P 2435

POLSKIE
TOWARZYSTWO
ANATOMICZNE

Postępy Biologii Komórki

TOM 5 · NR 4
1978 (325-364)

Bibl. Inst. Biol. Doświ. im. M. Nenckiego
PAN

PWN–WARSZAWA

http://rcin.org.pl

POSTĘPY BIOLOGII KOMÓRKI TOM 5, NR 4, 1978

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, Antoni HORST, 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 we Wrocławiu

Nakład 520 + 100 egz. Ark. wyd. 3,5; Ark. druk. 2,75 + wkl. Papier druk. sat. III kl. 80 g, 70 × 100 cm. Oddano do składania w lipcu 1978 r. Podpisano do druku w listopadzie 1978 r. Druk ukończono w grudniu 1978 r. Zam. 387/78 — M-7. Cena zł 20.—

Wrocławska Drukarnia Naukowa, Wrocław, ul. Lelewela 4

http://rcin.org.pl

POSTĘPY BIOLOGII KOMÓRKI TOM 5, NR 4, 1978 (325–340)

PEPTYDY JAKO REGULATORY KOMÓRKOWEGO WZROSTU

PEPTIDES AS CELL GROWTH REGULATORS

Mariusz SUDOŁ

Zakład Biochemii Zwierząt Instytut Biochemii Molekularnej, UJ

Streszczenie. Artykuł ten stanowi przegląd aktualnych doniesień na temat wpływu endogennych peptydów, izolowanych z płynów ustrojowych i ekstraktów tkankowych, na wzrost komórek zwierzęcych w hodowlach in vitro. Podkreślono w nim szczególną rolę związków peptydowych osocza i surowicy stymulujących wzrost komórkowy oraz ich powiązanie z działaniem chalonów. Przedstawiono także koncepcję antyneoplastonów, omawiając szczegółowo testy komórkowe wykazujące różnice w działaniu tych glikopeptydów na komórki normalne i nowotworowe.

Summary. The influence of endogenous peptides isolated from organism fluids and tissue extracts on animal cell growth in vitro is reviewed. Special attention is given to peptide compounds which stimulate cell growth and differentiation and which are separated from blood plasma and serum. Their competition with the action of chalones is also pointed out. The concept of antineoplastons and experiments in vitro which test the activity of these substances are discussed in detail.

Stosowane skróty

BHK (baby hamster kidney) — symbol linii komórek pochodzących z nerki chomiczego noworodka

C (clone) — klon

cAMP (adenosine 3',5' - cyclic monophosphate) — cykliczny 3',5' - adenozynomonofosforan

CSF (colony - stimulating factor) — czynnik stymulujący wzrost kolonii

EGF (epidermal growth factor) — naskórkowy czynnik wzrostu

CHL (chinese hamster lung) — symbol linii komórek pochodzących z płuc chomika chińskiego

RSV (Rous sarcoma virus) — wirus mięsaka Rousa.

Regulacja wzrostu i różnicowania komórek jest jednym z podstawowych problemów współczesnej biologii. W komórkach *Metazoa* pro-

http://rcin.org.pl

cesy te nie są bezpośrednio wynikiem ekspresji genomu, ale podlegają kontroli przez czynniki zarówno wewnątrz-, jak i zewnątrzkomórkowe. Do nich zalicza się m. in. swoiste tkankowo mitogeny, chalony i antyneoplastony, których działanie można w rezultacie sprowadzić do regulacji procesów zapoczątkowujących albo hamujących mitozy. Liczne prace doświadczalne, dotyczące zagadnienia komórkowego wzrostu, przeprowadzane są w hodowlach tkankowych, gdzie — w odróżnieniu od układu in vivo — istnieje możliwość względnie dokładnego określenia i kontrolowania warunków doświadczenia. Prace teoretyczne opisują różne modele mitotycznej regulacji, uwzględniając fakty doświadczalne dotyczące wpływu wspomnianych endogennych czynników na wzrost komórek.

Wśród różnego typu substancji, którym przypisuje się funkcję regulacji komórkowego wzrostu, na szczególną uwagę zasługują związki o budowie peptydowej, izolowane z płynów ustrojowych i ekstraktów tkankowych.

PEPTYDY IZOLOWANE Z OSOCZA LUB SUROWICY KRWI

Wielu autorów wskazuje na peptydy surowicy, która zwykle wzbogaca stosowane w hodowlach komórkowych środowisko, jako odpowiedzialne za jej aktywność w stymulacji i regulacji komórkowego wzrostu [13, 15, 20, 37, 45].

Eagle zaobserwował, że stymulacja wzrostu wybranych linii komórek ludzkich HeLa, HeLa - S3, KB oraz mysich L - 929 zachodzi w hodowlach, których środowiska pozbawione surowicy mają kontakt przez błonę półprzepuszczalną ze środowiskiem wzbogaconym dializowaną surowicą (1 - 5%) i dializowanym ekstraktem trzustkowym [20, 43]. Ponieważ w środowisku nie zawierającym dializowanego ekstraktu trzustki obserwowany był tylko przypadkowy i względnie powolny wzrost komórek, autor wysunął hipotezę, że enzymy proteolityczne uwalniają z białek surowicy drobnocząsteczkowy czynnik (lub czynniki) wzrostu. Przypuszczał on, że może być to strepogenina — związek o charakterze peptydowym, któremu przypisywano funkcję stymulacji wzrostu bakterii z rodzaju *Lactobacillus* i *Streptococcus* [38].

Obserwacje Eagle'a zainspirowały innych badaczy do prac doświadczalnych w tym kierunku. De Luca i wsp. [15] z cielęcej surowicy traktowanej takimi enzymami proteolitycznymi, jak pepsyna i trypsyna, otrzymali grupę 20 peptydów o masach cząsteczkowych około 5000 daltonów, stymulujących wzrost zależnej od surowicy nowotworowej linii komórek chomika syryjskiego (RPMI nr 2402). Otrzymana z tego samego

http://rcin.org.pl

źródła i w podobny sposób inna frakcja peptydów o mniejszych średnich masach cząsteczkowych była dla tych komórek toksyczna. Jednak statystycznie znamienne różnice we wzroście komórek obserwowano dopiero przy działaniu stosunkowo dużymi stężeniami danych frakcji (rzędu 1 mg na ml środowiska, w którym prowadzono hodowlę). Wydaje się, że fakt ten jest zgodny z zaproponowanym przez autorów mechanizmem działania, zakładającym wiązanie, przez stymulujące wzrost peptydy, toksycznych metabolitów pojawiających się w środowisku w trakcie rozwoju hodowli [8].

Amborski i Moskowitz [1] wyizolowali z handlowych preparatów „Bacto - Peptone" i „Proteose - Peptone" frakcje drobnocząsteczkowych peptydów o masach cząsteczkowych od 700 do 1600 daltonów, których wpływ na wzrost komórek in vitro, w przypadku niektórych linii komórkowych, był większy od wpływu surowicy. Te peptydowe czynniki wzrostu nie zostały jednak bliżej scharakteryzowane. Nie określono nawet czy są to peptydy proste, czy złożone.

Tα1 Val→Leu→Ser→Pro→Ala→Asp→Lys

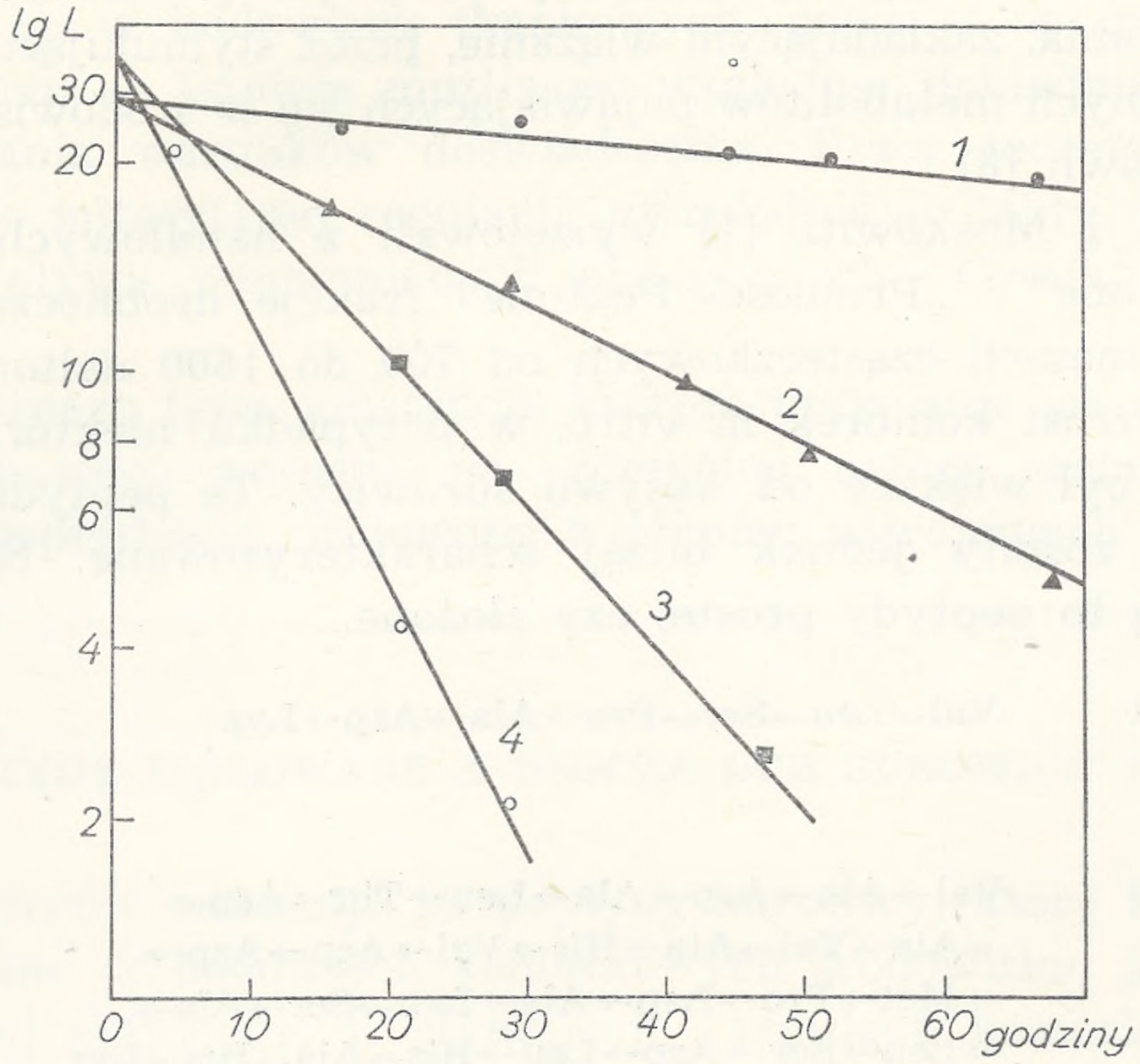
Tα9 Val→Ala→Asp→Ala→Leu→Thr→Asp→
→Ala→Val→Ala→His→Val→Asp→Asp→
→Met→Pro→Asp→Ala→Leu→Ser→Ala→
→Leu→Ser→Asp→Leu→His→Ala→His→Lys

Ryc. 1. Struktura pierwszorzędowa peptydów otrzymanych z trawionego trypsyną łańcucha α ludzkiej hemoglobiny [59]

Struktura pierwszorzędowa została podana dla dwóch peptydów, Tα1 i Tα9, otrzymanych z trawionego trypsyną łańcucha α ludzkiej hemoglobiny (ryc. 1) [59]. Peptydy te w stężeniu 10^{-6}M są cytotoksyczne dla komórek linii RPMI nr 2402. Zmniejszającą się w czasie inkubacji z peptydem Tα1 lub Tα9 liczbę żywych komórek opisuje krzywa bez fazy lag, podobna do krzywej opisującej kinetykę reakcji I rzędu (ryc. 2). Jednakowy stopień cytotoksyczności peptydów, w tym samym stężeniu molowym, może wskazywać na podobny lub taki sam mechanizm ich działania. Podobieństwo sekwencji aminokwasów →Ala→Leu→Ser→ w peptydzie Tα9 do trójkowej sekwencji Val→Leu→Ser→ w peptydzie Tα1, stało się podstawą do spekulacji o aktywnych miejscach tych cząsteczek jako strukturach odpowiedzialnych za ich funkcje. Chociaż występowanie tych peptydów w osoczu i surowicy jest dyskusyjne, to jednak w oparciu o otrzymane wyniki oraz na podstawie innych prac doświadczalnych nad wpływem produktów enzymatycznej hydrolizy różnych białek na wzrost komórek zwierzęcych w hodowlach, Tritsch

http://rcin.org.pl

i Grahl - Nielsen [59] wysunęli uniwersalną hipotezę. Podstawowym jej założeniem jest udział proteolitycznych enzymów, wytwarzanych przez hodowane in vitro komórki, w swoistej zewnątrzkomórkowej degradacji białek surowicy, z których uwalniane peptydy regulują komórkowy wzrost.



Ryc. 2. Półlogarytmiczny wykres cytotoksycznego działania syntetycznego peptydu Tα1 na komórki linii RPMI nr 2402 [59]

Cytotoksyczność oznaczono jako czas, po którym liczba żywych komórek w stosunku do liczby na początku doświadczenia zmniejszyła się do połowy. L — liczba żywych komórek oceniana metodą barwienia błękitem trypanu. *1* — doświadczenie kontrolne; dla użytych stężeń peptydu: *2* — $0{,}112 \times 10^{-6}$ M, *3* — $1{,}12 \times 10^{-6}$ M, *4* — $1{,}4 \times 10^{-6}$ M

Zarówno w osoczu, jak i w surowicy występuje zasadowy trójpeptyd Gly→His→Lys, który w niskich stężeniach rzędu 20 ng/ml stymuluje syntezę kwasów nukleinowych w hodowanych in vitro normalnych i zmienionych nowotworowo hepatocytach [37]. Wyższe stężenia peptydu, powyżej 200 ng/ml, wykazują działanie przeciwne, hamując wzrost zarówno hepatocytów, jak i fibroblastów [45, 52]. W środowisku o pH obojętnym peptyd ten ma własności chelatujące jony niektórych metali przejściowych: Cu^{2+}, Zn^{2+}, Co^{2+}, Fe^{3+} [52]. Badania spektroskopowe metodą magnetycznego rezonansu jądrowego wykazały dużą zdolność przyłączania się do kwasu dezoksyrybonukleinowego takich syntetycznych trójpeptydów jak: Gly→His→Gly, Lys→Trp→Lys i Lys→Tyr→ →Lys [45]. Molekularny mechanizm działania surowiczego trójpeptydu Gly→His→Lys pozostaje nadal nieznany, mimo że dane te skłaniają do spekulacji na ten temat [61].

http://rcin.org.pl

Asn→Ser→Tyr→Pro→Gly→Cys→Pro→Ser→Ser →Tyr→Asp→
→Gly→Tyr→Cys→Leu→Asn→Gly→Gly→Val →Cys→Met→His→
→Ile→Glu→Ser→Leu→Asp→Ser→Tyr→Thr →Cys→Asn→Cys→
→Val→Ile→Gly→Tyr→Ser→Gly→Asp→Arg →Cys→Glu→Thr→
→Arg→Asp→Leu→Arg→Trp→Trp→Glu→ Leu→Arg

Ryc. 3. Pierwszorzędowa struktura naskórkowego czynnika wzrostu [51]

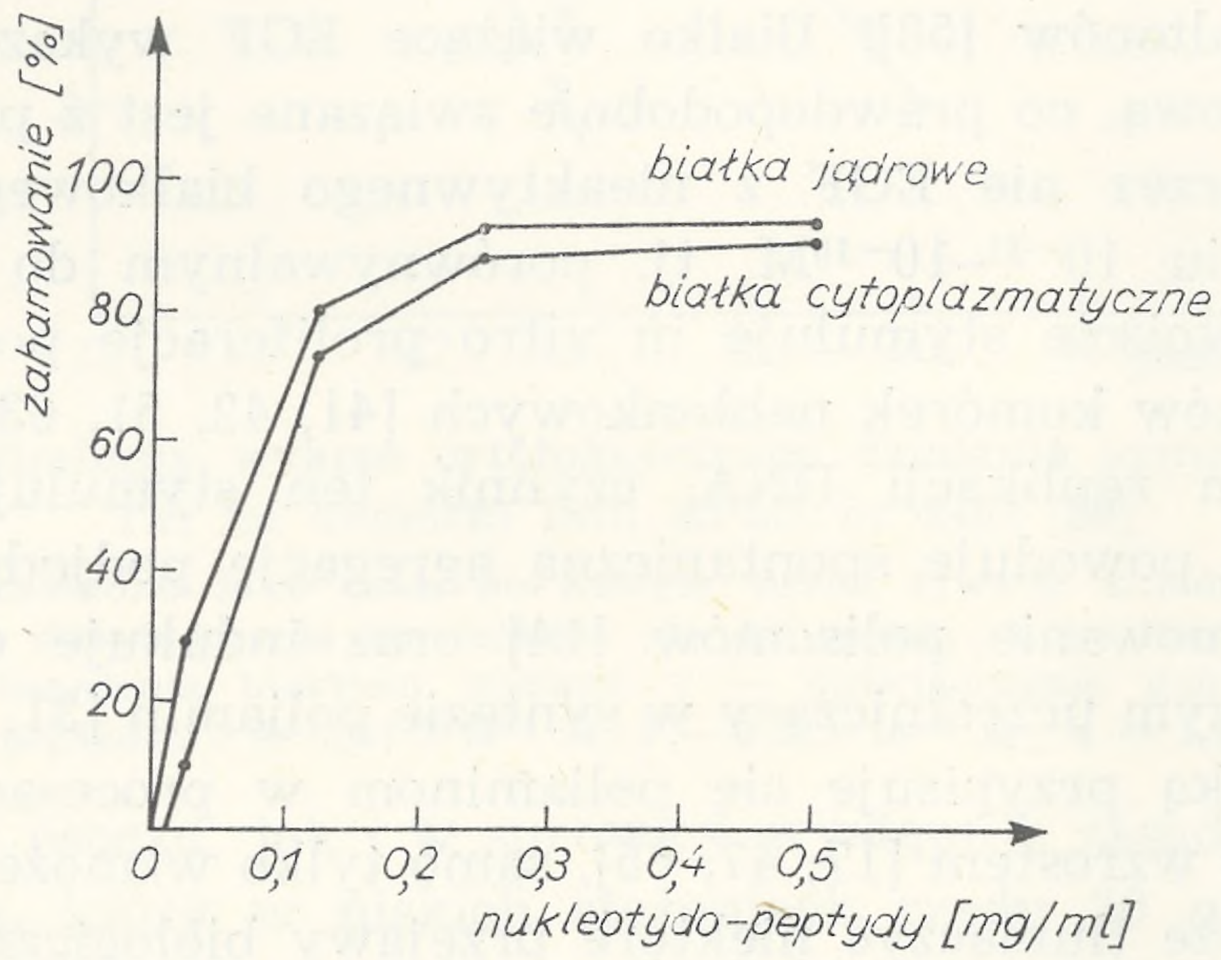
Jednym z dokładniej poznanych peptydów jest występujący w osoczu, ale wyizolowany po raz pierwszy z gruczołów podszczękowych myszy, naskórkowy czynnik wzrostu (EGF) [13]. Peptyd ten o masie cząsteczkowej 6045 daltonów zbudowany jest z 53 aminokwasów, których sekwencja została jednoznacznie określona (ryc. 3) [51]. Charakter kwaśny nadają cząsteczce wchodzące w jej skład dwukarboksylowe aminokwasy. Trzy mostki dwusiarczkowe między resztami cysteiny wpływają na swoiste pofałdowanie pojedynczego łańcucha polipeptydowego, którego konformacja, określona metodą dychroizmu kołowego w świetle UV, jest w przeważającym stopniu niehelikalna. In vivo dwie cząsteczki EGF połączone są z dwoma cząsteczkami białka, z których każda ma masę 29 000 daltonów [58]. Białko wiążące EGF wykazuje aktywność arginyloesterazową, co prawdopodobnie związane jest z proteolitycznym uwalnianiem przez nie EGF z nieaktywnego białkowego prekursora. EGF w stężeniu 10^{-11}–10^{-10}M, tj. porównywalnym do jego poziomu w surowicy, swoiście stymuluje in vitro proliferacje pochodzących od różnych gatunków komórek nabłonkowych [41, 42, 51, 63]. Razem z zapoczątkowaniem replikacji DNA, czynnik ten stymuluje proces biosyntezy białka, powoduje spontaniczną agregację podjednostek rybosomowych i formowanie polisomów [14] oraz indukuje dekarboksylazę ornitynową, enzym uczestniczący w syntezie poliamin [31, 56]. Ze względu na rolę, jaką przypisuje się poliaminom w procesach związanych z komórkowym wzrostem [17, 47, 65], samo tylko wzmożenie przez EGF ich syntezy może tłumaczyć niektóre przejawy biologicznej aktywności tego związku. Znana jest pochodna EGF nie zawierająca dwóch aminokwasów C-końca, tj. →Leu→Arg. Różnica ta w żadnym stopniu nie wpływa jednak na aktywność peptydu w komórkowych testach [50].

Insulina może zastąpić wpływ surowicy w hodowli kurzych fibroblastów i jest stosowana jako dodatek do środowisk, których skład ze względu na warunki doświadczenia powinien być dokładnie określony [18, 53]. Bürgi i wsp. [7] wyizolowali z ludzkiej surowicy frakcję związków wykazujących aktywność insuliny. Aktywność ta nie była hamowana przez przeciwciała indukowane insuliną. Pierson i Temin [4, 12], na podstawie metody przyjętej przez Bürgi i wsp., wyosobnili z cielęcej surowicy frakcję peptydów o masach cząsteczkowych od 6000 do 10 000

http://rcin.org.pl

daltonów, stymulującą wbudowywanie tymidyny w hodowli kurzych fibroblastów. Peptydy tej frakcji wykazywały aktywność insuliny, a własnościami biologicznymi i chemicznymi zbliżone były do somatomedyny [39, 44].

Istnieją przesłanki doświadczalne pozwalające przypuszczać, że także peptydy złożone są czynnikami biorącymi udział w regulacji procesu komórkowego wzrostu. Islam i Kay [29] wyizolowali z komórek wysiękowego raka Ehrlicha nukleotydo - peptydy, które w tego samego typu komórkach in vitro hamują odwracalnie syntezę kwasów nukleinowych i białek (ryc. 4). Peptydy te charakteryzują się dużą zawartością kwasu glutaminowego i lizyny oraz wszystkie posiadają jako komponentę nukleotydową kwas adenilowy. Znakowane izotiocyjanianem fluoresceiny, po krótkim czasie inkubacji (około 5 min), selektywnie gromadzą się w jądrach testowanych komórek. Na uwagę zasługuje fakt, że na szybkość syntezy nukleotydo - peptydów w żadnym stopniu nie wpływa zablokowanie przez puromycynę lub cykloheksimid syntezy polipeptydów na układzie rybosomów.



Ryc. 4. Wpływ różnych stężeń nukleotydo - peptydów na wbudowywanie ^{14}C - mrówczanu do białek jądrowych i cytoplazmatycznych [29]. Objaśnienia w tekście

Sarnecka - Keller i Rais [48] metodą filtracji żelowej i późniejszej dializy wyizolowały z osocza bydlęcego frakcję zawierającą związki o charakterze glikopeptydowym. Uzyskana w ten sposób grupa związków niedializujących została nazwana „niedializującą frakcją cukrowo - peptydową" (frakcja Ncp). Frakcja ta hamuje proliferację komórek linii CHL, podczas gdy jedna z jej elektroforetycznych podfrakcji o charakterze kwaśnym wykazuje działanie przeciwne [60]. W komórkach linii BHK 21/C13 frakcja Ncp hamuje wbudowywanie ^{14}C D - L leucyny do nierozpuszczalnego w 5% TCA materiału komórkowego, wykazując

http://rcin.org.pl

nieznaczną przewagę w homologicznych komórkach transformowanych wirusem RSV. Metodą wbudowywania znakowanej trytem tymidyny stwierdzono w tym samym układzie komórkowym wyraźne zahamowanie, pod wpływem działania frakcji, syntezy kwasów dezoksyrybonukleinowych [57]. Obecnie prowadzone prace zmierzają do wyosobnienia z frakcji Ncp składnika (składników) odpowiedzialnego za obserwowane zmiany w biosyntezie makrocząsteczek i w proliferacji badanych komórek.

Należy wspomnieć, że same komórki, a szczególnie te, które są zdolne do wzrostu w środowiskach pozbawionych surowicy, wytwarzają czynniki wzrostu [18, 54]. Putrescyna w połączeniu z peptydami lub białkami jest czynnikiem wzrostu wytwarzanym w hodowli komórkowej przez ludzkie fibroblasty [40, 46].

CHALONY

Chalony stanowią grupę substancji o charakterze peptydowym, którym przypisywana jest rola swoistych endogennych inhibitorów mitozy [6, 19, 26, 64]. Te swoiste tkankowo, a nieswoiste gatunkowo substancje wytwarzane są w tkance, na którą wybiórczo oddziaływają, kontrolując jej wzrost na zasadzie ujemnego sprzężenia zwrotnego [27, 33, 35]. Na poziomie organizmu przemieszczają się w układzie krążenia, a na poziomie tkankowym — przez dyfuzję [5]. Działają głównie pod koniec fazy G_1 cyklu życiowego komórki przez opóźnienie zapoczątkowania syntezy DNA i/lub pod koniec fazy G_2, kontrolując mitotyczną aktywność [2, 22, 26, 55]. Nie są cytotoksyczne, a działanie ich jest odwracalne i krótkotrwałe. Poznano ponad 20 układów, w których działają swoiste dla nich chalony [3]. Wyizolowane zostały m. in. drobnocząsteczkowe chalony erytrocytów, granulocytów, melanocytów i wątroby o masach nieprzekraczających 5000 daltonów [2, 16]. Pierwszorzędowa struktura tych związków, mimo ponad dziesięcioletniego okresu ich badań, nie została dotychczas poznana. Cechy charakterystyczne wybranych chalonów przedstawia tabela 1.

W mechanizmie działania chalonów można wyróżnić 3 etapy: syntezę cząsteczki, jej transport między komórkami danej tkanki i między tkanką a krwią oraz antymitotyczne działanie na poziomie komórki [6]. Przyjmuje się, że synteza chalonu utrzymywana jest na stałym poziomie. Nierównomierny transport chalonu, kontrolowany przez swoisty mechanizm w błonie komórkowej, jest przyczyną zwiększonego wewnątrzkomórkowego stężenia tego związku. Teoretycznie zakłada się, że każda cząsteczka chalonu składa się z dwóch funkcjonalnych komponent. Mitoza jest w zasadzie takim samym procesem we wszystkich

http://rcin.org.pl

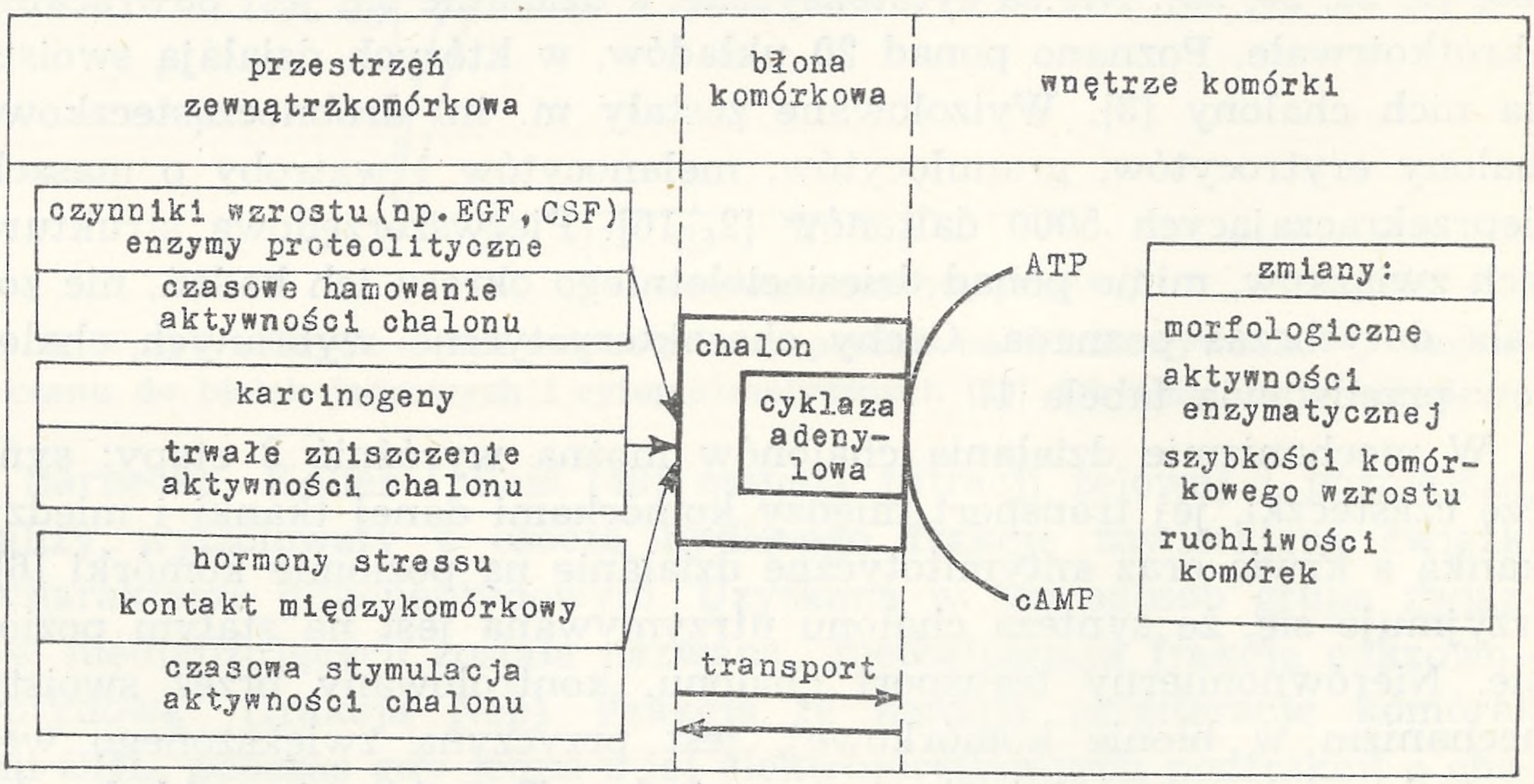
TABELA I

Ogólna charakterystyka wybranych chalonów [2]

Chalony	Faza cyklu komórkowego, w której działają	Masa cząst. aktywnego materiału (daltony)	Przeprowadzone testy		Gatunkowa swoistość
			in vitro	in vivo	
Epidermy	G_1	ca. 100000	tak	tak	nie
Erytrocytów	G_1	2000-4000	tak	—	nie
Fibroblastów	G_1	30000-50000	tak	—	—
Granulocytów	G_1	4000	tak	tak	nie
Nerki	G_2	—	tak	tak	nie
Wątroby	G_1	1000	tak	tak	nie
Limfocytów	G_1	30000-50000	tak	tak	nie

typach komórek i dlatego antymitotyczna komponenta wszystkich chalonów może być identyczna. Druga komponenta prawdopodobnie zawiera informację pozwalającą na rozpoznanie swoistej tkankowo błony komórkowej i na wniknięcie do wnętrza komórki całej efektorowej cząsteczki.

Mechanizm działania chalonu na poziomie komórki jest nieznany. Bullough przypisuje chalonom rolę czynników kontrolujących ekspresję genów syntetyzujących enzymy funkcjonalnie związane z procesem mitotycznego podziału komórki [6]. Z drugiej strony, istnieją doświadczalne przesłanki popierające hipotezę działania chalonów przez układ cyklazy adenylowej i cyklicznego AMP (ryc. 5) [2, 24, 34, 62].



Ryc. 5. Schematyczne przedstawienie hipotetycznego mechanizmu działania chalonów przez układ cyklazy adenylowej i cyklicznego AMP ([2], zmodyfikowane). Objaśnienia w tekście

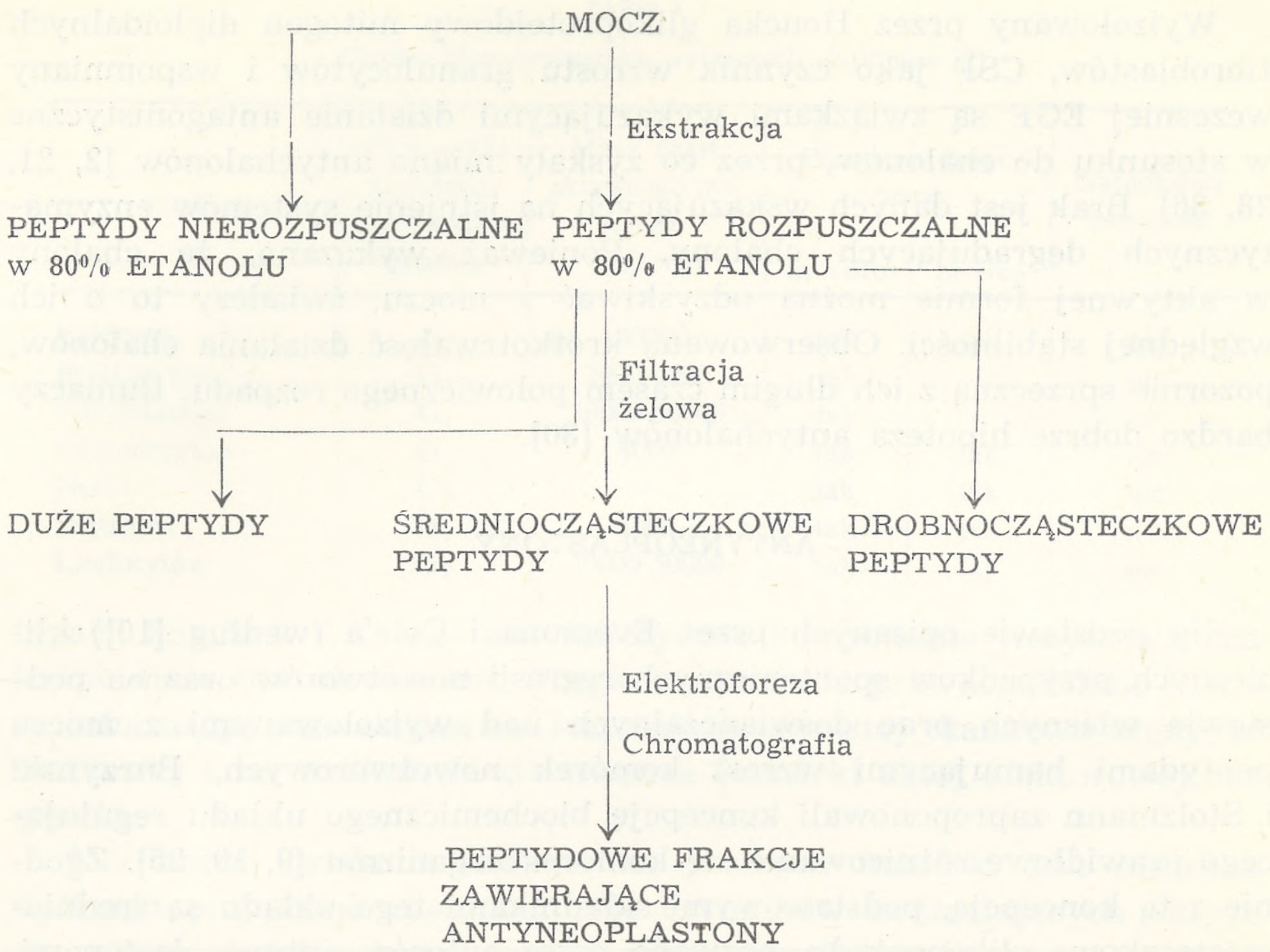
http://rcin.org.pl

Wyizolowany przez Houcka glikoproteidowy mitogen diploidalnych fibroblastów, CSF jako czynnik wzrostu granulocytów i wspomniany wcześniej EGF są związkami wykazującymi działanie antagonistyczne w stosunku do chalonów, przez co zyskały miano antychalonów [2, 21, 28, 36]. Brak jest danych wskazujących na istnienie systemów enzymatycznych degradujących chalony. Ponieważ wykazano, że chalony w aktywnej formie można odzyskiwać z moczu, świadczy to o ich względnej stabilności. Obserwowaną krótkotrwałość działania chalonów, pozornie sprzeczną z ich długim czasem połowicznego rozpadu, tłumaczy bardzo dobrze hipoteza antychalonów [30].

ANTYNEOPLASTONY

Na podstawie opisanych przez Eversona i Cole'a (według [10]) klinicznych przypadków spontanicznych regresji nowotworów oraz na podstawie własnych prac doświadczalnych nad wyizolowanymi z moczu peptydami hamującymi wzrost komórek nowotworowych, Burzynski i Stolzmann zaproponowali koncepcję biochemicznego układu regulującego prawidłowe różnicowanie się komórek organizmu [9, 10, 25]. Zgodnie z tą koncepcją, podstawowymi składnikami tego układu są średniocząsteczkowe glikopeptydy, nazwane przez autorów antyneoplastonami. Według Burzynskiego i Stolzmanna, antyneoplastony działają przez selektywne hamowanie wzrostu komórek nowotworowych nie wpływając aktywująco na układ immunologiczny organizmu. Są one prawdopodobnie syntetyzowane w tkankach, skąd przechodzą do układu krążenia. Podobnie jak chalony, są znajdowane w formie aktywnej w moczu, który dotychczas stanowi główne źródło ich izolacji. W pierwszych doświadczeniach otrzymano z 24 litrów prawidłowego ludzkiego moczu 119 frakcji peptydowych metodą etanolowej ekstrakcji, a następnie filtracji żelowej, elektroforezy i cienkowarstwowej chromatografii (ryc. 6) [11]. Frakcje te poddano testom we wspólnej hodowli komórek ludzkiego mięsaka kości i mieloblastycznej białaczki. Wyniki testów przedstawia tabela 2. Pięć frakcji wykazywało zahamowanie syntezy DNA i RNA, a trzy z nich — dodatkowo zahamowanie syntezy białka. Z siedmiu innych frakcji, pięć miało hamujący wpływ tylko na syntezę RNA, a dwie — tylko na syntezę białka. Peptydowe frakcje aktywne we wspomnianym układzie komórek testowano kolejno w hodowlach komórek nowotworowych: HeLa, białaczkowych komórek otrzymanych z krwi pacjentów z ostrą białaczką mieloblastyczną, komórek ludzkiego mięsaka kości oraz w hodowli normalnych ludzkich fibroblastów.

http://rcin.org.pl



Ryc. 6. Ogólny schemat izolowania peptydowych frakcji zawierających antyneoplastony [11]. Objaśnienia w tekście

Różna swoistość działania antyneoplastonów wobec danych linii i hodowli komórek nowotworowych stała się jednym z kryteriów nomenklatury tych związków. Aktywny składnik frakcji, która hamowała wzrost w trzech wymienionych hodowlach komórek nowotworowych, nazwano antyneoplastonem A; składnik, który hamował wzrost tylko komórek HeLa — antyneoplastonem H. Stwierdzono, że antyneoplaston L działał wybiórczo na komórki białaczki mieloblastycznej, a antyneoplaston O — na komórki mięsaka kości [10]. Test w hodowli zarodkowych fibroblastów nie wykazał żadnego wpływu antyneoplastonu L na syntezę DNA, podczas gdy hamujący wpływ wykazywała frakcji zawierająca antyneoplaston H oraz frakcja zawierająca antyneoplaston A (ryc. 7).

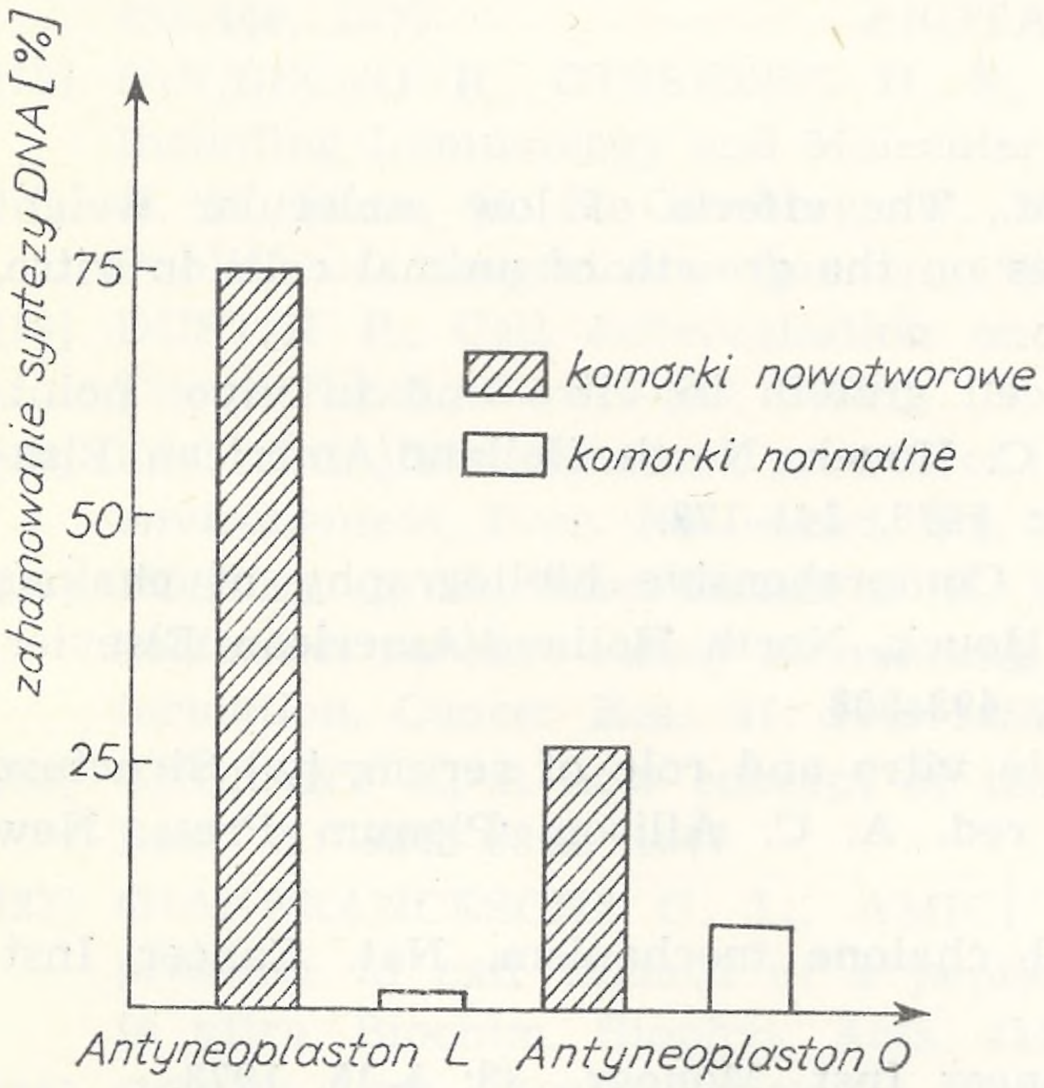
Wyróżnia się dwie grupy antyneoplastów. Do jednej z nich należą peptydy o charakterze obojętnym lub słabo kwaśnym, wykazujące szeroką swoistość działania w stosunku do różnych komórek nowotworowych. Do drugiej grupy należą peptydy o charakterze silnie kwaśnym, które przez swoją tkankową swoistość przypominają chalony. Brak jest danych o gatunkowej swoistości antyneoplastonów, a ich aktywność w hamowaniu mitoz trzykrotnie przewyższa aktywność chalonów [9, 10]

http://rcin.org.pl

TABELA 2

Wpływ peptydowych frakcji izolowanych z moczu na syntezę DNA, RNA i białka we wspólnej hodowli komórek ludzkiego mięsaka kości i mieloblastycznej białaczki [11]

Frakcja peptydowa	Synteza DNA		Synteza RNA		Synteza białka	
	Zahamowanie (%)	Wzmożenie (%)	Zahamowanie (%)	Wzmożenie (%)	Zahamowanie (%)	Wzmożenie (%)
W3B3P2H6	0	0	0	0	15	0
W3B3P2H7	0	0	0	0	0	42
W3B1-3P3H5	0	0	0	0	18	0
W3B1-3P3H6	0	0	16	0	0	0
W3B1-3P3H7	16	0	4	0	0	0
W3B1-3P5H2	0	0	12	0	0	0
W3B1-3P5H4	20	0	30	0	23	0
W3B1-3P5H11	0	0	16	0	0	0
W3B1--3P5H13	27	0	44	0	0	0
W3B1-3P8H7	0	0	27	0	0	0
W3B1--3P13H4	0	0	11	0	0	0
W3B4P1H5	19	0	22	0	12	0
W3B4P2H8	26	0	28	0	16	0



Ryc. 7. Diagram zahamowania przez antyneoplastony syntezy DNA w hodowli komórek białaczkowych (antyneoplaston L) i w hodowli ludzkiego mięsaka kości i mieloblastycznej białaczki (antyneoplaston O). Komórki normalne — zarodkowe ludzkie fibroblasty [10]

UWAGI KOŃCOWE

Tworzenie przez peptydy agregatów z białkami [49], a także stosunkowo trwałych agregatów z innymi peptydami [23], stwarza wiele trudności w ich izolacji. Znamiennym przykładem tych trudności są

http://rcin.org.pl

wieloletnie zmagania różnych badaczy z wyizolowaniem i oczyszczeniem chalonów. Z tego względu należy założyć możliwość badania przez różnych autorów tych samych związków, które różnią się między sobą „stopniem homogenności" i są oczywiście inaczej nazywane.

Tematem wymagającym odrębnego opracowania jest regulacja komórkowego wzrostu w adekwatnych testach in vitro przez hormony peptydowe i peptydy grasicy. Osobnym zagadnieniem, pominiętym w tej pracy, jest cytostatyczny wpływ antybiotyków o strukturze peptydowej na hodowle tkankowe. Wiele informacji na ten temat zawiera monografia Kobrzyskiego, Kowszyk - Gindifer i Kuryłowicza pt. „Antybiotyki" [32].

Należy podkreślić, że przedstawione w niniejszym artykule poglądy i hipotezy, dotyczące roli peptydów w regulacji komórkowego wzrostu, mają charakter dyskusyjny. Ponieważ nieznany jest dotychczas prawdopodobnie złożony mechanizm procesów komórkowego różnicowania i wzrostu, wydaje się, że wysunięte przypuszczenia powinny być także brane pod uwagę.

Autor wyraża podziękowanie prof. Marii Sarneckiej - Keller za zachęcenie do napisania tego artykułu oraz za pomocne uwagi w trakcie pracy.

LITERATURA

[1] AMBORSKI R. L., MOSKOWITZ M., The effects of low molecular weight materials derived from animal tissues on the growth of animal cells in vitro, Exptl. Cell Res., **53**: 117–128, 1968.

[2] ATTALLAH A. M., Regulation of cell growth in vitro and in vivo: point/ /counterpoint, [w] Chalones, red. J. C. Houck, North Holland/American Elsevier, Amsterdam–Oxford, New York 1976, 141–172.

[3] ATTALLAH A. M., HOUCK J. C., Comprehensive bibliography of chalone literature, [w] Chalones, red. J. C. Houck, North Holland/American Elsevier, Amsterdam–Oxford, New York 1976, 493–508.

[4] BROOKS R. F., Growth regulation in vitro and role of serum, [w] Structure and Function of Plasma Proteins, red. A. C. Allison, Plenum Press, New York, London, 1976, **2**: 239–289.

[5] BULLOUGH W. S., The epidermal chalone mechanism, Nat. Cancer Inst. Monogr., **38**: 99–107, 1973.

[6] — The chalones: a review, Nat. Cancer Inst. Monogr., **38**: 5–15, 1973.

[7] BÜRGI H., MULLER W. A., HUMBEL R. E., LABHART A., FROESCH E. R., Non - suppressible insulin - like activity of human serum. I. Physicochemical properties, extraction and partial purification, Biochim. Biophys. Acta, **121**: 349–359, 1966.

[8] BÜRK R. R., Growth inhibitor of hamster fibroblast cells, Nature, **212**: 1261–1262, 1966.

http://rcin.org.pl

[9] BURZYNSKI S. R., RAO P. N., GROSS S., STOLZMANN Z., Inhibition of the growth of HeLa cells by the peptide isolated from normal human urine, Fed. Proc., 35: 623, 1976.
[10] BURZYNSKI S. R., Antineoplastons: biochemical defense against cancer, Physiol. Chem. Phys., 8: 275–279, 1976.
[11] BURZYNSKI S. R., LOO T. L., HO D. H., RAO P. N., GEORGIADES G., KRANTZENSTEIN H., Biologically active peptides in human urine. III. Inhibitors of the growth of human leukemia, osteosarcoma and HeLa cells, Physiol. Chem. Phys., 8: 13–22, 1976.
[12] BUTSCHAK C., Initiation der DNS - Synthese und Zellteilung durch Wachstumsfaktoren, [w] Biochemische Grundlagen der Teilung und Differenzierung von Normal - und Tumorzellen, red. C. Butschak, VEB Gustav Fischer Verlag, Jena, 1976, 60–63.
[13] COHEN S., Isolation of mouse submaxillary gland protein accelerating incisor eruption and eyelid opening in the new born animal, J. Biol. Chem., 237: 1555–1562, 1962.
[14] COHEN S., STASTNY M., Epidermal growth factor. III. The stimulation of polysome formation in chick embryo epidermis, Biochim. Biophys. Acta, 166: 427–437, 1968.
[15] De LUCA C., HABEEB A. F. S. A., TRITSCH G. L., The stimulation of growth of mammalian cells in vitro by a peptide from enzymatic digests of serum, Exptl. Cell Res., 43: 98–106, 1966.
[16] DEWEY D. L., The melanocyte chalone, Nat. Cancer Inst. Monogr., 38: 213–216, 1973.
[17] DUFFY P. E., KREMZNER L. T., Ornithine decarboxylase activity and polyamines in relation to aging of human fibroblasts, Exptl. Cell. Res., 108: 435–440, 1977.
[18] DULBECCO R., GINSBERG H. S., Animal cell cultures, [w] Microbiology Including Immunology and Molecular Genetics, red. B. D. Davies, R. Dulbecco, H. N. Eisen, H. S. Ginsberg, W. B. Wood, M. McCarty, Harper and Row Publishers, Hargestown - London 1975, 1121–1139.
[19] DUSTIN P., Cell differentiation and carcinogenesis: a critical review, Cell Tissue Kinet., 5: 519–533, 1972.
[20] EAGLE H., The sustained growth of human and animal cells in a protein - free environement, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., 46: 427–432, 1960.
[21] FOSTER R. S., MacPHERSON B. R., BROWDIE D. A., Effect of *Corynebacterium parvum* colony stimulating factor and granulocytemacrophage colony formation, Cancer Res., 37: 1349–1355, 1977.
[22] GELFANT S., A new concept of tissue and tumor cell proliferation, Cancer Res., 37: 3845–3862, 1977.
[23] GIANFRANCESCHI G. L., AMICI D., GUGLIELMI L., Evidence for the presence in calf thymus of a peptidic factor controlling DNA transcription in vitro, Biochim. Biophys. Acta, 414: 9–19, 1975.
[24] GOETZ I. E., WEINSTEIN C., ROBERTS E., Effects of protease inhibitors of growth of hamster tumor cells in culture, Cancer Res., 32: 2469–2474, 1972.
[25] GROSS S., GALICKA N., GARBARCZYK N., GIANNINI N., BURZYNSKI S. R., STOLZMANN Z., Urinary peptides inhibit DNA synthesis in vitro in certain cultured neoplastic cells, Clin. Chem., 23: 148–149, 1977.
[26] HOUCK J. C., Chalones specific endogenous mitotic inhibitors, FEBS Lett., 32: 1–8, 1973.

http://rcin.org.pl

[27] — General introduction to the chalone concept, Nat. Cancer Inst. Monogr., **38**: 1–4, 1973.

[28] — Fibroblast chalone and a putative circulating and anti - chalone, [w] Chalones, red. J. C. Houck, North Holland/American Elsevier, Amsterdam - Oxford, New York, 1976, 247–263.

[29] ISLAM M. N., KAY E. R. M., Nucleotide - peptides of cells of the Ehrlich - Lettre ascites carcinoma, Arch. Biochem. Biophys., **150**: 250–258, 1972.

[30] IVERSEN O. H., The history of chalones, [w] Chalones, red. J. C. Houck, North Holland/American Elsevier, Amsterdam - Oxford, New York, 1976, 38–69.

[31] JANNE J., WILLIAMS - ASHMAN H. G., On the purification of L - ornithine decarboxylase from rat prostate and effects of thiol compounds on the enzyme, J. Biol. Chem., **246**: 1725–1732, 1971.

[32] KORZYBSKI T., KOWSZYK - GINDIFER Z., KURYŁOWICZ W., Antybiotyki polipeptydowe, [w] Antybiotyki, red. D. Chylińska, PZWL, Warszawa, 1977, **1**: 254–401.

[33] LAURENCE E. B., Experimental approach to the epidermal chalone, Nat. Cancer Inst. Monogr., **38**: 37–40, 1972.

[34] MALLUCI L., Cell response to surface stimulation, Nature New Biol., **240**: 60–61, 1972.

[35] MARKS F., A tissue - specific factor inhibiting DNA synthesis in mouse epidermis, Nat. Cancer Inst. Monogr., **38**: 79–90, 1973.

[36] — The epidermal chalones, [w] Chalones, red. J. C. Houck, North Holland/American Elsevier, Amsterdam - Oxford, New York 1976, 174–227.

[37] MATTHEWS D. M., PAYNE J. W., Effects of peptides on growth of animal cells in culture, [w] Peptide Transport in Protein Nutrition, red. D. M. Matthews, J. W. Payne, North Holland/American Elsevier, New York 1975, 41–46.

[38] — The story of strepogenin, [w] Peptide Transport in Protein Nutrition, red. D. M. Matthews, J. W. Payne, North Holland/American Elsevier, New York 1975, 13–21.

[39] MAGYESI K., KHAN C. R., RATH J., GORDEN P., Physiology of nonsuppressible insulin - like activity, [w] Endocrinology, Proceedings of the V International Congress of Endocrinology, Hamburg 1976, red. V. H. T. James, Excerpta Medica, Amsterdam - Oxford, **2**: 173–177, 1977.

[40] MELVIN M. L., KEIR H. M., Release of polyamines from growing and serum - deprived BHK - 21/C13 cells, 568th Meeting Aberdeen, Biochem. Soc. Transact., **5**: 711–712, 1977.

[41] MIERZEJEWSKI K., ROZENGURT E., Stimulation of DNA synthesis and division in chemically defined medium: effect of epidermal growth factor, insulin, vitamin B_{12} on resting cultures of 3T6 cells, Biochem. Biophys. Res. Commun., **73**: 271–278, 1976.

[42] — Density - dependent inhibition of fibroblast growth is overcome by pure mitogenic factors, Nature, **269**: 155–156, 1977.

[43] PARKER R. C., Media containing naturally occurring ingredients, [w] Methods of Tissue Culture, red. R. C. Parker, Pitman Medical Publishing Co., Ltd, London 1961, 81–92.

[44] PHILLIPS L. S., DAUGHADAY W. H., Bioassay of somatomedin, [w] Endocrinology, Proceedings of the V International Congress of Endocrinology 1976, red. V. H. T. James, Excerpta Medica, Amsterdam - Oxford, **2**: 150–161, 1977.

http://rcin.org.pl

[45] PICKART L., THAYER L., THALER M. M., A synthetic tripeptide which increases survival of normal liver cells and stimulates growth in hepatoma cells, Biochem. Biophys. Res. Commun., **54**: 562–566, 1973.
[46] ROSENBLUM M. G., DURIE B. G. M., SALMON S. E., CHANG S., RUSSELL D. H., A spermidine conjugate in body fluids of rats and humans, AACR Abstracts, **60**: 15, 1976.
[47] ROSZELL J. A., DOULAS C. J., IRVING Ch. C., Polyaminestimulated growth of cultured rat urinary bladder epithelial cells, Cancer Res., **37**: 239–243, 1977.
[48] SARNECKA - KELLER M., RAIS A., The nondialysable sugar peptide fraction from the bovine blood plasma. Isolation and preliminary characteristic, Acta Biol. Crac., Ser. Zool., **14**: 325–330, 1968.
[49] SARNECKA - KELLER M., RAIS A., KLEIN A., Nondialysable sugar peptide fraction of the bovine plasma. Comparison of ninhydrin positive substances of this fraction with low molecular constituents of seromucoid, Acta Biol., Ser. Zool., **15**: 175–182, 1972.
[50] SAVAGE C. R., COHEN S., Epidermal growth factor and a new derivative, J. Biol. Chem., **247**: 7609–7611, 1972.
[51] SAVAGE C. R., INAGAMI T., COHEN S., The primary structure of epidermal growth factor, J. Biol. Chem., **247**: 7612–7621, 1972.
[52] SCHLESINGER D. H., PICKART L., THALER M. M., Growth - modulating serum tripeptide is glycyl - histidyl - lysine, Experientia, **33**: 324–325, 1977.
[53] SCHUBERT D., LACORBIERE M., WATSON J., Growth regulation of cells grown in suspension culture, Nature, **264**: 266–267, 1977.
[54] SHODELL M., ISSELBACHER K., Effect of different media supplements on amino acid uptake and mitotic stimulation in BHK cells, Nature New Biol., **243**: 83–85, 1973.
[55] SMITH J. A., MARTIN L., Do cell cycle?, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., **70**: 1263–1267, 1973.
[56] STASTNY M., COHEN S., Epidermal growth factor. IV. The induction of orithine decarboxylase, Biochim. Biophys. Acta, **204**: 578–589, 1970.
[57] SUDOŁ M., KLEIN A., BRANNY J., (dane nie publikowane).
[58] TAYLOR J. M., COHEN S., MITCHELL W. M., Epidermal growth factor: high and low molecular weight forms, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., **67**: 164–171, 1970.
[59] TRITSCH G. L., GRAHL - NIELSEN O., The structure of growth controlling peptides for mammalian cells in axenic culture, Biochemistry, **8**: 1816–1820, 1969.
[60] TURYNA B., KUJAT R., SARNECKA - KELLER M., PORWIT - BÓBR Z., The effect of the nondialysable sugar - peptide fraction of bovine plasma and its electrophoretic subfractions on cell growth, Folia Biol., **25**: 89–95, 1977.
[61] VALLEE B. L., Zinc biochemistry in normal and neoplastic growth processes, Experientia, **33**: 600–601, 1977.
[62] VORHEES J. J., DUELL E. A., BASS L. J., HARRELL E. R., Role of cyclic AMP in the control of epidermal cell growth and differentiation, Nat. Cancer Inst. Monogr., **38**: 47–59, 1973.
[63] WESTERMARK B., Density dependent proliferation of human glia cells stimulated by epidermal growth factor, Biochem. Biophys. Res. Commun., **69**: 304–310, 1976.

http://rcin.org.pl

[64] WHELDON T. E., KIRK J., GRAY W. M., Mitotic autoregulation, growth control and neoplasia, J. Theor. Biol., **38**: 627–639, 1973.
[65] WOLSKA - MITASZKO B., Rola poliamin w syntezie białka, Post. Biochem., **23**: 399–415, 1977.

Otrzymano: 8 maja 1978.
Przyjęto: 30 maja 1978.

Adres autora: ul. Grodzka 53, 31 - 001 Kraków.

http://rcin.org.pl

POSTĘPY BIOLOGII KOMÓRKI TOM 5, NR 4, 1978 (341–354)

ENVIRONMENTAL ALTERATIONS OF THE ERYTHROCYTE GLYCOCALYX *

Günther GEYER

Institute of Anatomy, Friedrich Schiller University, Jena, GDR

Summary. Each individual cell is under constant interaction with its environment. In the case of erythrocytes as well as many other types of metazoan cells homeostasis makes the multiplicity of interactions to become more uniform. On the other hand, changes of the environment, e.g. transfer into an artificial medium, may exert a variety of effects on the cell surface constituents, and many of them can be traced back to physicochemical terms. The present paper reports cytochemical and biophysical studies on environmental alterations of the erythrocyte glycocalyx.

Under physiologic conditions blood plasma proteins are bound to the red cell membrane either by adsorption or specific interaction with receptor sites. High ionic strength treatment removes most of the bound protein. Incubation in low ionic strength media may render polypeptides insoluble, and for that reason it is an inappropariate means for washing off bound protein. Following incubation in human gamma globulin, erythrocytes washed with low ionic strength sucrose were heavily coated with insolubilised globulin. Proteins absorbed or specifically bound to the red cell membrane mask the negatively charged sites. The effect is thought to be due to both neutralisation and steric hindrance. The reduction of the net negative charge following the specific binding of two anti A-globulins to the erythrocyte glycocalyx was reversed by additional coating with acid glycoproteins bovine submaxillary mucin and glycophorin, respectively.

Upon incubation in phosphate buffered saline, discoid red cells transform to echinocytes. The shape change, which according to the bilayer-couple hypothesis

* Aided by grants from the Ministerium für Wissenschaft und Technik der DDR.

Invited paper read at the XVIth Symposium of the Polish Histochemical and Cytochemical Society at Szczecin, May 22-24, 1978.

http://rcin.org.pl

reflects absolute or relative expansion of the peripheral plasmalemmal leaflet, is believed to be associated with conformational changes of integral proteins of the cell membrane. Under centrifugation strain erythrocytes previously treated with phosphate buffered saline exhibit an increased permeability resulting in the loss of K^+ and cell water, accompanied by a decrease of cell volume and an increase of cell deformability. Prior to any treatment with phosphate buffered saline, discoid red cells incubated in blood plasma do not suffer from strain - dependent leakage, therefore, they cannot gain extra deformability due to loss of cellular fluid. From this finding one can conclude, that in circulating blood discoid normocytes will be incapable of passing a capillary smaller than 2.8 μm in diameter.

Repeated incubation in low ionic strength isotonic sucrose deprives the glycocalyx of loosely bound ions and may cause conformational changes. Low ionic strength treatment of erythrocytes results in complete inhibition of anisotropic staining, severe decrease of colloidal iron affinity, instantaneous agglutination, and increase of membrane permeability. The effects are considered mainly to be due to low ionic strength uncoiling of N - terminal hydrophilic segments of glycoproteins, thus being associated with reduction of charge density. High ionic strength media reverse this phenomenon.

INTRODUCTION

Proteins spanning the red cell membrane consist of three segments: a central hydrophobic segment inserted into the lipid bilayer, and two hydrophilic segments located at the cytoplasmic and external aspect of the membrane, respectively. The external hydrophilic segment is supplemented by oligosaccharide chains so as to comprise the main components of the erythrocyte glycocalyx [3, 20, 24, 33, 42]. At least some of the saccharide chains carry terminal sialic acid residues contributing to the negative surplus charge of the cell surface [5, 6, 8, 9, 37]. Various other sugar residues as well as adjacent sequences of the glycoprotein's polypeptide chain offer abundant receptor sites [32].

Saccharide side chains themselves and their negatively charged groups largely influence the spatial orientation of N - terminal segments of glycoproteins [25, 26, 38, 45, 46]. In addition, pH, ionic strength, and composition of the extracellular medium may affect the glycoprotein conformation [12]. Under physiologic conditions homeostatic regulation will prevent major alterations of the erythrocyte glycocalyx. Experimental pretreatments and incubations, however, are mostly carried out with high or low ionic strength solutions devoid of proteins and metabolites, i.e. artifical media greatly different from the cell's natural environment. The present study is an attempt to correlate cytochemical findings of the human erythrocyte glycocalyx with the functional properties of its cell membrane and to trace back the molecular mechanism(s).

http://rcin.org.pl

PROTEINS MASKING NEGATIVELY CHARGED GROUPS

a) NONSPECIFIC ADSORPTION OF PROTEINS

Erythrocytes of circulating or banked blood are in constant interaction with proteins of the blood plasma. Most of the blood plasma proteins are adsorbed to the cell surface so that they can be easily removed by treatment with saline media [7, 18]. However, fixation of cells incompletely washed or in the presence of proteins of the medium might result in firm attachment and covalent binding to the cell membrane of denaturated protein. Proteins either adsorbed under physiologic equilibrium conditions or bound by fixation may be considered as compounds neutralising part of the net negative charge of the glycocalyx. In addition, bulky protein molecules bound to the erythrocyte surface may cause steric masking of glycocalyx receptor sites.

Erythrocytes (RBC) previously washed with phosphate buffered saline (PBS) exhibit an intense homogeneous colloidal iron staining of their glycocalyx which is indicative of a great number of free acidic sites [21]. Pretreatment with isotonic sucrose of RBC previously incubated in 1% gamma globulin removed bound protein incompletely owing to the reduced solubility of globulin in the low ionic strength medium. Electron microscopy of cross-sectioned RBC revealed a) globulin coating the outer aspect of the membrane (Fig. 1c), and b) a severe decline of the iron-binding capacity (Fig. 1b) [11]. High ionic strength posttreatment resolubilised part of the adsorbed gamma globulin. Similar incubations performed with 1% serum albumin in place of gamma globulin resulted at best in a moderate decrease of colloidal iron staining of albumin-incubated RBC, the coating of which was not detectable in ordinary electron micrographs. Polyacrylamide gel electrophoresis revealed only traces of albumin which had been desorbed from RBC following incubation in albumin and washing with isotonic sucrose [11]. Topo-optical staining with toluidine blue clearly showed impaired birefringence of the membrane of many, but not of all albumin-incubated RBC of the smear [23].

The findings prove the adsorption to the RBC glycocalyx of proteins and their masking of negatively charged groups. The amount of coating protein is related to a) the type of protein, and b) the ionic strength of the incubation medium. Low ionic strength isotonic sucrose effectively insolubilises adsorbed gamma globulins. Albumins whose solubility is less dependent of the ionic strength [29] are largely washed off by

http://rcin.org.pl

the same treatment. Despite poor retention of coating albumins, their masking of negatively charged sites was demonstrated by the reduced anisotropic toluidine blue staining and the decline of electron microscopic colloidal iron reaction. In the case of globulin coated RBC the masking efficacy was more significant. The findings are inconclusive as to the role neutralisation and steric hindrance may play.

b) SPECIFIC BINDING OF PROTEINS

Presumably some gamma globulin is specifically bound to the RBC glycocalyx receptors, although most of it appears to be only adsorbed (v.s.). Incubation in group A antiserum or anti A_{HP} lectin from *Helix pomatia* of PBS-washed erythrocytes results in binding of either globulin to group A receptors. Reduction of both electrophoretic mobility and colloidal iron staining confirm the decrease of the net negative charge of specifically coated RBC (Table 1). Additional treatment with acid glycoproteins of anti A-coated cells reverts the negative surplus charge to slightly above the original level [42].

In conclusion, cytochemical, cytophoretic, and gel electrophoretic findings provide evidence of specific and nonspecific binding of proteins to the RBC glycocalyx. Repeated high ionic strength treatment is a suitable means to wash off most of the nonspecifically adsorbed proteins which may remain attached to these cells in the case of low ionic strength incubation. The desorption efficiency of low ionic strength treatment is better in the case of proteins least dependent on the ionic

TABLE 1

Relative electrophoretic mobility of coated human group A erythrocytes (per cent increase or decline of electrophoretic mobility in comparison with uncoated red cells). Specific primary coating was performed with group A antiserum or snail anti A_{HP}. Secondary coating of either group of precoated erythrocytes was carried out with glycophorin isolated from human group A erythrocytes and with bovine submaxillary mucin, respectively. n = number of measured cells (according to Sommer et al. [42])

1st coating	2nd coating	n	relative electrophoretic mobility
A antiserum	—	100	-16.7 ± 4.7
A antiserum	glycophorin	80	$+ 6.2 \pm 3.7$
A antiserum	sialomucin	60	$+ 1.2 \pm 3.8$
anti A_{HP}	—	140	-13.5 ± 5.6
anti A_{HP}	glycophorin	120	$+ 5.1 \pm 4.5$
anti A_{HP}	sialomucin	80	$+ 4.6 \pm 4.2$

http://rcin.org.pl

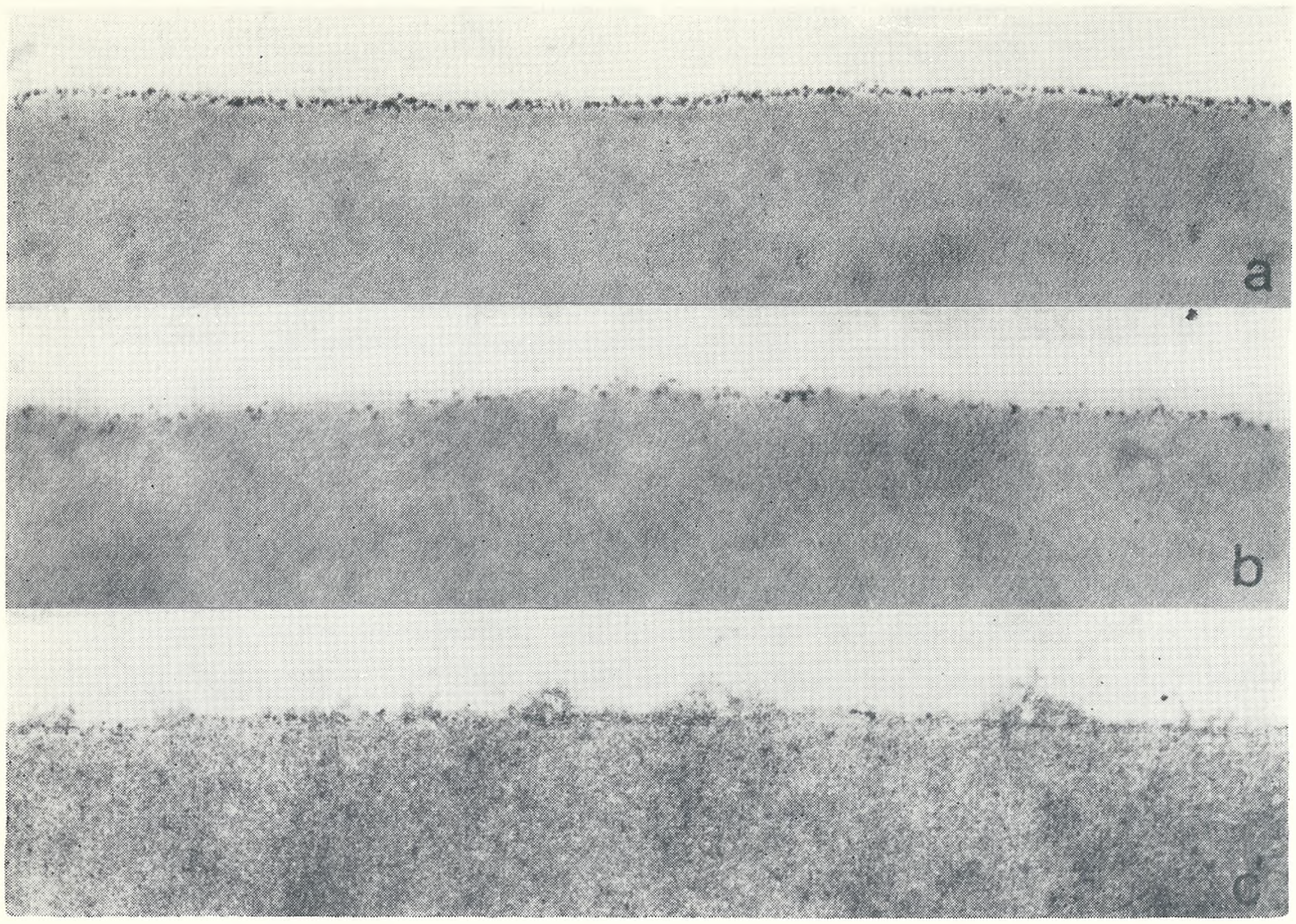


Fig. 1. Colloidal iron staining of the human erythrocyte glycocalyx

a — Cell washed with phosphate buffered saline. Iron particles form a continuous lining of the cell membrane. × 100 000. *b* — Cell previously incubated in human gamma globulin-PBS and washed with isotonic sucrose. Colloidal iron staining of the glycocalyx is greatly reduced. × 100 000. *c* — Same pretreatment as in *b* and staining of the section with uranyl acetate and lead citrate. Patchy deposits of globulin lie attached to the outer aspect of the cell membrane. × 100 000

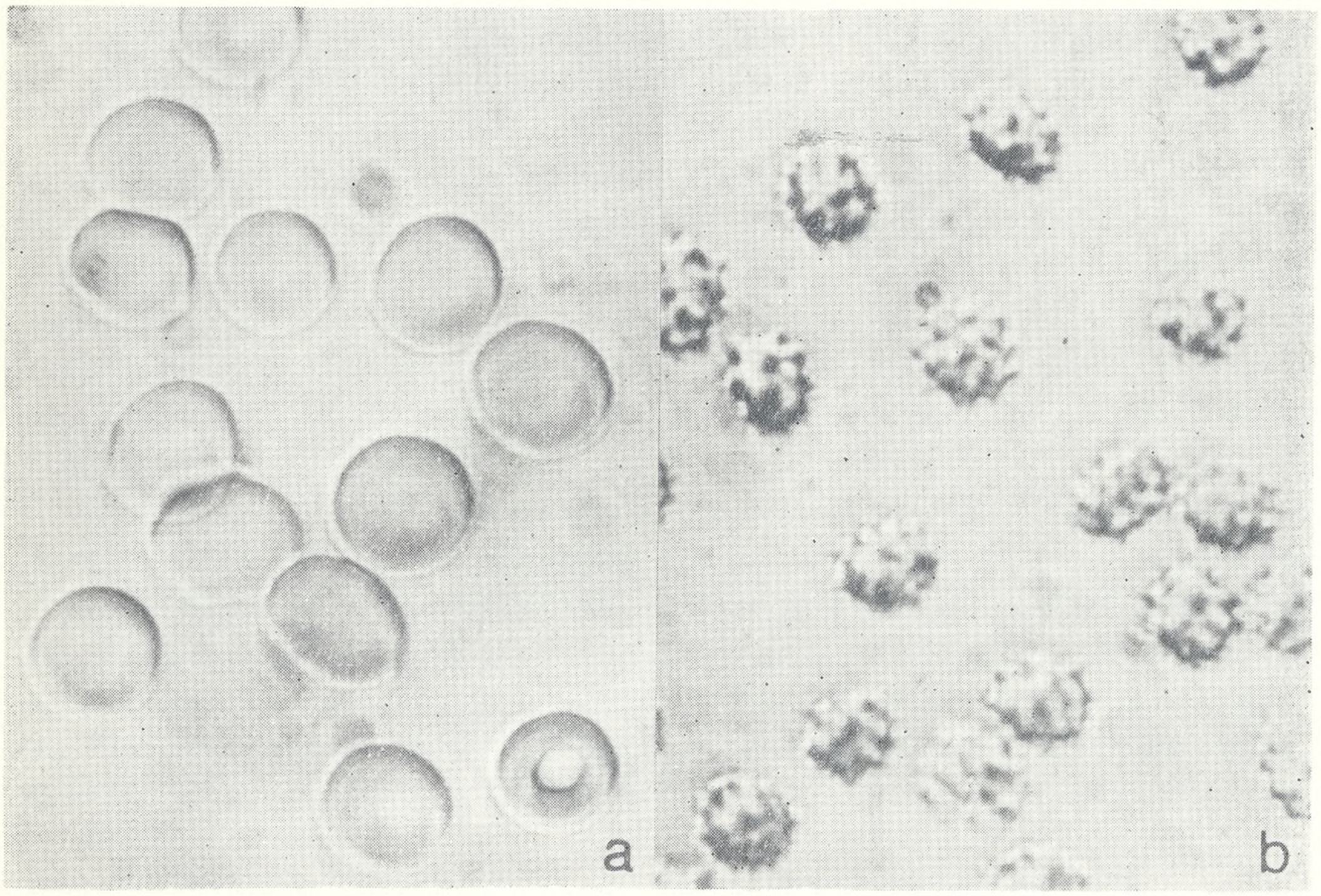


Fig. 2. Human erythrocytes incubated in a) blood plasma, and b) phosphate buffered saline. × 1450

http://rcin.org.pl

http://rcin.org.pl

strenght of the medium, i.e. insolubilisation of gamma globulins will be more pronounced than that of serum albumins. Protein - coating of RBC results in masking of the glycocalyx components; it is associated with a decline of the net negative charge of the cell.

MEMBRANE PERMEABILITY OF WASHED ERYTHROCYTES

Following repeated incubation in PBS, discocytes transform to become echinocytes (Fig. 2) [1, 2, 30]. According to the bilayer - couple hypothesis of Sheetz and Singer [39–41] the change of red cell shape is associated with the alteration of the areal relationship of the outer and inner lamella (0 : I ratio) of the cell membrane, i.e. in the case of discocyte/ /echinocyte transformation the 0 : I quotient increases owing to relative or absolute expansion of the outer lamella. This shape change is reversible for instance upon addition of serum albumin to the PBS medium [30].

If the bilayer - couple hypothesis is correct in explaining the phenomenon in simple geometric terms, the molecular basis of which may then be related to an alteration of the packing of lipids and/or the conformation of penetrating proteins in one or the other lamella or in the membrane as a whole. Hence, routine treatment with PBS may not be restricted to crenation of discocytes, it also should result in changes of the molecular state of the red cell membrane which night affect its functional properties.

Discrepancies of haematocrit values obtained with low and high speed centrifugation of otherwise identically treated RBC have long been known. High - speed centrifugation results in haematocrit values significantly smaller than the packing of cells could allow for unless the cell volume had decreased [4, 31]. These findings prompted a detailed study with two independent methods of evaluation of the cell volume supplemented by assessments of cellular deformability and K^+ efflux [17].

Evaluations of the RBC volume by means of 131 - I labelled human serum albumin revealed identical values irrespective of various incubation media (Table 2). A similar mean erythrocyte volume was found in the case of unwashed cells centrifuged at 15 000 *g* in plasma of banked blood. In contrast, RBC washed with PBS and resuspended in PBS or 3% human serum albumin (HSA) - PBS or 2% human gamma globulin (HgG) - PBS lost about 20% of their volume during high speed

http://rcin.org.pl

TABLE 2

Erythrocyte volume and K^+ efflux in regard to incubation media and strain (according to Halbhuber et al. [17])

Pretreatment	Incubation medium	Cell volume		K^+ efflux[1]	
		15 000g μm^3	131-I albumin μm^3	800g mM/l	15 000g mM/l
–	blood plasma	104	107	0.04	0.04
PBS	PBS	84	107	0.12	0.64
PBS	blood plasma	93			
PBS	HSA-PBS	86	108	0.10	0.48
PBS	HgG-PBS	84			
PBS	isoton. sucrose	75			

[1]from 5 ml banked blood

centrifugation (Table 2). Re-incubation in blood plasma of RBC previously washed with PBS could only partially restore the cells' original resistance towards loss of volume under centrifugation strain (Table 2). Compared with the effect of PBS the loss of cell volume following incubation in isotonic sucrose was still more pronounced.

Parallel to missing reduction of volume of cells in blood plasma the K^+ efflux from these cells was low whether or not they were subjected to the centrifugation strain at 15 000*g* (Table 2). However, incubation of washed erythrocytes in PBS or serum albumin-PBS was accompanied by a 12–16 fold increase of K^+ efflux during high speed centrifugation in comparison to the 2.5–3 fold increase during centrifugation at 800*g*.

The loss of volume is associated with increased deformability of erythrocytes as proved by the passage through micropipettes [17]. Unwashed red cells incubated in blood plasma will pass through a micropipette 2.9 μm in diameter, however, the hydrostatic pressure must exceed about 5 times the value essential for the passage of cells incubated in PBS (Table 3). The latter RBC even passed through a micropipette 2.3 μm in diameter, and according to calculations they also will in the case of a pipette 2.0 μm in diameter although the concomitant loss of volume will amount to about 30% (Fig. 3). At the same hydrostatic pressure only the cylindric process of a red cell incubated in blood plasma entered a 2.3 μm-micropipette, the rest of the cell remained outside. Upon elevation of the pressure microsphaerulation disrupted the cell [17].

The findings provide evidence of alterations of the erythrocyte membrane caused by repeated incubations in PBS or isotonic sucrose.

http://rcin.org.pl

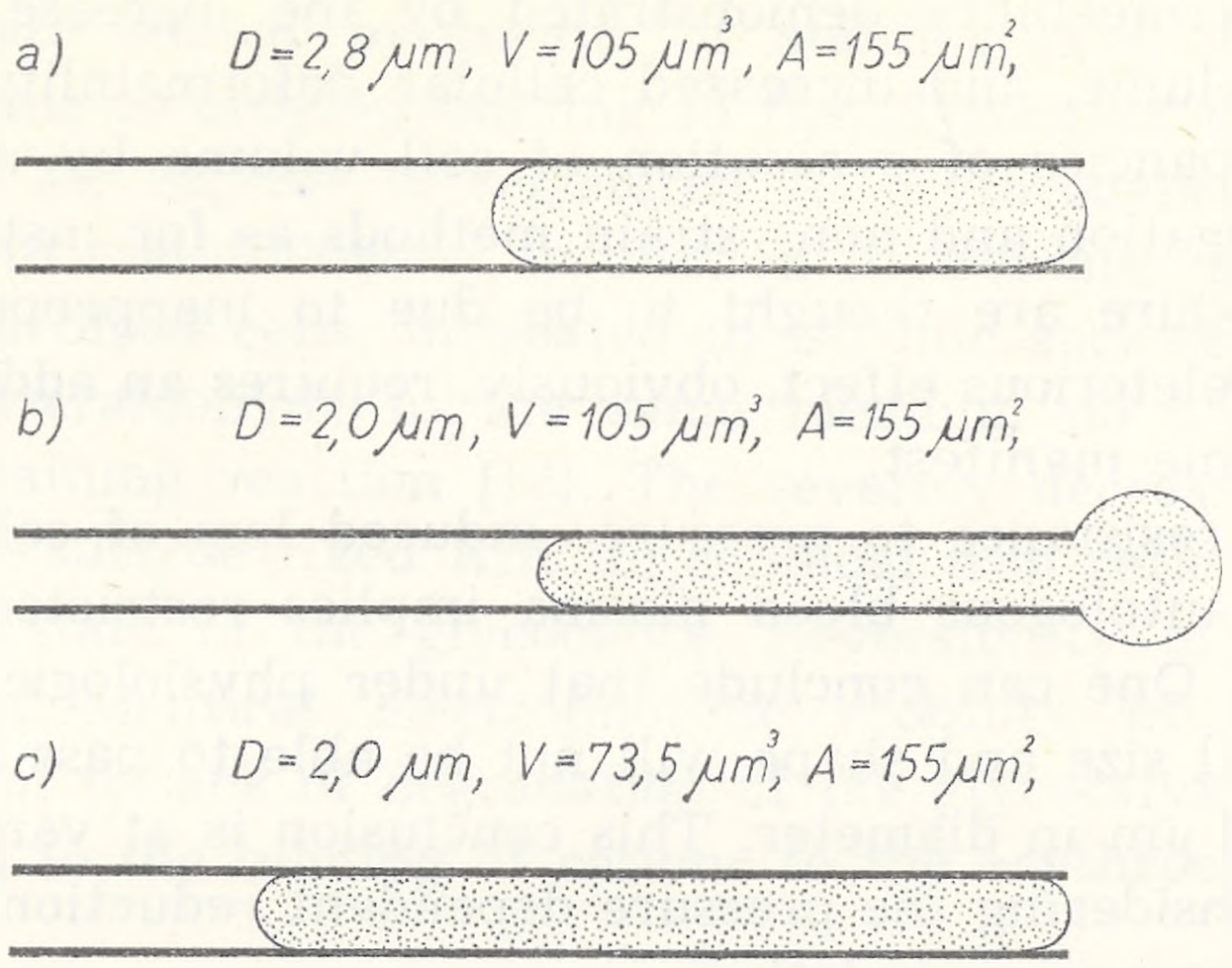


Fig. 3. Deformability of human red cells in regard to their surface area/volume ratio during passage through a micropipette

a — The surface area/volume ratio allows a normocyte to pass through a micropipette 2.8 μm in diameter. *b* — A normocyte, which due to incubation in blood plasma does not suffer from increased membrane permeability, can only partially enter a micropipette 2.0 μm in diameter. *c* — Following repeated incubation in phosphate buffered saline a normocyte under strain may lose about 30% of its fluid to reach a new surface area/volume ratio such as is essential for the passage through a micropipette 2.0 μm in diameter

TABLE 3

Mean hydrostatic pressure (mm H_2O) essential for the passage of an erythrocyte through a micropipette 2.9 μm and 2.3 μm in diameter, respectively, with regard to incubation media (according to Halbhuber et al. [17])

Pretreatment	Incubation medium	⌀ 2.9 μm	⌀ 2.3 μm
—	blood plasma	13.7	—*
PBS	PBS	2.6	156.2**

* Cells partially enter, but do pass the micropiette. Microsphaerulation occurs at 300-350 mm H_2O.

** Concomitant loss of cell volume amounts to about 20%

However, unless these cells are subjected to external strain, the plasmalemmal changes remain occult. The effect(s) was not reverted by resuspension in albumin - PBS or gamma globulin - PBS media of PBS - washed cells, and resuspension in autologous plasma could only succeed in an imperfect restoration of membrane permeability. In experimental conditions membrane alterations were related to an

http://rcin.org.pl

increase of permeability demonstrated by the increase of K^+ efflux, loss of cell volume, and increased cellular deformability.

The discrepancies of evaluation of cell volume by means of high-speed centrifugation and non-strain methods as for instance the tracer dilution procedure are thought to be due to inappropriate treatment of cells. The deleterious effect, obviously, requires an additional external strain to become manifest.

Moreover, resistance to pressure-induced loss of cell fluid of RBC incubated in autologous blood plasma implies restricted deformability in circulation. One can conclude that under physiologic conditions red cells of normal size and shape will not be able to pass a capillary less than about 2.8 μm in diameter. This conclusion is at variance with that of Jay [19] considering the pressure dependent reduction of cell volume a common event in circulation.

LOW IONIC ALTERATION OF GLYCOPROTEIN CONFORMATION

Besides various other factors the interaction of polar groups of a polypeptide chain will affect the actual conformation of the macromolecule. Therefore, changes of pH as well as ionic composition (v.s.) or ionic strength of the incubation medium may be associated with significant conformational changes. During repeated incubation in isotonic sucrose the glycocalyx of RBC undergoes severe alterations, some of them are related to spontaneous 'sugar induced agglutination' [12, 16, 44]. Isotonic sucrose is a low ionic strength medium the application of which will deprive the cell surface of many of its loosely bound inorganic ions, e.g. Ca^{2+} as demonstrated ultracytochemically [10a, 13]. Consequently, this incubation will allow for a new conformation of glycocalyx glycoproteins. The alterations were followed by an agglutination/disagglutination sequence of sucrose incubated red cells. Instantaneous agglutination of cells, repeatedly washed with isotonic sucrose, is considered as indicative of a minor threshold of ion concentration resulting in changes of glycoprotein conformation. The accompanying decline of charge density and reduced repulsion of cells is apt at the weak interaction of autologous isohaemagglutinins, i.e. the agglutination erroneously attributed to the sugar itself. Disagglutination will progress with efflux of cellular ions, i.e. increasing ionic strength of the medium. Disagglutination is inhibited entirely by constant renewal of the incubation medium or can be accelerated efficiently by addition of ions to the medium [12].

Reversible low ionic conformational changes of plasmalemmal

http://rcin.org.pl

glycoproteins are shown by means of staining with toluidine blue. Birefringence due to ordered binding to the glycocalyx of the dyestuff mocelules [22, 34, 35, 36] is registered in erythrocytes treated with PBS previous to and following incubation in isotonic sucrose. On the other hand, red blood cells, incubated in isotonic sucrose and fixed by addition of glutaraldehyde to the same medium, do not exhibit this topo - optical staining reaction [12]. The severely decreased affinity of glutaraldehyde - sucrose fixed RBC to colloidal iron reflects the altered conformational state of the glycocalyx. Reversibility of the effect as well as almost identical electrophoretic mobility of the variously treated cells hint to lack of degradation of the glycocalyx.

With regard to the binding of cations to the erythrocyte glycocalyx

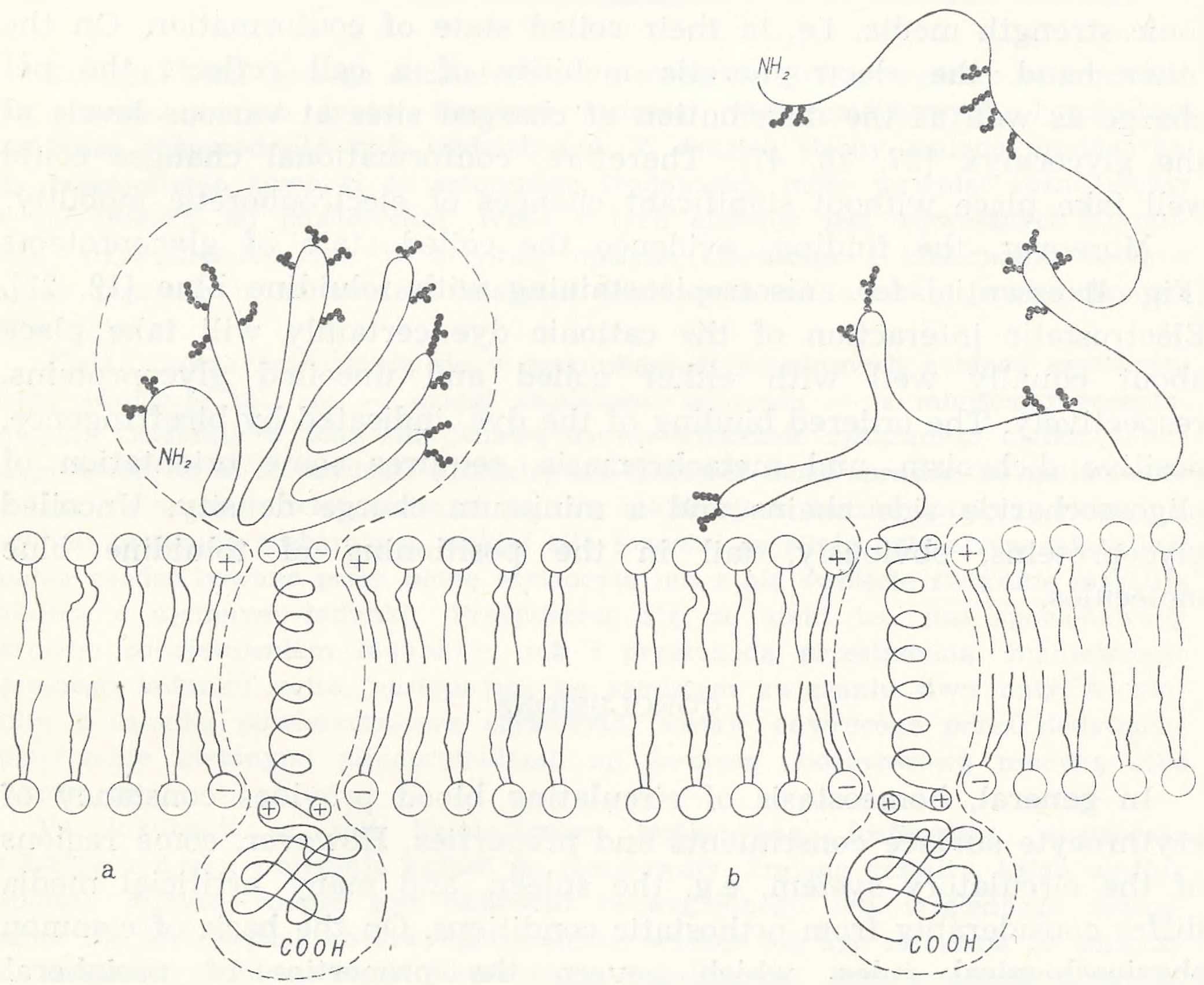


Fig. 4. Schematic representation of a glycophorin molecule of the human erythrocyte membrane

The sketch depicts three segments of the molecule: the hydrophobic segment within the level of the lipid bilayer, the N-terminal external hydrophilic segment which is supplemented with oligosaccharide chains, and the C-terminal cytoplasmic segment

a — Presumed coiled state of conformation the N-terminal hydrophilic segment may acquire in high ionic strength media. *b* — Presumed uncoiled state of the external segment in low ionic strength media

http://rcin.org.pl

[10a, 13] conformational changes due to incubation in low ionic strength isotonic sucrose are considered an uncoiling of glycoproteins which then may become more extended (Fig. 4). This change is associated with the decrease in density of negatively charged sites. Obviously, a minimum local concentration of negative charges is essential for both anisotropic toluidine blue staining and high iron binding capacity. At first glance, normal electrophoretic mobility, despite impaired staining with colloidal iron appears contradictory. From previous studies [10, 14, 15] it is known, however, that the binding of a single particle of colloidal iron will not take place unless a minimum number of negatively charged groups is accessible, thus the binding requires a minimum charge density at sites in good steric position. This prerequisite appears to be fulfilled best by glycoproteins fixed in high ionic strength media, i.e. in their coiled state of conformation. On the other hand, the electrophoretic mobility of a cell reflects the net charge as well as the distribution of charged sites at various levels of the glycocalyx [27, 28, 47]. Therefore, conformational changes could well take place without significant changes of electrophoretic mobility.

Moreover, the findings evidence the coiled state of glycoproteins (Fig. 4) essential for anisotropic staining with toluidine blue [12, 22]. Electrostatic interaction of the cationic dye certainly will take place about equally well with either coiled and uncoiled glycoproteins, respectively. The ordered binding of the dye, indicated by birefringence, positive dichroism, and metachromasia, requires some orientation of oligosaccharide side chains and a minimum charge density. Uncoiled glycoproteins, obviously, fail in the positioning of toluidine blue molecules.

CONCLUSIONS

In general, homeostasis of circulating blood provides constancy of erythrocyte surface constituents and properties. However, some regions of the circulatory system, e.g. the spleen, and many artificial media differ considerably from orthostatic conditions. On the basis of common physicochemical rules, which govern the properties of peripheral hydrophilic segments of glycocalyx glycoproteins, one may presume molecular alterations to occur upon incubation of cells in nonphysiologic media.

Cytochemical and physical methods were applied in this attempt to demonstrate environmental effects on the erythrocyte surface. The findings of the present studies cast light on a) the physiologic masking

http://rcin.org.pl

of erythrocyte receptor sites and b) artificial alterations of membrane permeability and spatial redistribution of receptor sites. At least some of the effects are associated with conformational changes of erythrocyte membrane glycoproteins. Obviously, various routinely applied pretreatments of cells inevitably cause severe alterations of the physiologic state of the cell membrane which might bear relevance to some properties of these cells.

ZMIANY W OSŁONCE POWIERZCHNIOWEJ (GLIKOKALIKS) ERYTROCYTA WYWOŁANE ODDZIAŁYWANIEM ŚRODOWISKA

Streszczenie

Komórka stale podlega oddziaływaniu z otoczeniem. W przypadku erytrocytów, jak również innych typów komórek zwierząt wielokomórkowych, homeostaza zmniejsza różnorodność tych oddziaływań. Z drugiej strony zmiana środowiska, np. przeniesienie komórki do sztucznego środowiska, może wywołać różne efekty w składnikach jej powierzchni. Wiele z tych efektów jest wywołanych czynnikami fizykochemicznymi. W artykule opisano chemiczne i biofizyczne badania zmian powstałych na skutek działania środowiska na osłonkę powierzchniową erytrocyta.

Białka osocza krwi wiążą się w warunkach fizjologicznych z błoną erytrocyta przez adsorpcję lub też — dzięki swoistemu wiązaniu — z miejscami receptorowymi. Działanie wysoką siłą jonową usuwa większość związanego białka. Inkubacja komórek w środowisku o niskiej sile jonowej może sprawić, że polipeptydy zostają związane z ich powierzchnią. Po inkubacji z ludzką gamma - globuliną, krwinki przemyte sacharozą o niskiej sile jonowej są silnie opłaszczone globuliną. Białka zaadsorbowane przez błonę erytrocyta lub z nią swoiście związane maskują miejsca o ujemnym ładunku. Przypuszcza się, że efekt ten jest spowodowany zarówno zobojętnieniem ładunków, jak i przeszkodą przestrzenną. Zmniejszenie ujemnego ładunku netto, następujące po swoistym związaniu dwu anty A - globulin z osłonką powierzchniową erytrocyta, zostaje odwrócone przez dodatkowe opłaszczenie kwaśnymi glikoproteidami, np. bydlęcą podżuchwową mucyną albo glikoforyną.

Po inkubacji w soli fizjologicznej, buforowanej fosforanem, erytrocyty w kształcie dysku zmieniają kształt na morwowaty. Zmiana kształtu, która według hipotezy bilayer - couple jest objawem bezwzględnego lub względnego rozszerzenia się zewnętrznej warstwy plazmolemy, wydaje się być związana ze zmianami konformacji integralnych białek błony komórkowej. Pod wpływem odkształcenia wywołanego wirowaniem, erytrocyty, uprzednio płukane solą fizjologiczną buforowaną fosforanem (PBS), wykazują zwiększoną przepuszczalność, której wynikiem jest utrata K^+ i wody komórkowej, oraz zmniejszenie się objętości komórki i większą skłonność do odkształcania. Przed płukaniem PBS dyskoidalne erytrocyty inkubowane w osoczu krwi nie tracą K^+ podczas wirowania, stąd nie stają się skłonne do odkształceń z powodu utraty płynu komórkowego. Na podstawie tych obserwacji można sądzić, że w krwi krążącej dyskoidalne erytrocyty

http://rcin.org.pl

nie mogą przesuwać się przez naczynie włosowate o przekroju mniejszym niż 2,8 μm.

Powtórna inkubacja w roztworze izotonicznej sacharozy o niskiej sile jonowej pozbawia osłonkę powierzchniową luźno związanych jonów i może spowodować zmiany konformacji białek błonowych. Działanie niską siłą jonową na erytrocyty daje w wyniku całkowite zahamowanie barwienia anizotropowego, znaczne zmniejszenie się powinowactwa do koloidalnego żelaza, natychmiastową aglutynację oraz zwiększenie się przepuszczalności błony komórkowej. Efekty te przypisuje się przede wszystkim prostowaniu się, na skutek działania niskiej siły jonowej, N-końcowych hydrofilnych glikoproteidów, co jest związane ze zmniejszeniem się gęstości ładunku elektrycznego. Środowiska o wysokiej sile jonowej mogą to zjawisko odwrócić.

LITERATURE

[1] BESSIS M., Living blood cells and their ultrastructure, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York 1973.

[2] — Corpuscles, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York 1974.

[3] BRETSCHER M. S., Membrane structure: some general principles, Science, **181**: 622–629, 1973.

[4] CHIEN S., DELLENBACH R. J., USAMI S., GREGERSEN M. I., Plasma trapping in hematocrit determination. Differences among animal species, Proc. Soc. Exp. Biol. Med., **119**: 1155–1165, 1965.

[5] COOK G. M. W., Linkage of sialic acid in the human erythrocyte ultrastructure, Nature, **195**: 159–161, 1962.

[6] COOK G. M. W., HEARD D. H., SEAMAN G. V. F., A sialomucopeptide liberated by trypsin from the human erythrocyte, Nature, **138**: 1011–1012, 1960.

[7] DODD B. E., LINCOLN P. J., The effect of elution on the reactivity of antibodies, as demonstrated by use of red cells various subgroups of A and group B, Brit. J. Haematol., **26**: 93–104, 1974.

[8] EYLAR E. H., MADOFF M. A., Isolation of a glycopeptide from the red cell membrane, Fed. Proc., **21**: 402, 1962.

[9] EYLAR E. H., MADOFF M. A., BRODY O. V., ONCLEY J. L., The contribution of sialic acid to the surface charge of the erythrocyte, J. Biol. Chem., **237**: 1992–2000, 1962.

[10] GEYER G., Elektronenmikroskopische Histochemie. Teil 1. Hdb. d. Histochemie. ed. W. Graumann u. K. Neumann. Bd. I, 3. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, New York 1977.

[10a] GEYER G., LINß W., Inverse localization of Ca^{2+} and La^{3+} high affinity binding sites of the red cell membrane, Exp. Pathol., **12**: 214–217, 1976.

[11] GEYER G., LINß W., STIBENZ D., Adsorbed proteins mask negatively charged sites of the erythrocyte glycocalyx, Acta Histochem., **60**: 312–316, 1977.

[12] GEYER G., LINß W., HALBHUBER K.-J., STIBENZ D., MAKOVITZKY J., BRUCHHAUS H., Reversible conformational changes of plasmalemmal glycoproteins, Acta Histochem., **60**: 283–291, 1977.

[13] GEYER G., LINß W., STIBENZ D., Phosphorylated spectrins are likely constituents of major Ca^{2+} affinity sites, Acta Histochem., **61**: 135–141, 1978.

[14] GEYER G., STIBENZ D., Quantitative aspects of the colloidal iron reaction, Acta Histochem., **50**: 264–272, 1974.

http://rcin.org.pl

[15] — Sterische Bedingungen bei der Bindung partikulärer Kontrastgeber, Acta Histochem. Suppl., **17**: 377–381, 1976.
[16] HALBHUBER K. - J., GEYER G., Zur Zuckeragglutinabilität, Folia Haematol., **103**: 900–905, 1976.
[17] HALBHUBER K. - J., UNGER J., FRÖBER R., GEYER G., Milieuabhängige Permeabilität der Erythrocytenmembran. Eine Fehlerquelle bei der Mikrohämatokritbestimmung, Folia Haematol. (in press).
[18] HARSHMAN S., NAJJAR V. A., The binding of autologous γ - globulin with isohemagglutinin activity to human red blood cells, Biophys. Biochem. Res. Comm., **11**: 411–421, 1963.
[19] JAY A. W. L., Viscoelastic properties of the human red blood cell membrane, Biophys. J., **13**: 1166–1182, 1973.
[20] JULIANO R. L., The proteins of the erythrocyte membrane, Biochim. Biophys. Acta, **300**: 341–378, 1973.
[21] LINß W., GEYER G., RICHTER H., HELMKE U., Quantitative Untersuchungen über die Verteilung saurer Bindungsorte an menschlichen Erythrozytenschatten, Acta Biol. Med. Germ., **28**: 7–12, 1972.
[22] MAKOVITZKY J., GEYER G., Untersuchungen über die anisotrope Toluidinblaufärbung der Glykokalyx, Histochemistry, **50**: 261–270, 1977.
[23] — unpublished findings.
[24] MARCHESI V. T., SEGREST J. P., KAHANE I., Molecular features of human erythrocyte glycophorin, [in] Membrane Research, ed. C. F. Fox, p. 41–51. Academic Press, New York, London 1972.
[25] MARCHESI V. T., TILLACK T. W., JACKSON R. L., SEGREST J. P., SCOTT R. E., Chemical characterization and surface orientation of the major glycoprotein of the human erythrocyte membrane, Proc. Nat. Acad. Sci., **69**: 1445–1449, 1972.
[26] MORAWIECKI A., Dissociation of M - and N - group mucoproteins into subunits in detergent solutions, Biochim. Biophys. Acta, **83**: 339–347, 1964.
[27] PASTUSHENKO V., DONATH E., On the electrophoretic mobility of cells coated with charged glycoprotein layer, Studia Biophys., **56**: 7–8, 1976.
[28] — Potential distribution near the cell coated with a charged glycoprotein layer, Studia Biophys., **56**: 9–10, 1976.
[29] PENDLE I., FELIX K., Eiweiß, [in] Hdb. d. physiolog. path. - chem. Analyse. ed. Hoppe - Seyler/Thierfelder, Bd., **3**: 153–267. Springer Verlag, Berlin 1960.
[30] PONDER E., Hemolysis and related phenomena, Grune & Stratton, New York 1948.
[31] — Compression of human red cells during centrifuging, Nature, **210**: 527, 1966.
[32] PROKOP O., UHLENBRUCK G., Lehrbuch der menschlichen Blut - und Serumgruppen, 2. Aufl., VEB Georg Thieme, Leipzig 1966.
[33] REYNOLDS J. A., Red cell membranes: fact and fancy, Fed. Proc., **32**: 2034–2038, 1973.
[34] ROMHÁNYI G., Über die submikroskopische strukturelle Grundlage der metachromatischen Reaktion, Acta Histochem., **15**: 201–233, 1963.
[35] ROMHÁNYI G., DEÁK G., On the ultrastructural organization of biological membranes as shown by topo - optical staining reactions, Acta Morph. Hung., **17**: 245–272, 1969.
[36] ROMHÁNYI G., MOLNÁR L., NÉMETH A., Ultrastructural differences in cell

http://rcin.org.pl

membranes of erythrocytes, myeloid and lymphoid cells as shown by topo-optical reactions, Histochemistry, **39**: 261–276, 1974.

[37] SEAMAN G. V. F., UHLENBRUCK G., The action of proteolytic enzymes on the red cells of some animal species, Biochim. Biophys. Acta, **64**: 570–572, 1962.

[38] SEGREST J. P., KOHN L. D., Protein - lipid interactions of the membrane - penetrating MN-glycoprotein from the human erythrocyte, [in] Protides of the biological fluids, ed. H. Peeters, p. 183–189, Pergamon Press, Oxford 1974.

[39] SHEETZ M. P., PAINTER R. G., SINGER S. J., Biological membranes as bilayer couples. III. Compensatory shape changes induced in membranes, J. Cell Biol., **70**: 193–203, 1976.

[40] SHEETZ M. P., SINGER S. J., Biological membranes as bilayer couples. A molecular mechanism of drug - erythrocyte interactions. Proc. Nat. Acad. Sci., **71**: 4457–4461, 1974.

[41] — Equilibrium and kinetic effects of drugs on the shapes of human erythrocytes, J. Cell Biol., **70**: 247–251, 1976.

[42] SOMMER D., GEYER G., LINß W., FEUERSTEIN H., STIBENZ D., Negative surplus charge of coated erythrocytes. Folia Haematol. (in press).

[43] TOMITA M., MARCHESI V. T., Amino acid sequence and oligosaccharide attachment sites of human erythrocyte glycophorin. Proc. Nat. Acad. Sci., **72**: 2964–2968, 1975.

[44] UHLENBRUCK G., WINTZER G., WERSDÖRFER R., Studien über den Aufbau der Zellmembran, insbesondere derjenigen des roten Blutkörperchens, Z. klin. Chem. klin. Biochem., **6**: 281–324, 1967.

[45] WINZLER R. J., Carbohydrates in cell surfaces. Internat. Rev. Cytol., **29**: 77–125, 1970.

[46] — Glycoproteins of plasma membranes. Chemistry and function, [in] Glycoproteins, 2nd edition, ed. A. Gottschalk, p. 1258–1293, Elsevier, Amsterdam, New York 1972.

[47] WOLF H., PETZOLDT R., DONATH E., Electrostatic phenomena on the cell surface of human erythrocytes, Studia Biophys., **56**: 5–6, 1976.

Received: June 16, 1978.
Accepted: June 30, 1978.

Author's address: Teichgraben 7, 69 Jena, DDR.

http://rcin.org.pl

POSTĘPY BIOLOGII KOMÓRKI TOM 5, NR 4, 1978 (355–362)

AKTYWNOŚĆ ARYLOWYCH HYDROKSYLAZ W LIMFOCYTACH LUDZKICH A PROCESY KARCINOGENEZY CHEMICZNEJ

RELATIONSHIP BETWEEN ARYL HYDROCARBON HYDROXYLASE ACTIVITY IN HUMAN LYMPHOCYTES AND CHEMICAL CARCINOGENESIS

Józef SAWICKI

Zakład Badania Środowiska Instytutu Biofarmacji AM, Warszawa

Streszczenie. Omówiono udział arylowej hydroksylazy limfocytów ludzkich w procesach aktywacji enzymatycznej wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych. Przedstawiono poglądy dotyczące oceny zależności między poziomem aktywności tego enzymu u poszczególnych osób a ryzykiem wewnątrzustrojowym zapadalności na choroby nowotworowe.

Summary. The role of aryl hydrocarbon hydroxylase of human lymphocytes in enzymatic activation of polycyclic aromatic hydrocarbons was discussed. The relationship between the enzyme activity in individuals and endogenous risk was presented.

Skróty użyte w pracy

AHH — arylowa hydroksylaza węglowodorów
BP — benzo(a)piren
MC — 3 - metylocholantren
DMBA — 7,12 - dwumetylobenzantracen
DBA — dwubenzantracen

Większość znanych związków rakotwórczych wymaga dla swego działania aktywacji enzymatycznej. Metabolity tych związków, wykazujące działanie karcinogenne, mogą powstawać w zmiennych ilościach w zależności od aktywności różnych enzymów zawartych w komórce. Dlatego też ważnym zagadnieniem pozostaje określenie roli, jaką mogą spełniać poszczególne enzymy w aktywacji lub detoksykacji związków rakotwórczych. Wśród enzymów uczestniczących w przemianach tych związków ważną grupę stanowią monooksygenazy zlokalizowane w sia-

http://rcin.org.pl

teczce wewnątrzplazmatycznej. Biorą one udział w metabolizmie różnorodnych ksenobiotyków [9], takich jak niektóre leki, pestycydy, wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne [10], jak również związków endogennych, np. sterydów [8]. Chociaż na ogół procesy katalizowane przez monooksygenazy prowadzą do detoksykacji związków [7, 10, 43], to jednak enzymy te mogą również metabolizować węglowodory aromatyczne do związków działających cytotoksycznie [12] i karcinogennie [21].

Wyniki wielu prac wskazują, że karcinogenność węglowodorów aromatycznych może być uzależniona od aktywności monooksygenaz [7, 10, 11, 43].

Do monooksygenaz należy m. in. arylowa hydroksylaza węglowodorów (AHH), której obecność stwierdzono w różnych tkankach wielu gatunków zwierząt laboratoryjnych [30, 32, 42] oraz w różnych tkankach ludzkich: wątrobie [24], łożysku [31, 44], tkankach płodowych [16], limfocytach [5, 45], monocytach [2, 25], skórze [26] i makrofagach płuc [6, 28]. Rola jaką odgrywa AHH w aktywacji karcinogenów z grupy wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych pozostaje nie w pełni wyjaśniona. Wiadomo, że związki te są wstępnie utleniane przez AHH do epoksydów, które mogą łączyć się z makrocząsteczkami komórkowymi, m. in. z DNA [39]. Zgodnie z hipotezami niektórych autorów [4], tworzenie kompleksów z DNA ma prawdopodobnie istotne znaczenie w mechanizmie indukcji nowotworów przez węglowodory aromatyczne. Stwierdzono także [40, 46], że AHH bierze udział w przemianie 7,8 - dwuhydrodiolu benzo(a)pirenu do epoksydiolu benzo(a)pirenu (7,8 - dwuhydro - 7,8 - dwuhydroksybenzo(a)piren - 9,10 - epoksyd), który to metabolit tworzy połączenia z DNA [36], jak również wykazuje silne działanie mutagenne [15, 27, 35] i obecnie uważany jest za związek, który może być odpowiedzialny za działanie karcinogenne BP.

Zależność między poziomem aktywności AHH i powstawaniem nowotworów wywołanych związkami chemicznymi była przedmiotem licznych badań i rozważań teoretycznych. Kouri i wsp. [22] wykazali istnienie korelacji między powstawaniem nowotworów wywołanych MC a poziomem indukcji AHH u myszy. Natomiast nie stwierdzono zależności między powstawaniem mięsaków pod wpływem DMBA [33] lub BP [3] a poziomem indukcji AHH u tych samych wsobnych szczepów myszy.

AHH są indukowane przez różne węglowodory wielopierścieniowe i istnieją dowody, że stopień indukcji może być uwarunkowany genetycznie zarówno u zwierząt laboratoryjnych [13, 34, 41], jak i u człowieka [18]. Przypuszcza się, że różnice w aktywności AHH, istniejące między poszczególnymi osobnikami [18], mogłyby być wskaźnikiem różnic ryzyka wewnątrzustrojowego zapadalności na nowotwory w przypad-

http://rcin.org.pl

ku narażenia na węglowodory aromatyczne. Wskaźnikiem możliwym do oznaczania może być aktywność AHH limfocytów krwi obwodowej, ze względu na dostępność tego materiału do badań.

AHH LIMFOCYTÓW LUDZKICH

Aktywność AHH w limfocytach ludzkich została wykazana stosunkowo niedawno przez Whitlocka i wsp. [45], przy czym okazało się, że jest ona niska w porównaniu z aktywnością w mikrosomach komórek wątroby szczura lub komórek fibroblastów chomicznych. Badania różnych autorów dowiodły, że limfocyty krwi obwodowej hodowane in vitro wykazują aktywność AHH, jeżeli zostaną poddane działaniu czynnika mitogennego [5, 45]. MC dodany do hodowli limfocytów zawierającej fitohemaglutyninę powoduje około 4-krotny wzrost aktywności AHH (w porównaniu do hodowli bez induktora) przy maksimum występującym po 12 godz. od momentu jego dodania, natomiast nie indukuje AHH przy braku w hodowli czynnika mitogennego [5]. Spośród badanych induktorów [14] DBA okazał się znacznie silniejszym niż MC i indukował enzym w komórkach, które nie wykazywały wzrostu aktywności AHH pod wpływem MC.

Szczegółowe badania akywności AHH w limfocytach ludzkich hodowanych in vitro prowadzili Gurtoo i wsp. [14]. Autorzy ci wykazali, że aktywność enzymu w hodowli stymulowanej mitogenem wzrastała wolno i osiągała maksimum między 48 a 72 godz. inkubacji, a następnie obniżała się wyraźnie wraz z upływem czasu. Od 72 godz. obniżała się również żywotność komórek, osiągając po 120 godz. poziom około 50%. Okazało się również, że przy pomiarze aktywności AHH optimum pH wynosi 8,5 w odróżnieniu od optimum 7,5, określonego przez Neberta i Gelboina [29] dla enzymu pochodzącego z innych tkanek zwierząt.

Przy ocenie zależności między aktywnością AHH w limfocytach a ryzykiem zapadalności na choroby nowotworowe często rozpatruje się współczynnik indukcji tego enzymu, tzn. stosunek aktywności indukowanej węglowodorem wielopierścieniowym (najczęściej MC lub DBA) do aktywności kontrolnej. Kellermann i wsp. [18] badali poziom indukcji AHH w limfocytach ludzkich i sugerowali, że populację ludzką można podzielić na 3 grupy ze względu na wartość współczynnika indukcji: niski — do 2,7 (53% populacji), średni — od 2,7 do 3,6 (37% populacji) i wysoki — powyżej 3,6 (10% populacji). Autorzy ci uważają, że międzyosobnicze różnice w poziomie indukcji są wynikiem występowania 2 alleli (dla niskiej i wysokiej indukcyjności) zlokalizowanych w pojedynczym locus. Następnie ci sami autorzy sugerowali, że u osób o wysokim i średnim współczynniku indukcji występuje odpowiednio

http://rcin.org.pl

36- i 16-krotnie większe ryzyko zachorowania na raka płuc w porównaniu z osobami o niskim współczynniku [19]. Wyniki tych badań pozwalają przypuszczać, że może istnieć związek między współczynnikiem indukcji AHH w limfocytach a ryzykiem zapadalności na choroby nowotworowe.

Okazuje się jednak, że o wyznaczonej wartości współczynnika indukcji AHH może decydować bardzo wiele czynników. Kellermann i wsp. [17, 19] stwierdzili w swoich badaniach wysoką powtarzalność wyników oznaczania AHH w limfocytach uzyskiwanych w różnych odstępach czasu u tej samej osoby, i istnienie w populacji 3 grup o zróżnicowanym współczynniku indukcji [18].

Nowsze prace wielu autorów [1, 20, 23, 37] dostarczyły sprzecznych danych dotyczących zarówno odtwarzalności oznaczania AHH, jak i możliwości wydzielenia grup osób o różnych współczynnikach indukcji tego enzymu. Kouri i wsp. [23] oraz Atlas i wsp. [1] stwierdzają, że u tych samych osób występują okresowe zmiany zarówno w kontrolnym, jak i wyindukowanym poziomie aktywności AHH w limfocytach. Natomiast Paigen i wsp. [37] zaobserwowali występowanie w ciągu roku sezonowej zmienności w aktywności AHH, podstawowej i wyindukowanej, u poszczególnych osób (od stycznia do maja poziom aktywności wyindukowanej jest najniższy i stanowi około 20% wartości uzyskiwanych w pozostałych miesiącach). Wartość współczynnika indukcji u 53 przebadanych osób wahała się w granicach 0,9–5,0, ale rozkład wartości nie pozwalał na wydzielenie jakichkolwiek grup. Taki zakres współczynnika jest zbliżony do wyników Kellermanna i wsp. [18], ale sprzeczny z wynikami Kouri i wsp. [23], którzy stwierdzili, że maksymalna wartość współczynnika wynosi 2,9.

Zmienna aktywność AHH w limfocytach tych samych osób może być według niektórych autorów [28] związana ze zmiennością indukującego działania mitogenu, jak również zmiennością reakcji na czynniki zawarte w podłożu hodowli. Stwierdzono, że aktywność enzymu zmienia się w zależności od rodzaju, jak również różnych partii tej samej surowicy dodawanej do hodowli [1, 37], co sugeruje istnienie w surowicy czynnika indukującego.

Według niektórych autorów [28], u osób palących papierosy poziom podstawowy AHH w limfocytach jest wyższy niż u niepalących, co powoduje, że współczynnik indukcji jest u tych osób niższy, przy znacznie wyższym ryzyku zapadalności na raka płuc.

W ostatnio opublikowanej pracy, Hart i wsp. [38] przedstawili dowody, że współczynnik indukcji AHH limfocytów ludzkich hodowanych in vitro jest zmienny w zależności od czasu trwania hodowli i że istnieje korelacja między poziomem indukcji enzymu a procentem transfor-

http://rcin.org.pl

macji blastycznej, przy czym okazało się, że wyraźne maksimum indukcji występuje u poszczególnych osób po różnym czasie od momentu dodania induktora.

Biorąc pod uwagę dużą rozbieżność wyników otrzymanych w omówionych pracach, można stwierdzić, że na obecnym etapie badań nie jest możliwa ostateczna odpowiedź na pytanie, czy zwiększony poziom indukcji AHH w limfocytach ludzkich może być wskaźnikiem wzrostu ryzyka wewnątrzustrojowego zapadalności na choroby nowotworowe.

Wydaje się, że konieczna jest dalsza standaryzacja samej metody oznaczania aktywności AHH w limfocytach dla uzyskiwania obiektywnych wartości aktywności enzymu. Jak wynika z omawianych już badań Harta i wsp. [38], bardzo ważny jest czas oznaczania od momentu dodania induktora do hodowli. Dlatego też, w celu określenia maksimum indukcji enzymu dla każdej osoby, należałoby dokonywać pomiarów w różnych odstępach czasu. Z uwagi na indukujące AHH działanie stosowanej w hodowli surowicy płodowej cielęcej, celowe wydaje się sprawdzenie surowicy autogenicznej, która być może pozwoli na wyeliminowanie jednego z czynników powodujących brak powtarzalności wyników uzyskiwanych w różnym czasie z materiału pochodzącego od tej samej osoby.

Przy ocenie zależności między poziomem indukcji AHH a ryzykiem wewnątrzustrojowym zapadalności na choroby nowotworowe, niektórzy autorzy stwierdzają istnienie korelacji na podstawie zwiększonych wartości współczynników indukcji u osób z nowotworami. Nie jest jednak wykluczone, że ten zwiększony współczynnik jest wynikiem zaistniałych zmian nowotworowych. Dlatego też wydaje się, że konieczne byłoby przeprowadzenie badań na dużej liczbie osób, u których wstępnie wyznaczono by wartości współczynnika indukcji AHH w limfocytach i osoby te byłyby poddane wieloletnim obserwacjom pod kątem zapadalności na choroby nowotworowe. Do badań można by wytypować rodziny, w których istnieje wysoka zapadalność na nowotwory, rodziny o niskiej zapadalności oraz potomstwo osobników pochodzących z rodzin mieszanych. Można przypuszczać, że wyniki uzyskane z tych badań mogłyby ułatwić odpowiedź na pytanie, czy genetycznie uwarunkowany zwiększony poziom indukcji AHH jest czynnikiem powodującym wzrost ryzyka zapadalności na choroby nowotworowe.

LITERATURA

[1] ATLAS S. A., VESELL E. S., NEBERT D. W., Genetic control of inter-individual variations in the inducibility of aryl hydrocarbon hydroxylase in cultured human lymphocytes, Cancer Res., **36**: 4619–4630, 1976.

http://rcin.org.pl

[2] BAST R. C. Jr., WHITLOCK J. P. Jr., MILLER H., RAPP H. J., GELBOIN H. V., Aryl hydrocarbon benzo(a)pyrene hydroxylase in human peripheral blood monocytes, Nature (London), **250**: 664–665, 1974.
[3] BENEDICT W. F., CONSIDINE N., NEBERT D. W., Genetic differences in aryl hydrocarbon hydroxylase induction and benzo(a)pyrene - produced tumorigenesis in the mouse, Mol. Pharmacol., **9**: 266–277, 1973.
[4] BROOKES P., LAWLEY P. D., Evidence for the binding of polynuclear aromatic hydrocarbons to the nucleic acids of mouse skin : relation between carcinogenic power of hydrocarbon and their binding to deoxyribonucleic acid, Nature, **202**: 781–784, 1964.
[5] BUSBEE D. L., SHAW C. R., CANTRELL E. T., Aryl hydrocarbon hydroxylase induction in human leucocytes, Science, **178**: 315–316, 1972.
[6] CANTRELL E. T., WARR G. A., BUSBEE D. L., MARTIN R. R., Induction of aryl hydrocarbon hydroxylase in human pulmonary alveolar macrophages by cigarette smoking, J. Clin. Invest., **52**: 1881–1884, 1973.
[7] CONNEY A. H., MILLER E. C., MILLER J. A., Substrate - induced synthesis and other properties of benzpyrene hydroxylase in rat liver, J. Biol. Chem., **228**: 753–766, 1957.
[8] CONNEY A. H., Pharmacological implications of microsomal enzyme induction, Pharmacol. Rev., **19**: 317–366, 1967.
[9] CONNEY A. H., BURNS J. J., Metabolic interactions among environmental chemicals and drugs, Science, **178**: 576–586, 1972.
[10] GELBOIN H. V., Carcinogens, enzyme induction and gene action, Adv. Cancer Res., **10**: 1–81, 1967.
[11] GELBOIN H. V., KINOSHITA N., WIEBEL F. J., Microsomal hydroxylases : Induction and role in polycyclic hydrocarbon carcinogenesis and toxicity, Fed. Proc., **31**: 1298–1309, 1972.
[12] GELBOIN H. V., Studies on the mechanism of microsomal hydroxylase induction and its role in carcinogen action, Rev. Can. Biol., **31**: 39–60, 1972.
[13] GIELEN J. E., GOUJON F. M., NEBERT D. W., Genetic regulation of aryl hydrocarbon hydroxylase induction, J. Biol. Chem., **247**: 1125–1137, 1972.
[14] GURTOO H. L., BEJBA N., MINOWADA J., Properties, inducibility, and an improved method of analysis of aryl hydrocarbon hydroxylase in cultured human lymphocytes, Cancer Res., **35**: 1235–1243, 1975.
[15] HUBERMAN E., SACHS L., YANG S. K., GELBOIN H. V., Identification of mutagenic metabolites of benzo(a)pyrene in mammalian cells, Proc. Nat. Acad. Sci., US, **73**: 607–614, 1976.
[16] JUCHAU M. R., PEDERSEN M. G., SYMMS K. G., Hydroxylation of 3,4 - benzpyrene in human fetal tissue homogenates, Biochem. Pharmacol., **21**: 2269–2272, 1972.
[17] KELLERMANN G., CANTRELL E., SHAW C. R., Variation in extent of aryl hydrocarbon hydroxylase induction in cultured human lymphocytes, Cancer Res., **33**: 1654–1656, 1973.
[18] KELLERMANN G., LUYTEN - KELLERMANN M., SHAW C. R., Genetic variation of aryl hydrocarbon hydroxylase in human lymphocytes, Am. J. Human Genet., **25**: 327–331, 1973.
[19] — Aryl hydrocarbon hydroxylase inducibility and bronchogenic carcinoma, New Engl. J. Med., **289**: 934–937, 1973.
[20] KELLERMANN G., LUYTEN - KELLERMANN M., HORNING M. G., STAFFORD M., Correlation of aryl hydrocarbon hydroxylase activity human

http://rcin.org.pl

lymphocyte cultures and plasma elimination rates for antipyrine and phenylbutazone, Drug Metab. Dispos., **3**: 47–50, 1975.

[21] KINOSHITA N., GELBOIN H. V., Aryl hydrocarbon hydroxylase in 7,12 - dimethylbenz(a)anthracene skin tumorigenesis : on the mechanism of 7,8 - benzoflavone inhibition of tumorigenesis, Proc., Nat. Acad. Sci. US, **69**: 824–828, 1972.

[22] KOURI R. E., RATRIE H., WHITMIRE C. E., Evidence of a genetic relationship between susceptibility to 3 - methylcholanthrene - induced subcutaneous tumors and inducibility of aryl hydrocarbon hydroxylase, J. Natl. Cancer Inst., **51**: 197–200, 1973.

[23] KOURI R. E., RATRIE III H., ATLAS S. A., NIWA A., NEBERT D. W., Aryl hydrocarbon hydroxylase induction in human lymphocyte cultures by 2,3,7,8 - tetrachlorodibenzo - p - dioxid, Life Sci., **15**: 1585–1595, 1974.

[24] KUNTZMAN F., MARK L. C., BRAND L., JACOBSON M., LEVIN W., CONNEY A. H., Metabolism of drugs and carcinogens by human liver enzymes, J. Pharmacol. Exp. Ther., **152**: 151–156, 1966.

[25] LAKE R. S., PEZZUTTI M. R., KROPKO M. L., FREEMAN A. E., IGEL H. J., Measurment of benzo(a)pyrene metabolism in human monocytes, Cancer Res., **37**: 2530–2537, 1977.

[26] LEVIN W., CONNEY A. H., ALVARES A. P., MERKATZ I., KAPPAS A., Induction of benzo(a)pyrene hydroxylase in human skin, Science, **176**: 419–420, 1972.

[27] MALAVEILLE C., BARTSCH H., GROVER P. L., SIMS P., Mutagenicity of non - K - region diols and diol - epoxides of benz(a)anthracene and benzo(a)pyrene in *S. typhimurium* TA 100, Biochem. Biophys. Res. Commun., **66**: 693–700, 1975.

[28] McLEMORE T. L., MARTIN R. R., BUSBEE D. L., RICHIE R. C., SPRINGER R. R., TOPPELL K. L., CANTRELL E. T., Aryl hydrocarbon hydroxylase activity in pulmonary macrophages and lymphocytes from lung cancer and noncancer patients, Cancer Res. **37**: 1175–1181, 1977.

[29] NEBERT D. W., GELBOIN H. V., Substrate — inducible microsomal aryl hydroxylase in mammalian cell culture. I. Assay and properties of induced enzyme, J. Biol. Chem., **243**: 6242–6249, 1968.

[30] — The in vivo and in vitro induction of aryl hydrocarbon hydroxylase in mammalian cells of different species, tissues, strains, and developmental and hormonal states, Arch. Biochem. Biophys., **134**: 76–89, 1969.

[31] NEBERT D. W., WINKLER J., GELBOIN H. V., Aryl hydrocarbon hydroxylase activity in human placenta from cigarette smoking and non - smoking women, Cancer Res., **29**: 1763–1769, 1969.

[32] NEBERT D. W., BAUSSERMAN L. L., BATES R. R., Effect of 17 - estradiol and testosterone on aryl hydrocarbon hydroxylase activity in mouse tissues in vivo and in cell culture, Intern. J. Cancer, **6**: 470–480, 1970.

[33] NEBERT D. W., BENEDICT W. F., GIELEN J. E., Aryl hydrocarbon hydroxylase, epoxide hydrase, and 7,12 - dimethylbenz(a)anthracene — produced skin tumorigenesis in the mouse, Mol. Pharmacol., **8**: 374–379, 1972.

[34] NEBERT D. W., GOUJON F. M., GIELEN J. E., Aryl hydrocarbon hydroxylase induction by polycyclic hydrocarbons: simple autosomal dominant trait in the mouse, Nature New Biol., **236**: 107–110, 1972.

[35] NEWBOLD R. F., BROOKES P., Exceptional mutagenicity of a benzo(a)pyrene diol epoxide in cultured mammalian cells, Nature, **260**: 52–54, 1976.

http://rcin.org.pl

[36] OSBORNE M. R., BELAND F. A., HARVEY R. G., BROOKES P., The reaction of (±) - 7 α, 8 β - dihydroxy - 9 β, 10 β - epoxy - 7, 8, 9, 10 - tetrahydrobenzo(a)pyrene with DNA, Int. J. Cancer, **18**: 362–368, 1976.

[37] PAIGEN B., MINOWADA J., GURTOO H. L., PAIGEN K., BEJBA PARKER N., WARD E., THOMPSON HAYNER N., BROSS I. D. J., BOCK F., VINCENT R., Distribution of aryl hydrocarbon hydroxylase inducibility in cultured human lymphocytes, Cancer Res., **37**: 1829–1837, 1977.

[38] PRUE HART, COOKSLEY W. G. E., FARRELL G. C., POWELL L. W., 3 - methylcholanthrene inducibility of aryl hydrocarbon hydroxylase in cultured human lymphocytes depends upon the extent of blast transformation, Biochem. Pharmacol., **26**: 1831–1834, 1977.

[39] SIMS P., GROVER P. L., Epoxides in polycyclic aromatic hydrocarbon metabolism and carcinogenesis, Adv. Cancer Res., **20**: 165–274, 1974.

[40] SIMS P., GROVER P. L., SWAISLAND A., PAL K., HEWER A., Metabolic activation of benzo(a)pyrene proceeds by a diol epoxide, Nature, **252**: 326–328, 1974.

[41] THOMAS P. E., HUTTON J. J., Genetics of aryl hydrocarbon hydroxylase induction in mice: Additive inheritance in crosses between C3H/HeJ and DBA/2J, Biochem. Genet., **8**: 249–257, 1973.

[42] WATTENBERG L. W., LEONG J. L., Histochemical demonstration of reduced pyridine nucleotide dependent polycyclic hydrocarbon metabolizing enzymes, J. Histochem. Cytochem., **10**: 412–420, 1962.

[43] — Chemoprophylaxis of carcinogenesis: A review, Cancer Res., **26**: 1520–1526, 1966.

[44] WELCH R. M., HARRISON Y. E., CONNEY A. H., POPPERS P. J., FINSTER M., Cigarette smoking: Stimulatory effect on metabolism of 3,4 - benzpyrene by enzymes in human placenta, Science, **160**: 541–542, 1968.

[45] WHITLOCK J. P. Jr., COOPER H. L., GELBOIN H. V., Aryl hydrocarbon (benzopyrene) hydroxylase is stimulated in human lymphocytes by mitogens and benzo(a)anthracene, Science, **177**: 618–619, 1972.

[46] WOOD A. W., LEVIN W., LU A. Y. H., YAGI H., HERNANDEZ O., JERINA D. M., CONNEY A. H., Metabolism of benzo(a)pyrene and benzo(a)pyrene derivatives to mutagenic products by highly purified hepatic microsomal enzymes, J. Biol. Chem., **251**: 4882–4890, 1976.

Otrzymano: 17 marca 1978.
Przyjęto: 30 marca 1978.

Adres autora: ul. Banacha 1, 02 - 097 Warszawa.

http://rcin.org.pl

KOMUNIKAT

Informujemy, że Konferencja Naukowo-Szkoleniowa Polskiego Towarzystwa Immunologicznego nt. *Immunologia w medycynie*, połączona z III Zjazdem Towarzystwa, odbędzie się w Poznaniu w dniach od 25 do 27 września 1980 r.

Przewiduje się dwa wykłady wprowadzające zaproszonych referentów oraz sympozja o następującej tematyce:

1. Mechanizmy efektorowe komórkowej odpowiedzi immunologicznej
2. Mechanizmy efektorowe humoralnej odpowiedzi immunologicznej
3. Immunologia nowotworów
4. Immunologia chorób tkanki łącznej
5. Immunologiczne podstawy nadwrażliwości typu natychmiastowego
6. Immunologia infekcyjna

W ramach każdego sympozjum zostaną wygłoszone cztery 20-minutowe wykłady.

Planuje się również sesje plakatowo-robocze (poster-workshops), których tematy nie są jeszcze ustalone. Dotychczas wpłynęły następujące propozycje:

1. Grasica i układ hemopoetyczny w rozwoju odpowiedzi immunologicznej
2. Subpopulacje limfocytów
3. Antygeny zgodności tkankowej
4. Antygeny nowotworowe
5. Immunologia chorób nerek
6. Immunologia chorób rozrostowych układu krwiotwórczego
7. Immunologia wirusowego zapalenia wątroby
8. Mechanizmy immunosupresji farmakologicznej

Prosimy o zgłaszanie uwag i propozycji, szczególnie dotyczących sesji plakatowo-roboczych.

Komitet Organizacyjny
Zakład Immunologii i Reumatologii
Instytutu Chorób Wewnętrznych AM
60-967 Poznań, ul. Szkolna 8/12
tel. 542-61 lub 511-11 w. 256

http://rcin.org.pl

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. Obowiązuje terminologia zgodna z polskim mianownictwem histologicznym, anatomicznym i embriologicznym.

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 maszynopisu. Maszynopis powinien być pisany jednostronnie, z podwójną interlinią, marginesem około 4 cm po lewej stronie oraz ponumerowany. W tekście nie należy robić żadnych podkreśleń na maszynie ani atramentem.

Na pierwszej stronie należy podać, przed tekstem, tytuł pracy w języku polskim i angielskim, pod nim imiona (w pełnym brzmieniu) i nazwiska autorów oraz nazwę zakładu naukowego, w którym autorzy pracują, następnie krótkie streszczenie (ok. 1/2 strony) — również w języku polskim i angielskim. 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, ryc. 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] Sachsenmajer 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 ryciny powinny być dołączone na oddzielnej kartce. Przy załącznikach powinno być podane ich pochodzenie.

Redakcja zastrzega sobie prawo dokonywania skrótów.

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 według ustalonych stawek, autorzy otrzymują 25 nadbitek bezpłatnie.

http://rcin.org.pl

Warunki prenumeraty kwartalnika

POSTĘPY BIOLOGII KOMÓRKI

Cena prenumeraty krajowej:

rocznie zł 80.— półrocznie zł 40.—

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

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

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

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

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

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

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

A subscription order stating the period of time, along with the subscriber's name and address can be sent to your subscription agent or directly to Foreign Trade Enterprise Ars Polona-Ruch, 00 - 068 Warszawa, 7 Krakowskie Przedmieście, P. O. Box 10001, POLAND.

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

http://rcin.org.pl

Cena zł 20,—

SPIS TREŚCI

M. SUDOŁ, Peptydy jako regulatory komórkowego wzrostu 325
G. GEYER, Environmental alterations of the erythrocyte glycocalyx 341
J. SAWICKI, Aktywność arylowych hydroksylaz w limfocytach ludzkich a procesy karcinogenezy chemicznej 355

Indeks 36970

http://rcin.org.pl