PL ISSN 0324-833

POLSKIE
TOWARZYSTWO
ANATOMICZNE

Postępy Biologii Komórki

TOM 6 · NR 2
1979 (57-140)

PWN—WARSZAWA

http://rcin.org.pl

POSTĘPY BIOLOGII KOMÓRKI TOM 6, NR 2, 1979

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 560 + 110 egz. Ark. wyd. 7. Ark. druk. 5,25 + 3/8 wkl. Papier druk. sat. III kl., 80 g. 70 × 100 cm. Oddano do składania 6 II 1979 r. Podpisano do druku w maju 1979 r. Druk ukończono w maju 1979 r. Zam. 685/79 — Cena zł 20.—

Wrocławska Drukarnia Naukowa, Wrocław, ul. Lelewela 4

http://rcin.org.pl

POSTĘPY BIOLOGII KOMÓRKI TOM 6, NR 2, 1979 (57-77)

POLIAMINY A WZROST NOWOTWORÓW

POLYAMINES AND THE GROWTH OF CANCER

Ryszard FARBISZEWSKI i Danuta KILCZEWSKA

Zakład Chemii Nieorganicznej, Instytut Chemii i Biofizyki AM w Białymstoku

Streszczenie. Poliaminy: putrescyna, spermidyna i spermina, obok wielu innych czynników, są w dużym stopniu odpowiedzialne za wzrost komórek prawidłowych. Nowotworom u ludzi i doświadczalnym nowotworom u zwierząt, wywołanym przez onkogenne wirusy i chemiczne czynniki karcinogenne, towarzyszy wzrost stężenia poliamin w komórkach i płynach biologicznych (surowica krwi, płyn mózgowo-rdzeniowy, mocz). Zwiększenie zawartości tych związków spowodowane jest wzrostem aktywności enzymów biorących udział w ich syntezie. Niektóre związki chemiczne, hamujące wzrost komórek nowotworowych, zmniejszają aktywność enzymów uczestniczących w biosyntezie poliamin. Wskazywałoby to na ważną biologiczną rolę poliamin w procesie wzrostu komórek nowotworowych.

Summary. Polyamines: putrescine, spermidine and spermine, apart from other factors in high degree are involved in normal cell growth. Based on the experimental evidence available at the present time it seems that the natural polyamines play an essential role in cellular metabolism and in cell proliferation in particular. Significant increase in the concentration of polyamines in cells and in biological fluids (blood serum, cerebrospinal fluid and urine) is connected with the human cancers and experimental animal cancers, induced by tumor-promoting agents, essential for carcinogenesis. Enhanced activity of four enzymes is primarily responsible for the biosynthesis of polyamines. Some chemotherapeutic agents, inhibitors of cancer cell growth, decrease the activity of enzymes engaged in synthesis of polyamines. It is concluded that these factors may be important in regulation of the process of tumor cell growth.

Wykaz stosowanych skrótów

BHK — komórki nerki chomika noworodka
cAMP — cykliczny 3'5' - adenozynomonofosforan,
db cAMP — pochodna dwubutyrylowa cyklicznego 3'5' - adenozynomonofosforanu
cGMP — cykliczny 3',5' - guanozynomonofosforan

http://rcin.org.pl

Poliaminy są drobnocząsteczkowymi związkami organicznymi powszechnie występującymi we wszystkich komórkach zwierzęcych, roślinnych, a także w bakteriach i bakteriofagach. Ich prekursorami są ornityna i metionina, z których na drodze dalszych przemian powstają putrescyna, spermidyna i spermina. Chociaż biochemiczna funkcja tych związków nie została dotychczas dokładnie sprecyzowana, badania in vitro i in vivo wskazują na ważną i różnorodną rolę biologiczną poliamin. Stwierdzono, że poliaminy biorą udział w biosyntezie białka [3, 19, 33, 52, 55, 65, 117, 126] oraz w procesie wzrostu komórek zwierzęcych i bakteryjnych [20, 53, 90, 103]. Metabolizm kwasów nukleinowych oraz cały szereg innych biochemicznych reakcji jest ściśle związany z poliaminami [13, 26–28, 54, 58, 62, 110, 118, 127].

Zawartość poliamin wewnątrz komórek u eukariotów ulega wahaniom i zależy od fazy cyklu komórkowego [29, 42, 78]. Hibasani i wsp. [44] stwierdzili, że komórki nerki chomika noworodka w fazie stacjonarnej zawierają mniejsze ilości poliamin niż komórki w fazie logarytmicznego wzrostu. Komórki zwierzęce wykazują dość znaczne różnice w zawartości poliamin, uzależnione głównie od wieku zwierząt [57, 74, 103, 112]. Zaobserwowano stopniowy spadek spermidyny, a wzrost sperminy w komórkach wątrobowych wraz z wiekiem u myszy. Wśród zwierząt tego samego wieku brak jest zależności między masą ciała a stężeniem poliamin [45].

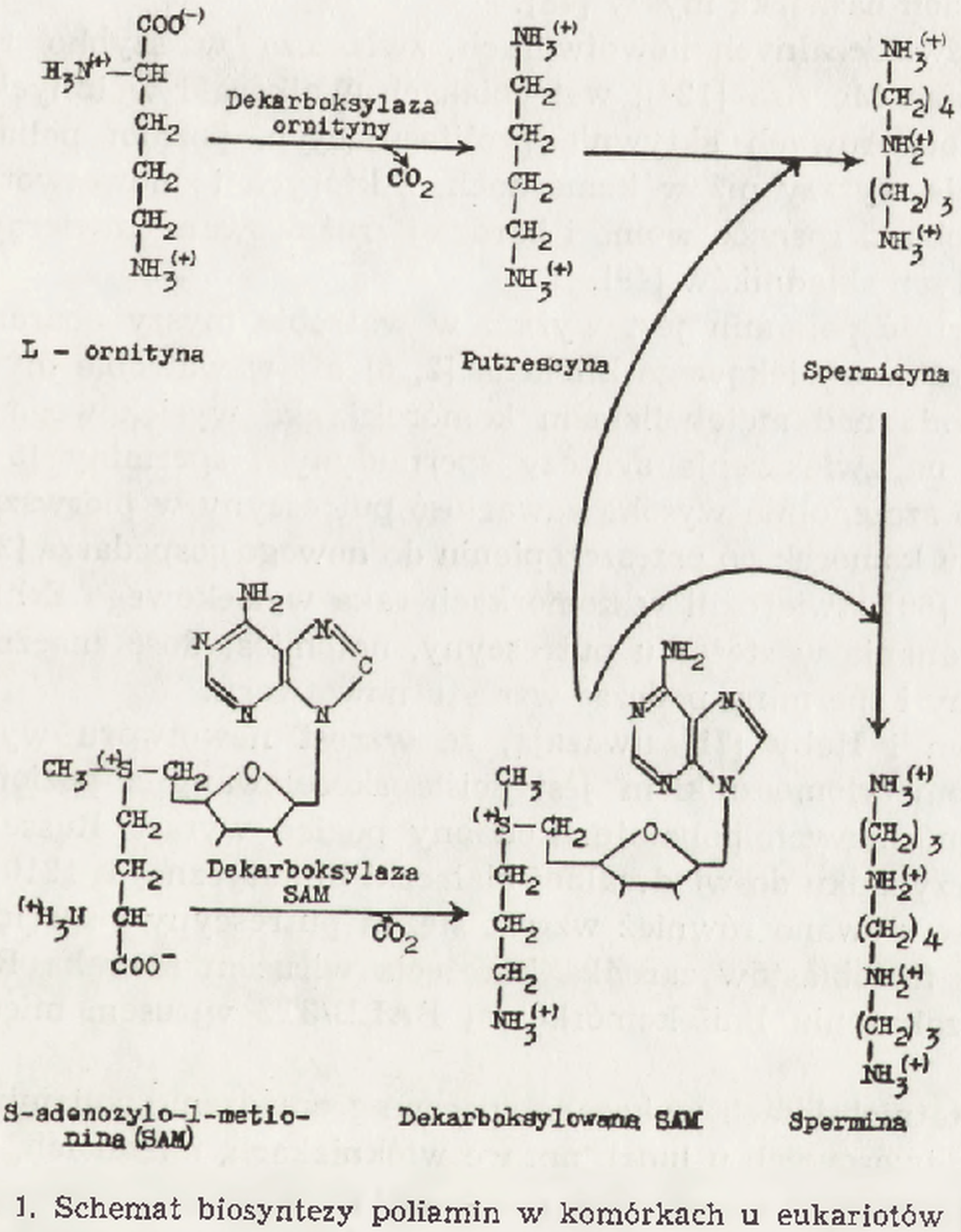
Stwierdzono, że po dodaniu czynników stymulujących podział komórek do hodowli różnych linii komórkowych (BHK, limfocytów) następuje gwałtowny wzrost stężenia poliamin [46, 115]. Komórki regenerującej wątroby zwierząt po częściowej hepatektomii [49, 101], gruczoły ślinowe myszy pod wpływem izoproterenolu, wykazującego działanie β - adrenergiczne [56], a także niektóre tkanki pod wpływem działania hormonów inicjujących wzrost [18, 98] zawierają więcej poliamin niż odpowiednie tkanki nie pobudzone.

Ostatnio Roszel i wsp. [94] zaobserwowali, że poliaminy: putrescyna, spermidyna i spermina, dodane łącznie do hodowli komórek nabłonka pęcherza moczowego utrzymują je w stanie maksymalnego wzrostu oraz przedłużają znacznie okres ich przeżycia.

Biosynteza poliamin przebiega w kilku etapach. Enzymem zapoczątkowującym pierwszy etap jest dekarboksylaza L - ornityny (EC 4.1.1.17), która katalizuje reakcję syntezy putrescyny z ornityny. Drugim enzymem warunkującym szybkość tworzenia poliamin jest aktywowana przez putrescynę dekarboksylaza S - adenozylo - L - metioniny (EC 4.1.1.50). W następnym etapie cząsteczka propyloaminy z dekarboksylowanej S - adenozylo - L - metioniny jest przenoszona na putrescynę przy udziale

http://rcin.org.pl

syntezy spermidyny, tworząc spermidynę, lub na spermidynę przy udziale syntetazy sperminy, tworząc sperminę. Te dwa końcowe etapy biosyntezy poliamin są najmniej poznane. Przemiana spermidyny w sperminę zachodzi w komórkach bardzo szybko. Możliwa jest również przemiana w odwrotnym kierunku, sperminy w spermidynę, która może ulec dalszej przemianie w putrescynę. Obie te reakcje zachodzą przy udziale oksydazy poliaminowej (EC 1.5.3.3.), a jako produkt uboczny



Ryc. 1. Schemat biosyntezy poliamin w komórkach u eukariotów [88]

uwalnia się aldehyd 3-aminopropionowy [51]. Biosynteza poliamin w tkankach jest regulowana również zawartością substratów wyjściowych: ornityny i metioniny.

Schemat biosyntezy poliamin w komórkach zwierzęcych przedstawiono na ryc. 1.

http://rcin.org.pl

I. ZAWARTOŚĆ POLIAMIN W KOMÓRKACH ZWIERZĘCYCH ORAZ PŁYNACH ZEWNĄTRZKOMÓRKOWYCH W CHOROBIE NOWOTWOROWEJ

W badaniach nad doświadczalną karcinogenezą u zwierząt zaobserwowano wzrost stężenia poliamin w komórkach.

Stwierdzono, że olej krotonowy i jego aktywny składnik octan mirystylowy forbolu, wywołujący hyperplazję i promocję nowotworu skóry u myszy [10], przyczynia się również do wzrostu stężenia poliamin w komórkach naskórka myszy [88].

W doświadczalnych nowotworach, zwłaszcza w szybko rosnących wątrobiakach Morrisa [124], wątrobiakach Walkera i w innych komórkach nowotworowych aktywnie proliferujących, poziom poliamin jest kilkakrotnie wyższy niż w komórkach, z których te nowotwory pochodzą. Wątrobiaki rosnące wolno i bardziej zróżnicowane zawierają mniejsze ilości tych składników [49].

Zawartość poliamin jest wyższa w wątrobie myszy obarczonej komórkami raka wysiękowego Ehrlicha [2, 5] niż w wątrobie myszy zdrowej. Badania nad metabolizmem komórek raka wysiękowego Ehrlicha wskazują na zwiększenie syntezy spermidyny i sperminy [5, 9, 113]. Wykazano szczególnie wysoką zawartość putrescyny w pierwszym okresie wzrostu komórek po przeszczepieniu do nowego gospodarza [2, 60]. Kalio i wsp. [60] stwierdzili w komórkach raka wysiękowego Erhlicha niewielkie wahania w stężeniu putrescyny, natomiast dość znaczny wzrost spermidyny i sperminy podczas wzrostu nowotworu.

Marton i Heby [71] uważają, że wzrost nowotworu wywołanego N - nitrozometylomocznikiem jest ściśle skorelowany z poziomem wewnątrzkomórkowych poliamin. Podobny pogląd wyraża Russell i Levy [102] w przypadku doświadczalnej białaczki limfatycznej L 1210 u myszy.

Zaobserwowano również wzrost stężeń putrescyny i spermidyny po zakażeniu fibroblastów zarodka kurczęcia wirusem mięsaka Rousa [22, 23] i po zakażeniu linii komórkowej BALB/3T3 wirusem mięsaka myszy [32].

W ostatnich latach wykazano znaczne gromadzenie poliamin w tkankach nowotworowych u ludzi, np. we włókniakach, mięsakach, wątrobiakach, nowotworach mózgu, płuc i w szpiku kostnym w białaczkach u dzieci [72, 73, 83, 92]. Stwierdzono również zwiększenie zawartości poliamin w nowotworach u roślin (cyt. za [8]).

Wydaje się interesujący fakt, że w większości przypadków wzrostowi guzów nowotworowych towarzyszą zmiany syntezy poliamin również w narządach, które są bezpośrednio związane z komórkami guza, np. w przypadku raka wysiękowego Ehrlicha dochodzi do wzrostu stężenia spermidyny w wątrobie [2] oraz do wzrostu aktywności dekarboksy-

http://rcin.org.pl

lazy ornitynowej w wątrobie i śledzionie [84, 85]. Obserwacje innych autorów wskazują na wzrost poziomu spermidyny i sperminy w wątrobie szczurów z mięsakiem Rd/3 [82]. Również w przypadkach transplantowanych guzów mózgu obserwuje się zwiększone stężenie putrescyny i spermidyny w śledzionie i nieznaczny ich wzrost w wątrobie [71].

Zawartość poliamin: putrescyny, spermidyny i sperminy, w płynach zewnątrzkomórkowych u zdrowych ludzi i zwierząt jest niewielka. Występuje ona jedynie w śladowych ilościach (tabela 1). Wartości te ulegają znacznym zmianom i to zarówno w surowicy krwi, płynie mózgowo - rdzeniowym i moczu w stanach nowotworowych u ludzi i w doświadczalnych nowotworach u zwierząt.

TABELA 1

Zawartość poliamin w płynach zewnątrzkomórkowych u ludzi zdrowych

Rodzaj płynu	Metoda analityczna	Jednostki	Putrescyna	Spermidyna	Spermina	Literatura
Surowica	ChJW	nmol/ml	0,13±0,015	0,49±0,085	0,057±0,040	[11]
	MRI		—	0,39±0,057	0,122±0,008	
	ChG		0,13±0,008	0,34±0,016	0,041±0,002	
Płyn mózgowo-rdzeniowy	ChJW	pmol/ml	76—292	54—246	0,0 — ślad	[73]

ChJW — chromatografia jonowymienna, ChG — chromatografia gazowa, MRI — metody radioimmunologiczne

Tokuoka, badając krew pobraną od ponad 1000 ludzi chorych na różne nowotwory, wykazał w 86% wzrost stężenia sperminy (cyt. za [8]). Bachrach i Robinson na mniejszej grupie osób chorych na nowotwory stwierdzili tylko w 65% podwyższone wartości tej poliaminy [4]. Wyniki badań Kalistratosa i wsp. [61] są zbieżne z danymi Tokuoki. Russell i wsp. [106] oraz Russel i Russell [108] stwierdzili, że w czasie stosowania chemioterapeutyków u ludzi i zwierząt z nowotworami dochodzi do stopnionego wzrostu stężenia putrescyny i spermidyny w surowicy krwi. W fazie remisji polekowej maleje stężenie poliamin w surowicy, a znacznie wzrasta ich wydalanie z moczem. Wznowie raka gruczołu piersiowego u szczurów lub wznowie wątrobiaka towarzyszy wzrost poziomu spermidyny w surowicy, a spadek stężenia poliamin w guzie [71, 105]. Autorzy sugerują, że pomiar poliamin w surowicy krwi i moczu może być dodatkowym wskaźnikiem w ocenie skuteczności terapii nowotworów. Wielu autorów uważa, że zmiany stężenia poliamin w surowicy i w moczu w sta-

http://rcin.org.pl

nach nowotworowych są zbieżne ze stanem klinicznym pacjentów [70, 99, 100].

Dane o zawartości poliamin w płynie mózgowo - rdzeniowym w przypadkach nowotworów centralnego układu nerwowego są nieliczne. Marton i wsp. [72] wykazali wzrost stężenia putrescyny i innych poliamin w płynie mózgowo - rdzeniowym u ludzi z glejakomięsakiem (glioblastoma) i rdzeniakiem (meduloblastoma). Rennert i wsp. [93] stwierdzili w przypadku białaczki obejmującej równocześnie centralny układ nerwowy podwyższoną zawartość poliamin. Ostatnio [73] podjęto ponownie badania nad zawartością poliamin w płynie mózgowo - rdzeniowym w przypadkach schorzeń nowotworowych, stosując metody radioimmunologiczne, mając na uwadze ich przydatność diagnostyczną. Dane te można podsumować następująco:

1. Stężenie poliamin w płynie mózgowo - rdzeniowym jest podwyższone w przypadkach nie leczonych nowotworów centralnego układu nerwowego w porównaniu ze stężeniem u osób zdrowych.

2. Brak jest zależności między wzrostem zawartości poliamin a stężeniem białka w płynie mózgowo - rdzeniowym.

3. Przypuszcza się, że istnieje korelacja między stężeniem poliamin a masą nowotworu.

TABELA 2

Wzrost stężenia poliamin w płynach zewnątrzkomórkowych w niektórych nowotworach

Rodzaj nowotworu	Płyn	% wzrostu poliamin	Literatura
Glejakomięsak, rdzeniak	PMR	100 (putrescyna)	[72, 73]
Gruczolak przysadki, gwiaździak	PMR	20—70 (spermidyna)	[72]
Białaczka szpikowa	S	75 (spermidyna)	[99]
Czerwienica	P	55 (spermidyna)	[21]
Mięsak	S	30—70 (putrescyna lub spermidyna)	[83]
Raki okrężnicy i odbytnicy	S	50—65 (spermidyna lub spermina)	[99]

PMR — płyn mózgowo-rdzeniowy, S — surowica, P — osocze.

Po chemoterapii nowotworów centralnego układu nerwowego w płynie mózgowo - rdzeniowym następuje wzrost stężenia poliamin, zwłaszcza putrescyny. Zaobserwowano, że wzrost stężenia tych związków wyprzedza poprawę stanu klinicznego chorych na nowotwory, spadek świadczy o ponownym wzroście nowotworu. W tabeli 2 przedstawiono wzrost zawartości poliamin w surowicy krwi i płynie mózgowo - rdze-

http://rcin.org.pl

niowym w nowotworach centralnego układu nerwowego oraz w niektórych innych nowotworach u ludzi.

Stwierdzono również zwiększone wydalanie poliamin z moczem u ludzi chorych na nowotwory [31, 67, 99, 122]. Wzrost spermidyny w moczu, a zwłaszcza monoacetylowej pochodnej stwierdził również Walle [123] u chorych z ostrą i przewlekłą białaczką limfatyczną. Fujita i wsp. [31] uważają, że spośród wszystkich poliamin zwiększone wydalanie putrescyny z moczem jest najbardziej charakterystycznym wskaźnikiem dla nowotworów układu krwiotwórczego i innych nowotworów o różnej lokalizacji narządowej u ludzi. Wzrost wydalania putrescyny z moczem obserwowano również w doświadczalnych nowotworach żołądka wywołanych przez 1 - metylo - 3 - nitro - 1 - nitrozoguanidynę u szczurów [31]. Znaczny spadek wydalania putrescyny stwierdzono po leczeniu chemoterapeutycznym, radioterapeutycznym i chirurgicznym [24, 31] (tabela 3).

TABELA 3

Wydalanie poliamin z moczem u ludzi z chorobą nowotworową przed (A) i po leczeniu (B) [31]

	Ilość poliamin w moczu (mg/24 godz.)						Ilość całkowita (mg/24 godz.)	
	Putrescyna		Spermidyna		Spermina			
	A	B	A	B	A	B	A	B
Ludzie zdrowi	4,2	—	1,1	—	3,4	—	8,7	—
Ostra białaczka mielocytowa	20,8	7,40	23,3	4,3	28,4	27,4	72,5	39,5
Włókniako-mięsak	19,1	—	7,8	—	13,2	—	40,1	—
Nowotwory jamy ustnej	10,7	5,1	3,4	1,9	5,6	4,0	19,1	11,1
Nowotwory trzustki	10,0	3,3	1,8	1,2	1,9	3,8	14,4	8,4
Nowotwory wątroby	16,6	2,5	11,4	2,2	9,3	4,3	37,3	9,0

Durie i wsp. [25] oraz Russell i wsp. [104, 106, 109] uważają, że znaczne zwiększenie zawartości spermidyny w płynach zewnątrzkomórkowych, jakie obserwuje się podczas leczenia, jest proporcjonalne do ilości komórek nowotworowych, które uległy zniszczeniu w wyniku działania chemicznych związków przeciwnowotworowych i promieni X.

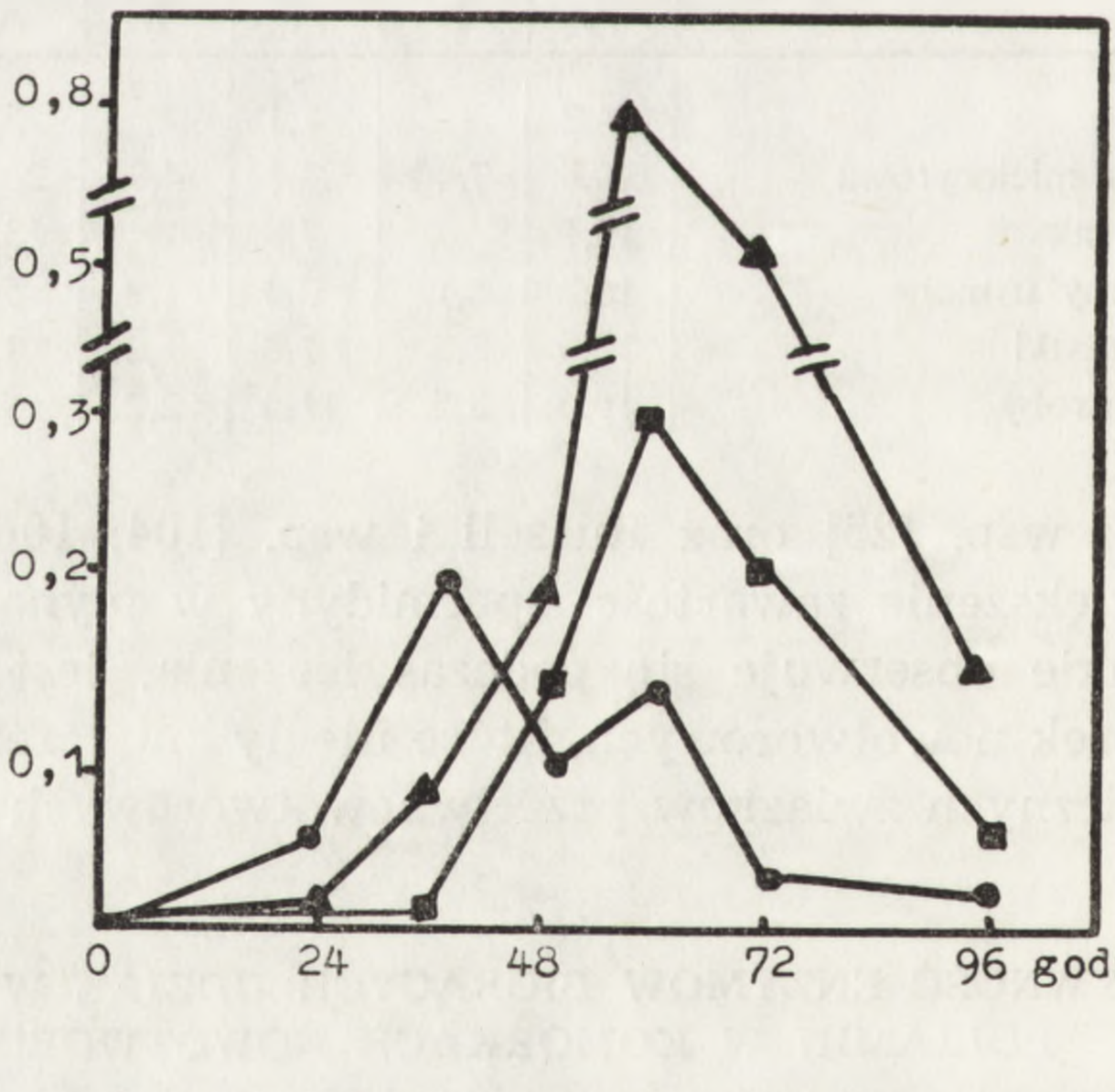
II. AKTYWNOŚĆ ENZYMÓW BIORĄCYCH UDZIAŁ W METABOLIZMIE POLIAMIN W KOMÓRKACH NOWOTWOROWYCH

Wyższe stężenie poliamin w tkance regenerującej wrażliwej na działanie niektórych hormonów oraz w komórkach nowotworowych w porównaniu z odpowiednimi komórkami prawidłowymi nasuwają przy-

http://rcin.org.pl

puszczenie o podwyższonej aktywności wewnątrzkomórkowych enzymów warunkujących szybkość ich tworzenia lub zmniejszonej aktywności enzymów biorących udział w ich degradacji. Aktywność dekarboksylazy L - ornityny, enzymu zapoczątkowującego pierwszy etap biosyntezy poliamin, jest w wymienionych tkankach podwyższona [16, 17, 32, 96]. W doświadczalnych wątrobiakach Morrisa, słabo zróżnicowanych i szybko rosnących, jest ona wyższa niż w wątrobiakach bardziej zróżnicowanych, a wolniej rosnących. Również w komórkach raka wysiękowego Ehrlicha wzrasta aktywność dekarboksylazy ornitynowej [38, 60]. Aktywność enzymów, biorących udział w syntezie poliamin w dalszych etapach, nie ulega tak charakerystycznym zmianom podczas wzrostu komórek.

Lembach [66] w badaniach in vitro na fibroblastach mysich transformowanych wirusem Rousa stwierdził, że podwyższeniu aktywności dekarboksylazy L - ornitynowej towarzyszy wzrost stężenia putrescyny. Należy podkreślić, że szybkość podziałów komórek transformowanych i prawidłowych była taka sama, mimo znacznej różnicy zawartości putrescyny [6]. Zaobserwowano, że zakażenie fibroblastów zarodków kurcząt wirusem onkogennym powoduje zmiany w aktywności dekarboksylazy L - ornitynowej przed zmianami fenotypowymi [23]. Aktywność tego enzymu również znacznie wzrasta w hodowli linii komórek BALB/3T3



Ryc. 2. Wpływ pojedynczej dawki czynnika karcinogennego na aktywność dekarboksylazy L - ornityny (EC 1.1.1.17) [88]

▲— 3-metylocholantren, ■ — benzo(α)pyren, ● — 7-12-dwumetylobenzantracen

http://rcin.org.pl

zakażonych wirusem mięsaka myszy [32] oraz w komórkach HeLa zainfekowanych wirusem krowianki [48].

Wpływ niektórych chemicznych czynników karcinogennych na aktywność dekarboksylazy ornityny przedstawia ryc. 2.

Goldstein i wsp. [34] wykazali, że zakażenie komórek nerek myszy wirusem polyoma powoduje dwufazowy wzrost aktywności dekarboksylazy L - ornityny i dekarboksylazy S - adenozylo - L - metioniny, przebiegający równolegle ze wzrostem poziomu poliamin. Pierwszy, wczesny szczyt wzrostu pojawia się w czasie syntezy wirusowego mRNA, przed syntezą DNA komórkowego. Drugi, późny szczyt wzrostu zbiega się w czasie z syntezą komórkowego DNA, stymulowanego wirusem polyoma.

Wykazano zależność między transformacją onkogenną, wywołaną przez wirusy, chemiczne środki karcinogenne (np. metylocholantren) i promienie X, a aktywnością dekarboksylazy L - ornitynowej [7, 22]. Aktywność tego enzymu jest proporcjonalna do poziomu poliamin w komórce, a odwrotnie proporcjonalna do zróżnicowania komórek. Podobne spostrzeżenia poczynił Heby i wsp. [41]. Autorzy zaobserwowali korelację między aktywnością dekarboksylazy L - ornitynowej oraz dekarboksylazy S - adenozylo - L - metioninowej a wzrostem guza mózgu u szczurów.

Mechanizm wzrostu aktywności dekarboksylazy L - ornitynowej i dekarboksylazy S - adenozylo - L - metioninowej w komórkach nowotworowych i transformowanych nie jest całkowicie wyjaśniony. Wzrost ten można tłumaczyć przyspieszoną syntezą enzymów. Bachrach [7] uważa, że wzrost aktywności dekarboksylazy L - ornitynowej w komórkach transformowanych można częściowo wyjaśnić wzrostem czasu połowicznego trwania enzymu ($T/_2$). Należy podkreślić, że charakterystyczną cechą tego enzymu, odróżniającą go od wszystkich enzymów, jest jego bardzo krótki półokres trwania wynoszący 10–20 min [59, 97]. Zjawisko wzrostu półokresu trwania enzymu tłumaczyłoby gromadzenie putrescyny w fibroblastach, nie wyjaśniając jednak mechanizmu wpływu poliamin na syntezę DNA, RNA i białka.

Stwierdzono, że czynniki wywołujące promocję nowotworu, np. pojedyncza dawka oleju krotonowego, stymulują włączanie ^{32}P w fosfolipidy błon i w białka histonowe [91], włączanie prekursorów do DNA i pobudzają syntezę RNA i białka [10]. O'Brien i wsp. [86, 87] uważają, że wzrost aktywności dekarboksylazy L - ornitynowej wywołany olejem krotonowym jest następstwem aktywacji specyficznych genów w komórkach. Badania in vivo [86] z użyciem inhibitorów biosyntezy białek (np. cykloheksimidu) sugerują, że stymulacja aktywności enzymu jest spowodowana wzrostem syntezy de novo białka enzymatycznego. Rów-

http://rcin.org.pl

nież badania wpływu innych związków chemicznych, stosowanych w terapii nowotworów i białaczek celem zahamowania syntezy białek, na aktywność enzymów uczestniczących w biosyntezie poliamin potwierdzają tę sugestię. 5 - azacytydyna — związek o wybitnym działaniu przeciwbiałaczkowym hamuje wzrost aktywności dekarboksylazy L - ornitynowej i dekarboksylazy S - adenozylo - L - metioninowej oraz gromadzenie poliamin w komórkach białaczki limfatycznej L 1210 myszy. Przerwanie podawania 5 - azacytydyny powoduje ponowny wzrost aktywności tych enzymów z równoczesnym zwiększeniem stężenia poliamin [39].

Do wzrostu aktywności dekarboksylazy L - ornitynowej w komórkach dochodzi po podaniu cAMP lub związków prowadzących do zwiększenia zawartości cAMP [14–16, 95, 107]. Natomiast w komórkach naskórka myszy, poddanych uprzednio działaniu pochodnych forbolu, cAMP lub cGTP nie wywiera wpływu na wzrost aktywności dekarboksylazy L - ornitynowej [80].

Wzrost aktywności dekarboksylazy L - ornitynowej w komórkach hepatoma u szczura, wywołany cAMP, może być zahamowany przez sperminę w stężeniu 10^{-5} M. Spostrzeżenie to sugeruje, że spermina odgrywa ważną rolę w kontroli aktywności dekarboksylazy L - ornitynowej [119].

Bachrach [9] stwierdził wzrost aktywności dekarboksylazy S - adenozylo - L - metioninowej w hodowli komórek nowotworowych centralnego układu nerwowego (klon komórkowy glejaka szczura C - 6 - B4 - 1 i klon nerwiaka u myszy N - 115) po przeniesieniu tych komórek do nowego środowiska. Autor zaobserwował, że indukcję dekarboksylazy S - adenozylo - L - metioninowej mogą wywoływać inhibitory fosfodwuesteraz, hormony aktywujące cyklazę adenylową lub db - cAMP [9]. Ponieważ wymienione czynniki powodują gromadzenie się wewnątrzkomórkowego cAMP, można przeto sugerować, że za indukcję dekarboksylazy S - adenozylo - L - metioninowej również odpowiedzialny jest cAMP.

Należy podkreślić, że aktywność dekarboksylazy L - ornitynowej w wątrobie zwierząt wzrasta również pod wpływem działania czynników, które nie powodują wzrostu komórek, np. po dootrzewnowym podaniu szczurom celitu lub mannitolu [111]. Podobne obserwacje poczyniono in vitro w komórkach HeLa oraz w komórkach tarczycy u myszy, po nagłym obniżeniu stężenia chlorku sodowego w środowisku inkubacyjnym [30, 81]. Przejściowy wzrost aktywności dekarboksylazy L - ornitynowej obserwuje się również w komórkach BHK po dodaniu do środowiska płodowej surowicy cielęcej [47].

Związek między aktywnością dekarboksylazy L - ornitynowej i proliferacją komórek pozostaje nadal kontrowersyjny. Jedni autorzy uwa-

http://rcin.org.pl

żają, że wzrost aktywności dekarboksylazy L - ornitynowej prowadzi do stymulacji syntezy DNA [13] i RNA [69], a inni sądzą, że nie ma takiej zależności [81, 87, 111].

Niewiele wiadomo na temat udziału innych enzymów uczestniczących w metabolizmie poliamin. Doświadczenia Hannonena i wsp. wskazują, że wzrost aktywności dekarboksylazy S - adenozylo - L - metioninowej i syntetaz spermidynowej i sperminowej następuje po częściowej hepatektomii u szczurów [35]. Podanie zwierzętom cykloheksimidu powodowało szybki spadek aktywności dekarboksylazy S - adenylo - L - - metioninowej. Inhibitor ten nie wykazywał natomiast wpływu na aktywność syntetazy spermidynowej i sperminowej.

Hölta [51] wykazał obecność w wątrobie szczura oksydazy poliaminowej, enzymu biorącego udział w degradacji poliamin. Aktywność tego enzymu była wysoka w porównaniu z aktywnością enzymów biorących udział w syntezie poliamin. Biologiczna rola tego enzymu jest dotychczas mało poznana.

III. HAMOWANIE BIOSYNTEZY POLIAMIN A WZROST NOWOTWORÓW

Wyniki dotychczasowych badań mogą sugerować, że wzrost komórek nowotworowych sprzężony jest z biosyntezą poliamin. Jeśli przypuszczenie to jest słuszne, należy sądzić, że wzrost guza nowotworowego powinien być hamowany związkami blokującymi biosyntezę putrescyny, spermidyny i sperminy.

Większość znanych obecnie inhibitorów syntezy poliamin, hamujących jednocześnie wzrost nowotworów, wpływa na aktywność dekarboksylazy L - ornitynowej lub dekarboksylazy S - adenozylo - L - metioninowej. Analogi ornityny: α - hydrazyno - ornityna i α - metylo - ornityna hamują biosyntezę putrescyny w komórkach wątrobiaka szczura [37, 68] i w śledzionie myszy, której przeszczepiono komórki białaczki L 1210 [1].

Ostatnio McCann i wsp. [75] wykazali, że α - metylo - ornityna hamuje dość znacznie biosyntezę putrescyny w komórkach wątrobiaka. Ponadto związek ten powoduje przedłużenie okresu połowicznego trwania dekarboksylazy L - ornitynowej prawdopodobnie przez zmniejszenie szybkości degradacji białka enzymatycznego na drodze blokowania centrum aktywnego enzymu.

Inny analog ornityny, kwas DL - α - hydrazynowalerianowy, hamuje aktywność dekarboksylazy ornitynowej oraz wzrost stężenia putrescyny wywołany uprzednio w skórze myszy przez etylo - fenylo - propiolan [116]. Kato i wsp. [63] wykazali, że kwas DL - α - hydrazynowalerianowy hamuje syntezę DNA w komórkach mięsaka 180 oraz jego

http://rcin.org.pl

wzrost u myszy. Autorzy uważają, że hamowanie syntezy DNA i wzrostu mięsaka jest spowodowane zmniejszeniem aktywności dekarboksylazy L - ornitynowej oraz spadkiem stężenia putrescyny w tkance nowotworowej.

Podanie myszom z rakiem wysiękowym Ehrlicha niektórych dwuamin, takich jak kadaweryna (1,5 - dwuaminopropan), 1,6 - dwuaminoheksan, 1,3 - dwuaminopropan lub putrescyna, powoduje spadek aktywności dekarboksylazy L - ornitynowej w komórkach nowotworowych oraz spadek stężenia poliamin. Szczególnie skuteczne działanie na komórki raka wysiękowego Ehrlicha wykazywała kadaweryna [60]. W komórkach białaczki u myszy L 1210, w nerwiakach oraz w komórkach wątrobiaka H - 35 putrescyna indukuje syntezę specyficznego białka hamującego aktywność dekarboksylazy L - ornitynowej [43].

W ostatnich latach wielu autorów stwierdziło, że witamina A oraz jej pochodne, a zwłaszcza forma kwasowa, mogą zapobiec powstawaniu nabłoniaków [12, 114], a nawet cofnąć promocję nowotworu wywołanego w skórze myszy estrami forbolu [120, 121]. Wyniki badań wskazują, że witamina A oraz jej pochodne hamują aktywność dekarboksylazy L - ornitynowej oraz magazynowanie putrescyny, natomiast nie mają wpływu na poziom spermidyny i sperminy.

Kilkanaście lat temu Mihich [77] zaobserwował, że dodanie spermidyny do hodowli komórek białaczkowych u myszy L 1210 zapobiega cytotoksycznym efektom wywołanym uprzednio przez bis - guanylo hydrazon metyloglioksalu. Związek ten z uwagi na hamowanie proliferacji komórek znalazł zastosowanie w lecznictwie w przypadkach nowotworowego rozrostu komórek syntetyzujących globuliny: szpiczaka mnogiego i jego odmian oraz białaczki limfatycznej. Mechanizm działania tego związku opisali po raz pierwszy Williams - Ashman i Schenone [125] i udowodnili, że jest on specyficznym inhibitorem dekarboksylazy S - adenozylo - L - metioninowej (EC 4.1.1.50) zależnej od putrescyny. Inhibitor ten hamuje biosyntezę spermidyny i sperminy. Podobne spostrzeżenia poczynili Höltta i wsp. [50]. Zaobserwowano, że po podaniu bis - guanylo hydrazonu metyloglioksalu myszom z białaczką limfatyczną L 1210 następuje gromadzenie putrescyny w śledzionie zwierząt, a spadek w komórkach białaczkowych spermidyny i sperminy [40]. Podobne spostrzeżenia poczyniono in vitro badając fibroblasty zarodka kurczącia, transformowane wirusem mięsaka Rousa (cyt. za [7]), oraz hodowane komórki BHK - 21/C13 [76].

Ostatnio wykazano [64], że bis - guanylo hydrazon metyloglioksalu — inhibitor syntezy spermidyny, hamuje włączanie ^{3}H - tymidyny, ^{3}H - urydyny i ^{14}C - leucyny do DNA, RNA i białek komórek linii HeLa. Dodanie spermidyny do hodowli komórek wraz z tym inhibitorem zapobiega

http://rcin.org.pl

jego hamującemu działaniu. Wskazywałoby to, że zmniejszenie poziomu spermidyny i sperminy spowodowane działaniem inhibitora może prowadzić do spadku syntezy DNA w komórce, spadku transkrypcji RNA i biosyntezy białka. Zatem poliaminy można uważać za induktory czynności genu u eukariotów, które obok swoistych induktorów, jakimi są hormony, spełniałyby również rolę regulacyjną w procesie wzrostu komórek.

Morris i wsp. [79] swtierdzili, że bis - guanylo hydrazon metyloglioksalu hamuje syntezę spermidyny i sperminy, lecz nie wpływa na syntezę putrescyny w limfocytach stymulowanych przez konkanawalinę A. Replikacja DNA w tych komórkach była zahamowana, natomiast nie stwierdzono wpływu tego związku na syntezę RNA i białka [79].

Russell i Levy [102], badając wpływ syntetycznych inhibitorów dekarboksylazy L - ornitynowej i S - adenozylo - L - metioninowej na biosyntezę poliamin, wykazali, że leki zwiększające przeżywalność myszy z białaczką L 1210, a mianowicie NSC 45388 [5 - (3,3 - dwumetylo - 1 - - triazeno)imidazolo - 4 - karboksyamid] i NSC 82196 [5 - (3,3 - bis (2 - chloro - etylo) - 1 - triazeno(imidazolo - 4 - karboksyamid], powodują spadek zawartości poliamin w tkance nowotworu. Bachrach [8] zaobserwował, że NSC 45388 hamuje aktywność dekarboksylazy ornitynowej fibroblastów zarodka kurczęcia. Związek ten w stężeniu 1 mM wykazuje szczególną toksyczność wobec fibroblastów zarodka kurcząt transformowanych wirusem mięsaka Rousa. Tej selektywnej toksyczności towarzyszy spadek poziomu putrescyny w transformowanych fibroblastach [6].

Niewiele poznano związków hamujących aktywność syntetaz spermidynowej lub sperminowej. Wiadomo jest, że putrescyna działa jako naturalny inhibitor syntetazy sperminowej w gruczole krokowym [89] oraz w mózgu szczura [36]. Stwierdzono ponadto, że putrescyna i kadaweryna hamują aktywność syntetazy spermidynowej w komórkach raka wysiękowego Ehrlicha [60].

UWAGI KOŃCOWE

Poliaminy, występujące powszechnie we wszystkich komórkach zwierzęcych, są w dużym stopniu odpowiedzialne — obok innych czynników — za wzrost komórek prawidłowych. Indukcji nowotworów u zwierząt i transformacji nowotworowej fibroblastów, wywołanej przez chemiczne czynniki karcinogenne lub wirusy onkogenne, towarzyszy wzrost stężenia poliamin, związany ze zwiększeniem aktywności enzymów biorących udział w ich syntezie. Prawdopodobnie związki te oddziaływają na funkcję DNA i RNA, powodując indukcję genów. Mechanizm induk-

http://rcin.org.pl

cji przez poliaminy nie jest poznany *. Stwierdzono, że w obecności poliamin dochodzi do stymulacji syntetazy AA - t - RNA oraz inicjacji syntezy łańcucha peptydowego.

LITERATURA

[1] ABDEL - MONEN M. M., NEWTON N. E., HO B. C., WEEKS C. E., Potential inhibitors of polyamine biosynthesis. 2. α - alkyl - and benzyl(±) - ornithine, J. Med. Chem., **18**: 600–604, 1975.

[2] ANDERSON G., HEBY O., Polyamine and nucleic acid concentrations in Ehrlich ascites carcinoma cells and liver of tumor - bearing mice at various stages of tumor growth, J. Nat. Cancer Inst., **48**: 165–172, 1972.

[3] ATKINS J. F., LEVIS J. B., ANDERSON C. W., GESTELAND R. F., Enhanced differential synthesis of proteins in mammalian cell - free system by addition of polyamines, J. Biol. Chem., **250**: 5688–5695, 1975.

[4] BACHRACH U., ROBINSON E., Occurrence of spermine in sera of cancer bearing individuals, Isr. J. Med. Sci., **1**: 247–250, 1965.

[5] BACHRACH U., BEKIERKUNST A., ABZUG S., The occurrence of putrescine, spermidine and spermine in Ehrlich ascites cells, Isr. J. Med. Sci., **3**: 474–477, 1967.

[6] BACHRACH U., DON S., WIENER H., Polyamines and tumor cells: effect of transformation of chick embryo fibroblast by *Rous sarcoma* virus on polyamine levels, Biochem. Biophys. Res. Commun., **55**: 1035–1041, 1973.

[7] BACHRACH U., Polyamines and neoplastic growth: stabilization of ornithine decarboxylase during transformation, Biochem. Biophys. Res. Commun., **72**: 1008–1013, 1976.

[8] — Polyamines as chemical markers of malignancy, Italian J. Biochem., **25**: 77–93, 1976.

[9] — Induction of S - adenosyl - L - methionine decarboxylase in glioma and neuroblastoma cells, FEBS Letters, **75**: 201–204, 1977.

[10] BAIRD W. M., SEDGWICK J. A., BOUTWELL R. K., Effects of phorbol and four diester of phorbol on the incorporation of tritiated precursors into DNA, RNA and protein of mouse epidermis, Cancer Res., **31**: 1434–1439, 1971.

[11] BARTOS F., BARTOS D., GRETTIA D. P., CAMPBELL R. A., MARTON L. J., SMITH R. G., DAVES G. D., Polyamine levels in normal human serum. Comparison of analytical methods, Biochem. Biophys. Res. Commun., **75**: 915–919, 1977.

[12] BOLLAG W., Prophylaxis of chemically induced benign and malignant ephitelial tumors by vitamin A acid (retinoic acid), Eur. J. Cancer, **8**: 689–693, 1972.

[13] BREWER E. N., RUSCH H. P., Control of DNA replication: effect of spermine on DNA polymerase activity in nucleic isolated from *Physarium polycephalum*, Biochem. Biophys. Res. Commun., **25**: 579–584, 1966.

[14] BYNS C. V., RUSSELL D. H., Effects of methyl xanthine derivates on cyclic

* Ostatnio ukazała się obszerna praca przeglądowa J. Jänne i wsp. pt. „Polyamines in rapid growth and cancer", Biochim. Biophys. Acta, **473**:241–293, 1978.

http://rcin.org.pl

AMP levels and ornithine decarboxylase activity of rat tissues, Life Sci., **15**: 1991–1997, 1974.
[15] — Ornithine decarboxylase activity: control by cyclic nucleotides, Science, **187**: 650–652, 1975.
[16] CANELLAKIS Z. N., THEOHARIDES T. C., Stimulation of ornithine decarboxylase synthesis and its control by polyamines in regenerating rat liver and cultured rat hepatoma cells, J. Biol. Chem., **251**: 4436–4441, 1976.
[17] CLARK - LEWIS I., MURRAY A. W., Tumor promotion and the induction of epidermal ornithine decarboxylase activity in mechanically stimulated mouse skin, Cancer Res., **38**: 494–497, 1978.
[18] COHEN S., O'MALLEY B. W., STASTNEY M., Estrogenic induction of ornithine decarboxylase in vivo and in vitro, Science, **170**: 336–338, 1970.
[19] COHEN S. S., Introduction to the polyamines p. 109, Prentice - Hall, Englewood Cliffs, N. J., 1971.
[20] DEMAN J., BRUYNEEL E., Putrescine — promoted mutual adhesiveness of HeLa cells from density - inhibited suspensions cultures, J. Nat. Cancer Inst., **58**: 145–147, 1977.
[21] DESSER H., HÖCKER P., WEISER M., BÖHNEL J., The content of unbound polyamines in blood plasma and leukocytes of patients with polycythemia vera, Clin. Chim. Acta, **63**: 243–247, 1975.
[22] DON S., WIENER H., BACHRACH U., Specific increase in polyamine levels in chick embryo cells transformed by Rous Sarcoma Virus, Cancer Res., **35**: 194–198, 1975.
[23] DON S., BACHRACH U., Polyamine metabolism in normal and in virus - transformed chick embryo fibroblasts, Cancer Res., **35**: 3618–3622, 1975.
[24] DREYFUSS F., CHAYEN R. G., DVIR R., RATAN J., Polyamine excretion in the urine of cancer patients, Israel J. Med. Sci., **11**: 785–795, 1975.
[25] DURIE B. G. M., SALMON S. E., RUSSELL D. H., Polyamines as markers of response and disease activity in cancer chemotherapy, Cancer Res., **37**: 214–221, 1977.
[26] EVANS J. A., DEUTSCHER M. P., Polyamine stimulation and cation requirements of rabbit liver tRNA nucleotidyltransferase, J. Biol. Chem., **251**: 6646–6652, 1976.
[27] FILLINGANE R. H., MORRIS D. R., Polyamine accumulation during lymphocyte transformation and its relation to the synthesis processing and accumulation of ribonucleic acid, Biochemistry, **12**: 4479–4487, 1973.
[28] FILLINGANE R. H., JORSTAD C. M., MORRIS D. R., Increased cellular levels of spermidine or spermine are required for optimal DNA synthesis in lymphocytes activated by concanavalin A, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., **72**: 4042–4045, 1975.
[29] FRIEDMAN S. J., BELLANTONE R. A., CANELLAKIS E. S., Ornithine decarboxylase activity in synchronously growing clon C cells, Biochim. Biophys. Acta, **261**: 188–193, 1972.
[30] FRIEDMAN Y., PARK S., LEVASSEUR S., BURKE G., Activation of thyroid ornithine decarboxylase (ODC) in vitro by hypotonicity. A possible mechanism for ODC induction, Biochem. Biophys. Res. Commun., **77**: 57–64, 1977.
[31] FUJITA K., NAGATSU T., MARUTA K., ITO K., SENBA H., MIKI K., Urinary putrescine, spermidine and spermine in human blood and solid cancers and in an experimental gastric tumor of rats, Cancer Res., **36**: 1320–1324, 1976.

http://rcin.org.pl

[32] GAZDAR A. F., STULL H. B., KILTON L. J., BACHRACH U., Increased ornithine decarboxylase activity in murine sarcoma virus infected cells, Nature, **262**: 696–698, 1976.
[33] GIORGI P. P., Polyamines and amino acid incorporation in vitro into microsomes of rat cerebral cortex, Biochem. J., **120**: 643–651, 1970.
[34] GOLDSTEIN D. A., HEBY O., MARTON L. J., Biphasic stimulation of polyamine biosynthesis in primary mouse kidney cells by infection with polyoma virus: uncoupling from DNA and rRNA synthesis, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., **73**: 4022–4026, 1976.
[35] HANNONEN P., RÄINA A., JÄNNE J., Polyamine synthesis in the regenerating rat liver: stimulation of S - adenosyl - methionine decarboxylase and spermidine and spermine synthases after partial hepatectomy, Biochim. Biophys. Acta, **273**: 84–90, 1972.
[36] — Partial purification and characterization of spermine synthase from rat brain, Biochim. Biophys. Acta, **289**: 225–231, 1972.
[37] HARIK S. I., SNYDER S. H., Ornithine decarboxylase: inhibition by α - hydrazinoornithine, Biochim. Biophys. Acta, **327**: 501–509, 1973.
[38] HARRIS J. W., WONG Y. P., KEHE C. R., TENG S. S., The role of adenosine triphosphate, chalones and specific proteins in controling tumor growth, fraction, Cancer Res., **35**: 3181–3186, 1975.
[39] HEBY O., RUSSELL D. H., Depression of polyamine synthesis in L1210 leukemic mice during treatment with a potent antileukemic agent 5 - azacytidine, Cancer Res., **33**: 159–165, 1973.
[40] — [w] Polyamine in normal and neoplastic growth, wyd. Russell, D. H., Raven Press, Inc, New York, str. 343, 1973.
[41] HEBY O., MARTON L. J., WILSON C. B., MARTINEZ H. M., Polyamine metabolism in a rat brain tumor cell line: its relationship to the growth rate, J. Cell. Physiol., **86**: 511–521, 1975.
[42] HEBY O., GRAY J. W., LINDL P. A., MARTON L. J., WILSON C. B., Changes in L - ornithine decarboxylase activity during the cell cycle, Biochem. Biophys. Res. Commun., **71**: 99–105, 1976.
[43] HELLER J. S., FONG W. F., CANELLAKIS E. S., Induction of a protein inhibitor to ornithine dekarboxylase by the end products of its reaction, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., **73**: 1858–1862, 1976.
[44] HIBASAMI H., TANAKA M., NAGAI J., IKEDA T., Concentrations of spermidine and spermine in normal mouse livers, Mie Med. J., **24**: 209–213, 1974–1975.
[45] — Polyamine concentrations in tissues of mice bearing Ehrlich's ascites tumor and effect of administration of methylglyoksal - bis (guanylhydrazone), Mie Med. J., **24**: 215–223, 1974–1975.
[46] — Changes in ornithine decarboxylase activity and polyamine concentrations in growing BHK cells, Mie Med. J., **25**: 223–229, 1976.
[47] — Induction of ornithine decarboxylase in synchronized BHK cells by calf serum after a short period of serum starvation, Austr. J. Exp. Biol. Med. Sci., **56**: 279–285, 1978.
[48] HODGSON J., WILLIAMSON J. D., Ornithine decarboxylase activity in uninfected and infected vaccinia virus HeLa cells, Biochem. Biophys. Res. Commun., **63**: 308–312, 1975.
[49] HOGAN B. L. M., Effect of growth conditions on the ornithine decarboxylase

http://rcin.org.pl

activity of rat hepatoma cells, Biochem. Biophys. Res. Commun., **45**: 301–307, 1971.

[50] HÖLTÄ E., HANNONEN P., PISPA J., JÄNNE J., Effect of methylglyoxal-bis (guanylhydrazone) on polyamine metabolism in normal and regenerating rat liver and rat thymus, Biochem. J., **136**: 669–676, 1973.

[51] HÖLTÄ E., Oxidation of spermidine and spermine in rat liver: Purification and properties of polyamine oxidase, Biochemistry, **16**: 91–100, 1977.

[52] IGARASHI K., HIKAMI K., SUGAWARA K., HIROSE S., Effect of polyamines on polypeptide synthesis in rat liver cell-free system, Biochim. Biophys. Acta, **299**: 325–330, 1973.

[53] IGARASHI K., HARA K., WATANABA Y., HIROSE S., TAKEDA Y., Polyamine and magnesium contents and polypeptide synthesis as a function of cell growth, Biochem. Biophys. Res. Commun., **64**: 897–904, 1975.

[54] IGARASHI K., WATANABA Y., KUMAGAI H., ISHIZAKI N., HIROSE S., Studies on the restoration of the activaties of ribonucleases by polyamines in the presence of various ribonuclease inhibitors, J. Biochem., **81**: 579–585, 1977.

[55] IMAI H., SHIMOYAMA M., YAMAMOTO S., TANIGAWA Y., UEDA I., Effect of polyamines on phosphorylation of non-histone chromatin proteins from hog liver, Biochem. Biophys. Res. Commun., **66**: 856–862, 1975.

[56] INOUE H., TANIOKA H., SHIBA K., ASADA A., KATO Y., TAKEDA Y., Effect of isoproterenol on polyamine metabolism in mouse salivary glands, J. Biochem. (Tokyo), **75**: 679–687, 1974.

[57] JÄNNE J., RÄINA A., SIIMES M., Spermidine and spermine in rat tissues at different ages, Acta Physiol. Scand., **62**: 352–358, 1964.

[58] JANSSENS deVAREBEKE P., AUGUSTYNIAK J., Deprotonation of salt-free tRNA by polyamines, Biochem. Biophys. Res. Commun., **77**: 1508–1516, 1977.

[59] JÄNNE J., RÄINA A., Stimulation of spermidine synthesis in the regenerating rat liver. Relation to increased ornithine decarboxylase activity, Acta Chem. Scand., **22**: 1349–1351, 1968.

[60] KALLIO A., PÖSO H., GUHA S. K., JÄNNE J., Polyamines and their biosynthetic enzymes in Ehrlich ascites-carcinoma cells. Modification of tumour polyamine pattern by diamines, Biochem. J., **166**: 89–94, 1977.

[61] KALLISTRATOS G., PFAU A., TIMMERMAN A., Untersuchungen über Malignolipin, Z. Krebsforsch, **73**: 387–396, 1970.

[62] KANO K., OKA T., Polyamine transport and metabolism in mouse mammary gland, J. Biol. Chem., **251**: 2795–2800, 1976.

[63] KATO Y., INOUE H., GOHDA E., Effect of DL α-hydrazino-δ-aminovaleric acid an inhibitor of ornithine decarboxylase on polyamine metabolism and growth of mouse sarcoma 180, Gann, **67**: 569–576, 1976.

[64] KROKAN H., ERIKSEN A., DNA synthesis in HeLa cells and isolated nuclei after treatment with an inhibitor of spermidine synthesis, Eur. J. Biochem., **72**: 501–508, 1977.

[65] KONECKI D., KRAMER G., PINPHANICHAKARN P., HARDESTY B., Polyamines are necessary for maximum in vitro synthesis of globin peptides and play a role in chain initiation, Arch. Biochem. Biophys., **169**: 192–198, 1975.

[66] LEMBACH K. J., Regulation of growth in vitro. I. Control of ornithine

http://rcin.org.pl

decarboxylase levels in untransformed and transformed mouse fibroblast by serum, Biochim. Biophys. Acta, **354**: 88–100, 1974.

[67] LIPTON A., SHEEHAN L., HARVEY H. A., Urinary polyamine levels in patients with gastrointestinal malignancy, Cancer, **36**: 2351–2353, 1975.

[68] MAMONT P. S., BÖHLEN P., MCCANN P. P., BEY P., SCHUBER F., TARDIF C., α - methyl ornithine, a potent competitive inhibitor of ornithine decarboxylase blocks proliferation of rat hepatoma cells in culture, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., **73**: 1626–1630, 1976.

[69] MANEN C. A., RUSSELL D. H., Relationship of ornithine decarboxylase to RNA polymerase I activity, Life Sci., **17**: 1769–1775, 1975.

[70] MARTON L. J., RUSSELL D. H., LEVY C. C., Measurement of putrescine, spermidine and spermine in physiological fluid by use of an amino acid analyzer, Clin. Chem., **19**: 923–926, 1973.

[71] MARTON L. J., HEBY O., Polyamine metabolism in tumor, spleen and liver of tumor - bearing rats, Int. J. Cancer, **13**: 619–628, 1974.

[72] MARTON L. J., HEBY O., WILSON C. B., Increased polyamine concentrations in the cerebrospinal fluid of patients with brain tumors, Int. J. Cancer, **14**: 731–735, 1974.

[73] MARTON L. J., HEBY O., LEVIN V. A., LUBICH W. P., CRAFTS D. C., WILSON C. L. B., The relationship of polyamines in cerebrospinal fluid to the presence of central nervous system tumors, Cancer Res., **36**: 973–977, 1976.

[74] McANULTY P., WILLIAMS J. P. G., Polyamines and their biosynthetic decarboxylases in various tissues of the young rat during recovery from undernutrition, Biochem. J., **162**: 109–121, 1977.

[75] McCANN P. P., TARDIF C., DUCHESNE M. C., MAMONT P. S., Effect of α - methyl ornithine on ornithine decarboxylase activity of rat hepatoma cells in culture, Biochem. Biophys. Res. Commun., **76**: 893–899, 1977.

[76] MELVIN M. A. L., KEIR H. M., Diminished excretion of polyamines from BHK - 21/C13 cells exposed to methylglyoxal - bis (guanylhydrazone), Biochem. J., **174**: 349–352, 1978.

[77] MIHICH E., Current studies with methylglyoxal - bis (guanylhydrazone), Cancer Res., **23**: 1375–1389, 1963.

[78] MITCHELL J. L. A., RUSCH H. P., Regulation of polyamine synthesis in *Physarium polycephalum* during growth and differentiation, Biochim. Biophys. Acta, **297**: 503–516, 1973.

[79] MORRIS D. R., JORSTAD C. M., SEYFRIED C. E., Inhibition of the synthesis of polyamines and DNA in activated lymphocytes by a combination of α - methylornithine and methylglyoxal - bis (guanylhydrazone), Cancer Res., **37**: 3169–3172, 1977.

[80] MUFSON R. A., ASTRUP E. G., SIMSIMAN R. C., BOUTWELL R. K., Dissociation of increases in levels of 3':5' - cyclic AMP and 3':5' - cyclic GMP from induction of ornithine decarboxylase by the tumor promoter 12 - O - tetra - decanoyl phorbol - 13 - acetate in mouse epidermis in vivo, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., **74**: 657–661, 1977.

[81] MUNRO G. F., MILLER R. A., BELL C. A., VERDERBER E. L., Effects of external osmolality on polyamine metabolism in HeLa cells, Biochim. Biophys. Acta, **411**: 263–281, 1975.

[82] NEISH W. J. P., KEY L., Spermidine, spermine and glutathione in Rd/3 sarcoma rats, Int. J. Cancer, **2**: 69–75, 1967.

http://rcin.org.pl

[83] NISHIOKA K., ROMSDAHL M. M., Elevation of putrescine and spermidine in sera of patients with solid tumors, Clin. Chim. Acta, **57**: 155–161, 1974.
[84] NOGUCHI T., KASHIWAGI A., TANAKA T., Changes in ornithine decarboxylase activity in normal tissues of tumor - bearing mice during tumor growth, J. Biochem. (Tokyo), **79**: 451–454, 1976.
[85] — A factor responsible for increases in ornithine decarboxylase activity in the livers of tumor - bearing mice, Cancer Res., **36**: 4015–4022, 1976.
[86] O'BRIEN T. G., SIMSIMAN R. C., BOUTWELL R. K., Induction of the polyamine biosynthetic enzymes in mouse epidermis by tumor - promoting agents, Cancer Res., **35**: 1662–1670, 1975.
[87] — Induction of the polyamine biosynthetic enzymes in mouse epidermis and their specificity for tumor promotion, Cancer Res., **35**: 2426–2433, 1975.
[88] O'BRIEN T. G., The induction of ornithine decarboxylase as an early, possibly obligatory, event in mouse skin carcinogenesis, Cancer Res., **36**: 2644–2653, 1976.
[89] PEGG A. E., WILLIAMS - ASHMAN, H. G., Enzymatic synthesis of spermine in rat prostate, Arch. Biochem. Biophys., **137**: 156–165, 1970.
[90] POHJANPELTO P., Putrescine as a growth factor, [w] Biology of fibroblast. Wyd. Kulonen E., Pikkareinen J., Academic Press, London, New York, str. 195–198, 1973.
[91] RAINERI R., SIMSIMAN R. C., BOUTWELL R. K., Stimulation of the phosphorylation of mouse epidermal histones by tumor promoting agents, Cancer Res., **33**: 134–139, 1973.
[92] RENNERT O., MIALE T., SHUKLA J., LAWSON D., FRIAS J., Polyamine concentrations in bone marrow aspirates of children with leukemia and other malignancies, Blood, **47**: 695–701, 1976.
[93] RENNERT O. M., LAWSON D. L., SHUKLA J. B., MIALE T. D., Cerebrospinal fluid polyamine monitoring in central nervous system leukemia, Clin. Chim. Acta, **75**: 365–369, 1977.
[94] ROSZELL J. A., DOUGLAS C. J., IRVING C. C., Polyamine stimulated growth of cultured rat urinary bladder, Cancer Res., **37**: 239–243, 1977.
[95] RUPNIAK H. T., PAUL D., Factors regulating the induction of ornithine decarboxylase in fetal rat liver cells in culture, Biochim. Biophys. Acta, **543**: 10–15, 1978.
[96] RUSSELL D. H., SNYDER S. H., Amine synthesis in rapidly growing tissues: ornithine decarboxylase activity in regenerating rat liver, chick embryo and various tumors, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., **68**: 1420–1426, 1968.
[97] — Amine synthesis in regenerating rat liver: extremely rapid turnover of ornithine decarboxylase, Mol. Pharmacol., **5**: 253–262, 1969.
[98] RUSSELL D. H., SNYDER S. H., MEDINA V. J., Growth hormone induction of ornithine decarboxylase in rat liver, Endocrinology, **86**: 1414–1419, 1970.
[99] RUSSELL D. H., LEVY C. C., SCHIMPFF S. C., HAWK I. A., Urinary polyamines in cancer patients, Cancer Res., **31**: 1555–1558, 1971.
[100] RUSSELL D. H., Icreased polyamine concentrations in the urine of human cancer patients, Nature, **233**: 144–145, 1971.
[101] RUSSELL D. H., McVICKER T. A., Polyamine metabolism in mouse liver after partial hepatectomy, Biochim. Biophys. Acta, **244**: 248–251, 1971.
[102] RUSSELL D. H., LEVY C. C., Polyamine accumulation and biosynthesis in a mouse L1210 leukemia, Cancer Res., **31**: 248–251, 1971.

http://rcin.org.pl

[103] RUSSELL D. H., [w] Polyamines in normal and neoplastic growth, wyd. Russell D. H., New York: Raven Press, str. 1–13, 1973.
[104] — The roles of the polyamines, putrescine, spermidine and spermine in normal and malignant tissues, Life Sci., **13**: 1635–1647, 1973.
[105] RUSSELL D. H., GULLINO P. M., LeGENDRE S. M., Polyamine depletion of the MTW9 mammary tumor and subsequent elevation of spermidine in the sera of tumor - bearing rats as a biochemical marker of tumor regression, Cancer Res., **34**: 2378–2381, 1974.
[106] RUSSELL D. H., LOONEY W. B., KOVACS C. J., HOPKINS H. A., MARTON L. J., LeGENDRE S. M., MORRIS H. P., Polyamine depletion tumor tissue and subsequent elevation of spermidine in the sera of rats with 3924A hepatomas after 5 - fluorouracil administration, Cancer Res., **34**: 2382–2385, 1974.
[107] RUSSELL D. H., STAMBROOK P. J., Cell cycle specific fluctuations in adenosine 3':5' - cyclic monophosphate and polyamines of chinese hamster cells, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., **72**: 1482–1486, 1975.
[108] RUSSELL D. H., RUSSELL S. D., Comparison of the relative usefulness of serum, plasma and urine levels of polyamines as biochemical markers of cancer, Clin. Chem., **21**: 860–863, 1975.
[109] RUSSELL D. H., LOONEY W. B., KOVACS C. J., HOPKINS H. A., DATTILO J. W., MORRIS H. P., Changes in serum putrescine and spermidine levels following local radiation to hepatoma 3924A of the rat, Cancer Res., **36**: 420–423, 1976.
[110] SCHIEBEL W., SCHNECK U., DNA replication continued in isolated nuclei of synchronously growing *Physarium polecephalum*, Hoppe - Seyler's, Z. Physiol. Chem., **355**: 1515–1525, 1974.
[111] SCHROCK T. R., OAKMAN N. J., BUCHER N. L. R., Ornithine decarboxylase activity in relation to growth of rat liver. Effects of partial hepatectomy, hypertonic infusians, celite injection or other stressful procedures, Biochim. Biophys. Acta, **204**: 564–577, 1970.
[112] SHIMIZU H., KAKIMOTO Y., SANO I., Changes in concentration of polyamines in the developing mouse brain, Nature, **207**: 1196–1197, 1965.
[113] SIIMES M., JÄNNE J., Polyamines and their biosynthesis in Ehrlich ascites cells, Acta Chem. Scand., **21**: 815–817, 1967.
[114] SPORN M. B., DUNLAP N. M., NEWTON D. L., SMITH J. M., Prevention of chemical carcinogenesis by vitamin A and its synthetic analogs (retinoids), Fed. Proc., **35**: 1332–1338 1976.
[115] TABOR H., TABOR C. W., Biosynthesis and metabolism of 1,4 - diaminobutane, spermidine, spermine and related amines, Advan. Enzymol., **36**: 203–268, 1972.
[116] TAKIGAWA M., INOUE H., GOHDA E., ASADA A., TAKEDA Y., MORI Y., The role of putrescine in cell proliferation of the skin of mice induced by ethylphenylpropiolate, Exp., Mol. Pathol., **27**: 183–196, 1977.
[117] TANIGAWA Y., KAWAMURA M., SHIMOYMA M., Effect of polyamines on ADP - ribosylation of nuclear proteins from rat liver, Biochim. Biophys. Res. Commun., **76**: 406–412, 1977.
[118] TASHIMA Y., HASEGAWA M., MIZUNUNA H., Activation of Na^+ -, K^+ - adenosine triphosphatase by spermine, Biochem. Biophys. Res. Commun., **82**: 13–18, 1978.
[119] THEOHARIDES T. C., CANELLAKIS Z. N., Spermine inhibits induction of

http://rcin.org.pl

ornithine decarboxylase by cyclic AMP but not dexamethasone in rat hepatoma cells, Nature, **255**: 733–734, 1975.

[120] VERMA A. K., BOUTWELL R. K., Vitamin A acid (retinoic acid) a potent inhibitor of 12 - O - tetradecanoylphorbol - 13 - acetate induced ornithine decarboxylase activity in mouse epidermis, Cancer Res., **37**: 2196–2201, 1977.

[121] VERMA A. K., RICE H. M., SHAPAS B. G., BOUTWELL R. K., Inhibition of 12 - O - tetradecanoylphorbol - 13 - acetate induced ornithine decarboxylase activity in mouse epidermis by vitamin A analogs (retinoids), Cancer Res., **38**: 793–801, 1978.

[122] WAALKES T. P., GEHRKE C. W., TORMEY D. C., ZUMWALT R. W., HUESER J. N., KUO K. C., LAKINGS D. B., AHMANN D. L., MOERTEL C. G., Urinary excretion of polyamines by patients with advanced malignancy, Cancer Chemother. Rep., **59**: 1103–1116, 1975.

[123] WALLE T., [w] Polyamines in normal and neoplastic growth p. 355, Russell D. H. (ed.) Raven Press, Inc. New York, 1973.

[124] WILLIAMS - ASHMAN H. G., JÄNNE J., COPPOC G. L., GEROCH M. E., SCHENONE A., New aspects of polyamine biosynthesis in eukaryotic organisms, Advan. Enzyme Regul., **10**: 225–245, 1972.

[125] WILLIAMS - ASHMAN H. G., SCHENONE A., Methyl glioxal - bis (guanylhydrazone) as a potent inhibitor of mammalian and yeast S - adenosylmenthionine decarboxylases, Biochem. Biophys. Res. Commun., **46**: 288–295, 1972.

[126] WOLSKA - MITASZKO B., Rola poliamin w syntezie białka, Post. Biochem., **23**: 399–415, 1977.

[127] YOSHIDA S., MASAKI S., ANDO T., Effects of polyamines on in vitro DNA synthesis by DNA polymerases from calf thymus, J. Biochem. (Tokyo), **79**: 895–901, 1976.

Otrzymano: 7 lipca 1978.
Przyjęto: 13 listopada 1978.

Adres autorów: ul. Mickiewicza 2c, 15 - 230 Białystok.

http://rcin.org.pl

http://rcin.org.pl

POSTĘPY BIOLOGII KOMÓRKI TOM 6, NR 2, 1979 (79–97)

NATURALNA CYTOTOKSYCZNOŚĆ KOMÓRKOWA

NATURAL CELL - MEDIATED CYTOTOXICITY

Marek JAKÓBISIAK

Zakład Transplantologii, Instytut Biostruktury Akademii Medycznej w Warszawie

Streszczenie. U człowieka, myszy, szczura i świnki morskiej stwierdza się obecność naturalnych komórek cytotoksycznych (NKC) zdolnych bez uprzedniego uczulenia do wywierania efektu cytotoksycznego in vitro w stosunku do izo-, allo- i ksenogenicznych komórek nowotworowych, a także w stosunku do niektórych komórek nienowotworowych. NKC mają wygląd limfocyta, posiadają receptory dla fragmentu Fc przeciwciał i mogą posiadać receptory dla składnika C3 dopełniacza. Sugerowany jest udział NKC w oporności przeciwnowotworowej in vivo.

Summary. Natural killer cells (NKC) present in man, mice, rat, and guinea-pig are capable without previous immunization to exert cytotoxic activity against iso-. allo-. and xenogeneic tumor cells, and against some non-tumor target cells. NKC have an appearance of lymphocyte, bear Fc receptors, and may have C3 receptors. Their participation in tumor resistance in vivo is suggested.

Wykaz stosowanych skrótów

Aktywność NKC — aktywnść naturalnych komórek cytotoksycznych
BCG — Bacille Calmette-Guérin
NKC — naturalne komórki cytotoksyczne

Jednym z centralnych zjawisk w immunologii jest cytotoksyczność limfocytów, w której limfocyty: a) pochodzące od swoiście uczulonych dawców, b) stymulowane nieswoiście mitogenami, c) za pośrednictwem swoistych przeciwciał, wywierają efekt cytotoksyczny w stosunku do komórek docelowych. Okazało się jednak, że cytotoksyczność limfocytów można obserwować także i wtedy, kiedy nie jest spełniony żaden z wymienionych warunków.

http://rcin.org.pl

W trakcie badania in vitro reaktywności cytotoksycznej limfocytów od osobników z rozwijającym się nowotworem w stosunku do komórek tego nowotworu nieoczekiwanie stwierdzono, że reaktywność taką posiadają również limfocyty pochodzące od osobników zdrowych [65, 66, 88, 92]. Przyjęto kilka terminów dla określenia tego zjawiska: naturalna (spontaniczna) cytotoksyczność komórkowa, naturalna (spontaniczna) cytotoksyczność limfocytów. Komórki odpowiedzialne za tę cytotoksyczność określono jako naturalne komórki cytotoksyczne (NKC). W odniesieniu do tego zjawiska należy unikać używania terminu — naturalna cytotoksyczność, gdyż w tym ostatnim pojęciu mieści się również — naturalna cytotoksyczność typu humoralnego uwarunkowana obecnością w surowicy zdrowych osobników przeciwciał humoralnych skierowanych przeciw komórkom nowotworowym. Dlatego w niniejszym opracowaniu będzie się używać dla określenia tego zjawiska terminu — aktywność NKC. Należy zaznaczyć, że niezależnie od NKC naturalną cytotoksyczność wykazywać mogą również makrofagi, który to temat nie będzie omówiony w tym artykule.

NKC to komórki pochodzące od zdrowych osobników zdolne do wywierania efektu cytotoksycznego in vitro w stosunku do komórek docelowych bez uprzedniego uczulenia przeciw tym komórkom. Nie wyklucza to oczywiście obecności NKC u osobników z rozwijającym się nowotworem, ale w tym przypadku należy odróżnić aktywność NKC od cytotoksyczności rozwijającej się w odpowiedzi na komórki nowotworu, a takie odróżnienie, choć możliwe [89], sprawia niekiedy trudności. W związku z tym, w niniejszym opracowaniu omówiona będzie przede wszystkim aktywność NKC występująca u osobników zdrowych, nie mających zmian nowotworowych.

Aktywność NKC nie wydaje się artefaktem. Stwierdza się ją bez względu na metodę użytą do izolacji komórek efektorowych [36], w różnych środowiskach hodowlanych, z dodatkiem surowicy kseno-, allo- i autogenicznej, a nawet w środowisku pozbawionym surowicy [19, 36, 79].

WYSTĘPOWANIE NKC

NKC wykryto dotychczas u człowieka [10, 12, 14, 15, 57, 68–70, 72, 76, 93, 100], myszy [27, 29, 43, 44, 59, 84, 97], szczura [58, 61, 62, 85, 86] i świnki morskiej [3].

Naturalną cytotoksyczność komórkową wykazują: a) limfocyty krwi obwodowej u człowieka [10, 12, 14, 15, 57, 68–70, 72, 76, 93, 100], myszy [6, 29], szczura [58, 61, 62, 86] i świnki morskiej [3], b) splenocyty u człowieka [57], myszy [27, 29, 43, 44, 59, 84, 97], szczura [58, 61, 62,

http://rcin.org.pl

85, 86] i świnki morskiej [3], c) komórki węzłów chłonnych u człowieka [14] i myszy [29, 43, 97], a w węzłach chłonnych szczura cytotoksyczność ta jest niska [61, 86], d) komórki kępek Peyera (Kamiński i wsp. — praca w przygotowaniu). Niską aktywność NKC wykazują komórki wysięku z jamy otrzewnej myszy [29] i szczura [58, 61]. Obecność NKC w migdałkach człowieka sugerowana przez jednych [14] jest negowana przez innych badaczy [57, 69]. W szpiku szczura stwierdzono brak NKC [36], natomiast u myszy [29, 43] i świnki morskiej [3] obserwowano niską aktywność tych komórek. Brak NKC stwierdzono w grasicy zarówno u człowieka [69], myszy [29, 43, 97] i świnki morskiej [3], jak i u szczura [61, 86]. Niektórzy badacze stwierdzają jednak w grasicy szczura niską aktywność NKC [58]. Nie znaleziono NKC wśród komórek pochodzących z drenażu przewodu limfatycznego piersiowego u szczura [61, 86]. Niska aktywność NKC w niektórych narządach może być uwarunkowana: a) niską zawartością NKC, b) obecnością NKC o niskiej aktywności, c) hamowaniem naturalnej cytotoksyczności komórkowej przez pewne mechanizmy supresyjne. Stwierdzana przez niektórych badaczy heterogenność NKC [75, 98], a także istnienie komórek supresyjnych w stosunku do NKC [69, 83] nie pozwalają, na podstawie dotychczasowych badań, na wykluczenie żadnej z wymienionych możliwości.

U myszy i szczurów aktywność NKC nie jest obserwowana u noworodków, pojawia się między 1–3 tygodniem życia, osiąga szczyt aktywności między 5–8 tygodniem życia, a następnie obniża się [29, 58]. Dlatego u zwierząt starszych aktywność NKC jest niska lub jest ona niewykrywalna [29, 58, 86]. U człowieka natomiast nie stwierdzono dotychczas zależności aktywności NKC od wieku, płci, rasy czy wykonywanego zajęcia [64]. NKC stwierdza się również u myszy i szczurów hodowanych bez dostępu mikroorganizmów (germ free) [29, 58, 86].

WYKRYWANIE NKC

Należy pamiętać, że zjawisko naturalnej cytotoksyczności komórkowej jest wykrywane dotychczas wyłącznie in vitro. Do wykrywania aktywności NKC używa się najczęściej testu cytotoksyczności typu komórkowego z komórkami docelowymi znakowanymi chromem ^{51}Cr [6, 36, 47, 58, 79, 86]. Czas inkubacji komórek efektorowych i docelowych stosowany przez różnych autorów dla badania tego zjawiska waha się od 4 [29, 58, 59, 61, 79, 86] do kilkunastu [6, 10, 43, 68, 72] godzin, choć aktywności NKC można wykryć już w ciągu pierwszych minut od rozpoczęcia inkubacji [36]. Prędkość z jaką rozwija się reakcja cyto-

http://rcin.org.pl

toksyczna nasuwa analogię do cytotoksyczności hyperimmunizowanych limfocytów T [53].

Aktywność NKC wykrywa się również w teście uwalniania z komórek docelowych trytowanej proliny [64], znakowanych węglem ^{14}C aminokwasów [69], a także w teście mikrocytotoksycznym [12, 24, 40, 91, 93]. Stosując test mikrocytotoksyczny lub inne testy wymagające długiego okresu inkubacji trzeba pamiętać, że naturalna cytotoksyczność typu komórkowego zmienia się w czasie inkubacji NKC in vitro [48, 67, 86]. Ponadto w testach trwających kilka dni może rozwinąć się odpowiedź immunologiczna, w wyniku której powstają cytotoksyczne limfocyty T. Dla wykazania aktywności NKC wymagany jest odpowiednio wysoki stosunek liczbowy komórek efektorowych do docelowych. Najczęściej stosunek ten waha się od 10:1 do 200:1, choć już przy stosunku 5:1 cytotoksyczność ta ujawnia się [6, 69]. Przygotowując komórki efektorowe do eksperymentu należy pamiętać, że pewne metody izolacji komórek mogą wpływać na aktywność NKC [64].

KOMÓRKI DOCELOWE DLA NKC

Stwierdzono występowanie aktywności NKC przeciw komórkom nowotworowym ksenogenicznym [21, 76], allogenicznym [11, 12, 24, 29, 44, 59, 61, 68, 70, 79, 84, 91, 100] i syngenicznym [28, 29, 58, 61, 62, 86], w tym przeciw nowotworom indukowanym chemicznie [44, 45, 59], przy użyciu wirusów onkogennych [27, 44, 46, 58, 59, 86], promieniowania jonizującego [59, 84], a także przeciw komórkom nowotworów powstałych spontanicznie [12, 24, 31, 36, 40, 46, 64, 70, 72, 79, 89, 90, 91, 100]. Aktywność NKC jest wyższa przeciw allo - niż przeciw ksenogenicznym komórkom docelowym [23a]. Wśród nowotworowych komórek docelowych dla NKC nie wymienia się komórek autogenicznych nie dlatego, że NKC nie występują w takim układzie, ale dlatego, że stwierdzenie ich obecności wymaga w przeprowadzonych testach wykluczenia lub oddzielenia mechanizmów swoistej cytotoksyczności powstałej w wyniku odpowiedzi immunologicznej rozwijającej się przeciw komórkom nowotworowym [89]

Aktywność NKC wydaje się być wyższa przeciw liniom komórek nowotworowych długo hodowanym in vitro niż przeciw świeżo wyizolowanym komórkom nowotworowym [11, 12], jest także wyższa przeciw komórkom nowotworowym pasażowanym in vitro w porównaniu z komórkami pasażowanymi in vivo [59, 84, 86]. Nie wszystkie badania zgodne są jednak z tą ostatnią obserwacją [29].

Aktywność NKC wykrywa się również przeciw pochodzącym od

http://rcin.org.pl

zdrowych dawców allogenicznym komórkom limfoidalnym [79], autogenicznym ustalonym liniom komórkowym [79], auto- i allogenicznym fibroblastom [69, 93] pochodzącym z krótkotrwałych hodowli in vitro. Należy zaznaczyć, że aktywność NKC jest wyższa przeciw komórkom nowotworowym niż przeciw komórkom normalnym [79]. U myszy niską aktywność NKC stwierdzono również przeciw syngenicznym i allogenicznym tymocytom, syngenicznym komórkom szpiku oraz przeciw syngenicznym i allogenicznym makrofagom pochodzącym z 24-godzinnej hodowli in vitro [59].

Nie znane są dotychczas antygeny powierzchniowe, przeciw którym skierowana jest aktywność NKC. Ponieważ szczególnie wysoki jej poziom obserwuje się przeciw nowotworom indukowanym przy użyciu wirusów onkogennych, istnieje hipoteza, że NKC u gryzoni rozpoznają antygeny związane z ekspresją endogennych wirusów typu C [29, 58, 86]. Trudno jest udowodnić czy obalić taką hipotezę, gdyż brak jest szczepów myszy czy wyprowadzonych z nich linii komórkowych, co do których istniałaby pewność, że są wolne od obecności wspomnianych wirusów. Do argumentów przemawiających przeciw tej hipotezie należy brak wzrostu aktywności NKC u myszy po superinfekcji komórek docelowych wirusami typu C [41]. Nie ma również korelacji między wrażliwością komórek docelowych na atak NKC z jednej strony i przeciwciał przeciw wirusom typu C z drugiej strony [5]. Wyklucza się, aby antygeny docelowe dla NKC były związane z mikoplazmą [79].

CHARAKTERYSTYKA NKC

NKC wyglądem przypominają limfocyta [43]. Wyniki badań markerów powierzchniowych świadczą o tym, że NKC mają receptor dla fragmentu Fc przeciwciał. Stwierdzono to w stosunku do NKC u ludzi [15, 31, 36, 48, 57, 68, 69, 72, 75, 93, 100] i u gryzoni [26, 61]. Chodzi tu o receptor dla fragmentu Fc IgG [26, 39, 61, 72]. Istnieją jednak również doniesienia sugerujące brak tego receptora na powierzchni NKC u myszy [27] i szczurów [85]. Na tej podstawie można sądzić, że populacja NKC u gryzoni jest niejednorodna, jeżeli chodzi o obecność tego receptora, podobnie jak to ma miejsce w przypadku receptora dla składnika C3 dopełniacza albo jest to spowodowane trudnościami przy jego identyfikacji. Tę ostatnią interpretację sugeruje grupa badaczy z Laboratorium Immunodiagnostyki Narodowego Instytutu Raka w Bethesda tłumacząc fakt, że początkowo opisali NKC u szczura jako nie posiadające Fc receptora [58], a następnie jako posiadające ten receptor [61]. Jeszcze mniej jednoznacznie przedstawia się problem obecności recepto-

http://rcin.org.pl

ra dla dopełniacza, NKC gryzoni wydają się go nie posiadać [27, 45, 58]. U ludzi wielu badaczy stwierdziło obecność na powierzchni NKC receptora dla składnika C3 dopełniacza [36, 69, 72, 76, 89], natomiast inni receptorów dla dopełniacza nie stwierdzają [15, 31, 48, 68, 100]. Późniejsze prace wydają się wyjaśniać tę sprzeczność, gdyż ich autorzy stwierdzają, że wśród NKC występują komórki zarówno posiadające, jak i nie posiadające receptora dla składnika C3 dopełniacza [75, 98]. Brak niestety bliższej charakterystyki receptora dla składników dopełniacza na NKC. Określenie czy jest to receptor CR1 (dla fragmentów C4b - C3b), czy CR2 (dla fragmentu C3d) mogłoby pomóc w określeniu dróg różnicowania NKC, gdyż wiadomo, że CR2 i CR1 pojawiają się sukcesywnie w trakcie różnicowania się komórek i wtórnie w stosunku do receptora dla Fc immunoglobulin klasy IgG. Dotyczy to zarówno granulocytów obojętnochłonnych, jak i limfocytów [80, 81].

NKC różnicują się z komórek szpiku [22] i zależą w związku z tym od normalnego funkcjonowania tego narządu [22, 23]. Aktywność NKC u myszy naświetlonej i repopulowanej komórkami szpiku zależy od aktywności NKC u dawcy szpiku [22]. NKC nie można utożsamić ani z dojrzałymi limfocytami B, ani T [69]. Przeciw ich identyfikacji z limfccytami B przemawia fakt, że według większości badaczy nie posiadają one receptorów immunoglobulinowych na swej powierzchni [27, 43, 57, 68, 85, 99], choć istnieją również doniesienia świadczące o obecności immunoglobulin na NKC [36, 72], a także sugestie, że pewna subpopulacja NKC posiada receptory immunoglobulinowe. Stwierdzono mianowicie, że u ludzi NKC z krwi obwodowej posiadają, a NKC wyizolowane z migdałków i węzłów chłonnych nie posiadają receptorów immunoglobulinowych [15]. W jednej z prac stwierdzono obecność antygenów charakterystycznych dla limfocytów B na ludzkich NKC [50]. Gaza nylonowa, która zatrzymuje limfocyty B (Ig - dodatnie), nie zatrzymuje jednak NKC [45, 58, 59, 84]. W związku z tym obserwowano nawet wzrost aktywności NKC po przepuszczeniu komórek efektorowych przez kolumnę opłaszczoną przeciwciałami przeciw immunoglobulinom [47] lub przez warstwę gazy nylonowej [6, 27]. NKC nie reagują z surowicami skierowanymi przeciw limfocytom T mysim [27, 43, 45, 47, 59, 97, 99] ani szczurzym [58, 85], a u człowieka nie tworzą spontanicznych rozetek z erytrocytami barana [15, 31, 36, 48, 68, 69, 72, 76]. Izolowane limfocyty T nie wykazują aktywności NKC [76]. Niektórzy badacze sugerują jednak, że NKC mają na swej powierzchni antygeny charakterystyczne dla limfocytów T [26a, 38] oraz receptory o niskiej gęstości lub słabej chwytliwości dla erytrocytów barana, co utrudnia ujawnienie tych receptorów [99, 100]. Te ostatnie, a także inne obserwacje skłaniają niektórych badaczy do przypuszczeń, że NKC są prekursorami

http://rcin.org.pl

limfocytów T [38, 45, 61] lub pobudzonymi limfocytami T [31]. Badacze próbujący utożsamić NKC z prekursorami limfocytów T sugerują, że jako komórki o receptorach dla fragmentu Fc IgG mogą należeć one do subpopulacji supresyjnych limfocytów T [38]. Na marginesie tej dyskusji warto zwrócić uwagę na fakt, że NKC pojawiają się tylko w pewnym okresie życia zwierzęcia i że u myszy nagich, nie posiadających grasicy, u których w związku z tym różnicowanie się prekursorów w kierunku dojrzałych limfocytów T jest zaburzone, aktywność NKC jest istotnie wyższa w porównaniu z myszami posiadającymi grasicę [8, 28]. Zakładając, że hipoteza identyfikująca NKC z prekursorami limfocytów T jest słuszna, zjawisko to można by wytłumaczyć powiększeniem się puli prekursorów w związku z niemożnością ich różnicowania w kierunku limfocytów T u myszy nagich. Mogłoby to tłumaczyć niezrozumiały z punktu widzenia hipotezy nadzoru immunologicznego fakt niskiej zapadalności na spontaniczne nowotwory myszy nagich [82]. Jest rzeczą znaną, że supresyjne i cytotoksyczne limfocyty T posiadające antygeny Ly 2,3, podobnie jak pomocnicze limfocyty T posiadające antygeny Ly 1 [9], różnicują się z prekursorów o fenotypie Ly 1,2,3 [35]. Z kolei cytotoksyczność przeciw nowotworom izogenicznym wydaje się zależeć od limfocytów posiadających antygeny Ly 1,2,3 w odróżnieniu od innych limfocytów cytotoksycznych [87]. Można na razie tylko przypuszczać, że aktywność NKC zależna jest od obecności pewnych form limfocytów, które z wiekiem ulegają dalszemu różnicowaniu, z czym wiąże się ich brak u zwierząt starszych [29, 58, 86] i równoległy wzrost zapadalności na nowotwory. Brak dokładnej i jednoznacznej charakterystyki receptorów i antygenów powierzchniowych NKC uniemożliwia na razie rozstrzygnięcie tego problemu. Należy zaznaczyć, że istnieją próby identyfikacji antygenu powierzchniowego swoistego dla NKC u myszy [17].

Przypuszczenie, że za aktywność NKC u zwierząt młodych odpowiedzialna jest pewna subpopulacja komórek, które następnie różnicują się dalej i nie są już obserwowane w wieku późniejszym, wydaje się tylko pozornie paradoksalne. O ile bowiem odporność przeciwnowotworowa zwierząt w wieku reprodukcyjnym może utrwalać się w wyniku doboru naturalnego, o tyle nie odnosi się to w takim stopniu do zwierząt starszych wychodzących z wieku reprodukcyjnego.

NKC nie wykazują własności żernych [27, 28, 31, 36, 43, 47, 58, 72, 76, 85, 99] i nie przylegają do plastyku [10, 72, 99] ani do szkła [84, 99].

Obecność na powierzchni NKC receptorów dla Fc przeciwciał i brak receptorów immunoglobulinowych skłania niektórych badaczy do przypuszczeń, że NKC są identyczne z komórkami K. Nie znaczy to bynajmniej, że aktywność NKC jest identyczna z typową dla komórek K cytotoksycznością komórkową uwarunkowaną przez przeciwciała. Me-

http://rcin.org.pl

chanizm efektu cytotoksycznego NKC jest bowiem dotychczas niewyjaśniony.

W trakcie przebiegu badania NKC obserwuje się skupianie komórek efektorowych wokół komórek docelowych [36]. Odwirowanie komórek przed inkubacją wzmaga efekt cytotoksyczny [10]. Obserwacje te wskazują, że aktywność NKC wymaga ścisłego kontaktu między komórkami efektorowymi i docelowymi. Przy tej okazji należy wspomnieć, że same błony komórkowe również mogą ujawniać własności cytotoksyczne [37]. Sugestie, że za efekt NKC odpowiedzialna jest limfotoksyna [71] nie znajdują potwierdzenia w innych pracach, w których opisano brak aktywności cytotoksycznej w supernatantach pochodzących z inkubacji komórek efektorowych z komórkami docelowymi [10].

CZYNNIKI WPŁYWAJĄCE NA AKTYWNOŚĆ NKC

Aktywność NKC hamowana jest m.in. przez: aktynomycynę D, cytochalazynę B, cAMP, cyclophosphamid, konkanawalinę A, kortykosterydy i azydek sodu [32, 36, 58, 60, 79]. Traktowanie trypsyną komórek efektorowych obniża [36, 45, 60, 72], natomiast traktowanie neuraminidazą nie ma wpływu [36, 60] na aktywność NKC. W jednej z prac sugerowano brak wrażliwości NKC na traktowanie trypsyną [27]. W pracy tej jednak stosowano krótki (20 minut) czas inkubacji w przeciwieństwie do dłuższego okresu (45 minut) stosowanego w tym celu przez innych autorów [45]. Aby aktywność NKC mogła zajść, wymagana jest w środowisku obecność jonów wapnia i magnezu [36]. Obniżoną aktywność NKC obserwuje się w chorobach z niedoboru immunologicznego [69, 79].

Aktywność NKC stymulowana jest u szczura i u myszy przez podanie BCG [62, 101], zakażenie pewnymi wirusami lub podawanie kwasu poliinozyno - policytydylowego (poli I:C) [28, 62, 99]. Również iniekcja komórek nowotworowych powoduje nieswoiście wzrost aktywności NKC [28, 94]. Stymulację aktywności NKC przez podanie komórek nowotworowych obserwuje się w ciągu 3 dni i po następnych kilku dniach wraca ona do normy, a nawet spada poniżej normy [28]. Ponieważ interferon również okazał się silnym stymulatorem aktywności NKC [16, 94, 96a] i dynamika wzrostu cytotoksyczności jest bardzo podobna do obserwowanej po podaniu komórek nowotworowych, jest bardzo prawdopodobne, że w tym ostatnim przypadku mechanizm pobudzenia aktywności NKC zależy od uwalniania interferonu. Wiadomo, że interferon uwalniany jest m.in. również w wyniku kontaktu limfocytów z komórkami nowotworowymi [95, 96, 96a]. Można przypuszczać, że stymulujące NKC

http://rcin.org.pl

własności poli I:C i BCG zależą również od uwalniania interferonu. W przypadku badania aktywności NKC w teście 18-godzinnym przeciw komórkom docelowym indukującym uwalnianie interferonu przez limfocyty, 80-90% cytotoksyczności wydaje się zależeć od stymulujących własności interferonu [96a]. Stymulując aktywność NKC interferon wydaje się równocześnie chronić przed tą cytotoksycznością komórki normalne, a nie chroni komórek nowotworowych lub transformowanych wirusem. Ochronny wpływ interferonu w stosunku do normalnych komórek docelowych odnosi się tylko do aktywności NKC, a nie do cytotoksyczności swoiście uczulonych limfocytów T [94]. Badania te wymagają potwierdzenia, gdyż stymulujący cytotoksyczność komórkową wpływ interferonu jest od dawna poznany, natomiast na temat jego wpływu na komórki nowotworowe nie osiągnięto jeszcze zgodnej opinii [13].

Jeżeli chodzi o *Corynebacterium parvum*, to istnieje doniesienie świadczące zarówno o jego pobudzającym [62], jak i hamującym [83] wpływie na aktywność NKC, co może zależeć m.in. od drogi podania tych migroorganizmów zwierzęciu [63].

NKC wydają się względnie oporne na promieniowanie [33, 42, 85, 99] i aktywność NKC może być nawet stymulowana przez naświetlanie dawkami w zakresie 500-1000 R [33]. Stymulacja ta wydaje się zależeć od względnego zagęszczenia NKC wśród badanych komórek w związku z utratą komórek wrażliwych na promieniowanie [33, 42]. Dopiero wyższe dawki hamują aktywność NKC, lecz nawet naświetlenie komórek efektorowych dawką 15000 R zmniejsza cytotoksyczność tylko o około połowę [79]. W badaniach tych określano aktywność NKC bezpośrednio po napromienieniu dawcy komórek efektorowych (splenocytów) lub komórek in vitro. Badania, które śledziły aktywność NKC w różnym czasie po napromienieniu myszy dawką 700 R, wykazały, że po około 12 dniach spada ona i pozostaje na niskim poziomie aż do 28 dnia, aby ponownie powoli wrócić do około 80% poziomu wyjściowego po 41-59 dniach [33]. Skłania to do wniosku, że w przeciwieństwie do dojrzałych NKC, ich prekursory są wrażliwe na promieniowanie.

Nie ma jednomyślności co do wpływu przechowywania komórek efektorowych w różnych temperaturach na aktywność NKC. Przechowywanie w temperaturze 4°C według jednych badań nie ma wpływu na NKC [27, 64], według innych natomiast obniża aktywność NKC w przypadku inkubacji 48-godzinnej [79]. Podobnie przechowywanie w temperaturze pokojowej pozostaje bez wpływu [64], obniża [48] lub podwyższa ich aktywności [51]. Według różnych doniesień preinkubacja NKC w temperaturze 37°C obniża [27, 64], nie wpływa [36, 48], nawet

http://rcin.org.pl

w przypadku inkubacji 48-godzinnej [36], lub stymuluje aktywność NKC [86]. Powodem tych rozbieżności mogą być: niejednorodność populacji NKC, różnice w składzie stosowanych środowisk hodowlanych, a z drugiej strony różnice we wrażliwości komórek docelowych na atak nabywające cytotoksyczność spontanicznie w wyniku hodowli in vitro nie są identyczne [93a].

Obserwuje się uwarunkowane genetycznie różnice dotyczące aktywności NKC między różnymi szczepami myszy [29, 44, 46, 61, 73, 84], a z drugiej strony różnice we wrażliwości komórek docelowych na atak NKC [29]. Według większości badaczy aktywność NKC bardzo różni się między komórkami efektorowymi pochodzącymi od różnych osobników tego samego gatunku [70, 76], nawet jeżeli badana jest w różnym czasie u tego samego zwierzęcia przeciw tym samym komórkom docelowym [24, 29, 79]. Jest ona także różna u myszy identycznych co do wieku, szczepu i płci badanych w jednym eksperymencie przeciw tym samym komórkom docelowym [58]. Istnieją sugestie, że przyczyną zmiennej aktywności NKC, badanej w różnym czasie u tego samego osobnika, jest brak zachowania identycznych warunków, szczególnie temperatury, w której przygotowywane i przechowywane są komórki efektorowe, a także zmieniająca się w kolejnych pasażach wrażliwość komórek docelowych [51]. Aktywność NKC, mierzona u tych samych osobników przy zachowaniu identycznych warunków, nie zmieniała się nawet w ciągu wielu miesięcy [51]. Różnice aktywności NKC u ludzi nie wydają się być, jak wspomniano, zależne od płci, wieku, rasy czy wykonywanego zawodu [64]. Należy jednak zaznaczyć, że u ludzi do trzydziestego roku życia stwierdza się zależną od płci różnicę aktywności NKC przeciw fibroblastom płodowym. Była ona wyższa u mężczyzn niż u kobiet [93]. Różnicy takiej nie obserwowano natomiast u ludzi starszych [93]. Różnice aktywności NKC związane z płcią obserwowano również u myszy [84].

Wydaje się, że in vivo NKC podlegają mechanizmom regulującym. We krwi obwodowej człowieka obecne są komórki hamujące aktywność NKC [69]. Usunięcie spośród krwinek jądrzastych krwi ludzkiej komórek mających własności żerne i przylegających do powierzchni plastyku podnosi aktywność NKC [31, 72]. Splenocyty 9-13-dniowych myszy hamują aktywność NKC splenocytów od myszy dorosłych [83]. Istnienie mechanizmów regulujących jest tym bardziej zrozumiałe, że jak wiadomo aktywność NKC stwierdza się nawet przeciw autogenicznym komórkom docelowym [69, 93].

Wykazano, że u myszy aktywność NKC przeciw komórkom nowotworu allogenicznego spada wraz z rozwojem nowotworu, aby wrócić do normy po regresji nowotworu [6]. W pracy tej nie stwierdzono za-

http://rcin.org.pl

leżności tego efektu od działania komórek supresyjnych. W innych badaniach nie wykryto istotnych różnic dotyczących aktywności NKC między osobnikami zdrowymi i chorymi z rozwijającym się czerniakiem przeciw hodowanym in vitro komórkom tego nowotworu [70, 72]. W tych ostatnich badaniach nie można było jednak wykluczyć nakładania się swoistej cytotoksyczności zależnej od limfocytów T na naturalną cytotoksyczność typu komórkowego, która mogłaby być faktycznie niższa u chorych w porównaniu z osobnikami zdrowymi.

PROPONOWANY MECHANIZM I ZNACZENIE NKC

Aktywność NKC jest prawdopodobnie tylko fragmentem szerszego zjawiska naturalnej cytotoksyczności, która obejmuje również naturalna cytotoksyczność typu humoralnego. Na kilka lat przed opisaniem NKC znane były obserwacje świadczące o obecności u nie uczulonych zwierząt przeciwciał humoralnych skierowanych przeciw allogenicznym i syngenicznym komórkom nowotworowym [2, 7, 25, 54, 55]. W związku z tymi obserwacjami powstaje pytanie, czy u podłoża NKC nie leżą naturalne przeciwciała cytotoksyczne. Zagadnienie to dyskutowane było wielokrotnie i choć niektórzy badacze wypowiadają się za taką ewentualnością [49, 50, 68] i utożsamiają aktywność NKC z cytotoksycznością komórkową zależną od przeciwciał [1, 50, 68, 72, 89], wiele jednak prac wydaje się wykluczać udział przeciwciał humoralnych w aktywności NKC [4, 10, 27, 57, 79, 96a]. Istnieją też sugestie, że mechanizm cytotoksyczności jest w obydwu przypadkach bardzo podobny, a jedyna różnica polega na tym, że w aktywności NKC przeciwciała lokują się pierwotnie na komórkach efektorowych (za pośrednictwem receptora dla fragmentu Fc przeciwciał), a w przypadku cytotoksyczności komórkowej uwarunkowanej przez przeciwciała opłaszczają komórkę docelową [49]. Wiadomo skądinąd, że cytotoksyczność komórkowa zależna od przeciwciał wymaga uczestnictwa bardzo niewielkiej ilości immunoglobulin [56].

Istnieje spór, w którym jedni badacze porównują lub nawet identyfikują NKC z komórkami K [49, 68], inni zaś uważają, że te dwa typy komórek wyraźnie się od siebie różnią [6, 27, 45]. Spór ten trudno obecnie rozstrzygnąć z dwóch powodów. Z jednej strony, w kilku przypadkach, o których już wspomniano w niniejszym opracowaniu, nie osiągnięto jednomyślności przy określaniu markerów powierzchniowych NKC. Z drugiej strony, pojęcie: „komórka K" jest wieloznaczne i używane jest w różnych pracach w odmiennym znaczeniu: a) jako komórka cytotoksyczna (killer cell) i w tym pojęciu mieszczą się wszystkie komórki zdolne do wywierania efektu cytotoksycznego bez względu na

http://rcin.org.pl

mechanizm tego efektu [30], b) w nieco węższym znaczeniu jako komórka posiadająca receptor dla fragmentu Fc immunoglobulin i zdolna do cytotoksyczności komórkowej zależnej od przeciwciał [78], c) jako limfocyt nie mający cech ani B, ani T limfocytu, lecz posiadający receptor dla fragmentu Fc immunoglobulin i zdolny do cytotoksyczności komórkowej zależnej od przeciwciał [68].

Zaobserwowano korelację i podobieństwo między aktywnością NKC i tzw. opornością hybryd [42, 83] polegającą na tym, że proliferacja komórek szpiku rodzicielskiego hamowana jest w organizmie „hybrydy" w porównaniu z nie zaburzoną proliferacją szpiku izogenicznego. Zarówno oporność hybryd, jak i aktywność NKC pojawiają się u myszy około czwartego tygodnia życia, są mało wrażliwe na naświetlanie promieniami jonizującymi i zależne od prawidłowego funkcjonowania szpiku kostnego [42]. Obserwuje się jednak również różnice, jak np. różną wrażliwość na podanie hydrokortyzonu [32]. Niestety podobieństwo między tymi dwoma zjawiskami niewiele wnosi do poznania aktywności NKC, gdyż mechanizm oporności hybryd nie jest również poznany do końca.

U myszy, u których, jak wspomniano, występują różnice aktywności NKC między różnymi szczepami, obserwuje się korelację między aktywnością NKC in vitro i opornością przeciw danemu przeszczepialnemu nowotworowi in vivo [20, 46, 47]. Wykazano również, że zawierające NKC normalne nie uczulone splenocyty, zmieszane z komórkami nowotworu, hamują wzrost przeszczepionego nowotworu in vivo zarówno u myszy [47], jak i u szczura [86]. Istnieją jednak wcześniejsze doniesienia sugerujące, że podane w ten sposób splenocyty mogą stymulować wzrost nowotworu in vivo [74]. Być może, że u podłoża tych rozbieżności leży różny wiek dawców splenocytów. Wykazano bowiem, że splenocyty zmieszane z komórkami nowotworu mogą hamować lub stymulować jego wzrost in vivo w zależności od tego czy pochodzą od młodych, czy od starych dawców [18]. Efekt przeciwnowotworowy wykazano również wtedy, gdy splenocyty podawano myszom w oddzielnej dawce nawet 24 godziny po podaniu komórek nowotworowych [34]. Przeciwnowotworowy efekt normalnych splenocytów mysich in vivo wykazano również w innych doświadczeniach przy okazji badania efektu przeciwnowotworowego komórek uczulonych [52] lub swoistych przeciwciał współdziałających z komórkami [77]. Cytowane badania sugerują udział NKC w oporności przeciwnowotworowej in vivo. Z drugiej strony, u pacjentów z rozwijającym się nowotworem nie znaleziono korelacji między aktywnością NKC badaną we krwi obwodowej i węzłach chłonnych z jednej strony, a wielkością nowotworu lub jego zdolnością do tworzenia przerzutów z drugiej strony [14].

http://rcin.org.pl

Należy pamiętać, że aktywność NKC obserwowana jest in vitro tylko przy wysokim stosunku komórek efektorowych do docelowych, co powinno skłaniać do ostrożności w przypisywaniu jej dużego znaczenia in vivo, gdzie tak duży nadmiar NKC w stosunku do komórek nowotworu może być trudny do osiągnięcia.

LITERATURA

[1] AKIRA D., TAKASUGI M., Loss of specific natural cell - mediated cytotoxicity with absorption of natural antibodies from serum. Int. J. Cancer, **19**: 747–755, 1977.

[2] AOKI T., BOYSE E. A., OLD L. J., Occurrence of natural antibody to the G (Goss) leukemia antigen in mice, Cancer Res., **26**: 1415–1419, 1966.

[3] ARNAUD - BATTANDIER F., BUNDY B. M., NELSON D. L., Natural killer cells in guinea - pig spleen bear Fc receptors, Europ., J. Immunol., **8**: 400–406, 1978.

[4] ASJÖ B., KIESSLING R., KLEIN G., POVEY S., Genetic variation in antibody response and natural killer cell activity against a Moloney virus - induced lymphoma (YAC), Europ. J. Immunol., **8**: 554–558, 1977.

[5] BECKER S., FENYÖ E. M., KLEIN E., The "natural killer" cell in the mouse does not require H - 2 homology and is not directed against type or group - specific antigens of murine C viral proteins, Europ. J. Immunol., **6**: 882–885, 1976.

[6] BECKER S., KLEIN E., Decreased "natural killer" effect in tumo - bearing mice and its relation to the immunity against oncorna virus - determined cell surface antigens, Europ. J. Immunol., **6**: 892–898, 1976.

[7] BRUNDA M. J., MINDEN P., Antibodies to bacterial and tumor - derived antigens in sera from normal guinea - pigs, J. Immunol., **119**: 1374–1377, 1977.

[8] BURTON R. C., GRALL D., WARNER N. L., Natural cytotoxicity of hemopoietic cell populations against murine lymphoid tumours, Br. J. Cancer, **37**: 806–817, 1978.

[9] CANTOR H., BOYSE E. A., Lymphocytes as models for the study of mammalian cellular differentiation, Immunol. Rev., **33**: 105–124, 1977.

[10] COOPER S. M., HIRSEN D. J., FRIOU G. J., Spontaneous cell - mediated cytotoxicity against Chang cells by nonadherent, non - thymus - derived, Fc receptor - bearing lymphocytes, Cell Immunol., **32**: 135–145, 1977.

[11] de VRIES J. E., CORNAIN S., RÜMKE P., Cytotixicity of non - T versus T - lymphocytes from melanoma patients and healthy donors on short - and long - term cultured melanoma cells, Inst. J. Cancer, **14**: 427–434, 1974.

[12] de VRIES J. E., RÜMKE P., Tumour - associated lymphocyte cytotoxicity superimposed on "spontaneous" cytotoxicity in melanoma patients, Int. J. Cancer, **17**: 182–190, 1976.

[13] DOWJAT W. K., Interferon i nowotory, Post. Mikrobiol., **16**: 45–60, 1977.

[14] EREMIN O., ASHBY J., STEPHENS J. P., Human natural cytotoxicity in the blood and lymphoid organs of healthy donors and patients with malignant disease, Int. J. Cancer, **21**: 35–41, 1978.

http://rcin.org.pl

[15] EREMIN O., COOMBS R. R. A., PLUMB D., ASHBY J., Characterization of the human natural killer (NK) cell in blood and lymphoid organs, Int. J. Cancer, **21**: 42–50, 1978.

[16] GIDLUND M., ÖRN A., WIGZELL H., SENIK A., GRESSER I., Enhanced NK cell activity in mice injected with interferon and interferon inducers, Nature, **273**: 759–761, 1978.

[17] GLIMCHER L., SHEN F. W., CANTOR A., Identification of a cell - surface antigen selectively expressed on the natural killer cells, J. Exp. Med., 145: 1–9, 1977.

[18] GOZES Y., TRAININ N., Enhancement of Lewis lung carcinoma in a syngeneic host by spleen cells of C57B1/6 old mice, Europ., J. Immunol., **7**: 159–164, 1977.

[19] HALLER O., Mouse natural cell - mediated cytotoxicity to human leukemia: independence of serum source used to target - cell culturing cytotoxicity assay, J. Nat. Cancer Inst., **60**: 1433–1438, 1978.

[20] HALLER C., HANSSON M., KIESSLING R., WIGZELL H., Role of non - conventional natural killer cells in resistance against syngeneic tumour cells in vivo, Nature, **270**: 609–611, 1977.

[21] HALLER O., KIESSLING R., ÖRN A., KÄRRE K., NILSSON K., WIGZELL H., Natural cytotoxicity to human leukemia mediated by mouse non - T cells, Int., J. Cancer, **20**: 93–103, 1977.

[22] HALLER O., KIESSLING R., ÖRN A., WIGZELL H., Generation of natural killer cells: and autonomous function of the bone marrow, J. Exp. Med., **145**: 1411–1416, 1977.

[23] HALLER O., WIGZELL H., Suppression of natural killer cell activity with radioactive strontium: effector cells are marrow dependent, J. Immunol., **118**: 1503–1506, 1977.

[23a] HANSSON M., KÄRRE K., BAKACS T., KIESSLING R., Intra - and interspecies reactivity of human and mouse natural killer (NK) cells, J. Immunol., **121**: 6–12, 1978.

[24] HEPPNER G., HENRY E., STOLBACH L., CUMMINGS F., McDONOUGH E., CALABRESI P., Problems in the clinical use of the microcytotoxicity assay for measuring cell - mediated immunity to tumor cells, Cancer Res., **35**: 1931–1937, 1975.

[25] HERBERMANN R. B., AOKI T., Immune and natural antibodies to syngeneic murine plasma cell tumors, J. Exp. Med., **136**: 94–111, 1972.

[26] HERBERMANN R. B., BARTRAM S., HASKILL J. S., NUNN M., HOLDEN H. T., WEST W. H., Fc receptors on mouse effector cells mediating natural cytotoxicity against tumor cells, J. Immunol., **119**: 322–326, 1977.

[26a] HERBERMANN R. B., NUNN M. E., HOLDEN H. T., Low density of Thy 1 antigen on mouse effector cells mediating natural cytotoxicity against tumor cells, J. Immunol., **121**: 304–309, 1978.

[27] HERBERMANN R. B., NUNN M. E., HOLDEN H. T., LAVRIN D. H., Natural cytotoxic reactivity of mouse lymphoid cells against syngeneic and allogeneic tumors. 2. Characterization of effector cells, Int. J. Cancer, **16**: 230–239, 1975.

[28] HERBERMANN R. B., NUNN M. E. HOLDEN H. T., STAAL S., DJEU J. Y., Augmentation of natural cytotoxic reactivity of mouse lymphoid cells against syngeneic and allogeneic target cells, Int. J. Cancer, **19**: 555–564, 1977.

[29] HERBERMANN R. B., NUNN M. E., LAVRIN D. H., Natural cytotoxic re-

http://rcin.org.pl

activity of mouse lymphoid cells against syngeneic and allogeneic tumors. 1. Distribution of reactivity and specificity, Int. J. Cancer, **16**: 216–229, 1975.

[30] HERBERT W. J., WILKINSON P. C., A dictionary of immunology, Blackwell Scientific Publlications, Oxford, London, Edinburgh, Melbourne, 1977, 104.

[31] HERSEY P., EDWARDS A., EDWARDS J., ADAMS E., MILTON G. W., NELSON D. C., Specificity of cell - mediated cytotoxicity against human melonoma lines: evidence for "non - specific" killing by activated T - cells, Int. J. Cancer, **16**: 173–183, 1975.

[32] HOCHMAN P. S., CUDKOWICZ G., Different sensitivities to hydrocortisone of natural killer cell activity and hybrid resistance to parental marrow grafts, J. Immunol., **119**: 2013–2015, 1977.

[33] HOCHMAN P. S., CUDKOWICZ G., DAUSSET J., Decline of natural killer cell activity in sublethally irradiated mice, J. Nat., Cancer Inst., **61**: 265–268, 1978.

[34] JAKÓBISIAK M., KAWIAK J., KAWALEC M., KAŃTOCH M., KAMIŃSKI M., ROZMYSŁOWICZ T., In vivo activity of spleen cells from untreated syngeneic mice against Ehrlich Ascites Carcinoma (EAC), Folia Biol. (Praha) (w druku).

[35] JANEWAY C. A., Suppressor T cells and immunoregulation: an overview, Transplant., Proc., **10**: 355–359, 1978.

[36] JONDEL M., PROSS H., Surface markers on human B and T lymphocytes. 6. Cytotoxicity against cell lines as a functional marker for lymphocyte subpopulations, Int. J. Cancer, **15**: 596–605, 1975.

[37] KAHN - PERLES B., GOLSTEIN P., Cell membrane - mediated cytolysis by membranes from noncytolytic cells, Europ. J. Immunol., **8**: 71–75, 1978.

[38] KAPLAN J., CALLEWAERT D. M., Expression of human T - lymphocyte antigens by natural killer cells, J. Nat. Cancer Inst., **60**: 961–964, 1978.

[39] KAY H. D., BONNARD G. D., WEST W. H., HERBERMANN R. B., A functional comparison of human Fc - receptor - bearing lymphocytes active in natural cytotoxicity, J. Immunol., **118**: 2058–2066, 1977.

[40] KAY H. D., SINKOVICS J. G., Cytotoxic lymphocytes from normal donors, Lancet, **2**: 296–297, 1974.

[41] KIESSLING R., HALLER O., FENYÖ E. M., STEINITZ M., KLEIN G., Mouse natural killer (NK) cell activity against human cell lines is not influenced by superinfection of the target cell with xenotropic murine C - type viruses, Int. J. Cancer, **21**: 460–465, 1978.

[42] KIESSLING R., HOCHMAN P. S., HALLER O., SHEARER G. M., WIGZELL H., CUDKOWICZ G., Evidence for a similar or common mechanism for natural killer cell activity and resistance to hemopoietic grafts, Europ., J. Immunol., **7**: 655–663, 1977.

[43] KIESSLING R., KLEIN E., PROSS H., WIGZELL H., "Natural" killer cells in the mouse. 2. Cytotoxic with specificity for mouse Moloney leukemia cells. Characteristics of the kille rcell. Europ. J. Immunol., **5**: 117–121, 1975.

[44] KIESSLING R., KLEIN E., WIGZELL H., "Natural" killer cells in the mpuse. 1. Cytotoxic cells with specificity for mouse Moloney leukemia cells. Specificity and distribution according to genotype, Europ. J. Immunol., **5**: 112–117, 1975.

[45] KIESSLING R., PETRANYI G., KÄRRE K., JONDAL M., TRACEY D.,

http://rcin.org.pl

WIGZELL H., Killer cells: a functional comparison between natural, immune T - cell and antibody - dependent in vitro systems, J. Exp. Med., **143**: 772–780, 1976.

[46] KIESSLING R., PETRANYI G., KLEIN G., WIGZELL H., Genetic variation of in vitro cytolytic activity and in vivo rejection potential of non - immunized semi-syngeneic mice against a mouse lymphoma line, Int. J. Cancer, **15**: 933–940, 1975.

[47] — Non - T - cell resistance against a mouse Moloney lymphoma, Int. J. Cancer, **17**: 275–281, 1976.

[48] KIUCHI M., TAKASUGI M., The nonselective cytotoxic cell (N cell), J. Nat. Cancer Inst., **56**: 575–582, 1976.

[49] KOIDE Y., TAKASUGI M., Determination of specificity in natural cell - mediated cytotoxicity by natural antibodies, J. Nat. Cancer Inst., **59**: 1099–1105, 1077.

[50] KOIDE Y., TAKASUGI M., BILLING R., B cell antigens on effectors for natural cell - mediated cytotoxicity, Europ. J. Immunol., **7**: 731–736, 1977.

[51] LEVIN A. C., MASSEY R. J., DEINHARDT F., Spontaneous human mononuclear cell cytotoxicity to cultured tumor cells: reproducibility of serial measurements with the use of a chromium - 51 - release microcytotoxicity assay, J. Mat., Cancer Inst., **60**: 1283–1294, 1978.

[52] LUKASIEWICZ O. A., DUFFEY P. S., MURPHY W. H., Immune mechanisms in leukemia: protective capacity of the major lymphoid cell compartments, J. Immunol., **116**: 976–981, 1976.

[53] MACDONALD H. R., ENGERS H. D., CEROTTINI J. C., BRUNNER K. T., Generation of cytotoxic T lymphocytes in vitro. 2. Effect of repeated exposure to alloantigens on the cytotoxic activity of longterm mixed leukocyte cultures, J. Exp., Med., **140**: 718–730, 1974.

[54] MARTIN S. E., MARTIN W. J., Anti - tumor antibodies in normal mouse sera, Int. J. Cancer, **15**: 658–664, 1975.

[55] MENARD S., COLNAGHI M. I., DELLA PORTA G., Natural antitumor serum reactivity in BALB/c mice. 1. Characterization and interference with tumor growth, Int. J. Cancer, **19**: 267–274, 1977.

[56] MÖLLER G., SVEHÄG S. E., Specificity of lymphocyte - mediated cytotoxicity induced by in vitro antibody coated target cells, Cell, Immunol., **4**: 1–9, 1972.

[57] NELSON D. L., BUNDY B. M., STROBER W., Spontaneous cell - mediated cytotoxicity by human peripheral blood lymphocytes in vitro, J. Immunol., **119**: 1401–1405, 1977.

[58] NUNN M. E., DJEU J. Y., GLASER M., LAVRIN D. H., HERBERMAN R. B., Natural cytotoxic reactivity of rat lymphocytes against syngeneic Gross virus-induced lymphoma, J. Nat. Cancer Inst., **56**: 393–399, 1976.

[59] NUNN M. E., HERBERMANN R. B., HOLDEN H. T., Natural cell - mediated cytotoxicity in mice against non - lymphoid tumor cells and some normal cells, Int. J. Cancer, **20**: 381–387, 1977.

[60] OEHLER J. R., HERBERMANN R. B., Natural cell - mediated cytotoxicity in rats. 3. Effects of immunopharmacologic treatments on natural reactivity and on reactivity augmented by polyinosinic - polycytidylic acid, Int. J. Cancer, **21**: 221–229, 1978.

[61] OEHLER J. R., LINDSAY L. R., NUNN M. E., HERBERMANN R. B., Natural cell - mediated cytotoxicity in rats. 1. Tissue and strain distribution, and

http://rcin.org.pl

demonstration of a membrane receptor for the Fc portion of IgG, Int, J. Cancer, **21**: 204–209, 1978.

[62] OEHLER J. R., LINDSAY L. R., NUNN M. E., HOLDEN H. T., HERBERMANN R. B., Natural cell - mediated cytotoxicity in rats. 2. In vivo augmentation of NK - cell activity, Int. J. Cancer, **21**: 210–220, 1978.

[63] OJO E., HALLER O., KIMURA A., WIGZELL H., An analysis of conditions allowing Corynebacterium Parvum to cause either augmentation or inhibition of natural killer cell activity against tumor cells in mice, Int. J. Cancer, **21**: 444–452, 1978.

[64] OLDHAM R. K., DJEU J. Y., CANNON G. B., SIWARSKI D., HERBERMANN R. B., Cellular microcytotoxicity in human tumor systems: Analysis of results. J. Nat. Cancer Inst., **55**: 1305–1318, 1975.

[65] OLDHAM R. K., HERBERMANN R. B., Evaluation of cell - mediated cytotoxic reactivity against tumor associated antigens with ^{125}I - iododeoxyuridine labeled target cells, J. Immunol., **111**: 1862–1871, 1973.

[66] OLDHAM R. K., SIWARSKI D., MCCOY J. L., PLATA E. J., HERBERMANN R. B., Evaluation of a cell - mediated cytotoxicity assay utilizing ^{125}I - iodcdeoxyuridine - labeled tissue - culture target cells, Nat. Cancer Inst. Monogr., **37**: 49–58, 1973.

[67] ORTALDO J. R., BONNARD G. D., HERBERMANN R. B., Cytotoxic reactivity of human lymphocytes cultured in vitro, J. Immunol., **119**: 1351–1357, 1977.

[68] PAPE G. R., TROYE M., PERLMANN P., Characterization of cytolytic effector cells in peripheral blood of healthy individuals and cancer patients. 2. Cytotoxicity to allogeneic or autochthonous tumor cells in tissue culture, J. Immunol., **118**: 1925–1929, 1977.

[69] PARKMAN R., ROSEN F. S., Identification of a subpopulation of lymphocytes in human peripheral blood cytotoxic to autologous fibroblasts, J. Exp., Med., **144**: 1520–1530, 1976.

[70] PAVIE - FISCHER J., KOURILSKY F. M., PICARD F., BANZET P., PUISSANT A., Cytotoxicity of lymphocytes from healthy subjects and from melanoma patients against cultured melanoma cells, Clin. Exp., Immunol., **21**: 430–441, 1975.

[71] PETER H. H., EIFE R. F., KALDEN J. R., Spontaneous cytotoxicity (SCMC) of normal human lymphocytes against a human melanoma cell line: a phenomenon due to lymphotoxin - like mediator, J. Immunol., **116**: 342–348, 1976.

[72] PETER H. H., PAVIE - FISCHER J., FRIDMAN W. H., AUBERT C., CESARINI J. P., ROUBIN R., KOURILSKY F. M., Cell - mediated cytotoxicity in vitro of human lymphocytes against a tissue culture melanoma cell line (IGR3), J. Immunol., **115**: 539–547, 1975.

[73] PETRÁNYI G., KIESSLING R., KLEIN G., Genetic control of "natural" killer lymphocytes in the mouse, Immunogenetics, **2**: 53–61, 1975.

[74] PREHN R. T., The immune reaction as stimulator of tumor growth, Science, **176**: 170–171, 1972.

[75] PROSS H. F., BAINES M. G., JONDAL M., Spontaneous human lymphocyte - mediated cytotoxicity against tumor target cells. 2. Is the complement receptor necessarily present on the killer cells, Int. J. Cancer, **20**: 353–358, 1977.

[76] PROSS H. F., JONDAL M., Cytotoxic lymphocytes from normal donors.

http://rcin.org.pl

A functional marker of human non - T lymphocytes, Clin. Exp. Immunol., **21**: 226–235, 1975.

[77] PUTNAM D. L., KIND P. D., KENDE M., Therapy of AKR leukemia with antibody - dependent normal lymphocytes and cyclophosphamide, Cancer Immunol. Immunother., **3**: 97–99, 1977.

[78] ROITT I. M., Podstawy Immunologii, PWN, Warszawa, 1977, 153–154.

[79] ROSENBERG E. B., MCCOY J. L., GREEN S. S., DONNELLY F. C., SIWARSKI D. F., LEVINE P. H., HERBERMANN R. B., Destruction of human lymphoid tissue - culture cell lines by human peripheral lymphocytes in ^{51}Cr - release cellular cytotoxicity assays, J. Nat. Cancer Inst., **52**: 345–352, 1974.

[80] ROSS G. D., JAROWSKI C. J., RABELLINO E. M., WINCHESTER R. J., The sequential appearance of Ia - like antigens and two different complement receptors during the maturation of human neutrophils, J. Exp. Med., **147**: 730–744, 1978.

[81] ROSS G. D., POLLEY M. J., Specificity of human lymphocyte complement receptors, J. Exp. Med., **141**: 1163–1180, 1975.

[82] RYGAARD J., POVLSEN C. O., The nude mouse vs. the hypothesis of immunological surveillance, Transplant. Rev., **28**: 43–61, 1976.

[83] SAVARY C. A., LOTZOVA E., Suppression of natural killer cell cytotoxicity by splenocytes from Corynebacterium Pervum - injected, bone marrow - tolerant, and infant mice, J. Immunol. **120**: 239–243, 1978.

[84] SENDO F., AOKI T., BOYSE E. A., BUAFO C. K., Natural occurrence of lymphocytes showing cytotoxic activity to BALB/c radiation - induced RL♂1 cells, J. Nat. Cancer Inst., **55**: 603–609, 1975.

[85] SHELLAM G. R., Gross - virus - induced lymphoma in the rat. 5. Natural cytotoxic cells are non - T cells, Int. J. Cancer, **19**: 225–235, 1977.

[86] SHELLAM G. R., HOGG N., Gross - virus - induced lymphoma in the rat. 4. Cytotoxic cells in normal rats, Int. J. Cancer, **19**: 212–224, 1977.

[87] SHIKU H., TAKAHASHI T., BEAN M. A., OLD L. J., OETTGEN H. F., Ly phenotype of cytotoxic T cells for syngeneic tumor, J. Exp. Med., **144**: 1116–1120, 1976.

[88] SKURZAK H., STEINER L., KLEIN E., LAMON E., Cytotoxicity of human peripheral lymphocytes for glioma, osteosarcoma and glia cell lines, Nat. Cancer Inst. Monogr., **37**: 149–156, 1973.

[89] SVEDMYR E., JONDAL M., Cytotoxic effector cells specific for B cell lines transformed by Epstein - Barr virus are present in patients with infectious mononucleosis, Proc. Nat. Acad. Sci. US, **72**: 1622–1626, 1975.

[90] TAKASUGI M., KOIDE Y., AKIRA D., RAMSEYER A., Specificities in natural cell - mediated cytotoxicity by the cross - competition assay, Int. J. Cancer, **19**: 291–297, 1977.

[91] TAKASUGI M., MICKEY M. R., Interaction analysis of selective and non-selective cell - mediated cytotoxicity, J. Nat. Cancer Inst., **57**: 255–261, 1976.

[92] TAKASUGI M., MICKEY M. R., TERASAKI P. I., Reactivity of lymphocytes from normal persons on cultured tumor cells, Cancer Res., **33**: 2898–2902, 1973.

[93] TIMONEN T., SAKSELA E., Human natural cell - mediated cytotoxicity against fetal fibroblasts. 1. General characteristics of the cytotoxic activity, Cell. Immunol., **33**: 340–352, 1977.

[93a] TREVES A. J., HEIDELBERGER E., FELDMAN M., KAPLAN H. S.,

http://rcin.org.pl

In vitro sensitization of human lymphocytes against histiocytic lymphoma cell lines. 2. Characterization of two different effector activities and of suppressor cells, J. Immunol., **121**: 86–90, 1978.

[94] TRINCHIERI G., SANTOLI D., Anti - viral activity induced by culturing lymphocytes with tumor - derived or virus - transformed cells. Enhancement of human natural killer cell activity by interferon and antagonistic inhibition of susceptibility of target cells to lysis, J. Exp. Med., **147**: 1314–1333, 1978.

[95] TRINCHIERI G., SANTOLI D., DEE R. R., KNOWLES B. B., Antiviral activity induced by culturing lymphocytes with tumor - derived or virus - transformed cells. Identification of the anti - viral activity as interferon and characterization of the human effector lymphocyte subpopulation, J. Exp. Med., **147**: 1299–1313, 1978.

[96] TRINCHIERI G., SANTOLI D., KNOWLES B. B., Tumour cell lines induce interferon in human lymphocytes, Nature, **270**: 611–613, 1977.

[96a] TRINCHIERI G., SANTOLI D., KOPROWSKI H., Spotaneous cell - mediated cytotoxicity in humans: role of interferon and immunoglobulins, J. Immunol., **120**: 1849–1855, 1978.

[97] TUFVESON G., RIESENFELD I., RÖNBLOM L., HEDMAN A., ALM G. V., Natural cell - mediated immunity to lymphoma cells. 1. Characteristics of effector cells in a cytostasis assay in vitro, J. Nat. Cancer Inst., **59**: 1491–1497, 1977.

[98] VESSELLA R. L., GORMUS B. J., LANGE P. H., KAPLAN M. E., Heterogeneity among human lymphocyte effector cells mediating spontaneous lymphocyte - mediating cytotoxicity, Int. J. Cancer, **21**: 594–603, 1978.

[99] WELSH R. M., Cytotoxic cells induced during lymphocytic choriomeningitis virus infection of mice. 1. Characterization of Natural Killer Cell induction, J. Exp. Med., **148**: 163–181, 1978.

[100] WEST W. H., CANNON G. B., KAY H. D., BONNARD G. D., HERBERMANN R. B., Natural cytotoxic reactivity of human lymphocytes against a myeloid cell line: characterization of effector cells, J. Immunol., **118**: 355–361, 1977.

[101] WOLFE S. A., TRACEY D. E., HENNEY C. S., BCG - induced murine effector cells. 2. Characterization of natural killer cells in peritoneal exudates, J. Immunol., **119**: 1152–1158, 1977.

Otrzymano: 10 grudnia 1978.
Przyjęto: 10 stycznia 1979.

Adres autora: ul. Chałubińskiego 5, 02 - 004 Warszawa.

http://rcin.org.pl

http://rcin.org.pl

POSTĘPY BIOLOGII KOMÓRKI TOM 6, NR 2, 1979 (99–114)

KOMÓRKI PANETHA — BUDOWA, CYTOFIZJOLOGIA I PATOLOGIA *

THE PANETH CELLS — MORPHOLOGY, CYTOPHYSIOLOGY AND PATHOLOGY

Jan LAMPRECHT i Ireneusz ADAMIEC

Zakład Histologii i Embriologii, Instytut Biostruktury, Akademia Medyczna w Warszawie

Streszczenie. Komórki Panetha ** łatwo identyfikowane dzięki swej budowie i lokalizacji nie doczekały się dotąd pełnej charakterystyki funkcjonalnej. Występują u wszystkich badanych dotąd ssaków z wyjątkiem psa i kota, w dnach gruczołów jelita cienkiego oraz w wyrostku robaczkowym i jelicie ślepym. Rozwój, kinetyka proliferacji oraz zanikanie tych komórek z populacji nabłonka są zagadnieniami słabo poznanymi. Liczba oraz budowa komórek Panetha zmieniają się w licznych stanach chorobowych. W niektórych enteropatiach jelita grubego obserwuje się metaplazję nabłonka okrężnicy z pojawieniem się w nim komórek Panetha. Uważa się, że głównym białkiem syntetyzowanym przez komórki Panetha jest lizozym. Synteza i wydzielanie lizozymu, a także zdolność fagocytozy mikroorganizmów flory jelitowej pozwala przypuszczać, że komórki Panetha są częścią bariery obronnej przewodu pokarmowego przed szkodliwymi wpływami środowiska zewnątrzustrojowego.

Summary. The Paneth cells may be easy identified, due to their morphology and localization, however the knowledge concerning their function is still incomplete. They occur in all mammals except for the carnivores, in the bottom of intestinal glands of small bowel, vermiform appendix and caecum. The development, differentiation and proliferation kinetics of these cells are understood very poorly, so is their disappearance from epithelial population. Morphology and the number of

* Praca wykonana w związku z realizacją Programu Rządowego PR - 6, temat 1315/13.

** Polskie Mianownictwo Histologiczne PZWL, 1974 r. zaleca używanie terminu „komórka jelitowa z ziarnistościami kwasochłonnymi" w miejsce terminu „komórka Panetha". Tradycyjna nazwa została użyta przez autorów jedynie ze względu na łatwość operowania terminem krótszym.

http://rcin.org.pl

Paneth cells change in numerous diseases. In some large intestine enteropathies the metaplasia of colonic epithelium with the Paneth cell occurrence can be observed. Lysozyme is considered to be a main protein syntetized by the Paneth cells. Synthesis and secretion of lysozyme as well as the phagocytic ability of the Paneth cells allow to consider these cells as a part of the small intestine defence system against detrimental influences of the external environment.

WSTĘP

Złożoność funkcji jelita cienkiego, tzn. trawienie, wchłanianie, wydzielanie egzo- i endokrynowe oraz udział w nieswoistej i swoistej odporności organizmu, znajduje swe odzwierciedlenie w bogactwie morfologicznych typów komórek nabłonka błony śluzowej.

Dominującą część nabłonka jelita cienkiego tworzą komórki z rąbkiem prążkowanym, zwane enterocytami bądź komórkami chłonącymi, oraz komórki śluzowe (komórki kubkowe). Znacznie mniej licznie są reprezentowane tzw. „tuft cells", komórki enteroendokrynowe, śródnabłonkowe elementy limfoidalne oraz komórki Panetha.

Komórki Panetha, mimo że zostały opisane już ponad 100 lat temu [96], a w swojej masie tworzą pokaźny gruczoł rozproszony, do dzisiejszego dnia nie doczekały się jednoznacznego określenia ich funkcji. Pierwszy morfologiczny opis tych komórek podał w 1888 r. Paneth [81], natomiast pierwszy opis ultrastruktury zawdzięczamy Hally'emu [43].

WYSTĘPOWANIE

Komórki Panetha występują powszechnie u ssaków. Wśród przebadanych gatunków nie stwierdzono ich u psa i kota; nie występują również u ptaków, płazów i gadów [17, 24, 63, 69, 74, 86, 99, 108, 113, 118]. Komórki te są charakterystyczne dla nabłonka jelita cienkiego, gdzie wraz z komórkami nie zróżnicowanymi (stem cells) tworzą dna gruczołów jelitowych (ryc. 1 i 2). Liczba komórek w nabłonku jelita cienkiego wzrasta wraz z odległością od żołądka. Obserwuje się je w około 60% gruczołów jelitowych dwunastnicy człowieka, około 80% gruczołów jelita czczego oraz w około 95% gruczołów jelita krętego [78]. U człowieka na 1000 komórek nabłonka jelitowego dwunastnicy przypada średnio około 15 komórek Panetha, w jelicie czczym — około 18, a w jelicie krętym — około 25 [78].

U człowieka komórki Panetha stwierdza się również w nabłonku ponad 95% badanych wyrostków robaczkowych [115] oraz sporadycznie w nabłonku jelita ślepego. W nabłonku pozostałych odcinków jelita gru-

http://rcin.org.pl

bego, w stanach fizjologicznych, nie obserwuje się komórek Panetha. Jedynym znanym gatunkiem, u którego komórki Panetha występują zarówno w nabłonku jelita cienkiego, jak i grubego jest kret [44].

BUDOWA

Komórki Panetha mają kształt ściętej piramidy, a swą szeroką podstawą oparte są o błonę podstawową nabłonka jelitowego (ryc. 2). Są to komórki o silnie zaznaczonej biegunowości budowy. Część szczytowa osiąga światło gruczołu, a jej powierzchnia ukształtowana jest w postaci nieregularnie ułożonych mikrokosmków. Między mikrokosmkami występują wpuklenia błony komórkowej będące morfologicznym przejawem egzocytozy ziaren wydzielniczych (ryc. 2). Charakterystyczną cechą budowy komórek Panetha są silnie kwasochłonne ziarna wydzielnicze o średnicy 1–3 μm, obserwowane w ich cytoplazmie nadjądrowej (ryc. 1–3). W obrazie mikroskopu elektronowego komórki Panetha myszy i wiewiórki posiadają między błoną otaczającą ziarno a gęstym centrum strefę o małej gęstości elektronowej (ryc. 3). Ziarna wydzielnicze komórek Panetha pozostałych ssaków wykazują homogenną, elektronowo gęstą strukturę. Między jądrem a obszarem gromadzenia ziaren wydzielniczych występuje obficie rozbudowany układ Golgiego (ryc. 4). Jądro zlokalizowane jest w przypodstawnej części komórki. W odróżnieniu od pozostałych typów komórek nabłonka jelitowego, długa oś jądra komórki Panetha ułożona jest zwykle prostopadle do długiej osi komórki. Obrys jądra jest nieregularny, często z licznymi wpukleniami. Chromatyna zwarta jąder układa się w sąsiedztwie wewnętrznego listka otoczki jądrowej, podobnie jak w innych wysoko zróżnicowanych komórkach. Widoczne jest także na ogół wyraźnie wykształcone jąderko. Ziarnista siatka śródplazmatyczna jest niezwykle obficie rozbudowana. Równolegle lub koncentrycznie ułożone wąskie cysterny zajmują dominującą część cytoplazmy wokół- i podjądrowej (ryc. 2 i 4). Mitochondria komórek Panetha posiadają w swej macierzy mniej wyraźne ziarna wewnątrzmitochondrialne niż sąsiadujące z nimi komórki nabłonka. W cytoplazmie okolicy przy- i podjądrowej obserwuje się występowanie lizosomów oraz tubularnych bądź włókienkowatych wtrętów, często o ułożeniu koncentrycznym [86].

METODY UWIDACZNIANIA KOMÓREK PANETHA

Podstawowe znaczenie dla barwliwości i morfologii ziaren wydzielniczych komórek Panetha ma rodzaj stosowanego utrwalacza oraz sposób przygotowania materiału [43, 46]. Utrwalacze kwaśne, a także alkohol i eter, które niszczą ziarna wydzielnicze, są zdaniem niektórych

http://rcin.org.pl

autorów przyczyną wielu błędnych interpretacji wyników badań nad komórkami Panetha [68].

Cytoplazma komórek Panetha barwi się błękitem alcjanu, błękitem toluidyny, hematoksyliną żelazistą, karminem Besta, czernią naftalenową, tioflawiną T, czerwienią Kongo, safraniną oraz metodą „azan", paS i van Giesona [15, 43, 62]. Wszystkie wymienione barwniki nie są specyficzne dla ziaren komórek Panetha, wybarwiają bowiem również ziarna wydzielnicze innych komórek. Według niektórych autorów specyficzną metodą jest barwienie szkarłatem Biebricha, ponieważ barwnik ten wiąże się kompetycyjnie z aktywnym miejscem lizozymu obficie występującym w ziarnach wydzielniczych komórek Panetha [32].

W szczytowej części cytoplazmy komórek Panetha wykryto aktywność glukozo - 6 - fosfatazy (EC 3.1.3.9), anhydrazy węglanowej (EC 4.2.1.1), silną aktywność oksydazy monoaminowej (EC 1.4.3.4), a także aminopeptydazę (EC 3.4.1.3), dehydrogenazę amidu kwasu liponowego (EC 1.6.4.3) i inne dehydrogenazy (EC 1.3.99.1, EC 1.1.1.41, EC 1.1.1.27) [62, 89]. W obrębie ziaren wydzielniczych, których centrum zbudowane jest z obojętnego lub zasadowego kompleksu polisacharydowo - białkowego, a obrzeże z kwaśnego mukopolisacharydu [43, 53, 69, 97, 101, 105], wykryto obecność argininy, tyrozyny i tryptofanu [43, 108], a także wolnych grup sulfhydrylowych i histydynowych [11, 68]. Wybitną kwasochłonność ziaren wydzielniczych przypisuje się obecności argininy. Zdaniem niektórych autorów, ziarna wydzielnicze komórek Panetha zawierają także enzymy lizosomalne [68, 89], choć w ziarnach wydzielniczych komórek Panetha człowieka nie stwierdzono obecności fosfatazy kwaśnej, E - 600 opornej esterazy, sulfatazy arylowej i innych enzymów lizosomalnych [90]. Obecnie uważa się, że głównym produktem wydzielanym przez komórki Panetha jest enzym bakteriolityczny lizozym (muramidaza) (EC 3.2.1.17) stwierdzany w obrębie ziaren wydzielniczych, okolicy układu Golgiego oraz w niektórych lizosomach [25, 32, 39, 80]. Ilość lizozymu określono na około 30 pg/komórkę Panetha jelita krętego szczura, tj. 5–6 razy więcej niż ilość lizozymu w leukocytach [34].

Komórki Panetha myszy, szczura i człowieka zawierają immunoglobuliny IgA oraz IgG [33, 36, 91], natomiast nie stwierdzono w nich IgD, IgE ani IgM [91]. Stosunek ilościowy immunoglobulin w obrębie komórki jest zmienny gatunkowo [33].

W obrębie ziaren wydzielniczych znajdują się także duże ilości jonów cynku [70], a stężenie jonów wapnia u niektórych gatunków jest znacznie wyższe niż w pozostałych typach komórek nabłonka jelitowego [84]. Obecność jonów wapnia wykrywa się na obwodzie niedojrzałych ziaren wydzielniczych, w mitochondriach oraz w ziarnistej siatce śródplazmatycznej [92]. Badania autoradiograficzne ujawniły zdolność komórek Panetha do wychwytywania Co^{60}, Hg^{203}, Pb^{210} [42].

http://rcin.org.pl

ROZWÓJ

Komórki Panetha pojawiają się w nabłonku jelita cienkiego człowieka około 24 tygodnia życia płodowego [40], natomiast u myszy około 1, a u szczura między 1 a 2 tygodniem życia pozapłodowego [60, 68, 109], tj. w okresie wykształcania się gruczołów jelitowych. Według niektórych autorów komórki Panetha stwierdza się również w jelicie grubym noworodków ludzkich, lecz nie obserwuje się ich w późniejszych okresach życia [13]. Jak wykazały badania Stibenza i Geyera [104], rozwój komórek Panetha w dwunastnicy myszy można przyspieszyć podając zwierzętom kortyzol.

Pochodzenie komórek Panetha nie jest ustalone, a poglądy na ten temat są bardzo rozbieżne. Patzelt [83] uważał, że komórki te powstają przez przekształcenie się komórek śluzowych. Cairnie [16], jest zdania, że prekursory komórek Panetha pochodzą spoza nabłonka krypty jelitowej. Według Tonera [109] komórki Panetha stanowią populację zanikającą, powstając tylko w życiu płodowym i we wczesnym okresie życia pozapłodowego. Zdaniem Trashera [110] komórki te stanowią samoodtwarzającą się populację. Nowe komórki mają powstawać z właściwego dla tego typu komórek prekursora umiejscowionego między komórkami Panetha. Wymienione poglądy straciły ostatnio na popularności na rzecz unitarystycznej teorii pochodzenia komórek nabłonka jelitowego [21]. Według tej teorii komórki Panetha rozwijają się z nie zróżnicowanych komórek - prekursorów wszystkich typów komórek nabłonka jelitowego umiejscowionych w dolnych obszarach krypty jelitowej.

PROLIFERACJA I RÓŻNICOWANIE

W komórkach Panetha nie obserwuje się mitoz, nie posiadają one także zdolności syntezy DNA [16, 18, 113]. Badania autoradiograficzne wykazują, że zróżnicowane komórki Panetha nie wychwytują izotopu w krótkim czasie po pojedynczej iniekcji 3H - tymidyny. Znakowanie jąder w zróżnicowanych komórkach Panetha obserwuje się w przypadku wielokrotnego podawania trytowanej tymidyny lub po dłuższym czasie po pojedynczej iniekcji. Wskazuje to na wolny mechanizm odnowy populacji komórek [16]. Ultrastrukturalne badania autoradiograficzne wykazały w nabłonku jelitowym obecność wyznakowanych komórek o morfologii pośredniej między komórkami niezróżnicowanymi, komórkami Panetha a komórkami śluzowymi. Uważa się je za młode formy komórek Panetha posiadające zdolność podziału [113]. Odnowa komórek Panetha jest znacznie wolniejsza niż innych typów komórek nabłonka jelitowego. Czas odnowy jest rzędu tygodni, np. u myszy trwa 14–16 dni [20].

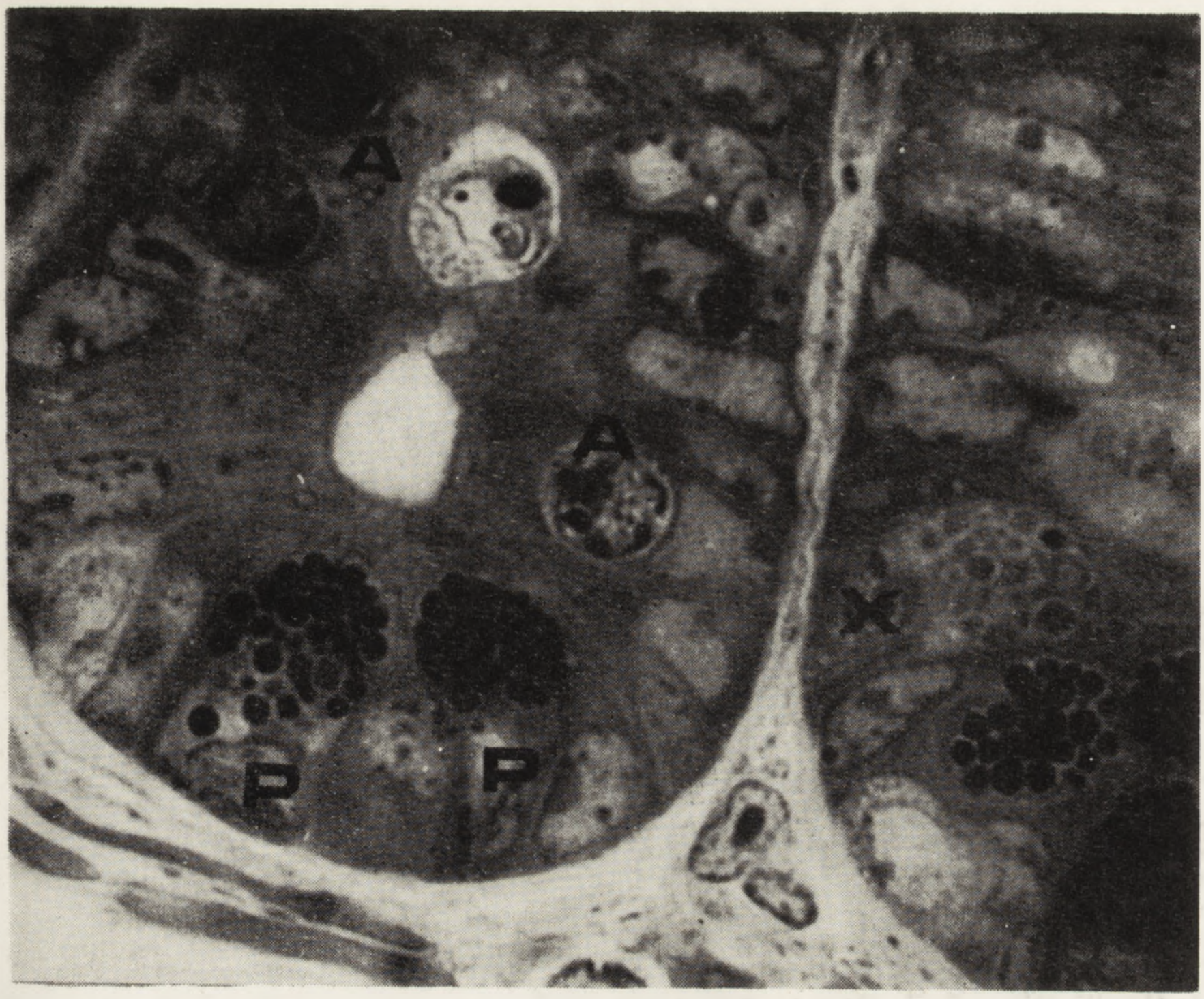
http://rcin.org.pl

Najmłodsze formy komórek Panetha poza nielicznymi małymi ziarnami wydzielniczymi wykazują wiele cech morfologicznych komórek macierzystych nabłonka (stem cells). W miarę różnicowania wzrasta znacznie ilość cystern ziarnistej siatki śródplazmatycznej, ilość i średnica ziaren wydzielniczych oraz zmienia się wielkość i ułożenie jądra komórkowego [21]. U myszy całą populację komórek Panetha Cheng [21] podzieliła na 3 grupy, tj. 1) młode komórki Panetha (23%) o średnicy ziaren poniżej 2 μm, 2) dojrzałe komórki (63%) o średnicy ziaren 2–3 μm, 3) stare komórki (14%) o średnicy ziaren powyżej 3 μm.

Podobnie jak poglądy dotyczące pochodzenia, również poglądy dotyczące zanikania komórek Panetha z populacji nabłonka jelitowego są kontrowersyjne. Nabłonek jelitowy ulega ciągłej i szybkiej odnowie. Komórki powstające w gruczołach jelitowych migrują na kosmki, a następnie ulegają złuszczeniu do światła jelita [59]. Zdaniem większości autorów komórki Panetha nie posiadają zdolności migracji, lecz pozostają w nabłonku dna gruczołów, degenerują i są fagocytowane przez nie zróżnicowane komórki nabłonka (zjawisko apoptozy) [21] (ryc. 1) lub przez pozanabłonkowe komórki przypominające monocyty krwi obwodowej [2]. Istnieją jednak również zwolennicy koncepcji postulującej migrację i przekształcanie się komórek Panetha w komórki śluzowe [12]. Za słusznością tej koncepcji może przemawiać obserwacja komórek o morfologii pośredniej między komórkami Panetha a komórkami śluzowymi zarówno w warunkach fizjologicznych (ryc. 1) [17, 43, 47, 56, 113], jak również w warunkach doświadczalnych [56, 104] i w niektórych enteropatiach [106]. Komórki te obserwowano w nabłonku górnej części gruczołów jelitowych [17], a także sporadycznie w nabłonku kosmków [56]. Za zdolnością komórek Panetha do migracji może przemawiać ponadto obecność desmozomalnych połączeń z komórkami sąsiadującymi, warunkująca synchroniczną migrację komórek nabłonka jelitowego [19], a także obecność w nabłonku jelita cienkiego człowieka i szczura subpopulacji komórek śluzowych wykazujących obecność lizozymu w obrębie ich materiału wydzielniczego [73].

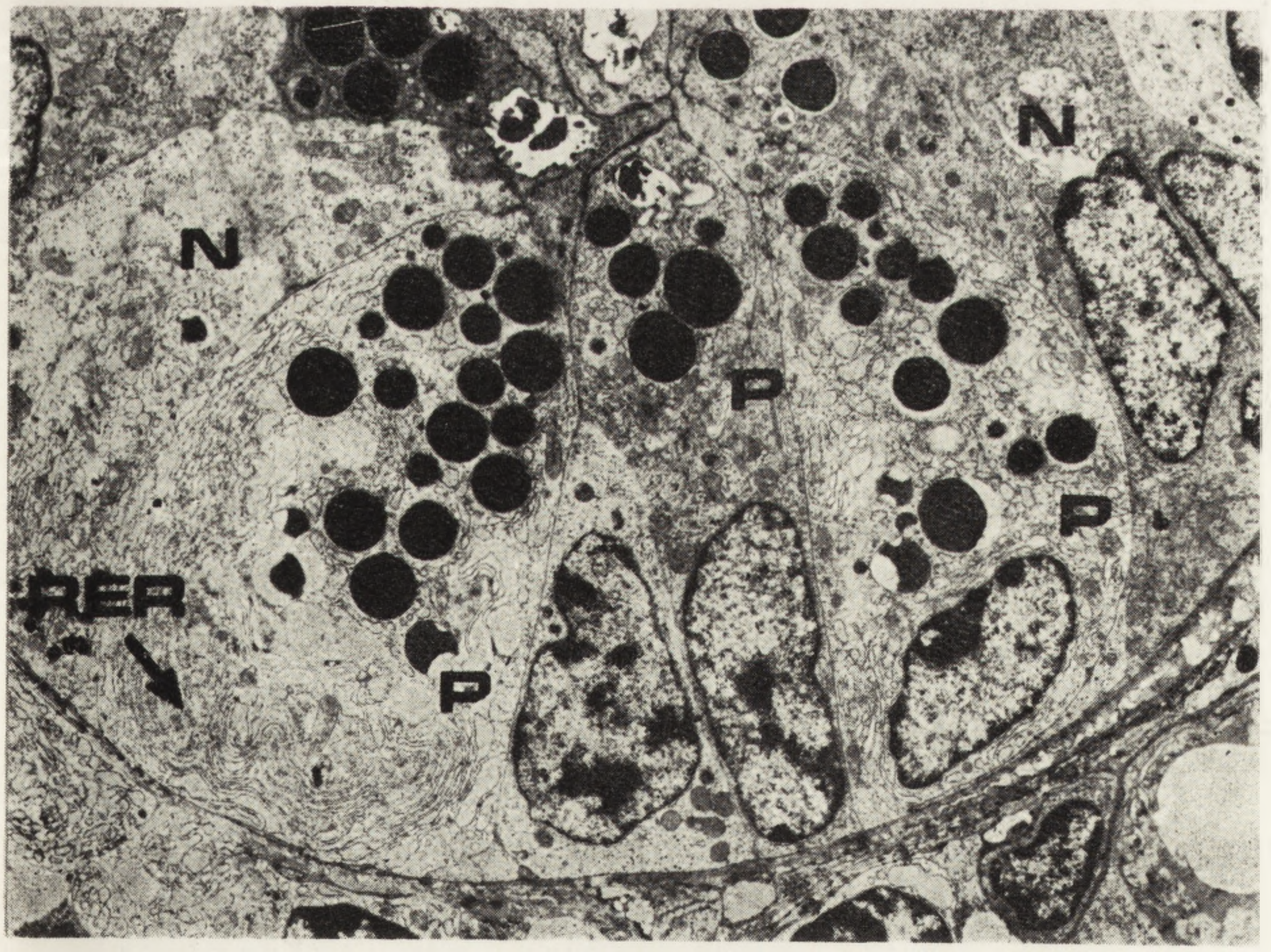
Spostrzeżenia te sugerują, że synchroniczna migracja komórek Panetha z pozostałymi typami komórek nabłonka jelitowego jest prawdopodobna również w warunkach normalnych, lecz być może nie jest ona zauważana wskutek zmian morfologicznych i/lub zmian barwliwości ziaren wydzielniczych w miarę starzenia się komórek Panetha. Dlatego też wydaje się, że proponowane przez Cheng [21] wyłączanie komórek Panetha z populacji poprzez zjawisko apoptozy, brak migracji komórek Panetha w przeciwieństwie do pozostałych typów komórek oraz zaliczenie komórek o budowie pośredniej do podtypu komórek śluzowych (tzw. komórki śluzowe ziarniste) wymagają krytycznej analizy.

http://rcin.org.pl



Ryc. 1. Dna dwu sąsiadujących gruczołów jelitowych dwunastnicy myszy

Komórki Panetha (P) z wyraźnie zgrupowanymi ziarnami wydzielniczymi w części szczytowej komórki, X — komórka o budowie i cechach barwliwości pośrednich między komórką Panetha a komórką śluzową, A — ciałka apoptotyczne. Pow. około 1000 ×



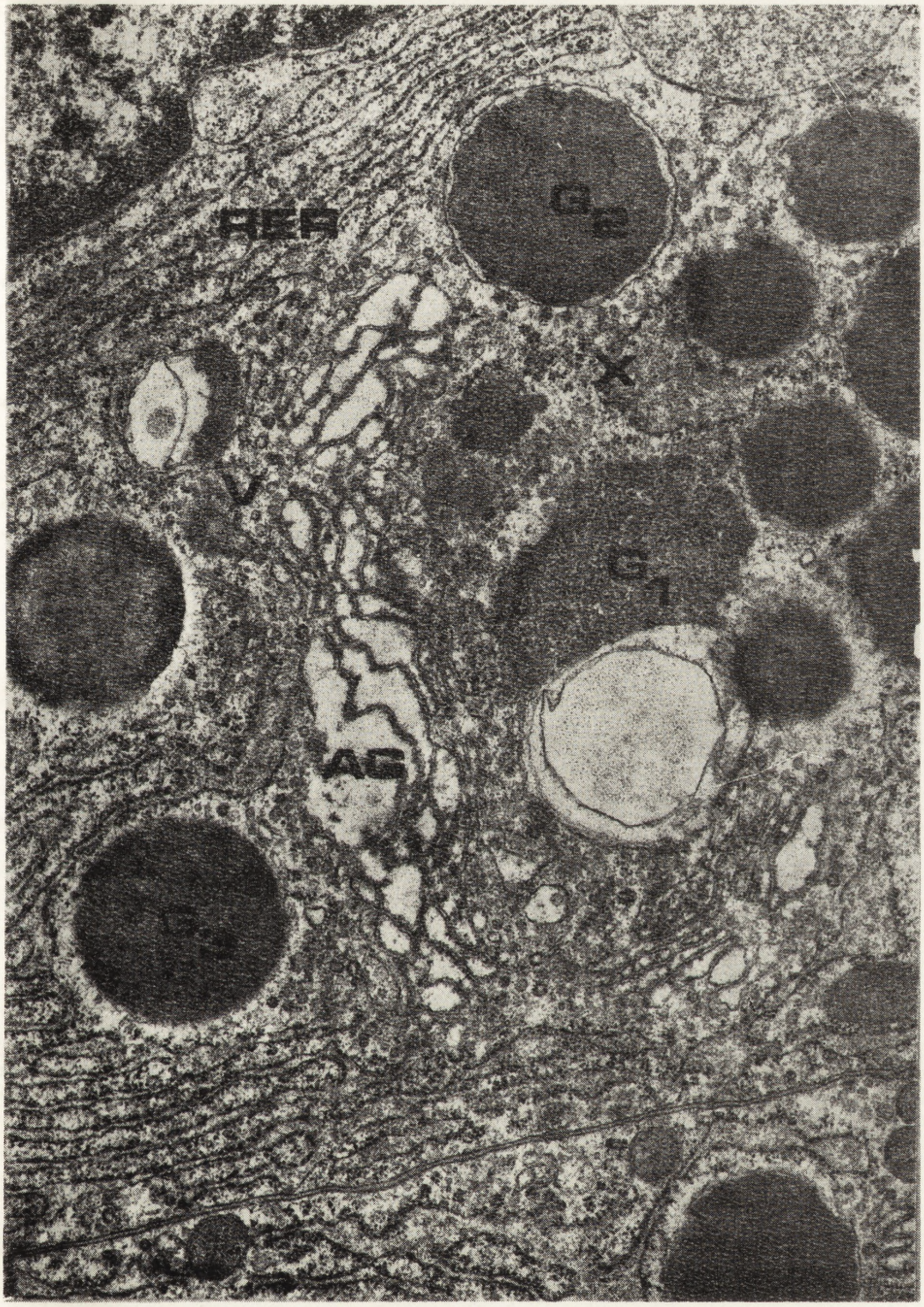
Ryc. 2. Ultrastruktura komórek dna gruczołu jelitowego dwunastnicy myszy

Obok komórek niezróżnicowanych (N) komórki Panetha (P) z licznymi ziarnami wydzielniczymi. RER — ziarnista siatka śródplazmatyczna. Pow. około 5500 ×

http://rcin.org.pl

Ryc. 3. Ultrastruktura części szczytowej komórki Panetha myszy
G — ziarna wydzielnicze, AG — układ Golgiego, RER — ziarnista siatka śródplazmatyczna. Pow. około 18 000 ×

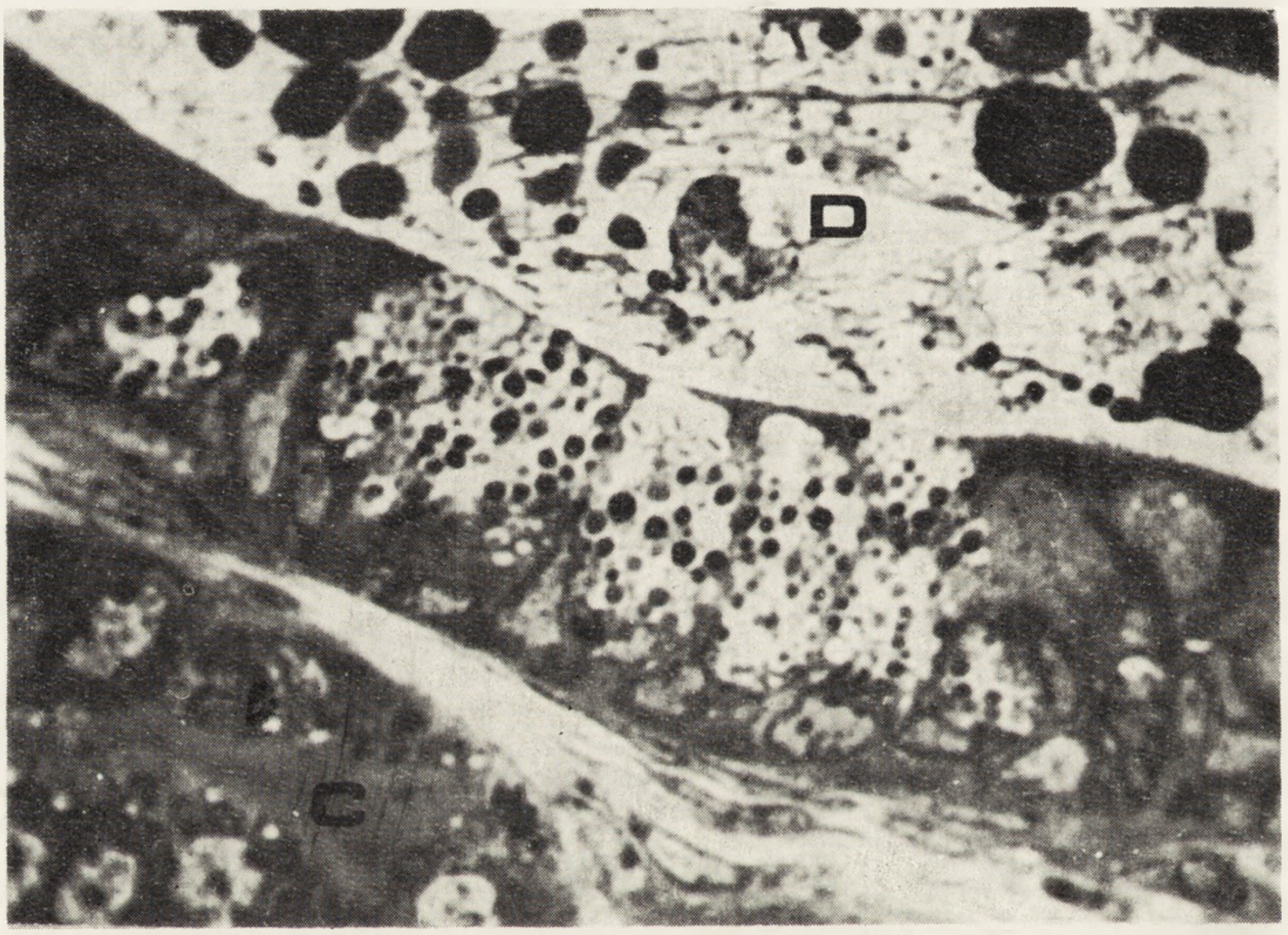
http://rcin.org.pl



Ryc. 4. Okolica cytoplazmy nadjądrowej komórki Panetha myszy

Widoczne różne postacie ziaren wydzielniczych (G_1—G_3), obficie rozbudowana ziarnista siatka śródplazmatyczna (RER) oraz poszczególne elementy GERL, tj. cysterny układu Golgiego (AG), mikropęcherzyki (V), poszerzone cysterny ziarnistej siatki śródplazmatycznej (X). Pow. około 43 000 ×

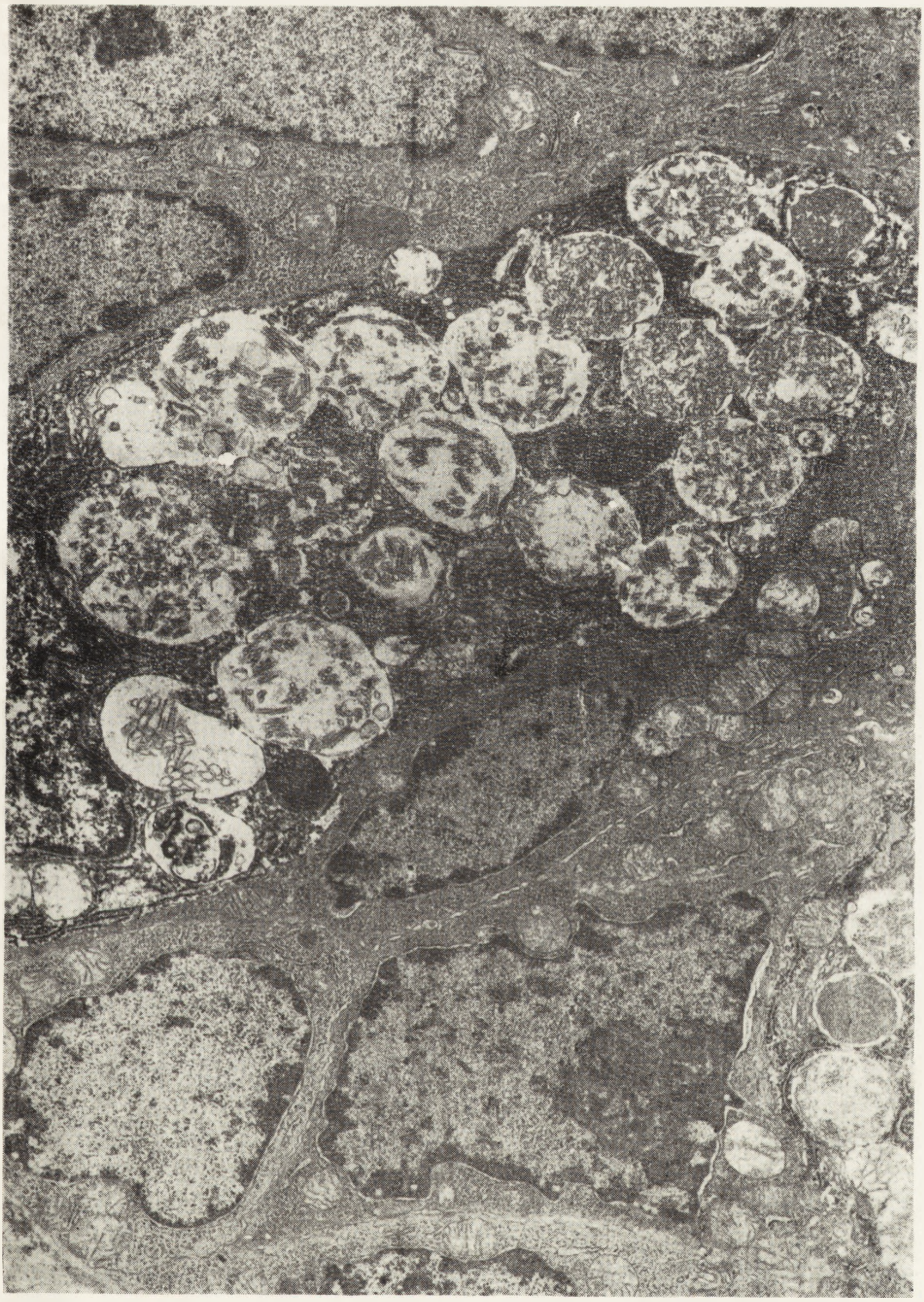
http://rcin.org.pl



Ryc. 5. Nabłonek syngenicznego przeszczepu fragmentu dwunastnicy myszy pod torebką nerki

W 30 dni po przeszczepieniu obserwowano hiperplazję komórek Panetha. D — zawartość cysty nabłonkowej, C — kora nerki. Pow. około 1000 ×

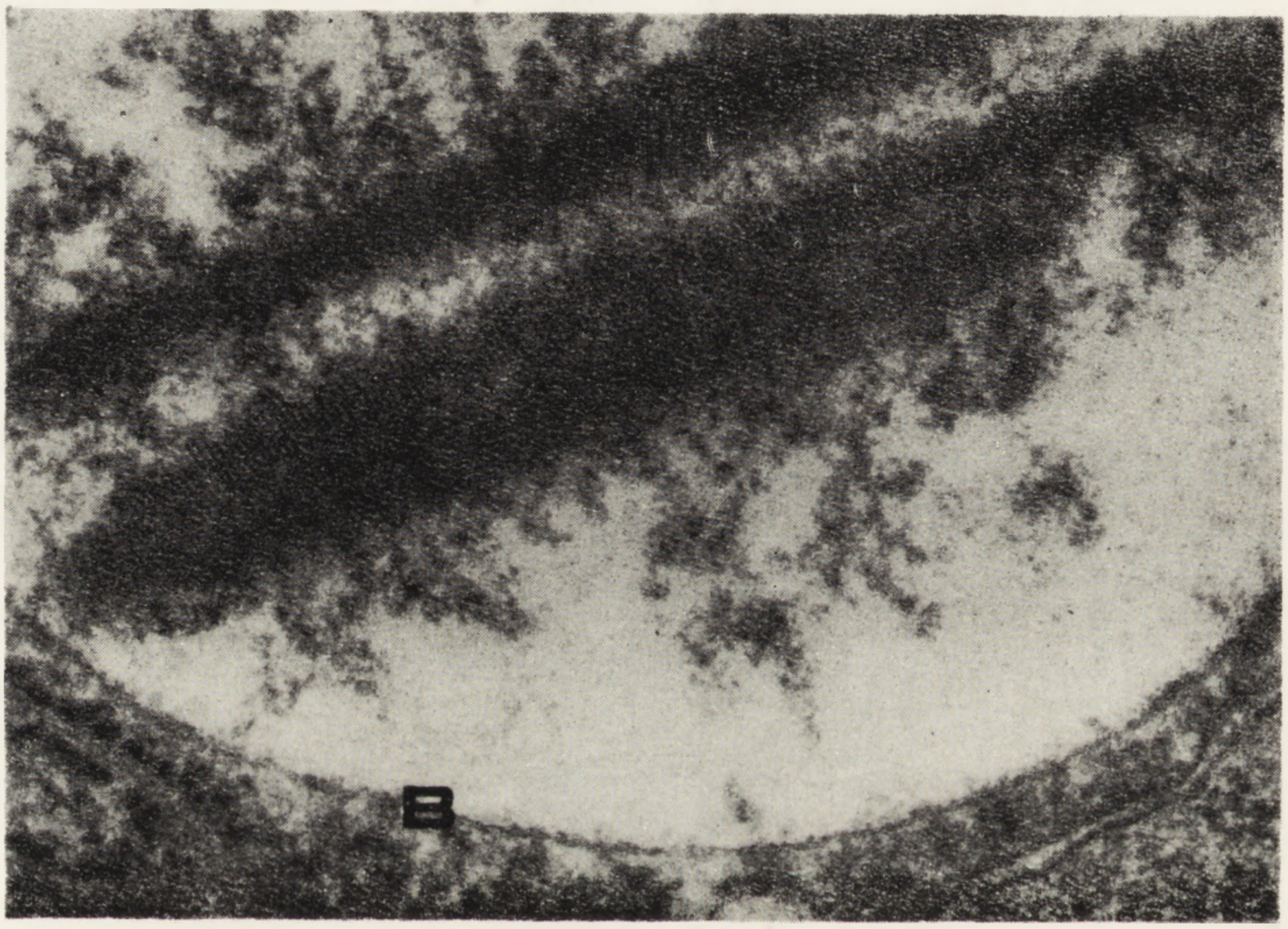
http://rcin.org.pl



Ryc. 6. Fragment komórki Panetha szczura w 14 dni po napromienieniu dawką 750 R

W obrębie ziaren wydzielniczych obserwowano pojawianie się tworów tubularnych o średnicy 900—1000 Å. Pow. około 20 000 ×

http://rcin.org.pl



Ryc. 7. Fragment ziarna wydzielniczego komórki Panetha szczura w 8 dni po napromienieniu dawką 750 R

Widoczna błona otaczająca ziarno (B) oraz krystaloid w obrębie ziarna. Pow. około 72 000 ×

http://rcin.org.pl

AKTYWNOŚĆ WYDZIELNICZA

Pełną aktywność wydzielniczą komórki Panetha myszy uzyskują począwszy od 4 tygodnia życia pozapłodowego [3], tj. w około 3 tygodnie po pojawieniu się w nabłonku jelitowym. Synteza i egzocytoza ziaren wydzielniczych zachodzi w sposób ciągły, a czas upływający między wytworzeniem a wydzieleniem ziarna zamyka się okresem 5–12 godzin [112]. Dunlop przedstawił dane sugerujące obecność rytmu dobowego aktywności wydzielniczej mysich komórek Panetha. Najwyższą aktywność syntezy ziaren obserwował pod koniec fazy ciemnej, natomiast najniższą pod koniec fazy jasnej [28]. Doniesienia o wpływie karmienia i głodzenia zwierząt na aktywność wydzielniczą komórek Panetha są sprzeczne. Dunlop i Trier nie obserwowali takiego wpływu [28, 105, 112], natomiast Merzel i Ahonen donieśli o zwiększeniu liczby ziaren wydzielniczych w trakcie głodzenia oraz ich nasilonej egzocytozie po podaniu pokarmu [4, 68]. Obserwowano zwiększenie liczby komórek Panetha w nabłonku jelita cienkiego pod wpływem diety mlecznej [88].

Silny wpływ na czynność wydzielniczą komórek Panetha zdaje się wywierać wegetatywny układ nerwowy. Zarówno wagotomia, jak i sympatektomia hamuje wydzielanie komórek Panetha [3]. Podobny wpływ wywiera podanie atropiny [105, 112], natomiast pilokarpina [105, 112] i dopamina [3] powodują pobudzenie syntezy i wydzielania.

Podanie glukagonu lub insuliny znamiennie zwiększa liczbę ziaren wydzielniczych w komórkach Panetha podobnie jak w pęcherzykach trzustkowych i w śliniankach [5].

KOMÓRKI PANETHA W STANACH PATOLOGICZNYCH

Istotnym elementem badań nad wyjaśnieniem funkcji komórek Panetha są obserwacje zmian morfologicznych oraz lokalizacji tych komórek w stanach patologicznych. Zdaniem Otto [78] w każdej gastroenteropatii można dostrzec zmiany w lokalizacji, budowie lub czynności komórek Panetha. W licznych schorzeniach przełyku, żołądka, pęcherzyka żółciowego oraz jelita grubego (choroba wrzodowa żołądka, wrzodziejące zapalenie jelita grubego, zanikowe zapalenie żołądka, anomalia Baretta, rak żołądka, rak okrężnicy) obserwuje się metaplazję nabłonka tych narządów z pojawianiem się komórek Panetha, w których można wykazać obecność lizozymu [51, 54, 58, 82, 93, 95]. W metaplastycznym nabłonku, szczególnie w sąsiedztwie procesów zapalnych, wrzodów lub guzów nowotworowych, lokalizacja i budowa komórek Panetha różni się od tej, którą obserwuje się w obszarach nie dotkniętych metaplazją.

http://rcin.org.pl

Komórki Panetha zawierają często znacznie mniejsze ilości ziaren wydzielniczych, a także często występują tylko w niektórych gruczołach i nie zawsze w ich dnie [58]. Pojawianie się komórek Panetha w nabłonku okrężnicy w przebiegu wrzodziejącego zapalenia jelita grubego jest zjawiskiem niezwykle częstym [82, 116].

W jelicie cienkim i wyrostku robaczkowym w wielu stanach chorobowych (choroba trzewna, amyloidoza, cukrzyca i in.) liczba komórek Panetha zmniejsza się, z wyjątkiem choroby Leśniowskiego - Crohna i gruźlicy jelita, w których obserwuje się czasami zwiększenie liczby tych komórek oraz zmianę ich lokalizacji [7, 8, 24, 35, 52, 62, 85].

Nowotwory z udziałem komórek Panetha są bardzo rzadko spotykane. Dotychczas opisano nieliczne przypadki guzów nowotworowych jelita cienkiego i grubego u człowieka z udziałem tych komórek oraz 2 przypadki eksperymentalnego wywołania takich guzów u myszy i szczurów za pomocą chemicznych karcinogenów [27, 49, 58, 71, 103, 117].

Wyraźne zmiany ultrastruktury komórek Panetha z brakiem zmian morfologicznych w innych typach komórek nabłonka jelitowego, zarówno na poziomie mikroskopu świetlnego, jak i elektronowego, obserwuje się u pacjentów z acrodermatitis enteropathica, której przyczyną jest prawdopodobnie złe wchłanianie cynku [14, 64, 87]. Zmiany, które dotyczą głównie ziaren wydzielniczych, ulegają odwróceniu w kilka miesięcy po rozpoczęciu podawania cynku [14]. Podobne zmiany ultrastruktury komórek Panetha udało się wywołać u szczurów pozbawionych cynku w pożywieniu [77].

Hiperplazję i hipertrofię komórek Panetha z pojawianiem się zmian utrastrukturalnych udaje się wywołać doświadczalnie u królika [17, 50] lub myszy [56] (ryc. 5) poprzez izolację fragmentu jelita cienkiego z ciągłości przewodu pokarmowego. Zmiany budowy i lokalizacji tych komórek są czasowe i zanikają po ponownym włączeniu fragmentu w obręb przewodu pokarmowego [50] lub samoistnie w miarę upływu czasu [56].

Wyraźne zmiany ultrastrukturalne pojawiają się w komórkach Panetha dwunastnicy szczura w przebiegu choroby popromiennej [55]. Zmiany te dotyczą głównie ziaren wydzielniczych z pojawianiem się w nich tworów tubularnych i krystaloidalnych (ryc. 6, 7) podobnych do tych, które obserwowano u szczurów żywionych dietą bezcynkową [77].

FUNKCJA

Przedstawione w poprzednich rozdziałach dane opisujące morfologię i cytofizjologię komórek Panetha w stanach zdrowia i choroby stały się punktem wyjścia dla wielu hipotez dotyczących funkcji tych komórek. Celem niniejszego rozdziału jest przedstawienie proponowanych

http://rcin.org.pl

funkcji komórek Panetha oraz zwrócenie uwagi na fakt, że żadna z tych hipotez nie została dotąd w sposób ostateczny udowodniona.

Komórkom Panetha przypisywano udział w trawieniu pokarmu poprzez wydzielanie enzymów trawiennych, szczególnie dwupeptydaz, do światła jelita cienkiego [1, 11, 114].

Wydzielanie przez komórki Panetha aminokwasów do światła gruczołu jelitowego, a także wychwytywanie pewnych aminokwasów ze światła gruczołu [68, 105, 137] może zdaniem Genta i Creamera świadczyć o aktywnym udziale komórek Panetha w utrzymywaniu homeostazy aminokwasów środowiska wewnątrzjelitowego.

Według Creamera [24] komórki Panetha poprzez wydzielanie zespołu białek i węglowodanów wytwarzają właściwe środowisko dla szybko dzielących się i dojrzewających komórek nabłonka jelitowego, wpływając pośrednio na utrzymanie właściwej struktury błony śluzowej jelita cienkiego. Wydzielina komórek Panetha może w tym wypadku działać jako wewnątrzjelitowa substancja wspomagająca odżywianie komórek nabłonka poprzez układ krwionośny bądź też zawierać troficzną substancję pobudzającą nabłonek gruczołu jelitowego i kosmka. Zdaniem Ahonena potwierdzeniem hipotezy Creamera jest obserwacja, że komórki Panetha pojawiają się w nabłonku w okresie rozwoju gruczołów jelitowych [3].

Badania autoradiograficzne nad zdolnością wychwytywania izotopów metali ciężkich przez komórki Panetha [41] oraz obecność znacznych ilości jonów cynku i wapnia w tych komórkach [70] dały podstawy do przypisania komórkom Panetha roli w wydalaniu tych metali z ustroju [42].

Współistnienie metaplazji komórek Panetha z hiperplazją komórek śluzowych i nadmiernym wydzielaniem śluzu w szeregu enteropatiach może, zdaniem Symondsa [107], świadczyć o roli komórek Panetha w kontrolowaniu lepkości wydzielanego śluzu nie tylko w stanach patologicznych, ale również w warunkach normy.

Hipotezą posiadającą największą liczbę zwolenników oraz posiadającą największą dokumentację doświadczalną jest wiązanie funkcji komórek Panetha z szeroko pojętą rolą bariery obronnej błony śluzowej jelita przed szkodliwymi wpływami środowiska zewnętrznego.

Jak już wspomniano, komórki Panetha syntetyzują i wydzielają enzym bakteriolityczny lizozym (muramidazę), którego substratem jest glikopeptyd ściany komórkowej większości bakterii [22]. Badania ultrastrukturalne ujawniły, że komórki Panetha posiadają zdolność fagocytozy i degradacji w obrębie swego układu lizosomalnego mikroorganizmów flory jelitowej [31]. Ponadto wykazano, że komórki Panetha człowieka i szczura zawierają immunoglobuliny klas IgA i IgG w większych

http://rcin.org.pl

ilościach niż pozostałe typy komórek nabłonka jelita cienkiego [33, 91], choć rozkład tych immunoglobulin w poszczególnych komórkach Panetha jest bardzo heterogenny. Zdaniem Erlandsena [33] immunoglobuliny nie są syntetyzowane w obrębie komórek Panetha, lecz dostają się do nich wraz z opłaszczonymi przez nie mikroorganizmami. Dzięki immunocytochemicznym badaniom nad rozkładem immunoglobuliny A oraz lizozymu u szczura stwierdzono, że obydwa białka związane są z rąbkiem prążkowanym jelita [33]. Łączne występowanie lizozymu i IgA na powierzchni mikrokosmków jelita cienkiego może tworzyć barierę ochronną przeciwdziałającą przyleganiu i penetracji bakterii poprzez szczytowy biegun enterocytów.

ZAKOŃCZENIE

Ilość informacji o budowie i funkcji komórek Panetha znacznie wzrosła w ostatnich latach, a mimo to pozostają one wciąż jednymi z najmniej poznanych komórek ustroju. Wiadomości dotyczące poszczególnych etapów ich rozwoju i różnicowania są często sprzeczne. Tajemnicą pozostaje również znaczenie występowania tych komórek tylko u ssaków. Niejasne są mechanizm i znaczenie metaplazji i hiperplazji tych komórek w stanach patologicznych. Problemy te w powiązaniu z dokładnie poznaną morfologią tych komórek stanowią o atrakcyjności komórek Panetha w badaniach nad różnicowaniem komórek.

LITERATURA

[1] ADAMS C. W. M., TUGAN N. A., The histochemical demonstration of protease by a gelatin - silver film substrate, J. Histochem. Cytochem., **9**: 469—472, 1961.

[2] AHONEN A., PENTTILA A., Effect of some drugs on the uptake of monoamines and their precursors in the mouse Paneth cells, Acta Physiol. Scand., **82**: 59–69, 1971.

[3] AHONEN A., Histochemical and electron microscophic observations on the development, neural control and function of the Paneth cells of the mouse, Acta Physiol. Scand. Suppl., **398**: 1973.

[4] AHONEN A., PENTTILA A., Effects of fasting and feeding and pilocarpine on Paneth cells of the mouse, Scand. J. Gastroent., **10**: 347–352, 1975.

[5] — Effects of glucagon and insulin on the Paneth cells of the mouse duodenum, Experientia, **31**: 1074–1075, 1975.

[6] AHONEN A., Paneth cells phagocytosed by monocytes, J. Submicr. Cytol., **7**: 25–30, 1975.

[7] — Paneth cells in experimental amyloidosis, Scand. J. Gastroent., **12**: 129–134, 1977.

http://rcin.org.pl

[8] ADRICH Z., BOJ E., KRYCZEWSKA A., RYNKIEWICZ H., Budowa błony śluzowej i czynność jelita cienkiego u chorych z cukrzycą, Przegl. Lek., **32**: 782–786, 1975.
[9] ASTALDI G., GRANDINI U., POGGI C., STROSSELLI E., Intestinal biopsy in acute hepatitis, Amer. J. Dig. Dis., **9**: 237–245, 1964.
[10] BACK A., Studies on the lymphocytes in the intestinal epithelium in the chicken, Intern. Arch. Allerg. Appl. Immunol., **39**: 342–351, 1970.
[11] BEHNKE O., MOE H., An electron microscopic study of mature and differentiating Paneth cells in the rat, especially of their endoplasmic reticulum and loysosomes, J. Cell Biol., **22**: 633–652, 1964.
[12] BIZZOZERO G., Über die Schlauchförmigen Drüsen des Magendarmkanals und die Beziehungen ihres Epithels zu dem Oberflächenepithel der Schleimhaut, Mitt. Arch. mikr. Anat., **40**: 325–375, 1892.
[13] BLOCH C. E., Anatomische Untersuchungen über das Magendarmkanal des Säuglings, Jarb. Kinderh., **58**: 121–174, 1903.
[14] BOHANE T. D., CUTZ E., HAMILTON J. R., GALL D. G., Acrodermatitis enteropathica, zinc and the Paneth cell (a case report with family studies), Gastroenterology, **73**: 587–592, 1977.
[15] BOWER D., CHADWIN C. G., Demonstration of Paneth cell granules using naphtalene black, J. Clin. Path., **21**: 107–112, 1968.
[16] CAIRNIE A. B., Renewal of goblet and Paneth cells in the small intestine, Cell Tiss. Kinet., **3**: 35–45, 1970.
[17] CASTRO N. M., SASSO W. S., SAAD F. A., Preliminary observations of the Paneth cells of the *Tamandua tetradactyla* Lin., Acta Anat., **38**: 345–352, 1959.
[18] CHENG H., MERZEL J., LEBLOND A. C., Renewal of Paneth cells in the small intestine of the mouse, Am. J. Anat., **126**: 507–525, 1969.
[19] CHENG H., LEBLOND C. P., Origin, differentiation and renewal of the four main epithelial cell types in the mouse small intestine. I. Columnar cells. Am. J. Anat., **141**: 461–480, 1974.
[20] — Origin, differentiation and renewal of the four main epithelial cell types in the mouse small intestine. IV. Paneth cells, Am. J. Anat., **141**: 521–536, 1974.
[21] — Origin, differentiation and renewal of the four main epithelial cell types in the mouse small intestine. V. Unitarian theory of the origin of the four epithelial cell types, Am. J. Anat., **141**: 537–562, 1974.
[22] CHIPMAN D. M., SHARON N., Mechanism of lysozyme action, Science, **165**: 454–465, 1969.
[23] CLARA M., Bieträge zur Kenntnis des Vogeldarmes. IV. Über das Vorkommen von Körnerzellen vom Typus der Panethschenzellen bei den Vögeln, Z. mikr. Anat. Forsch., **6**: 55–75, 1926.
[24] CREAMER B. C., Paneth - cell function, Lancet, **1**: 314–316, 1967.
[25] DECKX R. J., VANTRAPPEN G. R., PAREIN M. M., Localization of lysozyme activity in a Paneth cell granule fraction, Biochem. Biophys. Acta, **139**: 204–207, 1967.
[26] DEVIK F., Intestinal celly kinetics in irradiated mice. A quantitative investigation of the acute reaction to whole body roentgen irradiation, Acta Radiol., **10**: 129–149, 1971.
[27] DUNN T. B., KESSEL A. M., Paneth cells in carcinomas of the small intestine in a mouse and in rat, J. Nat. Cancer Inst., **6**: 113–118, 1945.

http://rcin.org.pl

[28] DUNLOP A., Evidence for diurnal rhythm in Paneth cells, Anat. Rec., **187**: 570–581, 1977.
[29] EISENHUTH I., GEYER G., Zytologische und zytochemische Untersuchungen über Veränderungen am Darmepithel der Albinomaus durch chronische Behandlung mit Antimetaboliten Riboazauracil und Aethionin, Acta Anat., **25**: 321–328, 1966.
[30] ELMES M. E., The Paneth cell population of the small intestine of the rat - effects of fasting and zinc deficiency on total count and on dithizone - reactive count, J. Path., **118**: 183–191, 1976.
[31] ERLANDSEN S. L., CHASE D. G., Paneth cell function, phagocytosis and intracellular digestion of intestinal microorganisms. I. *Hexamita muris*, II. Spiral microorganisms, J. Ultrastructure Res., **41**: 296–333, 1972.
[32] ERLANDSEN S. L., PARSONS J. A., TAYLOR T. D., Ultrastructural immunological localization of lysozyme in Paneth cells of man, J. Histochem. Cytochem., **22**: 401–413, 1974.
[33] ERLANDSEN S. L., RODNING C. B., MONTERO C., PARSONS J. A., LEWIS A., WILSON I. D., Immunological identification and localization of immunoglobulin A within Paneth cells of the rat small intestine, J. Histochem. Cytochem., **24**: 1085–1092, 1976.
[34] ERLANDSEN S. L., MONTERO C,. PARSONS J. A., Lysozyme content of the rat Paneth cells in normal and germfree animals as determined by radioimmunoassay (RIA), Anat. Rec., **187**: 574 (streszczenie), 1977.
[35] FALCZUK K. R., PERETT J. L., ISSELBACHER K. J., Serum lysozyme in Crohn's disease and ulcerative colitis, N. Engl. J. Med., **292**: 395–397, 1975.
[36] FERGUSON A., Secretion of IgA into "antigen - free" isografts of mouse small intestine, Clin. Exp. Immunol., **17**: 691–696, 1974.
[37] GENT A. E., CREAMER B., Paneth cell secretion, Digestion, **7**: 1–12, 1972.
[38] GEYER G., Lysozyme in Paneth cell secretions, Acta Histochem., **45**: 126–132, 1973.
[39] GHOOS Y., VANTRAPPEN G., The cytochemical localization of lysozyme in Paneth cell granules, Histochem., J., **3**: 175–178, 1971.
[40] GRAND R. J., WATKINS J. B., TORTI F. M., Development of the human gastrointestinal tract. A review, Gastroenterology, **70**: 790–810, 1976.
[41] HALBHUBER K. J., STIBENZ J., GEYER G., Autoradiographische Untersuchungen über die Synthese des Prosekrets in den Panethschen Körnerzellen des Dünndarms der Albinomaus, Acta Histochem., **42**: 143–156, 1972.
[42] HALBHUBER K. J., STIBENZ H. J., HALBHUBER U., Autoradiographische Untersuchungen über die Verteilung einiger Metalisotopen im Darm von Laboratoriumstieren. Ein Beitrag zur Ausscheidungsfunktion der Panethschen Körnerzellen, Acta Histochem., **35**: 307–319, 1970.
[43] HALLY A. D., The fine structure of the Paneth cells, J. Anat., **92**: 268–277, 1958.
[44] HAMPERL, Vien. akad. Anz. No 14, 1923 cyt. za Watson 1960.
[45] HAMPTON J. C., Effects of fixation on the morphology of Paneth cell granules, Stain Techn., **40**: 283–290, 1965.
[46] — Effects of ionizing radiation on the fine structure of Paneth cells in the mouse, Radiation Res., **28**: 71–83, 1966.
[47] — Fine structure of the intestinal epithelium after 3 krads of X - rays, [w] Gastrointestinal Radiation Injury, Sullivan M. F., Excerpta Medica Foundation, 13–26, 1968.

http://rcin.org.pl

[48] HERTZOG A. J., The Paneth cell, Am. J. Path., **13**: 351–364, 1937.
[49] HOLMES E. J., Neoplastic Paneth cells, Cancer., **18**: 1416–20, 1965.
[50] KEREN D. F., ELLIOTT H. L., BROWN G. D., YARDLEY J. H., Atrophy of villi with hypertrophy and hyperplasia of Paneth cells in isolated (Thiry - - Vella) ileal loops in rabbits. Light - microscopic studies, Gastroenterology, **68**: 83–93, 1975.
[51] KLOCKARS M., REITAMO S., REITAMO J. J., MOLLER C., Immunohistochemocal identification of lysozyme in intestinal lesions in ulcerative colitis and Crohn's disease, Gut, **18**: 377–381, 1977.
[52] KRYCZEWSKI A., BOJ E., ADRICH Z., Zmiany histologiczne błony śluzowej i czynności jelita cienkiego u chorych z marskością wątroby, Przegląd Lek., **32**: 777–781, 1975.
[53] KUROSUMI K., Electron microscopic analysis of the secretion mechanism, Int. Rev. Cytol., **11**: 1–24, 1961.
[54] LAITIO M., Intestinal, gastric body and central type mucosal metaplasia in the gallbladder, Beitr. Path., **159**: 271–279, 1976.
[55] LAMPRECHT J., LEWICKI Z., Crystalline and tubular inclusions in Paneth cell granules after whole body X - ray irradiation, Ann. Med. Sect. Pol. Acad. Sci., **21**: 1–2, 1976.
[56] LAMPRECHT J., Morfologia oraz różnicowanie nabłonka dwunastnicy myszy w syngenicznym przeszczepie pod torebkę nerki. Badania strukturalne i ultrastrukturalne, Rozprawa doktorska, Warszawa 1976.
[57] LAUMONIER R., La cellule intestinale de Paneth normale et patologique, Presse Med., **75**: 429–434, 1967.
[58] LAUREN P., The cell structure and secretion in intestinal cancer, Acta Path. Micr. Scand., suppl. 152, 1961.
[59] LEBLOND C. P., MESSIER B., Renewal of chief cells and goblet cells in the small intestine as shown by radioautography after injection of 3H - thymidine into mice, Anat. Rec., **132**: 247–259, 1958.
[60] LEWELLYN J. L., ERLANDSEN S. L., Differentiation of Paneth cells in neonatal rat intestine using immunocytochemistry for the localization of lysozyme, J. Histochem. Cytochem., **24**: 616 (streszczenie), 1976.
[61] LEWIN K., Neoplastic Paneth cells, J. Clin. Path., **21**: 476–87, 1968.
[62] — Histochemical observations on Paneth cells, J. Anat., **105**: 171–176, 1969.
[63] — The Paneth cell in health and disease, Ann. R. Coll. Surg. Eng., **44**: 23–34, 1969.
[64] LOMBECK J., VON BASSEWITZ D. B., BECKER K., TINSCHMANN P., KASTNER H., Ultrastructural findings in acrodermatitis enteropathica, J. Ped. Res., **8**: 82–88, 1974.
[65] LOMBECK J., SCHNIPPERING H. G., RITEL F., FEINEDEGEN L. E., BREMER H. J., Absorption of zinc in acrodermatitis enteropathica, Lancet, **1**: 855–856, 1975.
[66] MACHALETT H., GEYER G., Zum Verhalten der Panethschen Körnerzellen in Dünndarm der Maus nach höher oder tiefer Ligatur des *Ductus choledochus*, Z. Mikrosk. Anat. Forsch., **80**: 369–378, 1969.
[67] MALINSKY J., KOJECKY Z., Human small intestine mucosa during ontogenetic development, Acta Universitatis Palackianae Olomucensis Facultatis Medicae, Praga, suppl. 15, 1976.
[68] MERZEL J., Some histophysiological aspects of Paneth's cells of mice as

http://rcin.org.pl

shown by histochemical and radioautographic studies, Acta Anat., **66**: 603–630, 1967.

[69] MEYER C., HAUBENREISER L., GEYER G., Vergleichende histochemische Untersuchungen am Prosekretmaterial der Panethschen Körnerzellen, Acta Histochem., **35**: 392–401, 1970.

[70] MILLOR M. J., VINCENT N. R., MAWSON C. A., An autoradiographic study of the distribution of zinc - 65 in rat tissues, J. Histochem. Cytochem., **9**: 111–116, 1961.

[71] MIYAJIMA H., TAKEUCHI T., Paneth cell tumor — an additional case of duodenal adenoma with malignant change, Beitr. Path., **157**: 419–425, 1976.

[72] MIRKIN B. L., Onthogenesis of the adrenergic nervous system function and pharmacologic implications, Fed. Proc., **31**: 65–73, 1972.

[73] MONTERO C., ERLANDSEN S. L., Immunocytochemical and histochemical studies on intestinal epithelial cell producing both lysozyme and mucopolysaccharide, J. Histochem. Cytochem., **24**: 615–616 (streszczenie), 1976.

[74] MOTTET M. K., BODY R., Primate Paneth cell degeneration following methylmercury hydroxide ingestion, Am. J. Path., **84**: 93–106, 1976.

[75] MORSON B. C., Gastric polyps composed of intestinal epithelium, Brit. J. Canc., **9**: 550–556, 1955.

[76] MOLLER I., KUNNERT B., GEYER G., Über die Entwicklung der Paneth Zellpopulation im Dünndarm jünger Mäuse, Anat. Anz., **126**: 266–274, 1970.

[77] OTTO H. F., WEITZ S., Elektronenmikroskopische Untersuchung an Panethzellen der Ratte unter zincarmer Diät, Beitr. Path., **145**: 336–349, 1972.

[78] OTTO H. F., FETT R., Zur Orthologie und Pathologie Panethscher Körnerzellen. Quantitative, licht- und elektronenmikroskopische Untersuchungen beim Menschen, Virch. Arch. Abt. A, **356**: 187–206, 1972.

[79] OTTO H. F., Investigation on the ultrastructure of the small intestine of FW - 49 rats reared in germ - free conditions. I. Epithelial finding with special reference to Paneth cells, Virch. Arch. Abt. A, **360**: 235–257, 1973.

[80] PAETERS T., VANTRAPPEN G., The Paneth cell. A source of intestinal lysozyme, Gut, **16**: 553–558, 1975.

[81] PANETH J., Über die sezernierenden Zellen des Dünndarmepithels, Arch. Mikr. Anat., **31**: 113–191, 1888.

[82] PATERSON J. C., WATSON S. H., Paneth cell metaplasia in ulcerative colitis, Am. J. Path., **38**: 243–249, 1961.

[83] PATZELT V., Der Darm, [w] Handbuch der mikroskopischen Anatomie des Menschen, J. Springer, Berlin 1936.

[84] PENTTILA A., AHONEN A., Binding of 1 - 3,4 - dihydroxyphenylalanine and dopamine in cytoplasmic granules of Paneth cells, Experientia, **25**: 70–72, 1969.

[85] PERILLIE P. E., KHAN K., FINSCH S. C., Serum loysozyme in pulmonary tuberculosis, Am. J. Med. Sci., **265**: 297–302, 1973.

[86] PITHA J., The fine structure of membraneous inclusions in the Paneth cells of rabbit, Z. Zellforsch., **90**: 563–569, 1968.

[87] POLANCO I., Acrodermatitis enteropathica, zinc and ultrastructural lesions in Paneth cells, Lancet, **1**: 430, 1976.

[88] RECKNAGEL J., GEYER G., HALBHUBER K. J., Quantitative Untersuchungen über die Entwicklung der Panethzellpopulation in Dünndarm der Maus bei aussschliesslicher Milchernährung, Anat. Anz., **132**: 523–529, 1972.

http://rcin.org.pl

[89] RIECKEN E. O., PEARSE A. G. E., Histochemical study on the Paneth cell in the rat, Gut, **7**: 86–93, 1966.

[90] RIVA A., ZACCHEO D., La localizzatione istoimica di idrolasi acide nelle cellule di Paneth del digiuno amano, Boll. Soc. Ital. Biol. Sper., **44**: 933–934, 1968.

[91] RODNING C. B., Immunoglobulins within human small intestinal Paneth cells, Lancet, **1**: 984—987, 1976.

[92] SCHAFER H. J., OTTO H. F., The morphology of the intestinal calcium excretion by the Paneth cell of rat, mouse and man, [w] Calcium Metabolism, Bone and Metabolic Diseases, F. Kuhlencordt, H. P. Kruse, Springer Verlag, 1975, 343–348.

[93] SCHARFENBERG J. C., DE CAMP P. T., Neoplastic Paneth cells. Occurrence in an adenocarcinoma of a Meckel's diverticulum. Am. J. Clin. Path., **64**: 204–208, 1975.

[94] SCHMIDT J. E., Beiträge zur normalen und pathologischen Histologie einiger Zellarten der Schleimhaut des menschlichen Darmkanals, Arch. Mikr. Anat., **66**: 12–40, 1905.

[95] SCHREIBER D. S., APSTEIN M., HERMOS J. A., Paneth cells in Barrett's esophagus, Gastroenterology, **74**: 1302–1304, 1978.

[96] SCHWALBE G., Beiträge zur Kenntnis der Drüsen in den Darmwandungen, in's Besondere der Brunerschen Drüsen, Arch. Mikr. Anat., **8**: 92–140, 1872.

[97] SELZMAN H. M., LIEBELT R. A., Paneth cell granules of mouse intestine, J. Cell Biol., **15**: 136–139, 1962.

[98] SINGH J., The distribution of Paneth cells in the human small intestine, Anat. Anz., **128**: 60, 1971.

[99] SINKE G., GEYER G., Untersuchungen über die quantitative Verteilung der Panethschen Körnerzellen im Dünndarm von Maus, Ratte und Meerschweinchen, Anat. Anz., **123**: 169–178, 1968.

[100] SPECHT W., Morphology of the intestinal wall. Its mucous membrane under normal and experimental conditions, [w] Intestinal Permeation, Workshop Conferences Hoechst, W. Kramer, F. Lauterbach, Excerpta Medica, 1977, 4–40.

[101] SPICER S. S., STALEY M. W., WETZEL M. G., WETZEL B. K., Acid mucosubstance and basic protein in mouse Paneth cells, J. Histochem. Cytochem., **15**: 225–242, 1967.

[102] STAMPFL B., Die intravitale histochemische Darstellung des Zincs durch Dithison, Acta Histochem., **8**: 406–447, 1959.

[103] STERN J. B., SOBEL H. J., Jejunal carcinoma with cells resembling Paneth cells, Arch. Path., **72**: 47–50, 1961.

[104] STIBENZ A., GEYER G., Postnatale Etwincklung der Paneth Zellen im Dünndarm der Maus unter Cortisol Einfluss, Z. Mikr. Anat. Forsch., **88**: 529–536, 1974.

[105] STANLEY M. W., TRIER J. S., Morphologic heterogeneity of mouse Paneth cell granules before and after secretory stimulation, Am. J. Anat., **117**: 365–384, 1965.

[106] SUBBUSWAMY S. G., Paneth cells and goblet cells, J. Path., **111**: 181–189, 1973.

[107] SYMONDS D. A., Paneth cell metaplasia in diseases of the colon and rectum, Arch. Path., **97**: 343–347, 1974.

http://rcin.org.pl

[108] TAYLOR J. J., FLAA R. C., Histochemical analysis of Paneth cell granules in rats, Arch. Path., **77**: 278–285, 1964.
[109] TONER P. G., Cytology of intestinal epithelial cells, Int. Rev. Cytol., **24**: 233–343, 1974.
[110] TRASHER J. D., GREULICH R. C., The duodenal progenitor population. III. The progenitor cell cycle of principal, goblet and Paneth cells, J. Exp. Zool., **161**: 9–19, 1966.
[111] TRIER J. S., The Paneth cells: an enigma, Gastroenterology, **51**: 560—565, 1966.
[112] TRIER J. S., LORENZSON V., GROEHLER K., Pattern of secretion of Paneth cells of the small intestine of mice, Gastroenterology, **53**: 240–249, 1967.
[113] THROUGHTON W. D., TRIER J. S., Paneth and goblet cell renewal in mouse duodenal crypts., J. Cell Biol., **41**: 251–267, 1969.
[114] VAN GENDEREN H., ENGEL C., On the distribution of some enzymes in the duodenum and the ileum of the rat, Enzymologie, **5**: 71–78, 1938/1939.
[115] VESTFRID M. A., ZABALA SUAREZ J. E., Paneth's cell in human appendix. A statistical study, Acta Anat., **97**: 347–350, 1977.
[116] WATSON A. J., ROY A. O., Paneth cells in the large intestine in ulcerative colitis, J. Path. Bact., **80**: 309–316, 1960.
[117] WIEBECKE B., KREY U., LOHRS U., EDER M., Morphological and autoradiographical investigations on experimental carcinogenesis and polyp development in the intestinal tract of rats and mice, Virch. Arch. Abt. A, **360**: 179–193, 1973.
[118] WHEELER E. J., WHEELER J. K., Comparative study of Paneth cells in vertebrates, Anat. Rec., **148**: 350 (streszczenie), 1964.

Otrzymano: 19 grudnia 1978.
Przyjęto: 20 stycznia 1979.

Adres autorów: ul. Chałubińskiego 5, 02 - 004 Warszawa.

http://rcin.org.pl

POSTĘPY BIOLOGII KOMÓRKI TOM 6, NR 2, 1979 (115–129)

HODOWLA NARZĄDOWA, HODOWLA NA SZTUCZNYCH NACZYNIACH WŁOSOWATYCH ORAZ WYTWARZANIE SWOISTYCH PRODUKTÓW KOMÓRKOWYCH IN VITRO

ORGAN CULTURE, CULTURE ON ARTIFICIAL CAPILLARIES, SECRETION OF SPECIFIC CELL PRODUCTS

Stanisława STOKŁOSOWA

Uniwersytet Jagielloński, Instytut Zoologii, Zakład Fizjologii Zwierząt, Pracownia Hodowli Tkanek

Streszczenie. Omówiono metody hodowli narządowych, po które najczęściej sięgają badacze: 1. hodowle stacjonarne na granicy dwufazowej pożywki płynno - gazowej, 2. na plastikowych gąbkach, 3. metody perfuzyjne z metodą hodowli na sztucznych naczyniach włosowatych. Porównano hodowlę narządów zarodkowych i dojrzałych. Przedyskutowano czynniki warunkujące powodzenie hodowli oraz ograniczenie jej stosowania dyfuzją tlenu w eksplantacie i jego wielkością. Większość przykładów cytowanych dotyczy hodowli narządów wydzielających hormony. Zaprezentowano również własny system hodowli narządowej oparty na zasadzie metody Trowella. Przytoczono kilka przykładów hodowli organotypowych, które przyczyniły się do wyjaśnienia lub potwierdzenia ważnych procesów biologicznych.

Summary. Three most often used organ culture techniques have been described: grid, sponge and perfusion cultures. In the latter special attention has been paid to culture on artificial capillaries. The difference between cultures of embryonal and mature organs and tissues as well as factors limitting use of organ culture technique have been discussed. Most examples presented concern culture of endocrine organs and tissues. Significance of the described techniques for some important biological results such as the finding of anti - Müllerian Hormone, epiphyseal - hypophyseal antagonism, differentiation of gonads etc. has been emphasized.

WSTĘP

Pojęcie wzrostu organotypowego zostało wprowadzone przez Maximowa [22] w 1925 r. na określenie wzrostu zorganizowanego w odróżnieniu od wzrostu cytotypowego — niezorganizowanego.

http://rcin.org.pl

Hodowle narządowe, czyli organotypowe, różnią się od hodowli komórkowych, które in vitro tracą charakterystyczną strukturę histologiczną, a często i właściwości fizjologiczne tkanki, z której je wyprowadzono. Przykładem takich różnic mogą być wyniki badania Whittakera [48], który wykazał, że komórki barwnikowe tęczówki, hodowane w pojedynczej warstwie, bardzo szybko tracą zdolność wytwarzania pigmentu. Barwnik pojawia się na nowo w tych komórkach podczas hodowli narządowej osadu otrzymanego z zawieszonych w pożywce i odwirowanych komórek.

Często zdarza się, że wycinek tkanki lub narządu obrasta warstwą niezróżnicowanej tkanki. Franks i Barton [9] hodowali organotypowo eksplantaty prostaty i zauważyli, że zróżnicowany wycinek reagował na androgeny wprowadzone do pożywki, natomiast komórki wyrastające z niego nie reagowały zupełnie. Już tylko te dwa przykłady przemawiają za wyborem techniki hodowli narządowej tam, gdzie chodzi o badanie funkcji tkanek lub narządów z zachowaniem ich struktury i wzajemnych związków czynnościowych. Metoda ta bardziej przypomina warunki istniejące in vivo i częściej wyniki nią uzyskane dają się przenosić na wyniki in vivo.

HODOWLE NARZĄDÓW ZARODKOWYCH

Tkanki zarodkowe uzyskują większość energii na drodze glikolizy, mogą więc przeżywać, a nawet rosnąć w warunkach gorszego zaopatrzenia w tlen. Jedne z pierwszych hodowli założyła Fell [8], hodując zawiązki kości zarodków myszy na skrzepie osocza. Fell [7] opracowała metodę hodowli na szkiełku zegarkowym umieszczonym w szalce Petriego wyłożonej wilgotną watą. Zmiana pożywki polegała na przeniesieniu eksplantatu na świeży skrzep, przygotowany w innym szkiełku zegarkowym.

Chen [3] wprowadził płynne pożywki do metody Fell, a zamiast skrzepu zastosował kawałeczki papieru soczewkowego (lens paper — używany do czyszczenia optyki mikroskopowej), na których ułożone eksplantaty pływały na powierzchni pożywki. Spratt [33] zastąpił skrzep agarem hodując na nim z powodzeniem wczesne zarodki kurcząt.

Tkanki zarodkowe nie zróżnicowane oraz bardziej odporne na niedobór tlenu mogą nie tylko przeżywać przez dłuższy czas w hodowli (kilka tygodni) bez wystąpienia zmian martwiczych w centrum eksplantatu, lecz mogą także różnicować się, a nawet powiększać [10, 11, 49, 50].

http://rcin.org.pl

HODOWLE NARZĄDÓW ZRÓŻNICOWANYCH POBRANYCH Z ORGANIZMÓW DOJRZAŁYCH

W tym przypadku mamy do czynienia bardziej z przeżywaniem eksplantatów niż z ich wzrostem. Dojrzałe narządy bowiem, w przeciwieństwie do zarodkowych, czerpią energię z oddychania, stąd dobre natlenienie hodowli ma ogromne znaczenie. Większość zatem metod hodowli narządowej tkanek dojrzałych uwzględnia ich wymagania tlenowe. Większość też współcześnie stosowanych metod posługuje się pożywkami płynnymi o znanym składzie, wzbogaconymi odpowiednią surowicą lub białkowymi czynnikami stymulującymi wzrost [12, 24]. Hodowle narządowe na pożywce bez surowicy zwykle nie udają się i eksplantaty wcześnie degenerują, chociaż Waymouth [46] opisuje przykłady hodowli wyłącznie na pożywkach syntetycznych. Najczęściej hoduje się eksplantaty na granicy pożywki płynnej i atmosfery gazowej bogatej w tlen mieszany z 5% dodatkiem CO_2. Dwutlenek węgla wraz z dwuwęglanem zawartym w pożywce stanowi bufor utrzymujący stałe pH środowiska. W metodach, gdzie eksplantaty lub agregaty komórek zanurzone są w pożywce, konieczne jest jej natlenianie przed wprowadzeniem do naczyńka hodowlanego lub w czasie przepływu przez nie. Do dziś rozwinięto i zaadaptowano wiele bardzo różnorodnych technik hodowli narządowych. Opis ich można znaleźć w pracach oryginalnych oraz w wielu opracowaniach książkowych [1, 5, 16–19, 27, 30, 31, 45, 47].

HODOWLE NA GĄBKACH I SIATKACH

Narządy i kmórki można hodować na gąbkach plastikowych, a także naturalnych. Leighton [20] zastosował kawałki gąbek powlekanych kolagenem. Liczne tkanki przylegają z łatwością do tak przygotowanych beleczek gąbki nasączonych pożywką i rosną w przestrzeniach między nimi w sposób organotypowy. Gąbki takie nadają się również doskonale do hodowli agregatów komórkowych [25, 26].

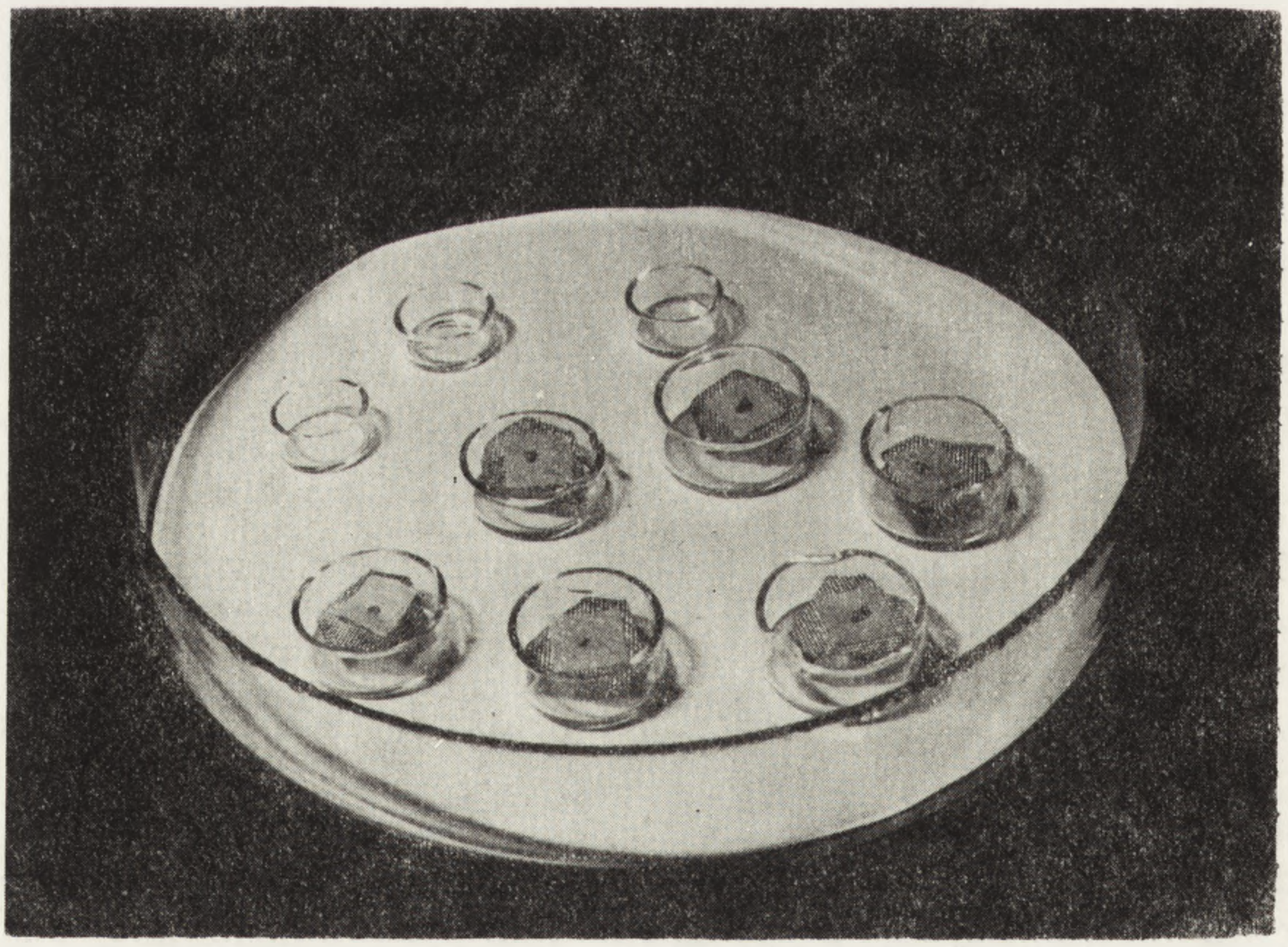
Metoda hodowli na siatkach stalowych została rozwinięta i wprowadzona do hodowli organotypowych przez Trowella [40, 41] i z mniejszymi lub większymi modyfikacjami jest stosowana do dziś. Trowell posłużył się siatką ze stali nierdzewnej do podparcia hodowanej tkanki i utrzymania jej na powierzchni płynnej pożywki. Siatkę tę umieścił on w szkiełku zegarkowym, które wypełniał pożywką tak, aby dotykała siatki od spodu i lekko ją zwilżała. Na siatce można położyć kawałek papieru soczewkowego, zwilżyć go pożywką i na nim położyć hodowany eksplantat, który wzrasta między włókienka papieru i ułatwia potem manipulo-

http://rcin.org.pl

Ryc. 1. Szalka plastikowa produkcji „Falcon Plastics" do hodowli narządowej

Widoczny zbiorniczek na płynną pożywkę z zawieszoną siatką stalową nad nim

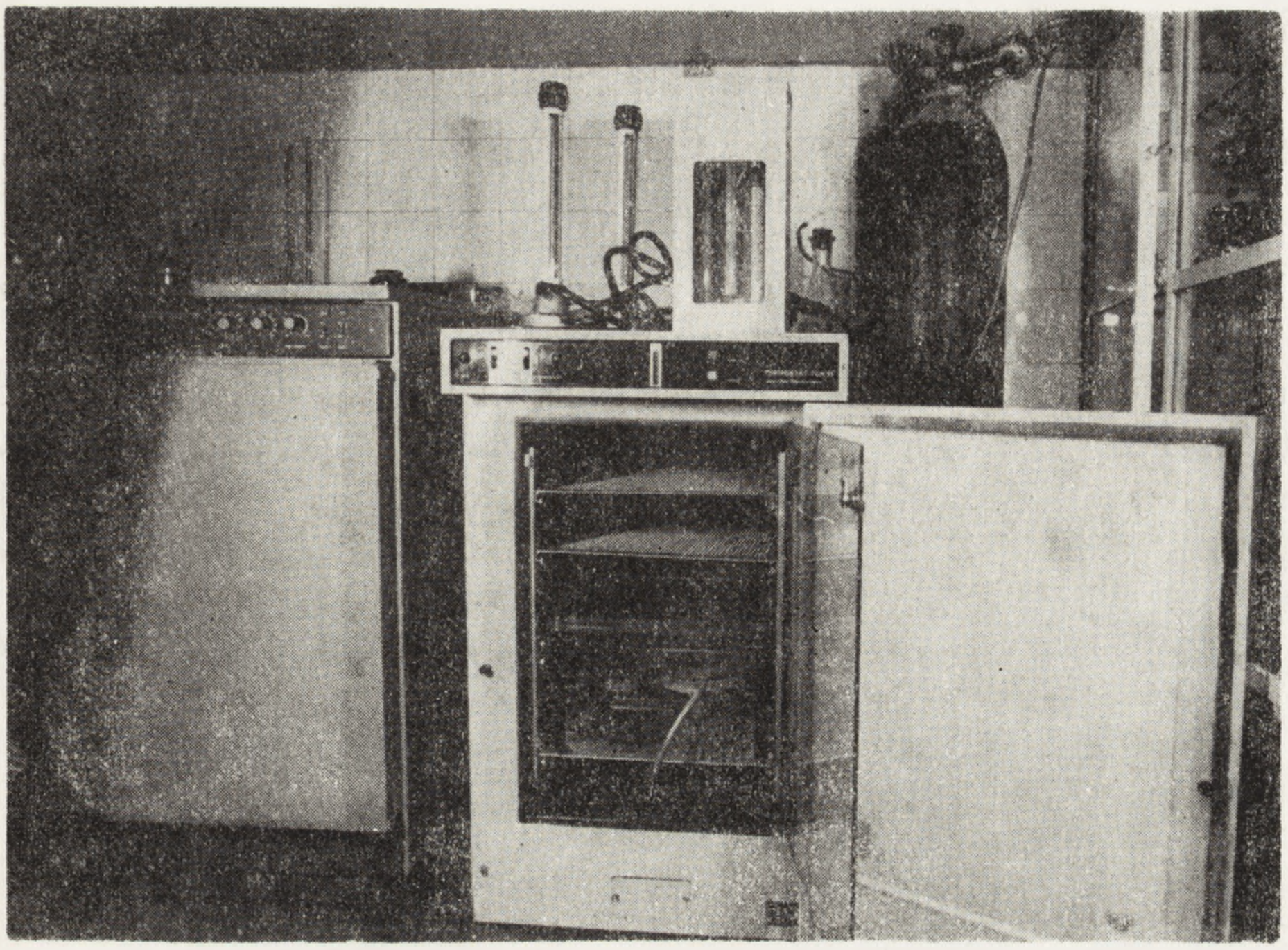
wanie nim przy opracowaniu histologicznym hodowli. Eksplantat można utrwalać, odwadniać itp. razem z papierkiem, co przy małych obiektach ma bardzo duże znaczenie, zmniejszając straty eksplantatów w czasie długiej drogi do zatopienia w parafinie. Szkiełka, zamknięte w szalkach



Ryc. 2. Zestaw miseczek własnej roboty z siatkami stalowymi wewnątrz

Na siatkach kawałki papieru soczewkowego i eksplantaty. Dno szalki Petriego wysłane bibułą filtracyjną

http://rcin.org.pl



Ryc. 3. Plastikowa szczelna komora do natleniania hodowli

Widać wąż doprowadzający tlen do komory z butli stojącej obok termostatu. Na termostacie stoją płuczki gazu i przepływomierze do regulacji ilościowego stosunku tlenu i CO_2

Petriego, przenosił on do skonstruowanej przez siebie komory metalowej, przez którą przepływała mieszanina tlenu i dwutlenku węgla w stosunku 95 : 5%. Można zastosować również nieco inny skład mieszanki [3]: 60% tlenu, 5% dwutlenku węgla i 35% powietrza. Trowell opracował także pożywkę specjalnie dla hodowli narządowych, zwaną Medium T 8 [23]. Metoda Trowella jest typową hodowlą stacjonarną na granicy dwufazowej pożywki. Jej celem jest zapewnienie optymalnego dopływu tlenu do hodowanego eksplantatu. Mimo to jednak, zwłaszcza w przypadku narządów sferycznych, jak pęcherzyk jajnikowy, czy dość grubych, jak np. jajnik myszy, tak skonstruowane środowisko odżywcze nie wystarcza i wewnątrz narządu pojawia się martwica. Niektórzy badacze [6] uważają, że dwufazowa pożywka nie jest niezbędna do przedłużenia czasu przeżywania eksplantatów, jeżeli obniży się temperaturę hodowli do 24°C. Dzięki temu uzyskuje się znacznie lepszą przeżywalność ciałek żółtych i całych jajników szczura. Thibault [39] uzyskał dobre rezultaty w hodowli pęcherzyków jajnikowych królika, zwiększając ciśnienie fazy gazowej do 1,5–2 atmosfer. Dickens [4] krytykował podnoszenie ciśnienia, twierdząc, że prowadzi to do nieodwracalnego zatrucia tlenem enzymów oddechowych tkanki. Jednakże pomyślne wyniki innych prac [2, 21,

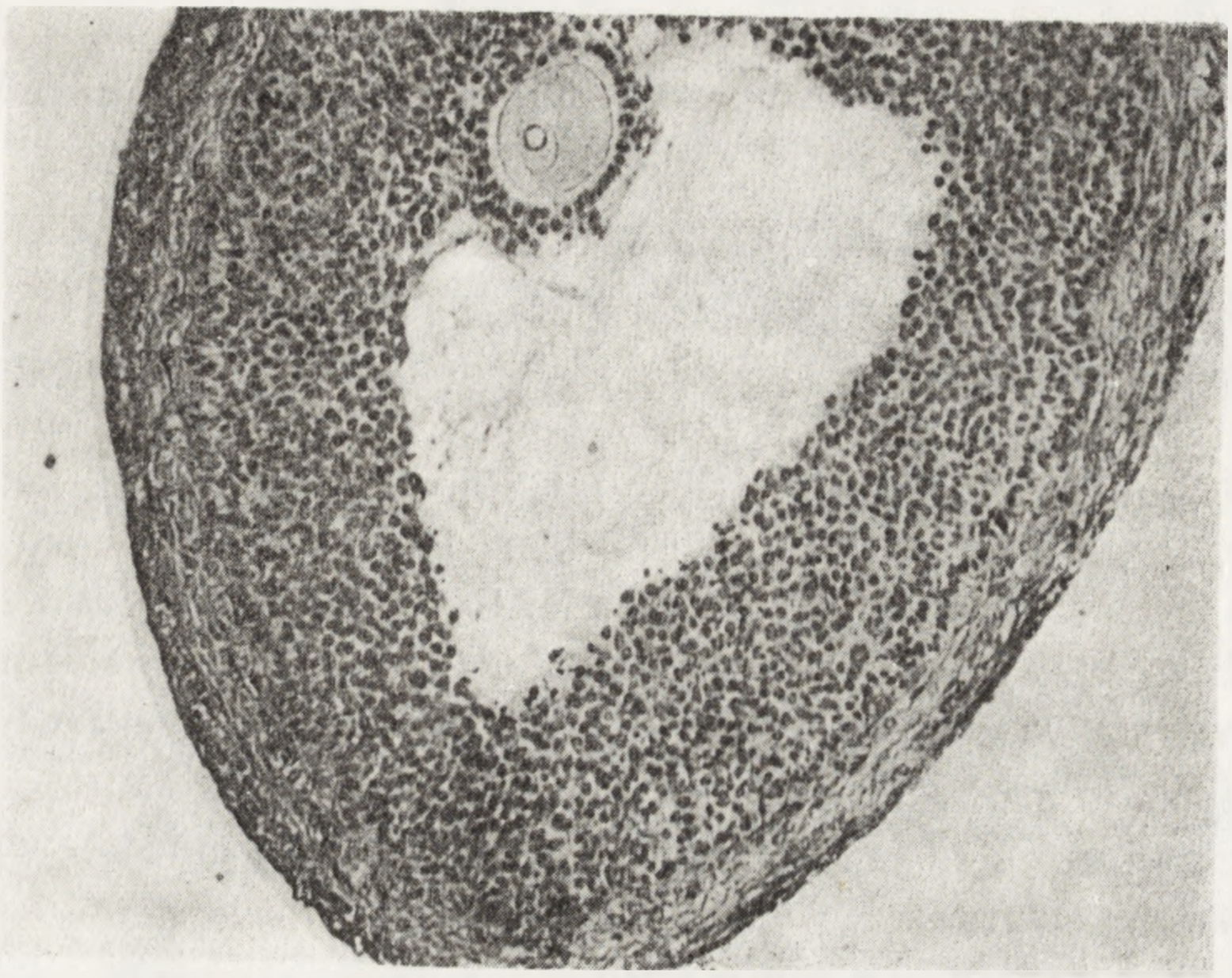
http://rcin.org.pl

39] budzą zaufanie do tej modyfikacji, zwłaszcza gdy chodzi o hodowanie większych eksplantatów. Zamiast siatek umieszczonych w szkiełku zegarkowym, jak w oryginalnej metodzie Trowella, używa się plastikowych szalek firmy Falcon z wgłębieniem na dnie, nad którym zawiesza się odpowiednią również fabrycznie wymodelowaną siatkę lub szklane naczyńka wykonane przez szklarza z rurek szklanych [36]. Rycina 2 przedstawia dwa rozmiary takich szklanych miseczek z siatkami zagiętymi tak, aby utworzyły rodzaj stoliczków, na których układa się papierki i eksplantaty. Pożywkę wprowadza się pod siatkę za pomocą strzykawki. Zmiana pożywki odbywa się również za pomocą strzykawek: osobnej do odciągania „starej" i osobnej do wprowadzania świeżej pożywki. Zamkniętą szalkę Petriego, wypełnioną miseczkami, umieszcza się w szczelnej plastikowej komorze, przez którą przepływa mieszanka tlenu i CO_2 (ryc. 3).

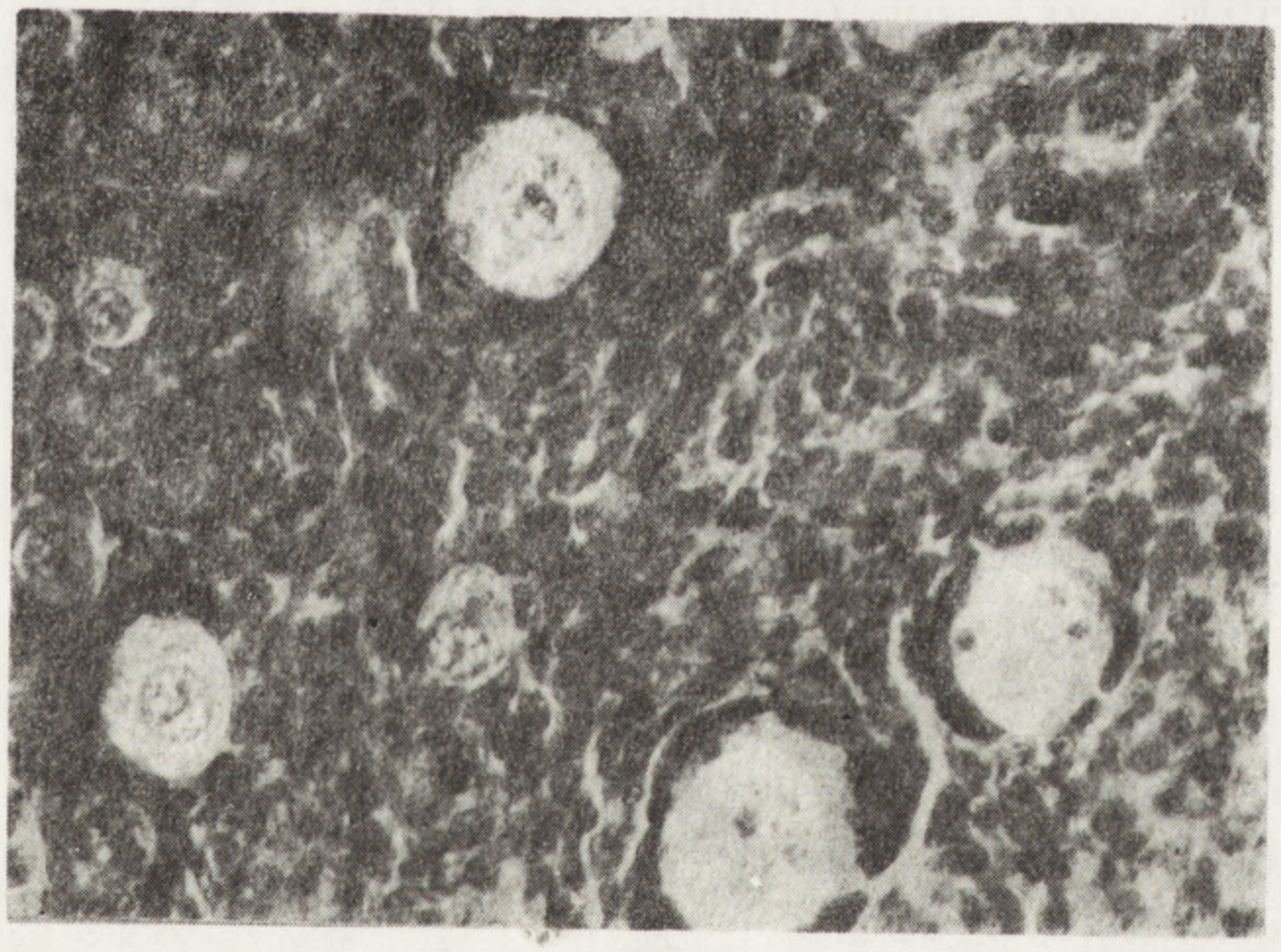
Ryc. 4. Pęcherzyk przedowulacyjny izolowany z jajnika szczura hodowany w systemie przedstawionym na ryc. 2 i 3. Pow. 35×

Metodą tą hodowano izolowane pęcherzyki jajnikowe szczura (ryc. 4 i 5), a także jajniki zarodków myszy (ryc. 6) [35, 37, 38]. W tym systemie uzyskano bardzo dobrą korelację wydzielania pęcherzykowych hormonów sterydowych in vivo i in vitro [30, 38].

http://rcin.org.pl



Ryc. 5. Przekrój przez pęcherzyk jajnikowy szczura po dwóch dniach hodowli. Hematoksylina i eozyna. Pow. 125×



Ryc. 6. Przekrój przez jajnik myszy w 18 dniu życia zarodkowego. Hodowla 6-dniowa. Hematoksylina i eozyna. Pow. 125×

CZYNNIKI OGRANICZAJĄCE STOSOWANIE HODOWLI NARZĄDOWYCH

Metoda ta pozwala jedynie na krótkotrwałe (kilkudniowe) eksperymenty z tkankami zróżnicowanymi. Hodowle te są bardzo pożyteczne w badaniach morfogenetycznych, fizjologicznych, biochemicznych, far-

http://rcin.org.pl

makologicznych i radiologicznych. Szersze ich jednak stosowanie jest ograniczone dwiema trudnościami: 1. wielkością i 2. czasem przeżywania eksplantatów in vitro.

1. WIELKOŚĆ HODOWLI

Jeżeli eksplantat lub narząd przekracza pewną optymalną wielkość, to środkowa jego część obumiera z powodu utrudnionego dostępu tlenu, braku glukozy albo z powodu zatrucia gromadzącym się wewnątrz dwutlenkiem węgla, kwasem mlekowym lub innymi produktami katabolizmu. Wiadomo, że najważniejszym czynnikiem, determinującym wielkość eksplantatu, jest przenikanie tlenu [40, 41]. Opracowano nawet wzór, z którego można obliczyć promień eksplantatu kulistego, w którym nie wystąpi martwica centralna, będzie bowiem do niego przenikał tlen [43]. Ten krytyczny promień wynosi $\sqrt{r = 6DC/A}$, gdzie A jest stopniem zużycia tlenu, C — zawartością tlenu w atmosferze otaczającej eksplantat, D — współczynnikiem dyfuzji tlenu w tkance. Pierwsze dwie wartości można zmierzyć, natomisat współczynnik dyfuzji w żywej tkance nie jest znany i często odnosi się go do wartości dyfuzji tlenu w wodzie. Trowell [42] znalazł dla większości badanych przez siebie narządów, że promień krytyczny był większy w praktyce niż obliczony w stosunku do wody — w niektórych przypadkach nawet o 50%.

Próbowano zwiększyć rozpuszczalność i stężenie tlenu w pożywce przez dodanie hemoglobiny. Niestety, okazała się ona toksyczna dla większości narządów nawet w stężeniu zaledwie 0,5% [43]. Wiadomo z fizjologii ssaków, że zużycie tlenu przez tkanki jest odwrotnie proporcjonalne do wielkości ciała. W świetle tego wydaje się, że małe gryzonie laboratoryjne nie są najlepszymi dawcami tkanek do hodowli narządowej. U krowy np. zużycie tlenu w tkankach wynosi zaledwie 1/3 tej wartości u myszy, zatem krytyczna średnica eksplantatu tkanek krowy wzrasta z 2 do 3,5 mm. Taki wycinek ma 5 razy większą objętość niż wycinek z tkanek myszy. Trowell [42], hodując wycinki różnych narządów krowy, wykazał, że eksplantaty o średnicy 4 mm i ciężarze 20 mg przeżywały w atmosferze tlenowej bez wystąpienia wewnętrznej martwicy. Najbardziej odpowiednie do tego typu hodowli są narządy płaskie, jak np. gruczoł mlekowy myszy, przepona, krezka. Eksplantaty takie mogą mieć dużą powierzchnię. Gruczoł mlekowy myszy może być hodowany w całości. Taka hodowla jest znacznie zdrowsza niż hodowla fragmentu narządu, wykazująca przyspieszoną degenerację.

2. CZAS PRZEŻYWANIA HODOWLI

Narządy zarodkowe przeżywają w hodowli bardzo długo, czasem do kilku miesięcy, a nawet przejawiają intensywny wzrost. W wyniku tego narząd może powiększyć się tak, że wystąpi martwica w jego wnętrzu.

http://rcin.org.pl

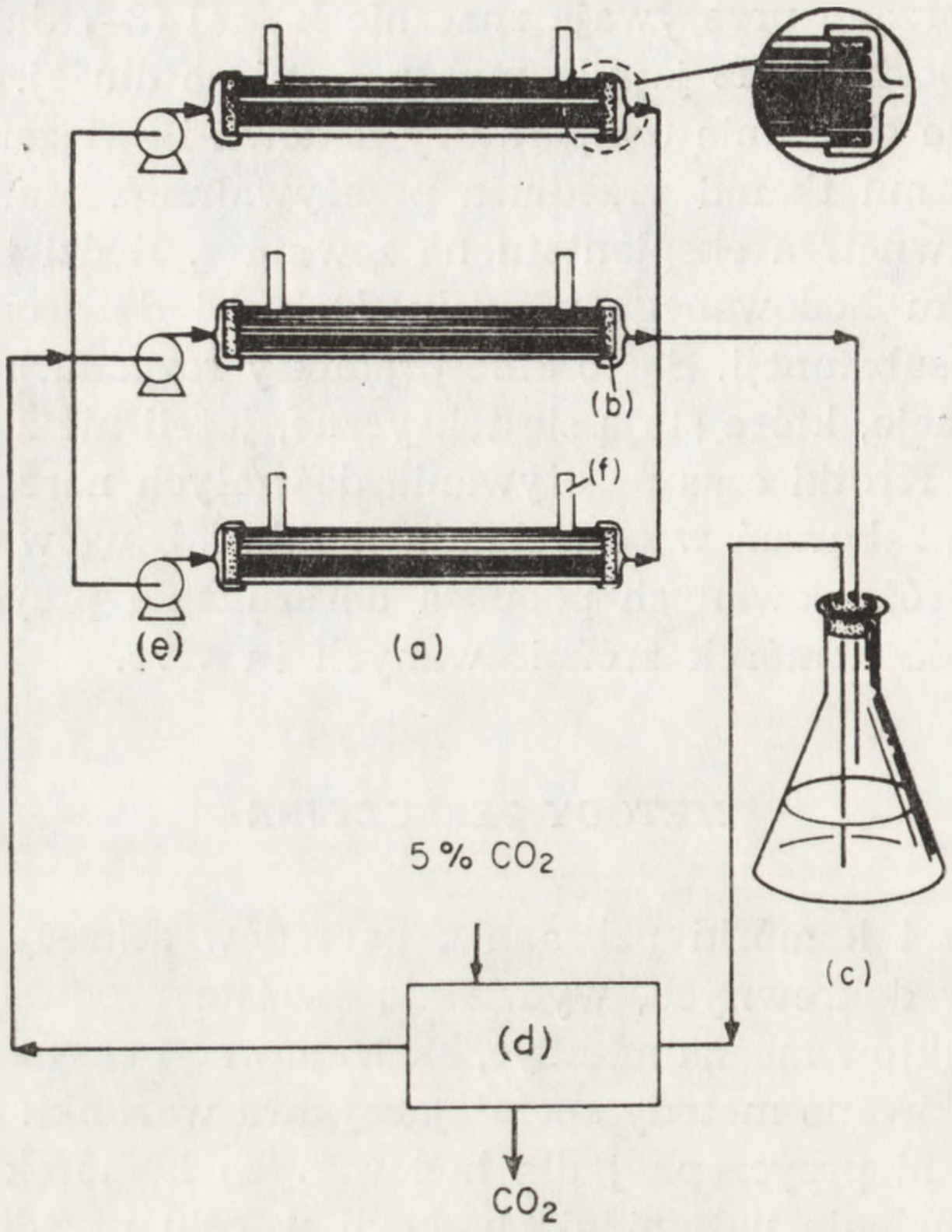
Dojrzałe narządy przeżywają znacznie krócej (3–7 dni), jedynie płaska prostata i postnatalne jajniki myszy — nieco dłużej. Część autorów [6, 40] uważa, że obniżanie temperatury hodowli i związane z tym zwolnienie metabolizmu tkanki przedłuża przeżywalność. Martwica rozprzestrzenia się od wnętrza eksplantatu na zewnątrz. Rodzi to przypuszczenie, że w środku hodowanego narządu dochodzi do gromadzenia słabo dyfundujących substancji. Są to albo produkty rozpadu, albo jakieś wydzielane substancje, które stają się toksyczne, jeżeli nie zostaną usunięte z pożywki [29]. Krótki czas przeżywania dojrzałych narządów może być także wynikiem zaburzeń w oddychaniu tkanki. „Długowieczność" hodowli tkanek niezróżnicowanych pobudza do szukania przyczyn utrzymujących żywotność komórek zróżnicowanych in vivo.

METODY PERFUZYJNE

Eksplantaty i komórki pobrane z narządów sekrecyjnie czynnych, np. z gruczołów dokrewnych, wydzielają swoiste produkty do pożywki. Ilość tych produktów można mierzyć, ekstrahować i oczyszczać. W związku z tym poszukiwano metody spełniającej dwa warunki: 1. zapewnienie dużej powierzchni przyczepnej dla hodowanych komórek lub ich agregatów, 2. poprawienie natlenienia hodowli w celu przedłużenia jej żywotności. Rezultatem był rozwój metod perfuzyjnych, umożliwiających wzrost komórek do gęstości podobnej jak w tkance. Wydzielanie substancji przez takie hodowle jest duże i może być regulowane lub pobudzane odpowiednimi czynnikami hormonalnymi lub farmakologicznymi dodanymi do pożywki.

Opis stosowanych współcześnie metod perfuzyjnych zebrano w książce Kruzego i Pattersona [17]. Jedną z nich, przydatną do badań hormonalnych, jest hodowla na sztucznych naczyniach włosowatych. Autorem jej jest Knazek i wsp. [14, 15]. Polega ona na zastosowaniu plastikowych lub silikonowych rurek kapilarnych, których ściany są przepuszczalne dla gazów oraz substancji o ciężarze cząsteczkowym do 100 000 daltonów. Średnica takich naczyń wynosi 250–350 μ. Pęczek rurek (60–300 sztuk) zlepionych na obu końcach polimeryzującą substancją, umieszczony w szklanym lub plastikowym naczyniu cylindrycznym o wymiarach dobranych do wielkości pęczka, tworzy sieć sztucznych naczyń włosowatych, przez którą ciągle przepływa pożywka, wprawiana w ruchu pompą perfuzyjną. Pęczki są zanurzone w pożywce zawierającej zawiesinę komórek lub ich agregatów, które osadzają się na zewnętrznej ścianie sztucznych naczyń i tam rozrastają się. Zawiesina komórkowa nie miesza się z pożywką perfudowaną przez naczynia (ryc. 7b, d i w kółku). Sztuczne naczynia włosowate doprowadzają substancje odżywcze, testo-

http://rcin.org.pl



Ryc. 7. Schemat przedstawiający urządzenie do hodowli na sztucznych kapilarach złożonych z 3 pęczków sztucznych naczyń [15]

a — 3 pęczki sztucznych naczyń, *b* — pierścień izolujący pęczek naczyniowy od plastikowego cylindra zawierającego hodowane komórki, *c* — zbiornik na pożywkę, *d* — urządzenie natleniania pożywki, *e* — pompa tłocząca pożywkę, *f* — boczne wejście do cylindra służące do wprowadzania zawiesiny komórkowej do przestrzeni pozanaczyniowej

wane, stymulujące i substraty, które dyfundują z nich do przestrzeni pozanaczyniowej zajmowanej przez komórki, a produkty metabolizmu i sekrecji komórek dyfundują w kierunku przeciwnym do wnętrza kapilarów. Produkty metabolizmu oraz substancje wydzielane można oznaczać i mierzyć w próbkach pożywki wypływającej z pęczka.

Schemat systemu perfuzyjnego przedstawia ryc. 7. W urządzeniu takim komórki rosną w strukturze trójwymiarowej i dysponują olbrzymią powierzchnią sztucznych ścian naczyń oraz przestrzenią między nimi (ryc. 8). Opracowanie histologiczne takiej hodowli jest bardzo łatwe, bowiem pęczek naczyń porośnięty komórkami można w całości utrwalać, zatapiać, krajać i barwić rutynowymi metodami. Techniką tą hodowano z powodzeniem, bez odróżnicowania, komórki kosmówczaka (JEG - 7) przez 28 dni. W ciągu całego tego czasu komórki nie tylko energicznie dzieliły się, tworząc kolonie, lecz również wydzielały duże ilości gona-

http://rcin.org.pl

Ryc. 8. Przekrój poprzeczny przez 2 sztuczne naczynia włosowate

Widoczne gęste grupy hodowanych komórek w przestrzeni międzykapilarnej [15]

dotropiny kosmówkowej. Podobnie hodowano guzy szczura i człowieka [14, 15] produkujące prolaktynę. Hodowano również wyspy Langerhansa wyizolowane z trzustek noworodków szczurzych. Uzyskano coś w rodzaju sztucznej trzustki, hodowla bowiem reagowała zwiększeniem wydzielania insuliny w odpowiedzi na zwiększone stężenie glukozy w perfudowanej pożywce.

Przedstawione tu metody, umożliwiające hodowanie małych lub płaskich narządów lub ich fragmentów, dostarczają często wyników zbliżonych do otrzymanych in vivo [15, 16, 27, 38], co najlepiej świadczy o wartości tych metod.

Hodowle metodą Trowella dostarczyły bardzo ważnych informacji

http://rcin.org.pl

o różnicowaniu się gonad, ich sekrecji hormonalnej oraz wrażliwości na hormony [2, 32, 34, 37, 39, 49, 50]. Duże znaczenie mają informacje, uzyskane in vitro, dotyczące dojrzewania pęcherzyka jajnikowego i oocytów [39, 44]. Metodą stacjonarnej hodowli narządowej wykazano hamujący wpływ szyszynki na przysadkę [28], istnienie w jądrach hormonu odpowiedzialnego za uwstecznienie przewodu Müllera oraz udowodniono, że hormon ten wytwarzany jest w komórkach Sertoliego [13]. Nie sposób omówić wszystkie osiągnięcia hodowli narządowych, literatura bowiem od czasu ich wprowadzenia obejmuje niemożliwą do zreferowania liczbę prac. Artykuł niniejszy jest jedynie bardzo pobieżnym przeglądem niektórych technik, wartościowych w badaniach endokrynologicznych.

Obiecująco przedstawia się opisana tu metoda hodowli na sztucznych naczyniach włosowatych. Dotychczas stosowano ją głównie do hodowli tkanek nowotworowych, które mnożą się szybko i wydzielają duże ilości hormonów. Jeżeli udałoby się dzięki niej przedłużyć żywotność hodowli pierwotnych tkanek lub agregatów normalnych komórek gruczołów dokrewnych, wówczas hodowla taka mogłaby się stać źródłem hormonów. Interesujące byłyby badania narządów o złożonej budowie, gdzie sekrecja hormonów nie zawsze jest dziełem jednego typu komórek. Łączenie różnych typów izolowanych komórek w hodowli na sztucznych kapilarach mogłoby rzucić trochę światła na miejsce syntezy i jej sekwencję w narządach o budowie bardzo złożonej. Możliwość łączenia pęczków naczyniowych szeregowo lub równolegle stwarza warunki dla hodowli parabiotycznych, np. komórek przysadki w pierwszym pęczku, a komórek gruczołów docelowych w dalszych układach kapilar. W ten sposób, przepuszczając pożywkę z pierwszej jednostki do następnej, obserwowano by wpływ substancji wydzielanych przez komórki w jednym pęczku na drugi.

Metoda ta stwarza możliwości odżywcze zbliżone najbardziej do warunków fizjologicznych, dlatego pomysłowość i inwencja badacza znajdzie tu wielkie pole do popisu.

LITERATURA

[1] ANSEVIN K. D., LIPPS B., V., Tissue plate, a new technique for long - term organotypic culture, In Vitro, **8**: 483–488, 1973.

[2] BAKER T. G., NEAL P., Gonadotropin induced maturation of mouse Graafian follicles in organ culture, [w] Oogenesis, red. J. D., Biggers and A. W. Schuetz, University Park Press, Baltimore 1972, 377–396.

[3] CHEN J. M., The cultivation in fluid medium of organized liver pancreas and other tissues of feetal rats, Exp. Cell Res., **7**: 518–527, 1954.

http://rcin.org.pl

[4] DICKENS F., The toxic effects of oxygen on brain metabolism and on tissue enzymes, Biochem. J., **40**: 145–148, 1946.
[5] FAINSTAT Th., Organ culture of postnatal rat ovaries in chemically defined medium, Fert. Ster., **19**: 317–321, 1968.
[6] — Submerged organ culture: an improved method, In Vitro, 7: 300–303, 1972.
[7] FELL H. B., Techniques of bone cultivation, [w:] Methods in Medical Research, red. M. B. Fischer, Year Book Publishers, Chicago 1951, Vol. 4, 234.
[8] FELL H. B., ROBINSON R., The growth, development and phosphatase activity of embryonic avian femora and limb buds cultivated in vitro, Biochem. J., **23**: 767–775, 1929.
[9] FRANKS L. M., BARTON A. A., The effect of testosterone on the ultrastructure of the mouse prostate in organ cultures, Exp. Cell Res., **19**: 35–40, 1960.
[10] GAILLARD P. J., Organ culture technique using embryologic watch glasses, [w] Methods in Medical Research, red. M. B. Fischer, Year Book Publishers, Chicago 1951, Vol. 4, 241–259.
[11] GAILLARD P. J., SCHABERG A., Endocrine glands, [w] Cells and Tissues in Culture, red. E. N. Willmer, Academic Press, London, New York 1965, Vol. 2, 631–695.
[12] GOSPODAROWICZ D., ILL CH. R., MESCHER A. L., MORAN J. S., The control of proliferation of steroid producing cells and endothelial cells by the fibroblast growth factors and the epidermal growth factor, [w:] Endocrinology (Poc. Vth Int. Congr. Endocr. Hamburg, July, 1976), red. V. H. T. James, Excerpta Medica, Amsterdam, Oxford, 1977, Vol. 2, 196–205.
[13] JOSSO N., PICARD J. Y., Sex differentiation of Müllerian ducts, [w] Endocrinology (Proc. Vth Int. Congr. Endocr. Hamburg, July, 1976), red. V. H. T. James, Excerpta Medica Amsterdam, Oxford, 1977, Vol. 1, 261–265.
[14] KNAZEK R. A., Endocrine cell culture on artificial capillaries, [w] Pancreatic beta cell culture (Proc. Fifth Workshop Conf. Hoechst, Kützbühel, October, 1976), red. E. von Wasielewski, W. L. Chick, Excerpta Medica, Amsterdam, Oxford, 1977, 29—33.
[15] KNAZEK R. A., GULLINO P. M., Artificial capillaries: An approach to tissue growth in vitro, [w] Tissue Culture, Methods and Applications, red. P. F. Kruze, Patterson M. K., Academic Press, New York, San Francisco, London 1973, 321–327.
[16] KOZIOROWSKA J., Wpływ hormonów na gruczoł mleczny myszy hodowany poza ustrojem, Prace Kom. Med. Dośw. (Pozn. Tow. Przyj. Nauk), **24**: 229–262, 1962.
[17] KRUSE P. F., PATTERSON M. K., Tissue Culture, Methods and Applications, Academic Press, N. York, S. Francisco, London 1973,
[18] KUMEGAWA M., TAKUNO T., MURAYAMA F., Culture of fetal mouse liver in plastic chambers: a new technique for organ culture, In Vitro, **12**: 718–728, 1976.
[19] LANE B. P., MILLER S. L., Preparation of large numbers of uniform tracheal organ cultures for long - term studies, In Vitro, **12**: 147–154, 1976.
[20] LEIGHTON J., Collagen coated cellulose sponge, [w] Tissue Culture, red. P. F. Kruse, M. K. Patterson jr, Academic Press, N. York, S. Francisco, London 1973, 367–371.

http://rcin.org.pl

[21] MACDOUGALL J. D. B., Organ culture under high - pressure oxygen, J. Anat. London, **97**: 149–153, 1963.
[22] MAXIMOW A., Tissue cultures of young mammalian embryos, Contr. Embryol. Carnegie Inst., **16**: 47–51, 1925.
[23] MERCHANT D. J., KAHN R. H., MURPHY W. H., Handbook of Cell and Organ Culture, Burgees Publ. Co, Minneapolis, 1968, 228–229.
[24] MICHL J., Buněčne Kultury, red. J. Bubenik, Academia, Praha 1977, 35–47.
[25] MOSCONA A. A., Tissue reconstruction from dissociated cells, [w] Growth in Living Systems, red. M. X. Zarrow, Basic Books, New York 1961c, 197.
[26] — Studies on cell aggregation: demonstration of materials with selective cell - binding activity, Proc. Nat. Acad. Sci. Washington, **49**: 742–749, 1963.
[27] MOSKALEWSKI S., Isolated islets in tissue culture, [w] Pancreatic beta cell culture (Proc. Fifth Workshop Conf. Hoechst, Kitzbühel, October, 1976), red. E. von Wasilewski, Excerpta Medica, Amsterdam, Oxford, 1977, 65–70.
[28] MOSZKOWSKA A., L'antagonisme epiphysio - hypophysaire. Etude in vivo et in vitro chez l'embryon de poulet Sussex, Ann. Endocr., Paris, **19**: 69–75, 1958.
[29] MURRAY M. R., Discussion on some trends in research on cellular differentiation and morphogenesis, J. Nat. Cancer Inst., **19**: 639–648, 1957.
[30] NEAL P., BAKER T. G., Response of mouse ovaries in vivo and in organ culture to PMSG and HCG, J. Reprod. Fert., **33**: 399–410, 1973.
[31] PARKER R. C., Methods of Tissue Culture, Pitman Medical Publishing Co. Ltd, London 1961.
[32] RYLE M., A quantitative in vitro response to follicle stimulating hormone, J. Reprod. Fert., **19**: 87–90, 1969.
[33] SPRATT N. T., Development in vitro of the early chick blastoderm on yolk and albumen extract saline - agar substrata, J. Exp. Zool., **106**: 345–351, 1947.
[34] STEINBERGER A., STEINBERGER E., PERLOFF W. H., Mammalian testes in organ culture, Exp. Cell Res., **36**: 19–23, 1964.
[35] STOKŁOSOWA S., Badania nad aktywnością hormonalną i luteinizacją izolowanego pęcherzyka jajnikowego in vitro, Zesz. Nauk. Uniw. Jagiell., **20**: 7–35, 1974.
[36] — Small glass dishes for organ culture, Tissue Culture Manual, red. V. J. Evans, V. P. Perry, M. M. Vincent, An activity of the tissue culture association Ime, Rockville, Maryland 1976, 149–150. Procedure No 43811.
[37] STOKŁOSOWA S., NALBANDOV A. V., Luteinization and steroidogenic activity of rat ovarian follicle in vitro, Endocrinology, **91**: 25–32, 1972.
[38] SZOŁTYS M., STOKŁOSOWA S., Relationship between the hour of proestrus and hormonal secretion by preovulatory follicles of rat in organ culture, J. Reprod. Fert., w druku.
[39] THIBAULT C., In vitro maturation and fertilization of rabbit and cattle oocytes, [w] Regulation of Mammalian Reproduction, red. S. J. Crozier, P. Corfman, P. K. Condliffe, C. C. Thomas, Springfield Illinois 1973, 231–247.
[40] TROWELL O. A., A modified technique for organ culture in vitro, Exp. Cell Res., **6**: 246–251, 1954.
[41] — The culture of mature organs in synthetic medium, Exp. Cell Res., **16**: 118–147, 1959.
[42] — Problems in the maintainance of mature organs in vitro, [w] La culture organotypique, Coll Int. C.N.R.S., Paris, Vol. 101, 237–249, 1961.
[43] — Lymphocytes, IV. Culture methods, Lymphocyte survival in vitro, [w] Cell

http://rcin.org.pl

and Tissues in Culture, red. E. N. Willmer, Academic Press, London, New York 1965, 98–107.

[44] TSAFRIRI A., LINDNER H. R., ZOR U., LAMPRECHT S. A., In vitro induction of meiotic division in follicle enclosed rat oocytes by LH, c - AMP and PG E_2, J. Reprod. Fert., **31**: 39—50, 1972.

[45] TURNBULL R. S., MELCHER A. H., Method for maintaining large explants of mature mixed tissue in organ culture, In Vitro, **10**: 6–11, 0000.

[46] WAYMOUTH CHARITY, Construction and use of synthetic media, [w] Cell and Tissue Culture, red. E. N. Willmer, Academic Press, London, N. York 1965, Vol. 1, 99–132.

[47] WILLMER E. N., Cells and Tissues in Culture, Methods, Biology and Physiology, Academic Press, London, N. York 1965, Vol. 1–3.

[48] WHITTAKER J. R., Changes in melanogenesis during the dedifferentiation of chick retinal pigment cells in cell cultures, Develop. Biol., **8**: 99–127, 1963.

[49] WOLFF Et., HAFFEN K., Germ cells and gonads, [w] Cell and Tissues in Culture, red. E. N. Willmer, Academic Press, London, N. York 1965, Vol. 2, 297–743.

[50] WOLFF Et., HAFFEN K., KANY M., WOLFF Em., Essais de cultures in vitro d'organes embryonnaires en miellieux synthetiques, J. Embryol. Exp. Morph., **1**: 55–67, 1953.

Otrzymano: 22 grudnia 1978.
Przyjęto: 20 stycznia 1979.

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

http://rcin.org.pl

http://rcin.org.pl

POSTĘPY BIOLOGII KOMÓRKI TOM 6, NR 2, 1979 (131-133)

SPRAWOZDANIE Z MIĘDZYNARODOWEGO SYMPOZJUM MITOCHONDRIÓW ROŚLINNYCH

(INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON PLANT MITOCHONDRIA)

Staraniem prof. C. Lance'a z Laboratoire de Biologie Végétale IV, Université Pierre et Marie Curie w Paryżu, i prof. C. Duceta z Laboratoire de Physiologie Cellulaire, Centre de Luminy w Marsylii, odbyło się 31 VII - 4 VIII 1978 r., na terenie miasta unwiersyteckiego Luminy w Marsylii, I Międzynarodowe Sympozjum Mitochondriów Roślinnych, w którym udział wzięło 90 osób (14 z USA, 48 z Europy i 3 z innych krajów).

Myślą przewodnią Sympozjum było podsumowanie obecnego stanu badań nad mitochondriami roślin i mikroorganizmów oraz nakreślenie głównych kierunków rozwoju tych badań.

Otwierając Sympozjum C. Lance podał bardzo interesujący i pełen humoru przegląd dotychczasowej literatury z dziedziny struktury i funkcji mitochondriów roślinnych. Do roku 1977 liczba publikacji sięgała około 1500 pozycji (głównie z USA, Anglii i Francji). O ile literatura mitochondriów zwierzęcych jest zdominowana przez materiał ssaków, o tyle to wśród materiału roślinnego panuje ogromna różnorodność, przy czym wybór roślin jest według Lance'a raczej specyficzny dla poszczególnych laboratoriów i decyduje o nim „...szerokość i długość geograficzna oraz lokalne zwyczaje hodowlane i gusty kulinarne. Laboratoria Kalifornii preferują fasolę, ziemniaki i różne owoce, w Illinois żyją z kukurydzy, w Pennsylvanii uwielbiają fasolkę i brukselkę, w Japonii — pataty (a nie ryż !), a laboratoria Francji — Arum, kalafiory i ziemniaki (efekt popularności frytek!)". Do około roku 1965 główną dziedziną badań nad mitochondriami roślin była enzymatyka oddychania i fosforylacja oksydacyjna, później zaś dzięki odkryciu mitochondrialnego aparatu genetycznego, silnie wzrósł udział badań nad biogenezą mitochondriów i składem ich błon, przy równoczesnej inwazji mikroorganizmów jako materiału badawczego. Wzrosło również zainteresowanie transportem przez błony mitochondrialne oraz udziałem mitochondriów w pro-

http://rcin.org.pl

cesach fizjologicznych, w tym głównie dojrzewaniu roślin i zarodków, wzroście, odpowiedzi na czynniki ekologiczne i patogenne, przechładzaniu i starzeniu się. Główną jednak dziedziną w problematyce fizjologicznej jest obecnie odporność na cyjanek i rola alternatywnego toru oddechowego oraz jego mechanizm molekularny.

Materiał Sympozjum rozdzielono na cztery pełnodniowe sekcje, z których każda obejmowała trzy referaty przeglądowe, sesję posterową i dyskusję okrągłego stołu.

Sekcja I. Struktura i funkcja mitochondriów.

1. Czynniki kontrolujące integralność mitochondriów (R. Romani).
2. Cytochromy grupy b w mitochondriach roślinych (B. T. Storey).
3. Charakter i znaczenie sygnałów EPR (P. R. Rich).

W sesji posterowej zaprezentowano 14 komunikatów na temat łańcucha transportu elektronów, a zwłaszcza cytochromu b i paramagnetycznych centrów Fe - S, kontroli oddechowej i I miejsca fosforylacyjnego. Dyskusja koncentrowała się głównie wokół roli i umiejscowienia cytochromu b w łańcuchu oddechowym.

Sekcja II. Funkcje mitochondriów (cd.).

1. Utlenianie NADH w efekcie utleniania jabłczanu przez izolowane mitochondria roślinne (J. M. Palmer).
2. Transport jonów w mitochondriach roślinnych (N. J. Earnshaw).
3. Sprzężenie chemiosmotyczne i przekształcenie energii w mitochondriach roślinnych (A. L. Moore).

Sesja posterowa obejmowała 13 komunikatów dotyczących metabolizmu jabłczanu, transportu (metabolitów, NAD^+, nukleotydów adeninowych i jonów wapnia), gradientu protonowego oraz badań EPR nad oddziaływaniem centrów Fe - S z ubichinonen. Szczególne zainteresowanie wzbudziły pracochłonne modele budowy i wzrostu olbrzymiego mitochrondrium u *Euglena*. Dyskusja skupiała się głównie wokół specyfiki metabolizmu jabłczanu u roślin, transportu NAD^+ oraz sygnałów EPR przy transporcie elektronów.

Sekcja III. Odporność na cyjanek.

1. Oddychanie odporne na cyjanek i antymycynę (W. D. Bonner).
2. Komórkowy aspekt odporności na cyjanek (G. G. Latties).
3. Oddychanie odporne na cyjanek u *Neurospora* (A. M. Lambrowitz).

W sesji posterowej przedstawiono 16 komunikatów dotyczących roli cyklu CoQ w mechanizmie regulacji alternatywnego toru oddechowego, prób izolacji i rekonstytucji oksydazy alternatywnej u roślin i drożdży, charakterystyki kinetycznej toru alternatywnego u roślin i mikroorga-

http://rcin.org.pl

nizmów, jego zależności od Fe i AMP u mikroorganizmów oraz jego roli fizjologicznej, np. w biologicznym mechanizmie obronnym. Dyskusja skupiała się głównie nad znaczeniem centrów Fe-S w alternatywnym torze oddechowym, indukcją tego toru u roślin przez etylen, rolą tego toru w procesach regeneracji i starzenia się oraz nad izolacją i lokalizacją oksydazy alternatywnej.

Sekcja IV.

1. Oddziaływanie mitochondriów z innymi składnikami komórki (H. Beewers).

2. Rola fizjologii mitochondriów w procesie rozwoju roślin (L. H. W. van der Plas).

3. Zależność struktury mitochondrialnej od anoksii (B. B. Vartapetian, odczytane pod nieobecność autora).

Sesja posterowa obejmowała 13 komunikatów dotyczących roli mitochondriów w szeregu procesów fizjologicznych, jak np. wzrost komórek w kulturach, germinacja, indukcja i wzrost kalusa. Trzy komunikaty dotyczyły ruchliwości fosfolipidów w błonach mitochondrialnych, zmiany ich składu przy niskich temperaturach i roli w transporcie elektronów.

Wszyscy uczestnicy wyrazili wdzięczność profesorom Lance'owi i Ducetowi za doskonałą organizację i zachowanie swobodnej formy, zostawiającej dużo czasu na pracę w spontanicznie tworzonych grupach oraz za stworzenie stymulującej atmosfery podczas dyskusji. W wyniku konferencji wskazano najbardziej pożądane i obiecujące kierunku badań oraz zawiązano przyszłe zespoły współpracy różnych laboratoriów, mające wyjaśnić ujawnione na konferencji rozbieżności wyników i interpretacji. Postanowiono ponowić zjazd za kilka lat w miarę nagromadzania się materiału i pojawiania się nowych problemów.

Na szczególne uznanie zasługuje sprawna pomoc ze strony przedstawiciela Elsevier North-Holland Biomedical Press, który na miejscu zebrał i uzgodnił maszynopisy, co pozwoliło na wydrukowanie już w listopadzie 1978 r. wszystkich referowanych materiałów w postaci 8-stronicowych artykułów w książce pt. „Plant Mitochondria" (454 stron), wydanej jako pierwszy tom serii „Developments in Plant Biology".

Jan Michejda

http://rcin.org.pl

KOMUNIKAT

XIV Konferencja Naukowo-Szkoleniowa Komisji Mikroskopii Elektronowej Komitetu Patofizjologii Komórki PAN odbędzie się w Jabłonnie k. Warszawy w dniach 25 - 27 października 1979 r.

http://rcin.org.pl

POSTĘPY BIOLOGII KOMÓRKI TOM 6, NR 2, 1979 (135-137)

SPRAWOZDANIE Z MIĘDZYNARODOWEJ KONFERENCJI POŚWIĘCONEJ *ACANTHAMOEBA*

(*ACANTHAMOEBA* CONFERENCE)

Z inicjatywy grupy biologów z USA zorganizowano w dniach 14 - 16 czerwca 1978 r. pierwszą Międzynarodową Konferencję poświęconą przeglądowi i ocenie szybko rozwijających się badań nad amebami z rodzaju *Acanthamoeba* i rodzajów pokrewnych. Ameby te, zasadniczo wolnożyjące w glebie, można stosunkowo łatwo i masowo hodować aksenicznie, przez co stanowią one coraz bardziej popularny model do badania prostej, eukariotycznej, heterotroficznej komórki. Zarazem pewne gatunki tych ameb są patogenne i mogą stanowić pewne zagrożenie.

Bezpośrednimi organizatorami konferencji byli prof. dr Robert A. Weisman z Zakładu Biochemii, Wright State University w Dayton, Ohio, i prof. dr Thomas J. Byers z Zakładu Mikrobiologii, Ohio State University w Columbus, Ohio, gdzie odbywała się konferencja. Organizatorzy zaprosili biologów i lekarzy pracujących aktualnie nad *Acanthamoeba* i pokrewnymi gatunkami.

Pierwsze dwa dni konferencji wypełniły obszerne referaty przeglądowe. Obrady zainicjował E. D. Korn z National Heart Institute, Bethesda. Omawiając biochemiczny aspekt ruchliwości u *Acanthamoeba* przedstawił on wyniki swych wieloletnich badań nad izolacją i charakterystyką aktyny u tej ameby. Następnie A. R. Stevens z Veteran's Administration Hospital, Gainesville, omówiła biochemiczne badania nad powierzchnią komórki *Acanthamoeba*, a J. E. Thompson z Uniwersytetu Waterloo, Ontario, przedstawił problem wymiany składników i stanu fazowego błon u tej ameby. Zagadnienie translacyjnej kontroli syntezy białka w etapach rozwoju *A. castellanii* omówiła H. Jantzen z Uniwersytetu Heidelberg. Dwa obszerne referaty wygłoszone przez E. Willaerta z Veteran's Administration Hospital w Gainesville i A. J. Martineza z Uniwersytetu Pittsburg dotyczyły bieżącego stanu wiedzy w zakresie acanthamoebiazy i naegleriazy, m. in. kliniczno-neuropatologicznych aspektów tej inwazji.

http://rcin.org.pl

W trzecim dniu konferencji obrady prowadzono w trzech sesjach, poświęconych różnicowaniu, patologii oraz biochemii, biologii komórki i genetyce.

W sesji Różnicowanie, prowadzonej przez R. J. Neffa, centrum zainteresowania stanowiły: problem encystacji *A. castellanii*, a w szczególności wpływ zmienionych warunków wzrostu na encystację oraz zmiany aktywności cyklazy adeninowej podczas różnicowania (S. B. Achar i R. A. Weisman), wpływ berenilu (W. D. O'Dell i C. F. Vercio) i jonów talu oraz rubidu na wzrost i encystację (A. Sobota i W. W. Glazunow), indukcja różnicowania przez dezoksyadenozynę (R. J. Neff), indukcja encystacji lekami (T. J. Byers i wsp.) oraz właściwości katalityczne i strukturę DNA - zależnej polimerazy RNA w czasie encystacji (M. R. Paul i wsp.).

W sesji Patologia, prowadzonej przez G. S. Visvesvarę, omówiono zagadnienia wirulencji, patogenności oraz wrażliwości na leki ameb z rodzaju *Acanthamoeba* i *Naegleria* (J. F. De Jonckheere, grupa A. J. Martineza i G. Visvesvary). Omówiono metodę izolacji i patogenność *A. culbertsoni* i nowo wyróżnionego gatunku *A. royreba* z nowotworowych tkanek ssaków hodowanych in vitro (R. L. Tyndall, E. Willaert i A. R. Stevens) oraz wyświetlono film o izolacji i hodowli rodzajów *Naegleria* i *Acanthamoeba* (E. Willaert i J. B. Jadin). Zasygnalizowano też znaczenie *Acanthamoeba* jako gospodarza i pośrednika w przenoszeniu mykobakterii (J. B. Jadin).

Sesję Biochemia, Biologia Komórki i Genetyka prowadził R. N. Band. Otworzył ją bardzo interesujący komunikat J. J. Sellhamera i T. J. Byersa o wyizolowaniu mutantów *A. castellanii* odpornych na erytromycynę, chloramfenikol i oligomycynę, co zarysowuje obiecującą możliwość rozwoju genetycznych badań nad tą amebą. Fagocytozę u *Acanthamoeba* omówiono z aspektu pomiarów stereologicznych (B. Bowers i T. E. Olszewski) oraz izolacji i charakterystyki błon fagosomów (A. H. Chagla i B. Bowers). Przedstawiono wyniki badań nad wiązaniem wapnia w błonie komórkowej *A. castellanii* (A. Przełęcka, A. Sobota, B. Hrabenda i A. Janossy) oraz badań E. P. R. nad mikrosomalnymi błonami tej ameby (K. P. Paulus i J. E. Thompson). Z zagadnień bioenergetycznych przedstawiono wyniki badań nad zdolnością mitochondriów *A. castellanii* do energizacji i transportu wapnia oraz nukleotydów adeninowych (J. W. Michejda i L. Hryniewiecka) oraz scharakteryzowano odporny na cyjanek alternatywny tor oddechowy u tej ameby (L. Hryniewiecka i J. Jenek). Opracowanie mapy genetycznej mitochondrialnego DNA *A. castellanii* omówił H. J. Bohnert. Sesję zakończono filmem o przebiegu mitozy u *A. castellanii* wykonanym przez B. Moleta przy współpracy A. Bajera.

http://rcin.org.pl

W konferencji uczestniczyło 60 osób z 6 krajów. Z Polski udział wzięli A. Przełęcka i A. Sobota z Instytutu Biologii Doświadczalnej PAN im. M. Nenckiego w Warszawie oraz L. Hryniewiecka i J. Michejda z Instytutu Biologii UAM w Poznaniu.

Konferencja była doskonale zorganizowana i przebiegała w bardzo miłej i koleżeńskiej atmosferze. Pomimo dużej ilości referatów wiodących i komunikatów, pozostawiono dużo czasu na swobodne dyskusje oraz zwiedzenie Zakładu Mikrobiologii Uniwersytetu Stanowego Ohio, w którym grupa T. J. Byersa prowadzi prace nad izolacją i charakterystyką biochemiczną mutantów *A. castellanii*.

Pod koniec obrad postanowiono kontynuować ścisły kontakt między wszystkimi laboratoriami pracującymi nad *Acanthamoeba* i innymi wolnożyjącymi amebami, prowadzić stałą wymianę informacji w zakresie badań podstwowych i stosowanych oraz ponawiać konferencje w odstępach dwuletnich; następna została zaplanowana na rok 1980 w USA.

Specjalną uwagę zwrócono na potencjalną patogenność rodzaju *Acanthamoeba* i zalecono przestrzeganie odpowiednich środków ostrożności przy pracy laboratoryjnej nawet z dotychczas niepatogennymi szczepami. Postanowiono opracować międzynarodowy rejestr (IFAR) wolnożyjących ameb obejmujący dane i preparaty ze znanych lub domniemanych przypadków chorób wywołanych amebami wolnożyjącymi. Opracowanie to powierzono drowi G. Healy'emu i drowi G. Visvesvarze z Centrum Zwalczania Chorób (CDC) w Atlancie. Drowi R. N. Bandowi z Zakładu Zoologii Uniwersytetu Michigan powierzono rozpoczęcie prac nad opracowaniem katalogu istniejących szczepów *Acanthamoeba*, *Naegleria* i innych rodzajów oraz zorganizowanie centralnego ośrodka hodowli zasadniczych szczepów. W Polsce różne gatunki *Acanthamoeba* i pokrewnych rodzajów ameb wolnożyjących hodowane są m. in. w Zakładzie Biologii i Parazytologii Lekarskiej AM w Poznaniu oraz w Zakładzie Mikrobiologii UMC w Lublinie. Akseniczne, masowe hodowle szczepu *A. castellanii* Neff utrzymywane są od 15 lat w Zakładzie Biochemii UAM w wariancie o wzroście powolnym (czas generacji 20 godz.) i szybkim (czas generacji 8 godz.).

Lilla Hryniewiecka

http://rcin.org.pl

KOMUNIKAT

Szósty Międzynarodowy Kongres Protozoologiczny odbędzie się w Warszawie w dniach 5 - 11 lipca 1981 r. Organizatorami Kongresu są: Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN w Warszawie, Komitet Cytobiologii Polskiej Akademii Nauk (krajowa grupa ECBO — Federacji Europejskich Towarzystw Biologii Komórki) i Sekcja Protozoologiczna Polskiego Towarzystwa Zoologicznego.

Kongres jest otwarty dla protozoologów wszystkich specjalności. Program naukowy przewiduje: referaty przeglądowe z najważniejszych dziedzin protozoologii, sympozja naukowe, sesje dla prezentowania zgłoszonych komunikatów oraz sesje plakatowe.

Sympozja i komunikaty będą zgrupowane w następujące sekcje:

Systematyka i filogeneza *Protozoa*
Genetyka i morfogeneza
Rozwój i cykle życiowe
Fizjologia, biochemia i immunologia
Ruch i zachowanie
Ekologia wolnożyjących i pasożytniczych *Protozoa*

Osoby zainteresowane uczestnictwem w kongresie powinny zgłaszać się o bardziej szczegółowe informacje pod adresem:

Doc. dr. Stanisław L. Kazubski
Sekretarz Generalny
VI Międzynarodowego Kongresu Protozoologicznego
Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN
02 - 093 Warszawa, ul. Pasteura 3

Termin wstępnych zgłoszeń upływa 1 marca 1980 r.

http://rcin.org.pl

POSTĘPY BIOLOGII KOMÓRKI TOM 6, NR 2, 1979 (139–140)

D. G. MACKEAN, Introduction to Biology.

Wydanie barwne (*in quarto*), w twardej okładce. John Murray Ltd., Londyn. Funtów ang. 3,95.

Książka, zgodnie z tytułem, ma na celu wprowadzenie czytelnika z podstawy biologii. Przeznaczona jest w zasadzie dla studentów kursu zerowego w Wielkiej Brytanii oraz dla tych czytelników, którzy pragną zaznajomić się z biologią w celu poszerzenia własnej wiedzy o powszechnie napotykanych zjawiskach związanych z cyklem życiowym zwierząt i roślin. Wiedza zawarta w tej książce pokrywa się w zasadzie z wiadomościami jakie może czerpać nasza młodzież z podręczników biologii do szkół średnich, przy czym jest ona tutaj znakomicie udostępniona dzięki licznym i doskonałym barwnym fotografiom, schematycznym rysunkom i prostym schematom obrazującym niektóre procesy życiowe.

Recenzowana książka jest godna polecenia dla nauczycieli biologii, jako pozycja uzupełniająca, z której można czerpać wiele pomysłowych, z dydaktycznego punktu widzenia, schematów poglądowych do wykładanego przedmiotu. Autor książki podzielił jej treść na 35 rozdziałów. Omawia w nich kolejno różne formy organizmów żywych oraz ich cechy charakterystyczne. Typy komórek i ich organizację w tkanki. Budowę roślin kwiatowych ich fizjologię, rozmnażanie oraz elementy uprawy roślin gospodarczo ważnych. Czytelnik znajdzie w tej książce również dwa rozdziały poświęcone grzybom i bakteriom. Jedenaście rozdziałów autor poświęca człowiekowi. Opisuje w nich elementarne czynności fizjologiczne organizmu, równocześnie daje dobrą podstawę morfologiczną tych narządów, których fizjologię streszcza. Ostatnie osiem rozdziałów zawiera opisy biologii owadów, ryb, płazów i ptaków. Krótki opis organizmów jednokomórkowych, chromosomową teorię dziedziczenia oraz zagadnienia ewolucji i doboru naturalnego znajdzie czytelnik w ostatnich trzech rozdziałach tego dziełka.

Dużą wartość książki stanowi słowniczek terminów biologicznych, pytania kontrolne oraz spis literatury zalecanej do dalszego pogłębienia studiów biologicznych. Książka jest godna polecenia dla bibliotek szkolnych i pedagogicznych.

W. Kilarski

http://rcin.org.pl

ROBERT W. HORNE, Structure and Function of Viruses.

Wydanie pierwsze, broszura (paperback edition). Edward Arnold, London 1978. Funtów ang. 1,60.

Recenzowana książka wydana jest w ramach znanej serii „Studies in Biology" i nosi kolejny numer 95. Autor, Robert Horne, znany wirusolog, jest kierownikiem Zakładu Badań Ultrastrukturalnych Instytutu im. John Innes w Norwich, Anglia. Autor recenzowanej książki zawarł na 54 stronach podstawowe informacje dotyczące geometrii cząsteczek wirusów, opisał podstawowe formy wirusów oraz ich stosunek do komórek gospodarza.

W rozdziale 1 książki autor wprowadza czytelnika w elementarne pojęcia wirusologiczne, takie jak pojęcie wirionu, jego ultrastrukturę spotykaną w różnych typach wirusów oraz stosowane nazewnictwo związane z poszczególnymi elementami strukturalnymi cząsteczki wirusa. Kolejne rozdziały (2–4) przedstawiają budowę wirusów zarówno o kulistym kształcie, jak i o wydłużonym oraz omawiają system replikacji bakteriofagów — ich stosunku do komórek bakterii, a w szczególności pojęcia eklipsji i lizogenii. W rozdziale 5 autor opisuje interakcje między wirusami zwierzęcymi, DNA i RNA a komórkami gospodarza, efekty cytopatogenne, sposoby replikacji cząsteczek wirusów DNA i RNA. Rozdział 6 i 7 zawiera wiadomości na temat infekcji i replikacji wirusów roślinnych w komórkach gospodarza oraz w sztucznie uzyskanych protoplastach. Wreszcie omawia się rzadko spotykane formy wirusów mykoplazm oraz wiroidy.

Książka może stanowić dobre uzupełnienie ogólnej wiedzy przyrodniczej tych czytelników, którzy w procesie swojej edukacji zetknęli się z pojęciem wirusa, ale nie w ściśle zdefiniowanym jego znaczeniu, nie mieli natomiast okazji poznania struktury jego cząsteczek, własności oraz stosunku, jaki zachodzi między wirusem a komórką gospodarza.

W. Kilarski

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

R. FARBISZEWSKI i D. KILCZEWSKA, Poliaminy a wzrost nowotworów 57
M. JAKÓBISIAK, Naturalna cytotoksyczność komórkowa 79
J. LAMPRECHT i I. ADAMIEC, Komórki Panetha — budowa, cytofizjologia i patologia 99
S. STOKŁOSOWA, Hodowla narządowa, hodowla na sztucznych naczyniach włosowatych oraz wytwarzanie swoistych produktów komórkowych in vitro . 115
J. MICHEJDA, Sprawozdanie z Międzynarodowego Sympozjum Mitochondriów Roślinnych 131
L. HRYNIEWIECKA, Sprawozdanie z Międzynarodowej Konferencji poświęconej *Acanthamoeba* . . 135
Recenzje 139

Indeks 36970

http://rcin.org.pl