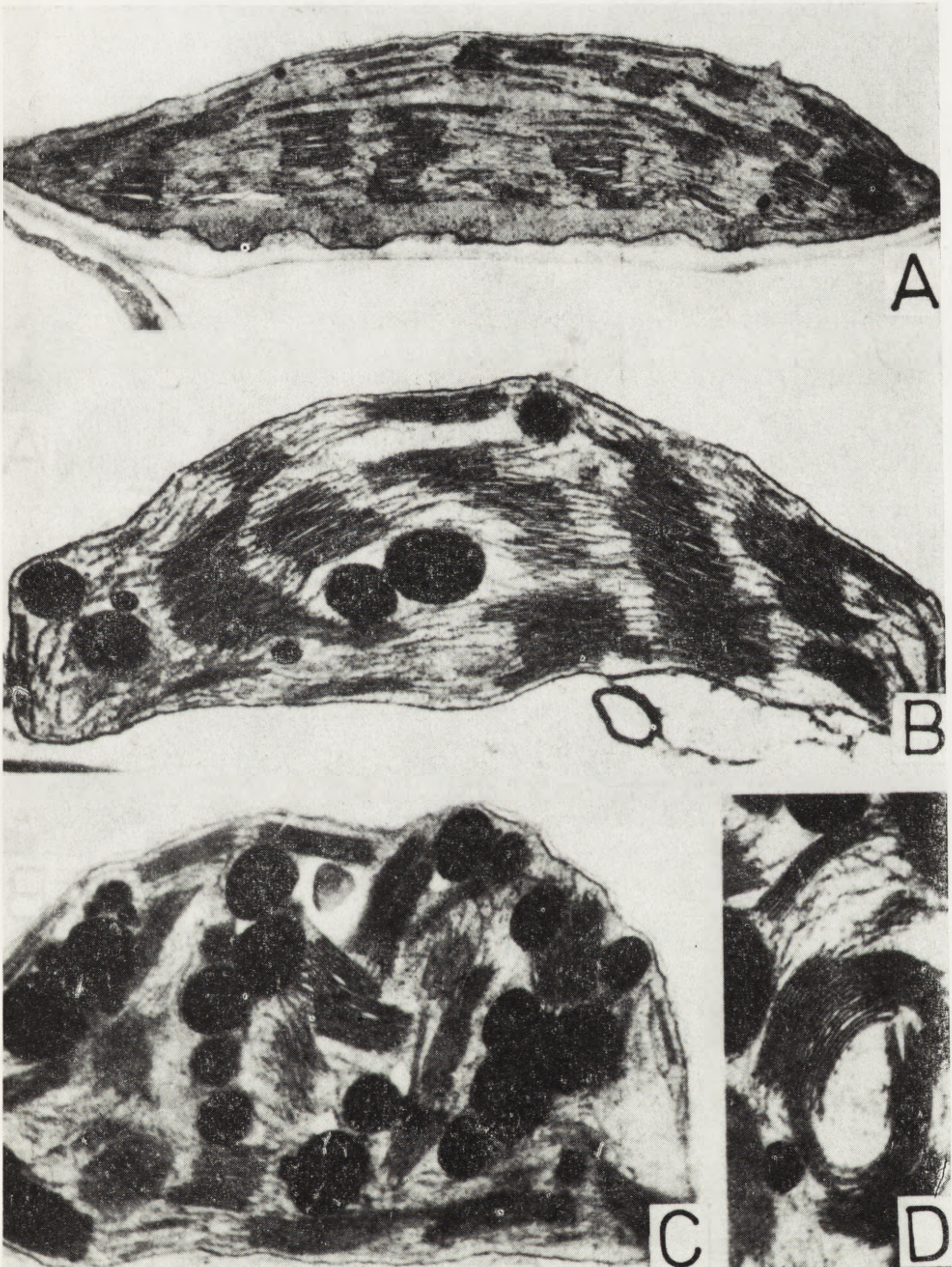
aminopuryna) na żółte liście tytoniu obserwowali przekształcanie się w chloroplasty chromoplastów, które zawierały oprócz plastoglobul jedynie ślady błon tylakoidalnych.

Cytokininom przypisuje się zdolność stymulowania resyntezy materiałów tworzących struktury błoniaste chloroplastów, a ultrastrukturalne zmiany potwierdzające ten pogląd opisano w starzejących się liściach pszenicy [51, 52, 77], owsa [11], rzepienia i bobu [14], kapusty brukselki [10], kalarepy [57], pietruszki [59], cykorii [58], jak również w powtórnie zazieleniających się pochwach okwiatu *Zantedeschia aetiopica* [66].

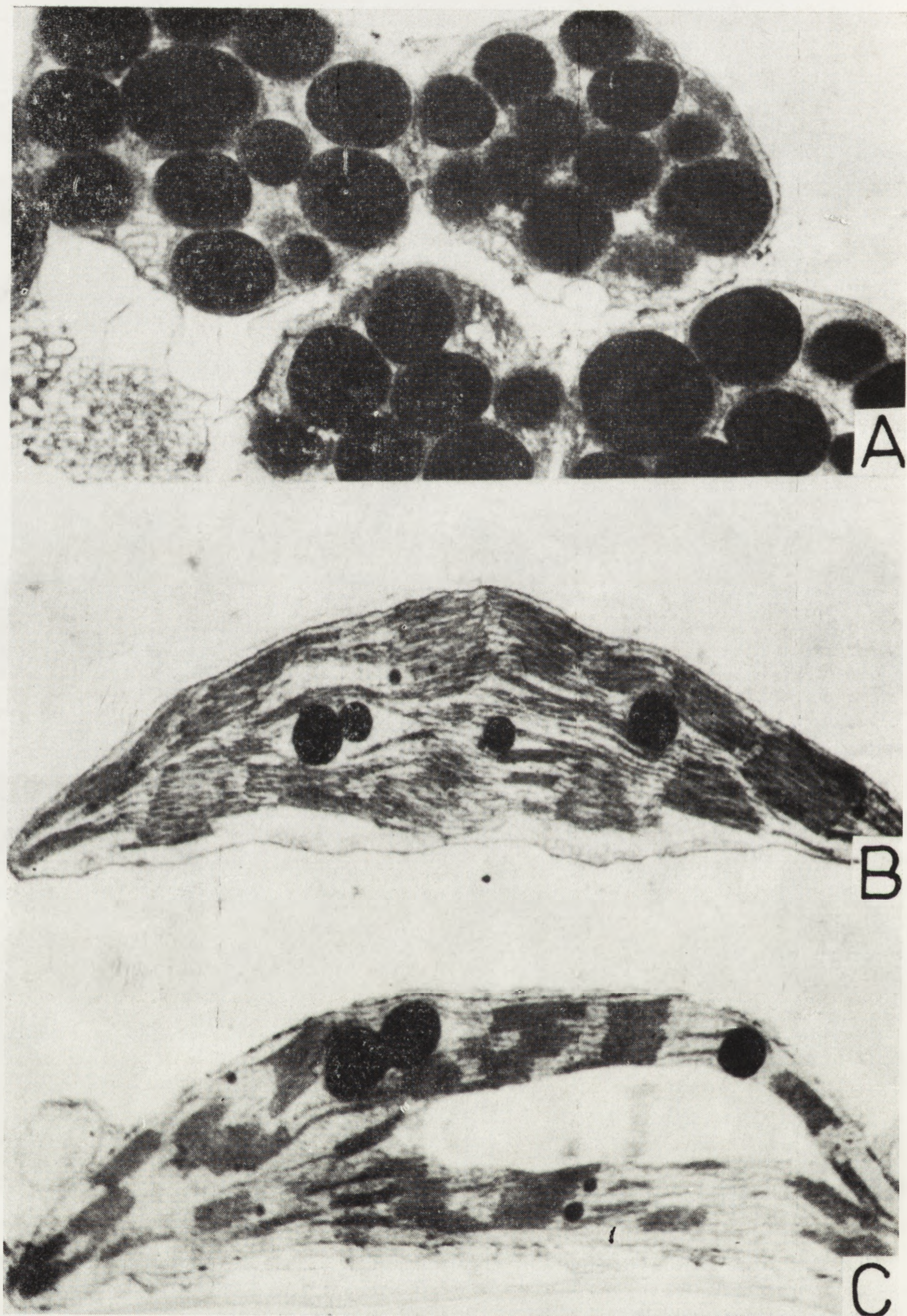
Badania procesu degeneracji chloroplastów i możliwości jego odwrócenia prowadzi się najczęściej na odciętych liściach. Stosując ten model doświadczalny wybrano pewne rośliny (pietruszka, kalarepa, cykoria), które różniły się modelem degeneracji chloroplastów, ale jednocześnie były „czule” na kinetynę [57–59]. Chloroplasty pietruszki, kalarepy i cykorii w czasie indukowanej odcięciem liści degeneracji przekształcały się w chromoplasty globularne, jednak sposób rozkładu tylakoidów wymienionych gatunków różnił się znacznie. Pewne etapy tej różnorodnej degeneracji przedstawia rys 6. U pietruszki (A) zanikały najpierw tylakoidy stromy, u kalarepy (B) zanikały grana, a na ich miejscu tworzyły się długie, równoległe przebiegające tylakoidy, u cykorii (C) pojawiły się najpierw gęsto upakowane grana olbrzymie o zredukowanej grubości błon. Jak widać z załączonych rysunków (rys. 6–8), niezależnie od sposobu degeneracji chloroplastów, kinetyna zapobiegała rozpadowi gran, a u kalarepy i cykorii można mówić o ich zwiększonej pod wpływem kinetyny rozbudowie.

Wiadomo jednak, że liście nie wszystkich odmian roślin reagują na egzogenne cytokininy opóźnieniem starzenia. Starzenie liści pewnych rodzajów roślin, jak np. *Taraxacum*, *Rumex* i *Tropaeolum* jest w większym stopniu hamowane przez kwas giberelowy niż przez cytokininy. Auksyny są raczej mało efektywne w hamowaniu starzenia u roślin zielnych, natomiast wykazują znaczną aktywność u roślin drzewiastych [88].

Transformację chromoplastów typu globularnego w chloroplasty obserwowano również w owocach [12, 48, 85]. Devidé i Ljubešić [12] analizowali szczegółowo w mikroskopie świetlnym i elektronowym poszczególne etapy tworzenia się chloroplastów z chromoplastów globularnych w podepidermalnej warstwie owoców dyni (rys. 9 i 10). Chromoplasty dojrzałych owoców dyni miały kształt owalny o średnicy 3–4 μm i wypełnione były plastoglobulami o średnicy 200–500 μm . Między plastoglobulami występowały tylko fragmenty spęczniałych tylakoidów, natomiast rybosomów plastydowych nie można było zidentyfikować. W czasie powtórnego zazieleniania się owoców po ich naświetleniu (1000–3000 lx)

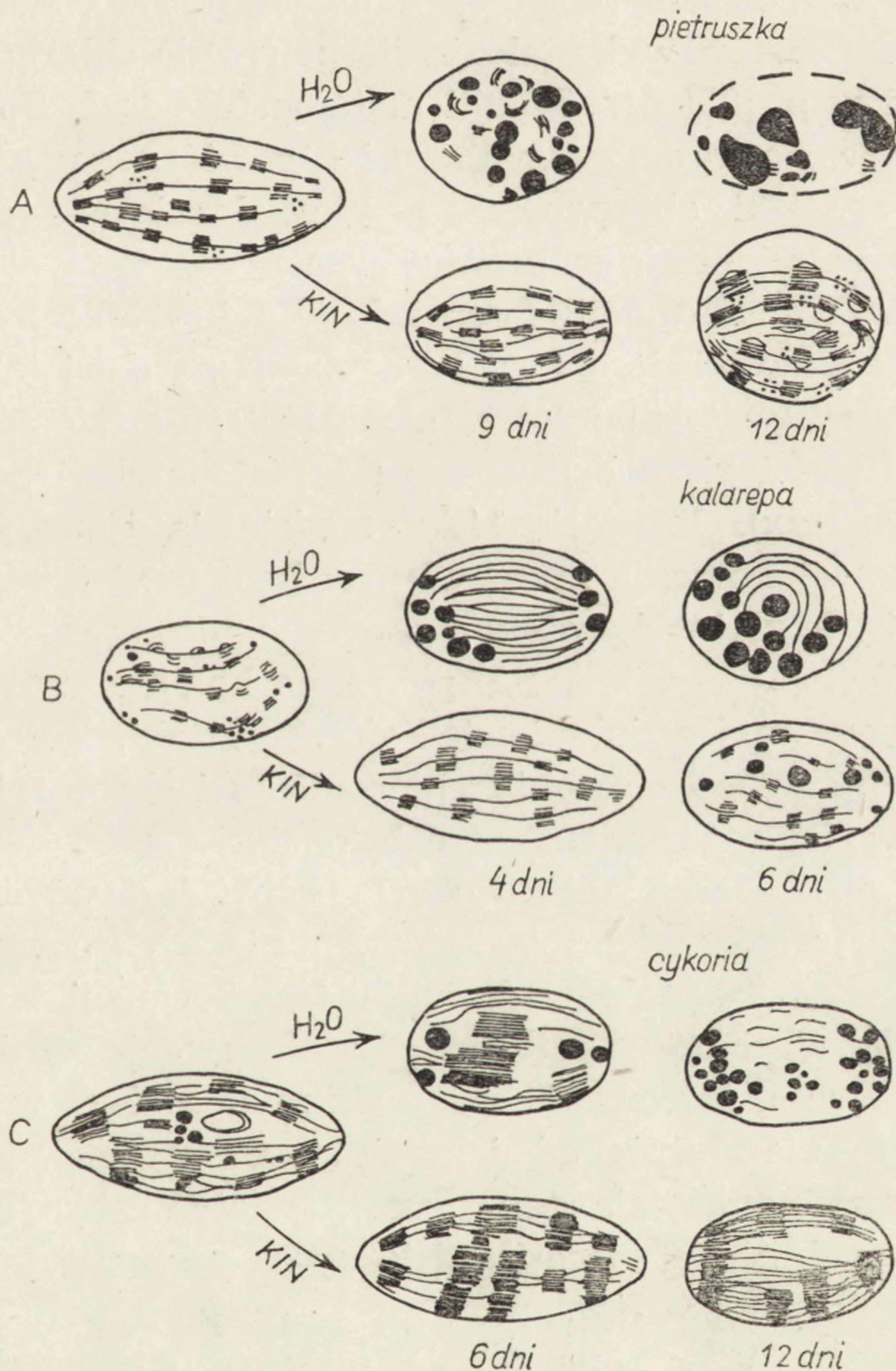


Rys. 4. Różne stadia degeneracji chloroplastu w czasie żółknięcia liści tytoniu
 A — Chloroplast zielonego liścia, $\times 10\ 000$. B — Chloroplast liścia będącego we wczesnej fazie żółknięcia. Widoczne zmniejszenie objętości plastydu kosztem stromy i powiększające się plastoglobule, $\times 28\ 000$. C — Chloroplast liścia będącego w średniej fazie żółknięcia. Objętość plastydu zmniejszyła się jeszcze bardziej, natomiast wzrosła liczba i objętość plastoglobul. Grana są rozrzucone i wygięte (D) na skutek zaniku tylakoidów stromy, $\times 27\ 000$. Ljubešić [11]



Rys. 5. A – Późne (nieodwracalne) stadium degeneracji chloroplastu — chromoplasty globularne w liściach tytoniu wypełnione dużymi plastoglobulami, między którymi widoczne są ślady pojedynczych tylakoidów, $\times 27\,000$. B – Chloroplast powtórnie zazieleniającego się liścia, $\times 24\,500$. C – Chloroplast liścia powtórnie zazielenionego, który tym głównie różni się od chloroplastów liścia zielonej rośliny, że zawiera duże plastoglobule $\times 20\,500$. Ljubešić [46]

obserwowano pojawienie się rybosomów i stopniowe rekonstruowanie tylakoidów z pęcherzyków pojawiających się w matriks. Pęcherzyki te tworzyły się z resztek tylakoidów chromoplastu, przez odsznurowywanie się wewnętrznej błony otoczki chromoplastu lub też jako wynik inwagiacji „wakuol plastydowych” występujących w pewnych chromoplastach. Tylakoidy początkowo były spęczniałe, lecz później spłaszczały się i tworzyły normalne grana. Pod koniec tego procesu ultrastruktura chloro-



Rys. 6. Różne typy degeneracji chloroplastów oraz zapobieganie jej kinetyną. Schemat uwzględnia tylko najbardziej istotne, pośrednie stadia. W chloroplastach pietruszki (A) proces degeneracji rozpoczyna się stopniowym rozkładem najpierw tylakoidów stromy, później gran. W chloroplastach kalarepy (B) i cykorii (C) charakterystyczne jest tworzenie się przejściowo odmiennego układu błon, który u kalarepy występuje w postaci długich, luźno ułożonych tylakoidów, a u cykorii jako gęsto upakowane grana olbrzymie. Niezależnie od typu degeneracji chloroplastów, kinetyna zapobiegała rozpadowi gran

plastów dyni wykształconych z chromoplastów jedynie tym się różniła od typowych chloroplastów, że występowało w nich kilka dużych plastoglobul. Po pewnym okresie obserwowano powtórne żółknięcie owocu, a ultrastrukturalne zmiany plastydów były takie same jak przy ich pierwotnym starzeniu. Należy nadmienić, że doświadczenia ze wzajemnym odwracaniem rozwoju chromoplast \rightleftharpoons chloroplast w owocach dyni można powtarzać wielokrotnie w ten sposób, że przez nakrycie części owocu ciemnym papierem następuje żółknięcie zielonej tkanki w ciągu 2 tygodni, natomiast po jego usunięciu, w ciągu 7–10 dni na świetle z chromoplastów wykształcają się ponownie chloroplasty.

Thomson i wsp. [85] prześledzili metamorfozę tych dwu typów plastydów u owoców pomarańczy w czasie ich powtórnego zazieleniania się. Matienko i wsp. [48] obserwowali przekształcanie się chromoplastów w chloroplasty w epidermie owoców arbuza.

Przykładów transformacji chromoplastów krystalicznych w chloroplasty dostarczają doświadczenia z korzeniami marchwi [22, 90]. Grönegress [22] obserwował stopniowe przekształcanie się chromoplastów w chloroplasty w miększu korowym korzenia marchwi po 2 - dniowym oświetlaniu (8000 lx). Rysunek 11A przedstawia typowy chromoplast z warstwy korowej korzenia marchwi przed jej oświetleniem. Widoczny jest pojedynczy kryształ karotenu, plastoglobule oraz ślady pojedynczych tylakoidów. Na rys. 11A i B pokazano kolejne etapy odtwarzania gran przy jednoczesnej redukcji wielkości kryształu. Pośrednie stadium (rys. 11B), które zawiera elementy chloroplastu i chromoplastu jest niezmiernie ważne jako argument przeciwko tezie Frey - Wysllinga [17], według której proces zazieleniania się marchwi jest wynikiem różnicowania się chloroplastów z proplastydów, a nie z chromoplastów, które nieodwracalnie utraciły zdolność do takiej transformacji.

Badania Wrischer [90] potwierdziły obserwacje Grönegressa [22] o możliwości przeróżnicowania się chromoplastów w chloroplasty u marchwi i to niezależnie od jakości stosowanego w doświadczeniu światła. Autorka indukowała ten proces światłem białym, niebieskim oraz czerwonym i nie stwierdziła istotnych różnic w ultrastrukturze tworzących się chromoplastów.

Należy zwrócić uwagę na to, że przy rozpatrywaniu możliwości odwracania rozwoju chromoplastów krystalicznych podobnie jak globularnych, ważne jest także stadium degeneracji, które jest punktem wyjścia w doświadczeniu. Wydaje się, że byłoby to niemożliwe w przypadku chromoplastu, którego cała zawartość została wyparta przez tworzący się kryształ karotenu. W przytoczonych przykładach materiał wyjściowy, obok kryształów czy plastoglobul, zawierał jeszcze ślady tylakoidów i w pewnych przypadkach rybosomy. Zdaniem Dyer i Osborne [14],

powtórne zazielenianie się liści jest możliwe jedynie w przypadku obecności w plastydach określonego RNA.

W podsumowaniu można powiedzieć, że o ile odwracanie procesu degeneracji chloroplastów zostało dowiedzione, to pytanie, jak daleko może być zaawansowana ta degeneracja, aby była jeszcze odwracalna, i jakie elementy złożonej struktury i funkcji chloroplastów warunkują odwracanie degeneracji, pozostaje ciągle bez jednoznacznej odpowiedzi.

Wobec doświadczalnego potwierdzenia możliwości nie tylko hamowania, ale i odwracania degeneracji chloroplastów, znalazła potwierdzenie stara hipoteza Schimpera [74]. Jednak dyskusja nad przyjęciem tylko jednej hipotezy Frey - Wysslinga [18] czy Schimpera [74] dla wyjaśnienia wzajemnego przechodzenia różnych form plastydów jest pewnym nieporozumieniem [78]. Nie należy tych hipotez sobie przeciwstawiać, lecz można je ze sobą godzić przy uwzględnieniu warunków w jakich proces zachodzi. Z jednej bowiem strony dostarczono szereg przykładów na poparcie poglądu Schimpera o możliwości odwracania degeneracji chloroplastów, z drugiej zaś, w warunkach naturalnych chromoplasty stanowią rzeczywiście końcowe stadium monotropowego rozwoju, czego przykładem mogą być plastydy komórek krótko żyjących, jak kwiaty, owocolistki czy starzejące się jesienią liście.

5. MECHANIZM DEGENERACJI CHLOROPLASTÓW I DZIAŁANIA CZYNNIKÓW ODWRACAJĄCYCH TEN PROCES

Jak wynika z prac Martina i Thimanna [47] oraz Petersona i Hufakera [68] nad starzeniem się liści, synteza enzymów hydrolitycznych, których zwiększona aktywność wiąże się z zainicjowaniem procesu degeneracji chloroplastów, hamowana jest przez specyficzny dla translacji cytoplazmatycznej antybiotyk — cykloheksimid. Wysunięto na tej podstawie hipotezę, że inicjacja procesu degeneracji chloroplastów pochodzi z cytoplazmy. Dla poparcia tej hipotezy wykonano doświadczenie z izolowanymi chloroplastami owsa i porównano poziom białka i chlorofilu w czasie degeneracji izolowanych chloroplastów z poziomem tych związków w starzejących się liściach [27]. Wyniki doświadczeń przedstawia rys. 12, wykazujący znacznie większy spadek poziomu chlorofilu i białka w starzejących się liściach niż w izolowanych chloroplastach. Również struktura plastydów izolowanych była lepiej zachowana, a aktywność fotosyntetyczna była wyższa niż chloroplastów niewyizolowanych. Tak więc hipoteza o zainicjowaniu procesu starzenia liści i degeneracji chloroplastów z cytoplazmy, będącej pod kontrolą jądra komórkowego, znalazła potwierdzenie.

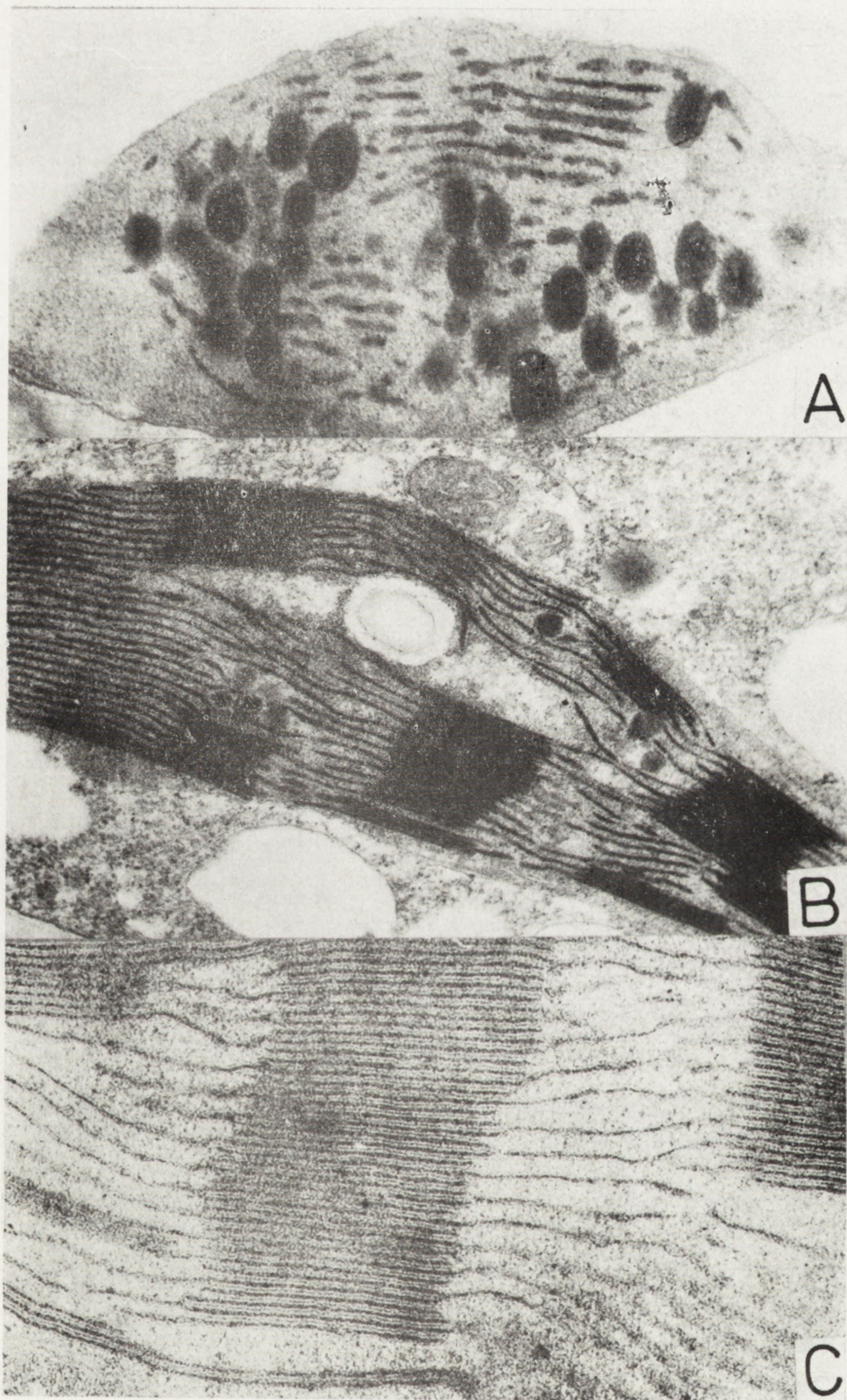
Szereg ciekawych obserwacji cytologicznych związanych ze znaczeniem jądra komórkowego w przebiegu procesów starzenia się chloroplastów przeprowadził Yoshida [93] na odciętych liściach moczarki.

W wyniku plazmolizy w pewnych komórkach moczarki protoplasty dzieliły się na dwie odrębne części: jądrową i bezjądrową. Okazało się, że w bezjądrowej połowie protoplastu chloroplasty przez szereg dni zachowują chlorofil, skrobię i powiększają nawet swoją objętość, natomiast w części jądrowej obserwowano typowe objawy degeneracji (rys. 13).

Reakcjami cytochemicznymi wykazano, że w bezjądrowej części protoplastu poziom RNA był niższy niż w części jądrowej. Pod wpływem egzogennej RNazy starzenie się chloroplastów zostało wstrzymane, co świadczyłoby o tym, że degeneracja chloroplastów skorelowana jest z syntezą RNA zachodzącą w jądrze (rys. 13 C). Traktowanie tego samego materiału NAD (dwunukleotyd nikotynamido - adeninowy — znany koenzym w katabolizmie węglowodanów, którego synteza związana jest z funkcją jądra) przyspieszało rozkład skrobi i starzenie się chloroplastów zarówno w bezjądrowych częściach protoplastów, jak i w jądrowych traktowanych uprzednio RNazą. Z drugiej strony BIZ (benzimidazol) znacznie zapobiegał degeneracji chloroplastów, wpływał na zachowanie ultrastruktury chloroplastów i przeciwdziałał efektowi NAD (rys. 14). Z pracy Persona i wsp. [67] wynika, że w odciętych liściach zwiększa się intensywność oddychania, natomiast nie obserwuje się tego zjawiska po zastosowaniu BIZ. Yoshida [93] wyjaśnia ten fakt tym, że BIZ hamuje starzenie poprzez tłumienie efektu NAD. Jakkolwiek istota działania BIZ pozostaje niewyjaśniona, miejsce jego działania zlokalizowano w chloroplastach, bowiem znakowany ^3H -benzimidazol włączany był w struktury lamellarne [92].

Hamowanie starzenia się liści moczarki obserwowano też przy zastosowaniu herbicydu (karbaminion - izo - propyl - N - 3 - chlorofenowy), znanego z tego, że wywołuje kondensację chromatyny i blokowanie mitozy w korzeniach *Vicia faba*. Przyjmuje się, że czynnik ten uniemożliwia transkrypcję. Stąd też mówić można o pewnej chemicznej enukleacji podobnej do mechanicznej enukleacji wywołanej plazmolizą. Różni inni badacze ([32] i cyt. lit.), stosując różne retardanty wzrostu znane jako inhibitory syntezy białka i RNA, opóźniali starzenie liści. Mechanizm tego zjawiska tłumaczy się hamowaniem syntezy specyficznych białek koniecznych do rozpadu chlorofilu.

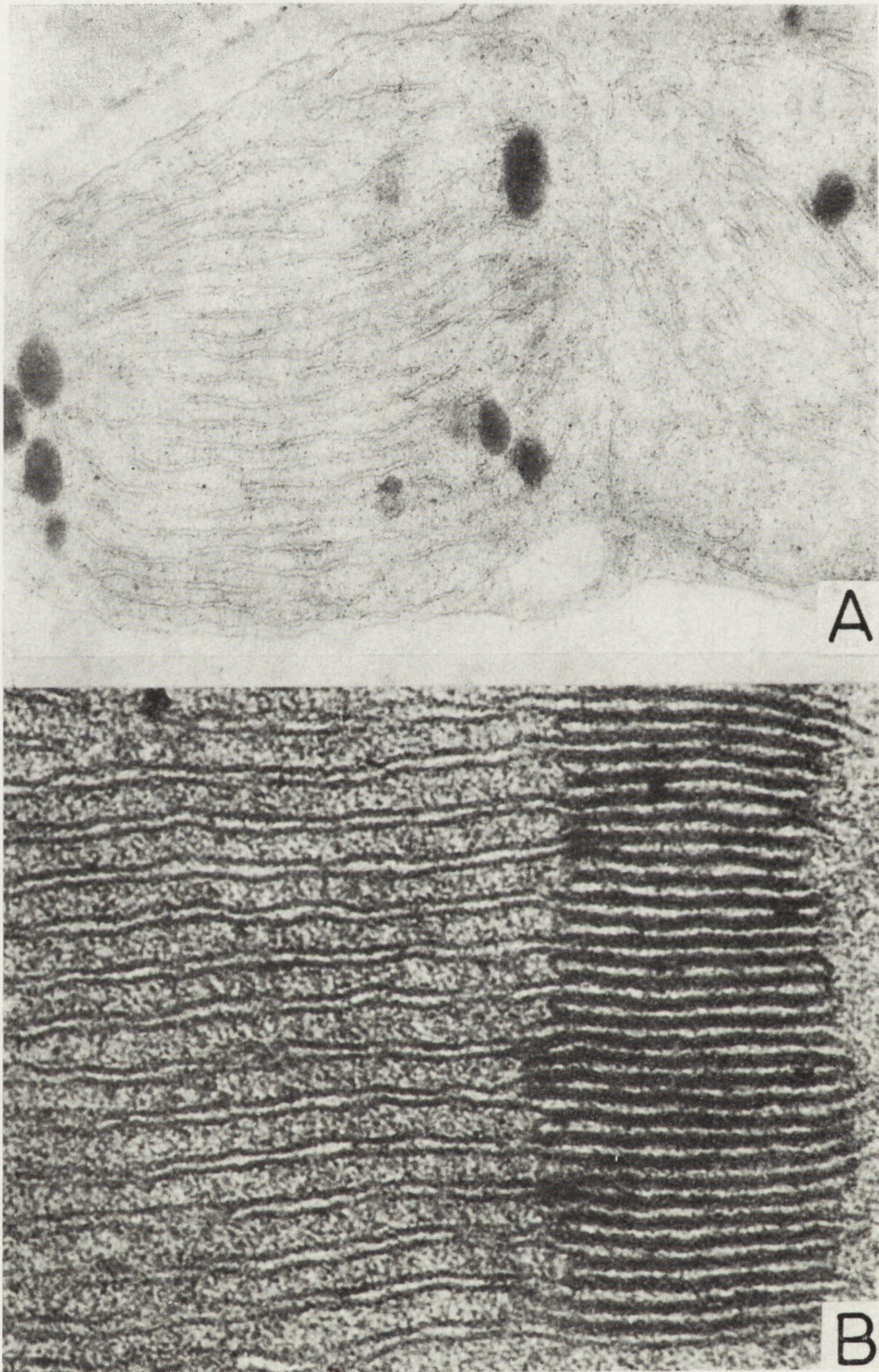
Specyficznym inhibitorem syntezy RNA zależnego od DNA jest aktynomycyna D. Z badań Yoshidy [93] wynika, że działa ona widocznie na zahamowanie starzenia się chloroplastów *Elodea*, spełniając rzeczywiście rolę „chemicznej enukleacji”.



Rys. 7. Wpływ kinetyny na zachowanie gran w odciętych liściach cykorii po 12 dniach inkubacji w warunkach słabego oświetlenia. U rośliny tej występowały dwa rodzaje plastydów różniące się strukturą tylakoidów. Rysunek ten przedstawia chloroplasty z tylakoidami o anormalnym, osmofilnym wnętrzu

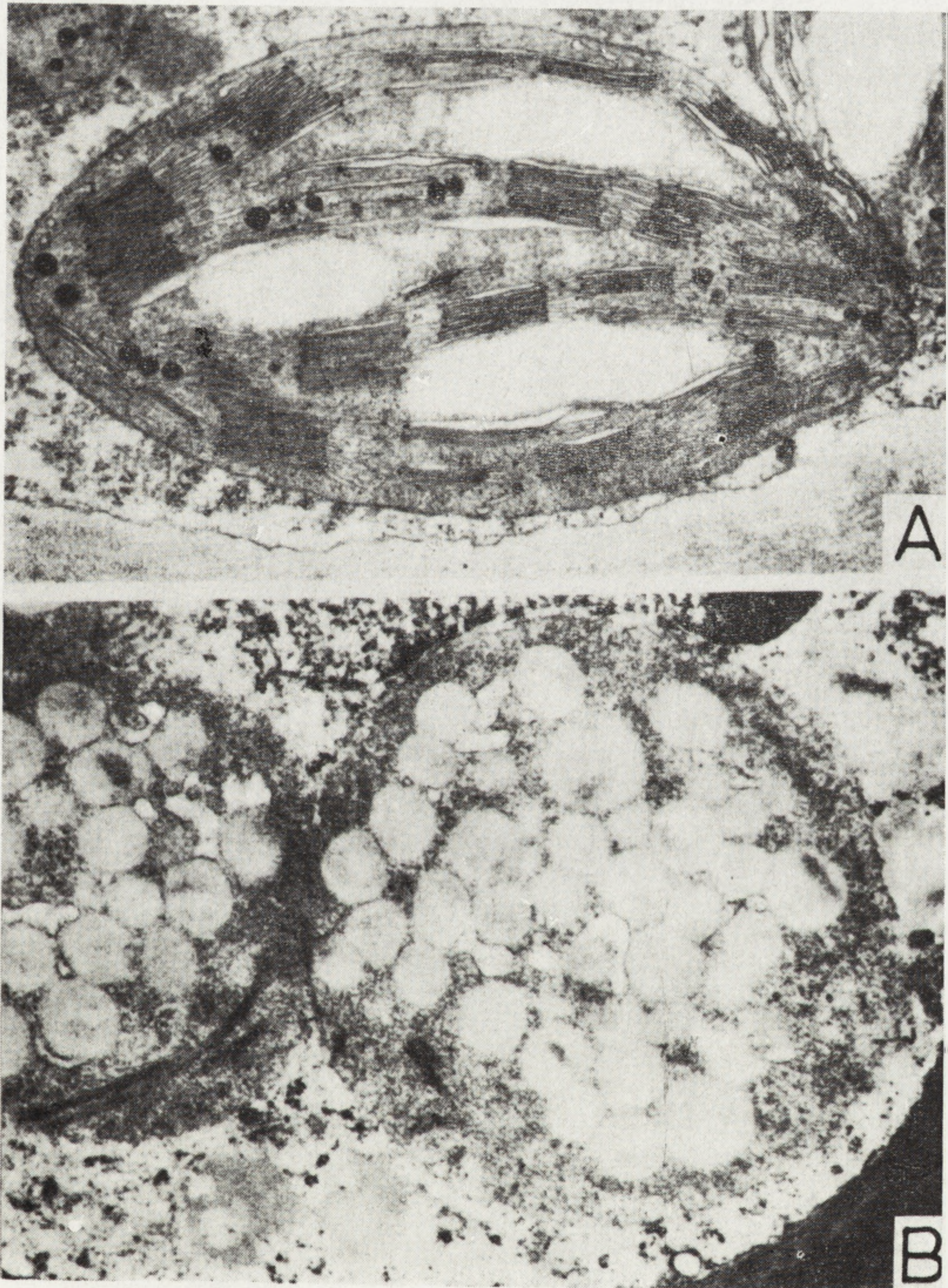
A — Chloroplast liścia kontrolnego, zanurzonego w wodzie. Brak gran. Widoczne resztki tylakoidów (T) i plastoglobule (PL), $\times 30\ 000$. B — Chloroplast liścia traktowanego kinetyną. Dobrze zachowane grana (G), tylakoidy stromy (Ts), plastoglobule (Pl) i skrobia (S), $\times 30\ 000$.

C — Grana z liści traktowanych kinetyną, $\times 60\ 000$. Młodzianowski i Młodzianowska [58]

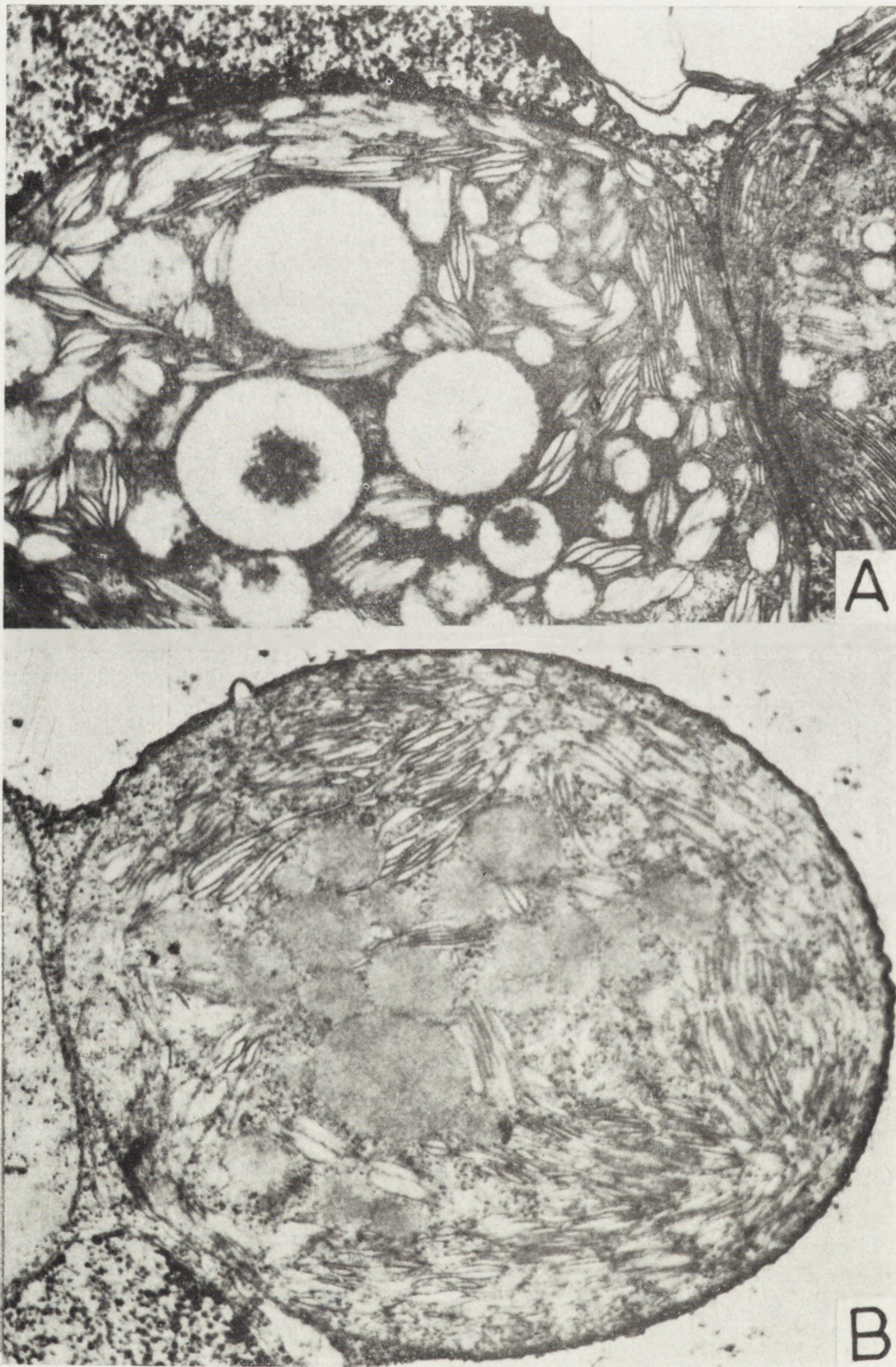


Rys. 8. Wpływ kinetyny na zachowanie gran w odciętych liściach cykorii po 12 dniach inkubacji w warunkach słabego oświetlenia. Tylakoidy przedstawionych chloroplastów w przeciwieństwie do uwzględnionych na rys. 7, charakteryzują się elektronowo — jasnym wnętrzem

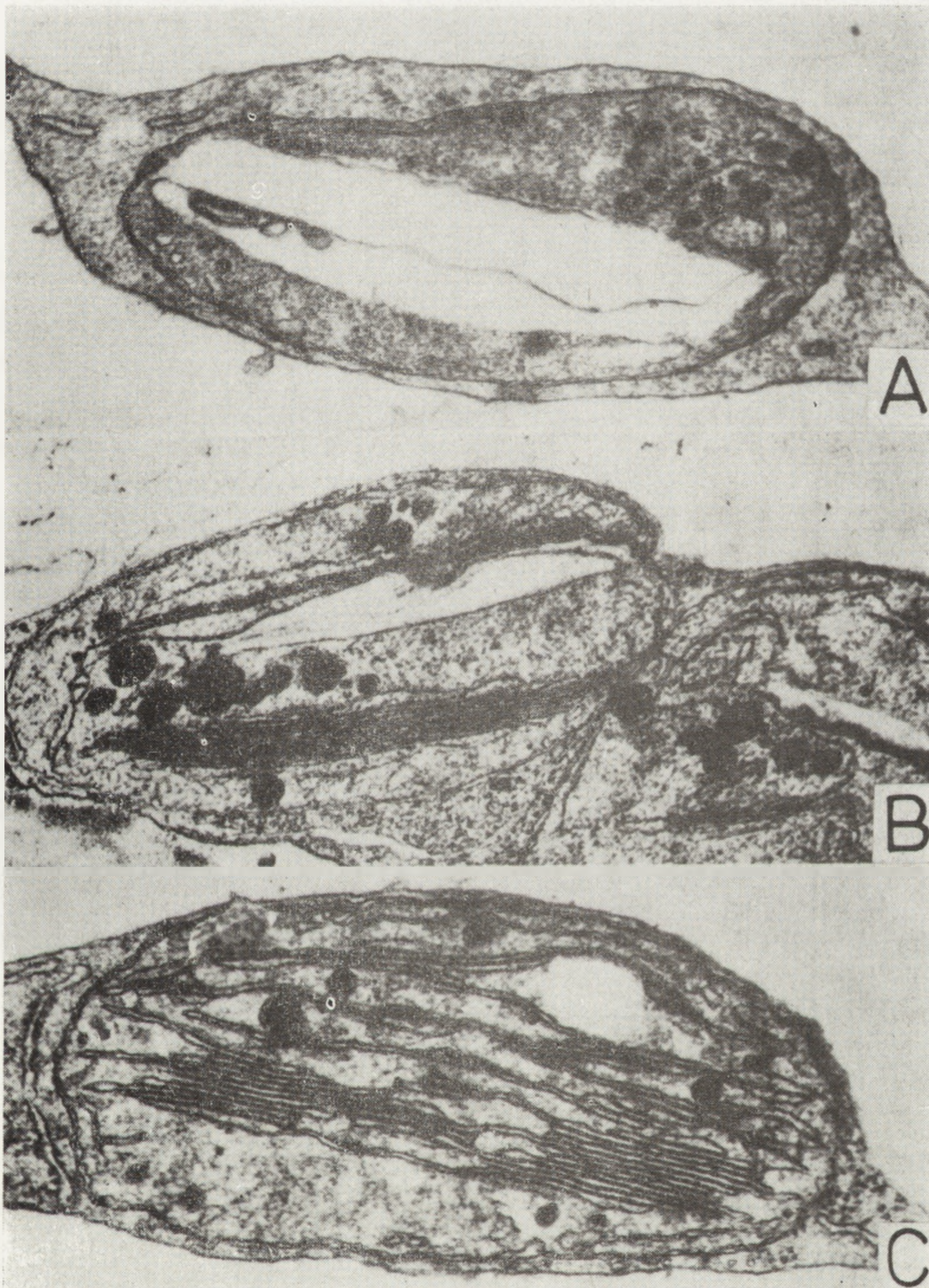
A — Chloroplasty liścia traktowanego wodą. Brak gran, tylko długie, pojedyncze tylakoidy oraz duże plastoglobule, $\times 30\ 000$. B — Dobrze zachowane grana w materiale kinetynowym. Widoczne szerokie, kontrastowe przegrody, $\times 90\ 000$. Młodzianowski i Młodzianowska [58]



Rys. 9. Plastydy z podepidermalnej warstwy komórek owoców dyni
A — Chloroplast z młodego, zielonego owocu, $\times 21\ 000$. B — Chromoplast z dojrzałego (po-
marańczowo-żółtego) owocu. Poza plastoglobulami, w stromie plastydu widoczne tylko nie-
liczne krótkie i spęzniałe tylakoidy, $\times 25\ 000$. Devidé i Ljubešić [12]

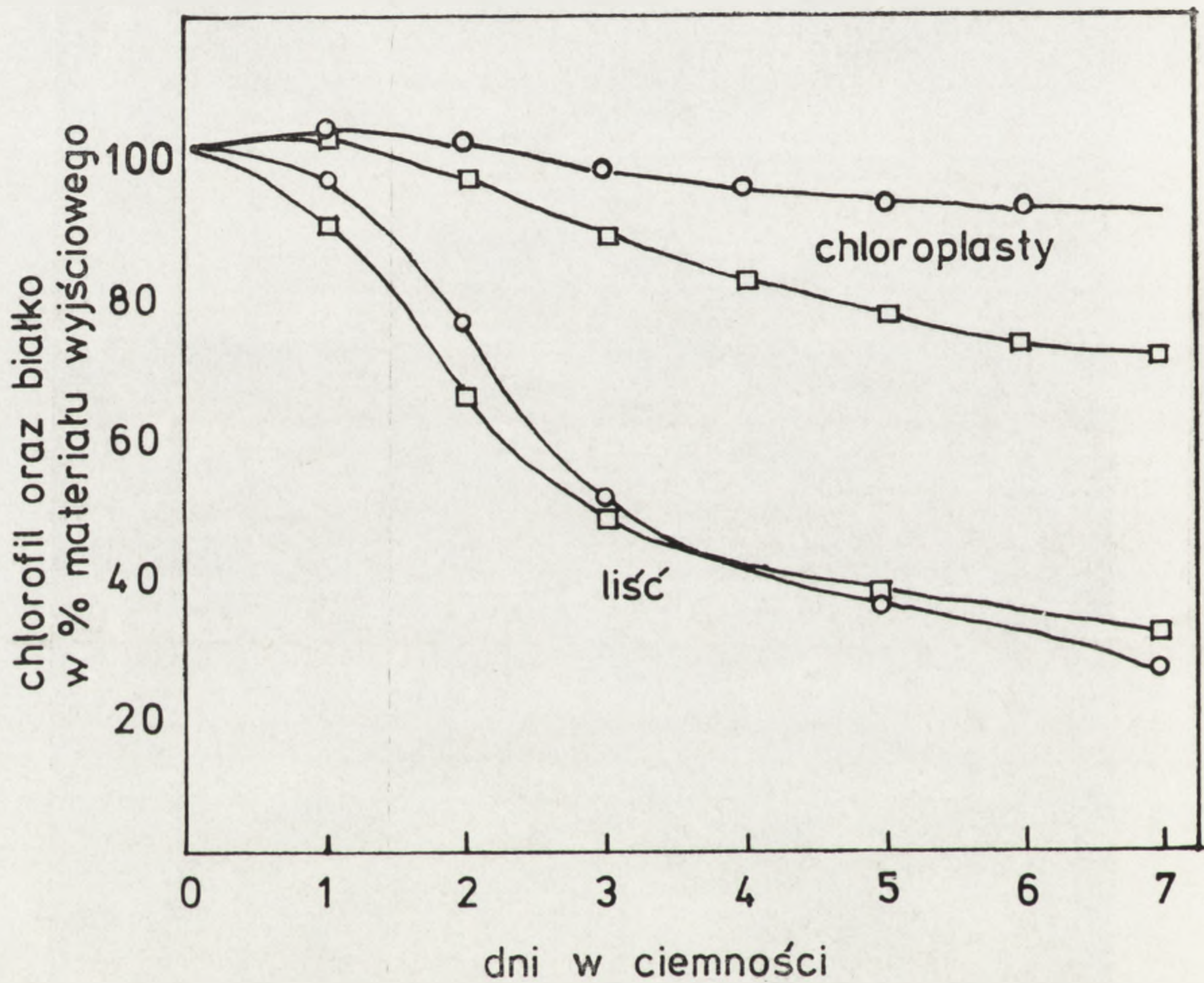


Rys. 10. Plastydy z podepidermalnej warstwy komórek owoców dyni (cd. rys. 9)
A — Część plastydów z odtwarzającymi się granami, których tylakoidy są spęczniałe, $\times 20\ 000$.
B — Odtworzony w czasie zazieleniania się chloroplast z normalnymi tylakoidami i dużymi plastoglobulami, $\times 25\ 000$. Devidé i Ljubešić [12]

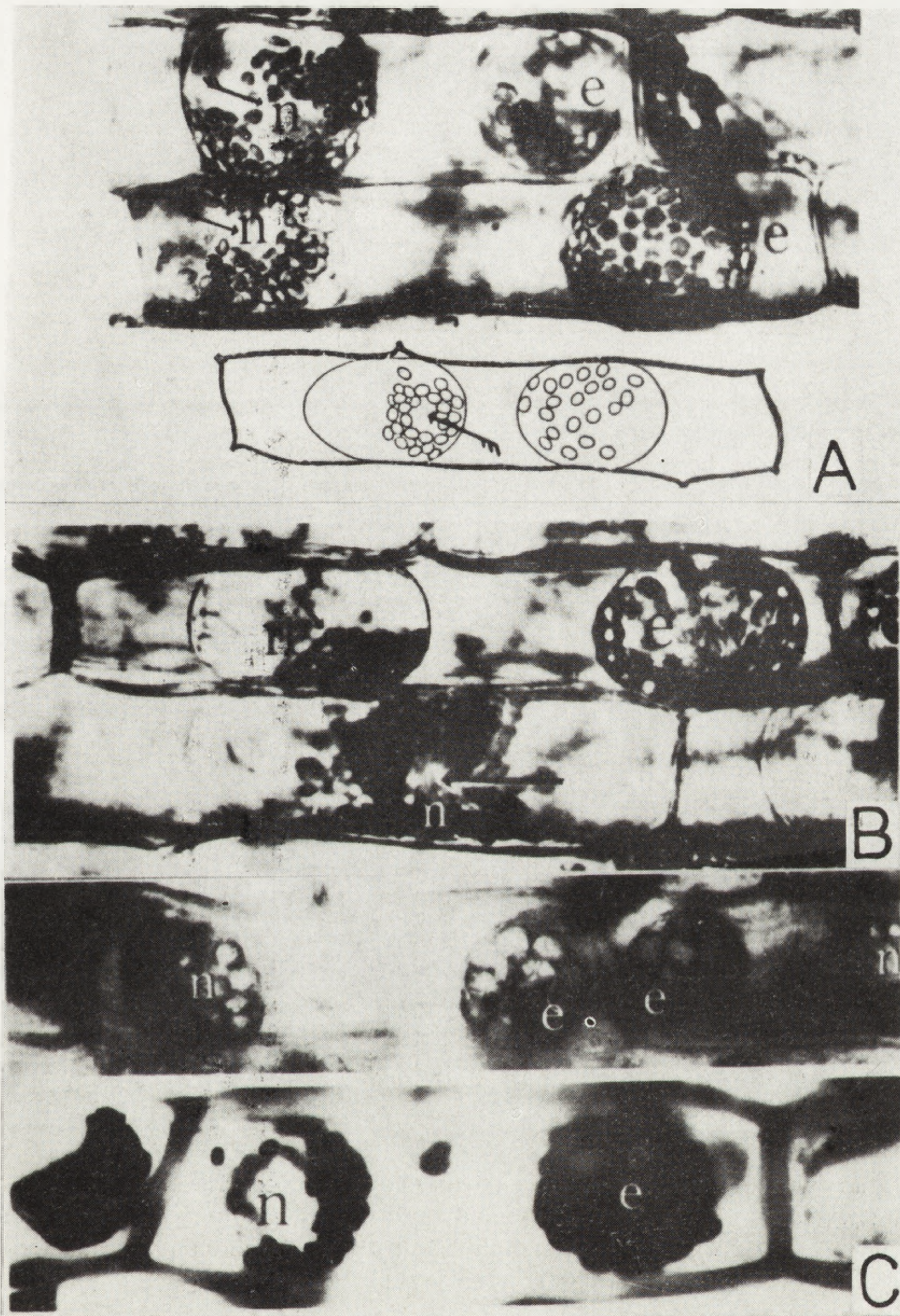


Rys. 11. Plastydy miększu korowego korzeni marchwi w czasie metamorfozy chromoplastów w chloroplasty

A — Chromoplast z kryształem karotenu, plastoglobulami i pojedynczymi tylakoidami. B — Pośrednie stadium zawierające elementy chromoplastu (kryształ karotenu) i chloroplastu (tylakoidy). C — Chloroplast z dobrze wykształconymi tylakoidami przeróżnicowany z chromoplastu po 2 dniach oświetlania korzenia, $\times 30\ 000$. Grönegress [22]



Rys. 12. Redukcja zawartości chlorofilów i białka zarówno w chloroplastach izolowanych, jak i w segmentach liści w czasie 7-dniowego starzenia. Kółka oznaczają chlorofil, kwadraty — białko [27]



Rys. 13. Przykłady doświadczeń z jądrowymi i bezjądrowymi połówkami protoplastów moczarki kanadyjskiej uzyskanymi metodą plazmolizy (n — część jądrowa, e — część bezjądrowa)

A — Podział protoplastów na część jądrową (n) i bezjądrową (e), mniej więcej tej samej wielkości, bezpośrednio po plazmolizie 0.2 M CaCl₂. B — Po 3 dniach inkubacji w części jądrowej obserwowano wyraźne objawy degeneracji chloroplastów, natomiast w części bezjądrowej — powiększenie chloroplastów i kumulację skrobi. C — Wyraźne zahamowanie starzenia chloroplastów przez dodanie RNazy (100 μg/ml) po 11 dniach inkubacji — wyżej i po 7 dniach inkubacji niżej. Dobrze zachowane plastidy zawierające skrobię zarówno w jądrowej, jak i bezjądrowej części protoplastu. Yoshida [93]

dni	0	1	2	3	4	5	6	7
DW								
NAD								
NAD + BIZ								
BIZ								

Rys. 14. Hamowanie procesu starzenia odciętych liści moczarki kanadyjskiej. DW — woda destylowana, NAD — roztwór dwunukleotydu nikotynamidoadeninowego ($10^{-3}M$), BIZ — benzimidazol ($10^{-3}M$). Yoshida [93]

Z przedstawionych doświadczeń wynika, że degeneracja chloroplastów jest ściśle skorelowana z funkcją jądra, mimo że przypisuje się im dość wysoką genetyczną i funkcyjną autonomię.

Szczególną rolę w procesie hamowania względnie odwracania degeneracji chloroplastów przypisuje się substancjom wzrostowym, a szczególnie cytokininom [6, 28, 88]. Mayak i Halevy [49] wykazali obecność endogennych cytokinin w płatkach róży i substancjom tym przypisują główną rolę w regulowaniu procesu starzenia.

Z licznych analiz biochemicznych, również z zastosowaniem znakowanych prekursorów wynika, że egzogenne cytokininy zwiększają względnie utrzymują poziom chlorofilu, białka i kwasów nukleinowych w starzejących się liściach [53, 56, 57, 87]. W dyskusji nad rolą cytokinin w stymulowaniu syntezy białka i kwasów nukleinowych [63, 65, 70, 81, 89] względnie tylko w zahamowaniu ich rozpadu [37, 53], możliwość odwracania procesu degeneracji [57, 82] przemawia za udziałem cytokinin w stymulowaniu resyntezy materiałów budujących strukturę chloroplastów. Cytokininy wpływają szczególnie na tworzenie gran [49, 57-59, 82]. Postuluje się, że jednym z możliwych mechanizmów oddziaływania cytokinin na ten proces może być stymulowanie syntezy białka wchodzącego w skład pewnych cząstek odpowiedzialnych za łączenie tylakoidów w grana [56]. Istnienie takich cząstek wykryto metodą „freeze - etching” u *Chlamydomonas* [21].

W badaniach mechanizmu działania cytokinin przeważają prace nad ich wpływem na metabolizm białek i kwasów nukleinowych, a w mniejszym stopniu na przemiany cukrowców. Tymczasem, jak wynika z pewnych prac, egzogenne stosowanie cukrów hamuje starzenie się odciętych liści [5, 11], a udział cytokinin w regulacji metabolizmu cukrowców jest w pewnych pracach coraz częściej akcentowany [4, 5, 61, 81, 83]. Podkreślana jest również ostatnio rola cytokinin w regulowaniu syntezy kwasów tłuszczowych i lipidów w liściach [36]. Cytokininy mogą hamować proces starzenia się chloroplastów, modyfikując przepuszczalność błon [15, 69, 71]. Richmond i wsp. [71] na podstawie doświadczeń nad włączaniem ^{14}C -leucyny w obecności kinetyny do izolowanych chloroplastów tytoniu przypuszczają, że jej pierwszym efektem jest zwiększenie przepuszczalności błon, a nie bezpośrednio synteza białek. Już bowiem Sacher [73] sugerował, że uszkodzenie błon czy zmiana ich przepuszczalności jest przyczyną procesu starzenia się. Z badań Poovaiaha i Leopolda [69] wynika, że starzenie się krążków liściowych kukurydzy może być opóźnione dodaniem do pożywki wapnia, przy czym kinetyna dodana łącznie z solami wapnia wzmacniała ten proces. Według Eilama [15] starzenie się liści fasoli związane jest z ubytkiem K^+ , natomiast

kinetyna zwiększa pobieranie K^+ wpływając na zmianę stosunku K^+/Na^+ .

Przytoczone dane wskazują, że efektu cytokinin w hamowaniu procesu starzenia można między innymi doszukiwać się w regulacji selektywnego transportu przez otoczki chloroplastów.

Autorzy dziękują Pani Prof. A. Szweykowskiej za krytyczne uwagi w przygotowywaniu niniejszego artykułu.

LITERATURA

- [1] BEN SHAUL Y., KLEIN Y. S., Development and structure of caroten bodies in carrot roots, *Bot. Gaz.*, **126**: 79–85, 1965.
- [2] BEN SHAUL Y., NAFTALI T., The development and ultrastructure of lycopene bodies in chromoplasts of *Lycopersicum esculentum*, *Protoplasma*, **67**: 333–344, 1969.
- [3] BEN SHAUL Y., TREFFY T., KLEIN S., Fine structure studies of carotene body development, *J. Microscopie*, **7**: 265–274, 1968.
- [4] BERRIDGE M. V., RALPH R. K., Kinetin and carbohydrate metabolism in chinese cabbage, *Plant Physiol.*, **47**: 562–567, 1971.
- [5] BOOTHBY D., WRIGHT S. T. C., Effects of kinetin and other plant growth regulators on starch degradation, *Nature*, **196**: 389–390, 1962.
- [6] BUTLER R. D., SIMON E. W., Ultrastructural aspects of senescence in plants, *Advances in Gerontological Research* 1–82, 1968.
- [7] CAMEFORT H., Evolution de la structure des plastes pendant la maturation de l'arille de l'if (*Taxus baccata* L.), *C. R. Acad. Sci., Paris*, **258**: 1017–1020, 1964.
- [8] COCCUCI S., MARRÉ E., Ricerche sull' invecchiamento in foglie recise. II sull' effetto di protezione degli zuccheri, della luce e della cinetina sugli acidi ribonucleici e sulla capacità fotosintetica, *Rc. Accad. Naz. Lincei*, **40** (6): 1095–1102, 1966.
- [9] COFFEY M. D., PALEVITZ B. A., ALLEN P. J., Ultrastructural changes in rust — infected tissues of flax and sunflower, *Can. Jour. Bot.*, **50**: 1485–1492, 1972.
- [10] DENNIS D. T., STUBBS M., COULTATE T. P., The inhibition of brussels sprout leaf senescence by kinins, *Canad. J. Bot.*, **45**: 1019–1024, 1967.
- [11] DE VECCHI L., Fine structure of detached oak leaves senescing under different experimental conditions, *Isr. J. Bot.*, **20**: 169–183, 1971.
- [12] DEVIDÉ Z., LJUBEŠIĆ N., The reversion of chromoplasts to chloroplasts in pumpkin fruits, *Z. Pflanzenphysiol.*, **73**: 296–306, 1974.
- [13] DODGE J. D., Changes in chloroplast structure during the autumnal senescence of *Betula leaves*. *Ann. Bot.*, **34**: 817–824, 1970.
- [14] DYER T. A., OSBORNE D. J., Leaf nucleic acids. II. Metabolism during senescence and effect of kinetin, *J. Exptl. Bot.*, **22**: 552–560, 1971.
- [15] EILAM Y., Permeability changes in senescing tissue, *J. Exp. Bot.*, **16**: 614–627, 1965.
- [16] FREY - WYSSLING A., KREUTZER E., Die submikroskopische Entwicklung

- der Chromoplasten in den Blättern von *Ranunculus repens* L., *Planta*, **51**: 104–114, 1958.
- [17] FREY - WYSSLING A., MÜHLETHALER K., *Ultrastructural plant cytology* Elsevier Publ. Comp. Amsterdam, 1965.
- [18] FREY - WYSSLING A., RUSH F., BERGER X., *Monotrope Plastiden — Metamorphose*, *Protoplasma*, **45**: 97–114, 1955.
- [19] FREY - WYSSLING A., SCHWEGLER F., *Ultrastructure of the chromoplasts in the carrot root*, *J. Ultrastructure Res.*, **13**: 543–559, 1965.
- [20] GRILLI M., *Origine e sviluppo dei cromoplasti nei frutti di zucca americana (Cucurbita pepo L. cv. small sugar)*, I i II *Caryologia*, **18**: 409–459, 1965.
- [21] GOODENOUGH L. A., STAEHELIN J., *Structural differentiation of stacked and unstacked chloroplast membrane*, *J. Cell Biol.*, **48**: 594–619, 1971.
- [22] GRÖNEGREGS P., *The greening of chromoplasts in Daucus carota L.*, *Planta*, **98**: 274–278, 1971.
- [23] HARRIS W. M., *Chromoplasts of tomato fruits III. The high — delta tomato*, *Bot. Gaz.*, **131**: 163–166, 1970.
- [24] HARRIS W. M., SPURR A. R., *Chromoplasts of tomato fruits II. The red tomato*, *Amer. J. Bot.*, **56**: 380–389, 1969.
- [25] HERRMAN R. G., *Do chromoplasts contain DNA? II. The isolation and characterization of DNA chromoplasts, chloroplasts, mitochondria and nuclei of Narcissus*, *Protoplasma*, **74**: 7–17, 1972.
- [26] HYDE B. B., HODGE A. J., KAHN A., BIRNSTIEL M. L., *Studies on phytoferritin. I. Identification and localization*, *J. Ultrastruct. Res.*, **9**: 248–258, 1963.
- [27] HYUNG T., CHOE., THIMANN K. V., *The senescence of isolated chloroplasts*, *Planta*, **121**: 201–203, 1974.
- [28] KENDE H., *The cytokinins*, *Inter. Rev. Cytol.*, **31**: 301–338, 1971.
- [29] KIRK J. T. O., JUNIPER B. E., *The ultrastructure of the chromoplasts of different colour varieties of Capsicum*, [w] *Symposium on Biochemistry of Chloroplasts. Vol. II. (T. W. Goodwin) str. 691–701*, Academic Press, London.
- [30] KLEINING H., WRISCHER M., *Die Feinstruktur von Acetabularia — Chloroplasten bei Sekundärcarotinoidbildung*, *Z. Pflanzenphysiol.*, **58**: 248–251, 1968.
- [31] KNYPL J. S., *Accumulation of lycopene in detached cotyledons of pumpkin treated with (2 - chloroethyl) - trimethylammonium chloride*, *Naturwiss.*, **56**: 572, 1969.
- [32] — *Wpływ retardantów wzrostu, kumaryny, gibereliny i cytokinin na kiełkowanie nasion oraz syntezę i rozpad chlorofilu, białek i RNA w liściach i liścieniach*, Uniwersytet Łódzki, 1970.
- [33] KOLLMANN R., KLEINING H., DÖRR I., *Fine structure and pigments of plastids in Orobanche*, *Cytobiologie*, **1**: 152–158, 1969.
- [34] KOWALLIK K. V., HERRMANN R. G., *Do chromoplasts contain DNA? I. Electron microscopic investigation of Narcissus chromoplasts*, *Protoplasma*, **74**: 1–6, 1972.
- [35] KUHN H., *Chemismus, Struktur und Entstehung der Carotinkriställchen in der Nebenkrone von Narcissus L. var „La Riente“*, *J. Ultrastruct. Res.*, **33**: 332–355, 1970.
- [36] KULL U., BÜXENSTEIN R., *Effect of cytokinins on the lipid fatty acid of leaves*, *Phytochemistry*, **13**: 39–44, 1974.
- [37] KURAISHI S., *The effect of kinetin on protein level of Brassica leaf discs*, *Physiologia Plant.*, **21**: 78–83, 1968.

- [38] LICHTENTHALER H. K., Untersuchungen über die osmophilen Globuli der Chloroplasten, Ber. Dtsch. Ges., **79**: 111–117, 1964.
- [39] — Verbreitung und Konzentration der lipophilen Plastidenchinone in grünen Pflanzen, Planta, **81**: 140–152, 1968.
- [40] — Die Plastoglobuli von Spinat, ihre Größe und Zusammensetzung während der Chloroplastendegeneration, Protoplasma, **68**: 315–326, 1969.
- [41] — Die Plastoglobuli von Spinat, ihre Größe, Isolierung und Lipochinonzusammensetzung, Protoplasma, **68**: 65–77, 1969.
- [42] — Zur Synthese der lipophilen Plastidenchinone und Sekundärcarotinoide während der Chromoplastenentwicklung, Ber. Dtsch. Ges., **82**: 483–497, 1969.
- [43] — Die Lokalisation der Plastidenchinone und Carotinoide in den Chromoplasten der Petalen von *Sarothamnus scoparius* (L.) Wilm et Koch, Planta, **90**: 142–152, 1970a.
- [44] — Die Feinstruktur der Chromoplasten in plasmochromen Perigon — Blättern von Tulipa, Planta, **93**: 143–151, 1970b.
- [45] LIEDVOGEL B., SITTE P., Lipids and proteins in lipid — rich chromoplast membranes, Naturwiss., **61**: 131, 1974.
- [46] LJUBEŠIĆ N., Feinbau der Chloroplasten während der Vergilbung und Wiederrgrünung der Blätter, Protoplasma, **66**: 369–379, 1968.
- [47] MARTIN C., THIMANN K. V., The role of protein synthesis in the senescence of leaves. I. The formation of protease, Plant Physiol., **49**: 64–71, 1972.
- [48] MATIENKO B. T., SALINSKIJ S. M., SOLOWEJ V. K., O wozmożnosti prewraszczenija karotinoidoplastow (chromoplastow) w chloroplasty w epidermisie ploda arbuza, [w] Chloroplasty i mitochondrii (Woprosy membrannoj biologii), 1969.
- [49] MAYAK S., HALEVY A. H., Cytokinin activity in rose petals and its relation to senescence, Plant Phys., **46**: 497–499, 1970.
- [50] MIKULSKA E., ŻOLNIEROWICZ H., NAROLEWSKA B., Ultrastructure of chromoplasts in detached cotyledons of cucumber treated with growth retardant (2 - chloroethyl - trimethylammonium chloride), Biochem. Physiol. Pflanzen (BPP), **164**: 514–521, 1974.
- [51] MITTELHEUSER C. J., VAN STEVENINCK R. F. M., The ultrastructure of wheat leaves I. Changes due to natural senescence and the effects of kinetin and ABA on detached leaves incubated in the dark, Protoplasma, **73**: 239–252, 1971.
- [52] — The ultrastructure of detached wheat leaves II. The effects of kinetin and ABA on detached leaves incubated in the light, Protoplasma, **73**: 253–262, 1971.
- [53] MIZRAHI Y., AMIR J., RICHMOND A. E., The mode of action of kinetin in maintaining the protein content of detached *Tropaeolum majus* leaves, New Phytol., **69**: 355–361, 1970.
- [54] MŁODZIANOWSKI F., Fitoferrytyna, Wszechświat, **12**: 330–332, 1972.
- [55] — Cytoplasmic inclusions in yellowing parsley leaves, Acta Soc. Bot. Pol., w druku.
- [56] — Wpływ cytokinin na strukturę organelli komórkowych. Uniwersytet A. Mickiewicza w Poznaniu, Wydział Biologii i Nauk o Ziemi. Ser. Biol., nr. 5, 1974.
- [57] MŁODZIANOWSKI F., KWINTKIEWICZ M., The inhibition of kohlrabi chloroplast degeneration by kinetin, Protoplasma, **76**: 211–226, 1973.
- [58] MŁODZIANOWSKI F., MŁODZIANOWSKA L., Chloroplast degeneration and its inhibition by kinetin in detached leaves of *Cichorium intybus* L. Acta Soc. Bot. Pol., **42** (4): 649–656, 1973.

- [59] MŁODZIANOWSKI F., PONITKA A., Ultrastructural changes of chloroplasts in detached parsley leaves yellowing in darkness and the influence of kinetin on that process, *Z. Pflanzenphysiol.*, **69**: 13–25, 1973.
- [60] MŁODZIANOWSKI F., SIWECKI R., Ultrastructural changes in chloroplasts of *Populus tremula* L. leaves affected by the *Fungus Melampsora pinitorqua* (Braun), *Rostr. Physiol. Plant Pathology*, w druku.
- [61] MŁODZIANOWSKI F., WESOŁOWSKA M., Synteza i mobilizacja skrobi oraz zmiany ściany komórkowej w rozwijających się liściach łubinu z uwzględnieniem wpływu kinetyny na te procesy, *Acta Soc. Bot. Pol.*, w druku.
- [62] MOLLENHAUER H. H., KOGUT C., Chromoplast development in daffodil, *J. Microscopie*, **7**: 1045–1050, 1968.
- [63] OLSZEWSKA M. J., Études autoradiographique de l'influence de la kinetine sur l'incorporation de l'adenine dans les cellules du méristème racinaire d'*Allium cepa*, *Exptl. Cell Res.*, **16**: 192–202, 1959.
- [64] — *Cytologia roślin*, PWN, Warszawa, 1971.
- [65] OSBORNE D. J., Effect of kinetin on protein and nucleic acid metabolism in *Xanthium* leaves during senescence, *Pl. Physiol. Lancaster*, **37**: 595, 1962.
- [66] PAIS M. S. S., Sur le reverdissement de la spathe de *Zantedeschia aetiopica* ou cours de la frutification, *Port. Acta Biol., Ser. A XII*: 101–124, 1972.
- [67] PERSON C. D., SAMBORSKI D. J., FORSYTH F. R., Effect of benzimidazole on detached leaves, *Nature*, **180**: 1294–1295, 1957.
- [68] PETERSON L. W., HUFFAKER R. C., Loss of ribulose diphosphate carboxylase and increase in proteolytic activity in detached barley leaves. (Abstr.) *Plant Physiol., Ann. Suppl.*, p. 12, 1974.
- [69] POOVAIAH A. C., LEOPOLD A. C., Deferral of leaf senescence with calcium, *Plant Physiol.*, **32**: 236–239, 1973.
- [70] RATAJCZAK W., SZWEYKOWSKA A., Bud — inducing activity of kinetin and its effect on the synthesis and differentiation of proteins in the moss protonema, *Bull. Soc. Amis Sci., Poznań*, w druku.
- [71] RICHMOND A. E., SACHS B., OSBORNE D. J., Chloroplasts, kinetin and protein synthesis, *Physiol. Plant.*, **24**: 176–180, 1971.
- [72] ROSSO S. W., The ultrastructure of chromoplast development in red tomatoes, *J. Ultrastruct. Res.*, **25**: 307–322, 1968.
- [73] SACHER J. A., Relationship between auxin and membrane — integrity in tissue senescence and abscission, *Science*, **125**: 1199–1200, 1957.
- [74] SCHIMPER A. F. W., Untersuchungen über die Chlorophyllkörner und die ihnen homologen Gebilde, *Jb. Wiss Bot.*, **16**: 1–247, 1885.
- [75] SCHNEPF E., CZYGAN F. C., Feinbau und Carotinoide von Chromoplasten im Spadix — Appendix von *Typhonium* und *Arum*, *Z. Pflanzenphysiol.*, **54**: 345–355, 1966.
- [76] SHAW M., BHATTACHARYA P. K., QUICK W. A., Chlorophyll, protein and nucleic acid levels in detached, senescing wheat leaves, *Can. J. Bot.*, **43**: 739–746, 1965.
- [77] SHAW M., MANOCHA M. S., Fine structure in detached senescing wheat leaves, *Can. J. Bot.*, **43**: 747–754, 1965.
- [78] SITTE P., Plastiden — Metamorphose und Chromoplasten bei *Chrysosplenium*, *Z. Pflanzenphysiol.*, **73**: 243–265, 1974.
- [79] SMITH M., BUTLER R. D., Ultrastructural aspects of petal development in *Cucumis sativus* with particular reference to the chromoplasts, *Protoplasma*, **73**: 1–13, 1971.

- [80] SPURR A. R., HARRIS W. M., Ultrastructure of chromoplasts in *Capsicum annuum*. I. Thylakoid membrane changes during fruit ripening, *Amer. J. Bot.*, **55**: 1210-1224, 1968.
- [81] SUGIURA M., UMEMURA K., OOTA Y., The effect of kinetin on protein level of tobacco leaf discs, *Plant Physiol.*, **15**: 457, 1962.
- [82] SWIESZNIKOWA I. N., KUŁAJEWA O. N., BOLJAKINA I. P., Restoration of the structure of cellular organelles of old leaves under the action of kinines, *Sixth Intern. Congr. Electron Micr. Kyoto*, 327-328, 1966.
- [83] TETLEY R. M., The metabolism of oat leaves during senescence. I. Respiration, carbohydrate metabolism and the action of cytokinins, *Plant Physiol.*, **54**: 294-303, 1974.
- [84] THOMSON W. W., Ultrastructural development of chloroplasts in *Valencia oranges*, *Bot. Gaz.*, **127**: 133-139, 1966.
- [85] THOMSON W. W., LEWIS L. N., COGGINS C. W., The reversion of chromoplasts to chloroplasts in *Valencia oranges*, *Cytobiologia*, **32**: 117-124, 1967.
- [86] TOYAMA S., UEDA R., Electron microscope studies on the morphogenesis of plastids. II. Changes in fine structure and pigment composition of plastids in autumn leaves of *Ginkgo biloba* L., *Sci. Rep. Tokyo Kyoiku Daigaku*, **B12**: 31-37, 1965.
- [87] VARGA A., BRUINSMA J., Effect of different cytokinins on the senescence of detached oat leaves, *Planta*, **111**: 91-93, 1973.
- [88] WAREING P. F., PHILLIPS J. D. J., The control of growth and differentiation in plants, Pergamon Press, Oxford, 1971.
- [89] WOLLGIEHN R., Nucleic acid and protein metabolism of excised leaves, [w] *Aspects of Biology of Aging, Symp. Soc. Exp. Biol.*, 231-246, 1967. (cyt. za 53).
- [90] WRISCHER M., Transformation of plastids in young carrot callus, *Acta Bot. Croat.*, **31**: 41-46, 1972.
- [91] WUTTKE H. G., Chromoplasten — Entwicklung bei *Rosa rugosa*. Staats-examenarbeit. Freiburg i Br., 1974.
- [92] YOSHIDA Y., Electron microscopic autoradiography on the site of tritiated benzimidazol incorporation in wheat chloroplasts, *Bot. Mag. Tokyo*, **83**: 428-430, 1970.
- [93] — Retardation of chloroplasts senescence by enucleation and some chemicals. *Biology and Radiobiology of enucleate systems. II. Plant Cells*, 3-25. Academic Press, New York, 1972.

Otrzymano: maj 1975.

Przyjęto: 5 czerwiec 1975.

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

ROLA CZYNNIKÓW HUMORALNYCH W BLOKOWANIU CYTOTOKSYCZNOŚCI LIMFOCYTÓW IN VITRO

Henryk SKURZAK

Zakład Immunologii, Instytut Onkologii im. Marii Skłodowskiej - Curie
w Warszawie

Streszczenie. Badania doświadczalne wskazują, że surowice pochodzące od osobników z zaawansowanym wzrostem nowotworu mają właściwość blokowania cytotoksyczności uczulonych limfocytów przeciwko odpowiednim komórkom docelowym w testach in vitro. Surowice takie mogą również blokować fazę rozpoznawczą odpowiedzi immunologicznej. Z dotychczasowych badań wynika, że czynnikiem blokującym jest prawdopodobnie kompleks immunologiczny złożony z antygeny i przeciwciała.

Jak się obecnie sądzi, czynniki blokujące zawarte w surowicy mogą odgrywać główną rolę w zapobieganiu rozwojowi odporności i ujawnianiu się efektorowej fazy reakcji przeciwko nowotworom. Wydaje się, że te same czynniki mogą odgrywać rolę w zapobieganiu odrzucania przeszczepu allogenicznego.

Dotychczas opisano wiele mechanizmów, które mogą prowadzić do zniszczenia komórek przeszczepów obcych tkanek lub autologicznych nowotworów. W większości przypadków mechanizmy te charakteryzują się swoistością immunologiczną wynikającą z obecności antygenów, które są poznawane jako obce przez gospodarza. Zrozumienie mechanizmów aktywnych w procesie odrzucania przeszczepu, jak i w procesie ochrony przed odrzuceniem jest istotne, jeżeli zakładamy możliwość czynnego manipulowania procesami aktywnymi w reakcjach immunologicznych organizmu. Z praktycznego punktu widzenia jest bardzo pożądana możliwość zmiany równowagi mechanizmów immunologicznego odporu, jak i ochronnych, w zależności od oczekiwanych efektów klinicznych.

W obecnym przeglądzie, głównie w oparciu o badania nad nowotworami, zostaną przedstawione niektóre fakty doświadczalne pozwalające bliżej zrozumieć rolę czynników zawartych w surowicy krwi w hamowaniu odporności komórkowej ujawnianej in vitro.

MECHANIZMY BLOKOWANIA KOMÓRKOWEJ ODPORNOŚCI

Kallis i Bryant [18] wykazali po raz pierwszy, że wszczepienie zabitych komórek nowotworowych zwierzętom przed transplantacją nowotworu może prowadzić do pobudzenia wzrostu nowotworu. Efekt taki może być przeniesiony z surowicą i został przez Kallisa określony terminem „immunologicznego pobudzenia” (immunological enhancement). Obecnie jest wiadomo, że immunologicznie swoista cytotoksyczność limfocytów może być blokowana na drodze różnych mechanizmów. Oryginalny termin „pobudzenie immunologiczne” jest często zastępowane przez mniej ambitne określenie „blokowanie” [15].

Przyjmuje się ogólnie, że efekt blokowania można podzielić na trzy klasy w zależności od poziomu reakcji immunologicznej, odpornościowej, w którym wystąpi zjawisko zahamowania: 1. Blokowanie indukcji odpowiedzi immunologicznej — blok afferentny; 2. Zahamowanie proliferacji immunologicznie kompetentnych komórek pamięci — blokowanie centralne; 3. Zaburzenie interakcji komórek docelowych z komórkami efektorowymi — blok efferentny. W obecnej dyskusji ograniczę się do przedstawienia tych mechanizmów i czynników, które oddziałują na interakcje limfocytów z komórkami docelowymi.

Możemy rozróżnić następujące rodzaje blokowania efferentnego:

a. maskowanie antygenów na powierzchni komórek docelowych.

1) Przeciwciała, fragmenty przeciwciał oraz kompleksy immunologiczne, które posiadają swoiste determinanty dla antygenów komórek docelowych. W tym układzie antygeny komórkowe ulegają zaangażowaniu bez aktywacji mechanizmu efektorowego.

2) Maskowanie antygeny przez przeciwciała i makrofagi.

b. inktywacja komórek efektorowych.

1) Blokowanie swoistych miejsc na cytotoksycznych limfocytach T przez wolny antygen komórek docelowych lub przez kompleksy immunologiczne utworzone z antygeny komórek docelowych i swoistych przeciwciał.

2) Konkurencyjne działanie między wolnymi kompleksami immunologicznymi i przeciwciałami opłaszczającymi komórki docelowe. Ten typ blokowania dotyczy głównie receptorów dla immunoglobulin na cytotoksycznych komórkach B [20].

METODY BADANIA KOMÓRKOWEJ ODPORNOŚCI IN VITRO I FUNKCJI CZYNNIKÓW BLOKUJĄCYCH ZAWARTYCH W SUROWICY KRWI

Analizując komórkową odporność lub jej brak, należy rozważyć co najmniej trzy składowe. Jedną z nich to komórki docelowe (komórki nowotworowe, komórki przeszczepu lub pasożyty), przeciwko którym

odporność jest wywołana. Drugą składową są komórki efektorowe, zwykle limfocyty i makrofagi, które reagują przeciwko komórkom docelowym. Trzecią składową są czynniki zawarte w surowicy lub płynach tkankowych, które blokują lub wzmagają efekty odporności komórkowej.

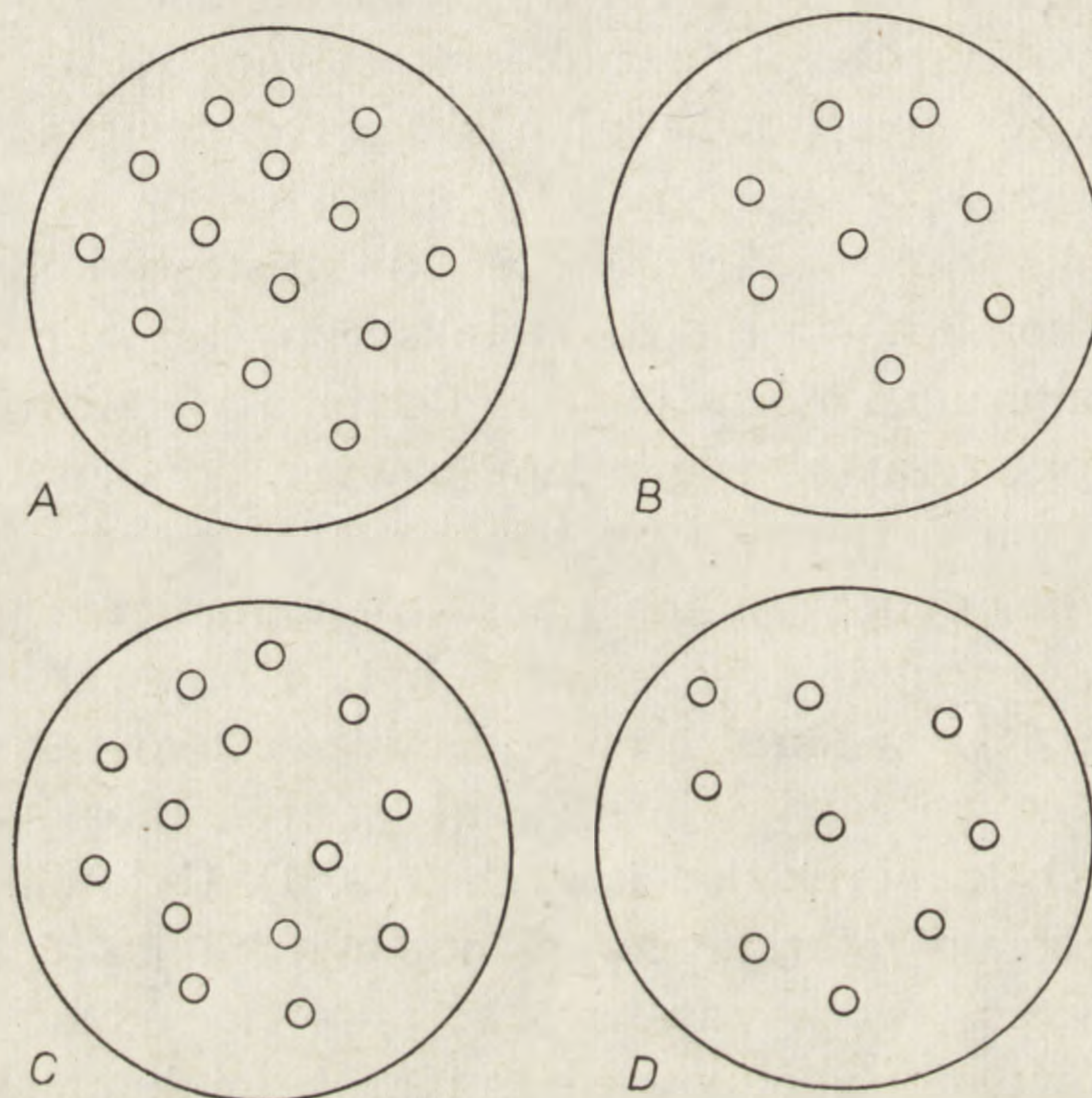
Komórkowa odporność może nie być ujawniana z dwóch powodów. Komórki efektorowe mogą być nieaktywne lub mogą być niezdolne do ujawnienia swej aktywności ponieważ na przeszkodzie stoją czynniki blokujące, znajdujące się w surowicy lub tkankach. Dla rozróżnienia między tymi dwoma alternatywami, opracowane zostały odpowiednie techniki pozwalające analizować zjawisko cytotoksyczności limfocytów poza ustrojem oraz wpływu czynników surowicy na to zjawisko. Spośród kilku technik, które znajdują szerokie zastosowanie w badaniach nad odpornością komórkową mikrocytotoksyczny tekst, opracowany oryginalnie przez Takasugi i Klein [30], Hellströma i Hellströma [14] i rozwinięty później przez zastosowanie izotopowych wykładników destrukcji komórek docelowych, jest najczęściej stosowaną metodą. Tekst mikrocytotoksyczny jest techniką wydajną i bardzo ekonomiczną, co nie pozostaje bez znaczenia szczególnie w badaniach nad odpornością komórkową u ludzi. Metoda polega w skrócie na wysiewaniu komórek docelowych na małe płytki plastikowe zawierające liczne mikrokomory, a następnie na liczeniu wszystkich komórek docelowych (rys. 1). Cytotoksyczność limfocytów dodawanych do mikrokomór w odpowiedniej proporcji do liczby komórek docelowych jest wyrażana jako odsetek redukcji komórek docelowych w porównaniu z odpowiednimi próbami kontrolnymi.

Kontrolę stanowią komórki docelowe bez limfocytów lub komórki docelowe w obecności tej samej liczby limfocytów otrzymanych od zdrowych nieuodpornionych dawców. Reakcję blokowania cytotoksyczności limfocytów ujawnia się przez dodanie surowicy pochodzącej od dawcy uodpornionego w porównaniu z wpływem surowicy pochodzącej od dawcy zdrowego nieuodpornionego. W ten sposób można mierzyć stopień blokowania swoistej komórkowej odporności przez autologiczne surowice.

ZNACZENIE CZYNNIKÓW ZAWARTYCH W SUROWICY W INTERAKCJI GOSPODARZ — NOWOTWÓR

Od ponad 15 lat jest wiadomo, że surowice zwierząt z przeszczepialnym nowotworem mogą pobudzać wzrost tych samych komórek nowotworowych u innych zwierząt [7, 18, 22]. Hellström [12] po raz pierwszy w układzie syngenicznym wykazał, że surowice zwierząt z różnym nowotworem mogą blokować komórkową cytotoksyczność *in vitro*. W badaniach tych surowicę uzyskiwano od myszy z mięsakiem rosnącym

progresywnie, wywołanym wirusem Moloneya MSV. Wykazano, że takie surowice mogą hamować niszczenie komórek nowotworowych mięsaka przez uczulone komórki węzłów chłonnych. Surowice zwierząt normalnych nieuczulonych nie wpływały na efekty cytotoksyczne limfocytów. Efekt blokowania w tych doświadczeniach był swoisty, bowiem surowice blokujące nie wykazywały żadnych właściwości w obecności innych komórek nowotworowych takich jak samorzutny rak sutka lub mięsak,



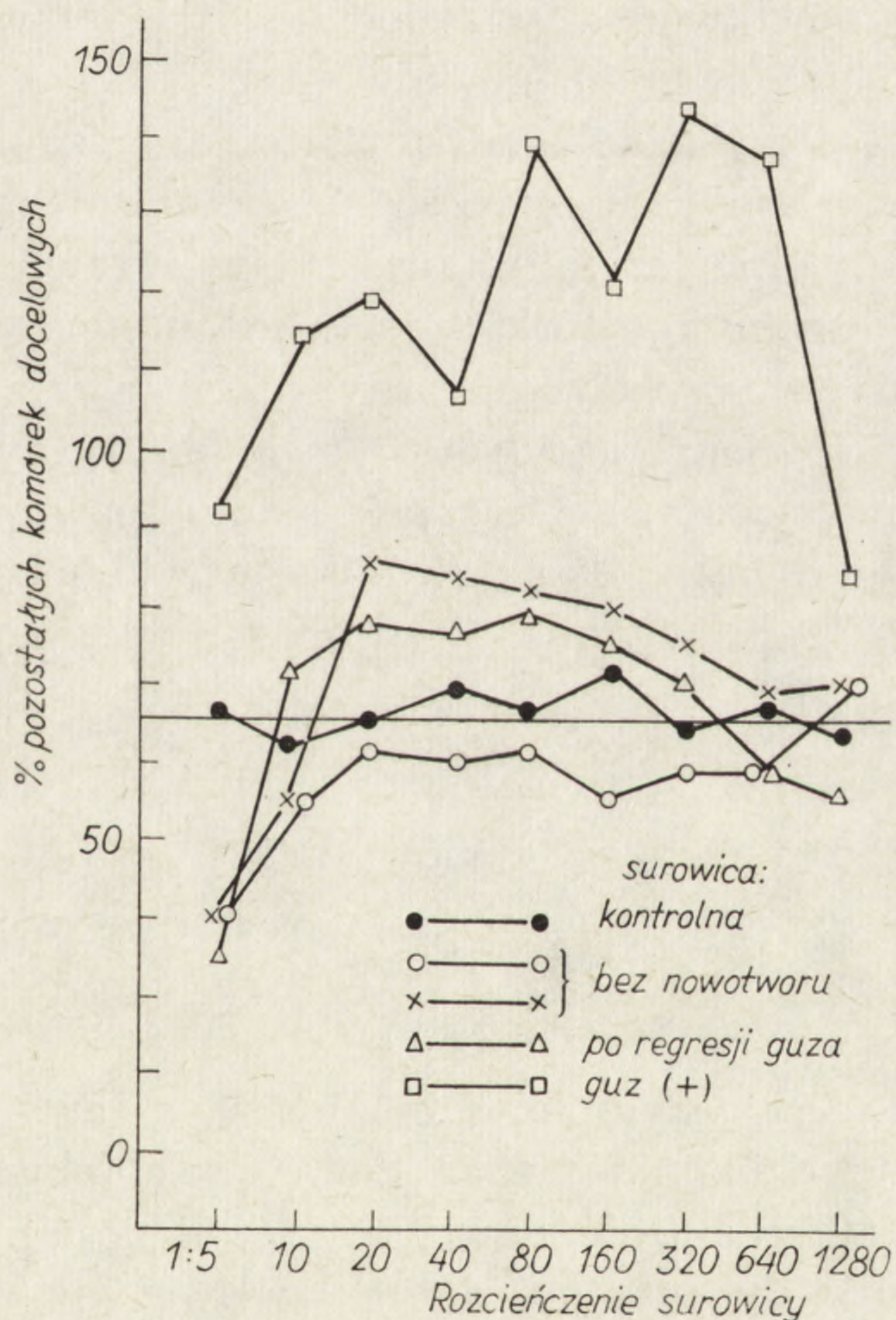
Rys. 1. Diagram przedstawia schematycznie zasadę wykonywania testu cytotoksycznego w mikroplatkach

A — Komórki docelowe z nieuczulonymi, kontrolnymi komórkami efektorowymi. B — Komórki docelowe z uczulonymi limfocytami plus surowica kontrolna; redukcja liczby komórek docelowych o 40%. C — Komórki docelowe z uczulonymi limfocytami plus surowica blokująca; redukcja komórek docelowych zmniejszona do 10%. D — Komórki docelowe z uczulonymi limfocytami plus surowica blokująca plus surowica odblokowująca; redukcja komórek docelowych ponownie wynosi 40% (wg Allisona [1])

wywołane stosowaniem metylocholantrenu. Właściwości blokujących nie wykazywały surowice zwierząt, u których nowotwór ulegał regresji. Jednakże w badaniach Skurzaka i wsp. [28, 29] stwierdzono, że surowice zwierząt, u których przeszczep nowotworu wywołanego wirusem MSV ulegał regresji, również posiadają właściwości blokujące cytotoksyczność uczulonych limfocytów. Efekt ten był wyraźnie widoczny przy niskim stężeniu badanej surowicy, podczas gdy ta sama surowica w wysokim stężeniu stymulowała cytotoksyczność limfocytów (rys. 2). Ten dwufazowy efekt działania surowicy występował dość regularnie i dotyczył głównie surowic uzyskiwanych od zwierząt po regresji nowotworu. Autorzy tłumaczyli obserwowany efekt prawdopodobną zmianą stężenia i pro-

porcji swoistych przeciwciał. Za efekt wzmagania cytotoksyczności limfocytów odpowiedzialne były prawdopodobnie immunoglobuliny klasy IgM, których stężenie w surowicy jest niewielkie. Przy znacznym rozcieńczeniu surowicy za efekt blokowania mogłyby być odpowiedzialne immunoglobuliny klasy IgG, których stężenie w surowicy jest znacznie wyższe niż IgM.

Potwierdzenie tych spostrzeżeń znajdujemy w pracy Ankersta [2], który w badaniach nad nowotworami wywołanymi adenowirusem typ 12 stwierdził, że blokujące właściwości surowicy zlokalizowane są we frak-



Rys. 2. Wpływ surowic uzyskiwanych od szczurów szczepionych wirusem Moloneya, na cytotoksyczność uczulonych limfocytów przeciwko komórkom docelowym, posiadającym na powierzchni swoisty antygen Moloneya. Limfocyty uczulone wywoływały redukcję komórek docelowych o 33,5% (linia pozioma). Surowica pochodząca od szczura z guzem rosnącym progresywnie blokowała cytotoksyczność limfocytów. Pozostałe surowice pochodzące od zwierząt po regresji nowotworu lub bez objawów wzrostu nowotworowego wywoływały efekt wzbudzenia toksyczności limfocytów w wysokich stężeniach i blokowanie toksyczności w niskich stężeniach. Same surowice pozostawały bez wpływu na liczbę komórek docelowych (wg Skurzaka i wsp. [28])

cji 7S. Dalsze dowody wskazujące na udział czynników blokujących odporność komórkową *in vitro* i *in vivo* dostarczyły badania Sjögrena i wsp. [26] wykonane nad nowotworami indukowanymi wirusem Polyoma u szczurów. Surowice zwierząt z rosnącym nowotworem miały zdolność przyspieszania wzrostu nowotworu *in vivo*, jak również hamowały komórkową cytotoksyczność limfocytów przeciwko komórkom nowotworowym Polyoma *in vitro*.

Ten rodzaj korelacji wyników wskazuje na użyteczność testu mikrocytotoksycznego w badaniach nad odpornością komórkową u zwierząt i ludzi.

Aktywność blokująca surowic została wykazana w badaniach nad różnymi modelami nowotworów u zwierząt [8, 11] i w badaniach nad surowicami u chorych z różnymi nowotworami [16, 17]. Większość osobników z nowotworem posiada komórki limfoidalne zdolne do reagowania przeciwko ich własnym komórkom nowotworowym. Jeżeli nowotwory rosną progresywnie, czynniki zawarte w surowicy mogą swoiście blokować cytotoksyczność komórek przeciwko autologicznym komórkom nowotworowym lub też przeciwko różnym komórkom nowotworowym powiązanym właściwościami antygenowymi. Jeżeli czynniki blokujące w surowicy mogą odgrywać rolę w zapobieganiu rozwoju obrony immunologicznej gospodarza przeciwko nowotworowi, to mogą również mieć istotne znaczenie w zapobieganiu odrzucania przeszczepu allogenicznego [1].

WŁAŚCIWOŚCI CZYNNIKÓW BLOKUJĄCYCH CYTOTOKSYCZNOŚĆ LIMFOCYTÓW

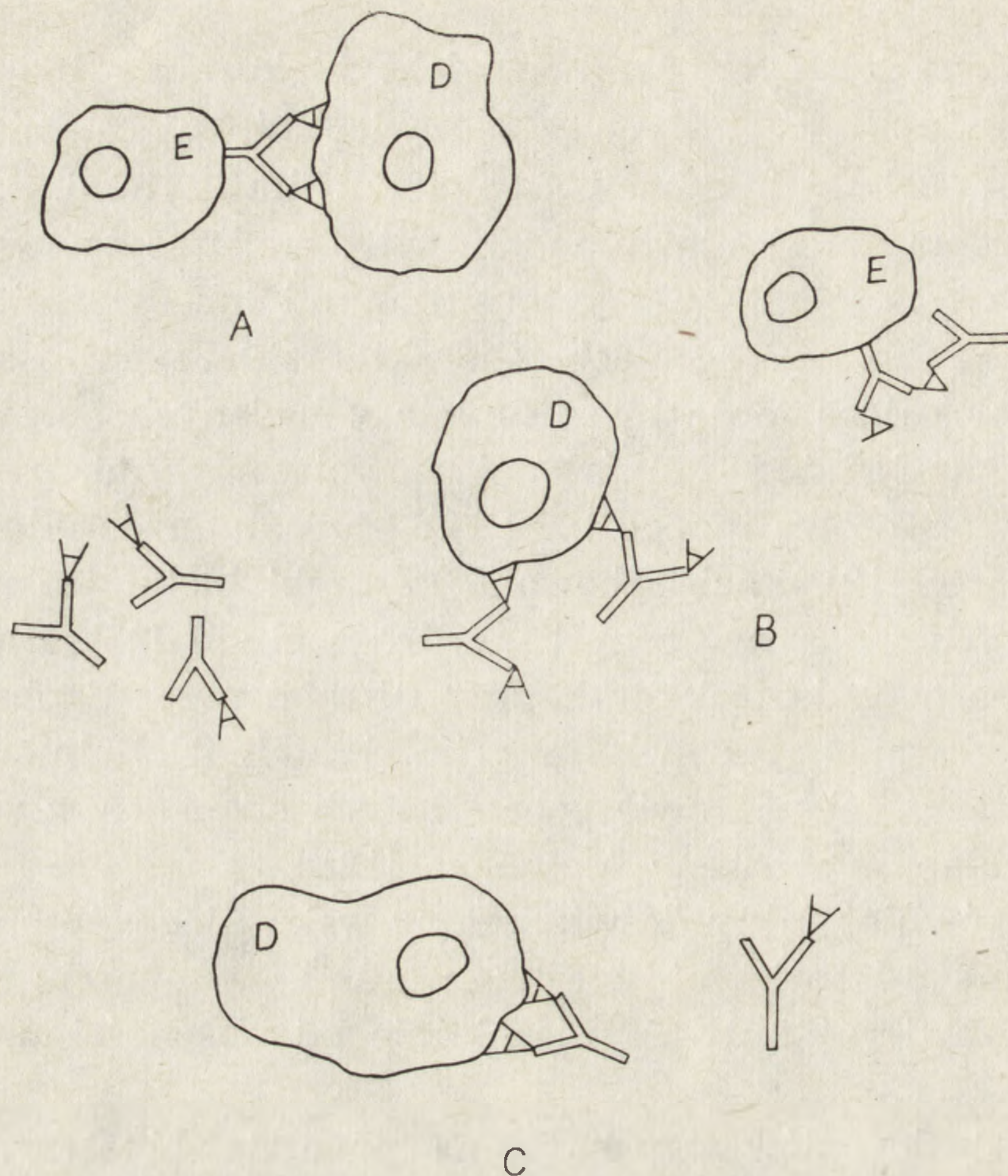
Właściwości i cechy czynników blokujących zawartych w surowicy i ich mechanizm działania nie są dotychczas dobrze poznane. Niemniej istnieje dostateczna ilość dowodów doświadczalnych pozwalająca przedstawić w formie dyskusyjnej dotychczasową wiedzę w tej dziedzinie. Dobrze udokumentowane prace, które wykazały, że immunoglobuliny klasy IgG₂ są odpowiedzialne za pobudzenie wzrostu alloprzeszczepów nowotworowych u myszy zostały wykonane przez Tagasuki i Klein [31], Safforda i Tokuda [25]. Dalszy rozwój badań w tym kierunku wykazał, że usunięte immunoglobuliny (elucja przy niskim pH) z nowotworów syngenicznych u myszy należą do grupy IgG₂ [24]. Należy podkreślić, że surowice pochodzące od zwierząt wielokrotnie immunizowanych mogą również blokować cytotoksyczność limfocytów [9, 13, 23, 31], jak również transformację limfocytów w mieszanym teście leukocytarnym

[10]. We wszystkich tych pracach efekt blokowania był widoczny po inkubacji komórek docelowych z surowicą blokującą, nie występował jednakże po podobnej inkubacji surowicy z limfocytami.

Blokujące czynniki ujawnione *in vitro* podczas testowania surowic pochodzących od osobników z autogenicznymi lub syngenicznymi nowotworami wykazują szereg cech charakterystycznych dla przeciwciał. Aktywność blokująca może być usunięta z badanych surowic drogą absorpcji z odpowiednimi komórkami nowotworowymi, natomiast inne komórki (nowotworowe innego typu lub normalne) nie eliminują aktywności blokującej [12]. Zaabsorbowane czynniki blokujące na komórkach nowotworowych mogą być odzyskane drogą elucji [26]. Blokujące czynniki należą na ogół do frakcji 7S przy filtracji przez Sephadex, a przeciwciała skierowane przeciwko mysim immunoglobulinom IgG mogą znosić blokujący efekt surowic pochodzących od myszy z rosnącym mięsakiem wywołanym wirusem Moloneya [12].

Istnieją również fakty doświadczalne wskazujące, że czynniki blokujące, uzyskane od zwierząt z nowotworami, w oparciu o badania *in vitro*, mogą zawierać antygen niezależnie od obecności przeciwciał [12, 13, 26].

Najwięcej dowodów uzyskano na poparcie hipotezy, że czynniki blokujące stanowią kompleks antygen - przeciwciało. Kiedy znany antygen nowotworowy i swoiste przeciwciała zostaną wymieszane razem poza ustrojem, to taka mieszanina posiada właściwości blokujące, mimo że ani antygen, ani przeciwciało z osobna nie hamują cytotoksyczności limfocytów [3]. Jeżeli jednak antygen zostanie dodany do limfocytów, to wówczas może nastąpić blokowanie cytotoksyczności tych limfocytów [4]. Mechanizm takiej reakcji przedstawia schematycznie rys. 3. Kompleks antygen - przeciwciało może łączyć się z komórką docelową poprzez przeciwciało lub z miejscami receptorowymi dla antygeny na powierzchni komórki efektorowej. Jak to wykazał Sjögren i Hellström [27] kompleks antygen - przeciwciało może być odzyskany z powierzchni komórki docelowej drogą dysocjacji w niskim pH. Antygen i przeciwciało będące składowymi kompleksu mogą być rozdzielone przez dysocjację i odzyskane drogą filtracji poprzez błony, które zatrzymują wysoko cząsteczkowe przeciwciała, ale nie zatrzymują cząsteczek antygenowych. Zanim przyjmiemy hipotezę udziału kompleksu antygen - przeciwciało w zjawisku blokowania komórkowej odporności, wymagane są dalsze badania dotyczące tego zjawiska. Istotne jest poznanie struktur cząsteczek zaangażowanych w procesie blokowania. Niezbędne są dalsze dowody wskazujące, czy rzeczywiście czynnikiem blokującym są kompleksy immunologiczne, jaki jest skład kompleksów oraz dokładne właściwości antygenów i przeciwciał będących składowymi kompleksów.



Rys. 3. Schematyczna ilustracja udziału przeciwciał w interakcji komórki efektorowej (E) z komórką docelową (D)

A — kontakt komórki efektorowej poprzez swoiste receptory z antygenem (A) obecnym na powierzchni komórki docelowej. B — kompleks antygen-przeciwciało wiąże się z antygenem na powierzchni komórki docelowej lub ze swoistymi receptorami na powierzchni komórki efektorowej. Sytuacja kiedy ujawnia się efekt blokowania reakcji cytotoksycznej, C — wolne przeciwciała z komponentą Fc zdolne do reagowania z receptorami komórek efektorowych mogą wzmacniać cytotoksyczność tych komórek. Takie przeciwciała mogą wymienić kompleksy antygen-przeciwciało na powierzchni. Na rysunku widoczny jest również wolny kompleks antygen-przeciwciało (wg Allisona [1])

CZYNNIKI ODBLOKOWUJĄCE

Ostatnio uzyskano dowody doświadczalne wskazujące, że niektóre surowice mają zdolność odblokowywania hamującego efektu surowicy blokującej. Po zmieszaniu surowicy odblokowującej (która może pochodzić np. od zwierząt po regresji nowotworu) z surowicą blokującą, ujawnia się ponownie cytotoksyczność limfocytów [5]. Schematyczne przykłady powyższego zjawiska znajdujemy na rysunkach 1 i 3. Obserwacje wskazujące na istnienie korelacji między efektem działania surowicy odblokowującej *in vitro* i *in vivo* zostały opisane przez Hellströma i wsp. [5] oraz Bansala i wsp. [13].

Surowica odblokowująca wstrzyknięta szczurom zapobiega wzrosto-

wi nowotworów wywołanych wirusem Polyoma, a także może zapobiegać pojawianiu się czynnika blokującego w surowicy [6]. Zjawisko to nie jest związane z lizą komórek nowotworowych, wywołaną poprzez przeciwciała. Podobnie u ludzi z samorzutną remisją nowotworu lub z nowotworem leczonym chemicznie można wykazać istnienie surowicy odblokowującej [14]. Czynniki ten, podobnie jak w badaniach u zwierząt, ma cechy swoistości, co wynika z faktu, że surowica odblokowująca ujawniona w układzie raka jelita grubego u ludzi nie wykazuje tych właściwości wobec komórek czerniaka i vice versa. Prosta interpretacja prowadzi do wniosku, że czynnik odblokowujący stanowi wolne przeciwciało, które jest zdolne wymienić kompleks immunologiczny związany z komórką docelową i działać synergistycznie z komórkami efektorowymi w ich aktywności przeciwko komórkom docelowym (rys. 3). Potwierdzeniem tego przypuszczenia są badania Mortona i wsp. [21], w których wykazano technikami immunofluorescencji obecność swoistych przeciwciał w surowicach posiadających właściwości odblokowujące.

LITERATURA

- [1] ALLSON A. C., Immunological tolerance, [w] *Clinical Immunobiology*, wyd. Bach F. H., Good R. A., Academic Press, New York, 1: 113–138, 1972.
- [2] ANKERST J., Demonstration and identification of cytotoxic antibodies and antibodies blocking the cell-mediated antitumor immunity against adenovirus type 12 induced tumors, *Cancer Res.*, 31: 997–1003, 1971.
- [3] BALDWIN R. W., PRICE M. R., ROBINS R. A., Blocking of lymphocyte — mediated cytotoxicity for rat hepatoma cells by tumor — specific antigen — antibody complex, *Nature New Biology*, 238: 185–187, 1972.
- [4] BALDWIN R. W., BOWEN J. G., PRICE M. R., Detection of circulating hepatoma D23 antigen and immune complexes in tumour bearer serum, *Brit. J. Cancer*, 28: 16–24, 1973.
- [5] BANSAL S. C., SJÖGREN H. O., Demonstration of „unblocking” serum activity in vitro in the Polyoma system and possible correlation with antitumor effects of antiserum in vivo, *Nature New Biol.*, 233: 76, 1971.
- [6] BANSAL S. C., HARGREAVES R., SJÖGREN H. O. Facilitation of polyoma tumor growth in rats by blocking sera and tumor eluate, *Int. J. Cancer*, 9: 97–108, 1972.
- [7] BATCHELOR J. R., The use enhancement in studying tumor antigens, *Cancer Res.*, 28: 1410–1414, 1968.
- [8] BLAIR P. B., LANE M. A., Serum factors in mammary neoplasia: enhancement and antagonism of spleen cell activity in vitro detected by different methods of serum factor assay, *J. Immunology*, 112: 439, 1974.
- [9] BRUNNER K. T., MANEL J., SCHINDLER R., Inhibitory effect of isoantibody on in vivo sensitization and on the in vitro cytotoxic action of immune lymphocytes, *Nature*, 213: 1246, 1967.
- [10] CEPPELINI R., BONNARD G. D., MIGGIANO V. C., POSPISIL M., CURTON

- E. S., PELLEGRINO M., Mixed leucocyte cultures and HL - A antigens. I. Reactivity of young fetuses, newborns and mothers at delivery, *Transplant. Proc.*, **3**: 58, 1971.
- [11] HAYAMI M., HELLSTRÖM I., HELLSTRÖM U. E., LANNIN D. R., Further studies on the ability of regressor sera to block cell mediated destruction of Rous Sarcomas, *Int. J. Cancer*, **13**: 43-53, 1974.
- [12] HELLSTRÖM I., HELLSTRÖM K. E., Studies of cellular immunity and its serum - mediated inhibition in Moloney - virus - induced mouse sarcomas, *Int. J. Cancer*, **4**: 587-600, 1969.
- [13] — Colony inhibition studies on blocking and non - blocking serum effects on cellular immunity to Moloney sarcomas, *Int. J. Cancer*, **5**: 195-201, 1970.
- [14] — Cellular immunity and blocking antibodies to tumors, *J. Reticuloendothelial Soc.*, **10**: 131-136, 1971.
- [15] — Lymphocyte — mediated cytotoxicity and blocking serum activity to tumor antigen, [w] *Advances in Immunology*, ed. Dixon F. J., Kunkel H. G., Academic Press, New York, **18**: 209-277, 1974.
- [16] HEPPNER G. H., STOLBACH L., BYRNE M., CUMMINGS F. J., Cell - mediated and serum blocking reactivity to tumor antigens in patients with malignant melanoma, *Int. J. Cancer*, **11**: 245-260, 1973.
- [17] JOSE D. G., SKVARIL F., Serum inhibitors of cellular immunity in human neuroblastoma. IgG subclass of blocking activity, *Int. J. Cancer*, **13**: 173, 1974.
- [18] KALLIS N., BRYANT B. F., Factors determining homograft destruction and immunological enhancement in mice receiving successive tumour inocula, *J. Nat. Cancer Inst.*, **40**: 691-704, 1958.
- [19] KALISS N., Immunological enhancement of tumor homografts in mice, a review, *Cancer Res.*, **18**: 992, 1958.
- [20] MACLENNAN I. C. M., Antibody in the induction and inhibition of lymphocyte cytotoxicity, *Transplant. Rev.*, **13**: 67-90, 1972.
- [21] MORTON D. L., MALMGREN R., A. HOLMES E. C., KETCHAM A. S., Demonstration of antibodies against human malignant melanomas by immunofluorescence, *Surgery*, **64**: 233-240, 1968.
- [22] MÖLLER G., Antibody - induced depression of the immune response: a study of the mechanism in various immunological systems, *Transplantation*, **2**: 405-415, 1964.
- [23] MÖLLER E., Antagonistic effects of humoral isoantibodies on the in vitro cytotoxicity of immune lymphoid cells, *J. Exp. Med.*, **122**: 11, 1965.
- [24] RAN M., WITZ T. P., Tumor — associated immunoglobulins. Enhancement of syngenic tumours by IgG - 2 containing tumor eluate, *Int. J. Cancer*, **9**: 242-247, 1972.
- [25] SAFFORD W., TOKUDA S., Suppression of graft - versus - host reaction by passive immunization of donor against recipient antigens, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **133**: 651-654, 1970.
- [26] SJÖGREN H. O., HELLSTRÖM I., BANSAL S. C., HELLSTRÖM K. E., Suggestive evidence that the „blocking antibodies” of tumor - bearing individuals may be antigen — antibody complexes, *Proc. Nat. Acad. Science*, **68**: 1372-1375, 1971.
- [27] SJÖGREN H. O., HELLSTRÖM I., BANSAL S. C., WARNER G. A., HELLSTRÖM K. E., Elution of „blocking factors” from human tumors, capable of abrogating tumor - cell destruction by specifically immune lymphocytes, *Int. J. Cancer*, **9**: 274-283, 1972.

- [28] SKURZAK H. M., KLEIN E., YOSHIDA T. O., LAMON E. W., Synergistic or antagonistic effect of different antibody concentration on in vitro lymphocyte cytotoxicity in the Moloney sarcoma virus system, *J. Exp. Med.*, **135**: 997-1002, 1972.
- [29] — In vitro interaction of serum and lymphocytes in the MSV system, [w] *Advances in the Biosciences*, wyd. Raspé G., Bernhard S., Pergamon Press, Vieweg, **12**: 495-509, 1973.
- [30] TAKASUGI M., KLEIN E., A microassay for cell-mediated immunity, *Transplantation*, **9**: 219-227, 1970.
- [31] — The role of blocking antibodies in immunological enhancement, *Immunology*, **21**: 675-684, 1971.

Otrzymano: 11 czerwca 1975.

Przyjęto: 30 czerwca 1975.

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

PRZEGLĄD METOD IZOLACJI I ROZDZIAŁU KOMÓREK

Sławomir R. HALWA, Jan JAROSZEWSKI i Jerzy B. WARCHOŁ

Zakład Histologii i Embriologii Instytutu Biostruktury
Akademii Medycznej w Poznaniu
Zakład Genetyki Człowieka PAN w Poznaniu

Streszczenie. Metody pozwalające na izolację komórek z narządu i ich rozdzielenie na mniej lub bardziej czyste frakcje stanowią dla cytobiologa nieocenione narzędzie badawcze. Pozwalają one na analizę *in vitro* czynności poszczególnych typów komórek, niezależnie od układu, w jakim występują one w ustroju. Z metod izolacji omówiono zarówno metody izolacji mechaniczne, jak i enzymatyczne, zwracając uwagę na warunki zapewniające nienaruszenie biologicznej integralności komórki. Wśród metod rozdziału wyróżniono metody fizykochemiczne, mające bardziej ogólne zastosowanie i metody biologiczne, szczególnie szeroko rozwinięte dla oczyszczania poszczególnych rodzajów komórek immunokompetentnych.

W ostatnich latach obserwuje się duży rozwój metod pozwalających na izolację i rozdzielanie komórek pochodzących z różnych narządów i tkanek. Metody te bowiem są bardzo przydatne w rozwiązywaniu szeregu zagadnień z zakresu biologii komórki, cytofizjologii, immunologii czy też endokrynologii doświadczalnej.

Metody izolacji komórek stawiają sobie za cel wyodrębnienie komórek z narządów i tkanek przy równoczesnym jak najpełniejszym zachowaniu ich właściwości biologicznych. Otrzymane na tej drodze komórki są z kolei bardzo często rozdzielane za pomocą specjalnych metod na mniej lub bardziej czyste frakcje komórkowe. Również w tych metodach zwraca się bardzo dużą uwagę na zachowanie jak najdalej idącej wartości biologicznej badanych komórek. Poniższy opis ma ogólnie orientować w temacie i nie wyczerpuje obszernego piśmiennictwa z tego zakresu.

1. METODY IZOLACJI KOMÓREK

Do chwili obecnej opracowano szereg metod służących do izolowania komórek, mających większe lub mniejsze zastosowanie w praktyce laboratoryjnej. W zasadzie metody te można podzielić na mechaniczne i enzymatyczne. Podział ten w pewnym sensie jest nieadekwatny, ponieważ w szeregu przypadków stosowana jest izolacja poprzez połączenie obu tych metod.

Pierwsza z wymienionych metod polega na mechanicznym rozrywaniu ciągłości narządów, w wyniku czego dochodzi do wyizolowania się poszczególnych komórek. Druga natomiast metoda związana jest z enzymatycznym rozluźnianiem połączeń między komórkami, prowadzącym w ostatecznym wyniku do izolacji komórek.

1.1. METODY MECHANICZNE

Metody mechaniczne najczęściej stosowane są dla tych narządów, których utkanie jest stosunkowo luźne (śledziona, węzły chłonne, gonada męska) lub w przypadku, gdy specyficzna struktura narządu nie pozwala na izolację za pomocą metod biochemicznych (układ nerwowy).

Spośród tych metod najczęściej stosowane jest przecieranie narządu przez siatki nylonowe lub stalowe o stopniowo zmniejszających się wymiarach oczek. Prześwity najgęstszej siatki muszą pozwalać na swobodne przechodzenie największych komórek [12, 31, 49, 67]. Do tego celu można również używać „prasy tkankowej” z odpowiednim kompletem siatek [17]. Zwykle stosowane są siatki, których wymiary oczek wahają się w granicach od 740 μm do końcowego wymiaru 37 μm . Na innej zasadzie opiera się izolacja komórek nerwowych wprowadzona przez Satake i Abe [66]. Autorzy ci, po skrojeniu żyłką tkanki nerwowej na drobne części rozdrabniali ją w homogenizatorze Elvhjema - Pottera o prześwicie 0,2 mm poprzez trzynastokrotne, bardzo delikatne przesunięcie tłoka w górę i w dół. Lam i wsp. [36] izolowali komórki z gonady męskiej posługując się przyrządem zbudowanym z 50 żyłek ustawionych równolegle w odstępach 0,2 mm. Tak przygotowany materiał poddawali dalszemu rozdrobnieniu przez kilkunastokrotne wciągnięcie i wydmuchnięcie z pipety. Shortman [75] uważa, że izolację limfocytów z węzła chłonnego lub śledziona przeprowadzić można krojąc te narządy nożyczkami na fragmenty i następnie „wyciskając” z nich komórki na siatce o odpowiednich oczkach.

1.2. METODY ENZYMATYCZNE ORAZ WYKORZYSTUJĄCE ZWIĄZKI KOMPLEKSUJĄCE

Najczęściej izolację komórek przeprowadza się w oparciu o metody enzymatyczne. Polegają one na trawieniu substancji spajających komórki za pomocą enzymów hydrolitycznych. Metody te są od dawna wypróbowane przy zakładaniu hodowli tkankowych. Do najbardziej popularnych enzymów należą peptydazy takie jak trypsyna, kolagenaza, elastaza lub pronaza czy też enzymy hydrolizujące substancje mukopolisacharydowe jak hialuronidaza czy neuraminidaza. Często używane są kombinacje enzymów z obu grup. W niektórych przypadkach używa się dodatkowo DNA - zę i RNA - zę, które nie mając wpływu na izolację komórek zapobiegają żelifikacji kwasów nukleinowych pochodzących z uszkodzonych komórek.

Ze względu na udział jonów wapnia w połączeniach międzykomórkowych, niektórzy autorzy używali do izolowania komórek kwasu etylenodwuaminoczworooctowego (EDTA), kompleksującego kationy dwuwartościowe. Istnieją także prace [60, 61] donoszące o skutecznym działaniu izolującym środków kompleksujących jony potasowe (czterofenyloboron sodu — TPB). Najczęściej stosowane stężenia substancji rozluźniających połączenia między komórkami oraz używane płyny inkubacyjne podane są w tabeli 1. Jak z niej wynika, najczęściej stosowanym enzymem jest trypsyna w stężeniu nie mniejszym niż 0,1⁰%. Szereg autorów w przypadku jej użycia, po zakończeniu trawienia stosuje swoiste dla tego enzymu inhibitory, takie jak np. z pewnej odmiany fasoli [79]. Jest to szczególnie istotne w przypadku badań nad zjawiskami dotyczącymi błon komórkowych. Użycie do izolacji tylko neuraminidazy, względnie EDTA jest rzadko stosowane, ze względu na konieczność przedłużenia okresu inkubacji i występującym wtedy (po czasie dłuższym niż 30 min.) efektem cytotoksycznym [26, 60, 96]. Trawienie enzymatyczne przeprowadzane jest zazwyczaj w połączeniu z wytrząsaniem lub mieszaniem płynu inkubacyjnego. Ponadto bardzo duże znaczenie dla zachowania właściwości biologicznych pewnych rodzajów izolowanych komórek ma utrzymywanie stałej atmosfery o wysokiej koncentracji tlenu oraz ciągła kontrola pH płynu inkubacyjnego [35, 69].

2. METODY ROZDZIAŁU KOMÓREK

Jak już wspomniano we wstępie, dla zdobycia bliższych informacji dotyczących poszczególnych rodzajów komórek badanego narządu, po procesie izolacji przystępuje się do rozdzielania frakcji zawierających poszczególne rodzaje komórek. Przeprowadzenie jednoznacznego podzia-

łu metod stosowanych do rozdzielania komórek napotyka na szereg trudności. Ogólnie jednak metody te można podzielić na fizykochemiczne i biologiczne.

TABELA 1. Płyny inkubacyjne najczęściej stosowane do izolacji komórek

	Trypsyna	Kolagenaza	Pronaza	Hialuronidaza	Neuraminidaza	EDTA
Płyn Krebsa-Ringera	0,25% [79] 0,1 % [26]	0,5% [63]			8×10^{-6} g/ml [26]	1mM[26]
Płyn Hanksa		1% [37] ^d 0,05% [35,58] ^{c,e}		0,1% [35,58] ^{c,e}		
Płyn Tyroda	0,25% [41]		0,25% [41]			
Płyn Rinaldiniego	0,25% [29] ^b					
PBS	0,25% [99]					
Bufor HEPES		0,35% [82] ^a		0,1% [82] ^a		
Bufor fosforanowy						0,4% [29] ^b
Sacharoza w buforze imidazolowym	1% [37] ^d					
SMEM	0,1% [28]					

a, b, c — roztwory używane łącznie do izolacji komórek w tej samej procedurze, d — mieszaniny używane do izolacji komórek po utrwaleniu materiału w aldehydzie glutarowym, e — substancje używane łącznie; w miejsce płynu Hanksa używano roztworu soli (Saline A).

Objaśnienie skrótów: PBS — buforowany roztwór soli fizjologicznej HEPES — N-2-hydroksyetylopiperazyno-N'-2-etanosulfonowy kwas, SMEM — środowisko podstawowe minimalne spinnera.

2.1. METODY FIZYKOCHEMICZNE

Metody te wykorzystują różnice we właściwościach fizykochemicznych poszczególnych komórek. Podzielić je można na:

2.1.1. metody wykorzystujące różnice w masie właściwej i objętości komórek,

2.1.2. metody wykorzystujące różnice we właściwościach powierzchniowych komórek,

2.1.3. metody wykorzystujące różnice we właściwościach optycznych komórek.

2.1.1. Metody wykorzystujące różnice w objętości komórek i masie właściwej

2.1.1.1. Przesiewanie komórek. Metoda ta jest jednym z najprostszyc sposobów rozdzielania komórek wykorzystującym różnice między ich średnicami. Teoretycznie przyjmuje się, że w wyniku przesiewania komórek poprzez odpowiednio dobrane sita można je rozdzielić w zależności od ich wymiarów. W praktyce napotyka się na szereg trudności związanych z kształtem komórek, ich zlepianiem się i zatykaniem oczek sita [31].

2.1.1.2. Sedymentacja komórek w polu grawitacyjnym. Metoda sedymentacyjna opiera się na różnicy w szybkości opadania poszczególnych komórek w polu przyciągania ziemskiego. Szybkość ta zależy od średnicy d i masy właściwej komórki D_p , masy właściwej D_m i lepkości η roztworu, w którym odbywa się sedymentacja, i wyraża się wzorem

$$S = \frac{D_p - D_m}{18\eta} g d^2, \quad (1)$$

gdzie g oznacza przyspieszenie ziemskie.

W większości przypadków masy właściwe poszczególnych rodzajów komórek różnią się między sobą w niewielkim stopniu, co powoduje, że praktyczna szybkość sedymentacji zależy głównie od kwadratu średnicy d^2 . Można zatem przyjąć, że wzór (1) będzie miał w przybliżeniu wartość

$$S = k d^2, \quad (2)$$

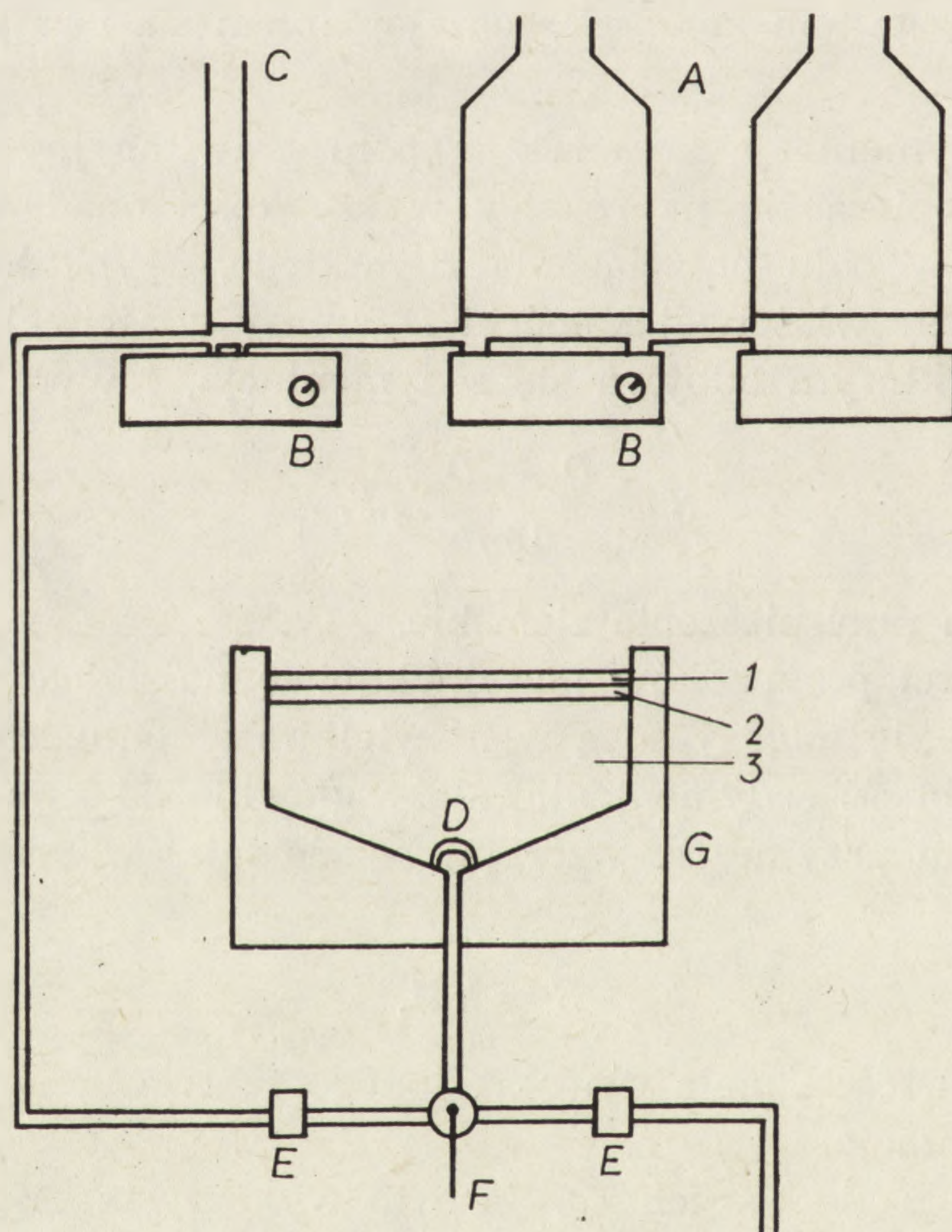
gdzie k jest wartością stałą dla określonego roztworu, w którym odbywa się sedymentacja.

Jako jeden z pierwszych zjawisko to wykorzystał Mel, który opracował metodę rozdziału komórek nazwaną STAFLO [44–46]. Ze względu jednak na skomplikowaną procedurę i pewne niekorzystne zjawiska hydrodynamiczne, zachodzące w komorze do rozdzielania, nie znalazła ona dotychczas szerokiego zastosowania.

Wydajnymi i często stosowanymi w praktyce metodami rozdziału opartymi na sedymentacji w polu grawitacyjnym są metody opracowane przez Petersona i Evansa [51] oraz Millera i Phillipsa [47]. Różnią się one jedynie niewielkimi szczegółami i z tego powodu omówione zostaną łącznie.

Używana do tego celu aparatura jest przedstawiona na rys. 1. Skła-

da się ona w zasadzie z urządzenia do wytwarzania gradientu ciągłego, komory sedymentacyjnej (o pojemności ok. 800 ml) oraz układów pozwalających na nakładanie w niej zawiesiny komórek i zbierania frakcji. Bardzo często stosuje się gradient z surowicy płodów cieląt (FCS) o stężeniu 5–30% uzyskanym przez rozcieńczenie buforowanym roztworem soli fizjologicznej (PBS). Użycie gradientu zapewnia optymalne warunki do nakładania komórek i zbierania frakcji. W wypełnionej komorze sedymentacyjnej znajdują się trzy warstwy 1, 2 i 3, tak jak to zaznaczono na rys. 1.



Rys. 1. Urządzenie do rozdzielania komórek drogą sedymentacji w polu grawitacji ziemskiej (wg Millera i Phillipsa [47])

A — wytwornik gradientu ciągłego, B — mieszadła magnetyczne, C — naczynie do nakładania komórek, D — „grzybek” regulujący warunki hydrodynamiczne podczas wypełniania i opróżniania komory, E — regulatory przepływu, F — kran trójdzielnny, G — komora sedymentacyjna (pojemność ok. 800 ml); 1 — warstwa 30 ml PBS, 2 — 20 ml zawiesiny komórek, 3 — gradient FCS w PBS

Gradient o podanych stężeniach ma ciężar właściwy w granicach od $1,004 \text{ g/cm}^3$ do $1,009 \text{ g/cm}^3$, co stanowi wartości mniejsze od średniej gęstości komórek jądrazastych (około $1,06 \text{ g/cm}^3$). Uważa się, że użycie

jako materiału do wytwarzania gradientu białek surowicy ma kilka stron dodatnich — m. in. zwiększa przeżywalność komórek, a także zapobiega ich agregacji. Często do otrzymywania gradientu posługujemy się albuminą surowicy.

Po 2–4 godzinach sedymentacji przebiegającej w temperaturze 4°C zbiera się frakcje o objętości około 15 ml.

Jednym z najważniejszych warunków wpływających na powodzenie rozdzielania komórek na drodze sedymentacji jest przestrzeganie górnej granicy ilości komórek wprowadzonych do komory, która nie powinna przekraczać 2×10^7 . Ilość wprowadzanych komórek można zwiększyć poprzez zastosowanie gradientu o specjalnym profilu. Posługując się powyższą metodą otrzymano dobre wyniki przy rozdzielaniu komórek szpiku [51], przysadki [28, 41], gonady męskiej [36] oraz krwinek białych [47].

2.1.1.3. Rozdzielanie komórek w oparciu o ich wirowanie w gradientie gęstości (wirowanie różnicowe). Dla rozdzielania komórek w oparciu o ich wirowanie opracowano szereg metod, z których należy wymienić takie, jak wirowanie izopykniczne i izokinetyczne.

W metodach polegających na wirowaniu komórek w gradientach na rozdział komórek wpływ mają nie tylko różnice w objętości, ale także w ich masach właściwych.

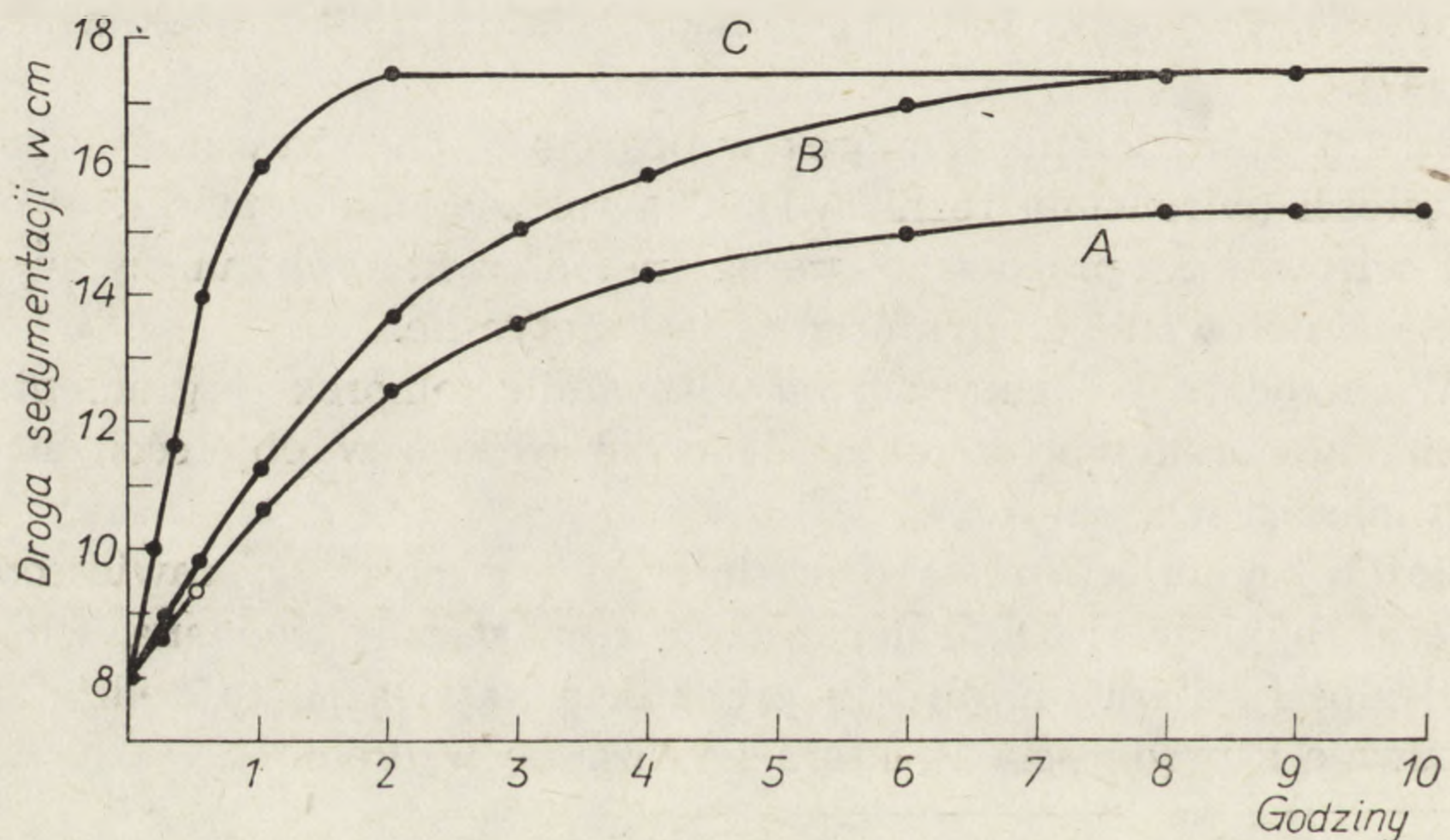
Jeżeli komórka kulista o średnicy d i gęstości D_p zawieszona jest w cieczy o gęstości D_m i lepkości η , a następnie poddana wirowaniu w odległości od osi obrotu r z prędkością kątową ω , to będzie się ona przesuwała z prędkością V , która wyraża się wzorem

$$V = \frac{d^2(D_p - D_m)\omega^2 r}{18\eta} \quad (3)$$

Przyjęto, że równanie to spełnione jest dla większości komórek i że ewentualny wpływ dodatkowych sił związany z ich nieregularnym kształtem można uznać za nieistotny w porównaniu z dużymi wartościami sił odśrodkowych [8].

Przy użyciu wirowania wyróżnia się w zasadzie dwa sposoby rozdzielania komórek, które opierają się na różnicach w ich masach właściwych lub średnicach. Aby lepiej zrozumieć zasady tych metod rozpatrzmy krzywe sedymentacji przedstawione na rys. 2 (wg Boone i wsp. [8]) dla trzech różnych komórek wirowanych w gradiencie, którego gęstość maksymalna jest równa lub nieco większa od masy właściwej komórek. Przeanalizujmy, jak będzie się zachowywała komórka A o średnicy 7,5 μm i masie właściwej 1,060 względem komórki B o tej samej średnicy i gęstości wynoszącej 1,070. Zgodnie z równaniem szybkości sedymenta-

cji podczas wirowania, komórka B będzie początkowo opadała szybciej niż komórka A, wskutek czego odległość między nimi będzie stale wzrastała. W miarę przesuwania się obu komórek w gradiencie gęstości, szybkości ich ruchu będą się stopniowo zmniejszały i ostatecznie zatrzymają się one w tych miejscach, w których ich masy właściwe będą odpowiadały gęstości gradientu. Innymi słowy komórki pod koniec wirowania będą znajdowały się w punktach izopyknicznych. Wirowanie, w którym profil gradientu i jego gęstość są tak zaplanowane, by komórki pod koniec wirowania znajdowały się w tych punktach, nazywa się izopyknicznym. Dodać tutaj należy, że wirowanie w gradiencie skokowym jest pewną odmianą wirowania izopyknicznego.



Rys. 2. Charakterystyka sedymentacji komórek o różnych średnicach i gęstościach podczas wirowania w gradiencie. Omówienie w tekście (wg Boone i wsp. [8])

Komórka	Średnica [μ]	Gęstość
A	7,5	1,060
B	7,5	1,070
C	15,0	1,070

Rozpatrzmy teraz jak będzie zachowywała się podczas wirowania komórka B o masie właściwej 1,070 i średnicy 7,5 μm względem komórki C o tej samej masie właściwej, a średnicy 15 μm . Jak można zauważyć na podstawie ich krzywych sedymentacji przedstawionych na rys. 2 komórka większa (C) będzie początkowo opadać wyraźnie szybciej niż mniejsza (B), co zgodne jest z równaniem na szybkość sedymentacji. W pewnym jednak momencie szybkości ich wyrównają się, a następnie, w przeciwieństwie do sytuacji początkowej, komórka mniejsza zacznie opadać szybciej od większej i spotkają się w punkcie izopyknicznym. Wynika z tego, że największa odległość między komórkami będzie wów-

czas, gdy ich szybkości opadania będą sobie równe. Gdy kształt gradientu i jego gęstość dobierzemy tak, by po zakończeniu wirowania komórki spełniały powyższy warunek, tzn. poruszały się z jednakową szybkością, ten sposób ich rozdzielania nazywać będziemy izokinetycznym.

Zwykle jednak mamy do czynienia z mieszaniną komórek, które różnią się między sobą zarówno pod względem wielkości, jak i masy właściwej. W takiej sytuacji odpowiednie obliczenia komputerowe oparte o krzywe sedymentacji pozwalają na podjęcie decyzji, jaka powinna być metoda, profil i skok gradientu oraz optymalny czas wirowania [57]. Oczywiście, można również znaleźć odpowiednie warunki rozdziału na zasadzie „prób i błędów”, ale jak to można zauważyć na rys. 2 niewłaściwy czas wirowania może spowodować złe rozdziały frakcji komórek.

Wirowania różnicowego komórek dokonywać można praktycznie na wszelkiego typu wirnikach horyzontalnych, przy czym dla jak najlepszego utrzymania ich stanu biologicznego wskazane jest używanie niskich sił odśrodkowych (nie większych niż 4000 *g*) [74]. Bardzo korzystne warunki, zarówno pod względem jednorazowo rozdzielanej ilości komórek, jak i układów hydrodynamicznych występujących w komorze sedymentacyjnej dają wolnoobrotowe wirniki strefowe Andersona [3]. Pretlow i Boone [56] polecają do omawianych celów oryginalny wirnik o krótkich ramionach.

Podobnie jak w metodzie sedymentacyjnej, istotne znaczenie posiada przestrzeganie górnej granicy liczby rozdzielanych komórek, gdyż w przeciwnym przypadku nie otrzymujemy dobrych rozdziałów. Należy również posługiwać się roztworami i gradientami izoosmotycznymi. Z tego powodu glukoza i szereg innych związków nie nadaje się do wytwarzania gradientu [74].

Odczynniki używane do wykonywania gradientu powinny spełniać kilka warunków, a między innymi:

nie wywierać wpływu toksycznego na komórkę,

zapobiegać agregacji komórek,

nie wykazywać zbyt dużych wahań w ciśnieniu osmotycznym w obrębie wytworzonego gradientu.

W związku z powyższym do celu tego najczęściej używane są albuminy osocza bydłęcego, które należy jednak przed użyciem przedializować, aby usunąć elektrolity zawarte w ich preparatach handlowych. Równie często stosowany jest wielkocząsteczkowy Ficoll (polisacharoza). Stosowano także roztwory renografiny [21], koloidalne roztwory krzemionki [52] oraz metrizamid [62].

2.1.1.4. Elutriacja. Metoda ta jest właściwie odmianą rozdzielania komórek przez wirowanie. Używany tutaj wirnik posiada 2 komory, z których jedna pełni rolę naczynia sedymentacyjnego, a druga osadnika.

W czasie wirowania do komory sedymentacyjnej wprowadzane są komórki, które w polu działania sił odśrodkowych ulegają rozdzielaniu. Wprowadzanie do komory sedymentacyjnej płynu powoduje stopniowe wyprowadzanie z niej lżejszych komórek, zbieranych następnie w osadniku. Dotychczas opracowano kilka rodzajów rotorów mogących być użytych w tej metodzie [43]. Omówiony sposób rozdziału, mimo szeregu zalet nie znalazł dotychczas szerszego zastosowania.

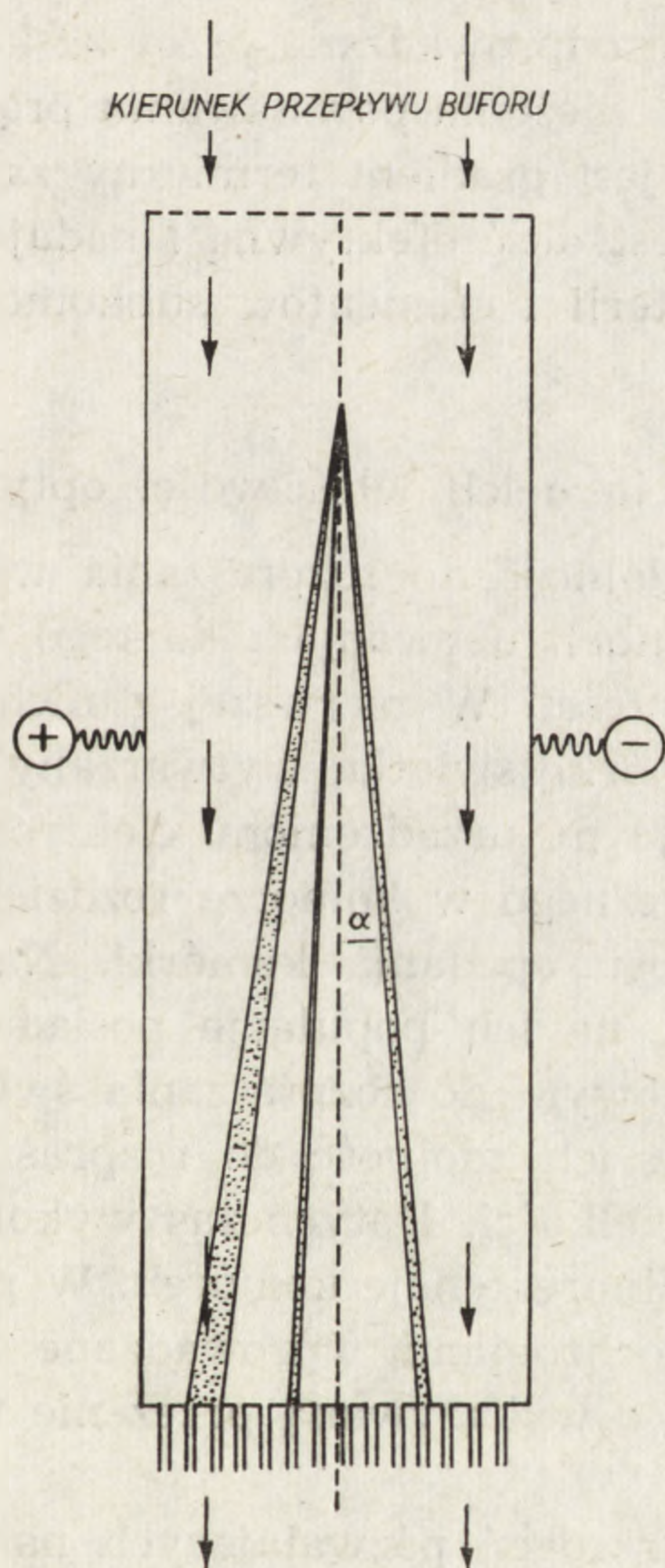
2. 1. 2. Metody wykorzystujące różnice we właściwościach powierzchniowych komórki

2.1.2.1. Rozdział przeciwprądowy. Roztwory takich substancji, jak dekstran i glikol polietylenowy (PEG) nie mieszają się ze sobą, tworząc układy dwufazowe. Z substancji tych można również przygotować roztwory izotoniczne, które są jedynie w niewielkim stopniu toksyczne dla komórek. Dzięki tym ich właściwościom można było opracować metody przeciwprądowego rozdziału komórek [2]. Zasada rozdziału przeciwprądowego polega na tym, że wskutek wzajemnego oddziaływania cząsteczek polimeru i plazmolemy, komórki mogą grupować się w pobliżu granicy faz. Tendencja do takiego układania się komórek zależy od właściwości ich powierzchni (prawdopodobnie główną rolę odgrywa tu ładunek powierzchniowy). W związku z tym komórki zróżnicować można na takie, które przy aktualnym stężeniu polimeru będą zgromadzone przede wszystkim na granicy faz i takie, które będą od niej oddalone. Ponadto trzeba dodać, że dzięki swoim właściwościom powierzchniowym mogą one mieć różne powinowactwo do obu roztworów polimerów. W związku z tym, jeżeli w probówce umieścimy roztwory dekstranu i PEG z zawiesiną komórek, a następnie poddamy wytrząsaniu, to po pewnej chwili od jego ukończenia, w fazie górnej (PEG) znajdować się będzie część komórek, część znajdować się będzie w pobliżu granicy faz, reszta natomiast komórek znajdować się będzie w fazie dolnej (dekstran). Poprzez odpowiednie odciążenie roztworów można otrzymać dwie frakcje, które poddać można ponownemu rozdzielaniu używając roztworów w innych stężeniach. Obecnie na rynku dostępne są aparaty do cienkowarstwowego rozdziału przeciwprądowego firmy Stalprodukter, Uppsala i LKB, Szwecja [1].

Metoda ta znalazła zastosowanie do rozdziału krwinek czerwonych [85, 88–90], oddzielania krwinek czerwonych od białych [86] oraz rozdziału komórek innych narządów [10, 87].

2.1.2.2. Elektroforeza komórek. Próby rozdzielania komórek wykorzystujące ich zachowanie się w polu elektrycznym dzięki ich ładunkowi powierzchniowemu były poczynione już w latach pięćdziesiątych. Jed-

nak, mimo pełnych założeń teoretycznych występowało szereg trudności, które nie pozwoliły na praktyczne wykorzystanie elektroforezy komórkowej [44–46]. Szereg kolejnych prób pozwoliło w ostateczności na zastosowanie tej metody do praktyki laboratoryjnej. Rozdział przeprowadza się na komórkach przepływających wraz z roztworem zawieszającym w polu elektrycznym. Zasadę tej metodyki poznać można bliżej na przykładzie aparatu do elektroforezy zaproponowanego przez Hanniga [22] (patrz rys. 3).



Rys. 3. Zasada elektroforezy komórek w aparacie wg Hanniga [22]. Omówienie w tekście

Zbudowany jest on z pionowo ustawionej komory, o długości 12,8 cm, wysokości 51,0 cm i szerokości 0,5–1 mm. Umieszczone po bokach komory elektrody oddzielone są od jej wnętrza błoną dializacyjną. Zawiesina komórek wprowadzana jest w sposób ciągły do buforu wypełniającego komorę. Przesuwanie komórek w komorze uwarunkowane jest od kilku czynników. Ruch ich ku dołowi uzależniony jest od siły grawitacji i przepływu cieczy w komorze. Przesunięcie natomiast poziome komórki jest

uwarunkowane działaniem pola elektrycznego (do 100 kV/cm). Z tego powodu tor opadania komórki ulega odchyleniu o pewien kąt α w stosunku do linii pionowej. Kąt ten określa wzór:

$$\operatorname{tg} \alpha = \frac{\text{szybkość wędrowki elektroforetycznej}}{\text{szybkość opadania komórki} + \text{szybkość przepływu roztworu}}$$

Ponieważ stosowana liniowa szybkość przepływu płynu w komorze jest stosunkowo duża (ok. 5 cm/min.), w związku z tym wyraz pierwszy w mianowniku może być praktycznie pominięty.

Komórki po dojściu do dna komory są odprowadzane przez 92 kanałki do odpowiednich pojemników. Dla zapobieżenia powstawaniu prądów konwekcyjnych, w komorze wytwarzany jest gradient termiczny za pomocą elementów Peltiera. Procedura ta jest dość efektywną i nadaje się do rozdziału różnorodnych komórek, bakterii i elementów subkomórkowych.

2.1.3. Metody rozdziału komórek w oparciu o ich właściwości optyczne

Techniki te wykorzystują głównie zdolność do rozpraszania wiązki światła padającego na komórkę. W aparatach używanych do tego typu rozdziału można wyróżnić zasadniczo 2 części. W pierwszej z nich, na podstawie oceny rozproszonego przez komórkę światła, wytwarzany jest impuls elektryczny, który dzięki sterującym urządzeniom elektronicznym, regulującym natężenie pola elektrycznego w komorze rozdzielającej powoduje odpowiednie odchylenie toru opadania komórki. Na tej zasadzie dochodzi do segregacji komórek na ich populacje posiadające podobne właściwości pod względem ilościowym do rozpraszania światła. Dodać należy, że dla większości komórek ich zdolność do rozpraszania wiązki światła jest uzależniona od ich wielkości. Dotychczas wykonano szereg prób, w których wykorzystywano fluorescencję komórek. W przypadkach tych komórki znakowane fluorochromami wprowadzane były do aparatu, który rozdzielał je w oparciu o wykazywaną przez nie fluorescencję.

Dotychczas wykonano kilka typów urządzeń pozwalających na rozdział komórek w oparciu o omówione tutaj zasady. Wydaje się jednak, że nie wypowiedziano jeszcze na ich temat ostatniego słowa.

2.2. BIOLOGICZNE METODY ROZDZIELANIA KOMÓREK

Techniki te są przeważnie, a niekiedy wyłącznie, stosowane do rozdziału komórek krwi, zwłaszcza limfocytów i z tego powodu zostaną omówione na ich przykładzie. W zasadzie podzielić je można na 2 rodzaje: techniki wykonywane *in vitro* i *in vivo*.

2.2.1. Techniki wykonywane in vitro

2.2.1.1. Metody wykorzystujące zdolności fagocytarne lub przyczepność komórek do podłoża. Metody te stosowane są głównie do rozdziału makrofagów, monocytów, granulocytów i fibroblastów od komórek limfocytarnych. Ponieważ zdolność przyczepiania się wspomnianych komórek do podłoża i fagocytoza dają zaobserwować się tylko w warunkach nienaruszonej przemiany materii w komórkach — metody te można zaliczyć do testów biologicznych, mimo iż często w rozdziale pełnią ważną rolę także proste oddziaływania fizykochemiczne powierzchni komórki i materiału użytego do rozdziału.

a. Metody wykorzystujące przyczepność komórek nielimfocytarnych do powierzchni. Techniki te mają wiele wariantów. Rabinowitz [59] zastosował jako jeden z pierwszych, a Shortman i wsp. [77] ulepszyli kolumnę z kulek szklanych, w której inkubowali zawiesinę leukocytów przez 30 minut w temperaturze 37°C. Po ukończeniu inkubacji delikatnie przemywali kolumnę, co pozwalało na uzyskanie limfocytów pozbawionych komórek o większej przyczepności. Podobne metody oczyszczania limfocytów opisali Berman i Stulberg [6], Levis i Robbins [39], a Marshall i wsp. [42] zastosowali je dla izolacji makrofagów i ich prekursorów. Szereg badaczy, w miejsce kulek szklanych jako materiału, do którego przylegają komórki nielimfocytarne, stosowało płytki poliakrylamidowe [13, 38], szkiełka nakrywkowe zanurzone w hodowli, watę szklaną, watę bawełnianą lub nylonową. Wielką zaletą takich technik jest duża czystość otrzymywanej populacji limfocytów (98–99% limfocytów), natomiast jej pewnym ograniczeniem jest to, że pewne subpopulacje limfocytów, zwłaszcza limfocyty B, pozostają w kolumnie [25]. Tym samym odzyskuje się mało komórek, a otrzymane limfocyty zostają zubożone w część swoich subpopulacji. Dotyczy to szczególnie tych rozdziałów, gdzie inkubuje się lub przepuszcza przez kolumny zawiesiny komórek w środowisku o niskiej zawartości surowicy. Spostrzeżenie to pozwoliło nawet opracować metody oczyszczania subpopulacji limfocytów.

b. Rozdział limfocytów T i B na kolumnach z waty nylonowej. Punktem wyjścia dla opracowania tych metod były spostrzeżenia wskazujące, że komórki tworzące przeciwciała, a więc z linii różnicowania limfocyta B mają znaczną przyczepność do powierzchni [54, 64]. Kierując się tym, Julius i wsp. [33] opracowali metodę, w której 30–45 - minutowa inkubacja limfocytów myszy w środowisku zawierającym 5–10% płodowej surowicy cielęcej w kolumnie wypełnionej watą nylonową powoduje przyleganie większości limfocytów B do włókien waty i następuje wolna elucja, tym samym, ciepłym środowiskiem wypłukuje lim-

focyty T. Schwartz i Handwerger [72] wprowadzili powtórne oczyszczanie otrzymanych na tej drodze limfocytów, uzyskując frakcję limfocytów T zawierającą nie więcej niż 2% limfocytów B. Autorzy ci ponadto odzyskiwali limfocyty B myszy z kolumny, po rozfragmentowaniu jej łożyska i energicznym płukaniu. Zaadsorbowane na wacie nylonowej mysie limfocyty B można także odzyskać, stosując półgodziną inkubację w temperaturze 37°C z 50% płodową surowicą cielęcą [30]. Metodę tę daje się stosować dla oczyszczania ludzkich limfocytów T (nie B), uzyskując preparaty o czystości rzędu 95–98%. Istnieją jednak dane, że tak izolowane limfocyty ludzkie T nie zawsze reagują normalnie w testach czynnościowych [50]. Niezwykle ważnym i rzadko publikowanym szczegółem tego typu rozdzielania jest wielodniowe płukanie waty nylonowej w wodzie bieżącej i destylowanej z następną sterylizacją przez autoklawowanie (S. Fröland, 1973 — informacja osobista).

c. Oddzielanie komórek mających zdolność fagocytozy. Metoda ta w najpopularniejszej postaci polega na inkubowaniu w temperaturze 37°C przez 30 minut w środowisku hodowlanym zawiesiny komórek z dodatkiem drobnych opiłków żelaza lub z karbonylkiem żelaza. Komórki, które sfagocytowały cząstki żelaza lub jego karbonylku są następnie usuwane za pomocą silnego magnesu [92]. Metodę tę zastosowała firma Technicon w produkowanym przez nią aparacie do oczyszczania limfocytów (lymphocyte separator) [38, 40]. Cząstki żelaza używane w tym aparacie są opłaszczane poli-lizyną dla łatwiejszej ich fagocytozy. Również i w tej metodzie dobre odzyskiwanie limfocytów i niezmienną strukturą ich subpopulacji warunkowane są wysokim stężeniem surowicy w środowisku inkubacyjnym. Niedogodnością omawianej techniki jest fakt, że mała część monocytów nie wykazuje zdolności żernych i tym samym nie daje się jej usunąć tą metodą.

2.2.1.2. Eliminacja populacji komórek za pomocą swoistej surowicy cytotoksycznej i dopełniacza. Metodę tę stosuje się standardowo do oczyszczania mysich limfocytów B z limfocytów T. Polega ona na tym, że stosuje się surowicę przeciw odpowiedniemu dla danego szczepu myszy allotypowi antygenowi Θ , który występuje na limfocytach T, a brak go na limfocytach B. Dopełniacz można dodać na początku 30–60-minutowej inkubacji w temperaturze 37°C lub, w wariacie dwustopniowym, przy następnej podobnej inkubacji. Po zastosowaniu tej techniki często usuwa się z zawiesiny martwe komórki opisanymi metodami. Teoretycznie metodę tę winno się stosować zawsze tam, gdzie dostępna jest odpowiednio swoista i cytotoksyczna antysurowica. Ważnym momentem jest zastosowanie dopełniacza wolnego od naturalnych przeciwciał przeciw komórkom zawiesiny i wiązanego przez stosowane przeciwciała (np. przeciwciała kurze nie wiążą dopełniacza świnki morskiej).

2.2.1.3. Rozdział komórek przy użyciu immunoabsorbentów. Do oczyszczania komórek immunoabsorbenty zastosowali po raz pierwszy Wigzell i Andersson [93]. Do chwili obecnej opracowano wiele metod tego rodzaju. Wydzielić wśród nich można techniki adsorpcji komórek w zawiesinie na klasycznych immunoabsorbentach i techniki adsorpcji komórek zawiesiny na innych komórkach żywych rosnących na powierzchni naczynia. W pierwszej grupie stosuje się kolumny wypełnione nośnikiem zapewniającym właściwy przepływ komórek. Z nośnikiem zostają związane chemicznie lub zaadsorbowane substancje reagujące ze składnikami powierzchni części komórek rozdzielanej zawiesiny. Najczęściej stosowanymi nośnikami były kulki szklane o średnicy 100–200 μm , gotowane uprzednio w wodzie królewskiej i płukane do zubożenia [93], podobnych rozmiarów kulki polimetylakrylowe — Degalan V - 26 firmy Degussa, Hanau am Main [94, 95], ziarna usieciowanego poliakrylamidu Biogel P - 6 [81, 97], ziarna Sephadexu G - 200 [71] lub Sepharozy. Trzy ostatnie nośniki, a zwłaszcza Biogel P - 6, mają dawać mniejszą niespecyficzną retencję komórek i lepsze odzyskiwanie, a dwa ostatnie dają się trawić enzymatycznie, co ułatwia odzyskiwanie zaadsorbowanych na nich komórek [71]. Stosowano też jako nośnik gąbkę poliuretanową lub żelatynę [23]. W zależności od stawianych zadań używa się nośników pokrytych różnymi substancjami immunologicznie czynnymi, takimi jak:

a. Przeciwciała lub ich fragmenty reagujące przeciw składnikom powierzchni komórek. Najczęściej stosowano immunoabsorbenty opłaszczane przeciwciałami (często w postaci pełnej antysurowicy) przeciw immunoglobulinom [94, 95]. Stosuje się je dla zatrzymania w kolumnie limfocytów B, mających znacznie więcej powierzchniowych immunoglobulin niż limfocyty T. Zaznaczyć należy, że powierzchniowe immunoglobuliny mogą odłączać się od powierzchni limfocytów po związaniu ich przez przeciwciało immunoabsorbenta. Wskutek tego, taki kompleks immunologiczny może wiązać inne komórki poprzez ich receptor na Fc IgG (obecny nie tylko na limfocytach B). Z tego powodu nie zaleca się stosowania w immunoabsorbencie pełnych przeciwciał, lecz ich fragmentów pozbawionych fragmentu Fc [95]. Z kolei immunoglobuliny powierzchni limfocytów mogą mieć niedostępną część Fc — stąd stosowano w immunoabsorbentach przeciwciała przeciw fragmentom immunoglobulinowym F (ab')₂ [19] lub F ab' [71]. W tego rodzaju immunoabsorbentach jest ważne stosowanie przeciwciał o możliwie dużym powinowactwie do antygeny.

b. Antygeny, przeciw którym mogą reagować przeciwciała powierzchniowe na części rozdzielanych komórek. W ten sposób udało się zubożyć lub, po elucji, wzbogacić limfocyty w komórki reagujące przeciw antygenowi [94, 95].

c. Kompleksy antygen - przeciwciało lub składnik trzeci dopełniacza. Istnienie na części limfocytów receptora na część Fc IgG pozwala na ich zatrzymanie w kolumnie opłaszczonej kompleksami immunologicznymi [4, 27]. Podobnie zatrzymać można w kolumnie opłaszczonej dopełniaczem te limfocyty, które mają receptor na trzeci składnik dopełniacza [78]. O ile jednak omawiane rozdziały komórek na immunoabsorbentach przeprowadza się w temperaturze 0–4°C, by zmniejszyć odrywanie się składników błony komórkowej po ich związaniu przez immunoabsorbent, w tym wypadku stosuje się inkubację w temperaturze 37°C, gdyż wtedy tylko zachodzi wiązanie immunoabsorbentu z receptorem. Z drugiej strony w takich warunkach zachodzić mogą poważne zmiany stanu funkcjonalnego komórki i to może tłumaczyć trudności napotymane w stosowaniu tej metody [14].

Kończąc omawianie metod polegających na użyciu immunoabsorbentów należy wspomnieć, że w zasadzie postępowanie w nich jest podobne.

Typowy rozdział wygląda następująco: 1) nałożenie 5×10^7 do 2×10^8 limfocytów na kolumnę objętości 50–100 ml, 2) wpuszczanie komórek do łożyska immunoabsorbentu z równoczesnym spłukaniem komórek zatrzymanych na ścianach kolumny, 3) inkubacja 30 min. do 2 godz., 4) powolna elucja niezaadsorbowanych komórek. Elucję „uwięzionych” komórek przeprowadza się wylewając zawartość kolumny i/lub płuczając immunoabsorbent w środowisku zawierającym odpowiednio wolny antygen, wolne przeciwciało, kompleks immunologiczny lub zinaktywowany dopełniacz. W ten sposób, np. stosując dla elucji wolny hapten, uzyskano doskonałe oczyszczenie limfocytów reagujących przeciw determinantom β - laktozydowym [24].

2.2.1.4. Metody rozdzielania komórek poprzez ich immunoadsorpcję na innych komórkach rosnących na powierzchni naczyń. Techniki te mają zastosowanie tylko do limfocytów, których część jest w stanie rozpoznawać obce antygeny na komórkach rosnących na ścianie naczynia i przylegać do nich. Metoda ta, zapoczątkowana przez Brondza i wsp. [9] znalazła zastosowanie w zubażaniu lub wzbogacaniu zawiesin limfocytów w swoiste limfocyty T, zdolne do reakcji cytotoksycznej przeciw antygenom komórek używanych jako immunoabsorbent [5, 9, 11]. Inkubację limfocytów nad hodowlami (zwykle fibroblastów) przeprowadza się w temperaturze 37°C. Ford [18] zastosował tę metodę *in vivo* przepuszczając allogeniczne limfocyty przez łożysko naczyniowe kończyny szczura, oczyszczając je w ten sposób z komórek cytotoksycznych. Stosowane metody adsorpcji na komórkach dają znacznie gorszy odzysk i mniejszy stopień czystości ściąanej subpopulacji limfocytów niż metody kolumnowe, ale te ostatnie nie nadają się do rozdziału limfocytów T.

2.2.1.5. Metody rozetkowe. W tego typu metodach wykorzystuje się zdolność receptorów i antygenów powierzchniowych pewnych subpopulacji limfocytów do wiązania się z innymi komórkami, co w efekcie daje agregaty komórkowe zwane rozetkami. Dzięki temu można oddzielić limfocyty tworzące rozetki od limfocytów nierozetkujących za pomocą metod wirowania izopyknicznego lub przez sedymentację. Najczęściej do tego celu stosuje się rozetki E i rozetki EAC',

Rozetki E tworzone są przez ludzkie limfocyty T z erytrocytami barana [32, 98], co uzyskuje się inkubując je (1–2 godz.) w temperaturze 4°C lub w temperaturze pokojowej. Do stabilizacji rozetek stosuje się erytrocyty barana traktowane neuraminidazą lub środkiem redukującym. Zwykle jednak dodaje się do mieszaniny inkubacyjnej 20–50% płodowej surowicy cielęcej po uprzedniej absorpcji erytrocytami barana. Metoda ta, w połączeniu z wirowaniem w gradiencie (Ficoll - Isopaque) jest najszersze stosowanym dzisiaj sposobem uzyskiwania ludzkich limfocytów T. Odzyskuje się blisko 100%, a czystość uzyskanych komórek przewyższa często 99%. Oczyszczone rozetki rozbija się poprzez ogrzanie ich do temperatury 37°C i wytrząsanie. Z kolei erytrocyty barana usuwa się przez lizę roztworem NH_4Cl (0,17 M) buforowanym za pomocą Tris (pH 7,2).

Rozetki EAC' tworzone są przez część limfocytów B oraz erytrocyty opłaszczone przeciwciałami i dopełniaczem. Otrzymanie ich wymaga 30 - minutowej inkubacji w temperaturze 37°C w środowisku wolnym od surowicy połączonej z mieszaniem [7, 15, 53]. Czynnikiem komplikującym jest tworzenie tego typu rozetek nie tylko przez limfocyty B, ale także przez monocyty. Wykluczenie ze środowiska jonów wapnia ma pozwalać na ominięcie tej trudności, lecz warunki takie niewątpliwie nie są bez wpływu na stan biologiczny rozdzielanych limfocytów.

Stosując inne typy rozetek można praktycznie rozdzielić każdy typ komórek, dla którego znany jest swoisty receptor lub antygen powierzchniowy. Jedynymi wadami tych technik jest czasochłonność rozdziału i możliwość uszkodzenia komórek przy licznych wirowaniach, tworzeniu i rozbijaniu rozetek, zwłaszcza gdy wymagane jest środowisko wolne od surowicy i inkubacja w temperaturze 37°C.

2.2.1.6. Metody polegające na aglutynacji komórek wywołanej działaniem enzymów. Sauter i wsp. [68] opisali wybiórczą aglutynację mieloblastów po traktowaniu neuraminidazą. Pozwala to na oddzielenie ich od innych, niezaglutynowanych komórek na drodze sedymentacji.

2.2.1.7. Techniki związane z wybiórczym wiązaniem lektyn przez komórki. Zaobserwowano, że pewne lektyny wiążą się z powierzchnią komórki tylko w niektórych stadiach ich cyklu życiowego [55] lub tylko

z niektórymi rodzajami komórek [39]. Stąd zastosowano lektyny sprzężone z włóknami nylonowymi lub płytkami plastikowymi dla rozdziału komórek [16].

2.2.1.8. Śmierć popromienna. Zawiesinę komórek można pozbawić komórek proliferujących przez inkubację z wysokiej aktywności tymidyną - ^3H . W ten sposób oczyszczać się daje np. limfocyty z tych komórek, które zdolne są do reakcji przeciw obcym antygenom zgodności tkankowej [65].

2.2.2. Usuwanie komórek martwych

W wielu omówionych technikach, zwłaszcza tych, gdzie celowo zabija się część komórek, zachodzi konieczność oddzielenia żywych komórek od martwych. W tym celu stosuje się wirowanie w gradiencie 100% płodowej surowicy cielęcej lub albuminy surowicy bydlęcej [76], krótkie kolumny z nieopłaszczonymi kulkami szklanymi [73] lub z watą bawełnianą [34], sedymentację w środowisku o niskiej sile jonowej [84] lub trawienie enzymami proteolitycznymi [80]. Zaznaczyć należy, że enzymy proteolityczne trawią nie tylko martwe komórki, ale także białka powierzchni żywych komórek, lecz te ostatnie w hodowli są regenerowane w ciągu 24 godzin. Metod kolumnowych powinno się jednak unikać, gdyż ich stosowanie powoduje utratę pewnych subpopulacji żywych komórek [75].

2.2.3. Metody stosowane in vivo

Szereg narządów ustroju stanowi materiał względnie czystych populacji komórek, np. grasica po rozdrobnieniu jest bogatym źródłem niemal czystych limfocytów T. Istnieją liczne metody wzbogacania lub zubożania w określone typy komórek tych narządów, które w warunkach normalnych stanowią mozaikę różnych typów komórkowych.

Oto przykłady:

2.2.3.1. Metody farmakologiczne.

a. Wstrzyknięcie 100 mg hydrokortyzonu na kg wagi ciała myszy powoduje, że pobrana po 24 godz. grasica zawiera jedynie znikome ilości funkcjonalnie czynnych korowych limfocytów T_1 , a jest bogatym źródłem limfocytów T_2 [83].

b. Wstrzyknięcie do zarodka kurzego testosteronu [20] powoduje, że nie rozwija się bursa Fabrycjusza i po wykluciu śledziona takiego kurczęcia nie zawiera limfocytów B, które wywodzą się z bursy Fabrycjusza (bursektomia hormonalna).

2.2.3.2. Metody repopulacyjne. Rekonstytucja układu limfatycznego letalnie naświetlonej i tymektomizowanej myszy za pomocą oczyszczono-

nych *in vitro* limfocytów B szpiku kostnego wiąże się z rozplemem tych ostatnich. Śledziona takiej myszy można używać jako wzbogaconego źródła limfocytów B.

2.2.3.3. Metody izotopowe. Wstrzyknięcie zwierzęciu antygeny znakowanego trytem powoduje wiązanie tego antygeny przez limfocyty nań reagujące i ich śmierć z napromienienia. Po określonym czasie śledziona takiego zwierzęcia zawierać będzie znacznie niższą niż w normie liczbę limfocytów zdolnych do reagowania przeciw temu antygenowi.

2.2.3.4. Metoda drenażu. Drenaż przewodu piersiowego powoduje usunięcie z ustroju znacznej części recyrkulujących limfocytów. Zwierzę takie jest wzbogaconym źródłem limfocytów osiadłych.

Kończąc omawianie metod rozdzielania komórek warto zastanowić się, jaki będzie ich dalszy rozwój. Wydaje się, że wśród metod fizykochemicznych należy oczekiwać dalszego postępu techniki elektroforetycznej i metod opartych na właściwościach optycznych komórek. Z informacji prywatnych od autorów wynika, że szereg firm zainteresowanych jest opracowaniem aparatów przeznaczonych do tych właśnie celów. Chodzi tutaj między innymi o zbudowanie urządzeń o większej wydajności, z jak najdalej idącą ich automatyzacją. Przewiduje się również ulepszanie techniki rozdzielania komórek na zasadzie przeciwprądowej poprzez wprowadzenie nowych roztworów wodnych substancji niemieszających się oraz doskonalenie aparatów używanych do tych celów. Wśród metod biologicznych można oczekiwać rozszerzenia ich na komórki pochodzące nie tylko z układu limfatycznego.

LITERATURA

- [1] ALBERTSSON P. A. Thin layer countercurrent distribution, *Anal. Bioch.* **11**: 121, 1965.
- [2] — Partition of cells and macromolecules, Almquist and Wiksell, Stockholm (wyd. II), 1971.
- [3] ANDERSON N. G., An introduction to particle separation in zonal centrifuges, [w] „The development of zonal centrifuges and ancillary systems for tissue fractionation and analysis”, str. 9–38, National Cancer Institute, Bethesda, 1966.
- [4] BASTEN A., SPRENT J., MILLER J. F. A. P., Receptor for antibody-antigen complexes used to separate T cells from B cells, *Nature New Biology*, **235**: 178, 1972.
- [5] BERKE G., LEVEY R. H., Cellular immunoabsorbents in transplantation immunity. Specific *in vitro* deletion and recovery of mouse lymphoid cells sensitized against allogenic tumours, *J. Exp. Med.*, **135**: 972, 1972.
- [6] BERMANN L., STULBERG K. S., *Lab. Invest.* **11**: 1322, 1962, cyt. za Denman A. M., Methods of separating human blood lymphoid cell populations, *J. Immunol. Method.*, **2**: 331, 1973.
- [7] BIANCO C., PATRICK R., NUSSENZWEIG V., A population of lymphocytes

- bearing a membrane receptor for antigen - antibody - complement complexes, *J. Exp. Med.*, **132**: 702, 1970.
- [8] BOONE C. W., DARELL G. S., BOND H. E., The resolution of mixtures of viable mammalian cells into homogenous fractions by zonal centrifugation, *J. Cell Biol.*, **36**: 369, 1968.
- [9] BRONDZ W., cyt. za Singhal S. K., Wigzell H., Cognition and recognition of antigen by cell - associated receptors, *Progr. In Allergy*, **15**: 188, 1971.
- [10] BRUNETTE D. M., MCCULLOCH E. A., TILL J. E., Fractionation of suspensions of mouse spleen cells by countercurrent distribution, *Cell Tissue Kinet.*, **1**: 319, 1968.
- [11] CLARK W., KIMURA A., Immunoreactivity in cellular immune reactions of lymphocytes preabsorbed on cell monolayers, *Nature New Biology*, **235**: 236, 1972.
- [12] CREMER J. E., JOHNSTON P. V., ROOTS B. I., TREVOR A. J., Heterogeneity of brain fractions containing neuronal and glial cells, *J. Neurochem.*, **15**: 1361, 1968.
- [13] CZERSKI P., SZMIGIELSKI S., LITWIN J., Simple methods for obtaining purified suspensions of lymphocytes, *Vox Sanguinis*, **11**: 724, 1966.
- [14] DICKLER H. B., KUNKEL H. G., Interaction of aggregated globulin with B lymphocytes, *J. Exp. Med.*, **136**: 191, 1972.
- [15] DUKOR P., BIANCO C., NUSSENZWEIG V., Bone marrow origin of complement - receptor lymphocytes, *Eur. J. Immunol.*, **1**: 491, 1971.
- [16] EDELMAN G. M., RUTISHAUSER U., MILETTE C. F., Cell fractionation and arrangement on fibers, beads and surfaces, *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.*, **68**: 2153, 1971.
- [17] FLANGAS A. L., BOWMAN R. E., Neuronal perikarya of rat brain isolated by zonal centrifugation, *Science*, **161**: 1025, 1968.
- [18] FORD W., Doniesienie na I Kongresie Immunologii w Waszyngtonie, 1971.
- [19] FRÖLAND S., NATRING J. B., Identification of three different human lymphocyte populations by surface markers, *Transplant. Rev.*, **16**: 114, 1973.
- [20] GOLE R. K., KITE J. H., WITEBSKY E., Hereditary autoimmune thyroiditis in the fowl, *Science*, **160**: 1357, 1968.
- [21] GRDINA D. J., MILAS L., HEWITT R. R., WITHERS H. R., Buoyant density separation of human blood cells in renografin gradients, *Exp. Cell Res.*, **81**: 250, 1973.
- [22] HANNIG K., Separation of Cells and particles by continuous free - flow electrophoresis, [w] „Techniques of biochemical and biophysical morphology” wyd. Glick D. i Rosenbaum R. M., t. I, str. 191-232, Wiley — Interscience, New York, 1972.
- [23] HAAS W., w przygotowaniu.
- [24] HENRY C., KIMURA J., WOFSY L., Cell separation on affinity columns: the isolation of immunospecific precursor cells from unimmunized mice, *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* **69**: 34, 1972.
- [25] HOOG N. M., GREAVES M. F., Antigen binding thymus derived lymphocytes. I. Rapid method for isolation of theta — positive antigen — stimulated cells, *Immunology*, **22**: 959, 1972.
- [26] HOPKINS C. R., FARQUHAR M. G., Hormone secretion by cells dissociated from rat anterior pituitaries, *J. Cell Biol.*, **59**: 276, 1973.
- [27] HØIER — MADSEN M., RUBIN B., Mitogenic responses of mouse thymus and spleen cells. Effect of immunoadsorbent procedures, *Cell. Immunol.*, w druku.

- [28] HYMER W. C., EVANS W. H., KRAICER J., MASTRO A., DAVIS J., GRISWOLD E., Enrichment of cell types from the rat adenohypophysis by sedimentation at unit gravity, *Endocrinology*, **92**: 275, 1973.
- [29] ISHIKAWA H., Isolation of different types of anterior pituitary cells in rats, *Endocrinol. Jap.*, **16**: 517, 1969.
- [30] JAROSZEWSKI J., — praca nie opublikowana.
- [31] JOHNSTON P. V., ROOTS B. I., Neuronal and glial perikarya preparations: an appraisal of present methods, *Int. Rev. Cytol.*, **29**: 265, 1970.
- [32] JONDAL M., HOLM G., WIGZELL H., Surface markers on human T and B lymphocytes. I. A large population of lymphocytes forming nonimmune rosettes with sheep red blood cells, *J. Exp. Med.*, **136**: 207, 1972.
- [33] JULIUS M. H., SIMPSON E., HERZENBERG L. A., A rapid method for the isolation of thymus - derived murine lymphocytes, *Eur. J. Immunol.*, **3**: 645, 1973.
- [34] KOVAŘIK S., *Folia Biol.*, **9**: 388, 1963, cyt. za [75].
- [35] LABREQUE D. R., BACHUR N. R., PETERSON J. A., HOWARD R. B., The importance of the techniques employed during the enzymatic preparation of isolated liver parenchymal cells, *J. Cell. Physiol.*, **82**: 397, 1973.
- [36] LAM D. M. K., FURRER R., BRUCE W. R., The separation, physical characterization and differentiation kinetics of spermatogonial cells of the mouse, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.*, **65**: 192, 1970.
- [37] LEE S. H., Isolation of parietal cells from glutaraldehyde - fixed rabbit stomach, *J. Histochem. Cytochem.*, **20**: 634, 1972.
- [38] LEVINE S., *Science*, **123**: 185, 1956, cyt. za [75].
- [39] LEVIS W. R., ROBBINS J. H., Antigen induced blastogenesis: the human cell determining the specificity of response in vitro, *J. Immunol.*, **104**: 1295, 1970.
- [40] LICHTENSTEIN B., PASEL TINER L., WIENGAARD R., WIDMARK R., Lymphocyte separator, Technical Bulletin, Technicon Instrument Company, Tarrytown N. Y., U.S.A., 1971.
- [41] LLOYD R. V., McSHAN W. H., Study of rat anterior pituitary cells separated by velocity sedimentation at unit gravity, *Endocrinology*, **92**: 1639, 1973.
- [42] MARSHALL W. H., RIGO S. J., MELMAN S., *Lancet*, **1**: 730, 1966, cyt. za Denman A. M., Methods of separating human blood cell populations, *J. Immunol. Method.*, **2**: 331, 1973.
- [43] McEWEN C. R., STALLARD R. W., JUHOS E. T., Separation of biological particles by centrifugal elutriation, *Anal. Biochem.*, **23**: 369, 1968.
- [44] MEL H. C., Stable - flow free boundary migration and fractionation of cell mixtures. I. Apparatus and hydrodynamic principles, *J. Theoret. Biol.*, **6**: 159, 1964.
- [45] — Stable - flow free boundary migration and fractionation of cell mixtures. II. Laminar flow and density gradient stability, *J. Theoret. Biol.*, **6**: 181, 1964.
- [46] — Stable - flow free boundary migration and fractionation of cell mixtures. III. Migration principles — sedimentation and electrophoresis, *J. Theoret. Biol.*, **6**: 307, 1964.
- [47] MILLER R. G., PHILLIPS R. A., Separation of cells by velocity sedimentation, *J. Cell. Physiol.*, **73**: 191, 1969.
- [48] MOSIER D. E., A requirement for two cell types for antibody formation in vitro, *Science*, **158**: 1373, 1967.

- [49] NORTON W. T., PODUSLO S. E., Neuronal soma and whole neuroglia of rat brain: a new isolation technique, *Science*, **167**: 1144, 1970.
- [50] NOWAK J., JAROSZEWSKI J., praca nie publikowana.
- [51] PETERSON E. A., EVANS W. H., Separation of bone marrow cells by sedimentation at unit gravity, *Nature*, **214**: 824, 1967.
- [52] PERTOFT H., BÄCH O., LINDAHL - KIESSLING K., Separation of various blood cells in colloidal silica - polivinylypyrrolidone gradient, *Exp. Cell Res.*, **50**: 355, 1968.
- [53] PINCUS S., BIANCO C., NUSSENZWEIG V., Increased proportion of complement-receptor lymphocytes in the peripheral blood of patients with chronic lymphocytic leukemia, *Blood*, **40**: 303, 1972.
- [54] PLOTZ P. H., TALAL N., Fractionation of splenic antibody forming cells on glass bead columns, *J. Immunol.*, **99**: 1236, 1967.
- [55] PODOLSKY D. K., WEISER M. N., Specific selection of mitotically active intestinal cells, by Con A — derivatized fibers, *J. Cell. Biol.*, **58**: 497, 1973
- [56] PRETLOW T. G., BOONE C. W., Centrifugation of mammalian cells on gradients: a new rotor, *Science*, **161**: 911, 1968.
- [57] — Separation of mammalian cells using programmed gradient sedimentation, *Exp. Mol. Pathol.*, **11**: 139, 1969.
- [58] PRETLOW T. G., GLICK M. R., REDDY W. J., Separation of beating cardiac myocytes from suspensions of heart cells, *Am. J. Pathol.*, **67**: 215, 1972.
- [59] RABINOWITZ Y., Separation of lymphocytes, polymorphonuclear leukocytes and monocytes on glass columns, including tissue culture observations, *Blood*, **23**: 811, 1964.
- [60] RAPPAPORT C., HOWZE G. B., Dissociation of adult mouse liver by sodium tetraphenylboron, a potassium complexing agent, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **121**: 1010, 1966.
- [61] — Further studies on the dissociation of adult mouse tissue, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **121**: 1016, 1966.
- [62] RICKWOOD D., BIRNIE G. D., Metrizamide, a new density - gradient medium, *FEBS Lett.*, **50**: 102, 1975.
- [63] RIVKIN I., CHASIN M., Nucleotide specificity of the steroidogenic response of rat adrenal cell suspensions prepared by collagenase digestion, *Endocrinology*, **88**: 664, 1971.
- [64] SALERNO A., PONTIERI G. M., Heterogeneity of populations of antibody-forming cells fractionated by glass bead columns, *Clin. Exp. Immunol.*, **5**: 209, 1969.
- [65] SALMON S. E., SMITH B. A., LEHLER R. I., MOGERMAN S. N. SHINEFIELD R. H., PERKINS H. A., Modification of donor lymphocytes for transplantation in lymphopenic immunological deficiency, *Lancet*, **2**: 149, 1970.
- [66] SATAKE M., ABE S., Preparation and characterization of nerve cell perikaryon from rat cerebral cortex, *J. Biochem.*, **59**: 72, 1966.
- [67] SATAKE M., HASEGAWA S.-I., ABE S., TANAKA R., Preparation and characterization of nerve cell perikaryon from pig brain stem, *Brain Res.*, **11**: 246, 1968.
- [68] SAUTER C., LINDENMANN J., GERBER A., Agglutination of leukemic myeloblasts by neuraminidase, *Eur. J. Cancer*, **8**: 451, 1972.
- [69] SAYERS G., SWALLOW R. L., GIORDANO N. D., An improved technique for the preparation of isolated rat adrenal cells: a sensitive, accurate and specific method for the assay of ACTH, *Endocrinology*, **88**: 1063, 1971.

- [70] SCHNEBLI H. P., DUKOR P., Plant agglutinins used to distinguish between different classes of mouse lymphocytes, *Eur. J. Immunol.*, **2**: 607, 1972.
- [71] SCHLOSSMAN S. F., HUDSON L., Specific purification of lymphocyte populations on digestible immunoabsorbent, *J. Immunol.*, **110**: 313, 1973.
- [72] SCHWARTZ R., HANDWERGER B., doniesienie osobiste.
- [73] SHORTMAN K., The separation of different cell classes from lymphoid organs. I. The use of glass bead columns to separate small lymphocytes, remove damaged cells and fractionate cell suspensions, *Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci.*, **44**: 271, 1966.
- [74] — The separation of different cell classes from lymphoid organs. II. The purification and analysis of lymphocyte populations by equilibrium density gradient centrifugation, *Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci.*, **46**: 375, 1968.
- [75] — Separation methods for lymphocyte populations, [w] "Contemporary topics in molecular immunology", wyd. Ada G. L., t. 3, str. 161-203, Plenum Press, New York, 1974.
- [76] SHORTMAN K., WILLIAMS K. N., ADAMS P., The separation of different cell classes from lymphoid organs. V. Simple procedures for the removal of cell debris, damaged cells and erythroid cells from lymphoid cell suspensions, *J. Immunol. Method.*, **1**: 273, 1972.
- [77] SHORTMAN K., WILLIAMS N., JACKSON H., RUSSEL P., BYRT P., DIENER E., The separation of different cell classes from lymphoid organs. IV. The separation of lymphocytes from phagocytes on glass-bead columns, and its effect on subpopulations of lymphocytes and antibody-forming cells, *J. Cell Biol.*, **48**: 566, 1971.
- [78] SONOZAKI T., COHEN S., doniesienie osobiste.
- [79] SWALLOW R. L., SAYERS G., A technic for the preparation of isolated rat adrenal cells, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **131**: 1, 1969.
- [80] TIILIKAINEN A., KAAKINEN A., AMOS D. B., The separation of genetically different lymphocyte populations in vitro, *Transplantation*, **10**: 361, 1970.
- [81] TRUFFA-BACHI P., WOFSY L., Specific separation of cells on affinity columns, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.*, **66**: 685, 1970.
- [82] VALE W., GRANT G., AMOSS M., BLACKWELL R., GUILLEMIN R., Culture of enzymatically dispersed anterior pituitary cells: functional validation of a method, *Endocrinology*, **91**: 562, 1972.
- [83] VISCHER T. L., Effect of hydrocortisone on the reactivity of thymus and spleen cells of mice to in vitro stimulation, *Immunology*, **23**: 777, 1972.
- [84] VON BOEHMER H., SHORTMAN K., The separation of different cell classes from lymphoid organs. IX. A simple and rapid method for removal of damaged cells from lymphoid cell suspensions, *J. Immunol. Method.*, **2**: 293, 1973.
- [85] WALTER H., KROB E. J., GARZA R., Factors in the partition of red blood cells in aqueous dextran-polyethylene glycol two phase system, *Biochim. Biophys. Acta*, **165**: 507, 1968.
- [86] WALTER H., KROB E. J., GARZA R., ASCHER G. S., Partition and counter-current distribution of erythrocytes and leucocytes from different species, *Exp. Cell Res.*, **55**: 57, 1969.
- [87] WALTER H., KROB E. J., ASCHER G. S., SEAMAN G. V. F., Partition of rat liver cells in aqueous dextran-polyethylene glycol phase systems, *Federation Proc.*, **31**: 310 A, 1972.
- [88] WALTER H., MILLER A., KROB E. J., ASCHER G. S., Alterations in mem-

- brane surface properties of reticulocytes during maturation as determined by partition in two polymer aqueous phase system, *Exp. Cell Res.*, **69**: 416, 1971.
- [89] WALTER H., SELBY F. W., Counter-current distribution of red blood cells of slightly different ages, *Biochim. Biophys. Acta*, **112**: 146, 1966.
- [90] WALTER H., SELBY F. W., GARZA R., On the counter-current distribution of red blood cells: an addendum, *Biochim. Biophys. Acta*, **136**: 148, 1967.
- [91] WEKERLE H., FELDMAN M., T cell recognition of cell surface antigens. I. Specificity, *Eur. J. Immunol.*, **4**: 240, 1974.
- [92] WESTRING D. W., LANDINSKY J. L., FEICK J. P., Proc. Soc. Exp. Biol. Med., **131**: 1077, 1969, cyt. za Denman A. M., Methods of separating human blood lymphoid cell populations, *J. Immunol. Method.*, **2**: 331, 1973.
- [93] WIGZELL H., ANDERSSON B., Cell separation on antigen-coated columns, *J. Exp. Med.*, **129**: 23, 1969.
- [94] — Isolation of lymphoid cells with active surface receptor sites, *Annu. Rev. Microbiol.*, **25**: 291, 1971.
- [95] WIGZELL H., MÄKELÄ O., *J. Exp. Med.* **129**: 23, 1970, cyt. za Denman A. M., Methods of separating human blood lymphoid cell populations, *J. Immunol. Method.*, **2**: 331, 1973.
- [96] WINZLER R. J., Carbohydrates in cell surfaces, *Int. Rev. Cytol.*, **29**: 77, 1970.
- [97] WOFSY L., KIMURA J., TRUFFA-BACHI P., Cell separation on affinity columns: the preparation of pure populations of anti-hapten specific lymphocytes, *J. Immunol.*, **107**: 725, 1971.
- [98] WYBRAN S., CAAR M. C., FUDENBERG H. H., The human rosette-forming cell as a marker of a population of thymus derived cells, *J. Clin. Invest.*, **51**: 2537, 1972.
- [99] YOUNGNER J. S., Monolayer tissue cultures I. Preparation and standardization of suspensions of trypsin-dispersed kidney cells, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **85**: 202, 1954.

Otrzymano: 7 lipca 1975.

Przyjęto: 12 lipca 1975.

Adres autorów: ul. Świecickiego 6, 60-781 Poznań.

Uwaga dodana przy korekcie

Po oddaniu manuskryptu do druku ukazała się praca opisująca sposób uzyskiwania znacznie oczyszczonych preparatów limfocytów T, specyficznych dla danego antygeny. Sposób ten polega na inkubacji limfocytów nad hodowlą makrofagów poddanych uprzednio działaniu antygeny i odzyskiwaniu limfocytów przylegających do makrofagów. Jeśli metoda ta okaże się dobrą, to może przyczynić się do znacznego postępu w dziedzinie immunologii (S. Z. Ben-Sasson, W. E. Paul, E. M. Shevach i I. Green, In vitro selection and extended culture of antigen-specific T lymphocytes. I. Description of selection culture procedure and initial characterization of selected cells, *J. Exper. Med.* **142**: 90, 1975.

INFORMACJE DLA AUTORÓW

POSTĘPY BIOLOGII KOMÓRKI — drukują artykuły przeglądowe, omawiające najnowsze osiągnięcia w dziedzinie biologii komórki, nie publikowane dotąd w innych wydawnictwach. Autorzy odpowiadają za ścisłość podawanych informacji. Artykuły drukowane w POSTĘPACH BIOLOGII KOMÓRKI nie mogą być bez zgody Redakcji publikowane w innych periodykach.

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

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

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

Przykłady cytowania literatury:

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

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

Redakcja zastrzega sobie możliwość dokonania skrótów nie wpływających na treść pracy.

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

Artykuły honorowane są wg ustalonych stawek, autorzy otrzymują 25 odbitek artykułu bezpłatnie.

Zamówienie na egzemplarze POSTĘPÓW BIOLOGII KOMÓRKI przyjmuje ORWN PAN, Warszawa, Pałac Kultury i Nauki.

KOMUNIKAT

Główna Komisja Badania Zbrodni Hitlerowskich w Polsce informuje, że kończy prace nad rejestrem strat osobowych inteligencji polskiej w latach 1939—1945, w tym środowiska naukowego.

W przygotowaniu jest publikacja poświęcona *upamiętnieniu pracowników nauki — ofiar wojny i okupacji*. W związku z tym prosi się zainteresowanych o nadesłanie:

1. Uzupełnień do opublikowanych już życiorysów lub biogramów.

2. Materiałów o osobach, o których nie ma dotąd informacji w piśmiennictwie. Informacja powinna zawierać: nazwisko i imię, datę i miejsce urodzenia, stopień i tytuł naukowy, pełnione funkcje, dyscyplinę naukową, najważniejsze dzieła, działalność społeczno-zawodową przed wojną i podczas okupacji, martyrologię oraz datę, miejsce i okoliczności śmierci.

3. Fotografii, odpisów lub fotokopii dokumentów dotyczących martyrologii i śmierci.

Kartotekę osobową strat naukowców polskich zamyka się w lutym 1976 r.

Korespondencję i materiały prosimy kierować pod adresem:

Dr Marian Walczak, Polska Akademia Nauk,
Warszawa — Pałac Kultury i Nauki.

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 ze zleceniem wysyłki za granicę, która jest o 40% droższa od prenumeraty krajowej, przyjmuje RSW „Prasa-Książka-Ruch”, Biuro Kolportażu Wydawnictw Zagranicznych, ul. Wronia 23, 00-840 W-wa, konto PKO Nr 1-8-100024.

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 and address can be sent to your subscription agent or directly to Foreign Trade Enterprise Ars Polona - Ruch, 7 Krakowskie Przedmieście, 00-068 Warszawa, P. O. Box 101, POLAND.

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

Indeks 38703/36970

SPIS TREŚCI

A. WOŹNY i F. MŁODZIANOWSKI, Działanie cytokinin w procesie różnicowania się chloroplastów	257
F. MŁODZIANOWSKI i A. WOŹNY, Degeneracja chloroplastów i możliwość jej odwracania	271
H. SKURZAK, Rola czynników humoralnych w blokowaniu cytotoksyczności limfocytów <i>in vitro</i>	287
S. R. HALWA, J. JAROSZEWSKI i J. B. WARCHOŁ, Przegląd metod izolacji i rozdziału komórek	299