PL ISSN 0324-833X

POLSKIE
TOWARZYSTWO
ANATOMICZNE

Postępy Biologii Komórki

TOM 6 · NR 3
1979 (141-242)

PWN — WARSZAWA

http://rcin.org.pl

POSTĘPY BIOLOGII KOMÓRKI TOM 6, NR 3, 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 562 -- 103 egz. Ark. wyd. 9,5. Ark. druk. $6^3/_8 - 7/_8$ wkl. Papier druk. sat. III kl., 80 g, 70 × 100 cm. Oddano do składania w maju 1979 r. Podpisano do druku w sierpniu 1979 r. Druk ukończono w sierpniu 1979 r. Zam. 828/79. Cena zł 20.—

Wrocławska Drukarnia Naukowa, Wrocław, ul. Lelewela 4

http://rcin.org.pl

POSTĘPY BIOLOGII KOMÓRKI TOM 6, Nr 3, 1979 (141-149)

PRZEBIEG REPLIKACJI DNA W CHROMOSOMACH CZŁOWIEKA

COURSE OF DNA REPLICATION IN HUMAN CHROMOSOMES

Małgorzata SCHMIDT

Zakład Genetyki Człowieka PAN, Poznań

Streszczenie. W artykule przedstawiono ogólne dane biochemiczne na temat przebiegu replikacji DNA w komórce z uwzględnieniem różnic między komórką prokariotyczną i eukariotyczną. Dotychczasowe badania wykazały, że synteza DNA odbywa się w sposób semikonserwatywny oraz że przebiega ona równocześnie w wielu replikonach, rozpoczynając się w miejscach inicjacji, z których elongacja łańcucha postępuje w sposób nieciągły aż do miejsca terminacji.

Procesy te są u eukariotów bardziej skomplikowane ze względu na wysoki stopień organizacji ich genomu. Synteza DNA w chromosomach eukariotycznych wykazuje stałą, gatunkowo-specyficzną kolejność, prawdopodobnie częściowo zależną od zróżnicowania struktury poszczególnych rejonów chromosomowych. Przedstawiono dane cytogenetyczne na temat przebiegu replikacji DNA w chromosomach człowieka ze szczególnym uwzględnieniem chromosomów płci i rejonów prążków C. Zasygnalizowano przypuszczalną rolę mechanizmów kontrolnych komórki w regulacji procesu syntezy DNA.

Summary. Some general biochemical data are presented on the DNA replication process within prokaryotic and eukaryotic cells. The studies have shown that DNA synthesis proceeds semi-conservatively in numerous replicons at the same time, starting from the origins. The DNA chain is elongated discontinuously till the termination points and the intermediates are subsequently joined. The process is much more complicated in eukaryots because of the genome complexity. DNA synthesis in eukaryotic chromosomes is characterized by a constant and species-specific sequence, which is probably dependent on the structural differentiation of particular chromosome regions. Cytogenetical results concerning the DNA replication course in human chromosomes and their regions are presented. The possible role of the control mechanisms of the cell in the regulation of DNA synthesis is suggested.

WSTĘP

Replikacja DNA w komórce stanowi niezwykle złożony proces. Postęp w tej dziedzinie zawdzięczamy przede wszystkim badaniom nad replikacją DNA wirusów i plazmidów. Ze względu na skomplikowaną

http://rcin.org.pl

organizację i funkcję genomu eukariotów, bezpośrednie przenoszenie uzyskanych wyników nie jest w pełni możliwe. Badania nad replikacją DNA u eukariotów mogą mieć podstawowe znaczenie dla dalszego poznania organizacji ich genomu. Poza tym mogą one rzucić nieco światła na mechanizmy kontrolne związane z różnymi funkcjami genomu i ich zaburzeniami, między innymi z procesem nowotworzenia. Z tych względów zapoznanie się z obecnym stanem wiedzy na ten temat wydaje się ze wszech miar pożądane, szczególnie dla biologów i lekarzy.

Replikacja DNA w komórce występuje w fazie S cyklu komórkowego. Odbywa się ona w sposób semikonserwatywny, przy czym nowe łańcuchy dobudowują się od zewnętrznej strony łańcuchów służących za matrycę [10].

Biochemiczne badania izolowanych łańcuchów DNA wykazały, że replikacja DNA jest kompleksowym procesem, wymagającym współdziałania wielu enzymów oraz zużywającym energię [1]. Zgodnie z uzyskanymi danymi przyjmuje się następujący mechanizm replikacji DNA. Podwójny łańcuch DNA ulega na pewnym odcinku rozszczepieniu, tworząc tzw. widełki replikacyjne. Rozszczepienie to umożliwiają liczne enzymy, a mianowicie: enzymy destabilizujące helisę, enzymy rozplatające DNA, enzym rozkręcający i inne. Proces ten odbywa się z udziałem energii pochodzcej z hydrolizy ATP. Przy obu pojedynczych łańcuchach widełek replikacyjnych syntetyzują się natychmiast, w sposób nieciągły, komplementarne łańcuchy DNA. W jednym ramieniu widełek, zwanym łańcuchem wiodącym, synteza komplementarnego łańcucha jest szybsza niż w drugim, zwanym łańcuchem opóźnionym. Nieciągłość syntezy polega na tworzeniu się fragmentów o długości od paruset do paru tysięcy nukleotydów, tzw. fragmentów Okazaki [1, 25, 27]. Fragmenty Okazaki są syntetyzowane przez polimerazę DNA, działającą w obu ramionach widełek w kierunku od końców 5' do 3', a następnie łączone przez ligazę [1, 29]. Dane te uzyskano głównie w wyniku badań przeprowadzonych na wirusach i plazmidach.

W doświadczeniach nad replikacją DNA komórek eukariotycznych wykazano, że polimeraza DNA nie ma zdolności do rozpoczynania syntezy DNA de novo, a fragmenty Okazaki są inicjowane na krótkich, primerowych odcinkach RNA [27]. Synteza primerowego RNA ma istotne znaczenie dla zapewnienia wierności replikacji — jednego błędu na 10^9–10^{10} skopiowanych zasad [1].

Należy sądzić, że synteza primerowych odcinków RNA odbywa się w miejscach inicjacji („origins" autorów anglosaskich). Z miejsc tych elongacja replikowanych łańcuchów postępuje jedno- lub dwukierunkowo aż do miejsca terminacji [4, 29]. Pojedyncze miejsce inicjacji i związany z nim obszar elongacji łańcucha stanowi replikon — samo-

http://rcin.org.pl

dzielną jednostkę replikacji, zdolną do kontroli inicjacji oraz, być może, tempa elongacji łańcucha. Ostatnio zdołano poznać sekwencje niektórych miejsc inicjacji. Jednocześnie ustalono, że kodują one białka inicjatorowe, zdolne prawdopodobnie do uczynniania miejsc inicjacji [29].

Ostateczne tempo wzrostu łańcucha wynosi u eukariotów około 100 nukleotydów na sekundę i jest znacznie niższe niż u prokariotów. Również fragmenty Okazaki są u eukariotów krótsze i mają długość około paruset nukleotydów [1, 27]. Istnieją dane, że w komórkach HeLa replikacja DNA jest poprzedzona przez jego metylację postępującą w określonej kolejności wzdłuż łańcucha [7, 33].

Całość procesu replikacji u eukariotów jest nieporównywalnie bardziej skomplikowana niż u prokariotów, na co wpływa sposób upakowania DNA w chromosomach oraz liczba łańcuchów DNA w jądrze eukariotów, równa prawdopodobnie liczbie chromosomów. Wskutek tego dane na temat replikacji DNA w chromosomach eukariotycznych są dotąd bardzo fragmentaryczne.

Czas trwania fazy S jest w różnych komórkach u ssaków bardzo zbliżony i wynosi od 6 do 10 godzin [4].

W doświadczeniach nad replikacją DNA chromosomów chomika chińskiego stwierdzono występowanie miejsc inicjacji co około 4 μm. Większość tych miejsc w normalnych warunkach była nieczynna, a liczba czynnych miejsc inicjacji zależała m. in. od stopnia zaawansowania rozwoju ontogenetycznego organizmu oraz od warunków wzrostu komórek [32]. Nie wiadomo dotąd, czy możliwe jest jednoczesne funkcjonowanie wszystkich miejsc inicjacji, czy też w części z nich synteza DNA musi być ukończona, zanim nastąpi uczynnienie innych. Tempo elongacji łańcucha podlega prawdopodobnie oddzielnej kontroli. Jest ono jednak odwrotnie proporcjonalne do liczby czynnych miejsc inicjacji, co sugeruje istnienie mechanizmu regulującego, utrzymującego całkowitą syntezę DNA w jądrze komórkowym na względnie stałym poziomie [32]. Jak sugerują nowsze badania, mechanizm ten jest związany raczej z tempem łączenia poszczególnych replikonów niż z prędkością elongacji łańcucha w obrębie replikonu [15, 23]. W niesynchronizowanej hodowli komórek chomika chińskiego określono średnią odległość czynnych miejsc inicjacji na około 74 μm, a średnią prędkość wzrostu łańcucha w jednym kierunku — na około 0,88 μm/min [32]. Czasowe zablokowanie komórek chomika w punkcie G_1/S, przy użyciu fluorodezoksyurydyny, powodowało po odblokowaniu zredukowanie średniej odległości miejsc inicjacji do około 49 μm oraz obniżenie tempa syntezy do około 0,63 μm/min [32]. Autorzy opisanych wyników sugerują, że w wypadku zahamowania syntezy łańcucha DNA aktywuje się duża ilość potencjalnych miejsc inicjacji, a tempo wzrostu łańcucha od każdego z nich ma-

http://rcin.org.pl

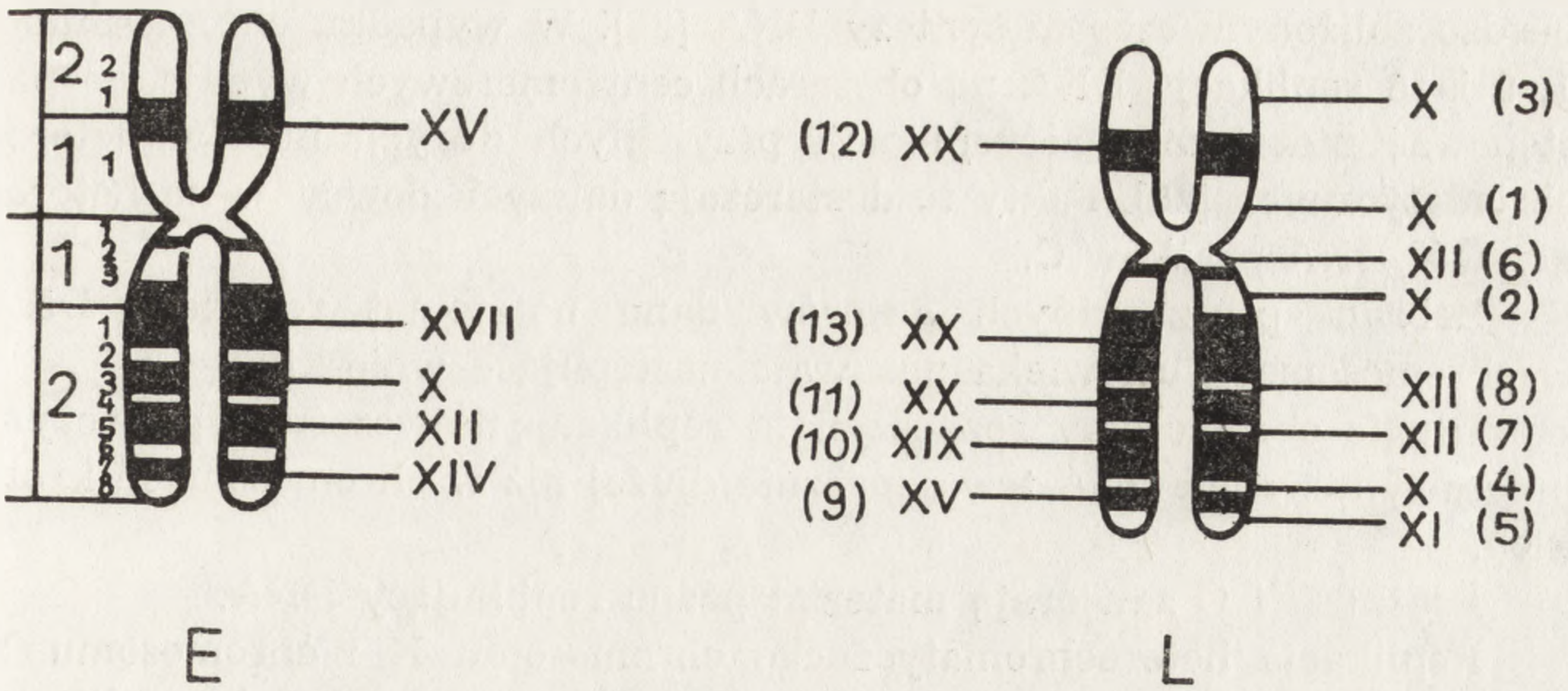
leje. Całkowity czas trwania okresu S w komórkach, w których uprzednio zablokowano syntezę DNA, ulega skróceniu, przy czym skrócenie to jest tym większe, im dłużej komórki pozostawały w warunkach inhibicji syntezy DNA [5, 32]. Badania przebiegu fazy S w hodowli limfocytów ludzkich, synchronizowanych ametopteryną, sugerują, że skróceniu ulega w tym wypadku przede wszystkim wczesny okres fazy S [28]. Jednakże według niektórych autorów skrócenie fazy S w warunkach hodowli synchronizowanej może być pozorne i wynikać ze szczątkowej syntezy DNA, postępującej w okresie trwania bloku [31].

W badaniach cytogenetycznych nad replikacją DNA chromosomów używano pierwotnie metod autoradiograficznych, opartych o wykrywanie promieniowania trytowanej tymidyny, wbudowanej do różnych rejonów DNA w czasie jego replikacji. Ze względu na stosunkowo niską rozdzielczość tej metody, dalszy postęp w badaniach nad replikacją DNA chromosomów umożliwiło wprowadzenie techniki podstawiania łańcucha DNA 5-bromodezoksyurydyną (BUdR). Związek ten jest analogiem tymidyny, mogącym służyć jako substrat dla kinazy tymidynowej, blokując jednocześnie anabolizm tymidyny [30]. Jednoniciowe wbudowanie BUdR do DNA chromosomów uniemożliwia prawidłowe zabarwienie podstawionych rejonów barwnikami fluorescencyjnymi i barwnikiem Giemsy, dzięki czemu uzyskuje się wzór prążkowy chromosomów, zmieniający się w zależności od tego, do jakich rejonów chromosomowych wbudowana została BUdR [16]. Opisana metoda ma większą rozdzielczość, jest prostsza technicznie i łatwiejsza w interpretacji niż metoda autoradiograficzna. Dodatkowo pozwala ona na identyfikację wszystkich chromosomów, gdyż każdy z nich charakteryzuje się typową dla siebie kolejnością replikacji DNA i tym samym — specyficznym wzorem replikacyjnym. Metoda ta pozwala także na odróżnienie aktywnego i nieaktywnego chromosomu X u kobiety w sposób o wiele pewniejszy niż autoradiografia.

Za pomocą obu wymienionych metod zgromadzono wiele danych dotyczących przebiegu replikacji DNA w poszczególnych chromosomach człowieka i ich rejonach [3, 6, 10, 11, 16, 18, 19 - 34 - 36]. Zostały one przedstawione w pracy przeglądowej Hübnera i Konowicza [13].

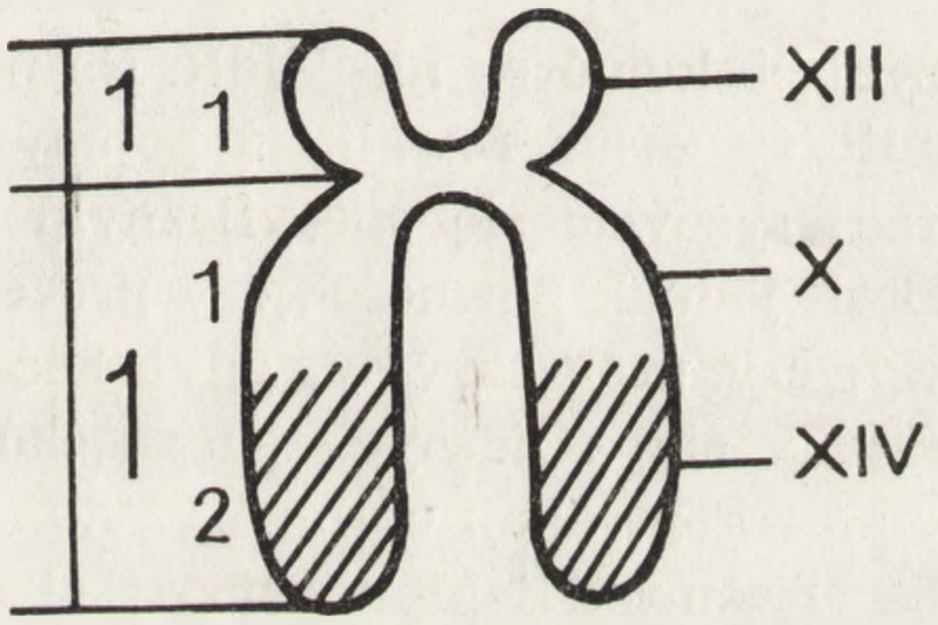
Na szczególną uwagę zasługują obserwacje dotyczące syntezy DNA w chromosomach płci. Badania, przeprowadzone na synchronizowanych hodowlach limfocytów ludzkich, doprowadziły do ustalenia kolejności replikacji poszczególnych prążków tych chromosomów (ryc. 1 i 2) oraz zasugerowały, że replikacja DNA nieaktywnego chromosomu X i chromosomu Y przebiega szybciej niż w innych chromosomach [28]. Nadal jednakże istnieją kontrowersje co do czasu rozpoczynania replikacji DNA przez chromosomy płci. Według większości danych nieaktywny chromo-

http://rcin.org.pl



Ryc. 1. Kolejność replikacji DNA w poszczególnych prążkach chromosomów X

E — aktywny chromosom X, *L* — heterochromatyczny chromosom X
Cyfry rzymskie odpowiadają poszczególnym grupom Dutrillaux [6], arabskie — dokładniejszej kolejności replikacji poszczególnych prążków [28]



Ryc. 2. Kolejność replikacji DNA w poszczególnych prążkach chromosomu Y z podziałem na grupy wg Dutrillaux [6, 28]

som X w komórce żeńskiej oraz chromosom Y w komórce męskiej rozpoczynają replikację DNA jako ostatnie chromosomy w komórce [3, 28, 36], wraz z rejonami prężków G [28]. Wyniki Nakagome [24] sugerują jednak, że chromosomy te posiadają niewielkie obszary replikujące DNA już w ciągu pierwszych 10 min okresu S.

Dane dotyczące replikacji DNA prążków C również pozostają niepełne. Stwierdzana przez licznych autorów asynchronia homologów, dotycząca dużych bloków heterochromatycznych chromosomów 1, 9 i 16, jak również zmienny czas replikacji prążka Yq12, są zazwyczaj wiązane ze zróżnicowaną ilością późno replikującego DNA w tych rejonach [13, 21, 26]. Nie można jednak wykluczyć, że wymienione rejony zawierają także zmienną ilość wcześnie replikującego materiału [6, 28].

Obszary centromerów poszczególnych chromosomów cechują się

http://rcin.org.pl

bardzo zbliżonym czasem syntezy DNA [28]. W wypadku chromosomów 1, 9 i 16 replikacja DNA na obszarach centromerowych wydaje się postępować niezależnie od replikacji przyległych dużych bloków heterochromatycznych [28]. Fakty te dostarczają dalszych dowodów na heterogenność DNA prążków C.

Zebrane przez różnych autorów dane na temat replikacji DNA w chromosomach człowieka nasuwają następujące wnioski:

Długie chromosomy rozpoczynają replikację najwcześniej, przy czym proces syntezy ich DNA trwa znacznie dłużej niż w chromosomach krótkich.

Prążki G i C zawierają materiał późno replikujący DNA.

Replikacja heterochromatycznego chromosomu X i chromosomu Y najprawdopodobniej zaczyna się jako ostatnia w stosunku do replikacji wszystkich pozostałych chromosomów.

Wzór replikacyjny chromosomów jest stały i gatunkowo specyficzny.

Ostatni z wniosków wymaga omówienia. Stała kolejność replikacji fragmentów DNA chromosomów została ostatnio potwierdzona w bardziej finezyjnych doświadczeniach, opartych na krótkotwrałych ekspozycjach komórek na BUdR. Na podstawie tych badań Dutrillaux i współautorzy zasugerowali, iż pojedynczy prążek chromosomowy może charakteryzować się specyficznym dla siebie czasem replikacji DNA [6]. Brak jednak pewności, czy proces ten jest w obrębie prążka jednoczasowy, czy progresywny, gdyż każdy prążek chromosomów metafazowych składa się z licznych subprążków, nieodróżnialnych od siebie na tym etapie kontrakcji chromatyny.

Kasupski i Mukherjee [14] dowiedli, że inkorporacja BUdR do komórek w określonych przedziałach czasowych fazy S. w stały i specyficzny sposób redukuje aktywność pewnych enzymów komórkowych. Świadczy to, iż geny tych enzymów replikują stale w tym samym czasie, przy czym ich informacja genetyczna może być zakłócona wskutek zastąpienia tymidyny przez BUdR [14].

Wysoce uporządkowana kolejność replikacji fragmentów DNA może ulegać zakłóceniu w wypadku wystąpienia aberracji chromosomowych. Dowodzą tego eksperymenty na izochromosomach X [2] i chromosomach z translokacjami [17], w których, z powodu zmiany położenia, występują pewne zakłócenia replikacji fragmentów DNA, co dowodzi złożonego mechanizmu kontroli tego procesu.

Badania ostatnich lat wykazały również, że kolejność i kinetyka replikacji DNA są do pewnego stopnia tkankowo specyficzne. Stwierdzono różnice w replikacji DNA komórek z różnych tkanek. Dotyczyły one zarówno rozmiarów replikonów oraz tempa elongacji łańcucha [23], jak

http://rcin.org.pl

i — do pewnego stopnia — kolejności replikacji poszczególnych rejonów chromosomowych, szczególnie w obrębie heterochromatycznych rejonów niektórych autosomów [8, 26] oraz nieaktywnego chromosomu X [16]. Wyniki te sugerują istnienie tkankowo specyficznych czynników wpływających na kinetykę replikacji DNA. Czynniki te mogą być związane z procesem różnicowania się komórek, odpowiedzialnym za zróżnicowanie środowiska jądrowego [23], represję niektórych loci, a nawet utratę [21] lub podwojenie [22] części satelitarnego DNA genomu.

Stała kolejność replikacji DNA w poszczególnych prążkach chromosomowych nie jest jedyną prawidłowością cechującą przebieg syntezy DNA w chromosomach ludzkich. Sugestia Dutrillaux i wsp., że okresy replikacji DNA w rejonach prążków R i prążków G mogą nie zachodzić na siebie w czasie [6], została ostatnio potwierdzona w badaniach nad przebiegiem replikacji DNA w warunkach synchronizowanej hodowli limfocytów ludzkich. Wyniki tych badań sugerują dwufazowy przebieg syntezy DNA w jądrze eukariotycznym — najpierw w rejonach prążków R, a po ukończeniu tego procesu — w rejonach prążków G [28]. Koncepcja taka znajduje pewne potwierdzenie w wynikach badań Volpego i Eremenki, dotyczących przebiegu metylacji DNA, poprzedzającej proces jego replikacji w komórce. Według tych autorów w czasie fazy S funkcjonują w komórce dwie odrębne metylazy DNA. Jedna z nich jest odpowiedzialna za metylację sekwencji DNA bogatych w pary zasad G - C i działa we wczesnej fazie S, a druga, funkcjonująca podczas później fazy S, metyluje sekwencje DNA bogate w pary zasad A - T [33].

Proces replikacji DNA w komórce eukariotów jest wysoce uporządkowany, skoro poszczególne chromosomy nie syntetyzują DNA w sposób niezależny, a ponadto synteza jest dwufazowa i zachodzi w stałej, ściśle określonej kolejności. Uporządkowanie replikacji jest prawdopodobnie zależne od pewnych, nie poznanych jeszcze mechanizmów kontrolnych. Ostatnie badania nad replikacją DNA pojedynczych chromosomów ludzkich w międzygatunkowych hybrydach sugerują, że mechanizmy te są związane nie tyle z pojedynczym chromosomem, ile z obecnością nie naruszonego genomu, gdyż w komórkach hybrydu kolejność replikacji DNA chromosomów człowieka może ulegać znacznym zmianom [9]. Ponadto obecność komponenty cytoplazmatycznej wydaje się być niezbędna dla prawidłowego przebiegu syntezy [23].

Dalsze badania nad replikacją DNA oraz regulacją tego procesu w komórce eukariotów powinny przyczynić się do lepszego poznania struktury genomu oraz zasadniczych procesów życiowych komórki, jak replikacja, transkrypcja, mitoza i inne. Z tych względów zagadnienia dotyczące replikacji DNA u eukariotów zasługują na wyjątkową uwagę.

http://rcin.org.pl

LITERATURA

[1] ALBERTS B., STERNGLANZ R., Recent excitement in the DNA replication problem, Nature, **269**: 655–61, 1977.
[2] BARANOVSKAYA L. I., EGOLINA N. A., ZAKHAROV A. F., TSVETKOVA T. G., Isochromosome X in man. Different DNA replication pattern in the long arms, Hum. Genet., **33**: 55–60, 1976.
[3] BIANCHI N. O., De BIANCHI M. S. A., DNA replication sequence of human chromosomes in blood cultures, Chromosoma, **17**: 273–280, 1965.
[4] BOSTOCK C. J., SUMNER A. T., The Eukaryotic Chromosome, North-Holland Publishing Company, Amsterdam, New York, Oxford, 217–222, 1978.
[5] CAMEVALI F., MARIOTTI D., Variations of the length of S phase related to to the time cells are blocked at the G_1S interphase, Chromosoma, **63**: 33–37, 1977.
[6] DUTRILLAUX B., COUTURIER J., RICHER C. L., VIEGAS-PEQUIGNAT E., Sequence of DNA replication in 277 R and Q bands of human chromosomes using a BUdR treatment, Chromosoma, **58**: 51–61, 1976.
[7] EREMENKO T., TIMOFEEVA M. Y., GRANIERI A., VOLPE P., Organization, modification and replication of the human genome, Abstracts of XIV International Congress of Genetics, Moscow, 194, 1978.
[8] FABER R. A., DAVIDSON R. L., Differences in the order of termination of DNA replication in human chromosomes in peripheral blood lymphocytes and skin fibroblasts from the same individual, Cytogenet. Cell Genet., **18**: 349–363, 1977.
[9] — Altered pattern of replication of human chromosomes in a human fibroblasts — mouse cell hybrid, Proc. Nat. Ac. Sci., **75**: 1470–1474, 1978.
[10] GIANELLI F., Human Chromosomes DNA Synthesis. Monographs in Human Genetics, Vol. 5, L. Beckman, M. Hange, S. Karger — Basel, München, New York, 1970.
[11] GRZESCHIK K. H., KIM M. A., JOHANNSMANN R., Late replicating bands of human chromosomes demonstrated by fluorochrome and Giemsa staining, Humangenetik, **29**: 41–59, 1975.
[12] HAMERTON E. Chromosome band nomenclature. The Paris Conference. Chromosome Identification. Proc. of the 23-rd Nobel Symp., 1972.
[13] HÜBNER H., KONONOWICZ A. K., Postulowane mechanizmy powstawania wzorów prążkowych w chromosomach metafazowych, Postępy Biologii Komórki, **4**: 339–370, 1977.
[14] KASUPSKI G. J., MUKHERJEE B. B., Effects of control exposure of L-cells to BUdR. Evidence for ordered gene replication during S phase, Exp. Cell Res., **106**: 327–338, 1977.
[15] LANOTTE M., MOERMAN J., PANIJEL J., DNA synthesis in mouse thymocytes, Exp. Cell Res., **109**: 191–200, 1977.
[16] LATT S. A., Fluorescence analysis of late DNA replication in human metaphase chromosomes, Somatic Cell Genetics, **1**: 293–300, 1975.
[17] LATT S. A., WILLARD H. F., GERALD P. S., BÜdR - 33258 Hoechst analysis of DNA replication in human lymphocytes with supernumerary or structurally abnormal X chromosome, Chromosoma, **57**: 135–153, 1976.
[18] LIMA De FARIA A., Differential uptake of tritiated thymidine into hetero- and euchromatin in Melanopus and Secale, J., Biophys. Biochem. Cytol., **6**: 457–466, 1959.

http://rcin.org.pl

[19] LIMA De FARIA A., REITALU J. BERGMAN S., The pattern of DNA synthesis in the chromosomes in man, Hereditas, **47**: 695–703, 1961.
[20] LIMA De FARIA A., JAWORSKA M., Late DNA synthesis in heterochromatin, Nature, **217**: 138–142, 1968.
[21] LOZOVSKAYA E. R., SLESINGER S. J., PROKOFIEVA - BELGOVSKAYA A. A., Comparative study of chromosome replication in primary cultures of embryonic fibroblasts and in cultures of peripheral blood lymphocytes, Chromosoma, **60**: 69–79, 1977.
[22] MAGENIS R. E., DOULON T. A., WYANDT H. E., Giemsa - 11 staining of chromosome 1, Science, **202**: 64–70, 1978.
[23] MOERMAN C., LANOTTE M., PANIJEL J., Comparative study of DNA elongation in mitogen stimulated mouse thymocytes and splenocytes, Exp. Cell Res., **109**: 201–209, 1977.
[24] NAKAGOME Y., Initiation of DNA replication in human chromosomes, Exp. Cell Res., **106**: 547, 1977.
[25] OKAZAKI T., OKAZAKI R., Mechanisms of DNA chain growth IV. Direction of synthesis of T4 short DNA chains as revealed by exonucleolytic degradation, Proc. Nat. Ac. Sci., **64**: 1242–1248, 1969.
[26] PROKOFIEVA - BELGOVSKAYA A. A., SLESINGER S. J., LOZOVSKAYA E. R., ATAYEVA J. M., Comparative study of human chromosome replication in primary cultures of embryonic fibroblasts and in the cultures of peripheral blood leucocytes, Chromosoma, **57**: 261–270, 1976.
[27] REICHARD P., From deoxynucleotides to DNA synthesis, Federation Proc., **37**: 9–15, 1978.
[28] SCHMIDT M., w przygotowaniu do druku.
[29] SHERRAT D., Replication origins, Nature, **271**: 404–405, 1978.
[30] SNEIDER T. W., DNA replication, modification and repair. The Molecular Biology of Cancer., H. Busch. Acad. Press, New York and London, 1974.
[31] STEFFEN J., dane nie publikowane.
[32] TAYLOR I. H., Increase in DNA replication sites in cells held at the beginning of the S phase, Chromosoma, **62**: 291–300, 1977.
[33] VOLPE P., EREMENKO T., A language of DNA modification during its replication, XIV International Congress of Genetics, Abstracts, Moscow, 1978.
[34] ZAKHAROV A., Differential spiralization along mammalian mitotic chromosomes, Chromosoma, **44**: 343, 1974.
[35] ZAKHAROV A. F., EGOLINA N. A., Correlations between patterns of DNA replication and chromosome banding, Biol. Zbl., **95**: 327–334, 1976.
[36] ZAKHAROV A. F., Chromosomy Czełowieka, Akademia Medicinskich Nauk ZSRR, Moskwa, Medicina, 68–94, 1977.

Otrzymano: 22 stycznia 1979.
Przyjęto: 5 marca 1979.

Adres autorki: ul. Święcickiego 6, 60–781 Poznań.

http://rcin.org.pl

http://rcin.org.pl

POSTĘPY BIOLOGII KOMÓRKI TOM 6, Nr 3, 1979 (151-169)

WIRUS ZAPALENIA WĄTROBY TYPU B

WŁASNOŚCI FIZYCZNE, CHEMICZNE I BIOLOGICZNE ORAZ CYKL REPLIKACYJNY Z UWZGLĘDNIENIEM BADAŃ WŁASNYCH PRZY UŻYCIU TECHNIKI ELEKTRONOWO - MIKROSKOPOWEJ

HEPATITIS B VIRUS

PHYSICAL, CHEMICAL AND BIOLOGICAL PROPERTIES AS WELL AS THE REPLICATION CYCLE OF THIS VIRUS ARE DESCRIBED ON THE BASIS OF THE AUTHORS' STUDIES BY THE ELECTRON - MICROSCOPIC TECHNIQUE

Wiesława BICZYSKO i Jacek JUSZCZYK

Zakład Anatomii Patologicznej Instytutu Biostruktury
Akademii Medycznej w Poznaniu
Klinika Chorób Zakaźnych Instytutu Chorób Wewnętrznych
Akademii Medycznej w Poznaniu

Streszczenie. Na podstawie danych z piśmiennictwa przedstawiono własności fizyczne, chemiczne i biologiczne wirusa B hepatitis (HBV). W oparciu o elektronogramy własnych wyników badań biopunktatów wątrobowych, pobranych od chorych zakażonych HBV, podjęto próbę zrekonstruowania cyklu replikacji tego wirusa.

Summary. The physical, chemical and biological properties of the hepatitis B virus (HBV) are presented on the basis of literature data. The authors attempt to reconstruct the replication cycle of this virus according to the electronogrammes of their own biopsy samples from livers of patients infected with HBV.

WSTĘP

Od czasu odkrycia przez Blumberga i wsp. [9, 10] antygenu Australia i potwierdzenia jego związku z HBV [32, 73] rozpoczęły się intensywne badania nad różnymi aspektami wirusologicznymi, epidemiologicznymi, patogenetycznymi i klinicznymi choroby.

W krąg tematyczny związany z HBV weszło szereg określeń, których

http://rcin.org.pl

przypomnienie umożliwi dalszy ciąg relacji. Kandydatem do miana HBV jest cząstka Dane'a [16] o średnicy około 42 nm; składa się ona z części rdzeniowej, o średnicy około 27 nm, o swoistości antygenowej określonej jako „Hepatitis B core antigen" — antygen rdzeniowy wirusa B (w skrócie HBcAg) oraz płaszcza wirusa, posiadającego swoistość antygenową „Hepatitis B surface antigen" — antygen powierzchniowy wirusa B (w skrócie HBsAg). Przeciwciała przeciwko HBcAg nazwane zostały anty-HBc, a przeciwko HBsAg — anty-HBs. HBsAg ma cztery główne podtypy: adw, ayw, ayr, adr [51, 52]; symbolem „a" oznaczono wspólną determinantę grupową, natomiast „d" lub „y", czy też „w" lub „r" — determinanty określające dany podtyp. Wymienione determinanty występują w olbrzymiej większości podtypów HBsAg zamiennie: jeśli „d", to nie „y", a jeśli „w", to nie „r" i na odwrót; wyjątkowo jednak w tej samej strukturze HBsAg mogą współwystępować determinanty „d" i „y" [56, 66]. Poszczególne podtypy HBsAg są wyrazem fenotypowej ekspresji genomu wirusowego. Wspólna determinanta grupowa „a" ma trzy odmiany: „a_1", „a_2", i „a_3" [84].

FIZYCZNE I CHEMICZNE WŁASNOŚCI HBsAg

Charakterystyka fizycznych własności HBsAg, tak jak ją przedstawiają różni autorzy, wykazuje pewne różnice, związane z rodzajem zastosowanych metod badawczych. Podczas wirowania surowic, zawierających antygen powierzchniowy (w zbuforowanym chlorku cezu), wyizolowano HBsAg przy gęstościach 1,20 g/cm^3, uzyskując również frakcję o gęstości 1,25 g/cm^3, co jest prawdopodobnie związane z obecnością w niej antygenu w postaci kompleksów immunologicznych z anty-HBs [22]. Przy użyciu 5–20% sacharozy uzyskano mniejsze wartości, gdyż 1,16 g/cm^3 [14]. Współczynnik sedymentacji HBsAg waha się, według danych Banda i wsp. [11], w granicach 30–40 S. Współczynnik dyfuzji znajduje się w przedziale od 2, 278 $\times$ 10^{-7} cm^2 S^{-1} do 6,3 $\times$ $\times$ 10^{-7} cm^2 S^{-1} [48]. Ciężar molekularny HBsAg wynosi 2,5 $\times$ 10^6 [48].

Bond i Hall [11] rozdzielili HBAg na trzy typy morfologiczne przy zastosowaniu metody ultrawirowania w różnych gradientach chlorku cezu, wpierw w zakresie 1,1–1,3 g/cm^3 (rotor B - 29), a następnie 1,04–1,20 g/cm^3 (rotor B - 14). Uzyskano frakcje bogate w cząstki o średnicy 22 nm, formy tubularne oraz frakcję zawierającą cząstki około 40 nm.

Heterogenność HBsAg została potwierdzona przez szereg autorów. Chairez i wsp. [13] w rozdziale chromatograficznym wykryli 4 frakcje o aktywności antygenowej w przedziale pH od 3,9 do 4,9 dla wysoko oczyszczonego HBsAg pochodzącego z surowic ludzkich. Natomiast Vnek

http://rcin.org.pl

i wsp. [89], analizując materiał uzyskany od szympansów — nosicieli HBsAg, w rozdziale chromatograficznym (kolumny z hydroksyapatytem) oznaczyli 5 frakcji HBsAg o aktywności antygenowej w pH od 4,7 do 5,7.

Cząstki o rozmiarach 22 nm nie tracą własności antygenowych po zadziałaniu 1% dezoksycholanu sodu, 1% Tweenu 80, w środowisku o pH 2,7, po ogrzewaniu przez kilka godzin w 56°C, natomiast inaktywacja ich zachodzi po dodaniu 1% dodecylosiarczanu sodu [22]. HBsAg nie ulega rozkładowi pod wpływem alfa-amylazy, neurarminidazy, RNA-zy, DNA-zy, trypsyny, fosfolipazy C, pronazy; natomiast ogrzewanie do 85°C niszczy jego własności immunologiczne [57].

Oczyszczone preparaty HBsAg, pochodzące z cząstek występujących w surowicy krwi, składają się z lipidów, białek i węglowodanów.

Składowa lipidowa stanowi blisko 30% całkowitej masy związków wchodzących w skład HBsAg [38]. Rozpuszcza się ona dobrze w mieszaninie chloroformu i metanolu w proporcji 2 : 1 [48]. Analiza tak uzyskanych wyciągów, przy użyciu chromatografii cienkowarstwowej w żelu silikonowym, wykazała przewagę spolaryzowanych grup lipidowych oraz cholesterolu nad lipidami bez grup polarnych [38].

W obrębie składowej białkowej wyodrębniono różne składowe o budowie polipeptydowej. Liczba polipeptydów różni się w doniesieniach poszczególnych autorów; podano także różne — choć zbliżone — wartości ciężarów cząsteczkowych. Gerin [23] wpierw podał informację o występowaniu dwu głównych składowych polipeptydowych o ciężarze cząsteczkowym 26 000 i 32 000 daltonów i trzech mniejszych — o ciężarze w przedziale od 40 000 do 95 000 daltonów; podobnie Vyas i wsp. [90], którzy oznaczyli dwa polipeptydy (24000 i 35000 daltonów), a następnie Gerin i wsp. określili liczbę polipeptydów na siedem, o ciężarach od 23 000 do 95 000 daltonów [25]. Dreesman i wsp. [17] stwierdzili występowanie siedmiu polipeptydów dla podtypu HBsAg/adw i dziewięciu — dla podtypu HBsAg/ayw z ciężarami cząsteczkowymi w granicach od 19 000 do 120 000 daltonów.

W podtypie HBsAg/ayw występują dwa polipeptydy o ciężarze cząsteczkowym 69 000 i 105 000 daltonów, których nie stwierdzono w podtypie HBsAg/adw. W porównaniu z innymi wirusami, HBsAg ma w swym składzie aminokwasowym zwiększoną zawartość cysteiny, cystyny, proliny, leucyny i fenyloalaniny [17]. Wśród surowiczych cząstek HBsAg o średnicy 20 nm znajdują się subpopulacje różniące się kwasowością; jedna z nich, zawierająca polipeptyd o ciężarze cząsteczkowym 90 000 daltonów, jest relatywnie bardziej kwaśna, a druga, zawierająca polipeptyd o ciężarze 82 000 daltonów, bardziej zasadowa [38]. Zakres pH dla HBsAg waha się w granicach od 4,7 do 5,7 [89], co świadczy o heterogenności antygenu.

http://rcin.org.pl

Składowa wąglowodanowa HBsAg stanowi 3,6% jego całkowitej struktury chemicznej [14]. W jej skład wchodzi przede wszystkim N-acetyloglukozamina, a poza tym mannoza, galaktoza, kwas sialowy i niewielkie ilości fukozy; brak w niej natomiast N-acetylgalaktozaminy [82]. Heksozy w HBsAg w stosunkach wagowych stanowią 25,0 μg/mg białka [82]. Duża ilość N-acetyloglukozaminy i mannozy wyjaśnia fakt, że HBsAg wiąże konkanawalinę A [62], gdyż konkanawalina A reaguje właśnie z mannozą i z N-acetyloglukozaminą, a poza tym — z glukozą. Wysoka zawartość N-acetyloglukozaminy i brak A-acetylogalaktozaminy może sugerować, że połączenie białkowo-cukrowcowe dokonuje się poprzez N-acetyloglukozaminę, analogicznie do ustaleń odnośnie do wirusa stomatitis [59].

Millman i wsp. [58] po zadziałaniu na HBsAg detergentem Tween 80 uzyskali produkty o własnościach immunoglobulin, komponenty C3 dopełniacza, beta - lipoproteiny, transferyny i albumin. Neurath i wsp. [63] donieśli o reagowaniu oczyszczonego HBsAg z surowicą zawierającą przeciwciała przeciwko apolipoproteinie C (Apo C) oraz apolipoproteinie D (Apo D); HBsAg wiązał się także z surowicami przeciwko immunoglobulinom ludzkim, prealbuminie, albuminie i łańcuchowi gamma IgG. Sugerowało to, że białka gospodarza mogą stanowić integralną część HBsAg, co mogło mieć istotne znaczenie dla patogenezy wirusowego zapalenia wątroby typu B. Z drugiej jednak strony doniesienia te mogą być wyrazem trudności w uzyskiwaniu wysokooczyszczonych preparatów HBsAg, co podkreśla wielu autorów. Problem ten jest bardzo kontrowersyjny, ponieważ nie uzyskano jednoznacznych wyników co do obecności białek gospodarza w HBsAg. I tak, Houwen i wsp. [37] oraz Vierucci [88] nie potwierdzili referowanych wyżej doniesień. Schuurs i Wolters [80] w badaniach elektronowo - mikroskopowych nie stwierdzili powstawania zlepów wysokooczyszczonego HBsAg po podaniu surowicy zawierającej przeciwciała przeciwko białkom surowicy ludzkiej. Gudeau i wsp. [26] sugerują, że wiązanie HBsAg z białkami stosowanymi w eksperymencie już cytowanym Neuratha i wsp. [63] nie ma cech swoistej reakcji immunologicznej, lecz zachodzi na skutek niespecyficznej adsorbcji białek (białka normalnej surowicy opłaszczone na sefarozie również wiążą HBsAg).

POLIPEPTYDY HBcAg

Badania nad polipetptydową budową HBcAg są mniej zaawansowane aniżeli nad komponentą HBs. Budkowska i wsp. [12] przeprowadzili je na materiale uzyskanym z zakażonych wątrób, otrzymując przy użyciu techniki wirowania w gradiencie gęstości chlorku cezu, chromatografii

http://rcin.org.pl

(Bio — Gel A — 5 m) oraz jodowania i sedymentacji w gradiencie gęstości cukrozy, dwie główne komponenty o ciężarze cząsteczkowym 17 000 i 35 000 i liczne mniejsze komponenty. Natomiast Hruska i Robinson [40] użyli oczyszczonych cząstek Dane'a, pochodzących z surowic nosicieli HBsAg, uzyskując 3 polipeptydy o ciężarach cząsteczkowych 19 000, 70 000 i 80 000 (elektroforeza w żelu poliakrylamidowym). Akahane [1], również przy zastosowaniu elektroforezy w żelu poliakrylamidowym, oznaczył w rdzeniach cząstek Dane'a cztery polipeptydy, z których główny miał ciężar cząsteczkowy 24 000, a pozostałe: 17 000, 37 000 i 46 000.

ANTYGEN E

Magnius i Epsmark [54] wykryli kolejny, immunologiczny wyznacznik zakażenia wirusem B, nazwany przez nich antygenem „e", który następnie oznaczono jako HBeAg, a skierowane przeciwko niemu przeciwciała — jako anty - e. Natura tego antygenu nie została w pełni określona. Wysunięto przypuszczenie, że może on mieć związek z DNA - zależną polimerazą DNA — HBV (pDNA) lub też, że jest białkiem - matrycą, na której dokonuje się wiązanie części rdzeniowej HBV z jego płaszczem, a także, iż może być pochodzenia ustrojowego [67]. Neurath i Strick [64] uzyskali dane fizykochemiczne oraz immunologiczne sugerujące, że HBcAg może być immunoglobuliną przede wszystkim podklasy IgG_4 o specyficznych właściwościach antygenowych. Badania Vyasa i wsp. [91] wskazały, że HBeAg związany jest z izoenzymem dehydrogenazy mlecznanowej (LDH). W ujęciu tym HBeAg jest kompleksem utworzonym przez piąty izoenzym LDH i składową HBsAg, co powoduje zmianę ruchliwości elektroforetycznej enzymu, doprowadzając do wystąpienia dodatkowego pasma w elektroforezie LDH, w postaci LDH - 5ex.

ANTYGEN DELTA

Rizzetto i wsp. [75] wykryli nowy układ antygenowy związany z HBV, immunologicznie różny od HBsAg, HBcAg i HBeAg. Oznaczono go jako delta. Występuje w jądrach hepatocytów osób chorych na przewlekłe, HBsAg dodatnie, zapalenie wątroby i jest wykrywalny metodą immunofluorescencji bezpośredniej, nie dając wyodrębnionej struktury morfologicznej. Odpowiednie przeciwciała, antydelta, występują w surowicach nosicieli HBsAg, zwłaszcza z uszkodzeniem wątroby. Podobne wyniki uzyskali Criveldi i wsp. [15] z tego samego ośrodka.

http://rcin.org.pl

DNA I DNA - ZALEŻNA POLIMERAZA DNA (pDNA) HBV

Dokładne poznanie budowy DNA, jak i sposobu, w jaki realizuje się aktywność pDNA HBV, ma kluczowe znaczenie w ustalaniu sposobu replikacji omawianego wirusa. Poczyniono tu znaczne postępy, jednakże — jak do tej pory — zgromadzone fakty interpretowane są w dużej mierze poprzez konstrukcję hipotez wymagających precyzyjnego udokumentowania.

Jako pierwsi aktywność pDNA w preparatach HBsAg od nosicieli tego antygenu wykazali Hirschman i wsp. [33]. Kaplan i wsp. [47], Greenman i wsp. [27] oraz Krugman i wsp. [49] stwierdzili związek aktywności tego enzymu z rdzeniami cząstek Dane'a. Jego aktywność pojawia się w surowicy krwi w późnym okresie wylęgania wirusowego zapalenia wątroby typu B (nim miano HBsAg osiąga swe maksymalne wartości), aby opaść — zanim ujawnią się biochemiczne wykładniki uszkodzenia komórek wątroby. Ta sekwencja czasowa wskazuje, że aktywność pDNA nie jest wykładnikiem uszkodzenia wątroby, lecz pozostaje w ścisłym związku z okresem wiremii, analogicznie do innych chorób wirusowych. Wykazano [35], że pDNA nie zmieniała aktywności pod wpływem detergentów (Nonidet P - 40, Triton N - lol), nie ulegała stymulacji po dodaniu DNA z komórek grasic cielęcych, DNA micrococcus - lysodeiktikus, DNA wirusa SV - 40 i faga M 174; dodecylsiarczan sodu znosił jej aktywność w stężeniach 0,1–0,9%. Robinson i wsp. [76, 77, 78] wyizolowali z części rdzeniowej cząstek Dane'a, uzyskanych z surowic nosicieli HBsAg, podwójnie skręconą, kolistą nić DNA o długości 0,78 ± ± 0,099 μm, co odpowiada ciężarowi cząsteczkowemu $1,6 \times 10^6$ daltonów; podobne dane uzyskali także Overby i wsp. [70].

Natomiast z cząstek rdzenia wirusowego, wyizolowanego z jąder zakażonych hepatocytów, uzyskali Hirschman i wsp. [34] liniową postać DNA o ciężarze cząsteczkowym $2,3 \times 10^6$ daltonów. Ponadto Hung i wsp. [44], bez przedstawienia wystarczających dowodów, czy oznaczony przez nich DNA jest pochodzenia wirusowego, czy od gospodarza, wykryli w surowicy krwi nosicieli HBsAg obecność wolnego DNA o ciężarze cząsteczkowym od 4×10^6 do 5×10^6 daltonów, posiadającego własności hybrydyzacji z DNA obecnym w cząstkach Dane'a.

W badaniach Robinsona i wsp. [79], prowadzonych na rdzeniach surowicznych cząstek Dane'a, oprócz kolistego DNA wykazano obecność DNA liniowego, który udało się usunąć przez zadziałanie DNAazą na rdzeń cząstki Dane'a; po zadziałaniu pDNA, radioaktywne produkty reakcji związane były z kolistą cząstką DNA, a nie z cząstką liniową, co wskazuje na kolistą postać DNA jako na matrycę, na której przebiega reakcja pDNA. Autorzy ci sugerują, że kolisty podwójnie skręcony DNA

http://rcin.org.pl

cząstki Dane'a mieszczący 3600 par nukleotydów zawiera zmiennej długości fragment (600–2100 nukleotydów) złożony tylko z nici pojedynczej, a odstęp ten uzupełnia pDNA. Pierwsi pogląd ten sformułowali Summers i wsp. [86] w oparciu o badania przeprowadzone z użyciem polimerazy DNA wirusa mieloblastozy ptasiej (AMV) do syntezy DNA na matrycy DNA cząstek Dane'a. Hruska i wsp. [39] określili długość fragmentu DNA cząstki Dane'a, zbudowanego z pojedynczej nici, na około 23% całego obwodu DNA. Landers i wsp. [50] uzyskali podobne wyniki co do obecności pojedynczo skręconej nici DNA o zmiennej długości (1700–2800 par nukleotydów) w pierścieniu wirusowego DNA i wykazali, iż ten fragment jest zamknięty przez pDNA.

Z analizy biochemicznej składowych HBV wynika dysproporcja między rozmiarami DNA cząstek Dane'a a biologicznymi potrzebami omawianego wirusa. Jego genom dla pełnego cyklu replikacyjnego winien posiadać zakodowaną informację odpowiadającą funkcji różnych genów [45], które, zgodnie z przyjętymi oznaczeniami, można określić jako odpowiedzialne za syntezę HBsAg, HBcAg, pDNA, a być może także HBeAg. Hirschman [36], dla wytłumaczenia tych dysproporcji, postuluje w swej hipotezie, że pDNA związana z surowiczą cząstką Dane'a nie służy do replikacji DNA genomu wirusa w zwykłym trybie działania tego enzymu, lecz umożliwia hybrydyzację kolistego DNA surowiczej cząstki Dane'a w odpowiednie miejsce DNA genomu gospodarza. Hipoteza zakłada następujące etapy replikacji HBV:

1. polimeraza DNA, w połączeniu z DNA części rdzeniowej surowiczej cząstki Dane'a, wnika do jądra hepatocyta pełniąc rolę enzymu wbudowującego DNA wirusa do DNA komórkowego;

2. DNA wirusa ulega replikacji łącznie z DNA komórki;

3. wyodrębnienie DNA wirusa z DNA gospodarza pociąga za sobą pewną składową DNA komórkowego, która powoduje, że na tym etapie DNA wirusowe jest o 40% większe aniżeli natywne DNA wirusa B;

4. dochodzi do usunięcia nadmiaru DNA pochodzącego od gospodarza, a powstałe końce natywnego DNA wirusa łączą się, tworząc kolistą nić DNA.

Robinson [79], w oparciu o badania wskazujące na heterogenność podstawowej sekwencji DNA w cząstkach Dane'a, a także o wyliczenie możliwości kodowania informacji zbyt małej w stosunku do liczby znanych polipeptydów wirusowych, sugeruje, że cząstki Dane'a posiadają genomy charakteryzujące się niekompletnością i heterogennością, a pełny genom HBV może powstać w efekcie połączenia materiału genetycznego pochodzącego z różnych cząstek Dane'a. Robinson [79] w zaproponowanym przez siebie modelu zakażenia HBV sugeruje, że infekcja małymi dawkami wirusa może doprowadzić do zakażenia nielicznych hepatocy-

http://rcin.org.pl

tów, które syntetyzują niepełne genomy wirusa, nie kompletujące się w pełnozakaźne cząstki Dane'a. Na dowód swej hipotezy przytacza spostrzeżenia różnych autorów, którzy opisywali u części biorców krwi z tego samego źródła występowanie klinicznych postaci hepatitis B, a u pozostałych — jedynie pojawienie się w surowicy krwi HBsAg (Kaplan i wsp. [46]). W badaniach Gerina i wsp. [24] średnio tylko 7,2% surowiczych cząstek Dane'a miało kompletną budowę, a 83,9% wykazywało niepełnowartościową strukturę rdzenia, natomiast 8,9% w ogóle go nie zawierało, tworząc „puste" cząstki Dane'a. Ponieważ nosiciele HBsAg wytwarzają przeciwciała anty - HBc, Hoofnagle i wsp. [31] oraz Robinson [79] zakładają, że immunogennie działają antygeny HBc, które u części nosicieli nie wchodzą w skład cząstki Dane'a, gdyż synteza HBsAg jest niewystarczająca.

Niedostateczność informacji genetycznej w DNA cząstki Dane'a stanowi nadal nie rozwiązaną w pełni trudność w wyjaśnieniu przebiegu pełnego procesu replikacji HBV. Ponieważ stwierdzono [20], że niektóre wirusy, jak np. wirus polyoma, mogą replikować się — pomimo pozornie niewystarczającej informacji genetycznej — poprzez uruchamianie mechanizmu proteolitycznego rozszczepiania prekursorów białkowych, według Gerina i wsp. [25] HBV może należeć do tej klasy wirusów. Nie wyklucza się także możliwości, że DNA zawarty w cząstce Dane'a wymaga uzupełnienia brakującej informacji, która może pochodzić z nieznanego źródła, jak np. DNA innego wirusa [79].

ULTRSTRUKTURA HBV

W roku 1966 Harris i wsp. [wg 94] opisali obecność w surowicy krwi chorych z zespołami limfoproliferacyjnymi cząstek o cechach ultrastrukturalnych odpowiadających formom HBV, zgodnie z kryteriami dziś obowiązującymi, lecz nie zostały one wówczas właściwie zidentyfikowane. Pierwsze ukierunkowane badania przeprowadzili Bayer i wsp. w roku 1968 [7], opisując w surowicy krwi okrągłe cząstki o średnicy 19–21 nm z podjednostkami o średnicy 3 nm i formy wydłużone wielkości od 50 do 320 nm. Podobne spostrzeżenia poczynili Almeida i Waterson [3] w roku 1969. W 1970 r. Dane i wsp. [16] wykryli w surowicy krwi chorych na wirusowe zapalenie wątroby cząstki o średnicy 42 nm złożone z rdzenia o średnicy 28 nm oraz warstwy zewnętrznej o grubości 7 nm, posiadającej cechy budowy dwudziestościennej. Dane i wsp. [16] pierwsi podnieśli, że cząstki 42 nm są morfologicznym ekwiwalentem HBV, a mniejsze cząstki okrągłe i tubularne, występujące w dużych ilościach w surowicy krwi — materiałem płaszcza wirusowego. Począwszy od 1970 roku

http://rcin.org.pl

ukazało się szereg prac dotyczących występowania okrągłych i/lub owalnych cząstek o średnicy od 20 do 26 nm zlokalizowanych w jądrach hepatocytów osób zakażonych HBV. Były to prace m. in. Nowosławskiego i wsp. [68], Nelsona i wsp. [61], Scotto i wsp. [81], Zawrockiej - Wrzołkowej [93] i innych. Almeida i wsp. [4] opisali drugi po HBsAg układ antygenowy HBV, związany z rdzeniem cząstek Dane'a o własnościach oznaczonych jako HBcAg. Huang i Groh [42] wykazali w homogenatach wątrobowych, chorych na przewlekłe HBsAg - dodatnie agresywne zapalenie wątroby, nieopłaszczone, wirusopodobne cząstki o średnicy 27–29 nm o symetrii dwudziestościanu i strukturach powierzchni przypominających kapsomery wirusowe; cząstki te były identyczne z rdzeniami cząstek Dane'a. W homogenatach obecne były też małe cząstki okrągłe o średnicy około 20 nm, tubularne o tej samej średnicy oraz pełne cząstki Dane'a. Wszystkie te formy morfologiczne ulegały zlepianiu po dodaniu surowicy anty - HBs. Cytowane tu, jak i inne prace doprowadziły ostatecznie do konkluzji, że cechy morfologiczne HBV są związane z szeregiem różnych form występujących zarówno w surowicy krwi, jak i w wątrobach osób zakożonych wirusem B. Identyfikacja poszczególnych struktur odbywała się przy użyciu metod immunologicznych z wykorzystaniem ich swoistości antygenowej, HBsAg lub HBcAg, a także na podstawie cech ultrastrukturalnych. Okrągłe cząstki 20 nm, jak i tubule różnej długości tej samej średnicy, zostały zidentyfikowane w cytoplazmie zakażonych hepatocytów dzięki badaniom Steina i wsp. [85], Gerbera i wsp. [21], Haynes'a i wsp. [30] i innych. Huang i wsp. [43] wykazali w kanałach siatki śródplazmatycznej hepatocyta obecność struktur odpowiadających pełnym cząstkom Dane'a i cząstki rdzeniowe wirusa [41]. Yamada i Nakane [92] wykazali obecność HBcAg w jądrach hepatocytów, a także w cytoplazmie. W jądrach antygen występował nie tylko w postaci okrągłych cząstek 22 nm, lecz także w formie rozproszonej. W cytoplazmie antygen obecny był w okolicy rybosomów związanych z siatką śródplazmatyczną, w wolnych polirybosomach, jak również hialoplazmie w pobliżu rybosomów, dookoła otoczki jądrowej, a zwłaszcza w obrębie jej porów. Sugeruje to, że HBcAg zsyntetyzowany w rybosomach cytoplazmy przechodzi przez pory otoczki jądrowej i jest składany razem z wirusowym DNA w obrębie jądra komórkowego w postać okrągłych cząstek rdzenia wirusowego. W tej postaci rdzenie o antygenowej swoistości HBc przedostają się przez zewnętrzną blaszkę otoczki do cytoplazmy, gdzie w kanałach siatki śródplazmatycznej są opłaszczone białkami o własnościach HBsAg. Cząstki wirusowe po tak dokonanym skompletowaniu uwalniane są do przestrzeni międzykomórkowej na drodze egzocytozy [92]. Liczne badania immunofluorescencyjne [19, 28, 60, 65, 69] wykazały, że białka płaszcza wirusowego występują wyłącznie

http://rcin.org.pl

w cytoplazmie hepatocytów, co uważane jest powszechnie za dowód syntezy białek o swoistości HBsAg w cytoplazmie komórek wątrobowych. Problem proporcji syntezy struktur o antygenowych własnościach HBs i HBc jest tematem stosunkowo jeszcze nielicznych prac, wykonanych przy użyciu różnych technik.

Liczba zakażonych komórek wątrobowych, badanych przy pomocy technik immunofluorescencyjnych, waha się od 1% do 100%, a względna liczba komórek syntetyzujących tylko HBsAg, tylko HBcAg lub oba antygeny jest różna w zależności od badanego materiału [6, 28, 74]. Wspólnym motywem występującym w tych opracowaniach jest podkreślanie znacznego zróżnicowania ekspresji materiału antygenowego w obrębie komórek.

Rozmieszczenia antygenów HBV ujmuje się w schematy w zależności od zmian histologicznych, w których ekspresja HBc i HBs - antygenów jest znamienna dla różnych stanów patologicznych [28, 71, 74]. Lokalizacja HBsAg na powierzchni hepatocytów lub w formie struktury wbudowanej w błonę komórkową, mająca węzłowe znaczenie w patogenezie zapaleń wątroby wywołanych przez HBV, jest nadal kontrowersyjna. Jedni autorzy uzyskali dane przemawiające za taką możliwością [2, 6], inni natomiast podchodzą do tej możliwości krytycznie [5]; pojawiły się także opinie, że może to być efekt pozorny, powstały na skutek uwalniania się HBsAg z cytoplazmy martwiczo zmienionych hepatocytów z następowym przyleganiem cząstek HBsAg do zewnętrznych powierzchni komórek wątrobowych [72]. Należy tu podkreślić, iż prace te związane są ściśle z patogenetycznymi konsekwencjami mniejszej lub większej ekspresji materiału antygenowego na błonach hepatocytów w związku z możliwością występowania osobniczo - uwarunkowanej immunologicznej odpowiedzi zakażonego ustroju, skierowanej przeciwko antygenowi wbudowanemu w strukturę błony komórkowej; komórka wątrobowa w tym ujęciu występuje w roli komórki docelowej. Zagadnienie to nie jest jednak przedmiotem niniejszego opracowania. Dla informacji podajemy, że szczególnie wyczerpująco przedstawili je Gudat i Bianchi [29], rzecznicy koncepcji immunologicznej eliminacji zainfekowanych hepatocytów, wysuniętej pierwotnie przez Dudleya i wsp. [18].

PRÓBY HODOWLI HBV

Zuckerman i Taylor [94] donieśli w 1969 r. o udanym zakażeniu hodowli komórek wątrobowych wirusem B; manifestowało się ono obecnością HB Ag (metoda immunofluorescencyjna) wpierw w cytoplazmie (po 5 dniach), następnie w okolicy okołojądrowej (po 7 dniach) i w okolicy jąderek (po 11 dniach).

http://rcin.org.pl

Noyes [wg 94] przedstawił dane, zgodnie z którymi w hepatocytach zarodków ludzkich w warunkach hodowli in vitro w 2 tygodnie po inokulacji wykrywano HB Ag w postaci depozytów w jądrach, a po upływie 4 tygodni — w cytoplazmie. Po 5–6 tygodniach przyrastała ilość komórek zawierających antygeny wirusowe; tworzyły się ogniska liczące po 2–4 komórki.

REKONSTRUKCJA CYKLU REPLIKACYJNEGO HBV

Badania własne oparte są jedynie o technikę mikroskopii elektronowej. Jako materiał posłużyły biopunktaty wątrobowe pobrane od chorych na przewlekłe agresywne zapalenie wątroby, którzy przebyli ostre wirusowe zapalenie wątroby typu B. Chorzy pozostawali w ciągłej obserwacji klinicznej począwszy od ostrej fazy choroby; okres czasu, jaki upłynął od wystąpienia klinicznych objawów hepatitis B do rozpoznania zapalenia przewlekłego, był nie krótszy aniżeli 6 miesięcy. Rozpoznania przewlekłego agresywnego zapalenia wątroby dokonywano na podstawie typowego obrazu klinicznego i biochemicznego oraz weryfikacji biopsyjnej z użyciem techniki mikroskopii świetlnej. U chorych włączonych do niniejszego opracowania wielokrotnie stwierdzano obecność HBsAg w surowicy krwi (metoda immunoelektroosmoforezy).

Rekonstrukcja cyklu replikacyjnego HBV w opracowaniu o uzyskane przez nas obrazy elektronowo - mikroskopowe jest wyłącznie próbą odtworzenia procesu, którego pełne prześledzenie jest możliwe w bardziej sprzyjających warunkach; ich optimum stanowi nieosiągalna w chwili obecnej hodowla wirusa in vitro.

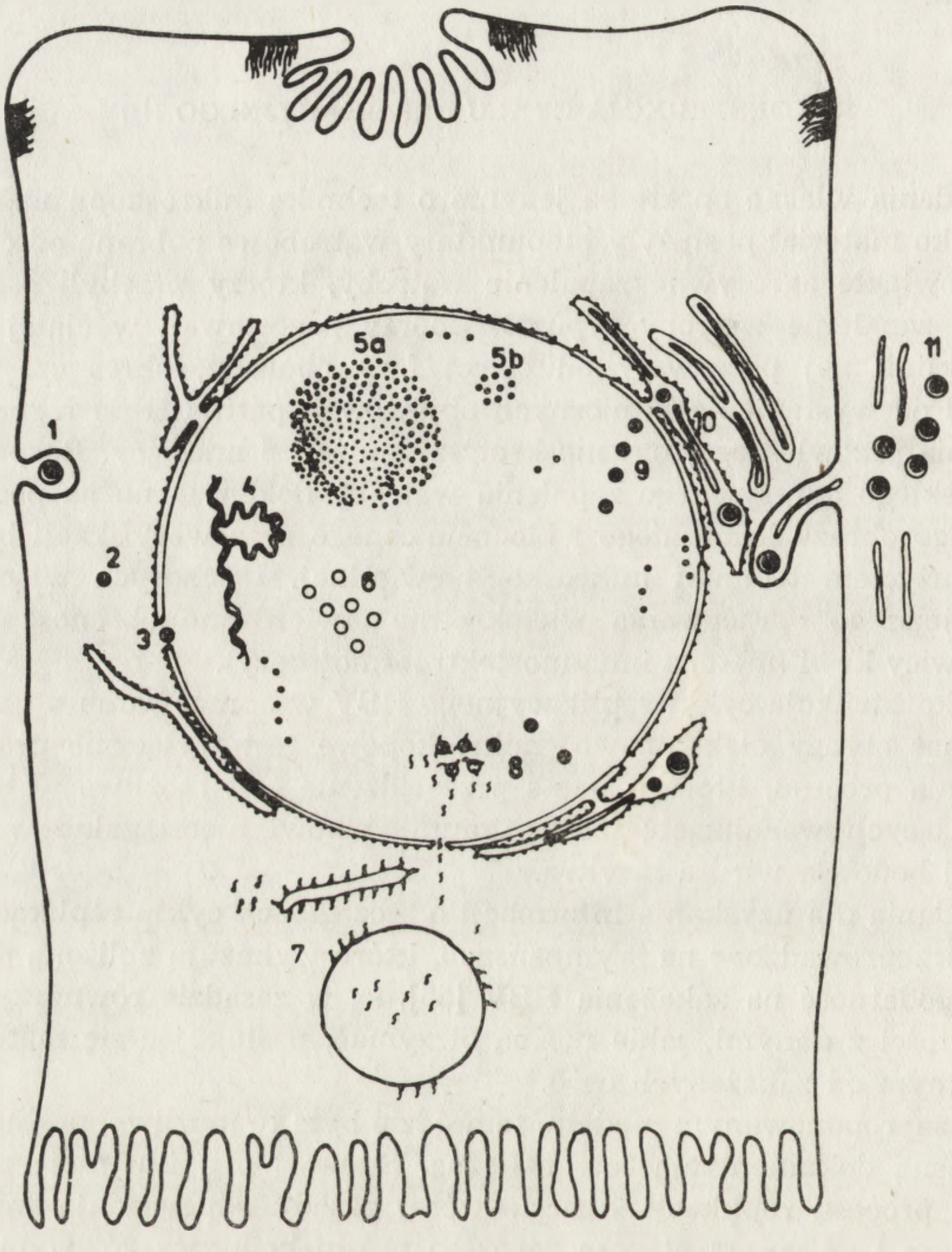
Badania dla uzyskania informacji o szczegółach cyklu replikacyjnego HBV, przeprowadzone na szympansach, które wykazują zbliżoną do człowieka podatność na zakażenia HBV [55], są w zasadzie równorzędne co do wartości z danymi, jakie można otrzymać, posługując się materiałem biopsyjnym od zakażonych osób.

W zaproponowanym modelu, tam gdzie było to możliwe, posługujemy się własną dokumentacją fotograficzną. Stanowi ona ilustrację różnych etapów procesu replikacji wirusa, której zasady odpowiadają wcześniej poznanym i opisanym etapom zarówno w aspekcie szczegółowym, dotyczącym HBV, co przedstawiono w pierwszej części pracy, jak i w oparciu o dane z zakresu wirusologii.

Na załączonym schemacie (ryc. 1) przedstawiliśmy poszczególne etapy zrekonstruowanego cyklu replikacyjnego wirusa. Stanowi to jedynie uporządkowaną sekwencję procesu wymagającą z pewnością uzupełnień i korekt.

http://rcin.org.pl

HBV wnika do jądra komórki i wbudowuje się w DNA komórki wątrobowej. Po wniknięciu wirusa pojawiają się pierwsze zmiany na terenie jąder hepatocytów. Z terenu jąder znika heterochromatyna, jądro zawiera tylko euchromatynę (ryc. 2). Równolegle z tym stanem ulegają



Ryc. 1. Schemat ilustrujący cykl replikacji wirusa w komórce

1 — wejście pełnej cząstki Dane'a na drodze mikropinocytozy; 2 — zdejmowanie płaszcza wirusowego w cytoplazmie; 3 — wniknięcie rdzenia wirusowego do jądra; 4 — hybrydyzacja wirusowego DNA z komórkowym DNA 5a — powiększenie jąderka; 5b — zwiększenie liczby ziarnistości perichromatynowych; 6 — nowozsyntetyzowany wirusowy DNA; 7 — ergastoplazma syntetyzująca białka rdzeniowe wirusa, 8 — kompletowanie rdzenia cząstek Dane'a; 9 — kompletne rdzenie cząstek Dane'a, 10 — opłaszczenie rdzeni (formowanie kompletnych cząstek Dane'a i białek płaszczowych); 11 — wychodzenie cząstek Dane'a i białek płaszcza do przestrzeni międzykomórkowych

http://rcin.org.pl

powiększeniu jąderka (ryc. 2). Powiększenie jąderek (ryc. 3 i 3a) utrzymuje się przez wszystkie kolejne fazy zmian w hepatocytach, a wykładniki jego degeneracji są równoległe z wykładnikami degeneracji komórek.

Obrazy ultrastrukturalne powiększonych jąderek świadczą o ich znacznej aktywności w syntezie prekursorów rybosomalnego RNA [83]. Zawierają one liczne ziarnistości i włókienka jąderkowego RNA przemieszane ze sobą. W obwodowej części jąderek, a także na całym terenie jąder, znajdują się liczne ziarnistości i włókna perichromatynowe. Całość obrazu świadczyć może o zwiększeniu syntezy prekursorów polirybosomalnego RNA i messenger RNA [8, 87]. Przez porównanie tych obrazów z innymi modelami interakcji wirus - komórka [53] można sądzić, że ma tu miejsce aktywna synteza wirusowo - zależnego RNA w obrębie jąder komórek zakażonych HBV.

Opisanym przemianom jąderka towarzyszy pojawienie się pierwszych pierścieniowych struktur cząstek rdzeniowych wirusa w jądrach. Kolejno ilość tych struktur ulega stopniowemu zwiększeniu i w niektórych komórkach jądra są nimi wypełnione (ryc. 4). W czasie namnażania wirusowego DNA w cytoplazmie hepatocytów dochodzi do poszerzenia kanałów ergastoplazmy i syntetyzowania na nich białek rdzeni wirusowych [92]. Białka rdzeniowe przechodzą kolejno do hialoplazmy, a z niej porami jądrowymi do jąder komórkowych [92]. W jądrach dochodzi do kompletowania cząsteczek rdzeniowych z tych białek i wirusowego DNA (ryc. 5). Te skompletowane cząstki rdzeniowe w mikroskopie elektronowym są optycznie gęste i przy dużych powiększeniach można obserwować ich dwudziestościenny układ.

Nie wszystkie białka rdzeniowe wnikają do jąder komórkowych zakażonych komórek. Część ich zostaje w poszerzonych kanałach ergastoplazmy i te kanały są znacznie zdegranulowane (ryc. 6). Część kanałów pęka i materiał białek rdzeniowych wylewa się do hialoplazmy.

Kompletne cząstki rdzeni wirusowych poprzez pączkowanie blaszki zewnętrznej otoczki jądrowej wchodzą do kanałów ergastoplazmy (ryc. 7). Kanały ergastoplazmy są miejscem syntezy białek płaszczowych wirusa [92] i w świetle kanałów odbywa się opłaszczenie części rdzeniowych, a tym samym kompletowanie pełnych cząstek Dane'a (ryc. 8). Kanały ergastoplazmy, zawierające cząstki wirusowe kompletne lub niekompletne, równolegle do oddalania się od okolicy okołojądrowej, ulegają degranulacji (ryc. 9). W świetle kanałów leżących pod błoną komórkową znajdują się liczne pełne cząstki Dane'a i liczne tubularne struktury białek płaszcza wirusowego (ryc. 8). Następuje łączenie się kanałów siateczki śródplazmatycznej z otoczką komórkową i wychodzenie białek płaszczowych wirusa lub pełnych cząstek Dane'a do przestrzeni międzykomórko-

http://rcin.org.pl

wych. Tak więc wychodzenie cząstek wirusowych do przestrzeni międzykomórkowych nie odbywa się na drodze wbudowywania wirusa do otoczki komórkowej, a prawdopodobnie poprzez mechanizm podobny do egzocytozy.

PODSUMOWANIE

Badania nad własnościami HBV poczyniły znaczny postęp, którego efektem jest poznanie ultrastruktury jego różnych postaci morfologicznych, powiązanych z dwoma podstawowymi walorami antygenowymi wirusa: HBsAg i HBcAg, oznaczeniem komórkowym miejsc syntezy tych składowych oraz określeniem swoistej reaktywności immunologicznej ustroju na obecność obcych antygenów; wyraża się to syntezą odpowiednich przeciwciał i nadwrażliwością typu komórkowego. Istotne znaczenie miało wykrycie DNA - zależnej polimerazy DNA - HBV jako wyznacznika replikacji wirusa. Poczyniono także szereg ważnych spostrzeżeń nad korelacją zmian wykrywalnych metodami elektronowo - mikroskopowymi i immunofluorescencyjnymi. Podjęto próby skorelowania ekspresji zmian występujących w obrębie wątroby i o lokalizacji pozawątrobowej, związanych z obecnością HBsAg, co nie było tematem tego opracowania, lecz ma już dość bogate, choć niejednorodne co do uzyskanych wyników piśmiennictwo tematu, przede wszystkim o znaczeniu dla klinicysty współpracującego z patomorfologiem. Ustalono także dość dokładnie własności fizykochemiczne struktur tworzących HBV.

Jednakże nadal nie zostały w pełni wyjaśnione tak węzłowe zagadnienia, jak struktura DNA HBV, czy rola i pochodzenie antygenu e, który wydaje się mieć związek z infekcyjnością omawianego wirusa. Nieomal każde półrocze przynosi nowe, istotne informacje związane ze strukturą HBV, jak i problemami patogenezy stanów chorobowych przezeń wywoływanych.

LITERATURA

[1] AKAHANE Y., Detection of polypeptides of hepatitis virus (Dane particles) and their core particles using SDS - polyacrylamide gel electrophoresis, Acta Hepatol. Jap., **19**: 45–56, 1978.

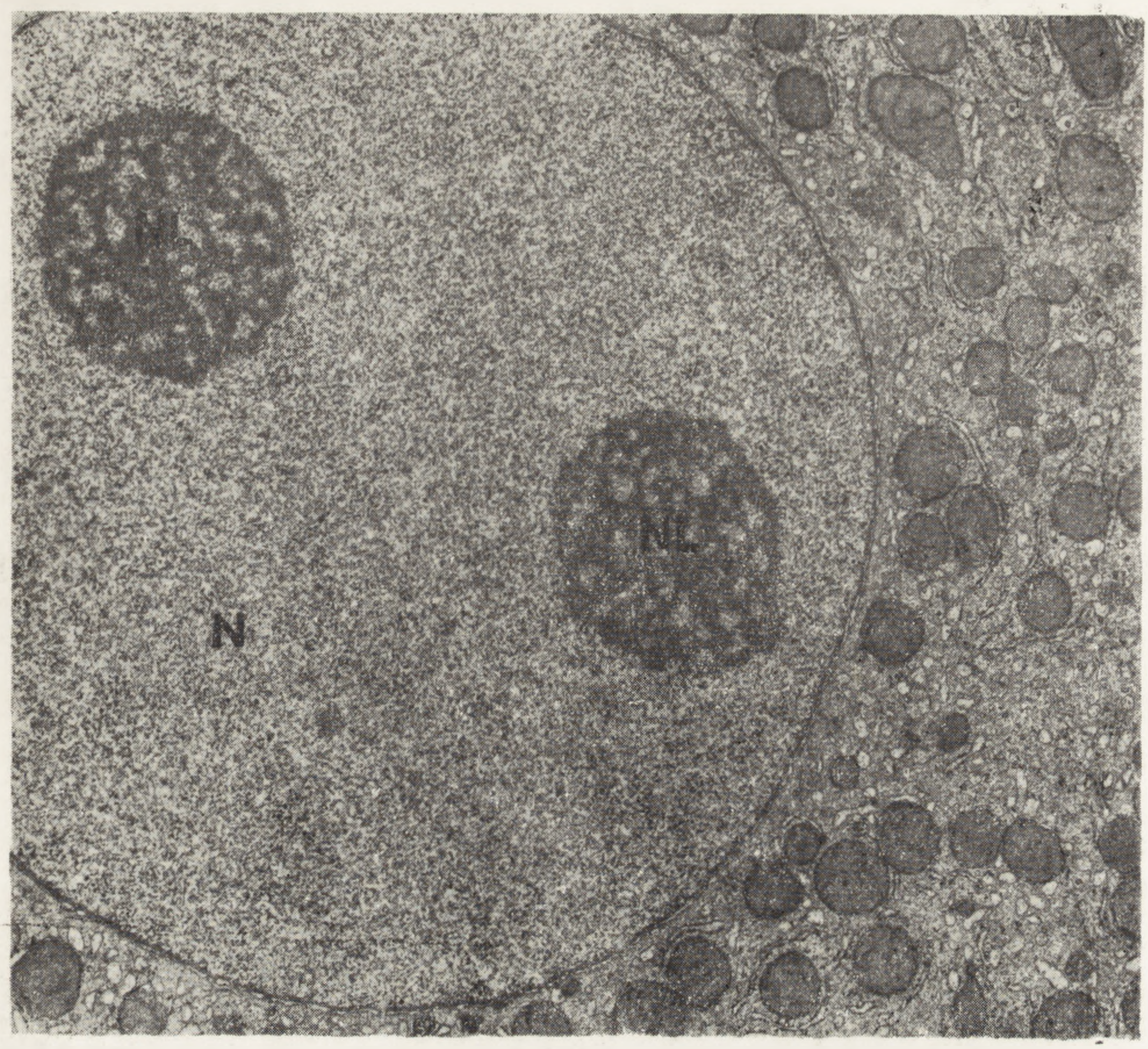
[2] ALBERTINI A., REALDI G., TREMOLADA R., SPINA G. P., Liver cell surface localisation of hepatitis B antigen and of immunoglobulins in acute and chronic hepatitis in liver cirrhosis, Clin. Exp. Immunol., **25**: 396–402, 1976.

[3] ALMEIDA J. D., WATERSON A. P., Immune complexes in hepatitis, Lancet, **2**: 983–986, 1969.

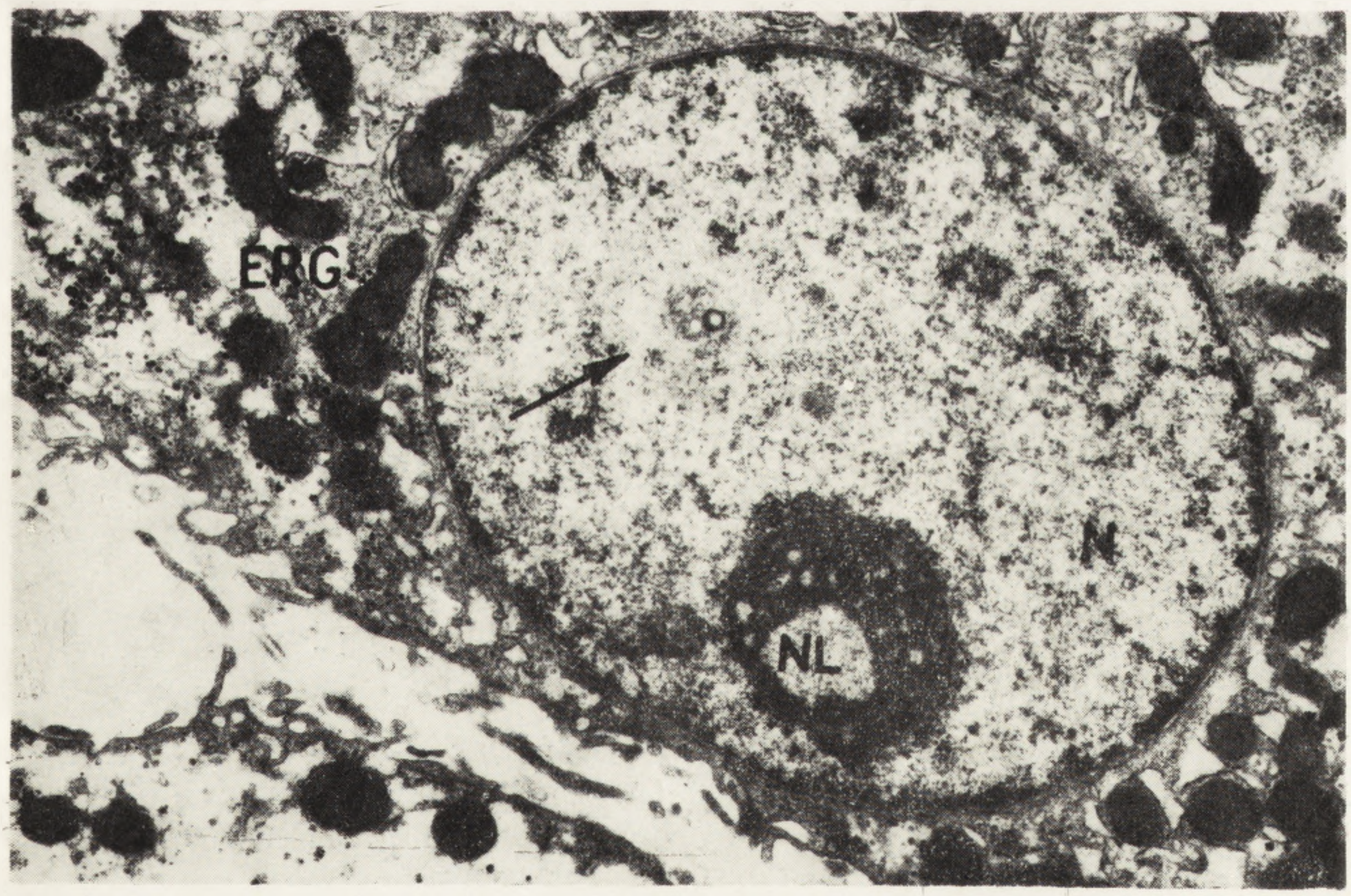
[4] ALMEIDA J. D., RUBENSTEIN D., STOTT E. J., New antigen - antibody system in Australia - antigen - positive hepatitis, Lancet, **2**: 1225–1227, 1971.

[5] ARNOLD W., MEYER ZUM BÜSCHENFELDE K. H., HOPF U., KORDBARLAG

http://rcin.org.pl

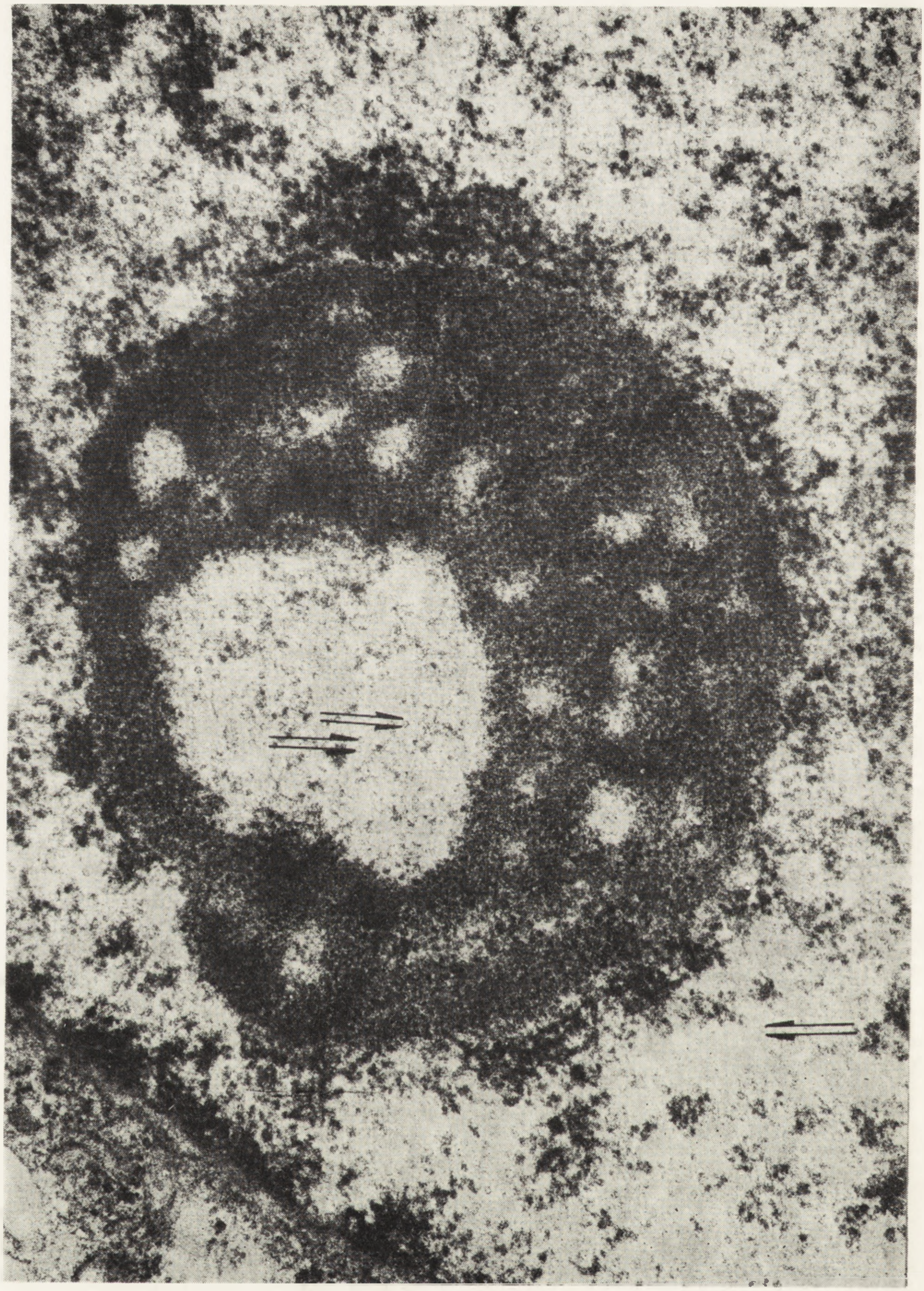


Ryc. 2. Jądro hepatocyta (N) pozbawione heterochromatyny zawiera dwa powiększone jąderka (NL). Cytoplazma nie wykazuje zmian. × 10 000



Ryc. 3. Jądro hepatocyta (N) ma pojedyncze opustoszenia (sztrzałka) oraz powiększone jąderko (NL). Część kanałów ergastoplazmy (ERG) poszerzona. × 7 000

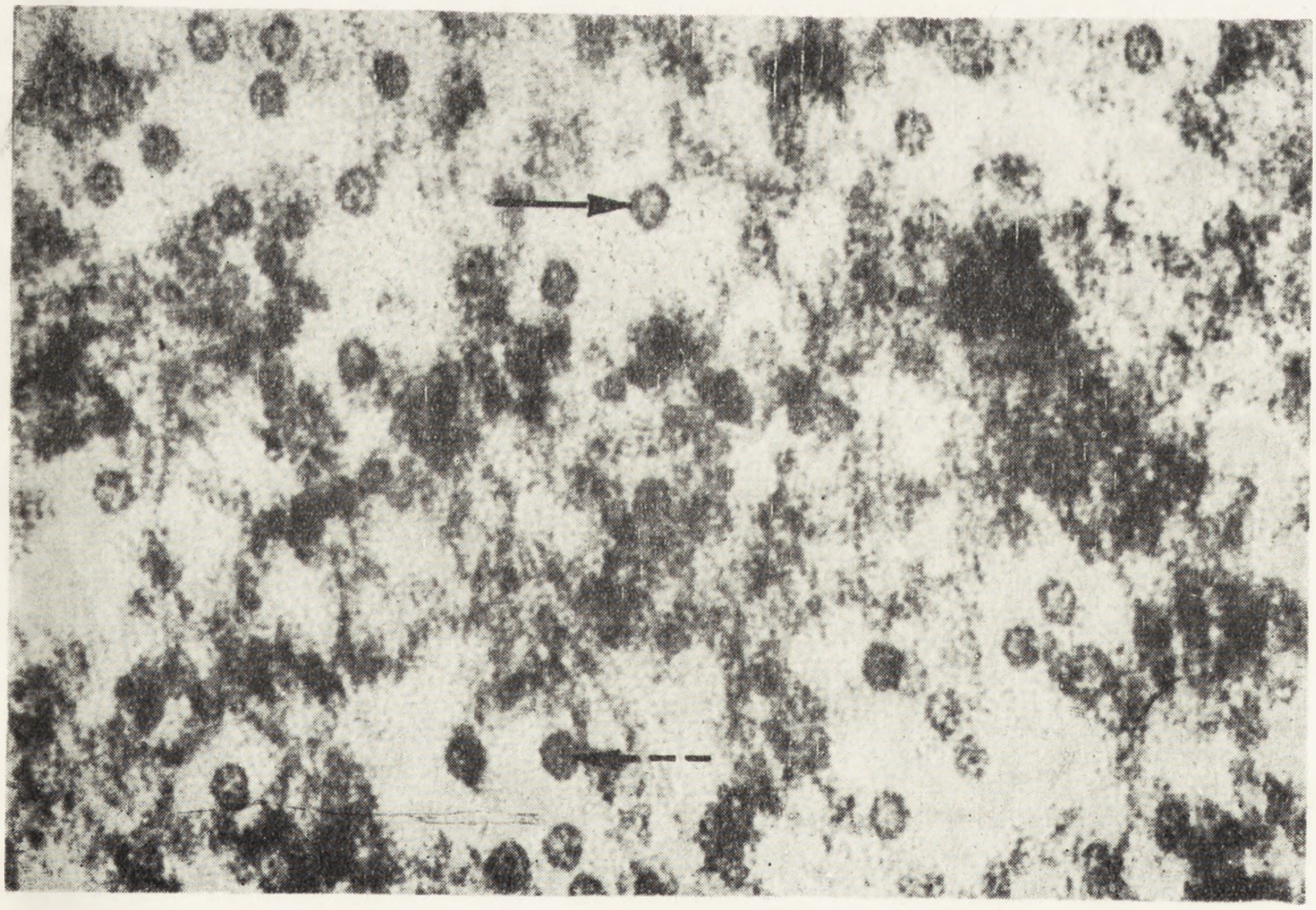
http://rcin.org.pl



Ryc. 3a. Fragment jądra z poprzedniego zdjęcia. Powiększone jąderko zawiera liczne struktury włókienkowe, drobno i gruboziarniste oraz jąderkowy DNA przemieszane ze sobą. W części środkowej jąderka i poza nim obecne są pierścienie wirusowego DNA (podwójna strzałka). × 61 000

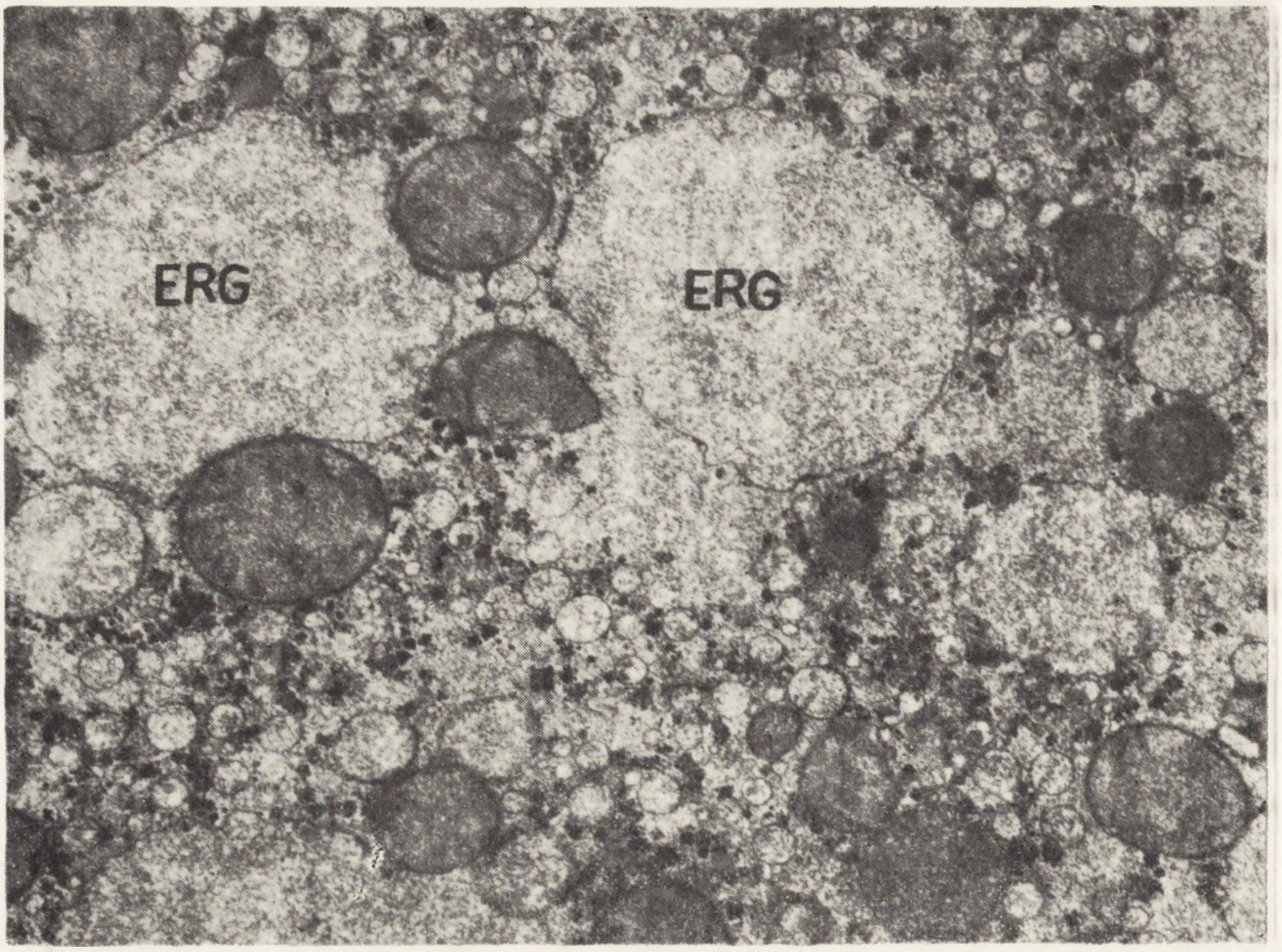
http://rcin.org.pl

Ryc. 4. Fragment jądra hepatocyta wypełnionego pierścieniowymi strukturami rdzeni wirusowych (podwójne strzałki). Liczne ziarna perichromatyczne (strzałka). × 72 000

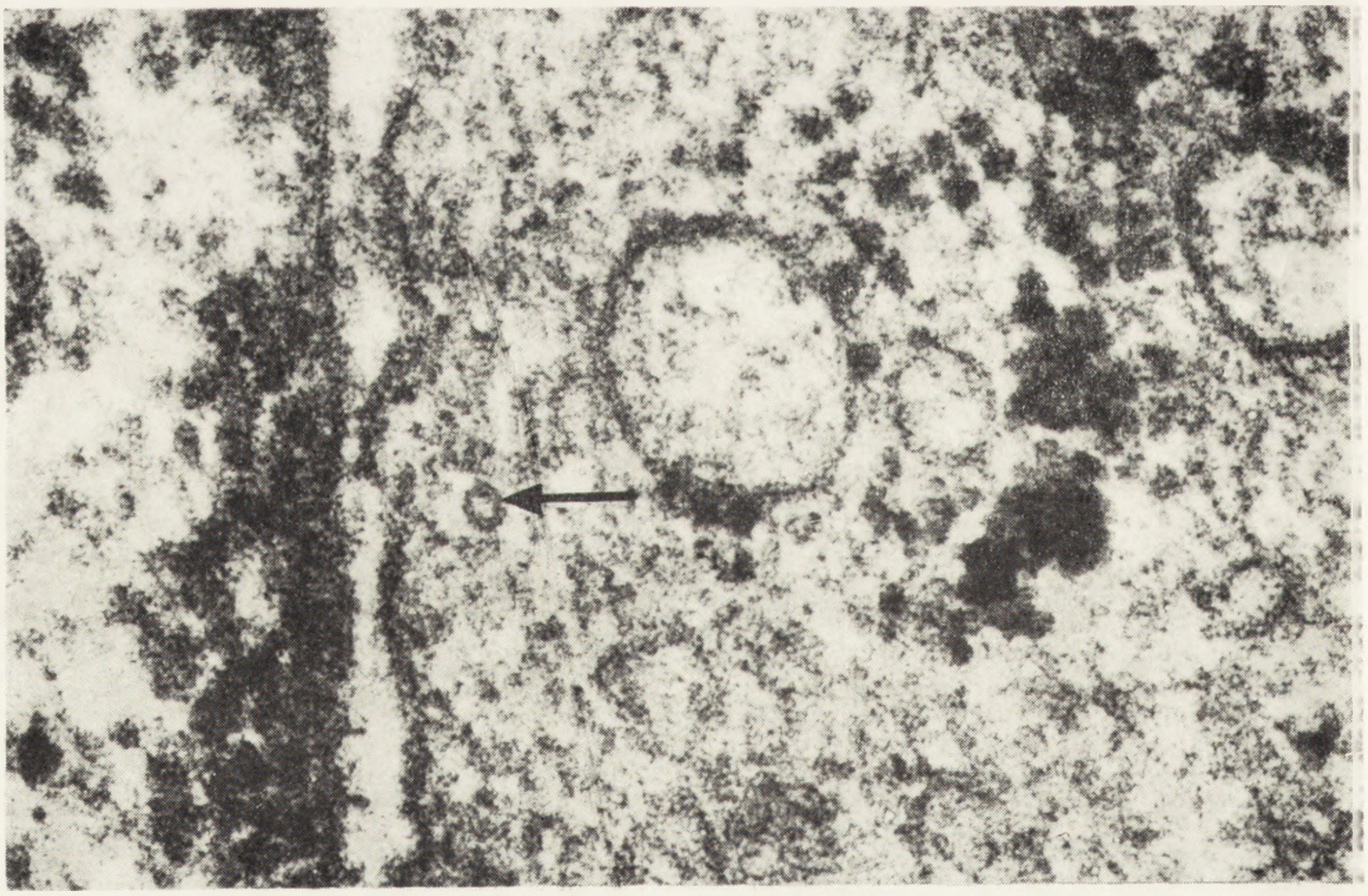


Ryc. 5. Fragment jądra hepatocyta zawiera kompletne (strzałka przerywana) i niekompletne (strzałka) rdzenie cząstek Dane'a, × 150 000

http://rcin.org.pl

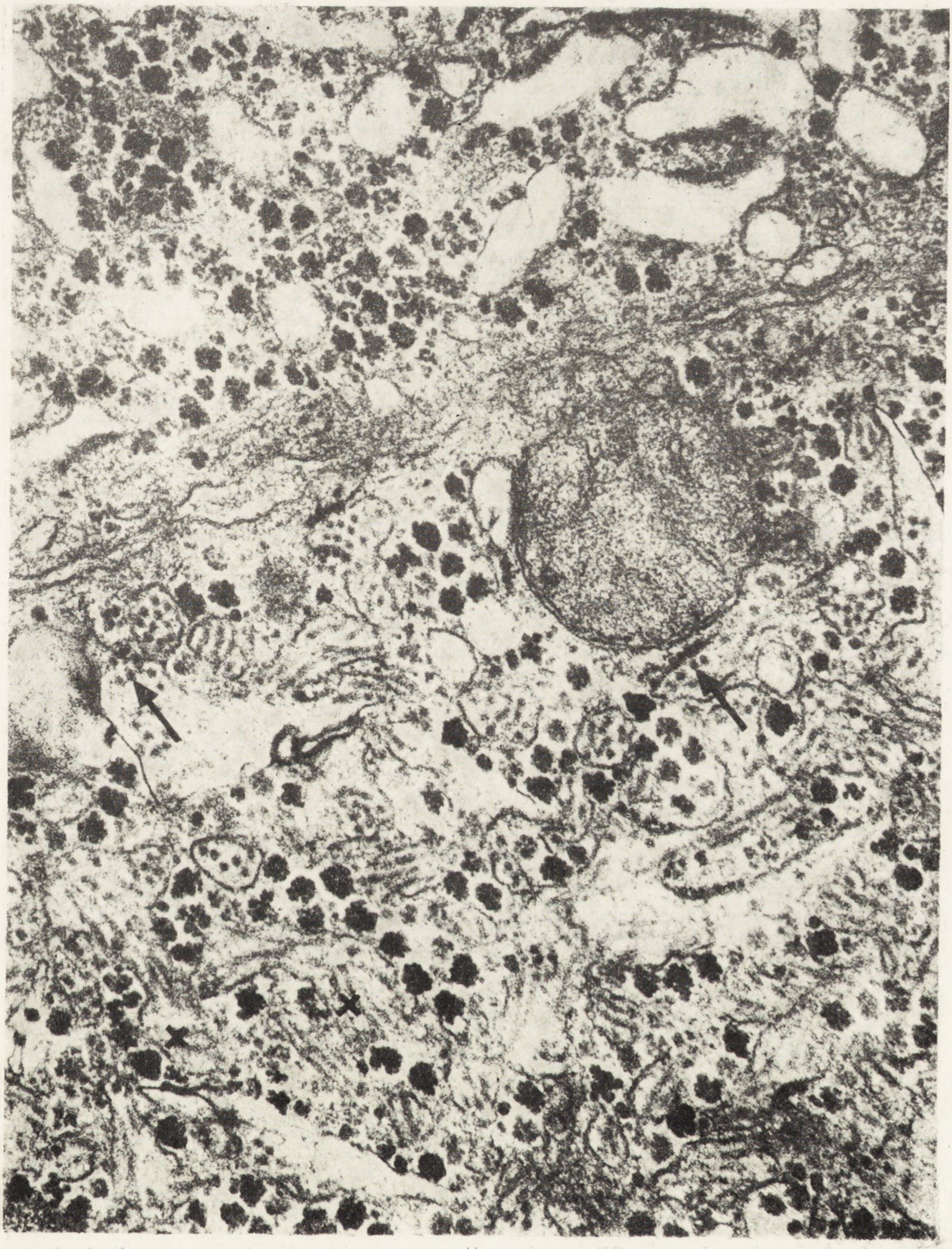


Ryc. 6. Cytoplazma hepatocyta ma poszerzone i częściowo zdegranulowane kanały ergastoplazmy (ERG), zawierające drobnowłókienkowy białkowy materiał, × 24 000



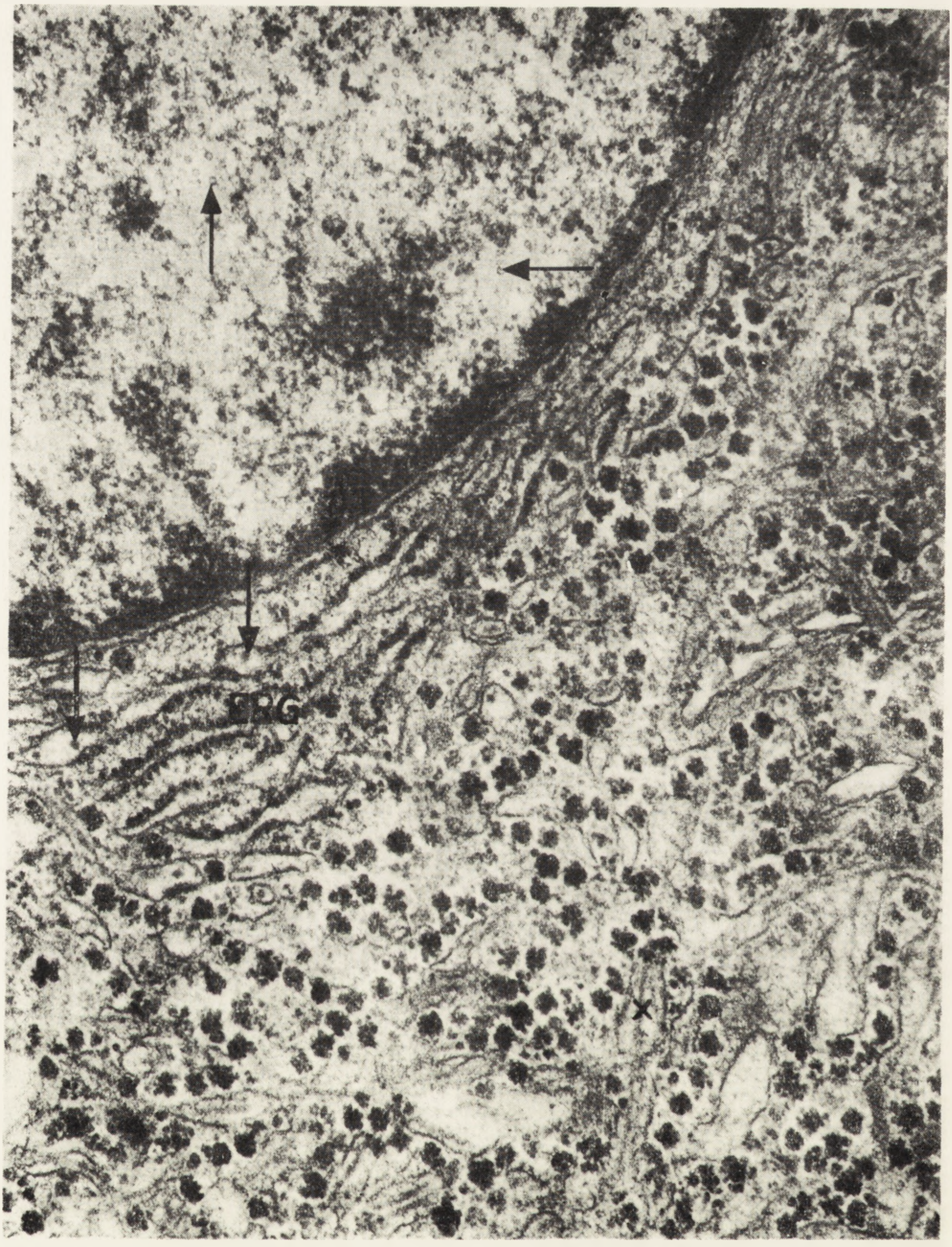
Ryc. 7. Fragment blaszki zewnętrznej otoczki jądrowej zawiera rdzeń wirusa (strzałka), × 180 000

http://rcin.org.pl



Ryc. 8. W częściowo zdegranulowanych kanałach ergastoplazmy znajdują się tubularne formy białek płaszcza wirusowego (x) oraz pełne cząstki Dane'a (sztrzałka), × 67 000

http://rcin.org.pl



Ryc. 9. Jądro hepatocyta (N) zawiera liczne cząstki rdzeniowe (strzałka). Ergastoplazma (ERG) okolicy okołojądrowej ma pojedyncze cząstki rdzeniowe (strzałka), a zdegranulowane kanały obwodowo leżącej siateczki śródplazmatycznej zawierają tubularne formy białek płaszczowych (x). × 60 000

http://rcin.org.pl

C., Untersuchungen zur Hapatitis B - Antigen (HBAg)–Fixation an peripheren Lymphozyten und isolierten Leberzellen bei Patienten mit entzüdlichen Leberenkrankungen, Klin. Wschr., **53**: 231–235, 1975.

[6] BARKER L. F., CHISARI F. V., McGRATH P. P., DALGARD D. W., KIRCHSTEIN R. L., ALMEIDA J. D., EDGINGTON T. S., SHARP D. G., PETERSON M. R., Transmission of type B viral hepatitis to chimpanzees, J. Infect. Dis., **127**: 648–662, 1973.

[7] BAYER M. E., BLUMBERG B. S., WERNER B., Particles associated with Australia antigen in sera of patients with leukaemia, Down's syndrome and hepatitis, Nature, **218**: 1057–1059, 1968.

[8] BERNHARD W., Drug - induced changes in the interphase nucleus. Advances in. cytopharmacology, First Intern. Symp. on Cell Biology, Raven Press, New York, **1**: 49–67, 1971.

[9] BLUMBERG B. S., ALTER H. J., VISNICH S., A „new" antigen in leukemic sera, J. Amer. Med. Assoc., **191**: 541–546, 1965.

[10] BLUMBERG B. S., ALTER H. J., Precipitating antibodies against a serum protein („Australia antigen") in the serum of transfused hemophilia patients, J. Clin, Invest., **44**: 1029 (Abstr.), 1965.

[11] BOND H. E., HALL W. T., Separation and purification of hepatitis - associated antigen in morphologic types by zonal ultracentrifugation, J. Infect. Dis., **125**: 263–268, 1972.

[12] BUDKOWSKA A., SHIH WAI - KUO J., GERIN J. L., Immunochemistry and polypeptide composition of hepatitis B core antigen (HBc Ag), I. Immunol., **118**: 1300–1305, 1977.

[13] CHAIREZ R., HOLLINGER F. B., BRUNSCHWIG J. P., DREESMAN G., Comparative biophysical studies of hepatitis B antigen, subtypes adw and ayw, J. Virol. **15**: 182–190, 1975.

[14] CHAIREZ R., STEINER S., MELNICK J. L., DREESMAN G. R., Glycopepteins associated with hepatitis B antigen, Intervirology, **1**: 224–228, 1973.

[15] CRIVELDI O., ARICO S., BONIN F., LAVARINI C., RIZZETTO M., Distribution of antibodies against the delta - antigen in HBsAg carriers detected by a simple immunofluorescence blocking test, Acta Gastro - ent. Belg., **41**: 351–355, 1978.

[16] DANE D. S., CAMERON C. H., BRIGGS M., Virus - like particles in serum of patients with Australia - antigen - associated hepatitis, Lancet, **1**: 695–698, 1970.

[17] DREESMAN G. R.: HOLLINGER F. B., MELNICK J. L., Biophysical and biochemical properties of purified preparations of hepatitis B surface antigen (HBsAg), Amer. J. Med. Sci, **270**: 123–129, 1975.

[18] DUDLEY F. J., FOX R. A., SHERLOCK S., Cellular immunity and hepatitis - - associated Australia antigen liver disease, Lancet, **1**: 723–726, 1972.

[19] EDGINGTON T. S., RITT D. J., Intrahepatic expression of serum hepatitis virus associated antigens, J. Exp. Med., **134**: 871–885, 1971.

[20] FRIEDMANN T., Genetic economy of polyoma virus: capsid proteins are cleavage products of same viral gene, Proc. Nat. Acad. Sci., **71**: 257–259, 1974.

[21] GERBER M. A.: HADZIYANNIS S., VISSOLIS C., SCHAFFNER R., PARONETTO F., POPPER H., Electron microscopy and immunoelektronmicroscopy of cytoplasmic hepatitis B antigen in hepatocytes, Amer. J. Pathol., **75**: 489–502, 1974.

http://rcin.org.pl

[22] GERIN J. L., PURCELL R. H., HOGGAN M. D., HOLLAND P. V., CHANOCK R. M., Biophysical properties of Australia antigen, J. Virol., **4**: 763–768, 1969.
[23] GERIN J. L., Isolation and physiochemical characteristics of HBAg, [w] Hepatitis and Blood Transfusion, Red. G. N. Vyas, A. H. Perkins i R. Schmid, Grune and Stratton, New York, str. 205–219, 1972.
[24] GERIN J. L., FORD E. C., PURCELL R. H., Biochemical characterization of Australia antigen, Am. J. Path., **81**: 651–668, 1975.
[25] GERIN J. L., SHIH J. W. K., KAPLAN P. M., Biophysical and biochemical characterization of hepatis B antigen, Amer. J. Med., Sci., **270**: 115–121, 1975.
[26] GOUDEAU A., HOUWEN B., DANKERT J., Cross - recation of human serum- - proteins with HBsAg, Lancet, **2**: 1325, 1974.
[27] GEREENMAN R., KAPLAN P. M., ROBINSON W. S., Evidence for the presence of a DNA polymerase in the core of the Dane particle of hepatitis B, Clin. Res., **22**: 125A, 1974.
[28] GUDAT F., BIANCHI L., SONNABEND W., THIEL G., AENISHAENSHIN W., STALDER A., Pattern of core and surface expression in liver tissue reflects state of specific immune response in hepatitis B, Lab. Invest., **32**: 1–16, 1975.
[29] GUDAT F., BIANCHI L., HBsAg a target antigen on the liver cell, [w] Membrane alterations as basis of liver injury, Red., H. Popper, L. Bianchi i W. Reutter, MTP, Lancaster, 171–178, 1977.
[30] HAYNES M. E., HAYNES D. W. G., WILLIAMS R., Cytoplasmic particles in hepatocytes of patients with Australia antigen - positive disease, J. Clin. Path., **25**: 403–409, 1972.
[31] HOOFNAGLE J. H., GERETY R. J., BARKER L. F., Antibody to hepatitis B core antigen, Am. J. Med. Sci., **270**: 179–187, 1975.
[32] HIRSCHMAN S. Z., SHULMAN N. R., BARKER L. F., Virus - like particles in sera of patients with infectious and serum hepatitis, J. Amer. Med. Assoc., **208**: 1667–1670, 1969.
[33] HIRSCHMAN S. Z., VERNACE S. J., SCHAFFNER F., DNA polymerase in preparations containing Australia antigen, Lancet, **1**: 1099–1103, 1971.
[34] HIRSCHMAN S. Z., GERBER M., GARFINKEL E., DNA purified from naked intranuclear particles of human liver infected with hepatitis B virus, Nature, **251**: 540–541, 1974.
[35] — Obserations on the core particle of hepatitis B virus and the DNA polymerase associated with hepatitis B antigen, Amer. J. Med. Sci., **270**: 141–149, 1975.
[36] HIRSCHMAN S. Z., Integrator enzyme hypothesis for replication of hepatitis — B virus, Lancet, **2**: 436–438, 1975.
[37] HOUWEN B., MARRINK J., VOS J., The use of an immunoadsorbent in the isolation of Australia antigen, Vox Sag., **24**: 114, 1973.
[38] HOWARD C. R., Biophysical and biochemical properties of hepatitis B surface antigen and the core, [w] Human Viral Hepatitis, Red. A. J. Zuckerman, North - Holland Publ. Co., Amsterdam, American Elsevier Publ. Co., Inc., New York, str. 108–121, 1975.
[39] HRUSKA J. F., CLAYTON D. A.: RUBENSTEIN J. L. R., ROBINSON W. S., Structure of hepatitis B Dane particle DNA before and after the Dane particle DNA polymerase reaction, J. Virol., **21**: 666–672, 1977.
[40] HRUSKA J. F., ROBINSON W. S., The proteins of hepatitis B Dane particle cores, J. Med. Virol., **1** (2): 119–131, 1977.
[41] HUANG S. N., Hepatitis associated antigen hepatitis. An electron microscopic study of virus-like particles in liver cells, Am. J. Path., **64**: 483–500, 1971.

http://rcin.org.pl

[42] HUANG S. N., GROH V., Immunoagglutination electron microscopic study on virus - like particles and Australia antigen in liver tissue, Lab. Invest., **29**: 353–366, 1973.

[43] HUNAG S. N., GROH V., BEAUDOIN J. C., DAUPHINEE W. D., GUTTMANN R. P., MOREHOUSE D. D., ARNOSS A., GAULT H., A study of the reliationship of virus - like particles and Australia antigen in liver, Human Path., **5**: 209–222, 1974.

[44] HUNG P. P., MAO J. C. H., LING C. M., OVERBY L. R., Hybrydisation of Dane particle DNA with the free plasma DNA of hepatitis cariers, Nature, **253**: 571–572, 1975.

[45] HUNT D. M., WAGNER RR., Location of the transcription defect in group I temperature - sensitive mutans of vesicular stomatitis virus, J. Virol., **13**: 28–35, 1974.

[46] KAPLAN P. M., GERIN J. L., ALTER H. J., Hepatic B - specific DNA polymerase actiity during post - transfusion hepatitis, Nature, **249**: 762–764, 1973.

[47] KAPLAN P. M., GREENMAN R. L., GERIN J. L., DNA polymerase associated with human hepatitis B antigen, J. Virol., **12**: 995–1005, 1973.

[48] KIM C. Y., TILLES J. G., Purification and biophysical characterization of hepatitis B antigen, J. Clin. Invest., **52**: 1176–1186, 1973.

[49] KRUGMAN S., HOOFNAGLE J. H., GERETY R. J., Viral hepatitis, type B: studies involving two new parameters, DNA polymerase activity and antibody to hepatitis core antigen, New Engl. J. Med., **290**: 1331–1335, 1974.

[50] LANDERS T., GREENBERG H. B., ROBINSON W. S., Structure of hepatitis B Dane particle DNA and nature of the endogenous DNA polymerase reaction, J. Virol., **23**: 368–376, 1977.

[51] LE BOUVIER G. E., The heterogeneity of Australia antigen, J. Infect. Dis., **123**: 671–765, 1971.

[52] LE BOUVIER G. E., WILLIAMS A., Serotypes of hepatitis B antigen (HBsAg): The problem of „new" determinants, as exemplified by „t", Amer. J. Med. Sci., **270**: 165–171, 1975.

[53] LEVINE A. J., VAN DER VLIET P. C., SUSSENBAH J. S., The replication of Paporavirus and Adenovirus DNA, Current Topics in Microbiology and Immunology, **73**: 67–124, 1976.

[54] MAGNIUS L. O., EPSMARK J. A., New specificities in Australia antigen positive sera distinct from the Le Bouvier determinants, J. Immunol., **109**: 1017–1021, 1972.

[55] MAYNARD J. E., BERQUIST K. R., DRUSHAK D. H., PURCELL R. H., Experimental infection of chimpanzees with the virus of hepatitis B, Nature, **237**: 514–515, 1972.

[56] MAZZUR S., BURGERT S., LE BOUVIER G., Compound d + y + particles of Australian antigen, J. Immunol., **114**: 1510–1512, 1975.

[57] MILLMAN J., LOEB L. A., BAYER M. E., BLUMBERG B. S., Australia antigen (a hepatitis - associated antigen), J. Exp. Med., **131**: 1190–1199, 1970.

[58] MILLMAN J., HUTANEN H., MERINO F., BAYER M. E., BULMBERG B. S., Australia antigen: physical and chemical properties, Res. Commun. Chem. Path. Pharm., **2**: 667–686, 1971.

[59] MOYER S. A., TSANG J. M., ATKINSON P. H., SUMMERS D. F., Oligosaccharide moieties of the glycoprotein of vasicular stomatitis virus, J. Virol., **18**: 167–175, 1978.

http://rcin.org.pl

[60] MÜLLER R., MEASS J., DEICHER H., Fluoreszenserologischer Nachweis von Australia - antigen in der Leber, Dtsch. Med. Wschr., **98**: 93–99, 1973.
[61] NELSON J. M., BARKER L. F., DANOVITCH S. H., Intranuclear aggregates in the liver of a patients with serum hepatitis, Lancet, **2**: 773–774, 1970.
[62] NEURATH A. R., PRINCE A. M., LIPPIN A., Affinity chromatography of hepatitis B antigen on concavalin A linked to Sepharose, J. General Virol., **19**: 391–395, 1973.
[63] — Hepatitis B antigen: antigenic sites related to human serum proteins revealed by affinity chromatography, Proc. Natl. Acad. Sci., USA **71**: 2663–2667, 1973.
[64] NEURATH A. R., STRICK N., Host specifity of a serum marker for hepatitis B.: evidence that „e" antigen has the properties of an immunoglobulin, Proc. Natl. Acad. Sci., USA **74**: 1702–1706, 1977.
[65] NIELSN J. O., ELLING P., Investigations of liver biopsies for Australia antigen by immunofluorescent technique. Clin. Exp. Immunol., **9**: 699–705, 1971.
[66] NORDENFELT E., LE BOUVIER G., The distribution of subtypes in various Swedish populations positive for hepatitis B antigen, Scand. J. Infect. Dis., **5**: 278–283, 1973.
[67] NORKRANS G., MAGNIUS L., IWARSON S., e antigen in acute hepatitis B, Brit. Med. J., **1**: 740–742, 1976.
[68] NOWOSŁAWSKI A., BRZOSKO W. J., MADALINSKI K., KRAWCZYŃSKI K., Cellular localization of Australia antigen in the liver of patients with lympho-proliferative disorders, Lancet, **1**: 494–498, 1970.
[69] NOWOSŁAWSKI A., KRAWCZYŃSKI K., BRZOSKO W. J., MADALIŃSKI K., Tissue localization of Australia antigen. Immune complexes in acute and chronic and liver cirrhosis, Amer. J. Path., **68**: 31–56, 1972.
[70] OVERBY I. R., HUNG P. P., MAO J. C. H., LING C. M., Rolling circular DNA associated with Dane particles in hepatitis B virus, Nature, **255**: 84–85, 1975.
[71] POPPER H., Clinical pathologic correlation in viral hepatitis. The effect of the virus on the liver, Amer. J. Path., **81**: 609–626, 1975.
[72] PORTMANN B., GALBRAITH R. M., EDDLESTON A. L. W. F., ZUCKERMAN A. J., WILLIAMS R., Detection of HBsAg in fixed liver tissueese of a modified immunofluorescent techniques and comparison with histochemical methods, Gut., **17**: 1–9, 1976.
[73] PRINCE A. M., An antigen detected in the blood during the incubation period of serum hepatitis, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, **60**: 814–821, 1968.
[74] RAY M. B.: DESMET V. J., BRADBURNE A. F., DESMYTER J., FEVERY J., DE GROOTE J., Differential distribution of hepatitis B surface antigen and hepatitis B core antigen in the liver of hepatitis B patients, Gastroenerology, **71**: 462–467, 1976.
[75] RIZZETTO M., CANESE M., G., ARICO S., CRIVELLI O., TREPO C., BONINO F., VERME G., Immunofluorescence detection of new antigen - antibody system (δ / anti - δ) associated to hepatitis B virus in liver and in serum of HBsAg cariers, Gut., **18**: 997–1003, 1977.
[76] ROBINSON W. S., CLAYTON D. A., GREENMAN R. L., DNA of a human hepatitis B virus candidate, J. Virol., **14**: 384–391, 1974.
[77] ROBINSON W. S., DNA and DNA polymerase in the core of the Dane particle of hepatitis B, Amer. J. Med. Sci., **270**: 151–159, 1975.
[78] ROBINSON W. S., LUTWICK L. J., The virus of hepatitis type B, New Engl. J. Med., **295**: 1168–1175, 1976.

http://rcin.org.pl

[79] ROBINSON W. S., The genome of hepatitis B virus, Ann. Rev. Microbiol., **31**: 357–377, 1977.
[80] SCHUURS A. H. W. M., VOLTERS G., Hepatitis B surface antigen and human serum proteins, Amer. J. Med. Sci., **270**: 173–177, 1975.
[81] SCOTTO J., STRALIN H., CAROLI J., Amas de particules viriformes dans les noyaux d'hépatocytes chez un sujet atteint d'hépatite virale mortelle et porteur de l'antigène Australia dans le sérum, Comp. Ren. Acad. Sci. (D), (Paris), **271**: 1603–1604, 1970.
[82] SHIRAISHI H., KOHAMA T., SHIRACHKI R., ISHIDA N., Carbohydrate composition of hepatitis B surface antigen, J. Gen. Virol., **36**: 207–210, 1977.
[83] SMETANA K., RASKA I., SEBESTA, Studies of the organization and distribution of nuclear RNA components after the nucleolar RNA synthesis and processing inhibition, FEBS - Proceedings of the minth meeting, Budapest 1974, **33**, 169–174, 1974.
[84] SOULIER J. P., COURENCE - PAUTY A. M., New determinants of hepatitis B autigen (Au or HB antigen), Vox Sang., **25**: 212–234, 1973.
[85] STEIN O., FAINARU M., STEIN Y., Virus - like particles in cytoplasm of liver of Au - antigen carriers, Lancet, **2**: 90–91, 1971.
[86] SUMMERS J., O'CONNELL A., MILLMAN I., Genome of hepatitis B virus: restriction enzyme cleavage and structure of DNA extracted from Dane particles, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, **72**, 4597, 1975.
[87] VAZQUEZ - NIN G., BERNHARD W., Comparative ultrastructural study of perichromatin and Balbiani ring granules, J. Ultrastruct. Res., **36**, 843–860, 1971.
[88] VIERUCCI A., LONDON A. T., BLUMBERG B. S., Crossreaction of antibodies to human lactoferrin with HBsAg, Lancet, **2**: 344, 1974.
[89] VNEK J., IKRAM H., PRINCE A. M., Heterogeneity of hepatitis B surface antigen - associated particles isolated from chimpanzee plasma, Infect. Immun., **16**: 335–343, 1977.
[90] VYAS G. N., WILLIAMS E. W., KLAUS G. G. B., BOND H. E., Hepatitis - - associated (Australia) antigen. Protein, peptides and aminoacid composition of purified antigen with its use in determining sensitivity of the hemagglutination test, J. Immunol., **108**: 1114–1118, 1972.
[91] VYAS G. N., PETERSON D. L., TOWNSEND R. M., DAMLE S. R., MAGNIUS L. O., Hepatitis B „e" antigen: an apparent associated with lactate dehydrogenase isozyme - 5, Science, **198**: 1068–1070. 1977.
[92] YAMADA G., NAKANE P. K., Hepatitis B core and surface antigens in liver tissue. Light and electron microscopic localization by the peroxidase - labeled antibody method, Lab. Invest., **36**: 649–659, 1977.
[93] ZAWROCKA - WRZOŁKOWA T., Liver cell nuclei during viral hepatitis, Beitr. Path., **146**: 187–191, 1972.
[94] ZUCKERMAN A. J., Human viral hepatitis, North - Holland Publ. Co, Amsterdam, American Elsevier Publ. Co., 351–370, 1975.

Otrzymano: 14 sierpnia 1978.
Przyjęto: 14 marca 1979.

Adres autorów: ul. Przybyszewskiego 49, 60–355 Poznań.

http://rcin.org.pl

http://rcin.org.pl

POSTĘPY BIOLOGII KOMÓRKI TOM 6, NR 3, 1979 (171-185)

MYKOPLAZMOWE I WIRUSOWE ZANIECZYSZCZENIA HODOWLI KOMÓREK

MYCOPLASMAL AND VIRAL CONTAMINATION OF CELL CULTURES

Izabella ZGÓRNIAK - NOWOSIELSKA

Zakład Wirusologii, Instytut Mikrobiologii Akademii Medycznej w Krakowie

Streszczenie. Wskazano na problem zanieczyszczenia hodowli komórkowych przez mykoplazmy. Omówiono wpływ mykoplazm na komórki, częstość występowania zakażeń, źródła i metody wykrywania drobnoustrojów oraz możliwość ich usuwania i ochrony komórek przed zakażeniem.

Przedstawiono zagadnienie wirusowych zanieczyszczeń hodowli komórkowych i wskazano na źródła wirusów. Omówiono zależność współistnienia komórek i wirusów w różnych postaciach zakażenia komórek i tkanek (zakażenia latentne, ukryte, wrodzone) oraz metody i trudności związane z wykrywaniem tych zakażeń.

Wskazano na konieczność kontroli hodowli komórkowych oraz stosowania starannej aseptycznej techniki pracy.

Summary. The problem of cell cultures contamination by mycoplasma and viruses is discussed. Mycoplasma - cell cultures interaction, incidence of contamination, sources of mycoplasma, methods of its detection and possibility of elimination and prevention of contamination of cell cultures are presented. Problems of cell cultures contamination by viruses introduced from bovine sera, as well as latent and cryptic virus infection of tissue cultures and some difficulties in detecting of virus contamination are also discussed. The necessity of regular control of cell cultures and careful aseptic technique to prevent cell cultures contamination are recomended.

Opracowanie metod hodowania komórek zwierzęcych in vitro w latach pięćdziesiątych przyczyniło się znacznie do postępu badań w dziedzinie wirusologii. Obecnie hodowle komórek stanowią układ badawczy nie tylko dla wirusologów, ale są przedmiotem i narzędziem pracy specjalistów wielu odrębnych dziedzin naukowych, jak biologia komórki, immunologia, genetyka, biologia molekularna, biochemia i biofizyka. Zagadnieniem hodowli komórkowych zajmują się odrębne towarzystwa naukowe, organizuje się na ten temat sympozja i konferencje oraz poświęca oddzielne czasopisma naukowe.

http://rcin.org.pl

W przypadku użycia linii komórkowych do badań biologicznych powinny być ściśle określone cechy hodowli, jak swoistość gatunkowa, morfologia i kariotyp komórek, żywotność (plating efficiency, ang.) komórek po trypsynowaniu, liczba pasaży przeprowadzonych po ustaleniu linii, wrażliwość na zakażenie wirusowe, zdolność wywoływania guzów u zwierząt laboratoryjnych i inne właściwości. Charakterystyka linii komórkowych powinna na podstawie przeprowadzonych testów mikrobiologicznych stwierdzać, czy hodowle są wolne od drobnoustrojów.

Kontrola komórek w kierunku zanieczyszczeń bakteryjnych lub grzybicznych jest prowadzona zazwyczaj rutynowo w każdym laboratorium, a efekt zakażenia nie może ujść uwadze badaczy. Znacznie większe trudności sprawiają zanieczyszczenia wirusowe lub mykoplazmowe. Są one najczęściej niezauważalne makroskopowo. Niekiedy trudności związane z utrzymaniem hodowli w ciągu kolejnych pasaży, zmienność w zakresie wrażliwości komórek na zakażenie wirusem, wreszcie wystąpienie nietypowej degeneracji komórek nasuwają podejrzenie zakażenia hodowli komórek.

Zakażenia mykoplazmowe hodowli, opisane po raz pierwszy w 1956 roku [37], stanowią poważny problem również w naszych pracowniach. W badaniach własnych, przeprowadzonych w latach 1968—1975, wykazano, że spośród 65 linii komórkowych, pochodzących z różnych pracowni wirusologicznych na terenie kraju, aż 69% było zakażonych mykoplazmami [50]. Izolowane szczepy należały zarówno do gatunków występujących u człowieka — *Mycoplasma orale* typ 1 i *Mycoplasma hominis*, jak również u świń — *Mycoplasma hyorhinis* oraz u bydła — *Mycoplasma arginini*. Ten ostatni szczep wyosobniono również z surowicy cielęcej. Gatunki izolowanych szczepów wskazują na źródło mykoplazm występujących w hodowlach komórek. Mogą one pochodzić zarówno od osób, które w pewnym odsetku są nosicielami mykoplazm, jak również z surowic stosowanych do wzbogacania podłóż do hodowli komórek.

Stwierdzenie, że różne linie komórkowe, pochodzące z jednego ośrodka badawczego, były zakażone tym samym szczepem mykoplazm, wskazuje, że szerzenie się zakażenia drogą kropelkową z zakażonych hodowli komórek mogło być spowodowane niewłaściwą techniką pracy [49]. Dodawanie antybiotyków do płynów odżywczych obniża również reżim aseptycznej pracy i stanowi czynnik współdziałający w zanieczyszczeniu mykoplazmami hodowli komórkowych. Antybiotyki hamują bowiem wzrost bakterii wprowadzonych ze śliną, zwłaszcza przy pipetowaniu płynów ustami, natomiast mykoplazmy oporne na penicylinę i słabo wrażliwe na streptomycynę, preparaty najpowszechniej stosowane w podłożach tkankowych, znajdują dogodne warunki namnażania.

http://rcin.org.pl

Obserwowano wielokrotnie częstsze zakażenia hodowli prowadzonych na podłożach z antybiotykami, w porównaniu z hodowlami bez antybiotyków; odsetek zakażonych linii wynosił odpowiednio 72 oraz 7 (Barile i wsp. [7]).

Surowice cielęce stanowią znacznie częstsze źródło zakażenia hodowli komórkowych niż sądzono dawniej. Przez wiele lat kontrole surowic wykazywały ujemne wyniki, jednak opracowanie metody, w której badaniu podlega większa objętość materiału, pozwoliło wykazać obecność mykoplazm w surowicach. Stosując tę metodę zbadano kilkaset próbek surowicy cielęcej i płodowej i stwierdzono, że 34% surowic dostarczanych z placówek zaopatrujących w ten materiał oraz 19% surowic opracowanych w postaci gotowych preparatów handlowych było zakażonych mykoplazmami. W 62 surowicach, w których stwierdzono zakażenie mykoplazmowe, nie można było wykazać tych dronboustrojów metodą standardowej hodowli [6]. Wskazuje to na wyższość wspomnianej metody i celowość jej stosowania, zwłaszcza przy izolacji mykoplazm z materiałów, w których występują one w niskim mianie.

Obecność szczepów *Mycoplasma hyorhinis* w hodowlach komórek nie jest całkowicie wyjaśniona. Sądzono, że źródłem może być trypsyna, jednakże badania różnych serii tego preparatu nie wykazały obecności mykoplazm. Izolacja szczepu *M. hyorhinis* z surowicy bydlęcej nasuwa przypuszczenie, że w pewnych warunkach w procesie pobierania surowic cielęcych mogą one ulec przypadkowemu zakażeniu szczepami pochodzącymi od świń. Sądzę jednak, że bardzo szerokie rozpowszechnienie szczepów *M. hyorhinis* w hodowlach komórek, pochodzących z pracowni w Stanach Zjednoczonych, wykazane w latach 1965—1968 [5], wskazuje również na inne źródło zakażenia i mogą być nim przede wszystkim zakażone hodowle [49].

Zanieczyszczenia mykoplazmowe znacznie rzadziej występują w pierwotnych hodowlach komórek [50]. Wyjściowa tkanka, która jest źródłem hodowli pierwotnych, mimo szerokiego rozpowszechnienia mykoplazm u ludzi i zwierząt, nie stanowi więc poważniejszego zagrożenia dla wprowadzenia tych drobnoustrojów do hodowli, a krótki okres utrzymywania hodowli w pracowni zmniejsza możliwość zakażenia ich drobnoustrojami z otaczającego środowiska.

Wiele prac poświęcono opisaniu metod wykrywania mykoplazm w hodowlach komórkowych. Stosowano metody pośrednie, jak barwienie komórek, wykazywanie obecności antygenu dronboustrojów metodą immunofluorescencji, oglądanie tych organizmów w mikroskopie elektronowym oraz metody chemiczne. Opracowywanie coraz to nowych metod zmierza nie tylko do uproszczenia istniejących sposobów wykazywania

http://rcin.org.pl

zanieczyszczeń mykoplazmowych, ale wskazują również na pewne braki istniejących metod.

Preparaty z hodowli komórek owodni ludzkiej zakażonej mykoplazmami, barwione orceiną, w przypadku silnego zakażenia wykazują charakterystyczny obraz mozaiki na skutek skupienia dronboustropów w przestrzeniach międzykomórkowych. Słabsze zakażenie hodowli pozwala obserwować pojedyncze cząstki mykoplazm, kuliste lub rzadziej owalne, o wymiarach 0,18 μm–1,6 μm, przylegające do błony komórkowej. Mogą one również występować pojedynczo lub w skupiskach, w postaci kolonii na powierzchni szkła naczynia, w którym hodowle są prowadzone. Wykrywanie mykoplazm w hodowlach barwionych orceiną zawodzi w przypadku słabego zakażenia [18–20].

Zastosowanie techniki mikroskopii elektronowej pozwoliło poznać strukturę mykoplazm, procesy namnażania i powinowactwo do komórek hodowanych in vitro [1–4, 13, 26, 51]. W przypadkach „pokojowego" współżycia mykoplazm i komórek oraz braku objawów zakażenia, obserwacja hodowli w mikroskopie elektronowym ma szczególne znaczenie [51]. Mykoplazmy mają zdolność adsorbowania się na powierzchni komórek i często obserwuje się cząstki otoczone przez mikrokosmki komórkowe, natomiast w hodowlach poddanych działaniu antybiotyków, występują one niekiedy w wakuolach komórek. Ultrastruktura mykoplazm nie zależy od ich gatunku i własności metabolicznych; występują postacie owalne, a niekiedy cylindryczne, otoczone podwójną błoną zawierające kwas nukleinowy oraz rybosomy. Obserwowano również formy posiadające pałeczkowate wydłużenia, którymi przylegają do błony komórki zwierzęcej. Mogą one w poprzecznym przekroju przypominać cząstki elementarne wirusów [26]. Mikroskopia elektronowa, technika zbyt pracochłonna i mało dostępna, nie może znaleźć szerszego zastosowania w wykrywaniu zanieczyszczeń mykoplazmowych hodowli. Czynione są również próby uproszczenia przygotowania preparatów i wykazywania struktur tych drobnoustrojów w mikroskopie elektronowym transmisyjnym [34].

Zastosowanie testu immunofluorescencji do wykrywania mykoplazm wymaga przygotowania i użycia wielu surowic odpornościowych, ponieważ różne gatunki mykoplazm mogą zanieczyszczać hodowle. W naszych więc warunkach, wobec braku handlowych preparatów surowic, ten sposób badania jest bardzo pracochłonny.

Metody biochemiczne, wykorzystujące aktywność enzymów obecnych w mykoplazmach, nie są również pozbawione błędów. Przejawem tej aktywności jest enzymatyczny rozkład argininy [8] lub działanie fosforylazy urydylowej [29, 30]. Nie wszystkie gatunki mykoplazm posiadają zdolność deaminacji argininy [8]. Test Levina [29], oparty na zdol-

http://rcin.org.pl

ności mykoplazm do rozkładu urydyny, szybki i wygodny w użyciu, został zastosowany do wykrywania zanieczyszczeń mykoplazmowych w hodowlach diploidalnych komórek ludzkich. Do badanych komórek wbudowano znakowaną promieniotwórczo urydynę i określano stopień rozkładu urydyny przez mykoplazmy. W przypadku hodowli zakażonych mykoplazmami obserwowano spadek ilości urydyny, a wzrost uracylu [39]. Jednakże metoda Levina może niekiedy dawać fałszywie dodatnie wyniki. Stwierdzono to przy kontroli linii komórek nerki zielonej małpy afrykańskiej (AGMK) oraz hodowli pierwotnych pochodzączych od innych gatunków małp. Wymienione komórki wykazują silną aktywność enzymatyczną, wywołują konwersję urydyny do uracylu i wskutek tego we wszystkich badanych hodowlach, również nie zakażonych, uzyskano dodatnie wyniki [47]. W celu wykrycia zanieczyszczeń mykoplazmowych w tych hodowlach zastosowano zmodyfikowaną metodę wykorzystującą aktywność fosforylazy tymidyny wytwarzanej przez mykoplazmy. Stopień konwersji tymidyny do tyminy oznaczono chromatograficznie [25, 47].

Przedstawione pośrednie metody wykrywania mykoplazm w hodowlach komórkowych nie są więc pozbawione błędów. Dlatego metoda bezpośrednia wykazywania drobnoustrojów, przez izolację ich na podłożach, zasługuje na szczególną uwagę. W tym celu stosowane są najczęściej podłoża opisane przez Chanocka i wsp. [11] lub o zbliżonym składzie [48]. Podstawę tego podłoża stanowi wyciąg z serca wołu z dodatkiem peptonu, surowicy końskiej i wyciągu drożdżowego. Podłoża stałe zawierają ponadto agar, a płynne — czerwień fenolową.

Przed badaniem hodowle komórek winny być inkubowane w podłożach bez antybiotyków. Materiałem do badania jest zarówno płyn z hodowli, jak i zawiesina trypsynowanych komórek. Z podłoży płynnych dokonuje się przesiewu na podłoża stałe. Płytki inkubuje się w temperaturze 37°C w atmosferze tlenowej i beztlenowej (95% N_2, 5% CO_2), w pojemnikach zabezpieczających utrzymanie wilgotności podłoża i codziennie ogląda się je pod mikroskopem. Kolonie mykoplazm o średnicy 10–100 μm mają różną morfologię, zależną nie tylko od gatunku izolowanego szczepu, ale również od gęstości hodowli, czasu inkubacji i rodzaju podłoża. Często obserwuje się kolonie posiadające ciemniejsze centrum, wrastające do agaru. Niekiedy skupiska martwych komórek, pochodzących z hodowli, lub pseudokolonie nastręczają trudności w rozpoznaniu kolonii mykoplazm [23]. Własności metaboliczne izolowanych szczepów, jak rozkład glukozy lub argininy, stanowią o wstępnej identyfikacji, a ostateczną przynależność gatunkową oznacza się serologicznie w teście zahamowania wzrostu według Clyde [12]. Szybszą identyfikację szczepów można również przeprowadzić bezpośrednio w pierwotnych ho-

http://rcin.org.pl

dowlach na płytkach przy użyciu surowic odpornościowych w odczynie immunofluorescencji [6]. Metoda ta pozwoliła również ujawnić zakażenie mieszane, wywołane dwoma gatunkami mykoplazm w tej samej hodowli komórek.

W toku pracy nad izolacją mykoplazm z hodowli komórkowych stwierdzono, że nie wszystkie szczepy rosną w bezpośrednich posiewach na podłożach standardowych [51]. Badania mikroskopowo - elekronowe niezakażonych linii komórek nerki chomika (BHK/21) oraz zakażonych wirusem wścieklizny lub wirusem LCM wykazały obecność cząstek morfologicznych zbliżonych do mykoplazm, których nie można było izolować na podłożach standardowych. W badaniu tych linii zastosowano metodę izolacji w hodowli komórek BHK/21 w podłożu Eagle'a zestalonym agarozą. Po kilku dniach inkubacji na powierzchni płytek stwierdzono obecność nieprzejrzystych skupisk o średnicy około 0,05–1 mm, które w dalszych badaniach okazały się koloniami mykoplazm. Na płytkach podbarwionych czerwienią obojętną kolonie te tworzyły łysinki z widocznym ciemniejszym centrum, które odróżniało mykoplazmy od łysinek wirusa. Przesiew kolonii izolowanych, w obecności komórek BHK zawieszonych w agarozie, na podłoża standardowe (PPLO - bulion i PPLO - agar firmy Difco) pozwolił izolować szczepy, których nie można było wyosobnić przez bezpośredni posiew badanych hodowli na podłoża bezkomórkowe. W teście zahamowania wzrostu oznaczono przynależność izolowanych szczepów do gatunku *Mycoplasma hyorhinis* [51]. Wyższa czułość opisanej metody wskazuje na celowość jej stosowania w przypadkach, w których jest podejrzenie zakażenia hodowli mykoplazmami, a użycie standardowej metody nie wykazuje obecności tych drobnoustrojów.

Hodowle komórek zanieczyszczone mykoplazmami nie mogą być używane w żadnych badaniach biologicznych. Drobnoustroje te wywierają znaczny wpływ na metabolizm kwasów nukleinowych i aminokwasów komórki [44] oraz wywołują zmiany w chromosamach komórki [17, 44]. Obserwacje przeprowadzone w hodowlach komórek owodni zakażonych mykoplazmami wskazują, że zmiany zachodzące w chromosomach komórek, zmniejszenie ich liczby, wzrost aberracji i pojawianie się nowych chromosomów uwarunkowane są procesami geetyczynmi [17, 19, 21]. Po usunięciu mykoplazm z hodowli niektóre zmiany, np. dotyczące kariotypu komórki, spadku liczby podziałów komórkowych oraz wzrostu oporności na zakażenie mykoplazmowe, utrzymywały się w dalszych pasażach hodowli. Podobne zmiany w chromosomach komórek owodni, wywołane zakażeniem mykoplazmami, obserwowano w hodowlach diploidalnych fibroblastów ludzkich w następstwie infekcji wirusem SV_{40} [28].

Zmiany, które wywołują mykoplazmy w hodowlach komórek, nie

http://rcin.org.pl

mogą pozostać bez wpływu na namnażanie wirusów. Zahamowanie metabolizmu i wzrostu komórek oraz zmiany degeneracyjne [10], jak również zubożenie podłoża, znacznie hamują namnażanie wirusów. Arginina, niezbędna w procesach syntezy białek kapsydu i produkcji kompletnych zakaźnych cząstek wirusa, jest metabolizowana przez niektóre gatunki mykoplazm. Obserwowano słabsze namnażanie adenowirusa [38], wirusa krowianki [41] oraz wirusa SV_{40} [22] w hodowlach zanieczyszczonych mykoplazmami. Z drugiej strony wykazano, że *Mycoplasma arginini* i *Mycoplasma hyorhinis* hamują produkcję interferonu i mogą w określonych warunkach wpływać na podniesienie miana wirusów [40, 42, 43].

Stężenie mykoplazm w hodowlach komórek osiąga często wyższe miano niż namnażany wirus, a liczba cząstek mykoplazmowych zawarta w mililitrze podłoża może być o kilka rzędów wielkości wyższa od liczby komórek zanieczyszczonych hodowli [33].

Wiele prac poświęcono opracowaniu sposobów usuwania mykoplazm z hodowli komórek. Stosowano działanie wyższej temperatury, a przede wszystkim „leczenie" hodowli antybiotykami [14, 35, 49, 50]. Pomimo uzyskania w niektórych przypadkach pozytywnych wyników, nie należy zalecać powszechnie tego sposobu postępowania. Stosowanie antybiotyków, na które mykoplazmy są wrażliwe, może niekiedy tylko zmniejszać liczbę cząstek mykoplazm, powodować ich „ucieczkę" do wakuoli komórkowych i może prowadzić do zamaskowanego zakażenia komórek. Nieodwracalne zmiany w komórkach, utrzymujące się przez wiele lat po usunięciu mykoplazm [19], wskazują również, że raz zakażona hodowla może utracić właściwości charakterystyczne dla ustalonych linii komórkowych.

Problem zanieczyszczeń wirusowych w hodowlach komórek przedstawia znacznie większe trudności od opisanych zakażeń mykoplazmowych. Wykrycie w płodowych surowicach cielęcych, używanych do hodowli komórek, przeciwciał przeciwko niektórym wirusom chorobotwórczym dla bydła wskazywało, że płód przebył zakażenie in utero. Fakt ten zwrócił uwagę badaczy na możliwość wprowadzania wirusów wraz z surowicą do hodowli komórkowych. Podjęto zatem badania obecności wirusów w surowcach pobranych od płodów, cieląt kilkumiesięcznych oraz od dorosłych zwierząt. Surowice przed badaniem wirowano, a następnie osad zawieszony w podłożu Eagle'a wprowadzano do hodowli diploidalnych komórek tchawicy bydlęcej i płuca zarodka ludzkiego. Wykazano, że około 10% surowic było zanieczyszczonych wirusami. Większość spośród izolowanych szczepów można było zidentyfikować. Należały one do grupy wirusów *Herpes* lub wirusów biegunki bydła. Kilka szczepów, które wytwarzały ciała wtrętowe w cytoplazmie i jądrze komórek, należało przypuszczalnie do wirusów grupy parainfluenza [27].

http://rcin.org.pl

Stwierdzono więc, że surowice cielęce mogą być źródłem zanieczyszczenia hodowli komórek nie tylko mykoplazmami, ale również wirusami występującymi u bydła. Zapobieganie tym zanieczyszczeniom stanowi problem otwarty i konieczne jest przestrzeganie zasad jałowości przy pobieraniu krwi oraz opracowanie takich metod wyjaławiania surowic, które umożliwią inaktywowanie wszystkich zanieczyszczeń biologicznych, a nie będą obniżały tych właściwości surowic, które wspomagają wzrost komórek zwierzęcych hodowanych in vitro.

Innym źródłem przypadkowych zakażeń wirusowych hodowli komórek jest tkanka i narządy, z których uzyskuje się hodowle. Często występujące ukryte zakażenia wirusowe u wielu gatunków zwierząt są przyczyną przeniesienia wirusów do hodowli in vitro. Szczególnie tkanki nowotworowe mają duży dynamizm namnażania się, stwarzają dogodne warunki replikacji wirusów i są ich nosicielami.

Zakażenia wirusowe komórek hodowanych in vitro mogą przebiegać bezobjawowo. W tej formie zakażenia zachodzi stan równowagi (steady state, ang.) między wirusem a tkanką lub narządem gospodarza, lub wirusem a komórką hodowaną in vitro i brak jest objawów zakażenia. Wywołują go często wirusy zawierające kwas rybonukleinowy (RNA), które w fazie dojrzewania uwalniają się z błony cytoplazmatycznej komórki przez proces „pączkowania". Tę formę zakażenia utajonego obserwowano w przypadku pierwotnej hodowli nerki małpy *Maccacus rhesus* i paramyksowirusa SV_5 (wirus małpi wakuolizujący). W hodowli fibroblastów zarodków kurzych mogą występować utajone zakażenia wirusami białaczki ptaków lub wirusem mięsaka Rousá (RSV).

Zakażenie komórek ptasich i mysich przez wirusy onkogenne jest bardzo rozpowszechnione. Genom wirusów onkorna jest ściśle zintegrowany z genomem komórki gospodarza. Komórki tych zwierząt zawierają determinanty wirusów onkorna przenoszone „pionowo" z rodziców na potomstwo w sposób dziedziczny. Wirusy tej grupy mogą nie ujawniać się w hodowli in vitro, mogą wywoływać transformację nowotworową komórek lub, po wielokrotnych pasażach komórek, mogą występować w postaci zakaźnych cząstek. Na obecność wirusów w komórce wskazuje nie tylko zmiana właściwości komórek, ale również wytwarzanie swoistego antygenu wirusowego. Istnieje możliwość odzyskania dojrzałych cząstek wirusa przez łączenie (fuzja) z komórkami wrażliwymi. Aktywacja tych wirusów w komórkach namnażanych in vitro może zachodzić spontanicznie, jak również pod wpływem czynników chemicznych [9, 16, 31, 32, 45, 46].

W hodowlach komórek pozostających w „stanie równowagi" z zakażającym je wirusem prawie wszystkie komórki są zakażone, a wirus jest

http://rcin.org.pl

stale uwalniany w małej ilości. Takich hodowli komórek nie można „wyleczyć" przez zastosowanie surowic zawierających przeciwciała.

Zakażenia komórek wirusami zawierającymi kwas dezoksyrybonukleinowy (DNA), w przypadku gdy zachodzi synteza zakaźnych cząstek wirusa, przebiegają najczęściej ze zmianami degeneracyjnymi komórek. Niekiedy jednakże występuje również stan równowagi, w którym równolegle odbywa się namnażanie komórek i wirusów. Tak na przykład wirus włókniaka królików (*Fibroma virus*) wywołuje bardzo słabo zaznaczone zmiany morfologii komórek nerki królika, a wirus SV_{40} (*Simian virus* — wirus małpi wakuolizujący) podobnie zachowuje się w hodowli komórek nerki małpy *Maccacus rhesus*. Ten ostatni wirus został przypadkowo wprowadzony do szczepionki przeciwko poliomyelitis, przygotowanej z wirusów polio, namnażanych w hodowli komórki nerki małpy *M. rhesus*.

Tkanki i narządy zwierząt, będące źródłem hodowli komórek in vitro, mogą być trwale zakażone wirusem, który pozostaje w formie latentnej. Dotyczy to szczególnie wirusów grupy *Herpes*. Wykazano, że komórki limfoblastyczne, pochodzące z chłoniaka Burkitta, pasażowane wielokrotnie ujawniają obecność wirusa Epstein - Barra [24], a hodowle komórek nerki małpy *Maccacus rhesus* są latentnie zakażone szczególnie niebezpiecznym dla człowieka wirusem B (*Herpesvirus simiae*).

Inna forma trwałego zakażenia hodowli komórek to „hodowle - nosiciele" (carrier - cultures, ang.), które powstają w następstwie wprowadzenia wirusa do hodowli komórek i pasażowania tych hodowli. Komórki zakażone wirusem dzielą się i dają początek zakażonym klonom komórkowym. Stan nosicielstwa wirusów w komórce może być uwarunkowany genetyczną opornością większości komórek na zakażający wirus i namnażaniem się wirusa tylko w nielicznych wrażliwych komórkach lub też komórki wykazują wrażliwość na wirus obecny w hodowli, ale jego przenoszenie z komórki do komórki jest hamowane przez przeciwciała obecne w podłożu. Komórki wrażliwe na wirus mogą również wykazywać okresową oporność na zakażenie przez ochronne działanie interferonu, produkowanego w hodowlach „komórek - nosicieli" [16].

Hodowle komórek mogą być również zakażone wirusem ukrytym. W tej postaci zakażenia, określanym jako ukryte lub okultywne (occult, ang.), nie daje się wykryć obecności cząstek wirusa ani określić aktualnej fazy jego rozwoju. Stwierdzono, że nerki zdrowych małp zawierają często różne rodzaje wirusów, które w organizmie są hamowane przez obecne przeciwciała i nie ujawniają się, natomiast w hodowli komórek nerki in vitro namnażają się i wywołują efekt cytopatyczny.

Zanieczyszczenia hodowli komórek wirusami pochodzącymi ze środowiska zewnętrznego lub z surowic użytych do hodowli, a przede

http://rcin.org.pl

wszystkim latentne i ukryte zakażenia tkanek, z których uzyskano hodowlę komórek, mogą być źródłem błędów nie tylko przy izolacji wirusów z materiałów klinicznych, w badaniach dotyczących charakterystyki ludzkich wirusów, ale przede wszystkim w badaniach genetycznych. Hybrydyzacja materiału genetycznego różnych wirusów, namnażanych w tych samych komórkach, prowadzi do tworzenia i replikacji hybrydów o zmienionych własnościach [36]. Zmiany właściwości wirionów zachodzą również w procesach transkapsydacji, gdy materiał genetyczny jednego wirusa jest wbudowany do płaszcza białkowego innego wirusa.

Wykazanie zanieczyszczeń wirusowych w hodowlach komórek jest trudne. Obecność zakaźnych cząstek wirusów, przejściowo i przypadkowo zakażających hodowlę, można stwierdzić przez izolację ich we wrażliwym układzie komórek. Obecność wirusów, które nie wywołują efektu cytopatycznego, można stwierdzić pośrednio przez oznaczenie poziomu interferonu w hodowli i wykazanie oporności komórek na zakażenie indykatorowym wirusem cytopatycznym, wrażliwym na interferon. Wirusy grupy myxo i paramyxo można również wykrywać w odczynie hemadsorpcji.

Znacznie większe trudności sprawiają zakażenia wirusami, które nie występują w postaci zakaźnych cząstek. Wykrycie tych zakażeń wymaga stosowania złożonych metod. Technika fuzji komórek z komórkami indykatorowymi pozwala niekiedy ujawnić obecność wirusów wywołujących transformację, a chemiczna aktywacja umożliwia wykrycie genomu wirusów zintegrowanych z genomem komórki gospodarza [9, 32, 45]. Ukryte wirusowe zakażenia komórek można również ujawnić przez wykazanie antygenów wirusowych metodą immunofluorescencji.

Technika mikroskopii elektronowej znalazła szczególne zastosowanie w rozpoznawaniu ukrytych zakażeń wirusowych w komórkach. Poznano ultrastrukturę nowych czynników w tkankach zwierząt laboratoryjnych i w hodowlach komórek pochodzących od tych zwierząt. Szereg linii komórek mysich, które nie wykazują zmian cytopatycznych, jest zakażonych wirusami białaczki mysiej (MLV - Murine Leukemia Virus). W linii BHK, uzyskanej z nerki zarodka chomika, oraz innych liniach chomiczych obserwuje się występowanie wirusopodobnych cząstek R (nazwa od słowa ang. radiate) o charakterystycznej morfologi z promienistym układem wypustek wypełniających przestrzeń pomiędzy genomem a osłonką cząstki. Aktywność biologiczna tych cząstek nie jest poznana, jednakże wiadomo, że nie wywołują one zmian degeneracyjnych komórek, w których występują [15]. Zastosowanie mikroskopii elektronowej do wykrywania ukrytych zakażeń wirusowych w hodowli komórek jest jednakże możliwe tylko w przypadku dużej liczby cząstek wirusowych.

Zanieczyszczenia mykoplazmowe hodowli komórek mogą być kon-

http://rcin.org.pl

trolowane w większości pracowni, natomiast stwierdzenie zakażeń wirusowych jest bardzo trudne. Wirusy wprowadzone przypadkowo do hodowli komórek można wykryć przez izolację ich w układzie wrażliwych komórek, przez wykazanie antygenów wirusowych metodą immunofluorescencji, jak również przez stwierdzenie produkcji interferonu i interferencji wirusowej. Metody te mogą być dostępne tylko w dobrze zorganizowanych pracowniach wirusologicznych.

Najbardziej niebezpieczne są takie formy pasożytnictwa wirusów, które nie wywołują widocznych zmian w komórkach przez długi okres czasu. Możliwości stosowania złożonych metod, które pozwalają na wykrywanie latentnych i ukrytych zakażeń wirusowych, są u nas ograniczone. Sądzę więc, że badacze, posługujący się hodowlami komórek, powinni uzyskiwać je z instytucji, których zadaniem jest charakterystyka, kontrola i przechowywanie sprawdzonych, wolnych od zanieczyszczeń mykoplazmowych i wirusowych linii komórkowych.

Sposób postępowania, który by zapobiegał zakażeniu i pozwalał utrzymać hodowle komórkowe wolne od drobnoustrojów, przedstawił McGarrity [33]. Sądzę, że przynajmniej niektóre z tych zaleceń mogą być, w naszych warunkach pracy, realizowane.

Hodowle komórek powinny pochodzić z pewnych źródeł i muszą być regularnie badane w kierunku zakażeń bakteryjnych, grzybiczych i mykoplazmowych. Wskazane jest stosowanie podłóż bez antybiotyków i jeśli możliwe bez surowicy. Płyny i składniki podłoża należy po kontroli jałowości przechowywać w małych objętościach i pipetować bez użycia ust. Obowiązuje kontrola urządzeń wyjaławiających. Jałowe hodowle komórek należy przechowywać w płynnym azocie, stanowią one rezerwę w przypadku zakażenia hodowli. Wszystkie prace związane z hodowlą komórek winny być prowadzone w pomieszczeniach wyjałowionych, przy zachowaniu starannej aseptycznej techniki.

Taki sposób postępowania zmniejsza prawdopodobieństwo zanieczyszczenia hodowli komórkowych mykoplazmami i innymi drobnoustrojami, co jest bardzo istotne w pracy laboratoryjnej. Podkreślić należy, że mimo dużego postępu w ostatnich latach metod prowadzenia hodowli komórek in vitro, zakażenia tych hodowli występują ogromnie często. Przyczyn należy szukać nie tylko w złej technice pracy. Brak krajowego banku linii komórkowych zmusza niejednokrotnie do uzyskiwania hodowli z innych pracowni. Nie zawsze odpowiadają one wymogom stawianym prawidłowym hodowlom. Problem zakażeń hodowli komórkowych często nie jest dostatecznie dostrzegany.

W pracy wirusologów nie ujawnione zakażenia wirusowe i myko-

http://rcin.org.pl

plazmowe hodowli komórek mogą prowadzić nie tylko do uzyskania fałszywych wyników badań eksperymentalnych, ale mogą być źródłem pomyłek w diagnozowaniu zakażeń wirusowych i stwarzają zgarożenie przy produkcji antygenów i szczepionek wirusowych.

LITERATURA

[1] ANDERSON D. R., Subcellular particles associated with human leukemia as seen with the electron microscope, [w] Methodological Approaches to the Study of Leukemias, red. V. Defendi, The Wistar Institute Symposium Monograph, Philadelphia, 113–146, 1965.

[2] — Ultrastructural studies of Mycoplasmas and the L - phase of bacteria, [w] The Mycoplasmatales and the L - Phase of Bacteria, red. L. Hayflick, Appleton, New York, 365–402, 1969.

[3] ANDERSON D. R., BARILE M. F., Ultrastructure of *Mycoplasma orale* isolated from patients with leukemia, J. Nat. Cancer Inst., **36**: 161–169, 1966.

[4] ANDERSON D. R., MANAKER R. A., Electron microscope studies of *Mycoplasma* (PPLO strain 880) in artificial medium and in tissue culture, J. Nat. Canter Inst., **36**: 139–154, 1966.

[5] BARILE M. F., Mycoplasmal contamination of cell cultures: Mycoplasma - - virus - cell culture interactions, [w] Contamination in Tissue Culture, red. J. Fogh, Academic Press, New York, 131–172, 1973.

[6] BARILE M. F., DELGIUDICE R. A., Isolation of Mycoplasmas and their rapid identification by plate epi - immunofluorescence, [w] Pathogenic Mycoplasmas, Ciba Foundation Symposium, Elsevier, Amsterdam, London, New York, 165–188, 1972.

[7] BARILE M. F., MALIZIA W. F., RIGGS D. B., Incidence and detection of pleuropneumonia - like organism in cell cultures by fluorescent antibody and cultural procedures, J. Bacteriol., **84**, 130–136, 1962.

[8] BARILE M. F., SCHIMKE R. T., A rapid chemical method for detecting PPLO contamination of tissue cell cultures, Proc. Soc. Exp. Biol. Med., **114** : 676–679, 1963.

[9] BESMER P., SMOTKIN D., HASELTINE W., FAN H., WILSON A. T., PASKIND M., WEINBERG R., BALTIMORE D., Mechanism of induction of RNA tumor viruses by halogenated pyrimidines, Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology, **39** : 1103–1107, 1974.

[10] BUTLER M., LEACH R. H., A Mycoplasma which induces acidity and cytopathogenic effect in tissue culture, J. Gen. Microbiol., **34** : 285–294, 1964.

[11] CHANOCK R. M., HAYFLICK L., BARILE M. F., Growth on artificial medium of an agent associoted with atypical pneumonia and its identification as a PPLO, Proc. Nat. Acad. Sci., **48** : 41–49, 1962.

[12] CLYDE W. A., Mycoplasma species identification based upon growth inhibition by specific antisera, J. Immunol., **92** : 958–965, 1964.

[13] COLLIER A. M., Pathogenesis of *Mycoplasma pneumoniae* infection as studied in the human foetel trachea in organ culture, [w] Pathogenic Mycoplasmas, Ciba Foundation Symposium, Elsevier, Amsterdam, London, New York 30–327, 1972.

[14] CROSS G. F., GOODMAN M. R., SHAW E. J., Detection and treatment of

http://rcin.org.pl

contaminating Mycloplasma in cell culture, Austr. J. Exp. Biol. Med. Sci., 45 : 201–212, 1967.

[15] DeHARVEN E., Identification of tissue culture contaminants by electron microscopy, [w] Contaminotion in Tissue Culture, red. J. Fogh, Academie Press, New York, London 205–231, 1973.

[16] FENNER F., MCAUSLAN B. R., MIMS C. A., SAMBROOK J., WHITE D. O., The Biology of Animal Viruses, Academic Press, New York, London 452–457, 1974.

[17] FOGH J., Reversible and irreversible alternations of cultured FL human amnion cells after experimental mycoplasmal infection, [w] Contamination in Tissue Culture, red. J. Fogh, Academic Press, New York, London 173–194, 1973.

[18] FOGH J., FOGH H., A method for direct demonstration of *Pleuropneumonia* - Like Organism in cultured cells, Proc. Soc. Exp. Biol. Med., **117**: 899–901, 1964.

[19] — Morphological and quantitative aspects of mycoplasma - human cell relationships, Proc. Soc. Exp. Biol. Med., **125**: 423–430, 1967.

[20] FOGH J., FOGH H., RAMOS L., Growth in vitro of Mycoplasma - infected human amnion cells, FL amnion cells, and Mycoplasma - modified FL cells, Proc. Soc. Exp. Biol. Med., **136** : 809–818, 1971.

[21] FOGH J., HAHN E., FOGH H., Effects of Pleuropneumonia - Like Organisms on cultured human cells, Exp. Cell. Res., **39**: 554–566, 1965.

[22] GOLDBLUM N., RAVID Z., BECKER Y., Effect of withdrawal of arginine and other amino acids on the synthesis of tumor and viral antigens of SV_{40} virus, J. Gen. Virol., **3**: 143–146, 1968.

[23] HAYFLICK L., Tissue cultures and Mycoplasmas, Texas Rep. Biol. Med., **23** : 285–303, 1965.

[24] HENLE W., HENLE G., Effect of arginine - deficient media on the Herpes - type virus associated with cultured Burkitt tumor cells, J. Virol., **2** : 182–191, 1968.

[25] HOROSZEWICZ J. S., GRACE J. T., PPLO detection in cell culture by thymidine cleavage, Bacteriol. Proc., **64** : 131, 1964.

[26] HUMMLER K., TOMMASSINI N., HAYFLICK L., Ultrasturcture of a Mycoplasma (Negroni) isolated from human leukemia, J. Bacteriol., **90** : 517–523, 1965.

[27] KNIAZEFF A. J., Endogenous virus contaminants in fetal bovine serum and their role in tissue culture contamination, [w] Contamination in Tissue Culture, red. J. Fogh, Academic Press, New York, London, 233–242, 1973.

[28] KOPROWSKI H., PONTEN J. A., JENSEN F., RAVIDIN R. G., MOORHEAD P., SAKSELA E., Transformation of cultures of human tissue infected with Simian virus SV_{40}, J. Cell. Comp. Physiol., **59**: 281–292, 1962.

[29] LEVINE E. M., Mycoplasma contamination of animal cell cultures: a simple, rapid detection method, Exp. Cell. Res., **74** : 99–109, 1972.

[30] — A simplified method for the detection of Mycoplasma, [w] Methods in Cell Biology, Vol. 8, red. D. M. Prescott, Academic Press, New York, London 229–248, 1974.

[31] LIEBER M., BENVENISTE R. E., LIVINGSTON D. M., TODARO G. J., Mammalian cells in culture frequently release typ - C viruses, Science, **183**: 56—58, 1973.

[32] MANLY K. F., GIVENS J. F., TABER R. L., ZEIGEL R. F., Characterization

http://rcin.org.pl

of virus - like particles released from the hamster cell line CHO - K1 after treatment with 5 - bromodeoxyurdine, J. Gen. Virol., **39**: 505–517, 1978.

[33] MCGARRITY G. J., Spread and control of mycoplasmal infection of cell cultures, In Vitro, **12** : 643–648, 1976.

[34] MAUL G., Positive detection of Mycoplasma contamination by the whole - mount preparation of cell cultures for transmission electron microscopy, J. Bact., **133** : 1452–1456, 1978.

[35] PERLMAN D., RAHMAN S .D., SEMAR J. B., Antibiotic control of Mycoplasma in tissue culture, Appl. Microbiol., **15** : 82–85, 1967.

[36] RAPP F., BUTEL J. S., MELNIK J. L., SV_{40} - adenovirus „hybrid" populations: transfer of SV_{40} determinants from one type of adenovirus to another, Proc. Nat. Acad. Sci., **54**: 717—724, 1965.

[37] ROBINSON L. B., WICHELHAUSEN R. H., ROIZMAN B., Contamination of human cell cultures by Pleuropneumonia - Like Organisms, Science, **124** : 1147, 1956.

[38] ROUSE H. C. BONIFAS V. H., SCHLESINGER R. W., Dependence of adenovirus replication and inhibition of plaque formation by Pleuropneumonia - Like Organisms, Virology, **20**: 357—365, 1963.

[39] SCHNEIDER E. L., STANBRIDGE E. J., A simple biochemical technique for the detection of mycoplasma contamination of cultured cells, [w] Methods in Cell Biology, Vol. X, red. D. M. Prescott, Academic Press, New York, London, 277–290, 1975.

[40] SINGER S. H., BARILE M. F., KIRSCHSTEIN R. L., Enhanced virus yields and decreased interferon production in Mycoplasma infected hamster cells, Proc. Soc. Exp. Biol. Med., **131** : 1129–1134, 1969.

[41] SINGER S. H., FITZGERALD V. A., BARILE M. F., KIRSCHSTEIN R. L., Effect of Mycoplasma on vaccinia growth: requirement for arginine, Proc. Soc. Exp. Biol. Med., **133** : 1439–1442, 1970.

[42] SINGER S. H., FORD M., BARILE M. F., KIRSCHSTEIN R. L., Effect of Mycoplasmas on virus replication and plaque formation in mouse cells, Proc. Soc. Exp. Biol. Med., **139** : 56–58, 1972.

[43] SINGER S. H., KIRCHSTEIN R. L., BARILE M. F., Increased yields of Vesicular Stomatitis Virus from hamster cells infected with Mycoplasma, Nature, **222** : 1087–1088, 1969.

[44] STANBRIDGE E., ÖNEN M., PERKINS F. T., HAYFLICK L., Karyological and morphological characteristics of human diploid cell strain WI - 38, Exp. Cell Res., **57**: 397—410, 1969.

[45] TEICH N., LOWY D. R., HARTLEY J. W., ROWE W. P., Studies of the mechanism of induction of infections murine leukemia virus from AKR mouse embryo cell lines by 5 - iododeoxyuridine and 5 - bromodeoxyuridine, Virology, **51** : 163–173, 1973.

[46] TIHON C., HELLMAN A., Characterization of an endogenous Chinese hamster virus, Federation Proceedings, **35** : 1612, 1976.

[47] VAN ROY F., FIERS W., Mycoplasma in African Green Money kidney cell cultures: biochemical detection and effects in virus - infected cells, In Vitro, **13** : 357–365, 1977.

[48] VOGELZANG A. A., VAN KLINGEREN B., Mycoplasmas in cell cultures, Antonie van Leeuwenhoek, **40** : 316–317, 1974.

[49] ZGÓRNIAK-NOWOSIELSKA I., Wykrywanie dobnoustrojów z rodzaju My-

http://rcin.org.pl

coplasma w hodowlach komórek i oporność izolowanych szczepów na antybiotyki, Med. Dośw. Mikrobiol., 22 : 195–203, 1970.
[50] ZGÓRNIAK-NOWOSIELSKA I., MARCISZEWSKA M., Mycoplasma of cell culture origin, In Vitro v CSSR, 4 : 11–23, 1975.
[51] ZGÓRNIAK-NOWOSIELSKA I., SEDWICK D. W., HUMMELER K., KOPROWSKI H., New assay procedure for separation of Mycoplasmas from virus pools and tissue culture systems, J. Virol., 1: 1227–1237, 1967.

Otrzymano: 22 stycznia 1979.
Przyjęto: 23 marca 1979.

Adres autorki: ul. Czysta 18, 31–121 Kraków.

http://rcin.org.pl

KMUNIKATY

W dniach 2–5 IX 1980 r. odbędzie się VII Sympozjum na temat tkanki łącznej.

Szczegółowych informacji udziela:

Dr. Z. Deyl
Institute of Physiology, Academy of Sciences
142 00 Praha 4–Krč
Budejovicka 1083, CSRS

Instytut Reumatologiczny i Sekcja Tkanki Łącznej Polskiego Towarzystwa Histo- i Cytochemików organizuje sympozjum na temat biologii i patologii tkanki.

W programie sympozjum przewidziane są referaty z zakresu biochemii, histochemii, histologii, histopatologii, ultrastruktury chrząstki w stanach prawidłowych i patologicznych.

Sympozjum odbędzie się w Instytucie Reumatologicznym w Warszawie 24 XI 1980 r.

Referaty wraz z zamówieniem hotelu należy zgłaszać w nieprzekraczalnym terminie do 31 V 1980 r. pod adresem:

Prof. dr hab. med. Eugeniusz Małdyk
Instytut Reumatologiczny
Spartańska 1, 02-637 Warszawa

http://rcin.org.pl

POSTĘPY BIOLOGII KOMÓRKI TOM 6, NR 3, 1979 (187-208)

WYBRANE ZAGADNIENIA MIOGENEZY

SELECTED TOPICS IN MIOGENESIS

Elżbieta ZUBRZYCKA

Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego, Zakład Biochemii Układu Nerwowego i Mięśni

Streszczenie. Prekursorami komórek miogennych są najprawdopodobniej komórki satelitarne. Dają one początek kolejnym generacjom mioblastów, które w wyniku fuzji tworzą wielojądrzaste miotuby. Miogeneza obejmuje cały szereg procesów, podczas których mioblasty różnicują się w dojrzałe, zdolne do skurczu włókna mięśniowe. Zdolność ta związana jest z powstawaniem aparatu kurczliwego mięśni oraz z pojawianiem się prawidłowo funkcjonującego systemu błon sarkoplazmatycznego retikulum (SR), który odgrywa rolę regulatora stężenia jonów wapnia w cyklu skurczowo-rozkurczowym.

W niniejszym artykule skoncentrowano się głównie na omówieniu biogenezy błon SR. Ponieważ cytowane wyniki badań uzyskano zarówno w doświadczeniach przeprowadzonych in vitro, jak i in vivo, sporo uwagi poświęcono również hodowli mioblastów, a także procesowi różnicowania się włókien mięśniowych w rozwoju osobniczym.

Na podstawie obserwacji ultracienkich skrawków mięśni, wykonanych na różnych etapach rozwoju osobniczego królika, stwierdzono, że typowy system podłużnych kanalików i cystern SR powstaje w różnicujących się włóknach mięśniowych później niż miofibryle. W czasie różnicowania zmienia się skład chemiczny błon SR. Polega to między innymi na spadku ogólnej ilości lipidów błonowych oraz wzroście ilości transportującej wapń ATPazy. Jednocześnie obserwuje się wzrost aktywności tego enzymu oraz wzrost zdolności błon SR do transportu jonów wapnia. Badania, wykonane przy zastosowaniu hodowli mioblastów, pozwoliły na zbadanie biosyntezy poszczególnych białek błon SR oraz lokalizację tych białek w komórkach w różnych fazach rozwoju hodowli. Na podstawie tych badań stwierdzono, że kalsekwestryna — peryferyjne białko błon SR, odznaczające się zdolnością do wiązania wapnia — jest obecna w mioblastach wcześniej niż integralne białko tych błon — ATPaza.

Na zakończenie artykułu przedstawiono proponowany model powstawania błon SR w różnicujących się włóknach mięśniowych.

Summary. Myogenesis represents a sequence of processes leading to the differentiation of mononucleated myoblasts to mature muscle fibres with the ability to contract. The latter property of muscle fibres requires the formation of both a con-

http://rcin.org.pl

tractile apparatus and a properly functioning system of sarcoplasmic reticulum (SR) membrane, which regulates the contraction-relaxation cycle by changing the concentration of calcium ions.

The biogenesis of various structural elements of muscle fibres including that of the SR membrane can be studied either in vivo or in muscle cell cultures.

In this article special attention is devoted to the problem of biogenesis of the SR membrane system.

STRUKTURA I ORGANIZACJA WŁÓKNA MIĘŚNIOWEGO

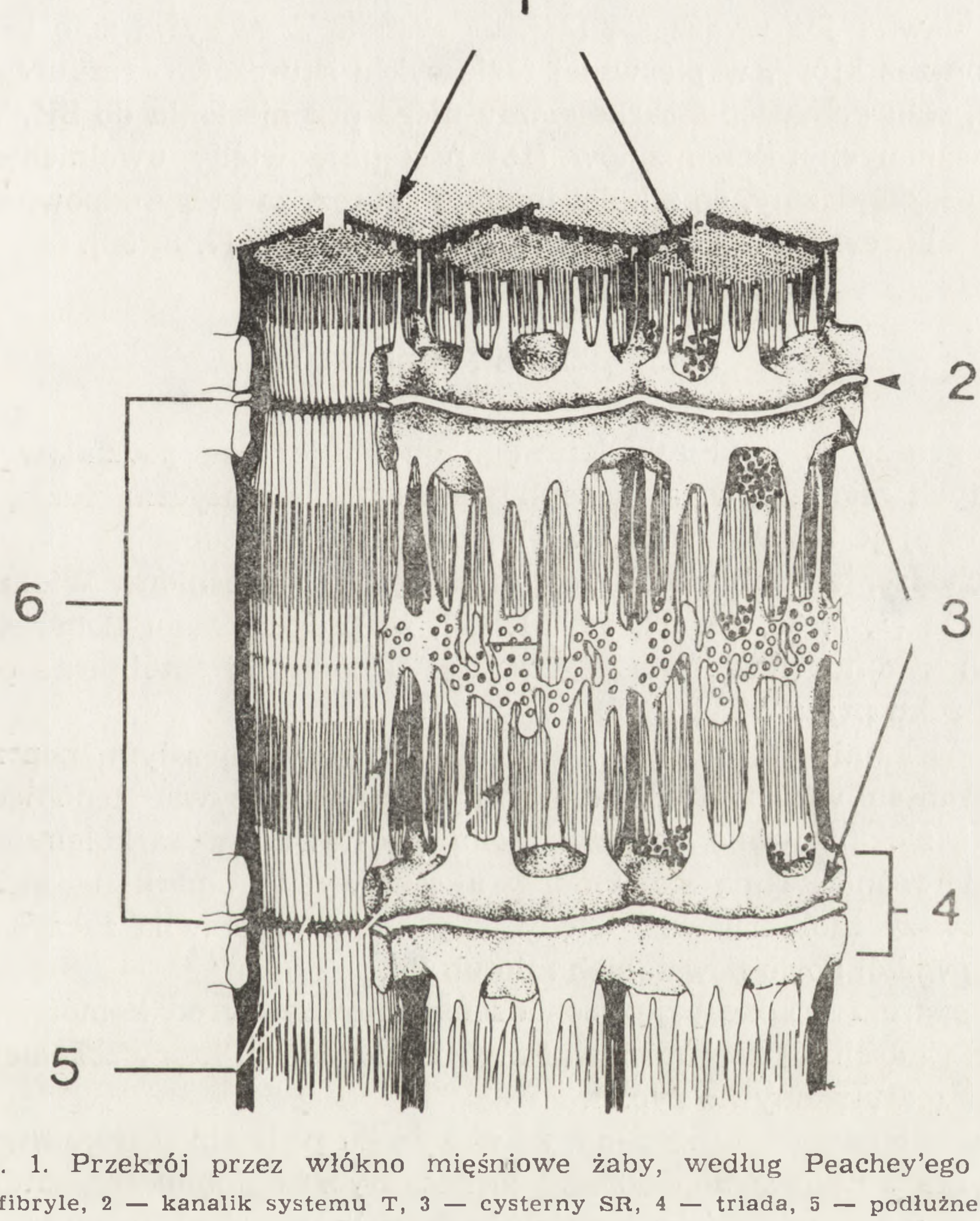
Mięsień poprzecznie prążkowany zbudowany jest z ciasno upakowanych włókien. Każde włókno zawiera wiele peryferyjnie zlokalizowanych jąder, jest więc komórczakiem czyli syncytium [76].

Pojedyncze włókna mięśniowe otoczone są błoną komórkową. W 1961 roku Mauro [46] wykazał w błonie komórkowej włókien mięśni szkieletowych żaby obecność czterech warstw. Zewnętrzna warstwa ma na ogół niestałą grubość i składa się z delikatnych, bliżej niezidentyfikowanych włókien o średnicy 100 Å. Następna warstwa zawiera włókna kolagenowe odznaczające się w mikroskopie elektronowym charakterystycznym prążkowaniem. Trzecia, granularna warstwa najprawdopodobniej składa się z mukopolisacharydów. Warstwę tę przyjęto nazywać błoną podstawną (basement membrane). Najbardziej wewnętrzną warstwę stanowi błona plazmatyczna o strukturze charakterystycznej dla wszystkich błon biologicznych. W dalszej części niniejszego artykułu termin sarkolemma używany będzie jedynie odnośnie do tej ostatniej warstwy.

Elementami kurczliwymi we włóknach mięśniowych są miofibryle. Mają one budowę odcinkową, a powtarzające się na ich długości charakterystyczne jednostki strukturalne noszą nazwę sarkomerów. Miofibryle zbudowane są z grubych i cienkich filamentów. Szczegółowy opis skomplikowanej struktury miofibryli czytelnik może znaleźć w artykułach przeglądowych innych autorów [7, 8]. Miofibryle są zanurzone w cytoplazmie, która w przypadku mięśnia jest nazywana sarkoplazmą [36]. Każda miofibryla [38] otoczona jest przez siateczkę śródplazmatycznych błon, będących odpowiednikiem endoplazmatycznego retikulum innych tkanek. W wypadku mięśnia błony te zwane są sarkoplazmatycznym retikulum (SR). Błony SR odgrywają decydującą rolę w prawidłowej pracy włókien mięśniowych. Ich funkcja polega na regulowaniu poziomu jonów wapnia w sarkoplazmie w czasie cyklu skurczowo - rozkurczowego [14, 22]. Sieć SR składa się z podłużnie przebiegających kanalików rozszerzających się na obu końcach każdego sarkomeru w cysterny, tak jak to przedstawiono na ryc. 1.

http://rcin.org.pl

Cysterny SR kontaktują się z innym systemem błonowym, a mianowicie z systemem poprzecznie leżących kanalików, które powstają w wyniku wpuklenia się sarkolemmy [59]. Kanaliki te tworzą tzw. system T (transverse tubules). Dwie cysterny sąsiadujących kanalików SR oraz położony między nimi kanalik systemu T składają się na tzw. triadę (ryc. 1).



Ryc. 1. Przekrój przez włókno mięśniowe żaby, według Peachey'ego [59]
1 — miofibryle, 2 — kanalik systemu T, 3 — cysterny SR, 4 — triada, 5 — podłużne kanaliki SR, 6 — sarkomer

Najnowsze prace morfologiczne Peacheyego [60], wykonane przy zastosowaniu wysokonapięciowego mikroskopu elektronowego, dostarczają interesujących danych na temat budowy systemu T. Na podstawie tych badań okazuje się między innymi, że poprzeczne kanaliki systemu T połączone są ze sobą w każdym sarkomerze kanalikami podłużnymi. Po-

http://rcin.org.pl

zwała to na zachowanie ciągłości systemu T w płaszczyźnie podłużnej, co może mieć istotne znaczenie dla spełnianej przez ten system funkcji.

Nieopublikowane wyniki Somlyo i wsp., uzyskane na podstawie obserwacji ultracienkich skrawków mięśnia półścięgnistego (m. Semitendinosus) żaby, utrwalonych w glutaraldehydzie i wybarwionych kwasem taninowym, wskazują na istnienie ciągłości między błonami systemu T i błonami SR.

Od dawna już uważa się [24], że system T odgrywa rolę przekaźnika, poprzez który, w pierwszej fazie cyklu skurczowo - rozkurczowego mięśnia, stan pobudzenia sarkolemmy ulega przeniesieniu do SR. W wyniku nieznanych mechanizmów [16] następuje wtedy uwolnienie Ca^{2+} z SR do sarkoplazmy, co z kolei inicjuje skurcz, za który odpowiedzialne są białka kurczliwe mięśnia obecne w miofibrylach [7, 8, 38].

POCHODZENIE MIOBLASTÓW

Miogeneza mięśnia szkieletowego obejmuje fazę podziałów jednojądrzastych mioblastów, a następnie ich cytoplazmatyczną fuzję, wynikiem której jest powstawanie wielojądrzastych miotub.

Pochodzenie mioblastów nie jest do końca wyjaśnione. Wielu badaczy uważa [1, 5, 30, 31, 52, 53, 61, 68], że prekursorami komórek miogennych w ontogenezie i w regeneracji są komórki satelitarne odkryte w 1961 roku przez Mauro [45].

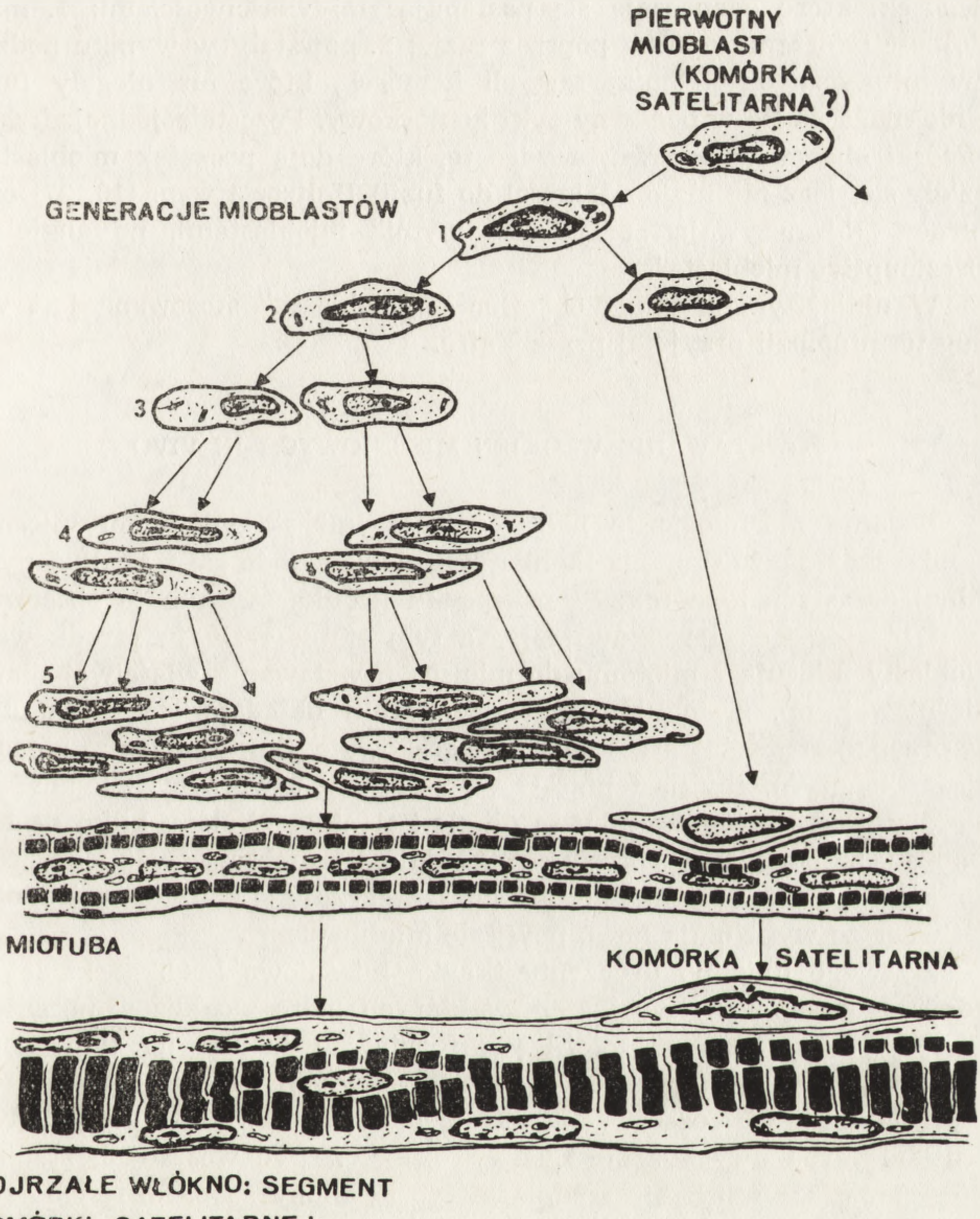
Komórkami satelitarnymi, które towarzyszą dojrzałym, poprzecznie prążkowanym włóknom mięśniowym, przyjęto nazywać jednojądrzaste komórki zlokalizowane między błoną podstawną a sarkolemmą [46]. W czasie różnicowania się włókien mięśniowych komórki te można po raz pierwszy zaobserwować wtedy, gdy błona podstawna zaczyna pojawiać się wokół nowo powstałych miotub [5].

W oparciu o koncepcję pochodzenia mioblastów od komórek satelitarnych Church [5] zaproponował model miogenezy, który schematycznie został przedstawiony na ryc. 2.

Autor tego modelu zakłada, że w wyniku podziału pierwotnego mioblastu, który najprawdopodobniej jest identyczny z komórką satelitarną, powstaje potomna komórka satelitarna oraz mioblast (pierwsza generacja mioblastów). Mioblast ten, dzieląc się, daje cztery kolejne generacje, z których dopiero komórki ostatniej generacji (piątej) przestają się dzielić i stają się zdolne do fuzji. Z nich to właśnie powstaje wielojądrzasta miotuba, która przekształca się następnie w dojrzałe włókno mięśniowe zawierające pod błoną podstawną komórki satelitarne. Odcinek włókna mięśniowego, w którym na jedną komórkę satelitarną przy-

http://rcin.org.pl

pada osiem jąder powstałych w wyniku podziałów mitotycznych mioblastów, nazywa Church „segmentem komórki satelitarnej".



Ryc. 2 .Model miogenezy, według Churcha [5]

W literaturze panują rozbieżności w definowaniu pojęcia „mioblast". Niektórzy autorzy, np. Yaffe [79, 81], używają tego terminu zarówno w stosunku do komórek, które dzielą się mitotycznie, lecz nie są zdolne do fuzji (wszystkie komórki łącznie z czwartą generacją na ryc. 2), jak

http://rcin.org.pl

i w stosunku do komórek, które przestają się dzielić i w wyniku fuzji dają początek miotubom (generacja piąta na rys. 2). Inni autorzy, np. Holtzer i wsp. [10, 27] oraz Turner [75], zawężają pojęcie mioblastu do komórek, które odznaczają się następującymi właściwościami: 1. mają zdolność tworzenia miotub poprzez fuzję; 2. powstały w wyniku podziałów mitotycznych jednojądrzastych komórek, które nie ulegały fuzji; 3. nie mogą wejść w ponowny cykl komórkowy. Pozostałe jednojądrzaste komórki obecne w hodowli, a więc te, które dają początek mioblastom (dzielą się, lecz nie mają zdolności do fuzji) Holtzer i wsp. [10, 27] oraz Turner [75] nazywają „przypuszczalnymi" mioblastami, po angielsku „presumptive mioblasts".

W niniejszym artykule określenie „mioblasty" stosowane jest według terminologii przyjętej przez Yaffe.

POWSTAWANIE WŁÓKIEN MIĘŚNIOWYCH IN VIVO

Badania morfologiczne nad różnicującymi się włóknami mięśniowymi wskazują, że przyszła tkanka mięśniowa składa się z wydłużonych, jednojądrzastych komórek. W przypadku królika stadium to obserwuje się u 14-dniowych zarodków [33]. Na tym etapie rozwoju zarodkowego mioblasty migrują z miotomu do miejsca powstawania właściwej tkanki mięśniowej, np. grzbietu czy kończyn. Tam układają się w warstwy (w przypadku mięśni grzbietu) lub pęczkowate skupiska (w przypadku mięśni kończyn), aby następnie w wyniku fuzji utworzyć wielojądrzaste miotuby. Początkowo miotuby są długie i cienkie. W ciągu kilku następnych dni zarodkowego rozwoju królika daje się zaobserwować ich wzrost. Pomiędzy 22 a 28 dniem miotuby charakteryzują się już dużą średnicą. Ich wnętrze wypełniają nowo powstałe miofibryle.

Trzeciego dnia po urodzeniu tkanka mięśniowa królika składa się z dobrze uformowanych włókien, w których jądra zlokalizowane są peryferyjnie. Poszczególne miofibryle różnią się jednak na tym etapie różnicowania grubością, a ich ułożenie we włóknach jest nieregularne.

Na podstawie obserwacji ultracienkich skrawków, otrzymanych z mięśni zarodkowych królika, stwierdzono, że we wczesnych stadiach ontogenezy [33] wszystkie śródplazmatyczne błony są bardzo słabo rozwinięte.

Tworzenie się błon SR i systemu T poprzedzone jest powstawaniem miofibryli. Stwierdzono, że między 14 a 16 dniem rozwoju zarodkowego królika błony szorstkiego endoplazmatycznego retikulum (ER) pozbawione są na pewnych odcinkach charakterystycznych cząstek, które odpowiadają związanym rybosomom. Te gładkie odcinki ER mogą repre-

http://rcin.org.pl

zentować w różnicujących się włóknach mięśniowych prekursory błon SR.

Wpuklenia sarkolemmy do wnętrza miotub, tworzące system T, można po raz pierwszy zaobserwować w skrawkach otrzymanych z mięśni 16-dniowych zarodków. W ciągu kilku następnych dni powstają triady. W niektórych rozwijających się triadach część błon jest jeszcze ciągle pokryta rybosomami, co sugeruje, że SR powstaje z szorstkiego ER. W trzy dni po urodzeniu królika zarówno siateczka SR, jak i system T są dobrze ukształtowane [33].

HODOWLA MIOBLASTÓW

Badania nad różnymi aspektami miogenezy prowadzone są w ciągu ostatnich lat z dużą intensywnością. Jedną z metod, przy pomocy której rozwiązuje się szereg problemów związanych z tym zagadnieniem, jest hodowla komórek mięśniowych. W niniejszym artykule ograniczono się do przedstawienia zagadnień dotyczących tzw. pierwotnej hodowli mioblastów. Powstaje ona z miogennych komórek izolowanych bezpośrednio z zarodków lub nowo narodzonych zwierząt. Najczęściej źródłem mioblastów są 10- lub 11-dniowe zarodki kurze oraz jednodniowe szczury [81]. Wybór mioblastów kurzych do zakładania hodowli uzasadniony jest możliwością łatwego ich izolowania z różnicujących się mięśni oraz dużą wydajnością preparatyki [81]. W przypadku nowo narodzonych szczurów wydajność jest z reguły mniejsza. Zaletą tej hodowli jest jednak znaczna powtarzalność i synchroniczność cyklu różnicowania [81]. W hodowli mioblastów szczura proces powstawania włókien mięśniowych jest bardzo uporządkowany. Granicę pomiędzy początkową fazą hodowli, obejmującą podziały miotyczne komórek, a fuzją daje się w tym wypadku łatwo zaobserwować.

Tkanka mięśniowa, z której otrzymuje się mioblasty, zawiera zarówno jednojądrzaste prekursory komórek mięśniowych, jak i częściowo już rozwinięte włókna mięśniowe [79]. Pojedyncze komórki uzyskuje się na ogół w wyniku trawienia tkanki mięśniowej trypsyną. Większość włókien mięśniowych ulega zniszczeniu i oddzieleniu w procesie trawienia, a następnie filtrowania tkanki. Zawiesina jednojądrzastych mioblastów i fibroblastów zostaje następnie przeniesiona do plastykowych szalek Petriego [74], których dno pokryte jest żelatyną [81] lub kolagenem [23]. Ten moment uważany jest za początek hodowli. Po upływie kilku godzin od chwili założenia hodowli, komórki przyczepione do podłoża tworzą pojedynczą warstwę na dnie naczynia. Już w tym czasie można łatwo odróżnić wrzecionowate mioblasty od innych komórek obecnych w hodowli.

http://rcin.org.pl

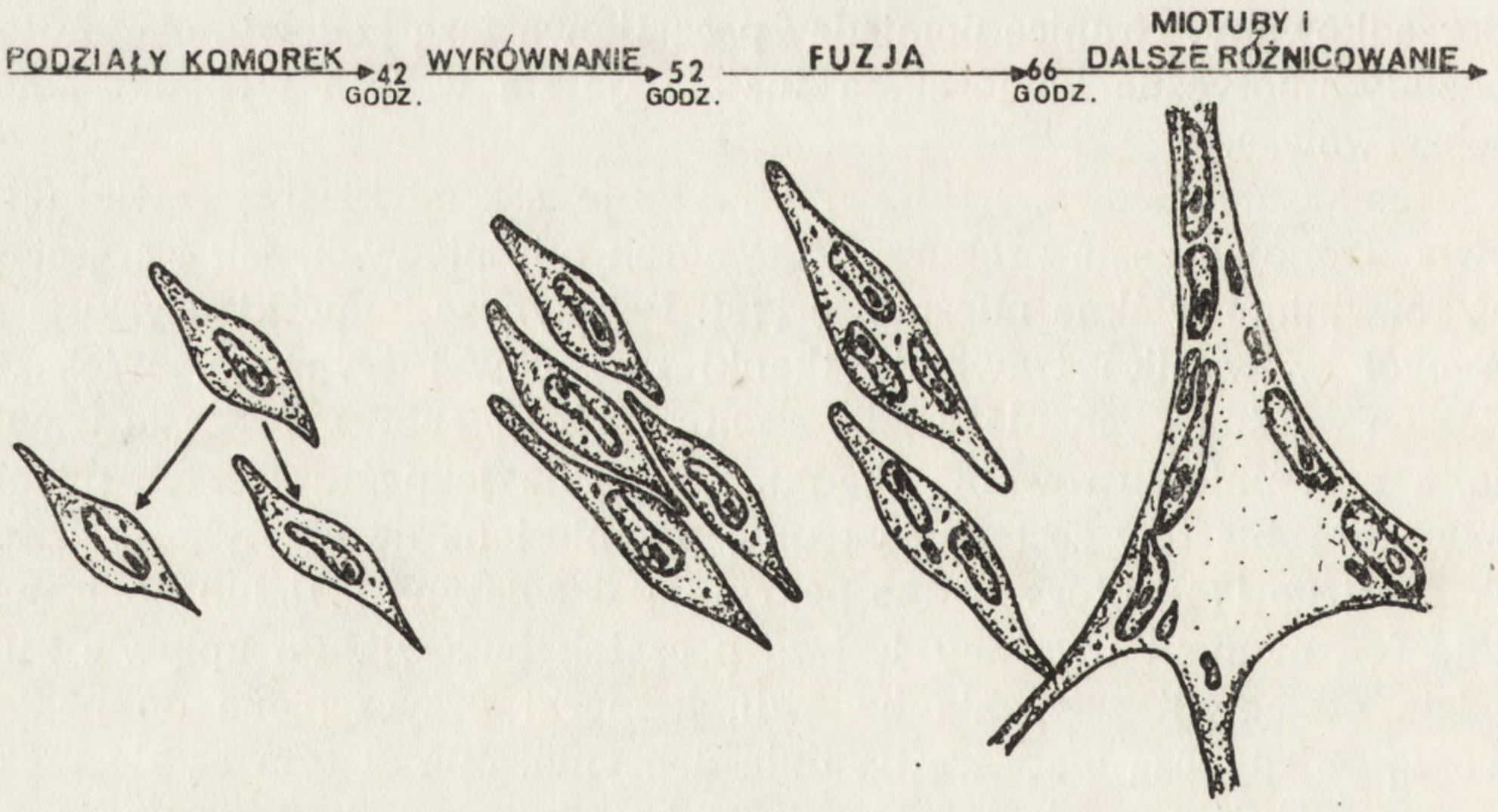
Ilość komórek przypadającą na jedną szalkę Petriego lub, innymi słowy, gęstość komórek na cm^2 powierzchni dobiera się w zależności od rodzaju eksperymentu. W przypadku badań morfologicznych gęstość ta jest zazwyczaj mniejsza niż w przypadku badań biochemicznych.

W celu zapewnienia prawidłowego procesu różnicowania komórki przechowuje się w inkubatorach w temperaturze 37°C, w atmosferze nasyconej parą wodną oraz zawierającej 5% CO_2 [81]. Źródłem wszelkich substancji pokarmowych dla komórek jest pożywka, którą należy zmieniać co 24 godziny. Standardową pożywkę (S) dla mioblastów stanowi podstawowa pożywka Eagle'a [12, 13] wzbogacona o 10% surowicę końską i 0,5% ekstrakt z zarodków kurzych [81]. Pożywka taka zawiera również niewielką ilość płodowej surowicy cielęcej, która jest między innymi źródłem fetuiny ułatwiającej komórkom przyczepianie się do podłoża [20].

W hodowli komórek w pożywce S można wyróżnić trzy zasadnicze fazy [80]: 1. mnożenie się komórek; 2. intensywną fuzję; 3. zakończenie fuzji związane z powstawaniem różnicujących się wielojądrzastych miotub wyścielających podłoże. Wśród tych ostatnich obecne są również fibroblasty oraz niewielka liczba jednojądrzastych mioblastów. W następnym etapie różnicowania powstaje poprzeczne prążowanie włókien oraz ich zdolność do spontanicznego skurczu.

Poszczególne fazy różnicowania komórek w hodowli zostały schematycznie przedstawione na ryc. 3.

W ciągu pierwszych 42 godzin zachodzi seria podziałów komórkowych (od 3 do 4). Między 42 a 52 godziną następuje wzrost mioblastów



Ryc. 3. Fazy rozwoju hodowli mioblastów w warunkach standardowych

http://rcin.org.pl

oraz ich grupowanie się blisko siebie. Kolejna faza obejmuje intensywną fuzję, która zazwyczaj trwa do 66 godziny hodowli.

W czasie fuzji zachodzi biosynteza białek charakterystycznych dla tkanki mięśniowej. Wykazano np. intensywną biosyntezę miozyny, aktyny, kinazy kreatynowej, fosforylazy, receptorów acetylocholiny, a także ATPazy sarkoplazmatycznego retikulum [6, 25, 47, 48, 58, 77, 78, 82, 85]. Rola fuzji jako procesu inicjującego biosyntezę tych białek, jest w ostatnich latach żywo dyskutowana [15, 18, 47, 55, 58, 69]. Wielu badaczy [15, 18, 25, 48, 55, 57, 85] opublikowało dane wskazujące na to, że fuzja nie jest warunkiem koniecznym do zapoczątkowania tej syntezy. Wymienione białka powstają bowiem również w jednojądrzastych mioblastach, których fuzja jest zahamowana.

Opisaną w tym artykule hodowlę komórek w pożywce S można zmodyfikować poprzez zastosowanie pożywek o odmiennym składzie. Wpływa to przede wszystkim na fuzję. Znane są metody opóźnienia lub całkowitego zahamowania tego procesu [81].

Jednym z często stosowanych rodzajów modyfikacji jest zastępowanie w pożywkach surowicy końskiej płodową surowicą cielęcą i zwiększanie ilości ekstraktu z zarodków kurzych (pożywka FE) [81]. Mioblasty hodowane w pożywce FE przechodzą co najmniej o jeden cykl komórkowy więcej niż te, które hodowane są w pożywce S. Tak więc komórki dzielą się, ale ich fuzja nie następuje aż do momentu, kiedy gęstość tych komórek na dnie szalki Petriego jest bardzo duża. Powoduje to opóźnienie fuzji o około 20 godzin w stosunku do warunków standardowych. Podobne efekty można uzyskać zwiększając w pożywce standardowej zawartość surowicy końskiej z 10 do 20% [81].

Inna modyfikacja hodowli mioblastów polega na całkowitym zahamowaniu fuzji na skutek obniżenia zawartości Ca^{2+} w pożywce [81]. Merlie i Gros [47] podają, że krytyczne stężenie Ca^{2+}, wymagane do zaistnienia fuzji, mieści się w granicach od 0,6 do 0,8 mM. Poniżej tego stężenia komórki są niezdolne do fuzji. Próby wyjaśnienia wpływu Ca^{2+} na fuzję zostały podjęte przez Chiquet'a i wsp. [4]. Autorzy ci zastosowali w badaniach technikę „freeze-fracture" (kryorytowania). Okazało się, że mioblasty i miotuby hodowane w warunkach standardowych posiadają charakterystyczne wypustki zwane filopodiami. Długość tych wypustek wynosi około 5 μm, a średnica waha się od 50 do 200 nm. Zaobserwowano, że filopodia nie pojawiają się w komórkach hodowanych w pożywce o niskiej zawartości Ca^{2+}, w tzw. pożywce L. Zmiana pożywki L na pożywkę S powoduje powstawanie filopodiów. Wpływ różnych stężeń wapnia na zdolność komórek do tworzenia filopodiów lub jej brak jest niewyjaśniony. Może się on wiązać ze zmianami w składzie i molekularnej strukturze sarkolemmy. Na podstawie otrzymanych wy-

http://rcin.org.pl

ników Chiquet i wsp. [4] sugerują, że filopodia mają znaczenie w nawiązywaniu kontaktu komórkowego. Zahamowanie fuzji następuje również w pożywkach z dodatkiem cytochalazyny B (5 μm/ml) [28].

Mimo że wapń w stężeniu 0,6 mM lub cytochalazyna B mają podobne działanie, jeśli chodzi o fuzję, to wpływ tych dwóch substancji na proces powstawania śródplazmatycznych błon wydaje się być różny. Schiaffino [67] podaje, że w komórkach hodowanych w pożywkach zawierających 0,6 mM Ca^{2+} nie ma prawidłowo rozwiniętego systemu T oraz triadowych połączeń między tym systemem a sarkoplazmatycznym retikulum. Tego rodzaju zmian nie wykryto w mioblastach hodowanych w pożywkach z dodatkiem cytochalazyny B.

Nameroff [54] wykazał, że fuzja mioblastów może być także zahamowana poprzez potraktowanie ich fosfolipazą C.

BUDOWA BŁON SARKOPLAZMATYCZNEGO RETICULUM MIĘŚNI SZKIELETOWYCH

Fragmenty błon SR w postaci pęcherzyków izoluje się z homogenatów mięśniowych w procesie różnicowego wirowania i oczyszczania w gradiencie sacharozy [50].

Błony sarkoplazmatycznego retikulum zbudowane są z podwójnej warstwy fosfolipidów, w którą, zgodnie z powszechnie akceptowanym, płynno-mozaikowym modelem błon [70], wkomponowane są białka integralne. W skład SR wchodzą również białka luźno związane, czyli peryferyjne. Budowę błon biologicznych, a także strukturę i funkcję błon sarkoplazmatycznego retikulum, omówiono szczegółowo w innych artykułach przeglądowych [49, 62, 83].

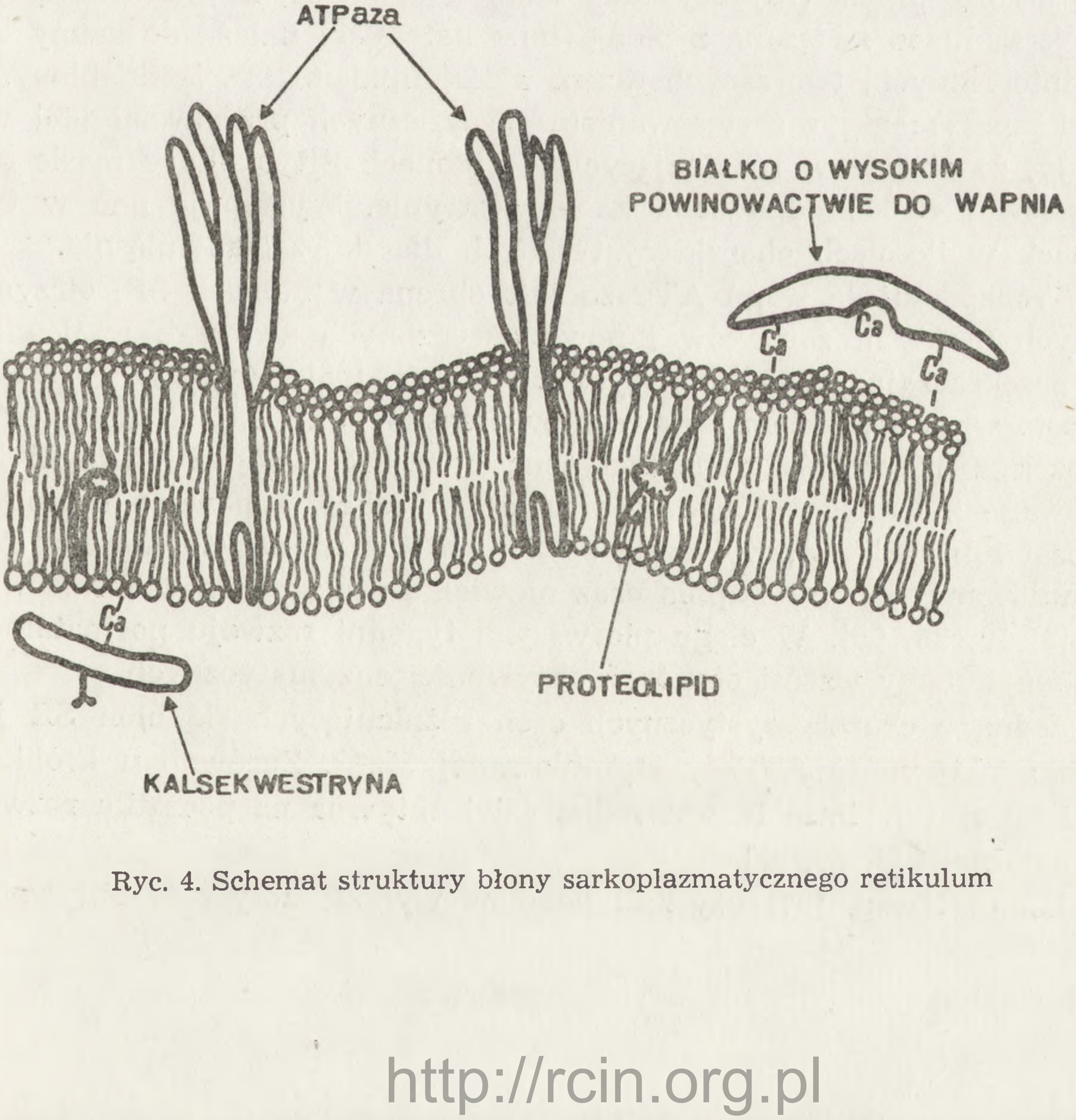
Wyizolowane fragmenty błon SR zawierają cztery dobrze poznane białka [40, 42]. Głównym białkiem integralnym jest transportująca wapń ATPaza (Ca^{2+},Mg^{2+}-ATPaza) o masie cząsteczkowej 105 000. Stanowi ona mniej więcej 2/3 całkowitej ilości białek błonowych. Białko to ułożone jest w błonie asymetrycznie [71–73]. Jego hydrofilowa część wystaje ponad zewnętrzną powierzchnię błony, natomiast hydrofobowa część przechodzi poprzez podwójną warstwę fosfolipidów aż do wnętrza kanalików SR. Innym białkiem integralnym jest proteolipid o masie cząsteczkowej około 12 000 [40, 42, 63]. Stanowi on tylko kilka procent wszystkich białek SR. Uważa się, że proteolipid spełnia funkcję w utrzymywaniu sztywnej struktury błony [34, 35].

http://rcin.org.pl

Kalsekwestryna (o masie cząsteczkowej 45 000) i białko o wysokim powinowactwie do Ca^{2+} (o masie cząsteczkowej 55 000) należą do grupy tzw. białek peryferyjnych [41, 42, 56]. Kalsekwestryna stanowi około 15%, a białko o wysokim powinowactwie do Ca^{2+} — około 10% wszystkich białek SR. Wśród badaczy panują niezgodne poglądy na temat lokalizacji tych białek w błonie SR. Ostatnie badania, przeprowadzone w naszej pracowni [84], wskazują, że kalsekwestryna związana jest z wewnętrzną powierzchnią błony, podczas gdy białko o wysokim powinowactwie do Ca^{2+} zlokalizowane jest na zewnętrznej powierzchni. Funkcja tych białek nie jest wyjaśniona, wydaje się jednak, że rola ich polega na wiązaniu jonów wapnia transportowanych przez błony SR [40, 42].

Każde z wymienionych białek udało się wyizolować i oczyścić [11, 39, 41, 56]. Wysiłki zmierzające do otrzymania specyficznych przeciwciał zostały na razie uwieńczone sukcesem tylko w przypadku ATPazy i kalsekwestryny [25, 85].

Skład i strukturę błon SR przedstawiono schematycznie na ryc. 4.



Ryc. 4. Schemat struktury błony sarkoplazmatycznego retikulum

http://rcin.org.pl

BIOGENEZA BŁON SARKOPLAZMATYCZNEGO RETIKULUM

Zagadnieniu biogenezy błon SR w procesie różnicowania się włókien mięśniowych poświęca się ostatnio wiele uwagi zarówno w badaniach in vivo, jak i in vitro.

Wyizolowane fragmenty błon SR stanowią wygodny model do badań nad biogenezą błon biologicznych ze względu na następujące właściwości: 1. ich skład jest bardzo prosty; 2. struktura i funkcja są dobrze poznane; 3. dostępne są mikrometody izolacji białek przy użyciu specyficznych przeciwciał.

Badania prowadzone nad biogenezą błon SR in vivo dotyczą między innymi analizy ich składu białkowego i lipidowego. Boland i Martonosi [3] oraz Sarzała i wsp. [65] stwierdzili, że błony SR, izolowane z mięśni zarodków oraz nowo narodzonych kurcząt lub królików, znacznie różnią się pod względem zawartości białek od błon SR otrzymywanych z mięśni dorosłych zwierząt. Ich skład białkowy jest bardziej skomplikowany i dotychczas nie udało się wyjaśnić, jaką funkcję pełnią w różnicującej się błonie dodatkowe białka. Na podstawie ekstrakcji roztworem EDTA w alkalicznym pH oraz dezoksycholanem sodu o stężeniu 0,25 mg/mg białka [66] uzyskano dane wskazujące, że niektóre z tych białek są luźno związane z błoną, inne natomiast należą do grupy białek integralnych, tworzących razem z fosfolipidami „szkielet" błony.

Eksperymenty z zastosowaniem specyficznych przeciwciał [86] wykazały, że obecne w różnicujących się błonach SR białko o masie cząsteczkowej 45 000 odpowiada kalsekwestrynie. Występuje ono w tych błonach w ilościach charakterystycznych dla dojrzałego mięśnia.

Transportująca wapń ATPaza jest obecna w błonach SR, otrzymywanych z mięśni zarodków i nowo narodzonych zwierząt, w ilościach nie przekraczających 10% wszystkich białek [65]. Zawartość ATPazy wzrasta wraz z wiekiem badanych zwierząt. Wydaje się, że ma to ścisły związek z aktywnością enzymatyczną błon SR [3,65]. Pęcherzyki SR, izolowane z homogenatów mięśniowych zarodków i nowo narodzonych kurcząt lub królików, wykazują bowiem bardzo niską aktywność ATPazy stymulowanej jonami wapnia oraz niewielką zdolność do wiązania wapnia [3, 19, 26, 65]. W ciągu pierwszych tygodni rozwoju postnatalnego następuje ciągły wzrost obu tych aktywności enzymatycznych.

Jedną z charakterystycznych cech różnicujących się błon SR jest wysoka aktywność ATPazy stymulowanej Mg^{2+}. Zarówno u królików, jak i kurcząt ATPaza ta jest najbardziej aktywna na początku rozwoju postnatalnego [3, 26, 65].

Lough i wsp. [37] uzyskali podobne wyniki, dotyczące aktywności

http://rcin.org.pl

ATPazy i zdolności do wiązania wapnia, badając frakcję SR izolowaną z komórek mięśniowych kurcząt w hodowli.

Badania Sarzały i wsp. [65] oraz Bolanda i Martonosiego [3] wykazały, że znacznym zmianom w czasie różnicowania się błon SR podlegają także lipidy. Stosunek fosfolipidów do białka zmniejsza się około dwukrotnie. Maleje także ilość lipidów obojętnych [65]. Zmienia się zawartość poszczególnych rodzajów fosfolipidów [3, 65], np. zmniejsza się ilość fosfatydyloetanolaminy, a wzrasta ilość fosfatydylocholiny (wyrażona jako procent całkowitej zawartości fosfolipidów w błonie).

Interesujących danych na temat metabolizmu fosfolipidów w czasie różnicowania się włókien mięśniowych dostarczyły badania Sarzały i Pilarskiej [64]. Okazało się, że SR spełnia nie tylko ważną funkcję w regulacji cyklu skurczowo-rozkurczowego mięśnia, ale jest również odpowiedzialne za biosyntezę poszczególnych fosfolipidów błonowych.

W czasie różnicowania się włókien męśniowych istotnym zmianom ulega struktura błon SR. Negatywowo kontrastowane pęcherzyki SR izolowane z dojrzałych włókien posiadają na swej powierzchni charakterystyczne cząstki o średnicy 4 nm [9, 29, 65, 71]. Każda taka cząstka odpowiada hydrofilowej części cząsteczki ATPazy wystającej ponad zewnętrzną powierzchnię błony. Pęcherzyki izolowane z homogenatów mięśniowych zarodków lub nowonarodzonych zwierząt nie mają 4 nm cząstek. Obecność cząstek na powierzchni niektórych pęcherzyków daje się po raz pierwszy zaobserwować w preparatach otrzymywanych z mięśni 4- lub 5-dniowych królików [65, 86].

Kontrastowane negatywowo pęcherzyki, pochodzące z zarodków lub nowo narodzonych zwierząt, odznaczają się charakterystycznym, grubym konturem [65, 66, 86]. Istnieją dowody [66, 86] na to, że kontur ten jest wynikiem obecności w błonie dużej ilości luźno związanych lipidów. Po ekstrakcji takich pęcherzyków bezwodnym eterem dwuetylowym, powodującym usunięcie nieomal wszystkich lipidów obojętnych, a także 60% fosfolipidów, ich kontur przypomina ten, którym charakteryzują się pęcherzyki otrzymane z dojrzałych włókien mięśniowych. Stosując technikę ultracienkich skrawków stwierdzono, że grubość błon SR nie zmienia się w czasie ontogenezy [86].

Interesujących danych na temat struktury omawianych błon w różnicujących się włóknach dostarczyły badania wykonane metodą „freeze-fracture". Tillack i wsp. [74] oraz Baskin [2] udowodnili, że ilość charakterystycznych, wewnątrzbłonowych cząstek, które odpowiadają cząsteczkom ATPazy, jest niewielka w pęcherzykach izolowanych z włókien mięśniowych na wczesnych etapach różnicowania. Gęstość tych cząstek wzrasta równolegle z wiekiem badanych zwierząt.

http://rcin.org.pl

Z przytoczonych faktów wynika, że istnieje zależność między ilością ATPazy w błonach SR a jej aktywnością enzymatyczną i charakterystyczną strukturą tych błon.

W najnowszych badaniach nad biogenezą błon SR podjęto pierwsze próby frakcjonowania mieszanej pod względem morfologicznym populacji pęcherzyków SR otrzymywanej z homogenatu mięśniowego nowo narodzonych królików [86]. W wyniku dodatkowego wirowania w gradiencie sacharozy uzyskano dwie frakcje. Frakcja pęcherzyków odznaczających się większą gęstością przypomina zarówno pod względem morfologicznym, jak i funkcjonalnym pęcherzyki SR otrzymywane z mięśni dorosłych zwierząt [86]. Frakcja o mniejszej gęstości stanowi heterogenną populację [86]. W skład tej frakcji wchodzą najprawdopodobniej pęcherzyki powstałe z fragmentów błon będących prekursorami SR, które później przekształcają się w typowe błony tego systemu. Kilarski i Jakubowska [33] zwrócili uwagę na możliwość występowania takich prekursorów, tworzących prymitywną siateczkę otaczającą miofibryle, w różnicujących się włóknach mięśniowych królika.

Aktywność charakerystycznych enzymów markerowych wskazuje na to, że lekka frakcja mirkosomalna zawiera także pęcherzyki pochodzące z innych systemów błonowych.

Badania nad biogenezą błon SR prowadzone są również przy zastosowaniu hodowli komórek mięśniowych izolowanych z jednodniowych szczurów [43] lub z zarodków kurzych [37, 44].

Na podstawie badań morfologicznych Ezerman i Ishikawa [17] stwierdzili, że system błon SR nie występuje w jednojądrzastych mioblastach. W miotubach natomiast można zauważyć błonowe pęcherzyki odrywające się od szorstkiego endoplazmatycznego retikulum. Te gładkie błony tworzą z czasem charakterystyczną siateczkę SR otaczającą nowo powstałe miofibryle.

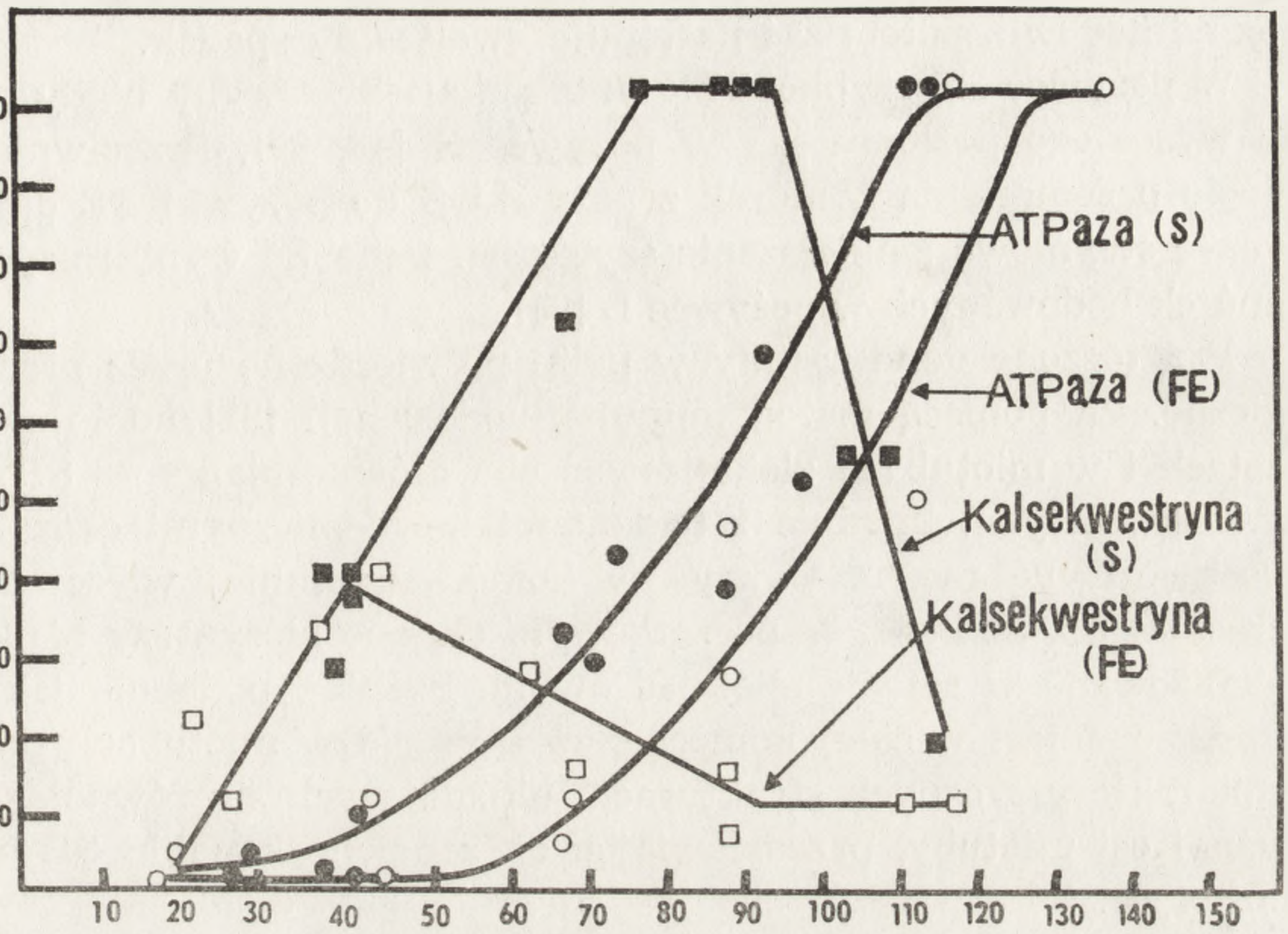
W pracowni MacLennana rozwinięto kompleksowe badania nad biosyntezą poszczególnych białek SR (w pierwotnej hodowli mioblastów szczura). Szczególną uwagę poświęcono transportującej wapń ATPazie i kalsekwestrynie. W doświadczeniach wykorzystano zarówno metody biochemiczne, jak i morfologiczne [25, 32, 85].

W badaniach biochemicznych, w zależności od celów doświadczalnych, komórki hodowane w różnych rodzajach pożywek znakowano (H^3) leucyną, a następnie solubilizowano używając 0,5% Triton X–100. W celu wyizolowania ATPazy lub kalsekwestryny do otrzymanego roztworu dodawano odpowiednią ilość specyficznego przeciwciała. Po inkubacji otrzymany kompleks przeciwciała z antygenem płukano, a następnie jego skład analizowano, stosując elektroforezę w żelu poliakrylamidowym. Radioaktywność znaleziona w prążkach białkowych odpowiadają-

http://rcin.org.pl

cych ATPazie lub kalsekwestrynie stanowiła podstawę do obliczenia względnej szybkości syntezy danego białka.

Wykres ilustrujący syntezę ATPazy i kalsekwestryny w pożywce S i w pożywce FE przedstawiono na ryc. 5 [43].



Ryc. 5. Przebieg syntezy ATPazy i kalsekwestryny w mioblastach hodowanych w pożywce standardowej (S) lub w pożywce wzbogaconej w zarodkową surowicę cielęcą i ekstrakt z zarodków kurzych (FE), według MacLennana i wsp. [43]

Przed rozpoczęciem fuzji, tj. przed 50 godziną hodowli, szybkość biosyntezy ATPazy w standardowych warunkach była niewielka [25, 84]. Gwałtowny jej wzrost obserwowano w czasie fuzji. Intensywna synteza tego białka utrzymywała się jeszcze ciągle piątego i szóstego dnia hodowli.

W pożywce FE następowało opóźnienie procesu biosyntezy ATPazy o około 20 godzin, czyli dokładnie o taki sam okres czasu, o jaki opóźniona była fuzja.

Opisana droga biosyntezy ATPazy w pożywce S została potwierdzona przez Martonosiego i wsp. [44] w badaniach nad powstawaniem ufosforylowanej formy tego białka w hodowanych mioblastach.

Początek biosyntezy ATPazy zsynchronizowany w czasie z fuzją sugeruje współzależność obu procesów. Związek ten okazuje się jednak pozorny, ponieważ ATPaza jest syntetyzowana również w mioblastach,

http://rcin.org.pl

które nie są zdolne do fuzji, np. w komórkach hodowanych w pożywce L [22, 32, 85].

Jak wynika z danych przedstawionych na ryc. 5 względna szybkość biosyntezy kalsekwestryny osiąga połowę swojej maksymalnej wartości już drugiego dnia hodowli. Jej szczyt obserwowany jest między 70 a 90 godziną hodowli, potem zaś następuje gwałtowny spadek.

W pożywce FE szybkość biosyntezy kalsekwestryny nigdy nie osiąga tak wysokiego poziomu jak w pożywce S [43, 85]. Przeciwnie, w momencie przeniesienia komórek z pożywki S do pożywki FE daje się zauważyć stopniowe zmniejszenie szybkości. Podobne wyniki uzyskano dla komórek hodowanych w pożywce L [85].

Przytoczone dane zostały w pełni potwierdzone przez prace morfologiczne. Za pomocą metod immunofluorescencji [32] udało się w mioblastach i w miotubach zlokalizować oba główne białka — SR - ATPazę i kalsekwestrynę. Zgodnie z badaniami biochemicznymi okazało się, że kalsekwestrynę można wykryć w komórkach mniej więcej 20 godzin wcześniej niż ATPazę. W początkowym okresie biosyntezy białko to jest zlokalizowane w rejonie okołojądrowym. Później, podobnie jak ATPaza, rozproszone jest w całej komórce, aż wreszcie w miotubach pojawia się w charakterystycznych strukturach, układających się równolegle do podłużnej osi miotuby, przedstawiających zapewne kanaliki SR otaczające miofibryle.

Wspomniane już badania Ezermana i Ishikawy [17] dowodzą, że SR powstaje z szorstkiego endoplazmatycznego retikulum w formie odrywających się pęcherzyków, które następnie zlewają się ze sobą, tworząc skomplikowaną sieć błon otaczających miofibryle w dojrzałych włóknach mięśniowych. Nasuwa się jednak pytanie, w którym miejscu w komórce syntetyzowane są białka i lipidy błon SR.

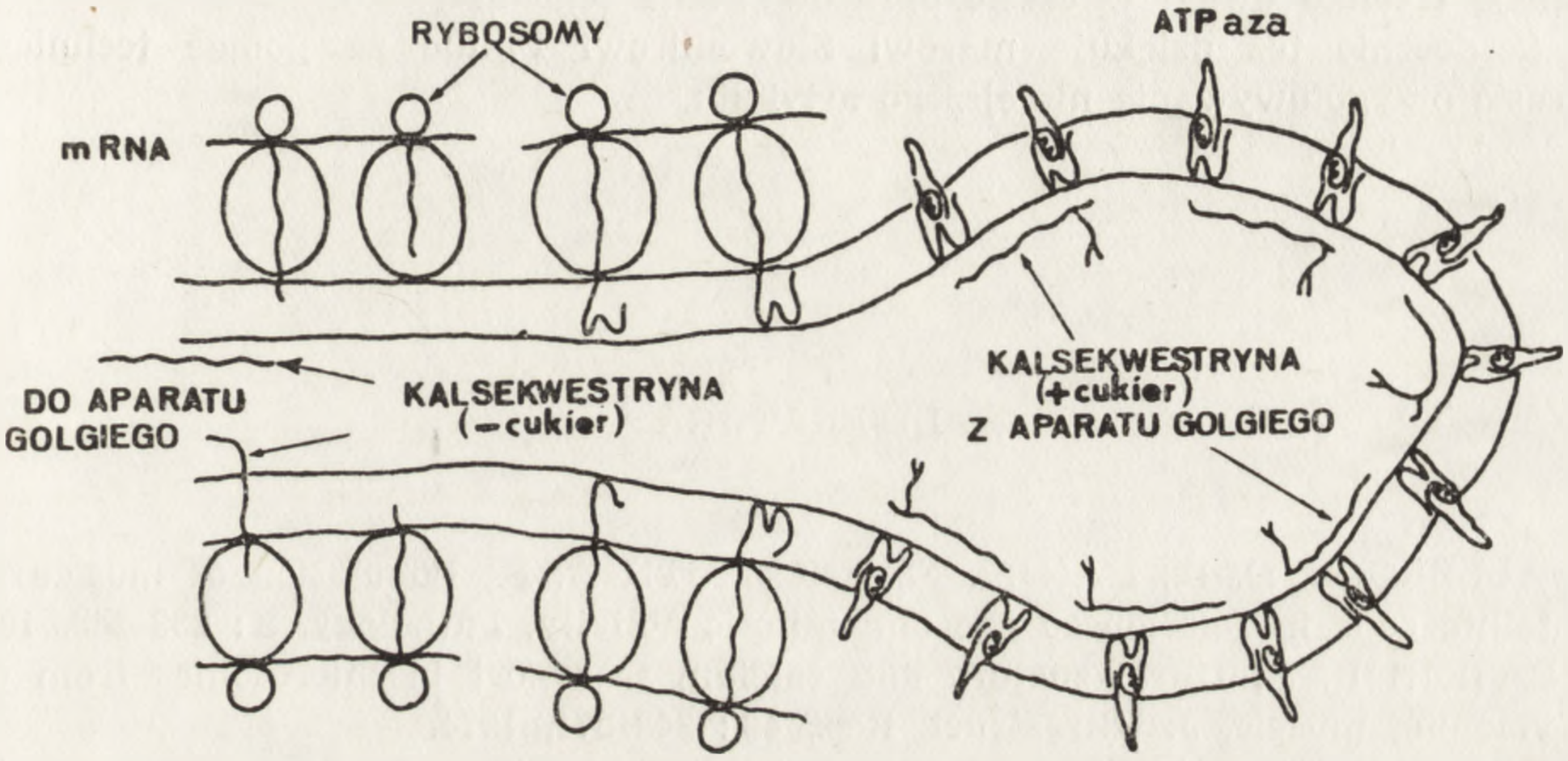
Najnowsze wyniki, uzyskane przez Greenwaya i MacLennana [21], potwierdzają wcześniejsze obserwacje Ezermana i Ishikawy [17]. Autorzy ci stwierdzili, że zarówno transportująca wapń ATPaza, jak i kalsekwestryna są syntetyzowane w szorstkim endoplazmatycznym retikulum. Oba te białka zostały wyizolowane za pomocą specyficznych przeciwciał z frakcji rybosomów związanych z błonami endoplazmatycznego reticulum, otrzymanej z mięśni nowo narodzonych szczurów.

Jørgensen i wsp. [32] wykazali obecność kalsekwestryny w okolicy okołojądrowej mioblastów. Wskazuje to na możliwość związku tego białka z aparatem Golgiego. Kalsekwestryna jest glikoproteidem [32], a więc jej obecność w aparacie Golgiego, odpowiedzialnym za glikozylację polipeptydów [51], wydaje się uzasadniona. Mechanizm transportu kalsekwestryny do aparatu Golgiego jest nieznany. Nie opublikowane wyniki Llewellyn-Smith i MacLennana wskazują na istnienie ciągłości między

http://rcin.org.pl

poszczególnymi systemami błonowymi w mioblastach. Istnieje więc możliwość, że kalsekwestryna wędruje z miejsca swego powstania do miejsca glikozylacji poprzez kanały ciągnących się błon śródplazmatycznych.

W podsumowaniu cytowanych wyników celowe wydaje się przedstawienie hipotetycznego modelu powstawania błon SR w różnicujących się włóknach mięśniowych, zaproponowanego przez MacLennana i wsp. [43] (ryc. 6).



Ryc. 6. Hipotetyczny model powstawania sarkoplazmatycznego retikulum w różnicujących się włóknach mięśniowych, według MacLennana i wsp. [43]

Hipotezę tę oparto na założeniu, że „szkielet" molekularnej struktury błon SR tworzy ATPaza i fosfolipidy. Kalsekwestryna oraz białko o wysokim powinowactwie do wapnia nie wchodzą w skład integralnej części błony. Tak więc powstawanie systemu błon SR, które można zaobserwować w mikroskopie elektronowym, byłoby jednoznaczne z syntetyzowaniem ATPazy i włączaniem jej do podwójnej warstwy fosfolipidów.

Według koncepcji autorów schematu ATPaza i fosfolipidy syntetyzowane są w tzw. „punkcie formowania" znajdującym się pomiędzy szorstkim endoplazmatycznym retikulum a powstającym SR. N-koniec syntetyzowanego łańcucha polipeptydowego ATPazy nigdy nie wychodzi poza podwójną warstwę fosfolipidów.

Kalsekwestryna również powstaje w szorstkim endoplazmatycznym retikulum. N-koniec jej łańcucha polipeptydowego, a następnie cała cząsteczka, penetruje poprzez podwójną warstwę fosfolipidów do wnętrza kanalika błony, skąd transportowana jest poprzez kanaliki łączących się błon śródplazmatycznych do aparatu Golgiego. Tam w świetle kanali-

http://rcin.org.pl

ków aparatu Golgiego następuje jej glikozylacja. Kalsekwestryna wraca do kanalika nowo utworzonego SR bądź tą samą drogą, jaką jest transportowana do miejsca swojej glikozylacji, bądź wewnątrz pęcherzyków odrywających się od błon aparatu Golgiego, które ulegają następnie fuzji z błonami SR.

Składam serdeczne podziękowanie prof. drowi Witoldowi Drabikowskiemu za dyskusję i cenne uwagi w czasie opracowywania tego artykułu.

Serdecznie też dziękuję mgrowi Sławomirowi Pikule za pomoc techniczną w czasie przygotowywania niniejszego artykułu.

LITERATURA

[1] ALLBROOK D. B., HAN M. F., HELLMUTH A. E., Population of muscle satellite cells in relation to age and mitotic activity, Pathology, **3** : 233–243, 1971.
[2] BASKIN R. J., Ultrastructure and calcium transport in microsomes from developing muscle, J. Ultrastruct. Res., **48** : 348–371, 1974.
[3] BOLAND R., MARTONOSI A., Developmental changes in the composition and function of sarcoplasmic reticulum, J. Biol. Chem., **249** : 612–624, 1974.
[4] CHIQUET M., EPPENBERGER M. M., MOOR H., TURNER D. C., Application of freeze-etching to the study of myogenesis in cell culture, Expl. Cell Res., **93** : 498–501, 1975.
[5] CHURCH J. C. T., A model for myogenesis using the concept of the satellite cell segment, [w] Regeneration of striated muscle and myogenesis, red. A. Mauro, S. A. Shafiq, A. T. Milhorat, Excerpta Medica, Amsterdam, 118–121, 1970.
[6] COLEMAN J. R., COLEMAN A. W., Muscle differentiation and macromolecular synthesis, J. Cell Physiol., suppl. **1**: 19–34, 1972.
[7] DĄBROWSKA R., DRABIKOWSKI W., Regulacja cyklu skurczowo-rozkurczowego mięśni szkieletowych, Post. Biochem., **16** : 405–420, 1970.
[8] — Molekularne podstawy skurczu mięśni, Post. Biochem., **2** : 343–359, 1973.
[9] DEAMER D. W., BASKIN R. J., Ultrastructure of sarcoplasmic reticulum, J. Cell Biol., **42**: 296–307, 1969.
[10] DIENSTMAN S. R., HOLTZER H., Myogenesis: A cell lineage interpretation, [w] The cell cycle and cell differentiation, red. H. Holtzer, J. Reinert, Springer, Berlin-Heidelberg-New York, 1–28, 1975.
[11] DRABIKOWSKI W., The identity of tropocalcin with calsequestrin; A simple method of its preparation, Biochem. Biophys. Res. Commun., **75**: 746-750, 1977.
[12] EAGLE H., Nutrition needs of mammalian cells in tissue culture, Science, **122** : 43–46, 1955.
[13] — Amino acid metabolism in mammalian cell culture, Science, **130** : 432–437, 1959.

http://rcin.org.pl

[14] EBASHI S., ENDO M., OHTSUKI J., Control of muscle contraction, Quart. Rev. Biophys., **2** : 351–384, 1969.
[15] EMERSON C. P., Jr .,BECKNER S. K., Activation of myosin synthesis in fusing and mononucleated myoblasts, J. Mol. Biol., **93** : 431–447, 1975.
[16] ENDO M., Calcium release from the sarcoplasmic reiculum, Physiol. Rev., **57** : 71–108, 1977.
[17] EZERMAN E. B., ISHIKAWA H., Differentiation of the sarcoplasmic reticulum and T system in developing chick skeletal muscle in vitro, J. Cell Biol., **35** : 405–420, 1967.
[18] FAMBROUGH D., RASH J. E., Development of acetylocholine sensitivity during myogenesis, Develop. Biol., **26** : 55–68, 1971.
[19] FANBURG B. L., DRACHMAN D. B., MOLL D., Calcium transport in isolated sacroplasmic reticulum during muscle maturation, Nature, **218**: 962–964, 1968.
[20] FISHER H. W., PUCK T. T., SATO G., Molecular growth requirements of single mammalian cells: The action of fetuin in promoting cell attachment to glass, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **44**: 4–10, 1958.
[21] GREENWAY D. C., MACLENNAN D. H., Assembly of the sarcoplasmic reticulum; Synthesis of calsequestrin and the Ca^{2+}, Mg^{2+} - adenosine triphosphatase on membrane - bound polyribosomes, Can. J. Biochem., **56**: 452–456, 1978.
[22] HASSELBACH W., Relaxing factor and the relaxation of muscle, Prog. Biophys. Mol. Biol., **14**: 167–222, 1964.
[23] HAUSCHKA S. D., KONISBERG I. R., The influence of collagen on the development of muscle clones, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **55**: 119–126, 1966.
[24] HUXLEY A. F., TAYLOR R. E., Local activation of striated muscle fibers, J. Physiol., **144**: 426–441, 1958.
[25] HOLLAND P. C., MACLENNAN D. H., Assembly of the sarcoplasmic reticulum; Biosynthesis of the adenosine triphosphatase in rat skeletal muscle cell culture, J. Biol. Chem., **251**: 2030–2036, 1976.
[26] HOLLAND D. L., PERRY S. V., The adenosine triphosphatase and calcium ion - transporting activities of the sarcoplasmic reticulum of developing muscle, Biochem. J., **114**: 161–170, 1968.
[27] HOLTZER H., RUBINSTEIN N., FELLINI S., YEOH G., CHI Y., BIRNBAUM J., OKAYAMA M., Leneages, quantal cell cycles and the generation of cell diversity, Quart. Rev. Biophys., **8**: 523–557, 1975.
[28] HOLTZER H., STRAKS K., BICHL J., SOMLYO A. P., ISHIKAWA H., Thick and thin filaments in postmitotic, mononucleated myoblasts. Science, **188**: 943–944, 1975.
[29] IKEMOTO N., SRETER F. A., NAKAMURA A., GERGELY J., Tryptic digestion and localization of calcium uptake and ATPase activity in fragments of sarcoplasmic reticulum, J. Ultrastruct. Res. **23**: 216–232, 1968.
[30] ISHIKAWA H., Electron microscopic observations of satellite cells with special reference to the development of mammalian skeletal muscle, Z. Anat. Entwickl. - Gesch., **125**: 43–55, 1966.
[31] — Satellite cells in developing muscle and tissue culture, [w] Regeneration of striated muscle and myogenesis, red. A. Mauro, S. A. Shafiq, A. T. Milhorat, Excerpta Medica, Amsterdam, 167–179, 1970.
[32] JØRGENSEN A. O., KALNINS V. J., ZUBRZYCKA E., MACLENNAN D. H., Assembly of the sarcoplasmic reticulum; Location by the immunofluorescence

http://rcin.org.pl

of sarcoplasmic reticulum proteins in differentiating rat skeletal muscle cell cultures, J. Cell Biol., 74: 287–298, 1977.
[33] KILARSKI W., JAKUBOWSKA M., An electron microscopic study of myofibril formation in embryonic rabbit skeletal muscle, Acta Biochim. Biophys. Sci. Hung., zgłoszone do druku.
[34] LAGGNER P., BARRAT M. D., The interaction of a proteolipid from sarcoplasmic reticulum membrane with phospholipids, A spin label study, Arch. Biochem. Biophys. **170**: 92–101, 1975.
[35] LAGGNER P., GRAHAM D. E., The effect of a proteolipid from sarcoplasmic reticulum on the physical properties of artificial phospholipid membranes, Biochem. Biophys. Acta, **433**: 311–317, 1976.
[36] LEHNINGER A. L., The molecular basis of cell structure and function, [w] Biochemistry, Worth Pub. Inc., 749–778. 1975.
[37] LOUGH J. W., ENTMAN H. L., BOSSEN E. H., HANSEN J. L., Calcium accumulation by isolated sarcoplasmic reticulum of skeletal muscle during development in tissue culture, J. Cell Physiol., **80**: 431–436, 1972.
[38] LOWEY S., Protein assemblies in muscle, 23 Colloq. Ges. Biol. Chem., Springer Verlag, Berlin - Heidelberg, 317–342, 1972.
[39] MACLENNAN D. H., Purification and properties of an adenosine triphosphatase from sarcoplasmic reticulum, J. Biol. Chem., **245**: 4508–4518, 1976.
[40] MACLENNAN D. H., HOLLAND P. C., Calcium transport in sarcoplasmic reticulum, Annu. Rev. Biophys. Bioeng., **4**: 377–404. 1975.
[41] MACLENNAN D. H., WONG P. T. S., Isolation of a calcium - sequestring protein from sarcoplasmic reticulum, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **68**: 1231–1235, 1971.
[42] MACLENNAN D. H., YIP C. C., ILES G. H., SEEMAN P., Isolation of sarcoplasmic reticulum proteins, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., **37**: 469–477, 1972.
[43] MACLENNAN D. H., ZUBRZYCKA E., JØRGENSEN A. O., KALNINS V. J., Assembly of the sarcoplasmic reticulum, [w] The molecular biology of membranes, red. A. Tzagaloff, S. Fleischer, J. Hatefi, D. H. MacLennan, Plenum Press, New York, 309–320, 1977.
[44] MARTONOSI A., ROUFA D., BOLAND R., REYES E., TILLACK T. W., Development of sarcoplasmic reticulum in cultured chicken muscle, J. Biol. Chem., **252**: 318–332, 1977.
[45] MAURO A., Satellite cells of skeletal fibers, J. Biophys. Biochem. Cytol., **9**: 493–495, 1961.
[46] — The structure of the sarcolemma of the frog skeletal muscle fiber, J. Biophys. Biochem. Cytol., **10**: 177–185, 1961.
[47] MERLIE J. P., GROS F., In vitro myogenesis; Expression of muscle specific function in the absence of cell fusion, Exptl. Cell Res., **97**: 406–412, 1976.
[48] MERLIE J. P., SOBEL A., CHANGEUX J. P., GROS F., Synthesis of acetylocholine receptor during differentiation of cultured embryonic muscle cells, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **72**: 4028–4032, 1975.
[49] MICHALAK M., SARZAŁA M. G., Asymetria błon biologicznych, Post. Biochem., **23**: 523–539, 1977.
[50] MICHALAK M., SARZAŁA M. G., DRABIKOWSKI W., Sarcoplasmic reticulum vesicles and glycogen - protein particles in microsomal fraction of skeletal muscle, Acta Biochim. Polon., **24**: 105–116, 1977.
[51] MONTREUIL J., Recent data on the structure of the carbohydrate moiety of

http://rcin.org.pl

glycoproteins; Metabolic and biological implications, Pure Appl. Chem., 42: 431–477, 1975.

[52] MOSS F. P., LEBLAND Ch. P., Nature of developing nuclei in skeletal muscle of growing rats, [w] Regeneration of striated muscle and myogenesis, red. A. Mauro, S. A. Shafiq, A. T. Milhorat, Excerpta Medica, Amsterdam, 165–179, 1970.

[53] MUIR A. R., The structure and distribution of satellite cells, [w] Regeneration of striated muscle and myogenesis, red. A. Mauro, S. A. Shafiq, A. T. Milhorat, Excerpta Medica, Amsterdam, 91–100, 1970.

[54] NAMEROFF M. A., Phospholipase C and the myogenic cell surface, [w] Exploratory concepts in muscular dystrophy, red. A. T. Milhorat, Excerpta Medica, Amsterdam 26–31, 1974.

[55] OKAZAKI K., HOLTZER H., An analysis of myogenesis in vitro using fluorescein - labeled antimyosin, J. Histochem. Cytochem., 13: 726–739, 1965.

[56] OSTWALD T. J., MacLENNAN D. H., Isolation of a high affinity calcium binding protein from sarcoplasmic reticulum, J. Biol. Chem., 249: 974–979, 1974.

[57] PATERSON B., PRIVES J., Appearance of acetylocholine receptor in differentiating cultures of embryonic chick breast muscle, J. Cell. Biol., 59: 241–245, 1973.

[58] PATERSON B., STROHMAN R. C., Myosin synthesis in cultures of differentiating chicken embryo skeletal muscle, Develop. Biol., 29: 113–137, 1972.

[59] PEACHEY L. D., The sarcoplasmic reticulum and transverse tubules of the frog's sartorius, J. Cell Biol., 25: 209–231, 1965.

[60] — Analysis of the T - system of skeletal muscle fibers as a net, Streszczenia, VI International Biophysics Congress, Kyoto, 161, 1978.

[61] REZNIK M., Origin of the myogenic cell in the adult striated muscle of mammals, Differentiation, 7: 65–73, 1976.

[62] SARZAŁA M. G., Struktura i funkcja błon sarkoplazmatycznego retikulum (mięśni szkieletowych), Post. Biochem., 20: 403–424, 1974.

[63] SARZAŁA M. G., ZUBRZYCKA E., DRABIKOWSKI W., Characterization of the constituents of sarcoplasmic reticulum membrane, [w] Calcium binding proteins, red. W. Drabikowski, H. Strzelecka - Gołaszewska, E. Carafoli, Elsevier Scientific Pub. Co., Amsterdam, 315–346, 1974.

[64] SARZAŁA M. G., PILARSKA M., Phospholipid biosynthesis in sarcoplasmic reticulum membrane during development, Biochim. Biophys. Acta, 411: 81–92, 1976.

[65] SARZAŁA M. G., PILARSKA M., ZUBRZYCKA E., MICHALAK M., Chages in the structure, composition and function of sarcoplasmic reticulum membrane during development, Eur. J. Biochem., 57: 25–34, 1975.

[66] SARZAŁA M. G., ZUBRZYCKA E., MICHALAK M., Comparison of undeveloped and mature sarcoplasmic reticulum vesicles, [w] Calcium transport in contraction and secretion, red. E. Carafoli, F. Clementi, W. Drabikowski, A. Margreth, North Holland Pub. Co., 329–338, 1975.

[67] SCHIAFFINO A., CANTINI M., SARTORE S., Myofibrillogenesis and sarcotubular differentiation in fusion-arrested myoblasts, Streszczenia, VI Meet. European Muscle Club, Paris, 22–23, 1977.

[68] SHAFIQ S. A., Satellite cells and fiber nuclei in muscle regeneration, [w] Regeneration of striated muscle and myogenesis, red. A. Mauro. S. A. Shafiq, A. T. Milhorat, Excerpta Medica, Amsterdam, 122–132, 1970.

http://rcin.org.pl

[69] SHAINBERG A., YAGIL G., YAFFE D., Enzyme activities during muscle differentiation, Develop. Biol., **25**: 1–29, 1971.
[70] SINGER S. J., NICOLSON G. J., The fluid mosaic model of the structure of cell membranes, Science, **175**: 720–731, 1972.
[71] STEWART P. S., MACLENNAN D. H., Surface particles of sarcoplasmic reticulum membranes; Structural features of the adenosine triphosphatase, J. Biol. Chem., **249**: 985–993, 1974.
[72] STEWART P., MACLENNAN D. H., SHAMOO A. E., Isolation and characterization of tryptic fragments of the adenosine triphosphatase of sarcoplasmic reticulum, J. Biol. Chem., **251**: 712–719, 1976.
[73] THORLEY - LAWSON D. A., GREEN N. M., Studies on the location of proteins in the sarcoplasmic reticulum, Eur. J. Biochem., **40**: 403–413, 1973.
[74] TILLACK W., BOLLAND R., MARTONOSI A., The ultrastructure of developing sarcoplasmic reticulum, J. Biol. Chem., **249**: 624–633, 1974.
[75] TURNER D. C., Differentiation in cultures derived from embryonic chicken muscle; The postmitotic, fusion - capable myoblasts as a distinct cell type, Differentiation **10**: 81–93, 1978.
[76] WALLS E. W., The microanatomy of muscle, [w] Structure and function of muscle, red. G. H. Bourne, Academic Press, New York and London, 21–61, 1960.
[77] WELAIN D., MEIENHOFER M. C., PROUX D., SCHAPIRA F., Studies on myogenesis in vitro; Changes of creatine kinase, phosphorylase and phosphofructokinase isozymes, Differentiation, **1**: 349–354, 1973.
[78] WHALEN R. G., BUTLER - BROWNE G. S., GROS F., Protein synthesis and actin heterogeneity in calf cells in culture, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **73**: 2018–2022, 1976.
[79] YAFFE D., Cellular aspects of muscle differentiation in vitro, Curr. Top. Develop. Biol., **4**: 37–77, 1969.
[80] — Developmental changes proceeding cell fusion during muscle differentiation in vitro, Exptl. Cell Res., **66**: 33–48, 1971.
[81] — Rat skeletal muscle cells, [w] Tissue culture; Methods and applications, red. P. F. Krause, M. K. Paterson, Academic Press, New York, London, 106–114, 1973.
[82] YAFFE D., DYM H., Gene expression during differentiation of contractile muscle fibers, Cold Spring Harbor Sym. Quant. Biol., **37**: 543–547, 1972.
[83] ZUBRZYCKA E., Solubilizacja i rekonstytucja błon biologicznych, Post. Biol. Komórki, **2**: 233–248, 1975.
[84] ZUBRZYCKA E., KORCZAK B., SARZAŁA M. G., DRABIKOWSKI W., Location of the peripheral proteins in sarcoplasmic reticulum vesicles, FEBS Letters, **90**: 215–217, 1978.
[85] ZUBRZYCKA E., MACLENNAN D. H., Assembly of the sarcoplasmic reticulum: Biosynthesis of calsequestrin in rat skeletal muscle cell cultures, J. Biol. Chem., **215**: 7733–7738, 1976.
[86] ZUBRZYCKA E., MICHALAK M., KOSK - KOSICKA D., SARZAŁA M. G., Properties of microsomal subfractions isolated from developing rabbit skeletal muscle, Eur. J. Biochem., **93**: 113–121, 1979.

Otrzymano: 4 listopada 1978.
Przyjęto: 26 marca 1979.

Adres autorki: ul. Pasteura 3, 02–093 Warszawa.

http://rcin.org.pl

POSTĘPY BIOLOGII KOMÓRKI TOM 6, NR 3, 1979 (209-238)

STRUKTURA I MORFOGENEZA WŁÓKIEN SPRĘŻYSTYCH

STRUCTURE AND MORPHOGENESIS OF ELASTIC FIBERS

Aleksander HINEK

I Klinika Chirurgiczna Instytutu Chirurgii CKP WAM

Streszczenie. W artykule przedstawiono aktualne informacje o składzie i ultrastrukturze elementów sprężystych. Omówiono trudności, jakie napotyka się w badaniach nad elastogenezą. W oparciu o badania własne przedstawiono prosty sposób pozwalający na uzyskanie dobrego kontrastu elastyny obecnej we włóknach sprężystych oraz na uwidocznienie gęstego elektronowo materiału, obecnego w cytoplazmie elastoblastów, będącego prawdopodobnie prekursorem produkowanej przez te komórki elastyny. Wyniki obserwacji mikroskopowo - elektronowych pozwoliły na wyróżnienie etapów pozakomórkowego formowania się włókien i błon sprężystych oraz na prześledzenie dróg wydzielania prekursorów elastyny z komórek. W oparciu o obserwacje mikroskopowo - elektronowe hodowli i przeszczepów miocytów aortalnych i chondrocytów chrząstek sprężystych wykazano duże podobieństwo ultrastruktury komórek produkujących włókna sprężyste oraz ich podobne zachowanie się w warunkach in vitro. Komórki te bowiem tworzą hodowle wielopokładowe, nie wykazują zahamowania kontaktowego ruchu i mitoz, czym różnią się od innych komórek tkanki łącznej produkujących substancje międzykomórkową. Obserwując tworzenie substancji międzykomórkowej w tkance, powstałej po przeszczepieniu izolowanych elastoblastów uprzednio inkubowanych w koloidalnej zawiesinie dwutlenku toru, stwierdzono, że związek ten, wychwytywany przez fagolizosomy komórek, hamuje wybiórczo tworzenie włókien sprężystych. W oparciu o literaturę przedstwiono również procesy elastolizy oraz stany chorobowe, w których są zaangażowane elementy sprężyste.

Summary. The paper present up-todate information on the composition and ultrastructure of elastic elements. The difficulties are discussed occurring in studies on elastogenesis. On the basis of the authors own investigations, a simple method is suggested which allows to obtain a good contrast picture of elastin present in elastic fibers and membranes and to visualise the electron - dense material in the elastoblasts cytoplasm, which probably is the precursor of elastin produced by these cells. The results of electron microscopic observations enabled the distinction of the stages of extracellular formation of elastic fibers and membranes and the detection of the pathways of elastin precursor excretion from the cells. Observation in the electron microscope of cultures and transplants of aortal myocytes and elastic cartilage chondrocytes revealed a high similarity of ultrastructure of cells

http://rcin.org.pl

producing elastic fibers and their similar behaviour in vitro. These cells form namely many - leyered cultures and show no inhibition of contact movement and mitoses, differing in this respect from other cells of connective tissue producing intercellular substance. It was noted, when observing the formation of the intercellular substance in the tissue formed after transplantation of isolated elastoblasts previously incubated in a colloidal suspension of thorium dioxide, that this compound stored in phagolysosmes of these cells inhibits selective production of elastic fibers. On the basis of literature data, the processes of elastolysis and pathological conditions involving elastic elements are described.

MORFOLOGIA ELEMENTÓW SPRĘŻYSTYCH

Elementy sprężyste kręgowców występują w dwóch zasadniczych formach morfologicznych: włókien i błon. Włókna sprężyste są składnikiem prawie wszystkich rodzajów tkanki łącznej [73, 82, 89, 91]. Największa ich liczba występuje w skórze właściwej, płucach, więzadle karkowym oraz w ścianach naczyń krwionośnych i chrząstce sprężystej. Średnica włókien nie przekracza 10 μm. Są one często długie i rozgałęzione. W tkankach tworzą nieregularną trójwymiarową sieć, a tylko w więzadle karkowym przebiegają równolegle do siebie wzdłuż linii sił największego obciążenia więzadła. Błony sprężyste występują w warstwie środkowej tętnic, otaczając koncentrycznie cały obwód naczynia [78, 82, 85, 88]. Ich szerokość waha się od kilkunastu do kilkudziesięciu μm. Błony łączą się między sobą licznymi bocznicami, nie są również ciągłe, a ich okienka zawierają wypustki komórek mięśniowych. Dla obserwacji mikroskopem świetlnym elementy sprężyste wybarwia się wybiorczo orceiną, rezorcyno-fuksyną według Weigerta i hematoksyliną żelazistą Verhoeffa [77]. Elementy sprężyste składają się z dwóch odrębnych składników strukturalnych — bezpostaciowych rdzeni zawierających elastynę oraz z otaczających je i w nich zatopionych 11 nm mikrofibryli zbudowanych z glikoproteidów. W preparatach mikroskopowo-elektronowych kontrastowanych rutynowo octanem uranylu i cytrynianem ołowiu mikrofibryle są gęste elektronowo, a rdzenie elastynowe pozostają niekontrastowane [22, 51, 78, 85 89].

ELASTYNA

Głównym składnikiem włókna jest białko elastyna o dużej wytrzymałości mechanicznej [24]. Moduł Younga dla tego białka wynosi 3×10^6 dyn/cm^2, a wytrzymałość na rozciągnięcie — 1×10^7 dyn/cm^2, co pozwala na zwiększenie pierwotnej długości nawet o 100% bez powstania trwałych odkształceń w strukturze białka [32].

http://rcin.org.pl

Elastynę po raz pierwszy wyizolował Tilamus [wg Franzblaua 24] w 1940 r.; odtłuszczał on tkanki alkoholem i eterem, a następnie działał na nie gorącym kwasem octowym. Elastyna pozostawała w osadzie. Technika ta została później udoskonalona przez Herbaczewskiego (w 1882 r.), a stosowane do dzisiaj sposoby uzyskiwania elastyny oparte są na odkrytych wtedy jej własnościach: oporności elastyny wobec silnych zasad i kwasów, a także niektórych soli. Schneider i Hejek w 1928 r. [wg Franzblaua 24] wprowadzili dodatkowo autoklawowanie wyjściowego materiału i następową ekstrakcję innych niż elastyna związków za pomocą 89% kwasu mrówkowego. Partridge [75], aby uzyskać elastynę, autoklawował tkanki w wodzie destylowanej i poddawał działaniu 0,1 N wodorotlenku sodowego przy temperaturze 100°C. Robert i wsp. [82] uzyskiwali elastynę, działając na tkanki zimnym 70% kwasem trójchlorooctowym. Elastynę można było również uzyskać z homogenatów tkankowych po ich wstępnej ekstrakcji roztworem chlorku sodu lub 5 M roztworem chlorowodorku guanidyny i późniejszym trawieniu homogenatu kolagenazą [86]. Preparaty elastyny uzyskane różnymi metodami nie są jednak jednolite ze względu na różny stopień ich oczyszczania i straty niektórych frakcji. Sposobem jakościowego określenia obecności elastyny jest stwierdzenie obecności desmozyny w materiale pozostałym po jednym z wymienionych sposobów ekstrakcji [64]. Elastyna izolowana z różnych tkanek różni się też składem aminokwasowym [8, 13, 24, 85, 86, 91]. Ogólnie powtarzającymi się jednak cechami tego białka jest wysoka zawartość glicyny (34%), alaniny (25%), proliny (13%) i waliny (13%), niska zawartość hydroksyproliny (1%) oraz całkowity brak hydroksyliny, histydyny, cysteiny i metioniny. Najbardziej stałą cechą elastyny izolowanej z dojrzałych włókien sprężystych jest obecność w jej cząsteczkach charakterystycznych połączeń aminokwasów — desmozyny, izodesmozyny i merodesmozyny — biorących udział w formowaniu wiązań krzyżowych elastyny, których obecność sprawia, że jest to białko nierozpuszczalne [91].

Dotychczas zaproponowano kilka modeli przestrzennej organizacji elastyny [75, 104, 106] zakładających, że elastyna jest białkiem o globularnej konformacji cząsteczek. Weiss-Fogh i Anderson [106] zakładają, że elastyna jest tzw. „elastomerem płynnych kropel" — zbiorem monomerów globularnych zawieszonych w fazie wodnej i łączących się między sobą w trójwymiarowy układ za pomocą wiązań krzyżowych. Stabilność w fazie wodnej miałyby tu zapewniać grupy hydrofilowe aminokwasów polarnych wystające ponad poziom sferycznych cząsteczek hydrofobowego białka. Gray i wsp. [37] przedstawili tzw. „model naoliwionej spirali", zakładając, że elastyna składa się nie z globularnych, a fibrylarnych monomerów łączących się w trójwymiarową sieć zawie-

http://rcin.org.pl

szoną w fazie wodnej. Monomery elastynowe byłyby zbudowane z naprzemiennie ułożonych odcinków, bogatych w glicynę, prolinę i walinę tworzących giętką spiralę, oraz z odcinków sztywnych zawierających sekwencje ala-ala-ala-liz, i liz-ala-ala-liz. Aminokwasy odcinków sztywnych układają się w strukturę alfa helisy i tworzą wiązania krzyżowe między sąsiednimi monomerami. Autorzy tego modelu zakładają, że leżące w odcinkach spirali reszty glicynowe zajmują najbardziej zewnętrzne pozycje łącząc się swymi grupami hydrofilnymi z fazą wodną, podczas gdy prolina, walina i inne aminokwasy zawierające grupy hydrofobowe nie sięgają fazy wodnej. W czasie rozciągania również i te grupy hydrofobowe są wpychane do środowiska wodnego. Po ustaniu działania siły rozciągającej reszty hydrofobowe są odpychane od wody, a energia tego odpychania wystarcza na powrót włókna do wymiarów wyjściowych. Sprężystość elastyny jest więc uwarunkowana obecnością wody. W stanie odwodnienia dochodzi bowiem do zbliżenia łańcuchów polipeptytowych i wystąpienia pomiędzy nimi silnych oddziaływań usztywniających strukturę białka.

Ustalenie ostatecznego modelu przestrzennej organizacji cząsteczek elastyny nie jest proste. Istnieją rozbieżności dotyczące morfologicznego obrazu próbek elastyny przygotowanej różnymi metodami izolacyjnymi dla celów mikroskopii elektronowej. Trudności w przygotowaniu nie zmienionych morfologicznie próbek elastyny wynikają m. in. z faktu szybkiego odwodnienia tego białka podczas przygotowywania próbek do mikroskopu elektronowego, co powoduje zapadanie się przestrzeni międzycząsteczkowych normalnie wypełnionych przez wodę [75]. Dodanie do próbek elastyny przygotowanych do mikroskopii elektronowej glikolu polietylenowego sprawia, że związek ten wypełnia opuszczone przez wodę przestrzenie międzycząsteczkowe, a próbki elastyny przyjmują formę kulistych monomerów o średnicy 4–5 nm. Badania mikroskopowo-elektronowe próbek elastyny, przygotowanej przez ekstrakcję alkaliami, rozdrobnianych działaniem ultradźwięków i oglądanych po kontrastowaniu tła, sugerują włóknistą strutkurę elastyny.

Badając próbki elastyny, uzyskane z aorty świńskiej i z aorty szczurzej, stwierdzono, że stanowią one nieregularną sieć mikrowłókienek biegnących w różnych kierunkach. Elastyna więzadła karkowego zaś składa się z mikrowłókienek ułożonych równolegle do siebie [22, 34, 35]. Różna przestrzenna organizacja, nawet w obrębie wysoce wyspecjalizowanego białka, jest prowdopodobnie wynikiem działania sił, jakim podlega elastyna w określonym narządzie. Szczegółowe badania mikroskopowo-elektronowe i analiza dyfrakcyjna uściśliły wiadomości o substrukturze elastyny [34, 35]. Gotte wykazał, że elastyna składa się z licznych ułożonych równolegle podwójnych spirali oddalonych od siebie o 5–

http://rcin.org.pl

6 nm. Każda spirala utworzona jest z dwóch skręconych wokół siebie łańcuchów o średnicy 1,5 nm. Taka podwójna spirala wykazuje pod mikroskopem elektronowym poprzeczne jasne prążki występujące regularnie co 3,5–4 nm i może być interpretowana jako rząd jednostek globularnych o średnicy 3,4–4 nm. Analiza dyfrakcyjna potwierdza jednak włókienkowy charakter podjednostek elastyny. Opisane niewielkie różnice w średnicy mikrowłókienek wynikają ze stopnia ich rozciągnięcia. Zestawienie wyników badań morfologicznych z danymi uzyskanymi z analizy biochemicznej elastyny sugeruje, że obecne w mikrowłókienkach elastynowych prążki są miejscem zbliżenia dwóch 1,5 nm łańcuchów białkowych, połączonych tam wiązaniami krzyżowymi. Nie obserwuje się jednak prążkowania większych konglomeratów elastyny obecnych we włóknach sprężystych, co potwierdza założenie, że wiązania krzyżowe tego białka są rozłożone nieregularnie.

PREKURSORY ELASTYNY

Narayanan i wsp. [69], obserwując hodowle komórek aorty w pożywce zawierającej beta-amino-proprionitryl — związek blokujący tworzenie wiązań krzyżowych elastyny i kolagenu, stwierdzili, że komórki te włączają znakowaną H^3-lizynę do innego niż kolagen białka rozpuszczalnego w soli, opornego na działanie kolagenazy. To rozpuszczalne w soli białko okazało się identyczne z prekursorem elastyny — tropoelastyną wyizolowaną z aort prosiąt żywionych dietą nie zawierającą jonów miedzi [32, 90, 91]. Następnie [90, 91, 94] ustalono, że tropoelastyna jest białkiem o charakterze zasadowym, rozpuszczalnym w soli. Jej masa cząsteczkowa, oznaczana metodą sedymentacyjną, wynosi 74 000, a metodą elektroforetyczną — 72 000 [32,91]. Białko to tworzy typową prawoskrętną alfa helisę o długości 850-870 reszt aminokwasowych, nie zawiera desmozyn. Jest za to kilkakrotnie bogatsze w lizynę niż dojrzała elastyna. Zawartość innych aminokwasów w tropoelastynie jest identyczna jak w dojrzałej elastynie. Białko to jest wrażliwe na działanie elastazy oraz niektórych innych enzymów proteolitycznych [90], co sprawia, że izolując tropoelastynę należy dodawać inhibitory proteaz [70]. Foster i wsp. [26] ustalili jednak, że z homogenatu aort kurcząt z latyryzmem można 5% roztworem chlorku sodu wypłukać również białko o ciężarze cząsteczkowym 130 - 140 000.

Materiał ten, w porównaniu z tropoelastyną, miał więcej aminokwasów dwukarboksylowych i hydroksyaminokwasów, zawierał również histydynę, metioninę i cystynę. Białko to różniło się elektroforetycznie od tropoelastyny, ale analiza immunochemiczna wykazała identyczny cha-

http://rcin.org.pl

rakter tych dwóch białek. Założono zatem, że to wielkocząsteczkowe białko jest wcześniejszym prekursorem elastyny — proelastyną, a tropoelastyna powstaje przez odłączenie od niego peptydu pod wpływem działania enzymu lub enzymów proteolitycznych. Założenia te stały się wysoce prawdopodobne, kiedy to stosując chromatografię jonowymienną peptydów, powstających po rozpadzie proelastyny, wykazano, że jeden z nich ma ciężar cząsteczkowy 72 000, a więc taki sam jak opisywana przez innych badaczy tropoelastyna.

Drugi uzyskany peptyd był białkiem kwaśnym o ciężarze cząsteczkowym 65 000, zawierającym również hydroksyprolinę. Ponadto wyniki analizy aminokwasowej peptydów z częściowo zhydrolizowanej proelastyny wykazały, że na jej N-końcu znajduje się identyczna sekwencja aminokwasów jak w tropoelastynie. Sugeruje to, że dodatkowy peptyd o ciężarze 65 000 jest dołączony do tropoelastyny na jej końcu karboksylowym. Wykazano również, że w czasie elektroforezy białko to przesuwa się razem z alfa-1 kolagenem, co miało być przyczyną dotychczasowego „przeoczenia" tego białka przez badaczy, którzy opisywali tylko tropoelastynę powstałą już po degradacji enzymatycznej pewnej liczby cząsteczek proelastyny.

Foster i wsp. [26] sugerują, że w czasie transportu śródkomórkowego i po wydzieleniu z komórki dochodzi do wytworzenia mostków dwusiarczkowych między cząsteczkami cystyny obecnymi w dodatkowych peptydach różnych cząstek proelastyny, co zapewnia cząsteczkom tego białka zbliżenie przestrzenne i ułatwia późniejsze tworzenie wiązań krzyżowych pomiędzy odcinkami tropoelastyny. Być może, że takie dwusiarczkowe mostki mogą również powstawać między dodatkowym peptydem zawartym w proelastynie a glikoproteidami mikrofibryli. Rozszczepienie cząsteczki proelastyny następuje dopiero po rozpoczęciu tworzenia się wiązań krzyżowych pomiędzy odcinkami zawierającymi tropoelastynę.

MIKROFIBRYLE WŁÓKIEN SPRĘŻYSTYCH

Pierwsze doniesienia o niejednorodności biochemicznej elementów strukturalnych włókna sprężystego pojawiły się na początku lat sześćdziesiątych [6, 8, 75]. Wykazano, że traktując tkanki, zawierające włókna sprężyste, gorącymi roztworami zasad lub autoklawując je, można oprócz elastyny uzyskać również inne białko o charakterze glikoproteidu. Ross i Bornstein [86], którzy poddawali homogenat więzadła karkowego działaniu 5 M chlorku guanidyny i trawieniu kolagenazą, uzyskali materiał heterogenny morfologicznie zawierający obok grudek elastyny struktury mikrofibrylarne. Trawienie tego mateiału trypsyną, chymotropsyną i pa-

http://rcin.org.pl

painą powodowało rozpad mikrofibryli, a trawienie elastazą pozwoliło na wyizolowanie czystej frakcji mikrofibryli. Frakcja ta zawierała 4–7% heksoz i 0,7% heksozaminy. Podobne wyniki uzyskali Robert i wsp. [80] oraz Muir i wsp. [67] po ekstrakcji tkanek zawierających struktury sprężyste 0,1 M wodorotlenkiem sodu w temperaturze 100°C, 88% kwasem mrówkowym w temperaturze 45°C, zimnym 70% kwasem trójchlorooctowym lub mieszaniną 5 M chlorku guanidyny i tiosiarczanu sodu oraz następowym traktowaniu heterogennego materiału 8 M mocznikiem i 0,1 M merkaptoetanolem. Ta ostatnia procedura pozwalała na rozpuszczenie frakcji mikrofibrylarnej i częściowe jej oczyszczenie metodą chromatografii jonowymiennej na DEAE celulozie i filitracji w agarozie. Elektroforezą w żelu poliakrylamidowym w obecności soli sodowej siarczanu dedecylu można było wykazać, że frakcja ta zawiera białko o ciężarze ok. 27 000 i o większej ruchliwości w polu elektrycznym niż elastyna.

Materiał tworzący mikrofibryle jest bogaty w glicynę, alaninę i aminokwasy dwukarboksylowe oraz zawiera względnie dużo cystyny (80 reszt na 1000). Białko to nie zawiera desmozyn, hydroksyproliny i hydroksylizyny. Zawiera natomiast heksozy i heksozaminę — jest więc glikoproteidem. Glikoproteidy mikrofibrylarne różnią się jednak zawartością cukrów i antygenowością od glikoproteidów strukturalnych formujących agregaty spajające włókna kolagenowe w tkance łącznej. Obserwacje mikroskopowo - elektronowe [74] wykazały, że mikrofibryle składają się z podjednostek globularnych, które agregują liniowo formując struktury tubularne o średnicy 11–12 nm.

WŁÓKNA OKSYTALANOWE I ELAUNINOWE

Omawiając elementy sprężyste należy wspomnieć, że niektórzy badacze zaliczają doń jako odrębne jednostki strukturalne jeszcze tzw. włókna oksytalanowe opisane po raz pierwszy przez Fulmera i Lilie w 1958 r. [87] oraz włókna elauninowe wyodrębnione przez Gawlika w 1965 r. [30]. Elementy te przyjmują większość barwień charakterystycznych dla włókien sprężystych, ale dopiero po uprzednim utlenieniu tkanki za pomocą kwasu nadoctowego. Oglądane w mikroskopie elektronowym odpowiadają morfologicznie niedojrzałym włóknom sprężystym, które nigdy nie kończą pełnego cyklu rozwojowego i spełniają w tkankach (więzadła okołozębowe, onerwie, ścięgna, skóra) funkcje oporowe. Wykazano, że pod mikroskopem elektronowym włókna oksytalanowe są wiązkami takich samych mikrofibryli, jakie stanowią szkielet włókien sprężystych [7, 15]. Włókna elauninowe według Cotta - Pereira i wsp. [14, 15] są skupiskami

http://rcin.org.pl

równolegle do siebie ułożonych mikrofibryli, pomiędzy którymi odkładają się grudki elastyny. Grudki te nie łączą się jednak ze sobą i nie wytwarzają homogennych rdzeni, jak to ma miejsce w czasie dojrzewania normalnych włókien sprężystych.

POWSTAWANIE WŁÓKIEN SPRĘŻYSTYCH

Obecnie uważa się, że elementy sprężyste produkowane są przez trzy podstawowe typy komórek — elastoblasty. Są to fibroblasty obecne w wiązadłach sprężystych, skórze, ścięgnach i zrębie płuc, chondroblasty — chondrocyty chrząstki sprężystej oraz komórki mięśniowe gładkie obecne w ścianach naczyń krwionośnych [24, 44, 45, 66, 84, 85, 91, 100].

Dotychczas nie została poznana dokładnie droga syntezy i wydzielania prekursorów elastyny i glikoproteidów z komórek. Takagi [97, 98] oraz Ito i wsp. [50] izolowali tropoelastynę o ciężarze cząsteczkowym 72 000 z frakcji mikrosomowej komórek aorty i sugerują, że już w kanałach siateczki śródplazmatycznej ziarnistej znajduje się ten bezpośredni prekursor elastyny. Tropoelastyna była jednak izolowana również z frakcji jądrowej, co może świadczyć, że w czasie procesu sedymentacji znajdowała się w większym kompleksie białkowym, a dopiero w czasie następnych etapów preparatyki nastąpiło jej odtrawienie z tego kompleksu proelastyny. Interpretacja taka jest bardzo prawdopodobna po opisaniu przez Mechana i wsp. [68] swoistej peptydazy, którą znajdowano we wszystkich frakcjach zawierających tropoelastynę.

Badania mikroskopowo - elektronowe [22, 88, 89] pozwoliły tylko na pewne sugestie dotyczące dróg transportu śródkomórkowego prekursorów elastyny. Poznano natomiast mechanizm przechodzenia tropoelastyny w elastynę. Ten zachodzący pozakomórkowo proces jest uwarunkowany powstawaniem wiązań krzyżowych [1, 25, 38, 72, 75, 51]. Wiązania krzyżowe powstają pomiędzy zbliżonymi do siebie cząsteczkami tropoelastyny oraz wewnątrzcząsteczkowo, a ich liczba jest wykładnikiem dojrzałości włókna sprężystego [34]. Gallop i Paz [29] podają, że w dojrzałej elastynie w wiązania krzyżowe zaangażowane jest 38 reszt lizynowych spośród 47 obecnych w łańcuchu peptydowym elastyny o długości 1000 reszt. Początkowym etapem tworzenia wiązań jest dezaminacja reszt lizynowych [85], prowadząca do powstania delta semi - aldehydu kwasu alfa aminoadypionowego, tzw. allilizyny. Jest to proces katalizowany przez enzym oksydazę lizylową aktywowaną jonami miedzi. W reakcji tej jony miedzi nie tylko aktywują gotowy enzym, ale mają również wpływ na jego syntezę de novo, przyspieszając translację długo żyjącego m - RNA ko-

http://rcin.org.pl

dującego ten enzym [39]. Wykazano również, że kompleks oksydaza lizylowa - Cu^{++} jest bardziej oporny na działanie nieswoistych proteaz niż sam enzym [72].

W następnym etapie, prowadzącym do wytworzenia wiązań krzyżowych, dwie reszty aldehydowe allilizyny mogą połączyć się ze sobą drogą kondensacji aldolowej lub reagować z następną grupą E-aminową niezmienionej lizyny, tworząc wiązania aldoiminowe, co prowadzi do powstania trwałego wiązania — lizynonorleucyny. Produkt kondensacji aldolowej po odwodornieniu wchodzi również w reakcję z następną resztą lizynową kolejnego łańcucha polipeptydowego, tworząc układ zwany dehydro-merodesmozyną [76]. Układ ten może być zredukowany do merodesmezyny lub reagować z kolejną resztą wspomnianego już aldehydu, tworząc produkt, który po odszczepieniu cząsteczki wody i utlenieniu przechodzi w desmozynę. Połączenie produktu kondensacji aldolowej i dehydrolizynonorleucyny z jednoczesnym odłączeniem cząsteczki wody i utlenieniem prowadzi do powstania isodesmozyny [76]. Grupy aminowe i karboksylowe wspomnianych już desmozyn są zaangażowane w wiązania peptydowe różnych łańcuchów peptydowych elastyny. Desmozyna i izodezmozyna mogą stanowić punkty węzłowe pomiędzy dwoma, trzema lub czterema łańcuchami, merodesmozyna może łączyć dwa lub trzy, a lizynonorleucyna — dwa łańcuchy peptydowe. Wiązania poprzez lizynonorleucynę i merodesmozynę mogą powstawać również w obrębie tej samej cząsteczki, co zapewnia lepszą stabilizację odcinków helisy w cząsteczce elastyny.

Pierwszym morfologicznym wykładnikiem procesu formowania się włókien sprężystych jest pojawienie się gęstych elektronowo ziarenek glikoproteidu, ich liniowe układanie się i stopniowa polimeryzacja w mikrofibryle o średnicy ok. 11 nm [22]. Wydłużające się mikrofibryle przylegają początkowo ściśle do zagłębień błony komórkowej, a następnie tworzą równoległe wiązki, których układ nadaje kształt i kierunek przyszłych dojrzałych włókien sprężystych. Włókienka glikoproteidowe, mające charakter polianionu, obdarzone są dużym ujemnym ładunkiem elektrycznym, który może powodować odkładanie się na nich agregatów tropoelastyny wydzielonej z komórek [85]. Nie jest jednak wykluczone, że pierwszym czynnikiem — mającym wpływ na wzajemne oddziaływanie tych dwóch komponent włókna sprężystego — jest wytwarzanie mostków dwusiarkowych pomiędzy peptydem dodatkowym preoelastyny a glikoproteidami.

Niezależnie od nie wyjaśnionego jeszcze do końca mechanizmu pierwszych kontaktów pomiędzy glikoproteidami a elastyną, dalszym wykładnikiem morfologicznym dojrzewania włókien sprężystych jest łączenie się ze sobą licznych agregatów tropoelastyny, zakotwiczonych na wiązkach

http://rcin.org.pl

mikrofibryli, ich polimeryzacja i wytworzenie homogennego rdzenia włókna sprężystego, który oblepia i maskuje obecne w nim mikrofibryle. Paz i wsp. [76] opisali możliwość wciągania mikrowłókienek glikoproteidowych nawet pomiędzy łańcuchy peptydowe elastyny tworzącej homogenny rdzeń włókna.

Najczęstszym obiektem badań histologicznych, mikroskopowo - elektronowych i biochemicznych elastogenezy jest ściana aorty zawierająca dużą liczbę miocytów zaangażowanych w wytwarzanie włókien i błon sprężystych. Miocyty naczyniowe uważane są za komórki wieloczynnościowe, które oprócz funkcji skurczowych mają zdolność syntezy wielu składników substancji międzykomórkowej. W badaniach mikroskopowo - elektronowych [21, 53, 88, 95] udowodniono, że produkują one proteoglikany, kolagen oraz elementy strukturalne włókien sprężystych — elastynę i glikoproteidy w czasie normalnego wzrostu i różnicowania się ściany naczyniowej. Wykazano również, że miocyty znacznie zwiększają produkcję elementów substancji międzykomórkowej w miejscach mechanicznego uszkodzenia ściany naczyniowej, w nadciśnieniu [68] oraz w czasie formowania się blaszek miażdżycowych [43, 74, 87]. Komórki te podejmują syntezę substancji międzykomórkowej również w warunkach hodowli tkankowych i komórkowych [2, 21, 23, 44, 65, 71, 84].

HODOWLE KOMÓRKOWE JAKO MODEL DO BADANIA MORFOLOGII ELASTOBLASTÓW I PROCESÓW ELASTOGENEZY

Chcąc prześledzić najwcześniejsze etapy formowania się włókien sprężystych i sprawdzić możliwości elastotwórcze miocytów naczyniowych, obserwowano hodowle komórek, które zostały wyizolowane z błony środkowej aort przy użyciu kolagenezy i DNA - azy [44]. Prace potwierdziły wcześniejsze obserwacje [41, 42, 43, 65], że technika izolacji enzymatycznej miocytów naczyniowych pozwala na uzyskanie niezmienionych morfologicznie i w pełni sprawnych fizjologicznie komórek, oraz wykazały, że komórki aortalne przeniesione do hodowli szybko formują pojedynczą warstwę, a następnie tworzą hodowle wielopokładowe. Jest to istotna cecha różniąca te komórki od fibroblastów. Miocyty aortalne bowiem nie wykazują zjawiska zahamowania kontaktowego ruchu i mitoz. Przez cały czas trwania hodowli zachowują swą strukturę oraz intensywnie produkują substancję międzykomórkową bogatą we włókna sprężyste. Technika izolacji enzymatycznej pozwala na szybkie rozpoczęcie hodowli i wyeliminowanie długiego czasu (zwykle kilka tygodni), który potrzebny jest na migrację miocytów, jeżeli materiałem wyjściowym są fragmenty ściany naczyniowej [19, 79].

http://rcin.org.pl

Ogólny schemat elastogenezy obserwowanej w hodowli jest zbliżony do obserwowanego w czasie normalnego rozwoju zarodkowego aorty. Już w czwartym dniu hodowli w zagłębieniach błony komórkowej miocytów pojawiają się gęste elektronowo ziarenka, które układają się liniowo formując cienkie mikrofibryle o średnicy 10–12 nm (ryc. 1). W miarę agregacji liniowej globularnych podjednostek mikrofibryle wydłużają się, stają się coraz liczniejsze, tworząc małe wiązki rozgałęzione na końcach, które następnie odsuwają się od błony komórkowej i w następnym stadium zostają oblepione przez konglomeraty gęstej elektronowo elastyny. Konglomeraty elastyny są amorficzne lub składają się z ziarenek o średnicy ok. 20 nm.

Wydłużaniu się włókna zawsze towarzyszy najpierw wydłużanie się mikrofibryli, a dopiero potem oblepianie ich przez elastynę. W starszych, 10 - i 28 - dniowych hodowlach centralne części włókien wykazują słabszy nieco kontrast niż części obwodowe zawierające nowo wydzieloną z komórki elastynę. Obserwacje hodowli miocytów aortalnych potwierdzają wcześniejsze badania autoradiograficzne całej ściany naczyniowej [88], wykazujące, że miocyty są komórkami odpowiedzialnymi za produkcję wszystkich elementów substancji międzykomórkowej obecnych w błonie środkowej aorty.

Należy zaznaczyć, że przedstawiony model jest bardzo przydatny do obserwacji wszystkich etapów powstania włókien sprężystych oraz może być użyty do badania wpływu określonych związków na ten proces, jak np. thorotrastu i cholesterolu (patrz dalej). Wydaje się, że w przyszłości może być on użyty do testowania leków mających punkt uchwytu w komórkach ściany naczyniowej.

PRZESZCZEPY IZOLOWANYCH MIOCYTÓW JAKO MODEL DO BADANIA ELASTOGENEZY

Hinek i wsp. [45] wykazali, że następnym dogodnym modelem do badania procesów produkcji włókien sprężystych są przeszczepy izolowanych miocytów. Komórki izolowane enzymatycznie z aort 5 - dniowych szczurów i przeszczepione następnie w układzie allogenicznym zachowują również zdolność produkcji substancji międzykomórkowej, co powoduje w miejscu wstrzyknięcia (mięsień języka) powstawanie charakterystycznej tkanki przypominającej błonę środkową aorty płodowej. Tkanka ta zawiera głównie komórki mięśni gładkich otoczone przez sieć włókien kolagenowych, włókna sprężyste, grudki wolnej elastyny, mikrofibryle oraz ziarna proteoglikanów (ryc. 2). Stosując znakowanie wstrzykiwanych komórek thorotrastem (koloidalna zawiesina cząsteczek dwu-

http://rcin.org.pl

tlenku toru włączana do fagolizosomów), wykazano wyraźnie, że powstała po wstrzyknięciu izolowanych komórek tkanek jest wytworem tych właśnie komórek, a nie lokalnych lub naciekowych komórek gospodarza.

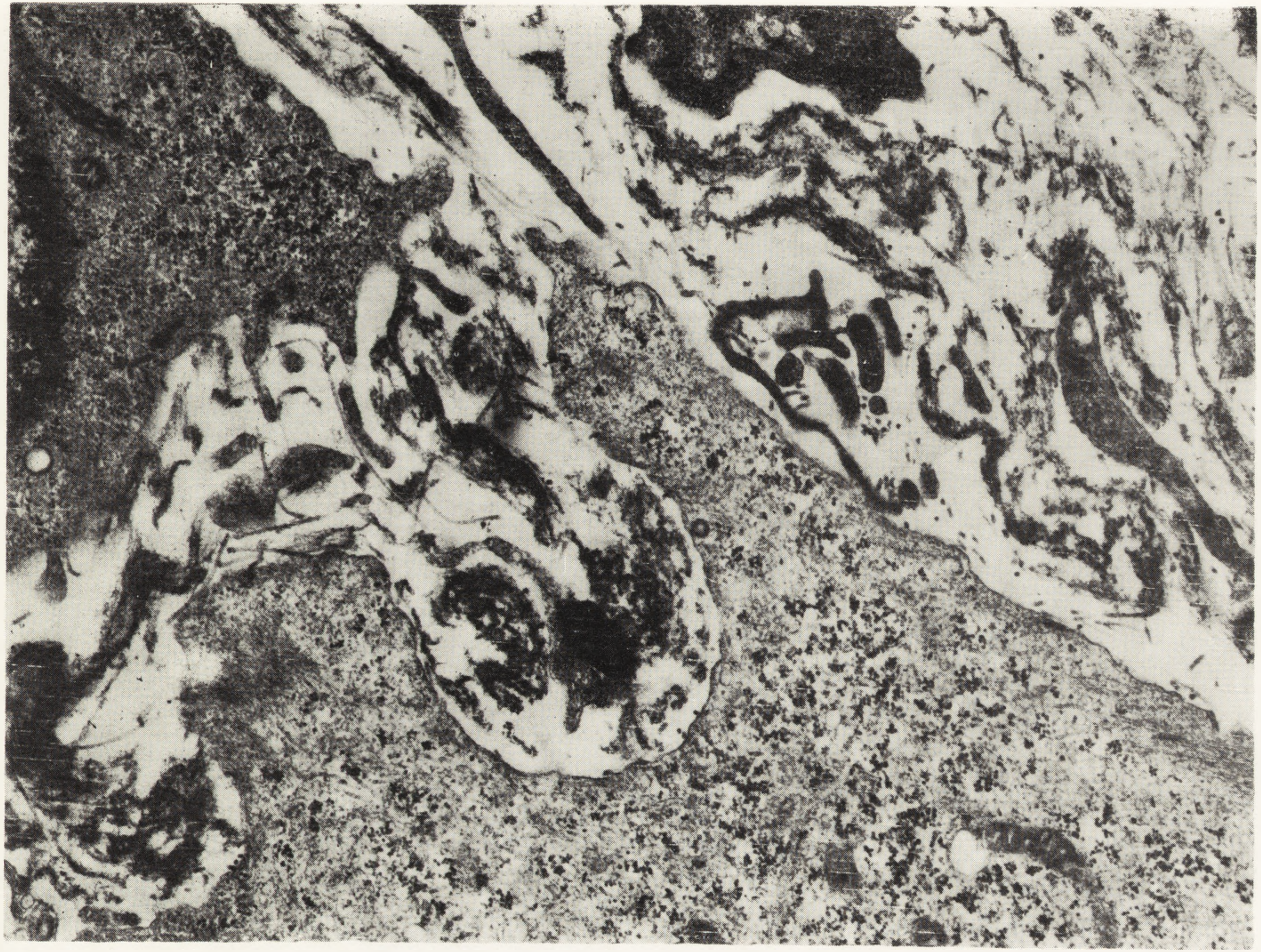
Ogólny schemat formowania włókien sprężystych w przestrzeni pozakomórkowej przez przeszczepione miocyty jest identyczny ze schematem elastogenezy opisanym w hodowli komórkowej. Wydaje się jednak, że układ przeszczepów pozwala na produkcję większej ilości elastyny i innych elementów substancji międzykomórkowej niż hodowle komórkowe w porównywalnych okresach czasowych. Przeszczepy pozwalają na dokładne prześledzenie wszystkich etapów elastogenezy i mogą być wykorzystywane do badań morfologii i funkcji miocytów naczyniowych. W przyszłości mogą być również przydatne do badań nad wpływem określonych substancji (leków, hormonów, substancji toksycznych, związków atherogennych) w warunkach pozwalających na wyeliminowanie czynników hemodynamicznych, którymi stymulowane są miocyty w normalnej ścianie naczyniowej.

ELASTOGENEZA NA TERENIE CHRZĄSTKI SPRĘŻYSTEJ

Aby wyciągnąć bardziej ogólne wnioski, dotyczące morfologii elastoblastów i procesów elastogenezy, prześledzono również hodowle i przeszczepy izolowanych chondrocytów chrząstki sprężystej [100]. Komórki te izolowane enzymatycznie [54] zachowywały swą charakterystyczną strukturę oraz zdolności produkcyjne elementów substancji międzykomórkowej de novo zarówno w warunkach in vitro, jak i in vivo. Chondrocyty w warunkach hodowli komórkowej szybko tworzą początkowo jedno-, a później wielowarstwową hodowlę, co różni je od hodowli izolowanych chondrocytów chrząstki szklistej formujących hodowle jednowarstwowe. Chondrocyty chrząstki sprężystej nie wykazują więc zjawiska zahamowania kontaktowego ruchu i miotz, podobnie jak to opisano w przypadku hodowli miocytów aortalnych. Można więc przypuszczać, że brak zahamowania kontaktowego stanowi wspólną cechę elastoblastów. Chondrocyty przez cały czas trwania hodowli zachowują swą chrakterystyczną ultrastrukturę. Mają dobrze rozwiniętą siateczkę śródplazmatyczną ziarnistą i aparat Golgiego liczne małe pęcherzyki, z których część zawiera gęsty elektronowo materiał podobny do elastyny, dobrze rozwinięty system mikrofilamentów łączących się ciałami ciemnymi, agregaty ziaren glikogenu i wakuole lipidowe w cytoplazmie.

Obecność często bardzo licznych mikrofilamentów identycznych z opisanymi filamentami aktynowymi sprawiała, że niektóre chondrocyty chrząstki szklistej, obecne zarówno w hodowli jak w przeszczepach, przy-

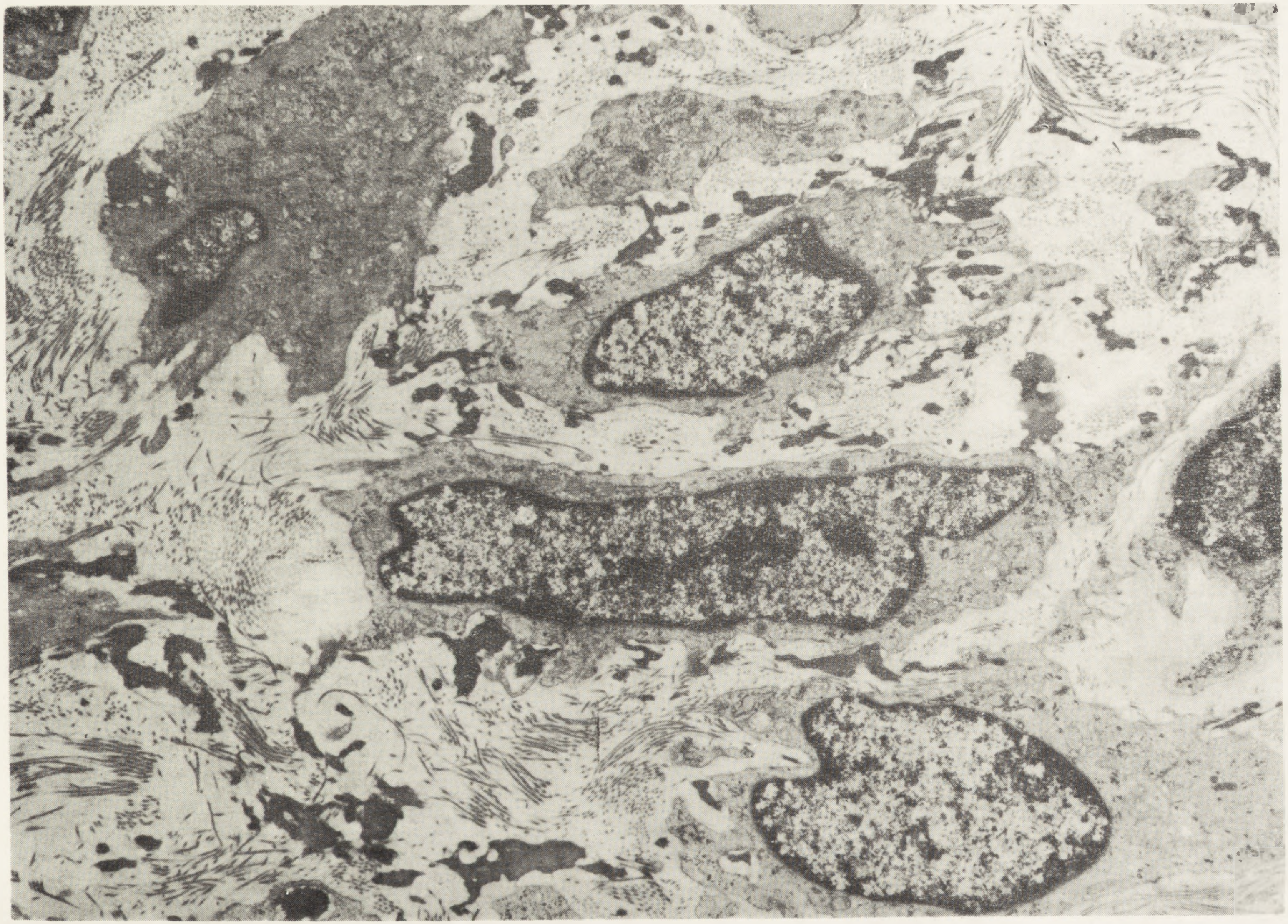
http://rcin.org.pl



Ryc. 1. Fragment 10-dniowej hodowli izolowanych miocytów aorty szczura

Widoczne fragmenty cytoplazmy dwóch sąsiednich komórek oraz produkowana przez te komórki substancja międzykomórkowa zawierająca pojedyncze włókna kolagenowe i liczne włókna sprężyste. × 26 000

http://rcin.org.pl



Ryc. 2. Tkanka powstała w mięśniu języka szczura w dwa tygodnie po przeszczepieniu izolowanych miocytów aorty
Widoczne liczne miocyty otoczone substancją międzykomórkową bogatą we włókna kolagenowe i dojrzałe włókna sprężyste. × 8 0000

http://rcin.org.pl

Ryc. 3. Fragment błony środkowej aorty 5-dniowego szczura

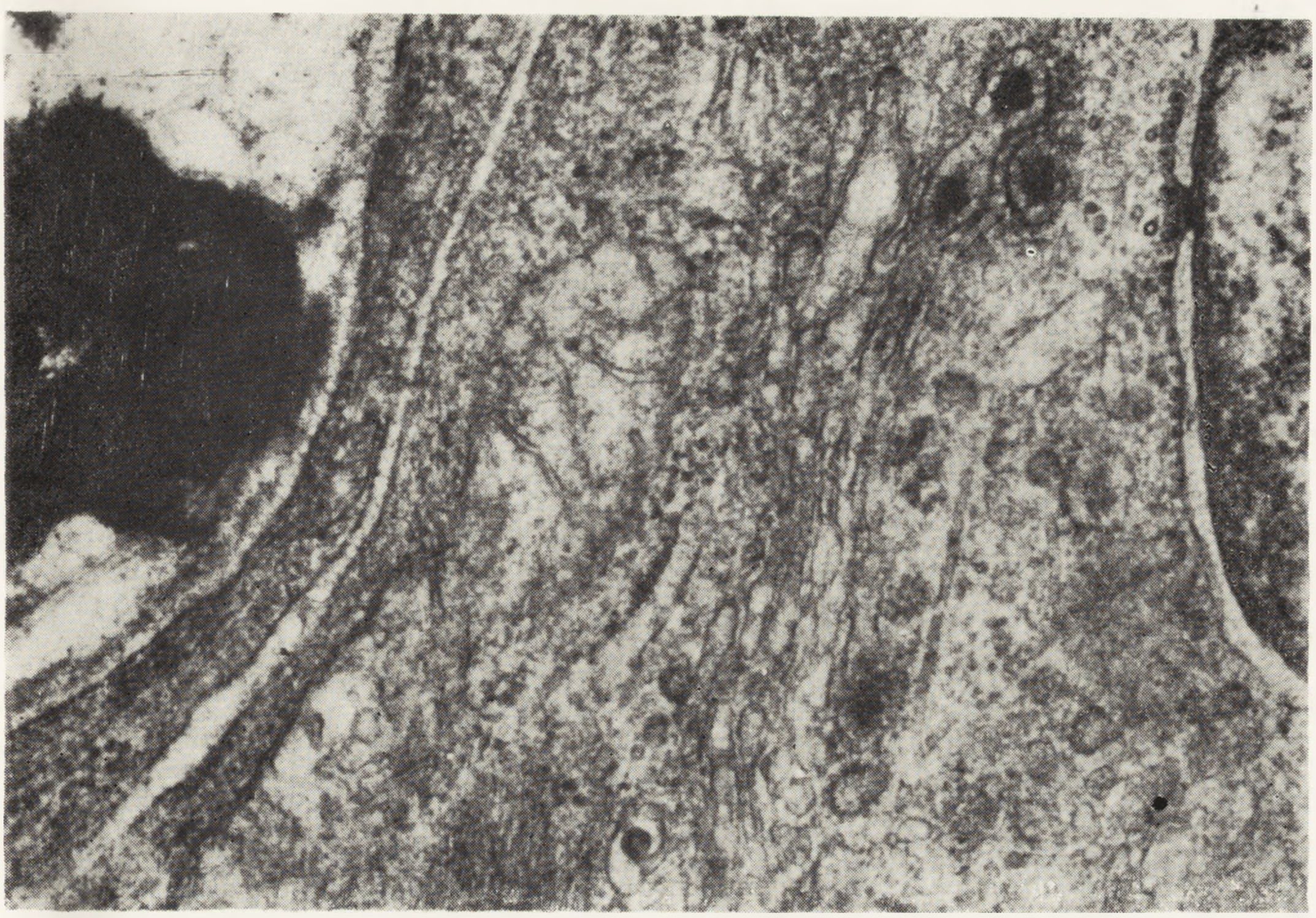
Materiał utrwalony w aldehydzie glutarowym i czterotlenku osmu, zatopiony w vestopalu i kontrastowany octanem uranylu i cytrynianem ołowiu. Na zdjęciu widoczne są miocyty rozdzielone błonami sprężystymi zawierającymi przezierną elektronowo elastynę. × 25 000

http://rcin.org.pl

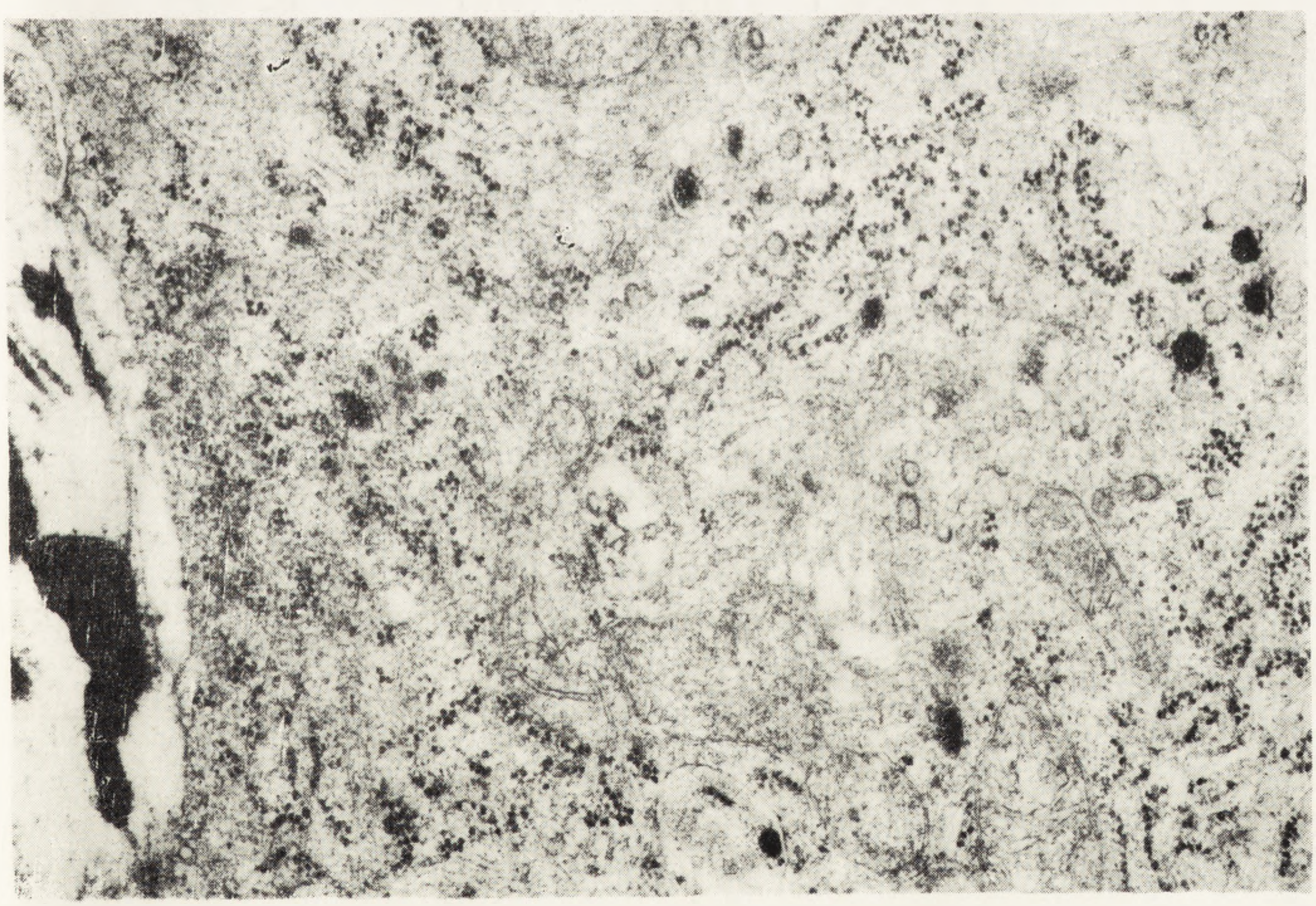
Ryc. 4. Fragment błony środkowej z tej samej aorty

Materiał podobnie utrwalony i kontrastowany jak na zdjęciu nr 3, ale zatopiony w środowisku Spurra o niskim stopniu lepkości, co pozwala na uzyskanie dużej gęstości elektronowej elastyny obecnej w błonach sprężystych. × 20 000

http://rcin.org.pl

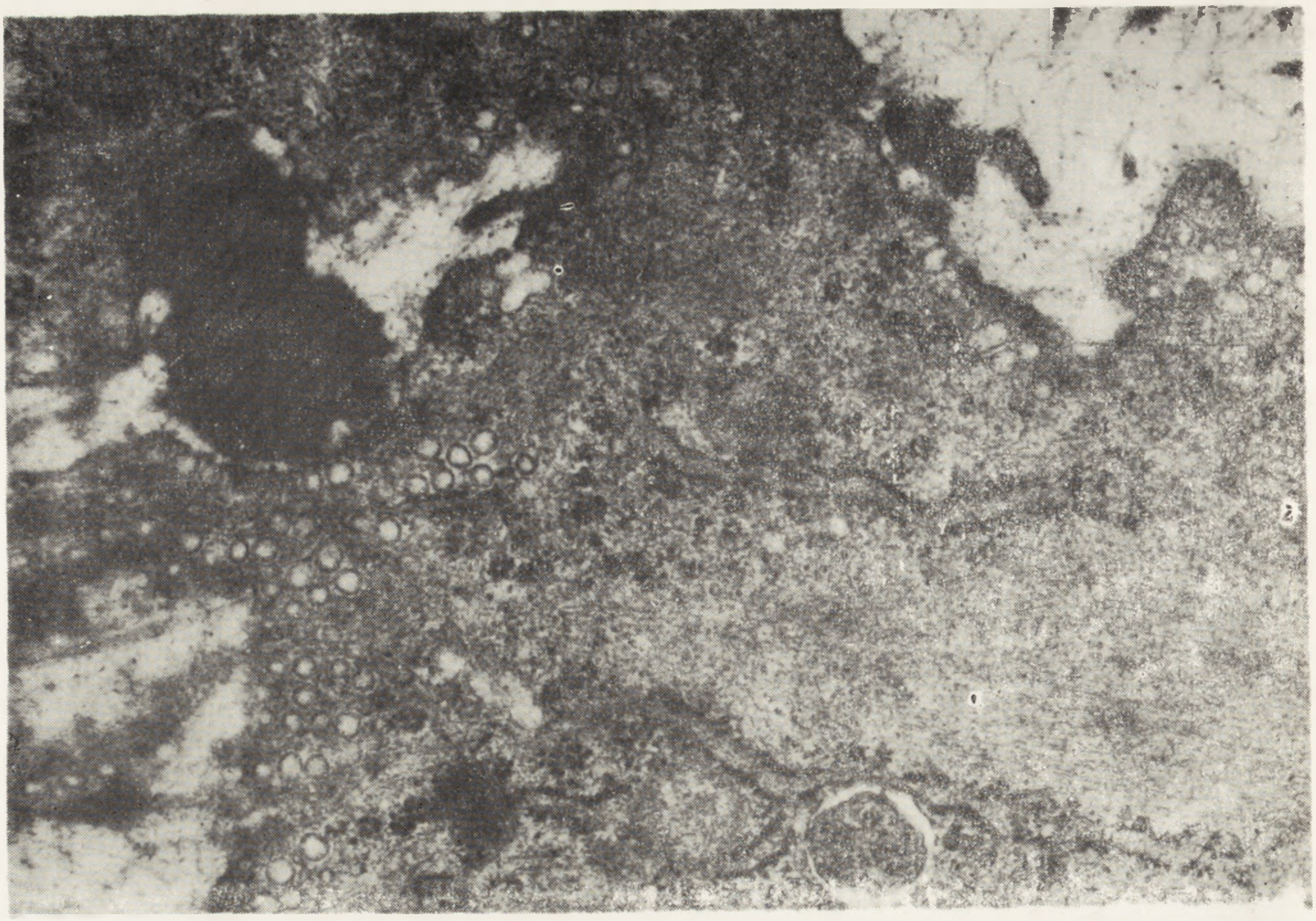


Ryc. 5. Fragment cytoplazmy miocyta błony środkowej aorty 5-dniowego szczura
W cysternach aparatu Golgiego widoczny gęsty elektronowo materiał podobny do leżącej w przestrzeni zewnątrzkomórkowej elastyny włókien sprężystych. × 59 000



Ryc. 6. Liczne pęcherzyki w cytoplazmie miocyta błony środkowej aorty szczura zawierające gęsty elektronowo elastynopodobny materiał, × 43 000

http://rcin.org.pl

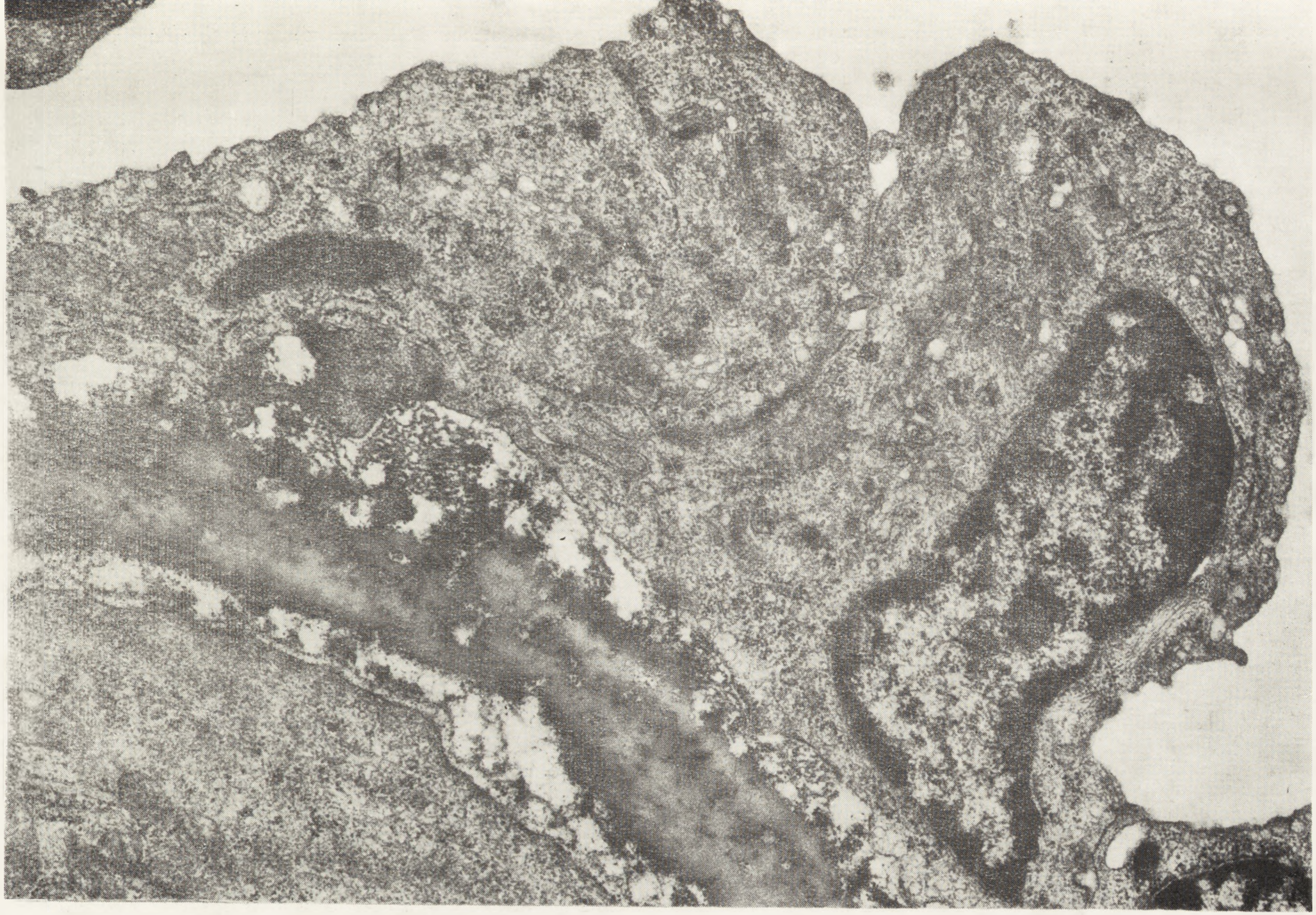


Ryc. 7. Część obwodowa cytoplazmy miocyta przeszczepionego do mięśnia języka szczura

Pod błoną komórkową widoczne liczne przezierne elektronowo pęcherzyki. Widoczne otwieranie się tych pęcherzyków do przestrzeni międzykomórkowej w miejscu formowania się włókna sprężystego (lewy róg zdjęcia). W miejscu tym widoczne jest również charakterystyczne zgrubienie błony komórkowej. × 46 000

Ryc. 8. Liczne przezierne elektronowo pęcherzyki oraz gęste elektronowo zgrubienia błony komórkowej miocyta tętnicy językowej szczura przylegające do nowo powstających błon sprężystych zawierających gęstą elektronowo elastynę. × 46 000

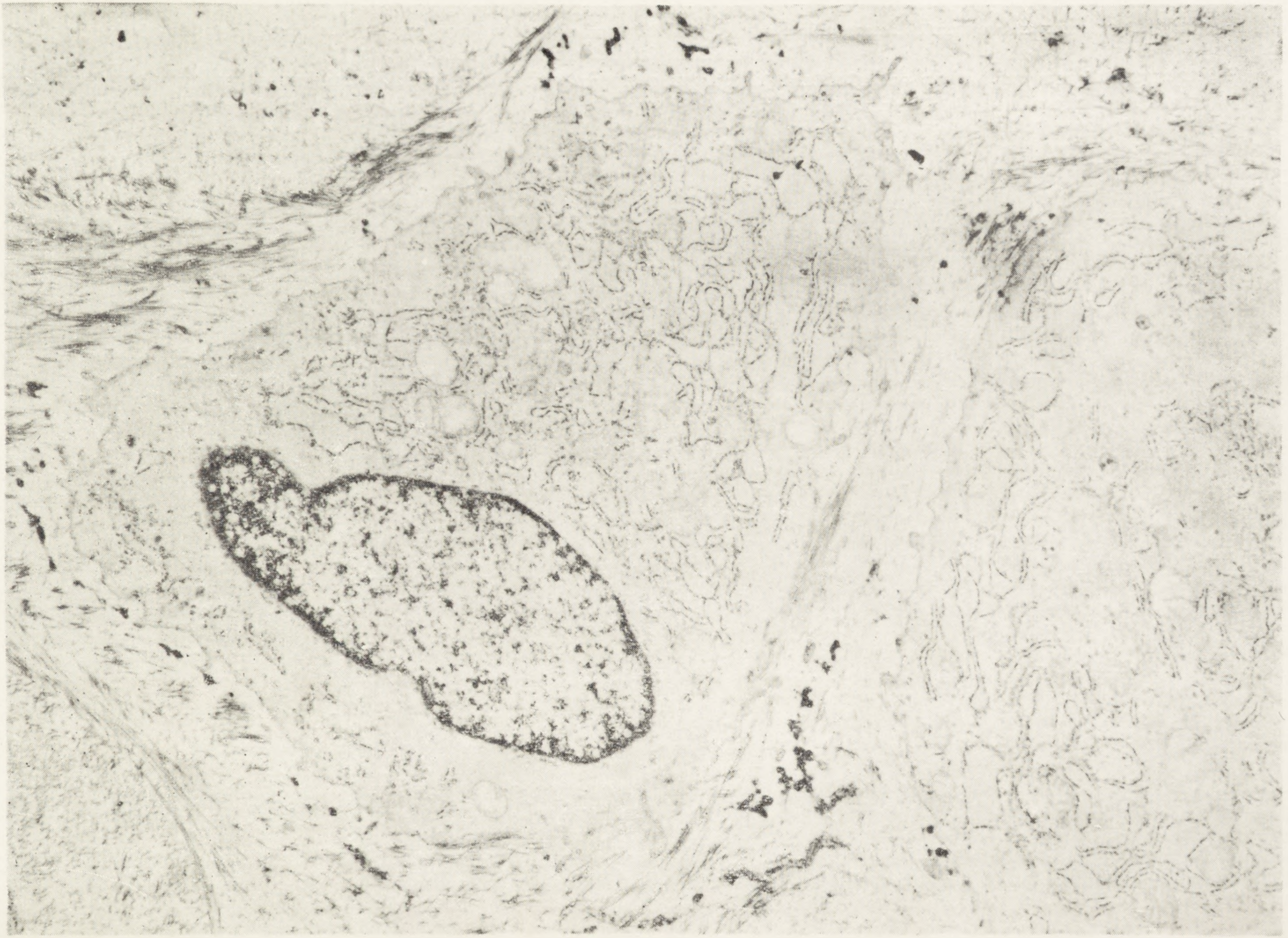
http://rcin.org.pl



Ryc. 9. Komórki śródbłonka 5-dniowego szczura zawierające w swej cytoplazmie pęcherzyki gęstego elektronowo elastynopodobnego materiału oraz charakterystyczne zgrubienia błony komórkowej przylegające do grudek elastyny dołączających się do błony sprężystej wewnętrznej

Centralna część błony sprężystej zawierająca dojrzałą elastynę jest mniej gęsta elektronowo niż nowo wydzielone z komórki grudki elastyny obecne na obwodzie błony. × 32 000

http://rcin.org.pl



Ryc. 10. Fragment chrząstki sprężystej powstałej w dwa tygodnie po przeszczepieniu izolowanych chondrocytów
W części centralnej widoczny chondrocyt oraz otaczająca go nowo powstająca torebka złożona z grudek gęstej elektronowo elastyny i licznych włókien kolagenowych. × 7 600

http://rcin.org.pl

pominają bardzo miocyty aortalne. Wydaje się, że obecność licznych wiązek mikrofilamentów jest jeszcze jedną cechą charakterystyczną komórek produkujących prekursory włókien sprężystych. Podobne wiązki mikrofilamentów opisali poprzednio Ross i Bornstein w cytoplazmie fibroblastów więzadła karkowego, komórek również intensywnie produkujących włókna sprężyste.

Komórki chrząstki sprężystej w hodowli, jak i przeszczepach szybko otaczają się substancją międzykomórkową bogatą we włókna kolagenowe nie mające prążkowania, wielokątne ziarenka wytworzone przez agregaty proteoglikanów, ziarna i grudki młodej elastyny oraz włókna sprężyste na różnych etapach ich dojrzewania.

Włókna sprężyste powstające w hodowli są morfologicznie identyczne z tymi powstającymi w przeszczepach oraz tymi obecnymi w skrawkach normalnej chrząstki sprężystej, z której izolowano komórki (ryc. 10). W hodowlach jest ich znacznie mniej niż w przeszczepach w porównywalnych okresach czasowych, co z jednej strony świadczyć może o niemożliwości odwzorowania w hodowli wszystkich warunków obecnych w organizmie in vivo, ale z drugiej strony nieco rzadsza substancja międzykomórkowa chrząstek powstających w hodowli pozwala na precyzyjne prześledzenie etapów formowania się włókien sprężystych. Sekwencja procesów elastogenezy w komórkach chrzęstnych w opisanych warunkach doświadczalnych zarówno in vitro, jak i in vivo przedstawia się w zasadzie podobnie, jak w przypadku komórek naczyniowych. Należy zaznaczyć, że elementy sprężyste chrząstki mają znacznie mniej mikrofibryli glikoproteidowych niż podobne struktury w aorcie. Grudki elastyny agregują tu głównie na cienkich włóknach kolagenowych, które stają się integralnym składnikiem błon sprężystych tworzących torebki chondrocytów.

TRUDNOŚCI W BADANIU ELASTOGENEZY

Pomimo dokładnych opisów dotyczących pozakomórkowego formowania się włókien sprężystych, nie ma dotychczas dokładnych danych dotyczących dróg transportu śródkomórkowego i wydzielania prekursorów włókien sprężystych z cytoplazmy miocytów naczyniowych i innych elastoblastów. Jednym z powodów trudności w badaniach procesów produkcji i wydzielania elastyny jest brak swoistych znaczników różniących elastynę od innych białek produkowanych przez te same komórki. Wyniki badań autoradiograficznych [88], określających lokalizację znakowanych izotopami aminokwasów najliczniej występujących w tym białku, tylko w przybliżeniu (ze względu na zbyt małą zdolność rozdzielczą tej metody) sugerują drogi wydzielania prekursorów elastyny z komórek.

http://rcin.org.pl

Wyniki analiz biochemicznych poszczególnych frakcji komórkowych wykazują, że prekursory elastyny znajdują się w kilku frakcjach i trudno jest tą drogą wnioskować o najwcześniejszych etapach elastogenezy. Jak dotychczas istnieją tylko przesłanki dotyczące mechanizmów, które powodują przekształcenie się proelastyny w tropoelastynę — bezpośredni prekursor elastyny obecnej we włóknach sprężystych.

Nie znane są również etapy syntezy i wydzielania glikoproteidów formujących mikrofibryle oraz wzajemne zależności między tym białkiem a prekursorami elastyny w procesach transportu śródkomórkowego. Dokładne badanie procesów elastogenezy utrudnia również fakt, że dotychczas nie przedstawiono techniki przygotowania preparatów dla celów mikroskopii elektronowej pozwalającej na wybiorcze uwidocznienie prekursorów włókna sprężystego w ich drodze przez komórkę. Większość rutynowo stosowanych technik mikroskopowych nie pozwala także na uzyskanie wysokiego kontrastu elastyny leżącej pozakomórkowo [22, 40, 41, 65, 78, 86, 95]. Jedyna metoda wybiórczego kontrastowania włókien sprężystych za pomocą siarczanu tetrafenyloporfiryny sprzężonengo z jonami srebra, opisana przez Alberta i Fleischera [3], jest złożona i jak dotychczas stosowana była tylko w ośrodku reprezentowanym przez tych autorów. Metoda ta pozwala na uzyskanie wysokiego kontrastu elastyny pozakomórkowej; nie kontrastuje jednak jej prekursorów leżących wewnątrzkomórkowo. Kontrast dojrzałej elastyny można wzmocnić nieswoiście kwasem fosforowolframowym, hematoksyliną żelazistą [9, 10, 51], a także kwasem taninowym [14, 28, 93]. Metody te jednak nadają również dużą gęstość elektronową kolagenowi i innym struktorom obecnym w substancji międzykomórkowej, co sprawia, że są one mało przydatne w badaniu wczesnych etapów elastogenezy. Dlatego ostatnio poszukuje się prostych metod, które pozwoliłyby na uzyskanie dobrego kontrastu elastyny nawet przy rutynowym przygotowaniu preparatów dla celów mikroskopii elektronowej, a tym samym na lepsze śledzenie procesów elastogenezy i rozszerzenie wiedzy o patogenezie chorób wciągających tkankę sprężystą.

PROSTE TECHNIKI POZWALAJĄCE NA UZYSKANIE DOBREGO KONTRASTU ELASTYNY

Badania przeprowadzone przez Thyberga, Hinka i Friberga [101] miały na celu wypracowanie optymalnych technik przygotowania preparatów aorty do mikroskopu elektronowego. Poczynione obserwacje wykazały, że przy rutynowym utrwalaniu skrawków w buforowym aldehydzie glutarowym i czterotlenku osmu kontrastowanie elastyny przez octan uranylu i cytrynian ołowiu jest uzależnione głównie od rodzaju

http://rcin.org.pl

środowiska, w którym zatopiono tkankę. W materiale zatopionym w vestopalu i eponie elementy sprężyste są słabo kontrastowe (ryc. 3). Dopiero zastosowanie środowiska Spurra o niskim stopniu lepkości [96] pozwala na uzyskanie bardzo wysokiego kontrastu obu składników włókna sprężystego (ryc. 4) Środowisko to pozwala na uwidocznienie nawet bardzo małych grudek elastyny leżących pozakomórkowo oraz małych pęcherzyków leżących we wnętrzu komórek, które zawierają materiał o identycznej gęstości elektronowej. Dojrzałe włókna, zawierające elastynę o dużej ilości wiązań krzyżowych, kontrastują się nieco słabiej niż materiał wewnątrzkomórkowy i elastyna (prawdopodobnie dopiero wydzielona) leżąca najbliżej komórek (ryc. 9). Wysoki kontrast elementów sprężystych w tkance zatopionej w środowisku Spurra uzyskuje się również, stosując kontrastowanie tylko octanem uranylu, zastosowanie zaś tylko cytrynianu ołowiu nie daje dostatecznego kontrastu elementom włóknistym substancji międzykomórkowej. W chwili obecnej trudno o bardzo ścisłą interpretację mechanizmów kontrastowania elastyny przez metale ciężkie po zatopieniu tkanki w środowisku Spurra. Wydaje się jednak, że to środowisko, dzięki niskiej lepkości, lepiej niż epon i vestopal przenika tkankę sprężystą o zbitej strukturze, a tym samym pozwala później na lepszą penetrację polarnych cząsteczek środka kontrastującego pomiędzy bardzo ciasno ułożone łańcuchy elastyny [34, 35].

Sposób utrwalenia tkanki nie ma zasadniczego wpływu na kontrastowość elastyny, bowiem w materiale zatopionym w środowisku Spurra włókna sprężyste wykazują dobry kontrast zarówno po utrwaleniu tkanek tylko w aldehydzie glutarowym, jak i po utrwaleniu ich tylko w czterotlenku osmu rozpuszczonym w wodzie redestylowanej. Stwierdzono również, że krótkie trawienie elastazą znacznie zwiększa gęstość elektronową rdzeni elastynowych dojrzałych włókien sprężystych. To zjawisko może być wynikiem rozrywania wiązań krzyżowych elastyny przez ten enzym i odsłaniania chwytników dla metali ciężkich. Podobne zjawisko zwiększenia kontrastowości elastyny po trawieniu elastazą obserowali Kadar i wsp. [52], którzy sugerowali, że wzmocnienie kontrastu dojrzałych włókien sprężystych po ich nadtrawieeniu elastazą jest — wynikiem mukolitycznego działania tego enzymu. Elastaza miałaby tu usuwać polisacharydy maskujące powierzchnię włókien.

Działanie kwasu taniowego w czasie utrwalania lub między wtórnym utrwalaniem a odwadnianiem znacznie zwiększa kontrastowość tkanek zatopionych w środowisku Spurra, nadając szczególnie wysoką gęstość elektronową elastynie i błonom komórkowym. Kwas taninowy zwiększa tu kontrastowość elastyny nawet wtedy, gdy nie stosuje się osmu, a materiał zatapia w eponie. Zjawisko zwiększenia kontrastu elastyny po zastosowaniu kwasu taniowego opisywali Simonescu i Simonescu [93],

http://rcin.org.pl

uważając, że najlepszy efekt wzmocnienia kontrastu uzyskuje się stosując kwas taniowy po uprzednim utrwaleniu tkanek w aldehydzie glutarowym i czterotlenku osmu, bowiem kwas taninowy ma według tych autorów działać jako czynnik garbujący, ułatwiający wiązanie struktur wysomowanych z cząsteczkami ołowiu. Obecnie potwierdzono to zjawisko [101] w odniesieniu do struktur błoniastych, zauważono jednak, że wzmocnienie kontrastu elastyny przez działanie kwasu taninowego uzyskuje się również wtedy, gdy nie stosuje się osmu jako utrwalacza. Podobny efekt uzyskuje się również w tkankach kontrastowanych tylko octanem uranylu. Wydaje się więc, że mechanizm działania kwasu taninowego na elastynę jest odmienny niż na struktury błoniaste. Być może zależy on również od zwiększenia ujemnego ładunku elastyny impregnowanej kwasem, co ułatwia wiązanie kationowych środków kontrastujących. Należy zaznaczyć jednak, że ze względu na dość trudną dyfuzję kwasu taniowego w tkankach należy stosować bardzo małe fragmenty tkanek. Podsumowując rozważania metodyczne, należy stwierdzić, że nawet proste metody przygotowawcze pozwalają na wzmożenie kontrastu określonego elementu morfotycznego, a tym samym na lepszą niż dotychczas czytelność preparatów ściany naczyniowej. Wysoka gęstość elektronowa elastyny w preparatach zatapianych w środowisku Spurra pozwala na implikacje dotyczące mechanizmów wydzielanie tego białka z komórki. Metoda ta okazała się również w pełni przydatna dla kontrastowania elementów sprężystych chrząstki.

ŚRÓDKOMÓRKOWA LOKALIZACJA PREKURSORÓW ELASTYNY

Stosując opisane wyżej techniki oraz wybrane reakcje histochemiczne, można było prześledzić etapy formowania się elementów sprężystych w aorcie. Obserwując aorty 5 - cio dniowych szczurów szczepu Sprague--Dawley stwierdzono we wszystkich trzech podstawowych typach komórek naczyniowych obecność kulistych pęcherzyków o średnicy około 100–300 nm, które są otoczone pojedynczą błoną i zawierają materiał o gęstości elektronowej podobnej do gęstości grudek młodej elastyny leżącej w przestrzeni pozakomórkowej (ryc. 5 i 6). Pęcherzyki te są najliczniejsze w komórkach mięśni gładkich. Występują również w niektórych komórkach śródbłonka (ryc. 9) i fibroblastach przydanki leżących najbliżej błony środkowej.

Podobne pęcherzyki obserwuje się także w miocytach aortalnych w hodowli i po ich przeszczepieniu [44, 45]. Wydaje się, że są one pęcherzykami wydzielniczymi niosącymi prekursory włókna sprężystego, ponieważ:

http://rcin.org.pl

zawierają materiał o gęstości elektronowej identycznej z gęstością elektronową młodej elastyny leżącj pozakomórkowo;

są widoczne tylko w preparatach, w których procedury przygotowawcze pozwalają na kontrastowanie nowo wydzielonej elastyny leżącej pozakomórkowo;

podobnych pęcherzyków nie obserwuje się w komórkach tkanki łącznej nie produkujących włókien sprężystych (chondrocyty chrząstki szkistej, fibroblasty ścięgien i osteoblasty) nawet po zastosowaniu wszystkich wspomnianych już procedur;

materiał o gęstości elektronowej młodej elastyny obserwuje się w zewnętrznych cysternach aparatu Golgiego i jego wakuolach, a także w pęcherzykach leżących w pobliżu tego organelum, a część pęcherzyków niosących gęsty elektronowo materiał wykazuje aktywność pyrofosfatazy tiaminowej, enzymu markerowego dla aparatu Golgiego;

pęcherzyki te, choć często leżą w pobliżu lizosomów i przypominają je morfologicznie, nie wykazują aktywności fosfatazy kwaśnej enzymu markerowego dla lizosomów, a także nie mają kontaktu z wakuolami fagocytarnymi i pinocytarnymi, które łatwo zidentyfikować za pomocą obecności egzogennych makrocząsteczek torotrastu i peroksydazy chrzanowej;

pęcherzyki te nie są również pochodnymi błony komórkowej, bowiem nie wykazują aktywności fosfatazy zasadowej.

Wydaje się również, że w komórkach aorty istnieje odrębny system pęcherzyków i wakuoli wydzielniczych dla elastyny i kolagenu. Opisane pęcherzyki, niosące gęsty elektronowo elastyno-podobny materiał, różnią się bowiem od wakuoli leżących w cytoplazmie tych samych komórek zawierających w swym wnętrzu włóknisto-ziarnisty materiał przypominający tropokolagen. Wakuole, niosące prekursory kolagenu obecne w komórkach aorty, są podobne do wakuoli wydzielniczych w komórkach kostniny [33] oraz w produkujących kolagen komórkach nabłonka rogówki [103]. Wakuole te grupują się często w okolicy aparatu Golgiego, ale nie wykazują aktywności pyrofosfatazy tiaminowej ani fosfatazy kwaśnej. Widuje się je czasem w obwodowych częściach cytoplazmy, gdzie komunikują się z przestrzenią pozakomórkową i posiadają aktywność fosfatazy zasadowej.

DROGI WYDZIELANIA PREKURSORÓW ELASTYNY Z KOMÓRKI

Przedstawione obserwacje sugerują udział aparatu Golgiego w procesach wydzielania prekursorów elastyny z komórek naczyniowych (ryc. 5). Są one zgodne z sugestiami wysuniętymi przez Rossa i Klebanoffa

http://rcin.org.pl

[88] w badaniach autoradiograficznych błony środkowej aorty oraz ze schematem wydzielania białek z komórek tkanki łącznej przedstawionym przez Paladea [73]. Obserwując ścianę naczyniową aorty młodych szczurów oraz hodowle i przeszczepy izolowanych miocytów aortalnych wydaje się, że w komórkach naczyniowych istnieje jednak więcej niż jedna droga wydzielania prekursorów elastyny. Wspomniane gęste elektronowo pęcherzyki obserwuje się również w znacznym oddaleniu od aparatu Golgiego, często tuż pod błoną komórkową (ryc. 6 i 9), oraz widuje się ich oddzielanie od zewnętrznych kanałów siateczki śródplazmatycznej ziarnistej. Ponieważ pęcherzyki o tej lokalizacji nie mają aktywności pyrofosfatazy tiaminowej, wydaje się więc, że reprezentują one inną drogę wydzielania prekursora elastyny, prawdopodobnie bezpośrednio z miejsca syntezy, z pominięciem aparatu Golgiego.

Ciekawym spostrzeżeniem, mogącym sugerować następną drogę wydzielania prekursorów elastyny z komórki, jest fakt, że w większości miocytów i w niektórych komórkach śródbłonka, przy ich wewnętrznej powierzchni obserwuje się charakterystyczne odcinkowe zgrubienia błony komórkowej (ryc. 7 i 8) oraz agregację ziarnistego, gęstego elektronowo materiału. Zgrubienia takie występują zwykle w miejscach przylegających do grudek elastyny i nowo formujących się włókien sprężystych w przestrzeni międzykomórkowej. Leżący wewnątrzkomórkowo ziarnisty, gęsty elektronowo materiał, przypominający ziarna pozakomórkowej elastyny, wydaje się wychodzić spomiędzy mikrofilamentów i mikrotubuli szczególnie licznych w tych rejonach cytoplazmy. Być może więc, że pewna część produkowanego przez komórkę prekursora elastyny po opuszczeniu siateczki śródplazmatycznej przesuwa się poprzez cytoplazmę podstawową wzdłuż mikrofilamentów i mikrotubuli w kierunku błony komórkowej, jest następnie przejściowo wcielana w jej układ strukturalny (zgrubienia) i stopniowo wydzielana na zewnątrz w postaci małych, gęstych elektronowo ziarenek. Założenie takie jest wysoce prawdopodobne, elastyna bowiem ma w swej strukturze rejony hydrofobowe, którymi mogłaby oddziaływać z lipidami błony komórkowej [37, 38, 90]. Powinowactwo młodej elastyny do związków lipidowych jest zjawiskiem opisywanym przez wielu autorów [25, 83, 84, 87, 95]. Prekursor elastyny, przesuwający się w formie nie otoczonej błoną, może być również syntetyzowany na polirybosomach, których agregaty są szczególnie liczne w obwodowym rejonie miocytów naczyniowych. Taki sposób syntezy i wydzielania elastyny wydaje się być szczególnie intensywny w miocytach o słabiej rozwiniętej siateczce śródplazmatycznej ziarnistej.

Rozważając drogi śródkomórkowego transportu prekursorów elastyny nie sposób pominąć przezierne elektronowo pęcherzyki, które są

http://rcin.org.pl

również liczne w rejonach obwodowych cytoplazmy miocytów przylegających do nowo powstających włókien sprężystych (ryc. 7 i 8). Często obserwuje się otwieranie takich pęcherzyków do przestrzeni pozakomórkowej (ryc. 7). Pęcherzyki te nie zawierają znaczników egzogennych, co wydaje się świadczyć przeciwko traktowaniu ich jako pęcherzyki plazmolemmalne czy pinocytarne. Zakładając, że pęcherzyki takie mogą również przenosić prekursor elastyny, założyć jednocześnie należy, że prekursor taki niesiony jest na ich błonie i dlatego światło pęcherzyków jest przezierne elektronowo lub też, że prekursor znajduje się we wnętrzu pęcherzyka, ale nie kontrastuje się. Za pierwszą sugestią przemawiać może fakt, że niektóre z omawianych pęcherzyków, zwłaszcza w preparatach osmowanych i traktowanych kwasem taninowym, mają pogrubiałe i bardziej gęste elektronowo błony. Przyjmując zaś, że prekursor znajduje się we wnętrzu pęcherzyka, ale nie kontrastuje się, można założyć, że jest to inny prekursor niż elektronowo gęsta zawartość pęcherzyków i zgrubień błon komórkowych zbliżonych morfologicznie do nowo wydzielonej elastyny — tropoelastyny. Prekursorem niekontrastującym się mogłaby być proelastyna, która dopiero po oddzieleniu dodatkowego peptydu przechodziłaby w gęstą elektronowo tropoelastynę. Przytoczono tu rozważania, sugerujące równoległe wydzielanie proelastyny i tropoelastyny, mogą potwierdzać wyniki badań biochemicznych wykazujących obecność proelastyny i tropoelstyny w tych samych frakcjach komórkowych [50, 97, 98].

Ostateczne jednak wykazanie dróg wydzielania prekursorów elastyny wymaga dalszych zintegrowanych badań biochemicznych i morfologicznych. Na podstawie obecnego stanu wiedzy trudno wypowiedzieć się co do dróg wydzielania glikoproteidów formujących pozakomórkowe mikrofibryle włókna sprężystego. Ponieważ zarówno w czasie rozwoju aorty, jak i w hodowli i przeszczepach izolowanych miocytów zauważono, że mikrofibryle pojawiają się wcześniej niż elastyna, można przypuszczać, że ich prekursory wydzielane są oddzielnie od prekursorów elastyny.

ROLA KOMÓREK ŚRÓDBŁONKA W TWORZENIU ELEMENTÓW SPRĘŻYSTYCH

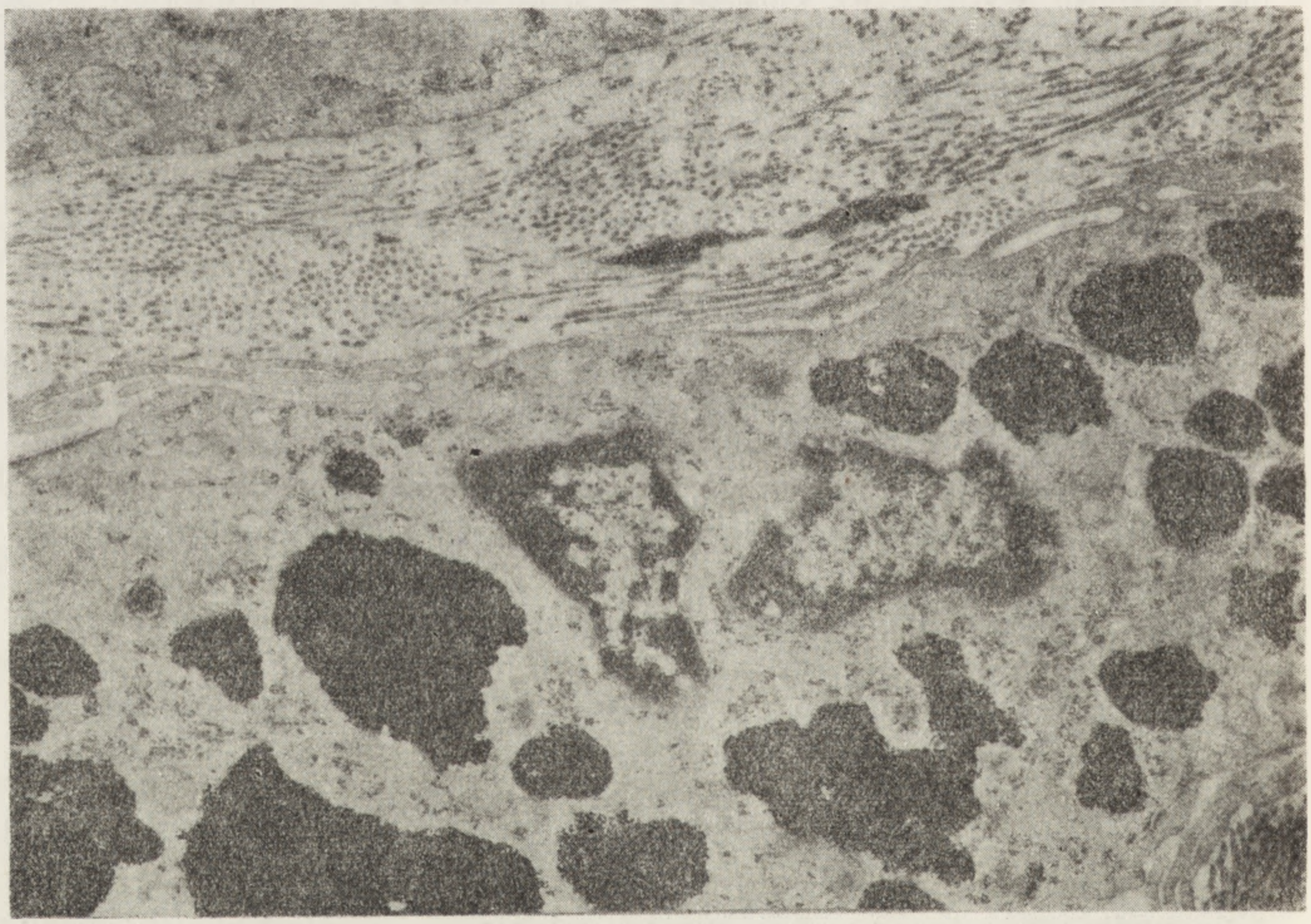
Omawiając procesy elastogenezy na terenie ściany naczyniowej, należy podkreślić, że obecność gęstego elektronowo, elastynopodobnego materiału obserwowano również w komórkach śródbłonka aorty, co wydaje się przemawiać za udziałem tych komórek w tworzeniu błony sprężystej tętnic (ryc. 9). Komórki te w niektórych miejscach przylegają bardzo ściśle do błony sprężystej wewnętrznej, a często można zauważyć

http://rcin.org.pl

już opisane zgrubienia błony komórkowej oraz otwieranie się małych pęcherzyków na ich powierzchni zwróconej do tej błony oraz agregaty mikrofibryli i grudek elastyny w ich zagłębianiach lub wokół ich wypustek. Komórki te morfologiczne są również podobne do miocytów gładkich ze względu na zawartość filamentów w cytoplazmie dobrze rozbudowaną siateczką śródplazmatyczną ziarnistą i aparat Golgiego. Wydaje się więc, że przynajmniej część komórek śródbłonka może być również zaliczona do grupy komórek tworzących włókna sprężyste — elastoblastów.

WPŁYW TOROTRASTU NA PROCESY PRODUKCJI WŁÓKIEN SPRĘŻYSTYCH

Obserwując tkanki powstałe po przeszczepach izolowanych miocytów i chondrocytów chrząstki sprężystej, inkubowanych przed przeszczepieniem z torotrastem, zauważono, że są one bogate we włókna kolagenowe i ziarna proteoglikanów, natomiast zawierają znikomą liczbę



Ryc. 11. Miocyt zawierający liczne wakuole wypełnione ziarnami gęstego elektronowo torotrastu

Substancja międzykomórkowa otaczająca komórkę zawiera bardzo liczne włókna kolagenowe i tylko pojedyncze, cienkie włókno sprężyste. Jest to fragment tkanki powstałej w dwa tygodnie po przeszczepieniu miocytów aorty inkubowanych z torotrastem. × 18 0000

http://rcin.org.pl

elementów sprężystych (ryc. 11) w porównaniu z przeszczepami komórek nie inkubowanych z tym związkiem [45, 100]. W przeszczepach takich elastyna pojawiała się głównie w pobliżu komórek zawierających w swych fagolizosomach pojedyncze ziarna torotrastu. Elastyny nie obserwowano w pobliżu komórek zawierających liczne wakuole gęsto wypełnione torotrastem. W komórkach obserwowano zmniejszanie się liczby wakuoli zawierających torotrast wraz z czasem trwania przeszczepów. Ponieważ nie obserwowano tych egzogennych cząstek w przestrzeni pozakomórkowej przeszczepu ani w komórkach gospodarza otaczających przeszczep, wydaje się, że u podstawy tego zjawiska leży rozdzielanie się pęcherzyków niosących torotrast pomiędzy komórki potomne powstające po podziale komórek wszczepionych [11, 102].

Torotrast wyraźnie interferował z procesami tworzenia włókien sprężystych. Komórki zawierające ten związek posiadały bowiem tylko znikomą liczbę pęcherzyków niosących prekursory tych włókien. Gromadzenie dużej ilości wakuoli fagocytarnych, wypełnionych niemożliwym do strawienia materiałem, może interferować z aktywnością wydzielniczą komórki, na przykład przez zaangażowanie dużej ilości jednostek błoniastych, które mogłyby być użyte przy formowaniu pęcherzyków wydzielniczych. Działanie torotrastu wydaje się być wybiórcze, bowiem inkubacja miocytów w zawiesinie cholesterolu — związku, który również pobudza tworzenie fagolizosomów — nie ma wpływu na jakość substancji międzykomórkowej powstającej w warunkach hodowli. Zaobserwowanie hamującego wpływu torotrastu na elastogenezę może przyczynić się również do wyjaśnienia patogenezy zmian chorobowych u ludzi, którzy otrzymali ten związek. Torotrast — koloidalna zawiesina cząsteczek dwutlenku toru — był bowiem używany jako środek kontrastowy w klinice człowieka między rokiem 1938 a 1955, kiedy to stwierdzono jego działanie rakotwórcze i wycofano definitywnie z użycia. Przez cały jednak następny okres, aż do dnia dzisiejszego, ukazują się doniesienia o występowaniu nowotworów u pacjentów, którzy kilkanaście lat przedtem przechodzili badania przy użyciu torotrastu. Opisywane są nowotwory wątroby o typie carcinoma hepato i cholangiocelulare, białaczki i mięsaki kości [12, 16, 17, 18]. Opisano również częstsze występowanie marskości wątroby, anemii aplastycznej, ogniskowego rozmiękania mózgu, a ostatnio również i zmiany dotyczące naczyń krwionośnych [49].

Zmiany w naczyniach, opisane przez Isnera i wsp. [49], dotyczyły guzów składających się z komórek zawierających ziarna torotrastu (Thorotrastoma) wychodzących z przydanki i błony środkowej naczyń w miejscu wstrzyknięcia torotrastu przed kilkunastoma laty oraz zmian odległych od miejsca wstrzyknięcia, takich jak włóknienie rozległe ścian

http://rcin.org.pl

i przegrody międzykomórkowej serca, powstawanie zwłókniałych blaszek miażdżycowych zamykających światło naczyń oraz zmian o typie angiosarcoma. Opisano również powstanie licznych zmian miażdżycowych u królików w cztery miesiące po wstrzyknięciu torotrastu [50].

Zmiany naczyniowe miały przede wszystkim charatker włóknisty, zawierały głównie włókna kolagenowe, a mechanizm ich powstania nie został jednak wyjaśniony. Rakotwórcze działanie torotrastu próbowano tłumaczyć jego działaniem radiacyjnym. Schemat teoretyczny rozpadu dwutlenku toru przewiduje powstanie 11 radioaktywnych izotopów, które emitują cząstki alfa. Nie jest to jednak wyjaśnienie wystarczające. Wiadomo bowiem, że większość zmian nowotworowych, indukowanych przez promieniowanie radioaktywne, pojawia się wcześniej po napromieniowaniu niż zmiany indukowane przez torotrast, które powstają w 15–30 lat po wstrzyknięciu tego związku. Być może, niezależnie od efektu promieniotwórczego, torotrast blokuje powstanie nowych włókien sprężystych, podczas gdy stare ulegają procesowi naturalnego powolnego rozpadu. Jeżeli w tym czasie doszło do transformacji nowotworowej komórek (np. pod wpływem efektu radiacyjnego), to z chwilą rozluźnienia bariery, jaką stanowią włókna sprężyste, komórki te mogą łatwiej migrować. Podobny proces zachodzi przy inicjacji procesu miażdżycowego, kiedy to opłaszczone przez lipidy włókna sprężyste zostają nadtrawiane przez elastazę i nieswoiste proteazy, co ułatwia migrację miocytów z błony środkowej do okolicy podśródbłonkowej.

Hipoteza ta wymaga oczywiście licznych badań, ale ma związek z obserwacjami Hornebecka i wsp. [47] sugerującymi, że w wielu guzach łagodnych i rakach sutka dochodzi do intensywnego tworzenia włókien sprężystych. W rakach sutka dochodzi również do szybkiego rozpadu włókien sprężystych, co sugeruje, że elastyna może być tu czynnikiem ograniczającym rozrost i migrację nowotworu, a przewaga procesów rozpadu włókien sprężystych nad procesami ich tworzenia może być czynnikiem ułatwiającym migrację komórek nowotworowych. Rozpad włókien sprężystych obecnych w guzach sutka jest zależny od działania elastazy, która produkowana jest przez naciekające leukocyty lub przez same komórki guza [47]. Przytoczone tu fakty i sugestie są jeszcze jednym czynnikiem stymulującym do badań nad biologiczną rolą włókien sprężystych.

ELASTOLIZA

Jedną z ważnych cech biologicznych elastyny jest jej oporność na działanie większości enzymów proteolitycznych oraz oporność wobec kwasów i soli występujących w tkankach. Te cechy sprawiają, że elastyna uważana jest za białko „długożyjące", a metabolizm elastyny — za bardzo wolny w zdrowych taknkach [23, 55].

http://rcin.org.pl

Badając tkanki zmienione patologicznie zauważono, że w niektórych schorzeniach (miażdżyca, cukrzyca, rozedma płuc, zapalenie trzustki i rak sutka) [47] dochodzi do nadtrawienia i rozpadu włókien sprężystych. Enzymem, który swoiście trawi elastynę jest elastaza — proteaza wyizolowana po raz pierwszy przez Balo i Banga w 1948 r. z wyciągu trzustki (wg [8]).

W późniejszych latach opisano również elastazę obecną w leukocytach, makrofagach, płytkach krwi i niektórych bakteriach [81]. Elastaza obecna jest także w normalnej surowicy krwi, ale w formie nieczynnej, bowiem w surowicy znajdują się też naturalne inhibitory elastazy, takie jak np. białko o ciężarze 120 000 z frakcji alfa$_2$ globulinowej [67]. Badając mechanizm działania elastazy stwierdzono, że zbliżenie tego enzymu do elastyny następuje na drodze oddziaływania elektrostatycznego [53]. Elastaza jest polikationem, a elastyna ma charakter polianionu. Wykazano również, że szereg związków, jak sole żółciowe, kwasy tłuszczowe, które mogą być zaabsobowane na elastynie, powoduje zwiększanie jej anionowego ładunku, przez co czyni elastynę bardziej podatną na działanie elastazy. Wykazano również, że czynnikiem wywołującym rozerwanie wiązań krzyżowych elastyny są również promienie ultrafioletowe [58], ale dotychczas nie wiadomo, czy mechanizm ten ma jakieś znaczenie w warunkach ustrojowych.

Mechan i wsp. [61, 62] opisali enzym proteolityczny o podobnej specyficzności jak trypsyna, którego aktywność wykryto w wielu próbkach zawierających „czystą" tropoelastynę. Enzym ten jest białkiem o ciężarze cząsteczkowym 45 000, optimum jego działania przypada w pH 7–9. Dzieli on tropoelastynę na pepytydy o ciężarze 57 000, 45 000, 36 000, 25 000 i 14 000. Biologiczna rola tego enzymu, towarzyszącego tropoelastynie, nie jest jeszcze do końca określona, ale autorzy przypuszczają, że bierze on udział w normalnych procesach katabolizmu tropoelastyny, trawiąc te jej cząsteczki, które nie weszły w wiązania krzyżowe.

STANY PATOLOGICZNE OBEJMUJĄCE ELEMENTY SPRĘŻYSTE

Badania podstawowe, dotyczące strutkury i funkcji elementów sprężystych, pozwoliły na wyjaśnienie podstawowych mechanizmów wielu procesów chorobowych obejmujących tkankę łączną bogatą w te struktury. Zmiany patologiczne dotyczące włókien sprężystych pojawiają się w niektórych wrodzonych zespołach chorobowych, mogą również wystąpić pod wpływem wielu czynników endo- i egzogennych. Do schorzeń dziedzicznych, w których dochodzi do trwałych zaburzeń włókien sprężystych, należą: zespół Marfana, zespół Ehlers-Danlosa i pseudoxanthoma elasticum. To ostatnie schorzenie charatkeryzuje się zespołem zmian

http://rcin.org.pl

klinicznych, takich jak utrata elastyczności skóry i powstawanie charakterystycznych guzków skóry oraz licznych zmian w ścianie naczyń tętniczych doprowadzających do zamykania się ich światła, lokalnych wylewów i zakrzepów [20]. Badając biopsje skóry od pacjentów z pełnym zespołem objawów oraz ich najbliższych krewnych, ustalono, że dochodzi tu do odkładania się soli wapniowych w obrębie włókien sprężystych, które zawierają znacznie mniejszą niż normalnie liczbę mikrofibryli, a elastyna nie tworzy dostatecznej liczby wiązań poprzecznych [20]. W zespole Ehlers-Danlosa dochodzi do sytuacji odwrotnej klinicznie — wzmożonej sprężystości tkanek przy jednoczesnym spadku ich wytrzymałości. Ustalono, że wprawdzie pierwotnym objawem jest tu brak dojrzewania kolagenu ze względu na niedobór enzymu peptydazy tropokolagenu, ale dochodzi również do zastępczego gromadzenia się w tkankach znacznych ilości elastyny [57].

Nadmierna elastyczność wiązadeł, zwichnięcia soczewki oka, tętniaki rozwastwiające aorty, nieprawidłowy wzrost kośćca i arachnodactylia stanowią kliniczne objawy zespołu Marfana, którego przyczyną jest również genetycznie uwarunkowane zaburzenie dojrzewania włókien sprężystych.

Ze schorzeń nabytych, które dotyczą zaburzeń rozwoju białek włóknistych kolagenu i elastyny, najbardziej znany jest latyryzm — zespół objawiający się zaburzeniami wzrostu i łamliwością kośćca, osłabieniem więzadeł, ścięgien, powięzi i skóry, a także wieloogniskowymi zmianami naczyniowymi doprowadzającymi do powstania tętniaków. Zespół ten występuje pod wpływem częstego spożywania pokarmu bogatego w rośliny z rodzaju grochowatych (*Lathyrus*) zawierających kilkanaście związków upośledzających syntezę włókien (tzw. latyrogeny). Najbardziej znanym latyrogenem jest beta-amino-propionitryl [69, 91]. Związek ten blokuje enzym oksydazę lizylową i utrudnia reakcję kondensacji aldolowej w procesie tworzenia się wiązań krzyżowych kolagenu i elastyny [5]. Podobna sytuacja zachodzi w homocystynurii [60].

Uszkodzenia elementów sprężystych, objawiające się zmianami naczyniowymi i powstawianiem tętniaków, występują również podczas długotrwałego niedoboru miedzi w organizmie [24, 25, 91]. U zwierząt doświadczalnych, żywionych dietą nie zawierającą jonów miedzi, obserwuje się spadek aktywności oksydazy lizylowej, co prowadzi do upośledzonego powstawania wiązań krzyżowych elastyny, odkładania się w tkankach grudek tropoelastyny i upośledzania funkcji włókien sprężystych.

Podobne efekty opisywano po zatruciu zwierząt związkami chelatującymi — penicylaminą i EDTA wiążącymi obecne w tkankach jony miedzi niezbędne do aktywacji oksydazy lizylowej.

http://rcin.org.pl

Uszkodzenie elementów sprężystych opisano tak w czasie naturalnej, jak i doświadczalnej rozedmy płuc [59, 107]. W schorzeniu tym dochodzi do fragmentacji, zcienienia, skręcenia i zmiany przestrzennej orientacji włókien sprężystych obecnych w przegrodach międzypęcherzykowych, w naczyniach płucnych i opłucnej, co powoduje spadek elastyczności tkanki płucnej i prowadzi do znanego zespołu klinicznego. Istnieją sugestie, że czynnikiem pierwotnym uszkadzającym elementy sprężyste płuc w tym schorzeniu jest elastaza leukocytów [59]. Uszkodzenie błon i włókien sprężystych małych naczyń tętniczych opisano także w chorobie Bürgera. W schorzeniu tym wykryto krążące przeciwciała skierowane przeciw elastynie [48]. Wykazano także, że zaburzenia metabolizmu elastyny są jednym z najistotnniejszych procesów prowadzących do formowania się blaszek miażdżycowych w naczyniach [24, 56, 83, 87]. Elastyna, tworzona na terenie błony wewnętrznej przez migrujące do niej komórki mięśni gładkich, różni się składem aminokwasów od elastyny syntetyzowanej w tętnicach nie poddanych działaniu czynników wywołujących miażdżycę. Elastyna blaszek miażdżycowych zawiera więcej aminokwasów polarnych, takich jak kwas glutaminowy, kwas asparaginowy, arginina, histydyna, treonina, seryna i lizyna. Obniżeniu zaś ulega zawartość lizynonorleucyny, desmozyny i izodesmozyny, co świadczy o zmniejszeniu tworzenia wiązań krzyżowych w powstającej elastynie. Jednocześnie zauważono, że taka niepełnowartościowa elastyna zdolna jest do wiązania znacznych ilości związków lipidowych, głównie beta-lipoproteidów, fosfolipidów i trójglicerydów, a także cholesterolu i jego esterów. Znamienne jest, że ponad 1/3 cholesterolu obecnego w rozwiniętych blaszkach miażdżycowych związana jest z elastyną [24, 56, 83]. Prowadzi to do zmiany struktury przestrzennej tego białka, co sprawia, że kompleksy takie stają się bardziej podatne na działanie elastazy, a także nieswoistych proteaz, co w konsekwencji prowadzi do zmian wstecznych w ścianie naczyniowej i utraty jej normalnej sprężystości.

LITERATURA

[1] ABRAHAM P. A., HART M. L, SMITH D. W., CARNES W. H., Biosynthesis of lysine derived elastin crosslinks in aortic cell in culture, Biochem. Biophys. Res. Commun., **67**: 723–727, 1975.

[2] ABRAHAM P. A., HART M. L., WINGLE A. R., CARNES W. H., The biosynthesis of elastin by aortic medial cell culture, Adv. Exp. Med. Biol., **79**: 397–412, 1977.

[3] ALBERT E., FLEISCHER E., A new electron dense stain for elastic tissue, J. Histochem. Cytochem., **18**: 697–718, 1970.

http://rcin.org.pl

[4] ANDERSON J. C.; Microfibrils of elastic fibers, Int. Rev. Conn. Tiss. Res., **7**: 285–290, 1976.
[5] ARDELT W., Biochemia latyryzmu. Post. Biochem., **11**: 413–426, 1965.
[6] BARNES M. J., PARTRIGE M. S., The isolation and characterisation of a glycoprotein from human thoracic aorta, Biochem J., **199**: 883–891, 1968.
[7] CARMICAEL G. G., FLUMER H. M., The fine structure of oxytalan fiber, J. Cell Biol., **28**: 33–36, 1966.
[8] BANGA I., Structure and function of elastin and collagen, Akademia Kiado, Budapest, 1966.
[9] BRISSIE R. M., SPICER S. S., HALL B. J., THOMPSON N. T., Ultrastructural staining of thin section with iron hematoxylin., J. Histochem. Cytochem., **22**: 895–907, 1974.
[10] BRISSIE R. M., SPICER S. S., THOMPSON N. T., The variable fine structure of elastin visualized with Verhoeff's hematoxylin, Anat. Rec., **181**: 83—94, 1974.
[11] BRUNK U., Distribution and shifts of ingested marker particles in residual bodies and other lisosomes, Exp. Cell. Res., **79**: 15–27, 1973.
[12] BLOMBERG R., LARSON L. E., LINDEL B., Late effects of thorotrast in cerebral angiography, Ann. N. Y. Acad. Sci., **145**: 853–859, 1976.
[13] CASTELANI I., VOLPIN D., Isolation of two peptides from elastin, Biochim. Biophys. Acta, **371**: 299–303, 1974.
[14] COTTA - PEREIRA G., RODRIGO F. G., DAVID - FERREIRA J. F., The use of tannic acid - glutaraldehyde in the study of elastic and elastic - related fibers, Stain Technol., **51**: 7–11, 1976.
[15] — The elastic system fibers, Adv. Exp. Med. Biol., **79**: 19–30, 1977.
[16] DAHLGREN S., Effects of locally deposited colloidal thorium dioxide, Ann. N. Y. Acad. Sci., **145**: 786–799, 1967.
[17] DA SILVA HORTA J., CAYOLLA DA MOTTA L., TAVARES M. H., Thorium dioxide effects in man, Environ. Res., **8**: 131–143, 1974.
[18] DA SILVA HORTA J., Effects of colloidal thorium dioxide extravasates in the subcutaneus tissue in man, Ann. N. Y. Acad. Sci., **145**: 776–785, 1967.
[19] DAUD S. A., FRITZ K. E., SINGH J., AUGUSTYN J. M., JARMOLYCH J., Production of mucopolisaccharides, collagen and elastic tissue by aortic medial explants, Adv. Exp. Med. Biol., **43**: 281–298, 1974.
[20] DANIELSEN L., KOBAYASI T., LARSON H. M., MIOLTGAARD K., CHRISTENSEN H. F., Pseudoxanthoma elasticum, a clinico - pathological study, Acta Dermatovener., **50**: 355–362, 1970.
[21] FERRIS B., SALCEDO L. L., COOK V., JOHNSON L., FOSTER J. A. FRANZBLAU C., The synthesis of connective tissue protein in smooth muscle cells, Biochim. Biophys. Acta., **418**: 93–103, 1976.
[22] FAHRENBACH W. H., SANDBERG L. B., CLEARY E. G., Ultrastructural studies on early elastogenesis, Anat. Rec., **155**: 563–572, 1966.
[23] FISCHER G. M., Dynamics of collagen and elastin metabolism in rat aorta, J. Appl. Physiol., **31**, 527–530, 1971.
[24] FRANZBLAU C., Elastin, [w:] Comprehensive Biochemistry, red. M. Florkin i C. H. Stolz, wyd. Elsev. Publ. Co., Amsterdam, London, New York, t. **26**, 659–712, 1971.
[25] FRANZBLAU C., FOSTER J. A., FARRIS B., Role of crosslinking in fiber formation, Adv. Exp. Med. Biol., **79**: 313–327, 1977.
[26] FOSTER J. A., MECHAM R., IBERMAN M., FARRIS B., FRANZBLAU C.,

http://rcin.org.pl

A high molecular weight species of soluble elastin - proelastin, Adv. Exp. Mel. Biol., **79**: 351–369, 1977.

[27] FULMER H. M., LILLIE R. D., The oxytalan fiber, J. Histochem. Cytochem., **6**: 425–434, 1958.

[28] FUTAESAKU Y., MIZUHIRA V., NAKAMURA H., The new fixation method using tannic acid for electron microscopy and some observations of biological specimens, Prc. Int. Cngr. Histochem. Cytochem., **4**: 155–156, 1972.

[29] GALLOP P. M., PAZ M. A., Posttranslational protein modifications with special attention to collagen and elastin, Physiol. Rev., **55**: 418–486, 1975.

[30] GAWLIK Z., Morphological and morphochemical properties of the elastic system in the motor organ of man, Folia Histochem. Cytochem., **3**: 233–244, 1965.

[31] GREENLE T. K., ROSS R., HARTMAN J. L., The fine structure of elastic fibers, J. Cell. Biol., **30**: 59–71, 1966.

[32] GOSLINE J. M., The physical properties of elastic tissue, Int. Rev. Conn. Tiss. Res., **7**: 211–249, 1976.

[33] GOTHLIN G., ERICSSON J. L. E., Electron microscopic studies of cytoplasmic filaments and fibers in different cell types of fracture calus rat, Virchows Arch., B. Zellpath., **6**: 24–37, 1970.

[34] GOTTE L., The ultrastructural organisation of elastin, Ultrastr., Res. **46**: 23–33, 1974.

[35] — Recent observations on the structure and composition of elastin, Adv. Exp. Med. Biol., **79**: 105–117, 1977.

[36] GRAY W., SANBERG J. A., FOSTER A., Molecular model for elastin structure and function, Nature, **246**: 461–466, 1973.

[37] GRAY W. R., Some kinetic aspects of crosslinks biosynthesis, Adv. Exp. Med. Biol., **79**: 285–290, 1977.

[38] — Molecular model for elastin, Adv. Exp. Med. Biol., **79**: 291–298, 1977.

[39] HARRIS E. D., RAYTON J. K., DE GROT J. E., A critical role for copper in aortic elastin structure and synthesis, Adv. Exp. Med. Biol., **79**: 543–559, 1977.

[40] HAUST M. D., MORE R. H., MOVAT H. Z., Role of smooth muscle cells in the fibrinogenesis of arteriosclerosis, Am. J. Pathol., **37**: 377–389, 1960.

[41] HINEK A., Badania nad morfologią i niektórymi parametrami metabolizmu komórek izolowanych ze ścian aorty i naczyń wieńcowych, Praca doktorska, AM, Warszawa 1973.

[42] HINEK A., KONWIŃSKI M., Ultrastructure of cell isolated from aortas of newborn and adult rabbits, Pol. Med. Scienc. Hist. Bull., **15**: 9–22, 1975.

[43] HINEK A., ROSNOWSKI A., Comparison of morphology of isolated cells obtained from aortas of normal and cholesterol - fed rabbits, Paroi Arteriel - Arterial Wall., **3**: 17–30, 1975.

[44] HINEK A., THYBERG J., Electron microscopic observations on the formation of elastic fibers in primary cultures of aortic smooth muscle cells, J. Ultrastruct. Res., **60**: 12–20, 1977.

[45] HINEK A., THYBERG J., FRIBERG U., Heterotropic autotransplantation of isolated aortic cells, An electron microscopical study, Cell Tissue Res., **172**: 59–79, 1976.

[46] HOROBIN R. W., TOMLINSON A., The influence of emmbeding medium wheen staining for electron microscopy: the penetration of stains into plastic sections, J. Microscopy, **108**: 69–78, 1976.

http://rcin.org.pl

[47] HORNEBECK W., ROBERT L., Elastase - like enzymes in aortas and human breast carcinomas, Quantitative variations with age pathology, Adv. Exp. Med. Biol., **79**: 145–164, 1977.
[48] HORSCH A. K., Antielastin antibodies in thrombangitis obliterans, Verh. Dtsch. Ges. Inn. Med., **83**: 1758–1761, 1977.
[49] ISNER J. M., SAZAMA K. J., ROBERTS W. C., Vascular complications of thorium dioxide, Am. J. Med., **64**: 1069–1074, 1978.
[50] ITO H., OGATA T., KAWASE O., An insoluble intermediate in the biosynthesis of elastin and its relationship to tropoelastin, Adv. Exp. Med. Biol., **79**: 413–427, 1977.
[51] KADAR A., The ultrastructure of elastic tissue, Path. Europ., **9**: 133–146, 1974.
[52] KADAR A., KERENYI T., JELINEK H., Die Wirkung der Elastase in ultradünnen Schnitten, Acta Histochem., **15**: 197–202, 1975.
[53] KAGAN H. M., JORDAN R. E., LERCH R. M., MUKHERIIJEE D. P., STONE P., FRANZBLAU C., Factors affective the proteolytic degradation of elastin, Adv. Exp. Med. Biol., **79**: 189–208, 1977.
[54] KAWIAK J., MOSKALEWSKI S., HINEK A., Reconstruction of the elastic cartilage by isolated chondrocytes in autogeneic transplants, Acta Anat., **76**: 530–544, 1970.
[55] KAO K. Y. T., HILKER D. M., MCGAVACK T. H., Connective tissue V. Comparison of synthesis and turnover of collagen and elastin in tissues of rat of several ages, Proc. Soc. Exp. Biol. Med., **106**: 335–338, 1961.
[56] KRAMSCH D. M., FRANZBLAU C., HOLLANDER W., The protein and lipid composition of arterial elastin and its relationship to lipid accumulation in the atherosclerotic plaque, J. Clin. Invest., **50**: 1666–1677, 1971.
[57] KUCHARZ E., Współczesne poglądy na patogenezę zespołu Ehlersa - Danlosa, Wiad. Lek., **29**: 609–667, 1976.
[58] LAMMY F., BAURAIN R., GUAY M., LAROCHELLE J. F., Photolysis of desmosine and isodesmosine by ultraviolet light, Adv. Exp. Med. Biol., **79**: 177–187, 1977.
[59] MANDL I. T., DARNULE, FIERRER J. A., KELLER S., TURINO G., Elatin degradation in human and experimental emphysema, Adv. Exp. Med. Biol., **79**: 221–231. 1977.
[60] MCCULLY K. S., WILSON R. B., Homocysteine theory of arteriosclerosis, Atherosclerosis, **22**: 215–227, 1975.
[61] MECHAM R. P., FOSTER J. A., FRANZBLAU C., Intrinstic enzyme activity associated with tropoelastin, Biochem. Biophys. Acta, **446**: 245–254, 1976.
[62] — Proteolysis of tropoelastin, Adv. Exp. Med. Biol., **79**: 209–220, 1977.
[63] MIYAKE Y., TOSHIKOTO N., Isolation of elastase inhibitor from rat plasma, Biochem. Biophys. Acta, **328**: 173–181, 1973.
[64] MOCZAR T., ROBERT B., ROBERT L., Separation and determination of crosslinking amino acids of elastin by high voltage paper electrophoresis, Anal. Biochem., **45**: 422–427, 1972.
[65] MOSKALEWSKI S., KONWIŃSKI M., HINEK A., In vitro elastic fiber formation by aggregated aortic cells of newborn rabbits, Anat. Embryol., **150**: 113–122, 1976.
[66] MOSKALEWSKI S., Elastic fiber formation in monolayer and organ cultures of chonodrocytes isolated from auricular cartilage, Amer. J. Anat., **146**: 443–448, 1976.

http://rcin.org.pl

[67] MUIR L. W., BORNSTEIN P., ROSS R., A presumptive subunit of elastic fibers microfibrils secreted by arterial smooth muscle cells in culture, Eur. J. Biochem., **64**: 105—114, 1976.
[68] MURRAY M., SCHRODT R. G., BERG H. F., Role of smooth muscle cells in healing of injured arterias, Arch. Pathol., **82**: 138–147, 1966.
[69] NARAYANAN A. R., SIEGEL R. C., MARTIN G. R., On the inhibition of lysyl oxydase by B - aminoproprionitryle, Biochem. Biophys. Res. Com., **46**: 743–751, 1972.
[70] NARAYANAN A. S., PAGE C., Molecular weight heterogeneity of tropoelastin resulting from proteolysis during preparation, FEBS Letters, **44**: 59–62, 1974.
[71] NARAYANAN S., SANDBERG L. B., ROSS R., LAYMAN D. L., The smooth muscle cells III. Elastin synthesis in arterial smooth muscle cell in culture, J. Cell Biol., **68**: 411–419, 1976.
[72] NARAYANAN A. S., PAGE R. C., KUZAN F., Studies on the action of lysyl oxidase on soluble elastin, Adv. Exp. Med. Biol., **79**: 491–508, 1977.
[73] PALADE G., Intracellular aspects of the process of protein synthesis, Science, **189**: 347–358, 1975.
[74] PARKER F., ODLAND G. F., A correlative histochemical, biochemical and electron - microscopic study of experimental atherosclerosis in the rabbit aorta with special reference to the myo - intimal cell, Amer. J. Pathol., **48**: 197–239, 1966.
[75] PARTRIDGE S. M., Biosynthesis and nature of elastin structures, Fed. Proc., **25**: 1023–1029, 1966.
[76] PAZ M. A., HENSON E., BLUMENFELD O., Dehydromerodesmosine and merodesmosine in elastin, Biochem. Biophys. Res. Commun., **44**: 1518–1532, 1971.
[77] PEARCE A. G. E., Histochemistry, 3 wyd. J. A. Churchill Ltd. London, 225, 1968.
[78] PEASE D. C., PAULE W. J., Electron microscopy of elastic arteries: the thoracic aorta of the rat., J. Ultrastruct. Res., **3**: 469–483, 1960.
[79] POLLAK O. J., Monographs on atherosclerosis, Vol. 1, Tissue culture, wyd. Karger, New oYrk 1969.
[80] ROBERT B., SZIGETI M., Studies on the nature of the microfibrillar component of elastic fibers, Europ. J. Biochem., **21**: 507–516, 1971.
[81] ROBERT B., ROBERT L., LEGRAND Y., Elastolytic protease in blood platelets, Ser. Haematol., **4**: 175–185, 1971.
[82] ROBERT L., KADAR A., ROBERT B., The macromolecules of the intercellular matrix of the arterial wall, Adv. Exp. Med. Biol., **43**: 85–123, 1974.
[83] ROBERT L., ROBERT B., ROBERT A. M., Molecular biology of elastin as related to aging and atherosclerosis, Exp. Gerontol., **5**: 339–356, 1970.
[84] ROSS R., The smooth muscle cells II. Growth of smooth muscle in culture and formation of elastic fibers, J. Cell Biol., **50**: 172–186, 1971.
[85] — The elastic fiber; J. Histochem. Cytochem., **21**: 199–208, 1973.
[86] ROSS R., BORNSTEIN P., The elastic fiber I. Separation and partial characterisation of its macromolecular components, J. Cell Biol., **40**: 366–381, 1969.
[87] ROSS R., GLOMSET J. A., Atherosclerosis and the smooth muscle cells, Science, **180**: 1332–1339, 1973.
[88] ROSS R., KLEBANOFF S. J., The smooth muscle cells. In vivo synthesis of connective tissue proteins, J. Cell Biol., **50**: 159–1971, 1971.

http://rcin.org.pl

[89] ROSS R., FIALKOFF P. J., ALTMAN L. K., The morphogenesis of elastic fibers, Adv. Exp. Med. Biol., 79: 7–17, 197.
[90] SANDBERG L. B., BRUENGER E., CLEARY E. G., Tropoelastin purification improvements using enzyme inhibitors, Annal. Biochem., 64: 249–254, 1975.
[91] SANDBERG L. B., Elastin structure in health and disease, Int. Rev. Conn. Tiss. Res., 7: 159–209, 1976.
[92] SERRAFINI - FRACASSINI A. J., FIELD M., DELF B., X - ray analysis of enzymatically purified elastin from bovine ligamentum nuchae, Adv. Exp. Med. Biol., 79: 679–683, 1977.
[93] SIMONESCU N., SIMONESCU M., Gallylglucoses of low molecular weight as mordant in electron microscopy, J. Cell. Biol., 70: 608–633, 1976.
[94] SMITH D. W., ABRACHAM P. A., CARNES W. H., Studies on the biosynthesis of a soluble precursors of elastin, Adv. Exp. Med. Biol., 79, 385–396, 1977.
[95] SOMLYO A. P., SOMLYO A. V., Vascular smooth muscle. Normal structure, pathology, biochemistry and biophysics, Pharmacol. Rev., 20: 197–272, 1968.
[96] SPURR A. R., A low viscosity epoxy - resin embedding medium for electron microscopy, J. Ultrastruct. Res., 26: 31–43, 1969.
[97] TAKAGI K., KAWASE O., An electron microscopic study of the elastogenesis in embryonic chick aorta, J. Electron Micr., Tokyo, 16: 330–339, 1967.
[98] TAKAGI K., Electron microscopical and biochemical studies of the elastogenesis in embryo chick aorta, Kumamoto Med. J., 22: 1–15, 1969.
[99] — On elastins isolated from subcellular fractions, Kumamoto Med. J., 22: 16–27, 1969.
[100] THYBERG J., HINEK A., Fine structure of rabbit ear chondrocytes in vitro and after autotransplantation, Cell and Tissue Res., 180: 341–356, 1977.
[101] THYBERG J., HINEK A., NILSON J., FRIEBERG U., Electron microscopic and collagen - like material, Histochem. J., 11: 1–17, 1979.
[102] THYBERG J., MOSKALEWSKI S., FRIBERG U., Electron microscopic studies on the uptake of colloidal thorium dioxide particles by isolated fetal guinea - pig chondrocytes and the distribution of labeled lysosomes in cartilage formed by transplanted chondrocytes, Cell Tissue Res., 156: 317–344, 1975.
[103] TRELSTAD R. L., Vacuoles in the embryonic chick corneal epithelium, an epithelium which produces collagen, J. Cell. Biol. 48: 689–694, 1971.
[104] VOLPIN D., CIFERI A., Thermoelasticity of elastin, Nature, 225: 362–364, 1970.
[105] VOLPIN D., Ultrastructure of elastin coacervates, Adv. Exp. Med. Biol., 79: 119–125, 1977.
[106] WEIS - FOGH S., ANDERSEN O., New molecular model for long range elesticity of elastin, Nature, 227: 718–721,
[107] YU S. Y., SUN C. N., STILL M. F., Ultrastructural changes of elastic tissue in hamster lung during elastase - emphysema, Adv. Exp. Med. Biol., 79: 39–56, 1977.

Otrzymano: 15 stycznia 1979.
Przyjęto: 27 marca 1979.

Adres autora: ul. Szaserów 128, 04-349 Warszawa.

http://rcin.org.pl

POSTĘPY BIOLOGII KOMÓRKI TOM 6, NR 3, 1979 (239-242)

RECENZJE

D. R. GARROD, editor. Specificity of Embryological Interactions. Receptors and Recognition, Series B, Volume 4.

Wydane przez Chapman and Hall; London, A Halsted Press Book, John Wiley and Sons, New York, 1978. Str. 274, twarda okładka z obwolutą, funtów ang. 15.

Tytuł recenzowanej książki obejmuje szeroki zakres zagadnień dotyczących rozwoju i różnicowania się organizmu. Zbiór artykułów, które czytelnik znajdzie w tej książce, odnosi się do problemu interakcji pomiędzy komórkami lub grupami komórek obserwowanych zarówno w rozwijającym się organizmie, jak też w różnych modelach doświadczalnych. Książka składa się z trzech części. W pierwszej (dwa artykuły) znajdzie czytelnik opisy oraz interpretacje współdziałania ze sobą różnych komórek lub grup komórek o ustalonym już położeniu, które powstało w wyniku przemieszczeń morfogenetycznych komórek. Druga część książki (trzy artykuły) stanowi zbiór rozdziałów o treści dotyczącej głównie adhezji komórek. Zjawisko to omawiane jest w oparciu o obserwacje materiału pochodzącego ze zwierząt kręgowych, podczas gdy w trzeciej części (dwa rozdziały) zjawisko to rozpatrywane jest u gąbek i śluzowców.

Autorzy zamieszczonych w tej książce artykułów pochodzą wyłącznie ze Stanów Zjednoczonych i Wielkiej Brytanii. Pierwszy rozdział, napisany przez D. M. Nodena, zawiera opisy wywędrowywania komórek grzebienia neuralnego oraz ich różnicowania się. Artykuł ten jest ilustrowany licznymi zdjęciami z mikroskopu skanującego i świetlnego. Rozdział drugi (R. M. Gaze) dotyczy powstawania połączeń nerwowych. Autor oparł ten rozdział prawie wyłącznie na własnych doświadczeniach. Posługuje się w nich specyficznymi markerami, które pozwalają mu prześledzić formowanie się połączeń retinotektalnych. Mimo przedstawienia licznych map i schematów, które mają na celu wyjaśnienie tego procesu, autor stwierdza w konkluzji, że zagadnienie specyfiki tworzenia się połączeń pomiędzy komórkami siatkówki i *tectum opticum* pozostaje nadal otwarte. Trzy kolejne artykuły w drugiej części książki dotyczą selektywnej adhezji komórek organizmów zarodkowych. W pierwszym

http://rcin.org.pl

rozdziale tej części książki, M. S. Steinberg prezentuje hipotezę, która ma na celu wyjaśnienie specyfiki wiązań jakie mają miejsce pomiędzy komórkami. Rozdział ten zawiera sporo matematyki, co moim zdaniem nie ułatwia czytelnikowi zrozumienia z natury już trudnego problemu. W rozdziale drugim tej części, który dotyczy molekularnej podstawy interakcji między komórkami a cząsteczkami, pomiędzy komórkami i podłożem, autor opisuje dynamizm receptorów powierzchniowych oraz ich znaczenie w procesie tzw. „cap formation". W kolejnym rozdziale A. G. G. Curtis omawia problem specyficznego umiejscowiania się komórek w stosunku do innych komórek. Zjawisko to jest często określane w języku polskim jako „wzajemne rozpoznawanie się komórek", co jest oczywistym antropomorfizmem, niemniej jednak określenie to obrazuje istotę tego zjawiska. Czytelnik znajdzie tutaj treściwy opis możliwości interakcji pomiędzy komórkami w rozmaitych systemach doświadczalnych — jedno i wielokomórkowych. Opisywane modele eksperymentalne pochodzą ze zwierząt kręgowych, bezkręgowych oraz gąbek.

Dwa ostatnie rozdziały trzeciej części książki są poświęcone rozważaniom nad zjawiskiem selektywnej adhezji i kohezji u gąbek i śluzowców. W pierwszym rozdziale tej części A. Turner omawia szczegółowo zjawisko „wzajemnego rozpoznawania się komórek" gąbek w różnie ustawionych modelach doświadczalnych. W efekcie swoich rozważań, w oparciu o szeroko prowadzone badania metodami biochemicznymi i immunologicznymi, autor dochodzi do wniosku, że komórki gąbek produkują specjalny czynnik umożliwiający ich agregację. Natomiast brak tego czynnika zapobiega spontanicznej dyspersji gąbki. W ostatnim rozdziale zespół autorów przedstawia w sposób systematyczny i bardzo poglądowy mechanizmy odpowiedzialne za zjawiska adhezji oraz kohezji komórek śluzowców. W pierwszej części rozdziału znajduje się opis własności komórek śluzowców oraz schematycznie przedstawiony cykl życiowy organizmu. Następnie autorzy koncentrują się nad chemizmem powierzchni komórek odpowiedzialnej za adhezję. W konkluzji czytelnik dowiaduje się, że pewne antygeny powierzchniowe odgrywają kluczową rolę w zjawiskach kohezyjnych. Na powierzchni komórek występują białka wiążące lektyny, których antagoniści mają własności blokowania zdolności adhezyjnych komórek śluzowców.

Książka jest wydana bardzo starannie, zawiera zbiorowy indeks rzeczowy, a każdy z rozdziałów ma obszerny spis cytowanej literatury. Pozycja ta jest godna polecenia specjalistom pracującym nad rolą receptorów powierzchniowych we „wzajemnym rozpoznawaniu się komórek".

W. Kilarski

http://rcin.org.pl

PETER A. WHITTAKER and SUSAN M. DANKS, Mitochondria: structure, function and assembly.

Wydanie pierwsze. Broszura ("paperback edition"). Longman, London, Nowy Jork 1978. Str. 145, funtów ang. 3,75.

Autorzy recenzowanej książki są wykładowcami biochemii na uniwersytecie w Sussex (Anglia). Celem ich było wypełnienie luki, jaka powstała pomiędzy popularnymi opracowaniami o mitochondriach a wysoce specjalistycznymi wydawnictwami.

Jedną z istotnych cech, która wyróżnia organizmy eukariotyczne od prokariotycznych, są mitochondria obecne w ich komórkach. Organele te w procesie ewolucji wyspecjalizowały się w transformatory energii. Dzięki temu stały się głównym tematem badań dla wielu dyscyplin naukowych, takich jak biochemia, cytologia i genetyka. Mitochondria są również przedmiotem licznych wydań książkowych. Każda książka dotycząca mitochondriów, która pojawi się na półkach księgarskich, stanowi zrozumiały przedmiot zainteresowań każdego biochemika i cytologa.

Treść książki autorzy podzielili na pięć rozdziałów, które są następnie podzielone na poszczególne zagadnienia. Pierwszy rozdział, „Wstęp", zawiera ogólne wiadomości o rozmieszczeniu mitochondriów w komórce, ich ultrastrukturze i funkcji. Jest on dość licznie ilustrowany dobrymi elektronogramami omawianych organeli. Rozdział drugi, „Metabolizm mitochondrialny", omawia głównie cykl kwasu cytrynowego, rolę jaką odgrywa w procesach metabolizmu cukrów, tłuszczów i aminokwasów. Ponadto czytelnik znajdzie tutaj omówienie cyklu mocznikowego i beta oksydacji kwasów tłuszczowych. Rozdział jest ilustrowany licznymi schematami, które ułatwiają czytelnikowi zrozumienie opisywanych procesów chemicznych. Rozdział trzeci został w całości poświęcony oksydatywnej fosforylacji. Omówiono w nim kolejno naturę poszczególnych przenośników elektronów, specyfikę systemu transportującego elektrony oraz kilka współczesnych teorii, które wyjaśniają proces tworzenia wysokoenergetycznych wiązań w cząsteczce ATP. W rozdziale czwartym autorzy omawiają mechanizm transportu jonów przez błony mitochondrialne. Czytelnik znajdzie tutaj wiadomości na temat rodzaju przenośników, ich biologicznej ważności oraz kilka przykładów transportu niektórych aminokwasów, kwasów tłuszczowych oraz transportu kationów jedno- i dwuwartościowych.

Ostatni rozdział tej książki poświęcony jest pochodzeniu mitochondriów, ich kwasom nukleinowym, syntezie białek, genetyce mitochondriów oraz ich ewolucji.

Książka napisana jest stylem prostym i dzięki temu jej treść jest zrozumiała i łatwo przyswajalna. Wszystkie opisywane w tej książce

http://rcin.org.pl

zjawiska są ilustrowane przejrzystymi schematami. Każdy rozdział autorzy uzupełnili zestawem zalecanej literatury. Książka zawiera indeks rzeczowy. Autorzy przeznaczyli ją dla studentów wyższych lat biologii i biochemii. Moim zdaniem mogą z niej korzystać zarówno studenci medycyny, jak i biologii oraz asystenci prowadzący odpowiednie zajęcia laboratoryjne. Może ona również stanowić przydatne kompendium dla wykładowców wstępu do biologii na pierwszych latach studiów biologicznych.

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

M. SCHMIDT, Przebieg replikacji DNA w chromosomach człowieka 141
W. BICZYSKO i J. JUSZCZYK, Wirus zapalenia wątroby typu B. Własności fizyczne, chemiczne i biologiczne oraz cykl replikacyjny z uwzględnieniem badań własnych przy użyciu techniki elektronowo-mikroskopowej 151
I. ZGÓRNIAK-NOWOSIELSKA, Mykoplazmowe i wirusowe zanieczyszczenia hodowli komórek . . . 171
E. ZUBRZYCKA, Wybrane zagadnienia miogenezy . 187
A. HINEK, Struktura i morfogeneza włókien sprężystych 209
Recenzje 239

Indeks 36970

http://rcin.org.pl