

PL ISSN 0324-833X

**POLSKIE
TOWARZYSTWO
ANATOMICZNE**

**TOM 7-NR 2
1980 (53-148)**

Postępy Biologii Komórki

PWN-WARSZAWA

<http://rcin.org.pl>

Kwartalnik
Polskiego Towarzystwa Anatomicznego
wydawany z pomocą finansową
Polskiej Akademii Nauk

Redaguje Kolegium

Jerzy KAWIAK, Wincenty KILARSKI, Jan MICHEJDA, Maria OLSZEWSKA

Komitet Redakcyjny

Jadwiga ACKERMAN, Leszek CIECIURA, 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 585 + 105 egz. Ark. wyd. 8,5. Ark. druk. 8 + 0,25 wkl. Papier druk. sat. III kl., 80 g,
70 × 100 cm. Oddano do składania w marcu 1980 r. Podpisano do druku w czerwcu 1980 r.
Druk ukończono w czerwcu 1980 r. Zam. 2146/80 — Cena zł 20.—

Wrocławska Drukarnia Naukowa, Wrocław, ul. Lelewela 4

EWOLUCJA POJĘCIA NEUROSEKRECJI

EVOLUTION OF THE NEUROSECRETORY CONCEPT

Andrzej JASIŃSKI

Zakład Anatomii Porównawczej, Instytut Zoologii Uniwersytetu Jagiellońskiego,
Kraków

Streszczenie. W artykule przedstawiono zarys historii badań komórek neurosekrecyjnych, sięgających swymi początkami drugiej dekady bieżącego stulecia. Część wstępna tekstu zawiera informacje ogólne na temat systemów neurosekrecyjnych, zbudowanych z omawianych komórek, u najlepiej zbadanych pod tym względem zwierząt, a więc owadów, skorupiaków i kregowców. Druga część artykułu jest przypomnieniem szeregu odkryć szczegółowych, często związanych z postęпами w sferze stosowanej metodyki badań. Ten wątek historyczny posłużył do równoczesnego prześledzenia ewolucji poglądów dotyczących zjawiska neurosekrecji, która znalazła swe odbicie w kolejnych próbach definiowania komórek i procesów neurosekrecyjnych. W zakończeniu opracowania przytoczono klasyfikację czynnościowych związków ośrodkowego układu nerwowego z narządami efektorowymi.

Summary. This presentation outlines the history of investigations on neurosecretory cells and phenomena, which begun in the 2nd decade of our century. The introductory part contains general informations concerning the neurosecretory systems, composed of the described cells, occurring in animals most extensively studied with this respect: insects, crustaceans and vertebrates. The second part of the review recalls a number of discoveries, often related to a progress in the applied scientific methods. The latter historical considerations have been also used to present the evolution of the opinions concerning neurosecretory phenomena, which has been reflected in successive attempts to define neurosecretion and neurosecretory cells. The final part contains the classification of functional connections between the central nervous system and the effector organs.

WSTĘP

Komórki neurosekrecyjne oraz tworzone przez nie systemy, mniej lub bardziej złożone, występują powszechnie u zwierząt tkankowych [17]. Do najwcześniej i równocześnie najpełniej poznanych systemów neuro-

sekrecyjnych bezkręgowców należy, występujący u owadów, zespół narządów złożony z protocerebrum—corpora cardiaca—corpora allata [86, 97, 98, 100, 101]. Niemal równie dobrze poznane, tak od strony morfologicznej, jak i czynnościowej, są systemy neurosekrecyjne słupków ocznych oraz ośrodkowego układu nerwowego skrupiaków, a mianowicie: zwojowy narząd X—gruczoł zatokowy—czuciowy narząd X, zwój mózgowy—narząd zaspoidłowy i zwój podprzełykowy—narząd osierdziowy [30, 129].

Natomiast u kręgowców przyciągają od lat szczególną uwagę składniki (A) peptydergicznego systemu neurosekrecyjnego podwzgórza, zróżnicowanego na (1) wielkokomórkowy system podwzgórzowo-przysadkowy, czyli neurosekrecji klasycznej, zwanej także CAH- i AF-pozytywną (skrót urobione od nazw barwników w pisowni angielskiej: chrome—alum—haematoxylin i aldehyde—fuchsin) [3—7, 75, 107, 111, 112], oraz na (2) drobnokomórkowy system guzowo-lejkowy, czyli neurosekrecji przysadkotropowej, w żargonie laboratoryjnym zwanej często CAH- i AF-negatywną [64, 75, 83, 87, 117].

Pierwszy z nich jest źródłem oktapeptydowych neurohormonów, natomiast w komórkach drugiego z tych systemów powstają hormony przysadkotropowe, będące również peptydami, dla których w różnych okresach i fazach badań stosowano nazwy czynników regulujących (regulatory factors — RF), czynników uwalniających lub hamujących (releasing factors — RF lub inhibitory factors — IF) oraz hormonów uwalniających lub hamujących odpowiednie hormony tropowe przysadki (jak TSH—RH lub GH—IH itp.). Dla zwięzłego określania poszczególnych hormonów przysadkotropowych są również stosowane nazwy jednowyrazowe, jak np. tyreoliberyna, gonadoliberyna, somatostatyna, somatoliberyna itd.

W tym kontekście morfofizjologia (B) rdzeniowego systemu neurosekrecyjnego jest — na dobrą sprawę — zagadnieniem marginesowym, albowiem system ów występuje tylko u ryb spodoustych i kostnoszkieletowych, natomiast brak go u pozostałych kręgowców.

Już to, co powiedziano, świadczy, że w świecie zwierząt występuje wiele systemów neurosekrecyjnych, różniących się liczbą i rozmieszczeniem tworzących je komórek, a przede wszystkim spełnianą przez nie rolą. Mając to na uwadze ograniczamy zasadniczy temat niniejszego opracowania do klasycznych komórek neurosekrecyjnych, tworzących w podwzgórzu bezowodniowców jądro przedwzrokowe (n. preopticus — NPO), a w podwzgórzu kręgowców owodniowych — jądra nadwzrokowe i przykomorowe (n. supraopticus — NSO i n. paraventricularis — NPV) oraz podwzgórzowo-przysadkowe drogi neurosekrecyjne. Istotną cechą klasycznych komórek neurosekrecyjnych, ostro wyróżniającą je spośród innych hormonogennych neuronów podwzgórza, jest wytwarzanie neurohormonów przeciwdiuretycznych i oksytocynopodobnych.

W komórkach neurosekrecyjnych splotły się dwa kierunki specjalizacji, z których jeden reprezentują cechy neuronalne, drugi zaś cechy gruczołowe. Dwojaki charakter komórek neurosekrecyjnych wyraża się nie tylko w tym, że funkcjonują one zarówno jak komórki nerwowe i gruczołowe, łącząc również w sobie ich cechy morfologiczne, lecz także i w tym, że są one wrażliwe na dwa rodzaje bodźców: nerwowe i hormonalne [122]. Wprawdzie w przeciwieństwie do zwykłych albo konwencjonalnych neuronów podstawową funkcją komórek neurosekrecyjnych nie jest przewodzenie impulsów i przekazywanie ich na inne neurony, to jednak zdolność ta może mieć istotne znaczenie czynnościowe [18].

Dopełniając wstępnej i z konieczności pobieżnej charakterystyki komórek neurosekrecyjnych, należy odnotować ich zazwyczaj większe rozmiary w porównaniu z sąsiadującymi neuronami konwencjonalnymi. Cechą bardziej istotną jest to, że aksony neuronów wydzielniczych z reguły nie tworzą zakończeń synaptycznych, natomiast uwalniane przez nie hormony docierają do narządów efektorowych poprzez ogólne krążenie krwi lub hemolimfy.

Porównując komórki nerwowe i neurosekrecyjne zwrócono również uwagę, że zasadnicze różnice między tworzonymi przez nie systemami mają charakter przestrzenny i czasowy. Komórki nerwowe oddziałują na elementy efektorowe z małej odległości, równej rozmiarom szczeliny synaptycznej, przez okres mierzony zaledwie w milisekundach. Natomiast komórki neurosekrecyjne uwalniają neurohormony do naczyń w dużym oddaleniu od narządów efektorowych, przy czym działanie tych substancji trwa niewspółmiernie dłużej. W tym samym duchu wypowiedziała się Scharrer [104], kiedy zwróciła uwagę, że jedną z cech odróżniających komórki neurosekrecyjne od konwencjonalnych neuronów jest tworzenie długotrwałych sygnałów za pośrednictwem uwalnianych do krwi neurochemicznych przekaźników, a zatem przeciwnie niż ma to miejsce w przypadku przekaźnictwa synaptycznego.

Piśmiennictwo naukowe dotyczące komórek neurosekrecyjnych i związanego z nimi zjawiska neurosekrecji jest obecnie, po kilkudziesięciu latach usilnych i wielostronnych badań, nadzwyczaj obfite. Większość publikacji ukazała się w licznych periodykach naukowych, natomiast znacznie skromniejsza część trafiła do wydawnictw zwartych. Spośród tych ostatnich szczególnie ważne są tomy będące pokłosiem kolejnych siedmiu (jak dotąd) międzynarodowych sympozjów nt. neurosekrecji, z których pierwsze odbyło się w 1953 r. w Neapolu [2], a kolejne — w kilkuletnich odstępach — w Lund [8], Bristolu [57], Strasburgu [121], Kilonii [13], Londynie [75] i w Leningradzie [12]. Oprócz przynoszenia wielu nowych faktów z zakresu morfologii i funkcjonowania neuronów wydzielniczych, kolejne spotkania badaczy skupionych wokół problemu neurosek-

recji, a szerzej wokół mechanizmów regulacji nerwowo-dokrewnej, przynosiły stopniowe krystalizowanie się poglądów na istotę zjawiska neurosekrecji.

KSZTAŁTOWANIE SIĘ POGLĄDÓW

Sięgając do początków badań nad komórkami i zjawiskiem neurosekrecji należy cofnąć się do 1914 r., w którym Gaskell [49] wysunął przypuszczenie, iż pewne komórki chromochłonne z pnia nerwowego pierścienic mogą spełniać równocześnie funkcje nerwowe i dokrewne. Dowodu na to, że mózg owadów jest również gruczołem dokrewnym, wydzielającym hormon przepoczwarzania, dostarczył polski biolog Stefan Kopeć. Ten błyskotliwy eksperymentator przeprowadził w latach 1917–1922 cykl doświadczeń na gąsienicach brudnicy nieparki, *Lymantia dispar* [76, 77]. Polegały one na usuwaniu gąsienicom mózgu po upływie różnej liczby dni od ostatniej linki, bądź też na zakładaniu gąsienicom tego motyla ligatury w połowie ich długości, przez co zamknięciu ulegały w tej okolicy ciała naczynia krwionośne. Doświadczenia Kopcia dowiodły, że do siódmego dnia od ostatniej linki obecność mózgu jest niezbędna, aby gąsienica mogła przeistoczyć się w poczwarkę, natomiast po przekroczeniu tego terminu usunięcie mózgu nie zapobiega przepoczwarzaniu. Wreszcie doświadczenia polegające na przewiązywaniu ciała gąsienic pokazały, że przeobrażeniu ulega tylko przednia część ciała, natomiast odcinek leżący do tyłu od przewiązki zachowuje budowę larwalną. Wyniki przypominanych eksperymentów Kopcia wskazywały niedwuznacznie, że mózg wpływa na morfogenezę tkanek za pośrednictwem substancji rozprowadzanej po organizmie przez krew, a zatem będącej neurogennym hormonem. Ilość tego hormonu w organizmie osiąga w siódmym dniu od ostatniej linki taki poziom, który nawet wobec usunięcia mózgu zapewnia normalny przebieg metamorfozy.

Bez wątpienia, osiągnięcia Kopcia były na owe czasy dużej miary rewelacjami. Jednak przez wiele lat nie potrafiiono właściwie docenić ich znaczenia. I chociaż bez popadania w egzaltację możemy uznać Kopcia za promotora neuroendokrynologii bezkręgowców, jednakże jego odkrycia nie wywarły większego bezpośredniego wpływu na rozwój tej dyscypliny, przyćmione publikacjami z czwartej i piątej dekady bieżącego stulecia [67, 95, 96, 123, 131–133]. Podobny los spotkał publikację Speidela z 1919 r. [118], w której autor ten opisał w rdzeniu ryb spodoustych komórki nerwowe o funkcji dokrewnej.

W 1928 r. Scharrer [105] wskazał na wydzielniczy charakter neuronów jądra przedwzrokowego w podwzgórzu ryb kostnoszkieletowych. Doceniając wagę swych spostrzeżeń, rozszerzył on obserwacje na przedsta-

wicieli innych grup kręgowców, aby następnie sformułować hipotezę mówiącą o hormonogennej roli niektórych jąder podwzgórza [106–110]. W owych pionierskich latach kontentowano się, zresztą z konieczności, prostą definicją, wedle której komórkami neurosekrecyjnymi są neurony zawierające inkluzje przypominające w mikroskopie świetlnym ziarna wydzieliny [110]. Podkreślano również powinowactwo tych komórek do określonych barwników histologicznych.

Idea neurosekrecji i hormonotwórczej roli podwzgórza, w ujęciu lansowanym przez E. i B. Scharrerów, napotykała początkowo na chłód, a nawet nieufność wielu badaczy. W tym kontekście na przypomnienie zasługuje historycznie pierwsza sugestia o pośredniczeniu między ośrodkowym układem nerwowym i przednim płatem przysadki czynnika hormonalnego, wpływającego według Hinsey i Markee [63] na aktywność sekrecyjną tego gruczołu. Również Roussy i Mosinger [94] wyrazili przypuszczenie, że neurony wydzielnicze podwzgórza mają prawdopodobnie zdolność wpływania na funkcję przedniego płata przysadki. Równocześnie z wykazaniem przez Wislockiego i Kinga w 1936 r. [134] zstępującego przepływu krwi w żyłach wrotnych przysadki, Friedgood sformułował hipotezę, iż naczynia te służą za kanał humoralny (patrz [26]). Ważnym wydarzeniem naukowym, przynależnym do tego samego okresu, było ogłoszenie przez Greena i Harrisa w 1947 r. [51] wyraźnie sformułowanej teorii czynników uwalniających, według której podwzgórze wpływa na czynność przysadki mózgowej (pars distalis) za pośrednictwem przysadkotropowych hormonów, przenoszonych z wyniosłości przyśrodkowej do przysadki via żyły wrotne tego gruczołu (zob. też [54–56]).

Aż po sam koniec lat 40 nie znano zadowalających metod barwienia substancji neurosekrecyjnej oraz morfologicznych składników podwzgórzowego systemu neurosekrecyjnego. Stosując kwas fosforowolframowy i fiolet krezyłowy, Popják [91] wykazał po raz pierwszy obecność koloidu w całym systemie podwzgórzowo-przysadkowym, lecz sugerował błędnie wstępujący kierunek wędrówki wybarwionych substancji. Natomiast Palay [89], który otrzymał podobne efekty barwiąc koloid kwaśną fuksyną, opowiedział się za zstępującym kierunkiem przesuwania się wydzieliny. Dopiero spostrzeżenia Bargmanna [3], które wykazały, że opracowane przez Gomoriego metody barwienia wysepek trzustkowych hematoksyliną chromowo-glinową (CAH) i fuksyną aldehydową (AF) wybarwiają stosunkowo wybiórczo substancję neurosekrecyjną w perykariach i wypustkach neurocytów wydzielniczych podwzgórza ssaków, nadały wielkiego rozmachu badaniom nad neurosekrecją kręgowców. Wiążąc dotychczasowe informacje, W. Bargmann i liczne grono jego współpracowników wykazali morfologiczny i czynnościowy związek między wielkokomórkowymi jądrami neurosekrecyjnymi podwzgórza (NPO, NSO,

NPV) i płatem nerwowym przysadki [4, 5, 14, 59, 88]. Szybko też wykryto związek między substancją neurosekrecyjną (CAH- i AF-pozytywną) i antydiuretyną płata nerwowego [60, 61] oraz wytłumaczono gromadzenie się nacieku tej substancji w proksymalnym odcinku przeciętej łodygi przysadki przesuwaniem się neurosekretu w kierunku zstępującym. Liczne grono badaczy wkrótce uwiarygodniło te ustalenia w odniesieniu do przedstawicieli wszystkich gromad kręgowców. Równocześnie powstała możliwość badania dynamiki procesu neurosekrecji w warunkach normalnych oraz zmienionych doświadczalnie (stres osmotyczny, hipertermia itp.).

W świetle omówionych wyników zgoła nowej wartości nabrały wcześniejsze odkrycia wskazujące na przeciwdiuretyczną funkcję płata nerwowego przysadki [29, 38, 126] oraz hipoteza, która głosiła, że występujące w tym płacie hormony są uwalniane przez zakończenia włókien nerwowych [92]. Wprawdzie termin „neurosekrecja” nie został wypowiedziany *expressis verbis*, ale istota tego zjawiska była już zawarta w hipotezie Rasmussena [92]. W kontekście zagadnień poruszonych w tym akapicie należy również przytoczyć badania, których autorzy [31] — posługując się techniką stereotaksji — wykazali, że zniszczenie proksymalnej części łodygi przysadki lub obustronnych jąder nadwzrokowych wywołuje atrofię płata nerwowego przysadki oraz moczówkę prostą. Ważnego odkrycia dokonał również Green [50] spostrzegając, że w płacie nerwowym żaby włókna nerwowe są rozmieszczone promieniście wokół naczyń krwionośnych. Na tej podstawie wyprowadził wniosek, że tak zbudowany płat nerwowy sugeruje neurosekrecję w znaczeniu nadanym przez Rasmussena [92].

Na podstawie badań układu neurosekrecyjnego skorupiaków, Carlisle i Knowles [21] ukuli w 1953 r. pojęcie „narządu neurohemalnego” dla określenia skupień końcowych odcinków aksonów komórek neurosekrecyjnych, przetkanych siecią naczyń krwionośnych i ewentualnie komórkami nabłonkowymi. Według takiego określenia, narządami neurohemalnymi są: gruczoł zatokowy, narząd zaspoidłowy i narząd osierdziowy skorupiaków, corpora cardiaca owadów, przysadka nerwowa kręgowców oraz przysadka rdzeniowa (urofiza) ryb. W publikacjach z lat 50 podkreślano, że pod względem cytologicznym komórki neurosekrecyjne łączą w sobie cechy neuronów i komórek gruczołowych, przy czym ich zakończenia nie tworzą połączeń synaptycznych z narządami efektorowymi, lecz uwalniają produkt sekrecji do naczyń krwionośnych na obszarze narządów neurohemalnych [72, 111]. Z tak sformułowanej definicji wynika, że aksony kończące się na kapilarach podwzgórzowo-przysadkowego systemu wrotnego są siłą rzeczy neurosekrecyjne [18]. Przytoczona definicja przemawiała zatem za włączeniem do systemów neurosekrecyjnych szeregu drobnokomórkowych jąder podwzgórza. Równocześnie jedną z okolicz-

ności komplikujących uzgodnienie wyczerpującej definicji komórek neurosekrecyjnych było wielokrotnie stwierdzane występowanie włókien i dróg neurosekrecyjnych zmierzających do różnych obszarów mózgu leżących poza podwzgórzem (tzw. zewnątrzprzysadkowe drogi neurosekrecyjne), tworzących przeto synapsy międzyneuronowe [15, 52, 53, 79, 80, 81].

Zastosowanie mikroskopu elektronowego otworzyło przed badaniami dotyczącymi neurosekrecji zgoła nowe perspektywy. Jednym z ważniejszych osiągnięć owego okresu było wykrycie w komórkach i aksonach neurosekrecyjnych charakterystycznie zbudowanych ziarenek neurosekretu o średnicy w granicach 0,1–0,3 μm [9, 10]. Wkrótce też odkryto, że owe ziarenka zawierają neurohormony, a mianowicie oksytocynę i wazopresynę [58], oraz że miejscem ich formowania się są aparaty Golgiego leżące w cytoplazmie okołojądrowej komórek [19, 20]. W ziarenkach tych widziano początkowo dobrą cechę diagnostyczną zjawisk neurosekrecji, ale nadzieje te rozwiały się wraz ze stwierdzeniem, że morfologicznie takie same ziarenka mogą występować w komórkach nerwowych mimo oczywistego braku neurosekrecji. W mózgu np. pierścienic większość neuronów konwencjonalnych, nie wykazujących aktywności dokrewnej, zawiera w cytoplazmie obłonione ziarnistości o silnie osmofilnej części rdzennej.

Obecność w cytoplazmie neurocytów obłonionych ziarenek jest wprawdzie poszlaką, lecz trudno ją uznać za kryterium neurosekrecji, zwłaszcza że w zakończeniach aksonów może występować kilka typów pęcherzyków i ziarnistości oraz szereg form pośrednich, różniących się rozmiarami, przenikliwością dla elektronów oraz szerokością jasnej strefy leżącej wprost pod błoną osłaniającą ziarenka itp. DeRobertis [23, 24] sklasyfikował ongiś te struktury na (i) jasne mikropęcherzyki o rozmiarach typowych dla cholinergicznym pęcherzyków synaptycznych, (ii) ziarenka adrenergiczne zawierające aminy katecholowe oraz (iii) typowe ziarenka neurosekrecyjne.

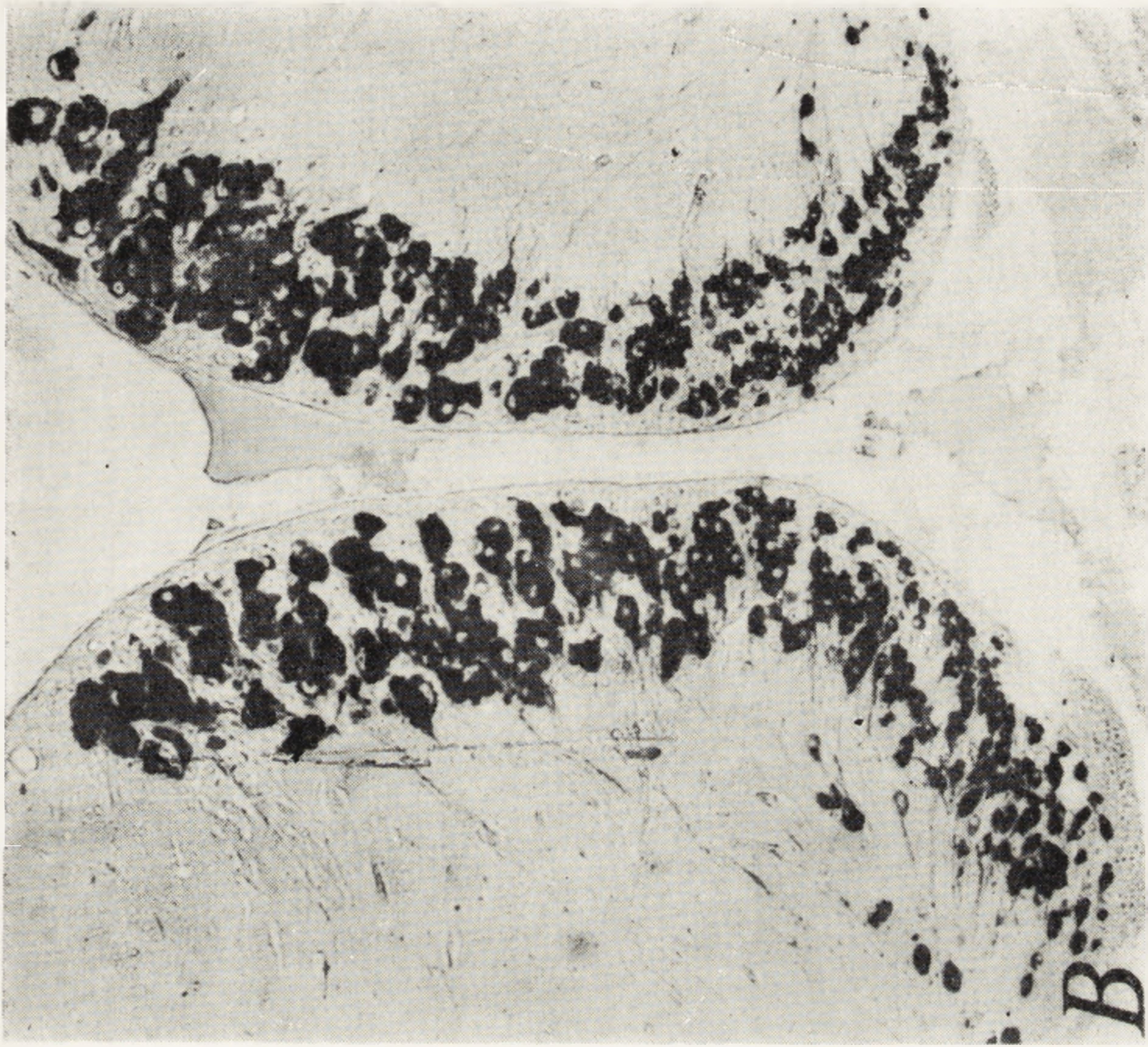
Badając ultrastrukturę narządu osierdziowego skorupiaków, Knowles [68] odkrył dwa typy włókien różniących się morfologią ziarenek neurosekretu. Oba typy włókien uwalniają wydzielinę do krwiobiegu, jednak różnią się budową chemiczną aktywnych czynników, które w jednych włóknach są peptydami, a w drugich — aminami. Autor cytowanych badań wprowadził terminy włókien A i włókien B albo odpowiednio — peptyderygicznych i aminerygicznych. W piśmiennictwie tego okresu pojawiły się również określenia neurosekrecji peptyderygicznej i aminerygicznej.

Równocześnie analogiczne spostrzeżenia poczynili Stahl i Leray [119] w przysadce ryb kostnoszkieletowych, gdzie również wykryli dwa typy włókien neurosekrecyjnych, z których jedne (CAH- i AF-pozytywne) pochodzą z jądra przedwzrokowego, natomiast drugie (CAH- i AF-negatywne) wybiegają z neurocytów jądra bocznego guza i są skorelowane pod

względem aktywności ze stopniem dojrzałości płciowej badanych ryb. Dalszy krok w tym samym kierunku znowu uczynił Knowles [70], który opublikował wyniki badań nad ultrastrukturą części pośredniej przysadki rekinka (*Scyliorhinus caniculus*), stwierdzając istnienie „unerwienia” komórek tej części gruczołu dwoma typami włókien neurosekrecyjnych. Jedne z nich (włókna A albo peptydergiczne) tworzą zakończenia w styczności z powierzchnią biegunów syntetyzujących (szczytowych), natomiast drugie (włókna B albo aminergiczne) kończą się na biegunach wydzielniczych (podstawnych) komórek gruczołowych. W ten sposób wykazano po raz pierwszy istnienie neurosekrecyjnego systemu podwzgórzowo-przysadkowego bez narządu neurohemalnego oraz tworzenie przez włókna neurosekrecyjne i komórki gruczołowe kontaktów (synaps) sekreto-motorycznych. Inny autor [84] wkrótce wykazał, że u rekinka włókna A wybiegają z komórek jądra przedwzrokowego, a włókna B — z komórek jądra bocznego guza. Z kolei Bargmann i wsp. [11] odkryli występowanie na powierzchni komórek pars intermedia przysadki kota kolbkowatych zakończeń włókien neurosekrecyjnych. W tym samym czasie podobne rezultaty otrzymywali autorzy prowadzący badania ultrastruktury przysadki nabłonkowej ryb kostnoszkieletowych [32, 33, 36, 37, 69, 73, 74]. Co więcej, wykryto również, że u owadów komórkami efektorowymi dla elementów neurosekrecyjnych mogą być włókna mięśniowe [65, 123, 130].

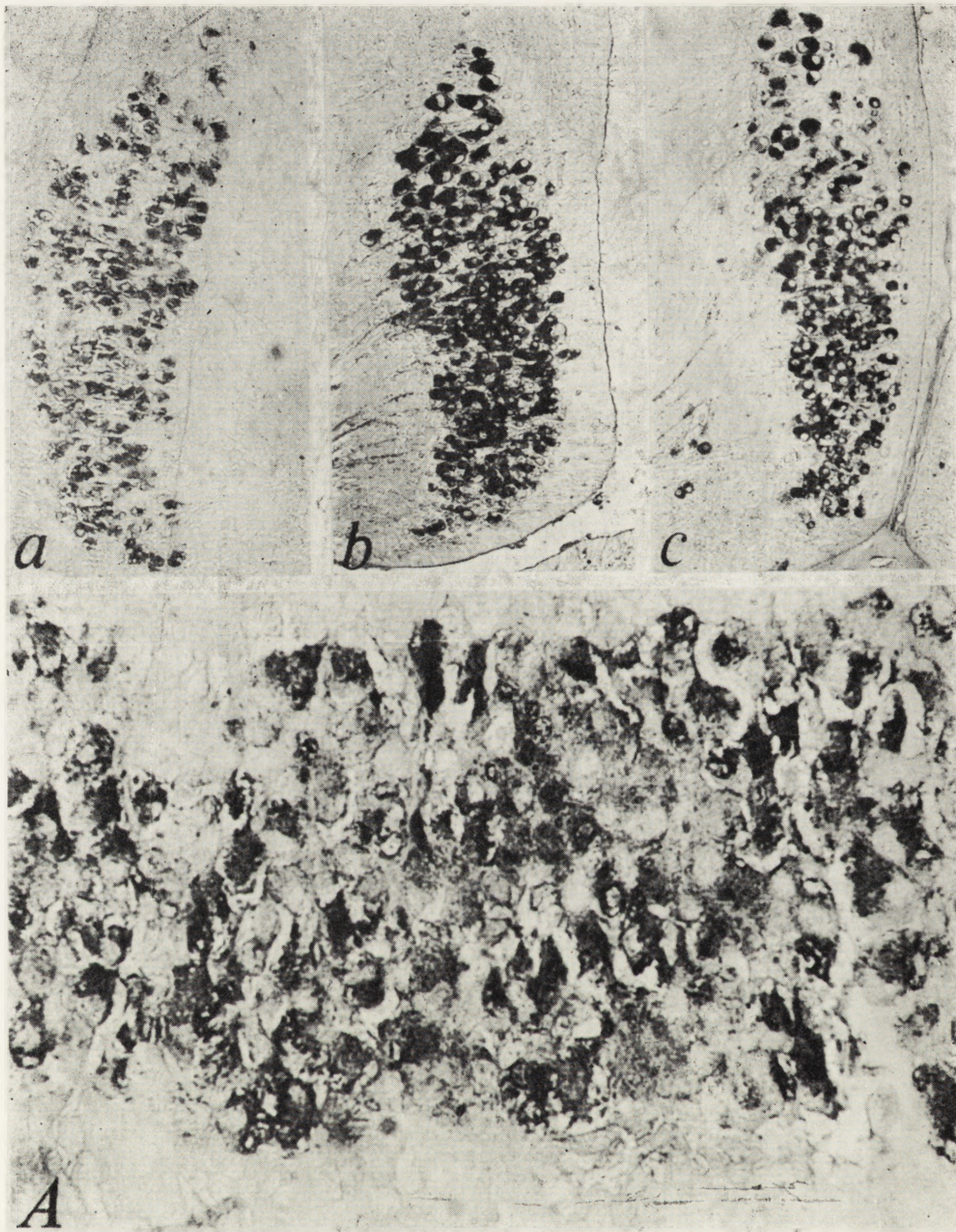
Opracowana przez Falcka i Hillrapa [27, 28] metoda specyficznego histochemicznego demonstrowania amin katecholowych przy zastosowaniu mikroskopu fluorescencyjnego umożliwiła uwidocznianie systemu guzowo-lejkowego, którego aksony kończą się na ścianach naczyń zewnętrznej warstwy wyniosłości przyśrodkowej oraz aminergicznego unerwienia hormonotwórczych jąder podwzgórza. Metodę tę szybko opanowali badacze z licznych ośrodków naukowych, choć od samego początku była i pozostała domeną autorów szwedzkich i fińskich [39–48, 62]. Posługując się tą techniką Fuxe i Hökfelt [44] wykazali, że zmienna zawartość amin katecholowych w wyniosłości przyśrodkowej ma związek z aktywnością wydzielniczą hormonotwórczej części przysadki. Autorzy ci sformułowali przypuszczenie, że zakończenia włókien aminergicznych drogi guzowo-lejkowej uwalniają do naczyń układu wrotnego przysadki dopaminę. Jednakże nie utożsamiali dopimany z którymś z hormonów przysadkotropowych. Przeciwnie, ich interpretacja sugerowała, że hormony te są prawdopodobnie magazynowa w innych typach zakończeń na obszarze wyniosłości przyśrodkowej. Koncepcję tę potwierdzili Schneider i McCann [113, 114] przez wykazanie, że same monoaminy nie mogą być identyfikowane z czynnikami regulującymi.

W 1964 r. Scharrer [109] wystąpił z płodną koncepcją, według której istota neurosekrecji polega na tym, że neurony hormonotwórcze two-

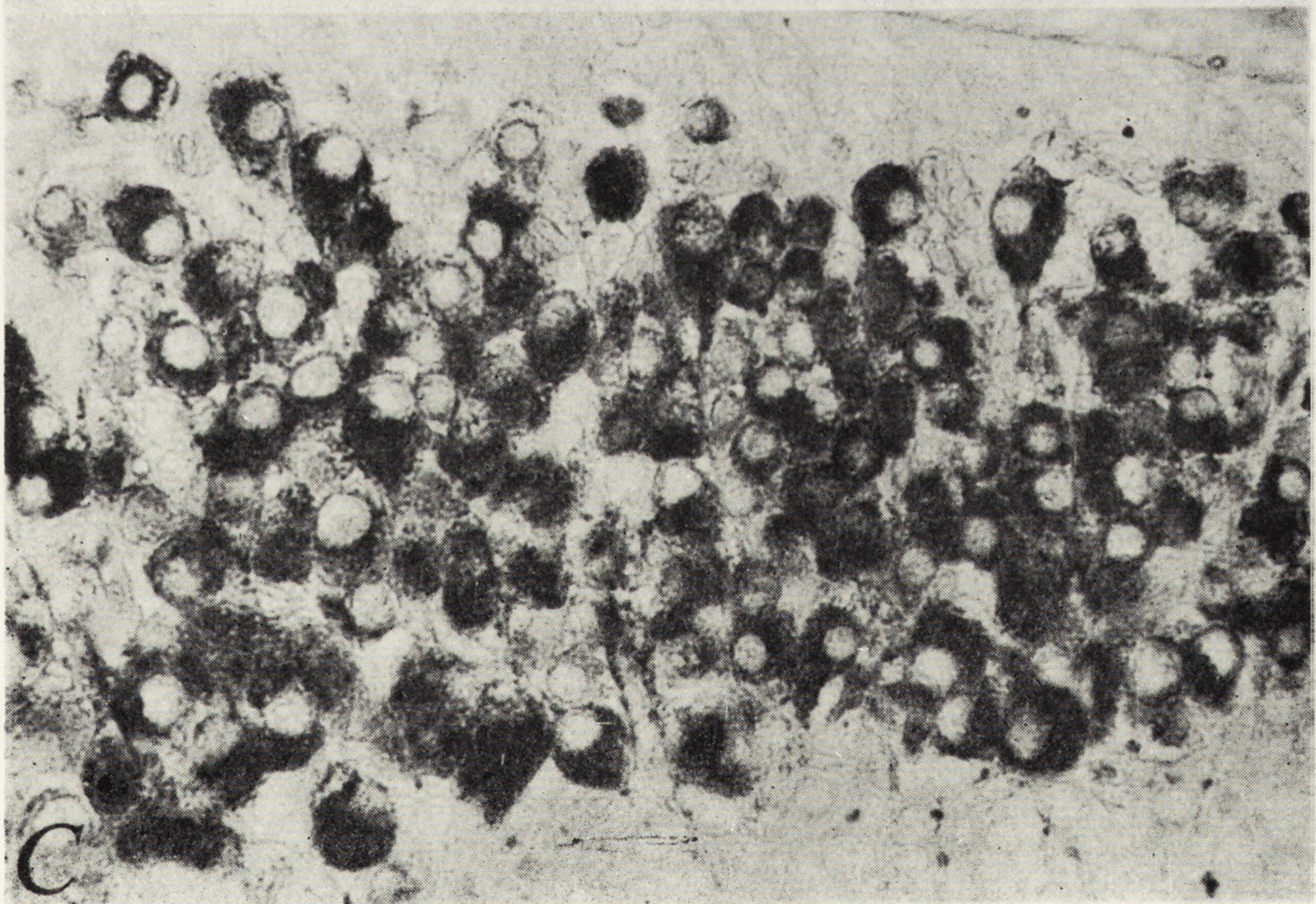
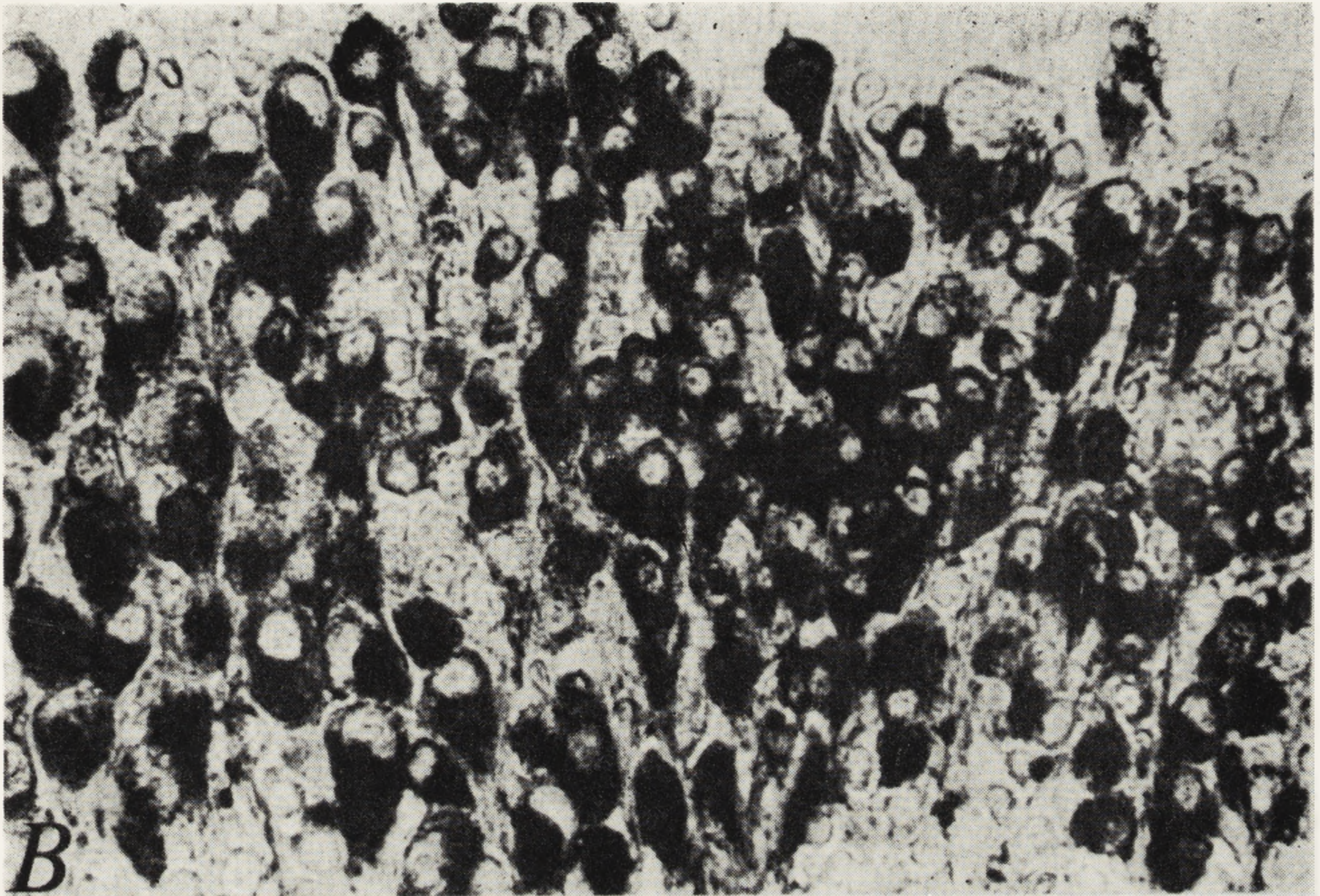


Ryc. 1. Jądro przedwzrokowe (NPO) w podwzgórzcu lina, *Tinca tinca* (L.). Przekroje poprzeczne (X 136)

A — styczeń, B — kwiecień. Neurosekret wybarwiony fuksyną aldehydową według metody Gomoriego. Cytoplazma komórek NPO obu osobników jest szczelnie wypełniona neurosekretem, co świadczy o niskim poziomie aktywności wydzielniczej neurocytów w miesiącach styczeniu i kwietniu (oryg.)



Ryc. 2. Jądro przedwzrokowe (NPO) w podwzgórzu karpia, *Cyprinus carpio* L. Przekroje poprzeczne (a) $\times 136$ (A) $\times 270$, część lewostronna jądra, styczeń; (b) $\times 136$, (B) $\times 270$, część prawostronna jądra, kwiecień; (c) $\times 136$, (C) $\times 270$, część prawostronna jądra. Neurosekret wybarwiony fuksyną aldehydową według metody Gomoriego. Zespół przedstawionych mikrofotografii wykazuje istnienie cyklu sezonowego w aktywności komórek neurosekrecyjnych NPO karpia, charakteryzującego się inną rytmiką w porównaniu z jądrem przedwzrokowym lina. Uderzającym rysem komórek neurosekrecyjnych karpia są małe rozmiary jąder komórkowych i silna wakuolizacja cytoplazmy w styczniu (2A), szczelne wypełnienie neurosekretem cytoplazmy komórek w kwietniu (2B) oraz zwiększone rozmiary jąder komórek neurosekrecyjnych przy zmniejszonej ilości i innym rozmieszczeniu neurosekretu w listopadzie (2C). Najwyższa aktywność NPO karpia przypada na miesiące lipiec i sierpień (oryg.).



rzą wspólną drogę końcową (final common pathway), łączącą systemy nerwowy z dokrewnym, a jak określa się obecnie: końcową drogę nerwowo-dokrewną (final neuroendocrine pathway) [71]. Ujęcie to wpłynęło na definicję komórek neurosekrecyjnych, określanych odtąd jako neurony uczestniczące pośrednio lub bezpośrednio w regulacji dokrewnej oraz tworzące całość lub część narządu dokrewnego. Wypowiadając się na ten sam temat Picard [90] użył nieco innego sformułowania pisząc, że komórka neurosekrecyjna jest neuronem, który uzyskał funkcję dokrewną, będąc w takim razie komórką o dwojakiej specjalizacji. Ponieważ obie funkcje są nierozłączne, przeto komórka neurosekrecyjna jest zintegrowaną jednostką nerwowo-gruczołową, co można uznać za jej cechę specyficzną. Powołując się na sformułowania Picarda przypomnijmy również wypowiedź Scharrer [102], zalecającą odnoszenie terminu „neurosekrecja” tylko do takich elementów nerwowych, dla których cechą dominującą jest produkcja chemicznych mediatorów (hormonów). Wreszcie przypomnienia wymaga również stwierdzenie [116], że długotrwałe działanie neurohormonów jest taką cechą diagnostyczną, która wyklucza substancje przekaźnikowe spośród neurosekretów.

Uznając, że oba hormonotwórcze systemy podwzgórzowe kręgowców, tj. podwzgórzowo-przysadkowy i guzowo-lejkowy, spełniają kryteria neurosekrecji, Bern i Knowles [18] skonstatowali, że tylko takie neurony możemy uznać za neurosekrecyjne, które albo same uwalniają hormony do krwi, albo regulują syntezę lub uwalnianie hormonów przez gruczoły dokrewne. Autorzy ci dali również wyraz stanowisku, według którego podstawowymi kryteriami komórek neurosekrecyjnych nie są ani cechy morfologiczne (tj. ich charakter nerwowo-gruczołowy), ani biochemiczne (synteza określonych substancji), lecz tworzenie ostatniego ogniwa łączącego układu nerwowy z dokrewnym — wspólną drogę końcową, przenoszącą informacje nerwowe do systemu dokrewnego. Wychodząc z podobnych przesłanek, zwłaszcza uwzględniając podobieństwa między klasyczną neurosekrecją peptydergiczną i zjawiskami, które legły u podstaw teorii czynników regulujących, Knowles [71] wysunął propozycję, aby za komórki neurosekrecyjne uznać neurony peptydergiczne, łączące systemy nerwowy z dokrewnym i spełniające prawdziwie dokrewną funkcję.

KONTAKTY NERWOWO-EFEKTOROWE

Dopełnieniem przedstawionych informacji jest klasyfikacja powiązań czynnościowych ośrodkowego układu nerwowego z narządami efektorowymi, głównie gruczołami, przeprowadzona przez Scharrer [104]. Ponieważ wnosi ład i klarowność do wspomnianego zagadnienia, przeto zasługuje na przypomnienie.

I. Konwencjonalne połączenia nerwowo-efektorowe: (A) ciągłe, (1) neurohumoralne, (a) stwierdzone w takich narządach efektorowych, jak komórki części pośredniej przysadki [11, 34, 35, 85], komórki trzustki wysepkowej [25, 66, 82, 115, 128], kora nadnerczy [1, 124], komórki ciałek pozaskrzelowych i komórki parafolikularne tarczycy ssaków [93, 120, 135], komórki śródmiąższowe jąder i jajników [16, 22, 125] oraz corpora allata owadów [103], (b) gruczoły wydzielania zewnętrznego i włókna mięśniowe.

II. Niekonwencjonalne mechanizmy regulacji oparte na sygnalizacji neurochemicznej, docierającej do komórek efektorowych przez kanał naczyniowy obwodowy (neurohormony) lub wrotny (czynniki regulujące): (A) nieciągłe, (1) neurohormonalne; (a) oddziałujące na efekторы gruczołowe, jak komórki pars distalis przysadki wyższych kręgowców i gruczoły protorakalne owadów, oraz na b) efekторы nie będące gruczołami, a mianowicie: na komórki kanalików nefronów i mięśnie macicy, (2) neurohumoralne, (a) odnoszące się do pars distalis przysadki niektórych ryb [127] i gruczołów dokrewnych owadów oraz (b) mięśni gładkich i niektórych mięśni prążkowanych i w końcu (B) ciągłe, których przykładem są komórki części pośredniej przysadki [11] oraz komórki corpora cardiaca [99] unerwiane sekreto-motorycznie przez aksony komórek neurosekrecyjnych.

LITERATURA

- [1] ALVAREZ F. G., Estudio ultraestructural sobre la inervación de la corteza suprarenal, *An. Anat.*, **19**: 267-279, 1970.
- [2] Anonimowa redakcja, I. International Symposium on Neurosecretion, *Pubbl. Staz. Zool. Napoli* 24, Suppl. 1-98, 1954.
- [3] BARGMANN W., Über die neurosekretorische Verknüpfung von Hypothalamus und Neurohypophyse, *Z. Zellforsch.*, **34**: 610-634, 1949.
- [4] — Zwischenhirn und Neurohypophyse; eine neue Vorstellung über die funktionelle Bedeutung des Hinterlappens, *Med. Mschr. Stuttgart*, **5**: 466-470, 1951.
- [5] — Das Zwischenhirn-Hypophysen system, Springer, Berlin 1954.
- [6] — The neurosecretory system of the diencephalon, *Endeavour*, **19**: 125-133, 1960.
- [7] — Neurosecretion, *Int. Rev. Cytol.*, **19**: 183-201, 1966.
- [8] BARGMANN W., HANSTRÖM B., SCHARRER E. (eds.), II International Symposium on Neurosecretion, Berlin, Göttingen, Heidelberg, Springer 1958.
- [9] BARGMANN W., KNOOP A., Elektronmikroskopische Beobachtungen an der Neurohypophyse, *Z. Zellforsch.*, **45**: 242-251, 1957.
- [10] BARGMANN W., KNOOP A., THIEL A., Elektronenmikroskopische Studie an der Neurohypophyse von *Tropidonotus natrix* (mit Berücksichtigung der Pars intermedia), *Z. Zellforsch.*, **47**: 114-126, 1957.
- [11] BARGMANN W., LINDNER E., ANDRES K. H., Über Synapsen endokrinen Epitelzellen und die Definition sekretorischer Neurone. Untersuchungen am Zwischenlappen der Katzenhypophyse, *Z. Zellforsch.*, **77**: 282-298, 1967.

- [12] BARGMANN W., OKSCHE A., POLENOV A., SCHARRER B. (eds.), Neurosecretion and Neuroendocrine Activity, Evolution, Structure and Function. VII International Symposium on Neurosecretion, Springer, Berlin, Heidelberg 1978.
- [13] BARGMANN W., SCHARRER B. (eds.), Aspects of Neuroendocrinology. V International Symposium on Neurosecretion, Berlin, Heidelberg, New York, Springer 1970.
- [14] BARGMANN W., SCHARRER E., The site of origin of the hormones of the posterior pituitary, *Am. Sci.*, **39**: 255-259, 1951.
- [15] BARRY J., Les voies extra-hypophysaires de la neurosécrétion diencephalique, *Bull. Assoc. Anat.*, **89**: 464-476, 1956.
- [16] BAUMGARTEN H. G., HOLSTEIN A. F., Adrenerge Innervation im Hoden und Nebenhoden vom Schwan (*Cygnus olor*), *Z. Zellforsch.*, **91**: 402-410, 1968.
- [17] BERN H. A., HAGADORN I. R., Neurosecretion, [w] Structure and Function in the Nervous System of Invertebrates, Freeman, San Francisco 1965, 353-429.
- [18] BERN H. A., KNOWLES F., Neurosecretion, [w] Neuroendocrinology (Martini L., Ganong W. F., eds.), I: 139-186, Academic Press, New York, London 1966.
- [19] BERN H. A., NISHIOKA R. S., HAGADORN I. R., Association of elementary neurosecretory granules with the Golgi complex, *J. Ultrastruc. Res.*, **5**: 311-320, 1961.
- [20] — Neurosecretory granules and the organelles of neurosecretory cells, [w] Neurosecretion (Heller H., Clark R. B., eds.), Academic Press, New York 1962, 21-34.
- [21] CARLISLE D. B., KNOWLES F., Neurohaemal organs in crustaceans, *Nature*, **172**: 304, 1953.
- [22] DAHL E., Studies of the fine structure of ovarian interstitial tissue. III. The innervation of the thecal gland of the domestic fowl, *Z. Zellforsch.*, **109**: 212-226, 1970.
- [23] DeROBERTIS E., A general interpretation of neurosecretory microvesicles [w] Perspectives in Biology (Corti C. et al., eds.), Elsevier, Amsterdam 1963, 409-423.
- [24] — Histophysiology of synapses and neurosecretion, Oxford, Pergamon Press, 1964.
- [25] ESTERHUIZEN A. C., SPRIGGS T. L. B., LEVER J. D., Nature of islet-cell innervation in the cat pancreas, *Diabetes*, **17**: 33-36, 1968.
- [26] EVERETT J. W., The mammalian hypothalamo-hypophysial system, [w] The Endocrine Hypothalamus (Jeffcoate S. L., Hutchinson J. S. M., eds.), Academic Press, London, New York, San Francisco 1978, 1-33.
- [27] FALCK B., Cellular localization of monoamines, *Progress Brain Res.*, **8**: 28-44, Elsevier, Amsterdam 1964.
- [28] FALCK B., HILLARP N.-A., THIEME G., THORP A., Fluorescence of catecholamines and related compounds condensed with formaldehyde, *J. Histochem. Cytochem.*, **10**: 348-354, 1962.
- [29] FARMI F., Ueber Diabetes insipidus und Hypophysistherapie, *Wien klin. Wschr.*, **26**: 1867, 1913.
- [30] FINGERMAN M., Perspectives in crustacean endocrinology, *Scientia*, **55**: 1-23, 1970.
- [31] FISHER C., INGRAM W. R., RANSON S. W., Diabetes insipidus and the neurohormonal control of water balance: A contribution to the structure and function of the hypothalamico-hypophyseal system, Edwards Bros, Ann Arbor 1938.

- [32] FOLLENIUS E., Bases structurales et ultrastructurales des correlations diencéphalo-hypophysaires chez les sélaciens et les téléostéens, *Arch. Anat. micr. Morph. exp.*, **54**: 195–216, 1965.
- [33] — Cytologie des systèmes neurosécréteurs hypothalamo-hypophysaires des poissons téléostéens, [w] *Neurosecretion* (Stutinsky F., ed.) Springer 1967, 42–55.
- [34] — Innervation adrénérgique de la métaadénohypophyse de l'Épinoche (*Gasterosteus aculeatus* L.). Mise en évidence par autoradiographie au microscope électronique, *C. R. Acad. Sci. (Paris)*, **267D**: 1208–1211, 1968.
- [35] — Mise en évidence, au microscope électronique, de l'innervation de l'hypophyse de *Gasterosteus aculeatus* L. par la technique de Maillet Champy, *C. R. Acad. Sci. (Paris)*, **271D**: 1034–1037, 1970.
- [36] FOLLENIUS E., PORTE A., Etude des différents lobes de l'hypophyse de la Perche (*Perca fluviatilis* L.) au microscope électronique, *C. R. Soc. Biol.*, **155**: 128–131, 1961.
- [37] — Appearance, ultrastructure and distribution of the neurosecretory material in the pituitary gland of two teleost fishes, *Lebistes reticulatus* and *Perca fluviatilis*, (w) [57]: 51–69, 1962.
- [38] FRANK E., Über Beziehungen der Hypophyse zum Diabetes insipidus, *Berliner klin. Wschr.*, **49**: 393–397, 1912.
- [39] FUXE K., Cellular localization of monoamines in the median eminence and infundibular stem of some mammals, *Acta Physiol. Scand.*, **58**: 383–384, 1963.
- [40] — Cellular localization of monoamines in the median eminence and the infundibular stem of some mammals, *Z. Zellforsch.*, **61**: 710–724, 1964.
- [41] — Evidence for the existence of central monoamine neurons, M. D. Thesis, Stockholm 1965.
- [42] — Evidence for the existence of monoamine neurons in the central nervous system. III. The monoamine nerve terminals, *Z. Zellforsch.*, **65**: 573–596, 1965.
- [43] FUXE K., HÖKFELT T., Further evidence for the existence of tubero-infundibular dopamine, *Acta Physiol. Scand.*, **66**: 245–246, 1966.
- [44] — The influence of central catecholamine neurons on the hormone secretion from the anterior and posterior pituitary, (w) [121]: 165–177, Springer 1967.
- [45] — Participation of central monoamine neurons in the regulation of anterior pituitary function with special regard to the neuroendocrine role of tubero-infundibular dopamine neurons, (w) [13]: 192–205, 1970.
- [46] FUXE K., HÖKFELT T., NILSSON O., A fluorescence and electron microscopic study on certain brain regions rich in monoamine terminals, *Am. J. Anat.*, **117**: 33–45, 1965.
- [47] — Activity changes in the tubero-infundibular dopamine neurons of the rat during various stages of the reproductive cycle, *Life Sci.*, **6**: 2057–2061, 1967.
- [48] FUXE K., HÖKFELT T., JONSSON G., LOFSTROM A., Aminergic mechanisms in neuroendocrine control, (w) [75]: 269–275, 1974.
- [49] GASKELL J. F., The chromaffine system of annelids and the relation of this system to the contractile vascular system in the leech, *Phil. Trans.*, **205B**: 153–211, 1914.
- [50] GREEN J. D., Vessels and nerves of amphibian hypophysis. A study of the living circulation and of the histology of the hypophysial vessels and nerves, *Anat. Rec.*, **99**: 21–53, 1947.
- [51] GREEN J. D., HARRIS G. W., The neurovascular link between the neurohypophysis and adenohypophysis, *J. Endocr.*, **5**: 136–146, 1947.
- [52] GRIGNON G., Mise en évidence d'une activité antidiurétique d'extraits de

- quelques régions de l'encéphale chez la Tortue terrestre (*T. mauritanica* Dumer.), C. R. Soc. Biol., **155**: 1523–1526, 1961.
- [53] GRIGNON G., LAMARCHE M., Etude de l'activité ocytocique d'extraits de différentes parties du cerveau chez la Tortue terrestre (*Testudo mauritanica*), C. R. Soc. Biol., **153**: 2030–2032, 1959.
- [54] HARRIS G. W., Oestrus rhythm, pseudopregnancy and the pituitary stalk in the rat, J. Physiol. Lond., **111**: 347–360, 1950.
- [55] — Neural Control of the Pituitary Gland, Arnold, London 1955.
- [56] — Unsolved problems in the portal vessel-chemotransmitter hypothesis, [w] Hypophysiotropic Hormones of the Hypothalamus (Meites J., ed.), Williams and Wilkins, Baltimore 1970, 1–10.
- [57] HELLER H., CLARK R. B. (eds.), Neurosecretion, III International Symposium on Neurosecretion, Mem. Soc. Endocrinol., 12, Academic Press, London, New York 1962.
- [58] HELLER H., LEDERIS K., Characteristics of isolated neurosecretory vesicles from mammalian neural lobes, (w) [57]: 35–46, 1962.
- [59] HILD W., Experimentell-morphologische Untersuchungen über das Verhalten der "Neurosekretorischen Bahn" nach Hypophysenstiieldurchtrennungen, Eingriffen in den Wasserhaushalt und Belastung der Osmoregulation, Virchows Arch. path. Anat., **319**: 526–546, 1951.
- [60] HILD W., ZETLER G., Über die Funktion des Neurosekrets im Zwischenhirn-Neurohypophysen system als Trägersubstanz für Vasopressin, Adiuretin und Ocytocin, Z. exper. Med., **120**: 236–243, 1953.
- [61] — Experimenteller Beweis für die Entstehung der sog. Hypophysenhinterlappenwirkstoffe im Hypothalamus, Pflug. Arch. ges. Physiol. **257**: 169–201, 1953.
- [62] HILLARP N. A., FUXE K., DAHLSTRÖM A., Central monoamine neurons, [w] Mechanisms of Release of Biogenic Amines (Euler W. S. von, Rosell S., Uvnäs B., eds.), Pergamon Press, Oxford 1966, 31–57.
- [63] HINSEY J. C., MARKEE J. E., Pregnancy following bilateral section of the cervical sympathetic trunks in the rabbit, Proc. Soc. exp. Biol. Med., **31**: 270–271, 1933.
- [64] JEFFCOATE S. L., HUTCHINSON J. S. M. (eds.), The Endocrine Hypothalamus, Academic Press, London, New York, San Francisco 1978.
- [65] JOHNSON B., BOWERS B., Transport of neurohormones from the corpora cardiaca in insects, Science, **141**: 264–266, 1963.
- [66] KERN H. F., HOFMANN H. V., KERN D., Licht und elektronenmikroskopische Untersuchung der Langerhansschen Inseln von Nutria (*Myocastor coypus*) mit besonderer Berücksichtigung der neuroinsulären Komplexe, Z. Zellforsch., **113**: 216–229, 1971.
- [67] KLEINHOLZ L. H., Crustacean eyestalk hormones and retinal pigment migration, Biol. Bull., Woods Hole, **70**: 159–184, 1936.
- [68] KNOWLES F., The ultrastructure of a crustacean neurohaemal organ, (w) [57]: 71–88, 1962.
- [69] — Neuroendocrine correlations at the level of ultrastructure, Arch. Anat. micr. Morph. exp., **54**: 343–358, 1965.
- [70] — Evidence for a dual control, by neurosecretions, of hormone synthesis and hormone release in the pituitary of the dogfish, *Scyliorhinus stellaris*, Phil. Trans., **B249**: 435–456, 1965.
- [71] — Twenty years of neurosecretion, (w) [75]: 3–11, 1974.

- [72] KNOWLES F., CARLISLE D. B., Endocrine control in the crustacea, *Biol. Rev.*, **31**: 396–473, 1956.
- [73] KNOWLES F., VOLLRATH L., Neurosecretory innervation of the pituitary of the eels *Anguilla* and *Conger*. I. The structure and ultrastructure of the neuro-intermediate lobe under normal and experimental conditions, *Phil. Trans.*, **B250**: 311–327, 1966.
- [74] — Neurosecretory innervation of the pituitary of the eels *Anguilla* and *Conger*. II. The structure and innervation of the pars distalis at different stages of the life cycle, *Phil. Trans.*, **B250**: 329–431, 1966.
- [75] — (eds.), Neurosecretion — The Final Neuroendocrine Pathway, VI International Symposium on Neurosecretion, Springer, Berlin, Heidelberg, New York 1974.
- [76] KOPEĆ St., Experiments on metamorphosis of insects, *Bull. Acad. Sci. Cracovie*, **B**: 57–60, 1917.
- [77] — Studies on the necessity of the brain for the inception of insect metamorphosis, *Biol. Bull., Woods Hole*, **42**: 323–324, 1922.
- [78] LEDERIS K., Ultrastructure of the hypothalamo-neurohypophysial system in teleost fishes and isolation of hormone-containing granules from the neurohypophysis of the cod (*Gadus morrhua*), *Z. Zellforsch.*, **58**: 192–213, 1962.
- [79] LEGAIT H., LEGAIT E., Mise en évidence de voies neurosécrétoires chez quelques Batraciens et Reptiles, *C. R. Soc. Biol.*, **150**: 1429–1431, 1956.
- [80] — Les voies extra-hypophysaires des noyaux neurosécrétoires hypothalamiques chez les Batraciens et les Reptiles, *Acta Anat.* **30**: 429–433, 1957.
- [81] — Présence d'une voie neurosécrétoire hypothalamo-habénulaire et mise en évidence d'une activité antidiurétique au niveau des ganglions de l'habénula chez la Poule, *C. R. Soc. Biol.*, **152**: 828–830, 1958.
- [82] LEGG P. G., The fine structure and innervation of the beta and delta cells in the islet of Langerhans of the cat, *Z. Zellforsch.*, **80**: 307–321, 1967.
- [83] MARTINEZ P. M., The structure of the pituitary stalk and the innervation of the neurohypophysis in the cat. Thesis, Leiden 1960.
- [84] MEURLING P., The vascularization of the pituitary in elasmobranchs, *Sarsia*, **28**: 1–104, 1967.
- [85] MEURLING P., BJÖRKLUND A., The arrangement of neurosecretory and catecholamine fibres in relation to the pituitary intermedia cells of the skate, *Raja radiata*, *Z. Zellforsch.*, **108**: 81–92, 1970.
- [86] NOVÁK J. A., Insect Hormones. The Physiology, Morphology and Phylogeny of the Insect Endocrines, Methuen, London 1966.
- [87] NOWAKOWSKI H., Infundibulum und Tuber cinereum der Katze, *Dent. Z. Nervenheilk.*, **165**: 201–339, 1951.
- [88] ORTMANN R., Über experimentelle Veränderungen der Morphologie des Hypophysen-Zwischenhirnsystem und die Beziehung der sog. „Gomori-substanz“ zum Adiuretin“, *Z. Zellforsch.*, **36**: 92–149, 1951.
- [89] PALAY S. L., Neurosecretion. VII. The preoptico-hypophysial pathway in fishes, *J. comp. Neurol.*, **82**: 129–143, 1945.
- [90] PICARD D., The neurosecretory cell of vertebrates, *J. Neuro-Visc. Rel., Suppl.*, **9**: 23–62, 1969.
- [91] POPJÁK G., The pathway of pituitary colloid through the hypothalamus, *J. Path. Bact.*, **51**: 83–89, 1940.
- [92] RASMUSSEN A. T., Innervation of the hypophysis, *Endocrinology*, **23**: 263–278, 1938.
- [93] ROBERTSON D. R., The ultimobranchial body in *Rana pipiens*. III. Sympat-

- hetic innervation of the secretory parenchyma, *Z. Zellforsch.*, **78**: 328–340, 1967.
- [94] ROUSSY G., MOSINGER M., Étude anatomique et physiologique de l'hypothalamus, *Rev. neurol.*, **41**: 848–888, 1934.
- [95] SCHARRER B., Neurosecretion. IV. Localization of neurosecretory cells in the central nervous system of *Limulus*, *Biol. Bull., Woods Hole*, **81**: 96–104, 1941.
- [96] — Neurosecretion. XI. The effects of nerve section on the intercerebralis-cardiacum-allatum system of the insect *Leucophaea maderae*, *Biol. Bull., Woods Hole*, **102**: 261–272, 1952.
- [97] — The fine structure of the neurosecretory system of the insect *Leucophaea maderae*, *Mem. Soc. Endocrin.*, **12**: 89–97, 1962.
- [98] — Neurosecretion. XIII. The ultrastructure of the corpus cardiacum of the insect *Leucophaea maderae*, *Z. Zellforsch.*, **60**: 761–796, 1963.
- [99] — Histophysiological studies on the corpus allatum of *Leucophaea maderae*. IV. Ultrastructure during normal activity cycle, *Z. Zellforsch.*, **62**: 125–148, 1964.
- [100] — The stromal element in endocrine organs of insects, *Proc. VIII Int. Congr. Anat., Stuttgart, Thieme*, 1965, 107.
- [101] — Neurosecretion. XIV. Ultrastructural study of sites of release of neurosecretory material in blattarian insects, *Z. Zellforsch.*, **89**: 1–16, 1968.
- [102] — Neurohumors and neurohormones: definitions and terminology, *J. Neuro-Visc. Rel., Suppl.*, **9**: 1–20, 1969.
- [103] — General principles of neuroendocrine communication, [w] *The Neurosciences: Second study program* (Schmitt F. O., ed.), The Rockefeller University Press, New York 1970, 519–529.
- [104] — Neuroendocrine communication (Neurohormonal, neurohumoral, and intermediate), [w] *Topics in Neuroendocrinology* (Ariëns Kappers J., Schadé J. P., eds.), Elsevier, Amsterdam, London, New York 1972, 7–18.
- [105] SCHARRER E., Die Lichtempfindlichkeit blinder Elritzen (Untersuchungen über das Zwischenhirn der Fische I), *Z. vergl. Physiol.*, **7**: 1–38, 1928.
- [106] — The general significance of the neurosecretory cell, *Scientia*, **46**: 177–183, 1952.
- [107] — Neurosecretion in the vertebrates: a survey, (w) [2]: 8–10, 1954.
- [108] — General and phylogenetic interpretations of neuroendocrine interrelations, [w] *Comparative Endocrinology* (Gorbman A., ed.), John Wiley, New York 1959, 233–249.
- [109] — The final common path in neuroendocrine integration, *Arch. Anat. micr. Morph. exp.*, **54**: 359–370, 1965.
- [110] — SCHARRER E., SCHARRER B., Secretory cells within the hypothalamus, *Res. Publ. Assoc. Nerv. ment. dis.*, **20**: 170–194, 1940.
- [111] — Neurosekretion, [w] *V. Möllendorf Handb. d. mikr. Anat.*, VI/5, Springer, Berlin 1954.
- [112] — *Neuroendocrinology*, Columbia University Press, New York 1963.
- [113] SCHNEIDER H. P., McCANN S. M., Possible role of dopamine as transmitter to promote discharge of LH-releasing factor, *Endocrinology*, **85**: 121–132, 1969.
- [114] — Dopaminergic pathways and gonadotropin releasing factors, (w) [13]: 177–191, 1970.
- [115] — SHORR S. S., BLOOM F. E., Fine structure of islet cell innervation in the pancreas of normal and alloxan, treated rats, *Z. Zellforsch.*, **103**: 12–25, 1970.
- [116] SIMPSON L., BERN H. A., NISHIOKA R. S., Survey of evidence for neurosecretion in gastropod molluscs, *Am. Zool.*, **6**: 123–138, 1966.

- [117] SPATZ H., Neues über die Verknüpfung von Hypophyse und Hypothalamus, *Acta Neuroveget. (Vienna)*, **3**: 1-49, 1951.
- [118] SPEIDEL C. S., Gland-cells of internal secretion in the spinal cord of the skates, *Carnegie Inst. Wash. Publ.*, **13**: 1-31, 1919.
- [119] STAHL A., LERAY C., The relationship between diencephalic neurosecretion and the adenohypophysis in the teleost fishes, (w) [57]: 149-163, 1962.
- [120] STOECKEL M. E., PORTE A., Sur l'ultrastructure des corps ultimobranchiaux du Poussin, *C. R. Acad. Sci.*, **D265**: 2051-2053, 1967.
- [121] STUTINSKY F. (ed.), Neurosecretion, IV International Symposium on Neurosecretion, Springer, Berlin, Heidelberg, New York 1967.
- [122] SWAAB D. F., The hypothalamo-neurohypophysial system and reproduction, [w] *Topics in Neuroendocrinology* (Ariëns Kappers J., Schadé J. P., eds.), Elsevier, Amsterdam, London, New York 1972, 225-244.
- [123] THOMSEN E., Studies on the transport of neurosecretory material in *Calliphora erythrocephala* by means of ligaturing experiments, *J. Exp. Biol.*, **31**: 332-330, 1954.
- [124] UNSICKER K., Zur Innervation der Nebennierenrinde von Goldhamster. Eine fluoreszenz und elektronenmikroskopische Studie, *Z. Zellforsch.*, **95**: 608-619, 1969.
- [125] — Zur Innervation der interstitiellen Drüse im Ovar der Maus (*Mus musculus* L.). Eine fluoreszenz- und elektronmikroskopische Studie, *Z. Zellforsch.*, **109**: 46-54, 1970.
- [126] VAN den VELDEN R., Die nierenwirkung von Hypophysenextrakten beim Menschen, *Berliner klin. Wschr.*, **50**: 2083-2086, 1913.
- [127] VOLLRATH L., Über die neurosekretorische Innervation der Adenohypophyse von Teleostiern, insbesondere von *Hippocampus cauda* und *Tinca tinca*, *Z. Zellforsch.*, **78**: 234-260, 1967.
- [128] WATARI N., Fine structure of nervous elements in the pancreas of some vertebrates, *Z. Zellforsch.*, **85**: 291-314, 1968.
- [129] WELSH J. H., Neurohumors and neurosecretion, [w] *The Physiology of Crustacea*, vol. II: 281-311, Academic Press, New York, London 1961.
- [130] WHITTEN J. M., Connective tissue membranes and their apparent role in transporting neurosecretory and the secretory products in insects, *Gen. comp. Endocrinol.*, **4**: 176-192, 1964.
- [131] WIGGLESWORTH V. B., The determination of characters et metamorphosis in *Rhodinus prolixus* (Hemiptera), *J. Exp. Biol.*, **17**: 201-222, 1940.
- [132] — The physiology of insect metamorphosis, Cambridge University Press 1954.
- [133] WILLIAMS C. M., Physiology of insect diapause: the role of the brain in the production and termination of pupal dormancy in the giant silkworm *Platysamia cecropia*, *Biol. Bull., Woods Hole*, **90**: 234-243, 1946.
- [134] WISLOCKI G. B., KING L. S., The permeability of the hypophysis and hypothalamus to vital dyes, with a study of the hypophyseal vascular supply, *Am. J. Anat.*, **58**: 421-472, 1936.
- [135] YOUNG B. A., HARRISON R. J., Ultrastructure of light cells in the dolphin thyroid, *Z. Zellforsch.*, **96**: 222-228, 1969.

Otrzymano: 1 grudnia 1979.

Przyjęto: 15 grudnia 1979.

Adres autora: ul. Karasia 6, 30-050 Kraków.

BIOGENEZA I DEGRADACJA GLIKOPROTEIDÓW BŁON PLAZMATYCZNYCH EUKARIOTÓW

BIOGENESIS AND DEGRADATION OF PLASMA MEMBRANE GLYCOPROTEINS OF EUKARIOTES

Danuta KILCZEWSKA i Ryszard FARBISZEWSKI

Instytut Chemii i Biofizyki Akademii Medycznej w Białymstoku

Streszczenie. Przedstawiono współczesne poglądy na biosyntezę i degradację glikoproteidów integralnie związanych z błoną komórkową. Większość autorów wyraża pogląd, że są one syntetyzowane przez rybosomy związane z błonami i stanowią specjalną klasę białek wydzielniczych. Ich glikozylacja odbywa się wewnątrz kanałików siateczki śródplazmatycznej oraz w aparacie Golgiego przy udziale pośredników lipidowych lub specyficznych transferaz glikozyłowych. Wymiana glikoproteidów błon komórkowych odbywa się w drodze pinocytozy, przy udziale enzymów lizosomalnych lub też za pomocą egzogennych proteaz. Poglądy odnośnie do całkowitej ich degradacji są kontrowersyjne.

Summary. Modern views on the biogenesis and degradation of plasma membrane glycoproteins have been presented. Most authors have suggested that these glycoproteins are synthesized on bound ribosomes and are a special class of secretory proteins. Glycosylation of protein takes place inside the endoplasmic reticulum and Golgi apparatus, with contribution of lipid intermediates or glycosyltransferases. Pinocytosis is involved in the exchange of plasma membrane glycoproteins. Pinocytotic vesicles become fused with lysosomes, next glycoproteins are degraded by lysosomal enzymes. Degradation may take place by exopeptidases.

The views dealing with total degradation of glycoproteins are controversial.

Wykaz stosowanych skrótów

SDS — siarczan dodecyłu sodu

UDP-galaktoza — urydynodwufosfogalaktoza

UDP-N-acetyloglukozamina — urydynodwufosfo-N-acetyloglukozamina

Błony komórek eukariotów są zbudowane z dwumolekularnej warstwy lipidowej, w której częściowo lub całkowicie zagłębione są resztami hydrofobowymi białka. Klasę białek trwale wbudowanych w błony naz-

wano białkami integralnymi. Białka przyłączone do powierzchni wiązaniami niekowalencyjnymi określono terminem białek powierzchniowych. Węglowodany połączone z białkami lub lipidami występują w warstwie zewnętrznej błon [58, 74–76].

Glikoproteidom błon komórkowych przypisuje się ważną rolę w wielu procesach biologicznych: we wzajemnym rozpoznawaniu i łączeniu komórek [26, 31, 69, 70], w wiązaniu do nich różnych substratów [18, 39, 80], w procesie transportu przez błony [16, 17, 32, 64, 67], w kontroli wzrostu [26] oraz transformacji nowotworowej [14, 15, 28, 29, 46].

Poznanie metabolizmu glikoproteidów błon plazmatycznych może mieć istotne znaczenie dla zrozumienia i wyjaśnienia szeregu ich funkcji.

W artykule zostały omówione zagadnienia dotyczące biogenezy i degradacji glikoproteidów integralnie związanych z błoną komórkową. Brak danych w ostatnich latach na ten temat w literaturze polskiej skłonił nas do dokonania przeglądu osiągnięć w tej dziedzinie.

I. BIOGENEZA GLIKOPROTEIDÓW BŁON PLAZMATYCZNYCH

Chociaż glikoproteidy, jako składniki błon komórkowych, są dość dobrze poznane, to ich biogeneza nie jest w pełni wyjaśniona. Poglądy na ten temat nie są jednoznaczne. Niektórzy autorzy [12, 13] uważają, że integralne białka błon plazmatycznych są syntetyzowane przez rybosomy wolne i jako cząsteczki rozpuszczalne wnikają resztami hydrofobowymi w dwumolekularną warstwę lipidową. Reszty cukrowe natomiast są dołączane do białka od strony środowiska błony przez swoiste transferazy glikozyłowe. Za tą hipotezą przemawiają np. spostrzeżenia dotyczące przenoszenia monosacharydów przy udziale transferaz glikozyłowych z nukleotydowych pochodnych monosacharydów do glikoproteidów błon plazmatycznych komórek nabłonka jelita cienkiego szczurów. Wskazuje na to obecność glikoproteidów o niecałkowicie zsyntetyzowanym łańcuchu oligosacharydowym w błonie komórkowej [87].

Również specyficzna struktura glikoproteidu α oraz glikoforyny, występujących w błonie erytrocytów, przemawia za tą hipotezą. Cząsteczki obu glikoproteidów mają charakter hydrofilowo-hydrofobowo-hydrofilowy [11, 72]. N-końcowe fragmenty łańcuchów peptydowych, zbudowane w większości z aminokwasów obojętnych, umieszczone są w zewnętrznej warstwie błony, C-końcowe fragmenty łańcuchów o charakterze hydrofilowym występują w warstwie cytoplazmatycznej [10, 37, 55, 62, 72]. W taki sposób zbudowane łańcuchy peptydowe (bez węglowodanów) prawdopodobnie przenikają przez błonę i następnie ulegają glikozyłacji [12]. Łańcuchy oligosacharydowe dobudowane od strony zewnątrzkomórkowej „umocowują” glikoproteidy w warstwie lipidowej błony [13] i tak

zbudowane glikoproteidy wykazują charakter hydrofilowo-hydrofobowo-hydrofilowy. Hipoteza ta nie wyjaśnia złożonej sekwencji monosacharydów występujących w glikoproteidach, których różnice w komórkach dojrzałych uzależnione są od mechanizmów regulujących translację. Oligosacharydy zbudowane z tego samego monosacharydu mogłyby służyć do „umocowania” białka w błonie.

Większość autorów uważa, że glikoproteidy błon plazmatycznych są syntetyzowane przez rybosomy związane z błonami siateczki śródplazmatycznej ziarnistej i stanowią specjalną klasę białek wydzielniczych. Glikozylacja białek, prowadząca do wytworzenia wiązania O-glikozydowego, zachodzi poprzez przeniesienia pojedynczej reszty glikozydowej z odpowiedniego nukleotydofosfocukru na akceptor białkowy, a następnie kolejne przyłączanie reszt cukrowych. Reakcja jest katalizowana przez glikozylotransferazy specyficzne zarówno w stosunku do substratu, jak i do akceptora. Glikozylacja rozpoczyna się, kiedy akceptor białkowy jest wciąż jeszcze połączony z rybosomami [30, 66]. Po przyłączeniu pierwszego cukru białko uwalnia się od rybosomu do światła kanalika siateczki śródplazmatycznej ziarnistej. Powstanie wiązania N-glikozydowego jest procesem bardziej złożonym i przebiega z udziałem fosforanów poliprenoli, które pełnią funkcję przenośników reszt cukrowych w transglikozylacji. Dotyczy to jedynie syntezy części rdzeniowej oligosacharydów. Tak zsintetyzowane, częściowo glikozylowane glikoproteidy uwolnione od rybosomów są następnie transportowane do aparatu Golgiego. W nim następuje dołączenie reszt glikozylowych stanowiących część korową łańcucha oligosacharydowego. Proces ten zachodzi na drodze przeniesienia reszt cukrowych z nukleotydowych pochodnych monosacharydów w obecności transferaz glikozylowych bez udziału pośredników lipidowych [66]. Pęcherzyki wydzielnicze aparatu Golgiego, zawierające mieszaninę różnych glikoproteidów, przemieszczają się w kierunku powierzchni komórki i ulegają fuzji z błonami komórkowymi. Prowadzi to do wbudowania nowych struktur glikoproteidowych w błony komórkowe [24, 34, 50, 65, 78, 79, 90].

Za takim modelem biosyntezy glikoproteidów błon plazmatycznych przemawiają badania autoradiograficzne przeprowadzone przez wielu autorów [6, 24, 34]. Po podaniu zwierzętom doświadczalnym L-[³H]-fukozy, monosacharydu występującego w części korowej łańcucha oligosacharydowego wielu glikoproteidów błonowych, stwierdzono jej obecność w aparacie Golgiego już po 2–10 minutach w ponad 50 typach różnych komórek [6] (tabela). Stanowi to dowód, że fukoza wbudowuje się do glikoproteidów w cysternach aparatu Golgiego, gdzie następuje całkowita synteza tych związków. W późniejszym okresie po podaniu L-[³H]-fukozy stwierdzono również wysoką radioaktywność w aparacie Golgiego oraz pojawienie się jej w innych przedziałach komórki, w tym w błonach plazmatycz-

TABELA

Komórki, w których [³H]-fukoza jest przemieszczana z aparatu Golgiego na ich powierzchnię [6]

	Autoradiograficzna lokalizacja [³ H]-fukozy w czasie					
	2–10 min		20–30 min		4 godz.	
	aparat Golgiego	powierzchnia komórki	aparat Golgiego	powierzchnia komórki	aparat Golgiego	powierzchnia komórki
Komórki walcowate kosmków dwunastnicy	+++	—	+++	+++ A ++ B	++	+++ A ++ L
Komórki walcowate krypt błony śluzowej dwunastnicy	++	—	++	+++ A + L	—	++ A
Komórki walcowate kosmków jelita czczego	++	—	++	+++ A ++ L	+	+++ A + L
Komórki walcowate krypt jelita czczego	++	—	++	++ A	—	+++ A
Hepatocyty	+++	—	++	++ A	—	++ A + L
Komórki kanalika nerkowego krętego	+	—	+	+ A	—	+++ A + B
Komórki kanalika nerkowego pętli nefronu	++	—	+++	+++ A	—	+++ A + B
Limfocyty	+	—	+	+	—	+

A — lokalizacja na szczycie komórki, B — lokalizacja wzdłuż powierzchni podstawy komórki, L — lokalizacja wzdłuż powierzchni bocznej komórki.

+ — reakcja słabo dodatnia, ++ — reakcja dodatnia, +++ — reakcja wyraźnie dodatnia, — — reakcja ujemna.

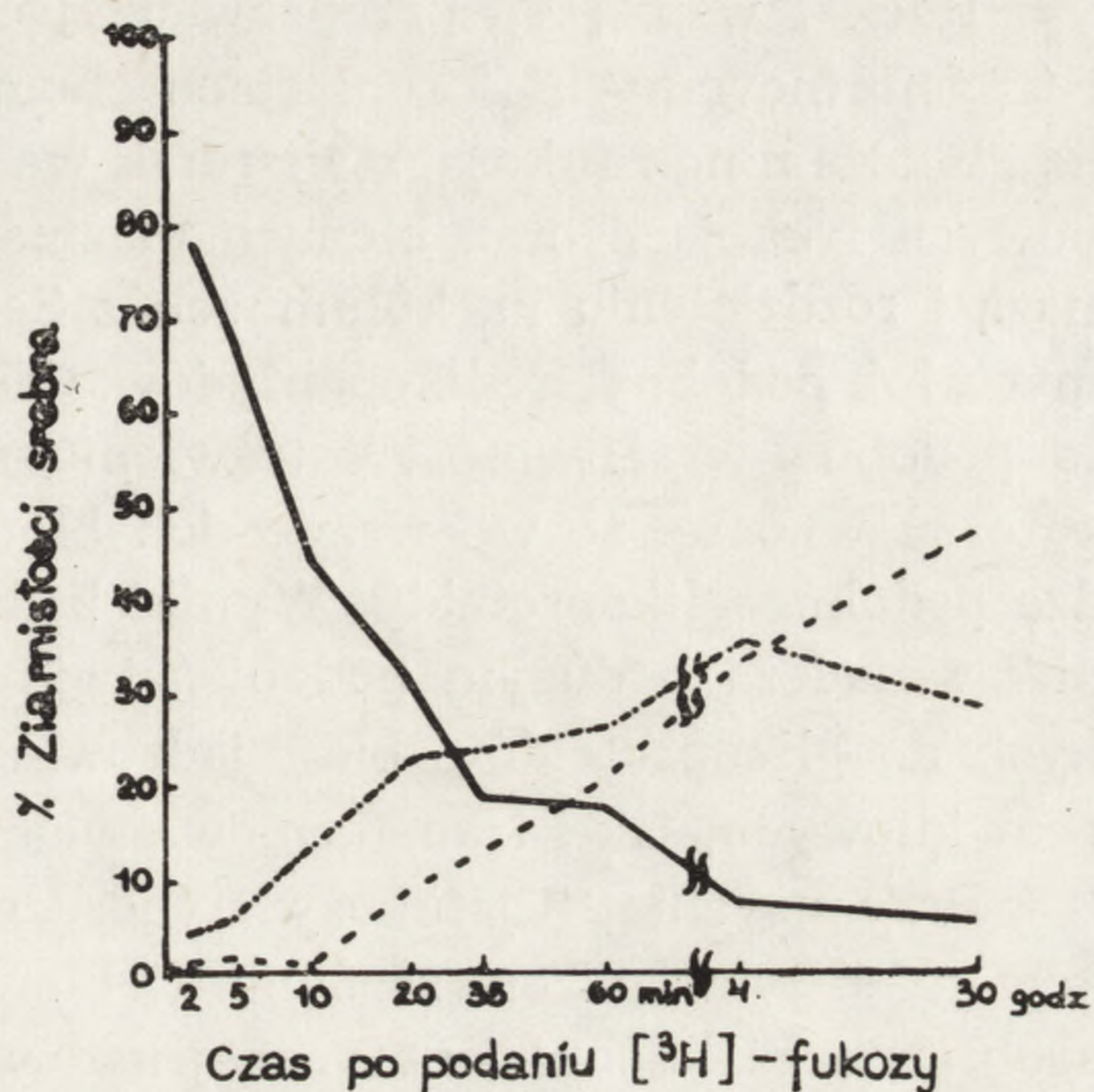
nych (ryc. 1, tabela). Na tej podstawie sądzi się, że nowo zsyntetyzowane glikoproteidy po wbudowaniu fukozy w aparacie Golgiego przemieszczają się w kierunku powierzchni komórki, gdzie są następnie włączane do błon plazmatycznych. Podobne wyniki uzyskano *in vivo* po podaniu L-[³H]-fukozy szczurom lub myszom dla komórek nabłonka kanalików nerkowych [34].

Zgodnie z tą koncepcją aparat Golgiego oprócz błon ziarnistej i gładkiej siateczki śródplazmatycznej jest organellą komórkową odgrywającą ważną rolę w procesie glikozylacji białek, determinacji sekwencji monosacharydów w łańcuchach glikoproteidów oraz ich przekazywaniu do błon komórkowych [65, 78, 79, 90] (ryc. 2).

Ryc. 1. Rozmieszczenie [^3H]-fukozy w komórkach walcowatych błony śluzowej dwunastnicy szczurów w różnych odstępach czasu [6]

— aparat Golgiego, — · — boczna powierzchnia błony komórkowej, — — — — szczytowa powierzchnia błony komórkowej

W świetle tych obserwacji można sądzić, że determinanty cukrowe glikoproteidów błon erytrocytów, znajdujące się pod kontrolą genetyczną, jednocześnie zależą od zdolności aparatu Golgiego do przyłączania odpowiednich monosacharydów do łańcuchów oligosacharydowych glikoproteidów [90]. Zatem aparat Golgiego odgrywa bardzo ważną rolę w procesach anabolicznych komórki. Uczestniczy w biosyntezie glikoproteidów i glikolipoproteidów oraz bierze udział w tworzeniu lizosomów i transformacji błon zarówno wewnętrznych jak i błony komórkowej [35,47].



Wielu autorów zwraca uwagę na znaczne podobieństwo między błonami aparatu Golgiego a błonami plazmatycznymi. Za pomocą elektroforezy w żelu poliakrylamidowym z SDS-em wykazano analogię w ruchliwości elektroforetycznej białek błon plazmatycznych i białek błon aparatu Golgiego komórek wątrobowych szczura [36] oraz hodowlanych komórek wątrobiaka [24]. Varga i wsp. [82] stwierdzili także podobieństwo między glikoproteidem receptorowym melanotropiny błon plazmatycznych oraz błon aparatu Golgiego w komórkach czerniaka myszy. Zaobserwowano, że aktywność niektórych enzymów (ATP-azy K^+ i Na^+ zależnej, transferaz glikozylowych oraz cyklazy adenyłowej) jest tego samego rzędu w błonach plazmatycznych i błonach aparatu Golgiego komórek nabłonkowych kosmków jelitowych szczura [88].



Ryc. 2. Wewnątrzkomórkowy transport glikoproteidów błon plazmatycznych [78]

Wielu autorów zwraca uwagę na znaczne podobieństwo między błonami aparatu Golgiego a błonami plazmatycznymi. Za pomocą elektroforezy w żelu poliakrylamidowym z SDS-em wykazano analogię w ruchliwości elektroforetycznej białek błon plazmatycznych i białek błon aparatu Golgiego komórek wątrobowych szczura [36] oraz hodowlanych komórek wątrobiaka [24]. Varga i wsp. [82] stwierdzili także podobieństwo

między glikoproteidem receptorowym melanotropiny błon plazmatycznych oraz błon aparatu Golgiego w komórkach czerniaka myszy. Zaobserwowano, że aktywność niektórych enzymów (ATP-azy K^+ i Na^+ zależnej, transferaz glikozylowych oraz cyklazy adenyłowej) jest tego samego rzędu w błonach plazmatycznych i błonach aparatu Golgiego komórek nabłonkowych kosmków jelitowych szczura [88].

Buck i wsp. [14], przeprowadzając doświadczenia na prawidłowych i transformowanych fibroblastach chomika inkubowanych z radioaktywną glukozaminą i fukozą, stwierdzili we wszystkich podkomórkowych błonowych frakcjach oraz błonach plazmatycznych (po strawieniu ich pronazą i rozdzieleniu na kolumnach z Sephadex G-50) obecność takich samych lub podobnych glikopeptydów. Glikopeptydy te wykazywały ponadto podobną wrażliwość na trawienie neuraminidazą. Na tej podstawie autorzy wnoszą, że we wszystkich błonowych frakcjach występują bardzo podobne glikoproteidy. Wyniki badań Keshgegian i Glicka [46] również świadczą o dużym podobieństwie glikoproteidów błon plazmatycznych do glikoproteidów błon jądrowych zarówno fibroblastów chomika prawidłowych, jak i transformowanych.

Przy użyciu [^{14}C]-fukozy stwierdzono obecność glikoproteidów znakowanych tym cukrem zarówno w błonach plazmatycznych, jak i w błonach siateczki śródplazmatycznej hodowlanych komórek wątrobiaka [24]. Jednocześnie wykazano, że skład, wielkość cząsteczki oraz sposób wiązania z błoną glikoproteidów błon komórkowych są bardzo podobne do glikoproteidów wewnętrznych błon śródkomórkowych. Można zatem przypuszczać, zgodnie z poglądami innych autorów [14, 15, 24, 46, 91], że część glikoproteidów błon siateczki śródplazmatycznej jest bezpośrednim prekursorem glikoproteidów błon plazmatycznych. Doyle i wsp. [24] uważają ponadto, że istniejąca w wewnętrznych przedziałach komórki pula jednostek glikoproteidowych uczestniczy w kontroli biogenezy glikoproteidów błon plazmatycznych. Może być ona wykorzystana w przypadku konieczności wymiany jednostek glikoproteidowych w błonie. Jednostki te mogą ulegać przemieszczeniu wewnątrz błonowemu, zachodzącemu w procesie tzw. tworzenia „czapeczek” („capping mechanism”) [26], lub wówczas, kiedy stężenie białka jest modulowane przez hormon, np. receptory insuliny w błonie są modulowane przez insulinę. Zdaniem autorów wymiana białka w błonie może zachodzić trzema drogami:

1. poprzez wbudowanie całkowicie zsyntetyzowanego białka z wewnętrznych przedziałów błonowych do błony plazmatycznej,
2. przez tworzenie nowych jednostek błonowych z niecałkowicie zsyntetyzowanych białkowych podjednostek, które następnie wbudowują się do błony,
3. przez przekształcenie białek w wewnętrznych jednostkach błonowych i ich zagęszczenie przed wbudowaniem do błony.

Doyle i wsp. [24] na podstawie wyników własnych badań jak i spostrzeżeń innych autorów [3, 81] uważają, że biogeneza glikoproteidów błon plazmatycznych przebiega w podobny sposób jak biogeneza glikoproteidów wydzielniczych. Związki te różnią się tylko powinowactwem wobec lipi-

dów błonowych. Za taką hipotezą przemawia również obserwacja, że do uwolnienia glikoproteidów związanych z błoną stosuje się większe stężenie dezoksycholenu sodu [51, 52].

Wykazano, że prolaktyna — glikoproteid wydzielniczy współzawodniczy o miejsce w błonie z powstającymi glikoproteidami wirusa opryszczkowego zapalenia jamy ustnej. Właściwości takich nie wykazywała globulina królicza [54]. Dane te potwierdzają przypuszczenie, że początkowo droga biosyntezy białek wydzielniczych i niektórych białek integralnych błon komórkowych jest wspólna.

Badania przeprowadzone przez Dallnera i wsp. [4, 5, 20, 21, 27] nad biogenezą glikoproteidów błon siateczki śródplazmatycznej wątroby szczura z zastosowaniem radioaktywnej D-N-acetyloglukozaminy i L-leucyny również wskazują, że ich synteza odbywa się na rybosomach związanych z błonami siateczki śródplazmatycznej ziarnistej. Dotychczas przyjmowano, że całkowicie zsyntetyzowane glikoproteidy z aparatu Golgiego dostają się do cytosolu, a następnie są przenoszone do błon siateczki śródplazmatycznej gładkiej i ziarnistej. Badania przeprowadzone z zastosowaniem UDP-N-acetyloglukozaminy i UDP-galaktozy wskazują na obecność dwóch różnych typów fosforanów poliprenoli w błonach siateczki śródplazmatycznej, uczestniczących w przenoszeniu reszt glikozyłowych na endogenne akceptor białkowy [2, 7]. Wyniki tych badań wskazują na obecność pośredników lipidowych na powierzchni cytoplazmatycznej błon siateczki śródplazmatycznej i aparatu Golgiego. Autorzy sugerują, że nowo zsyntetyzowane białka błonowe, po uwolnieniu od rybosomów związanych z błonami, przemieszczają się wzdłuż powierzchni cytoplazmatycznej błon siateczki śródplazmatycznej do aparatu Golgiego, ulegając glikozylacji przy udziale pośredników lipidowych znajdujących się na ich powierzchni. Rozpuszczalne lipoglikoproteidowe kompleksy są uwalniane do cytosolu i następnie „wbudowane” od strony powierzchni cytoplazmatycznej do błon siateczki śródplazmatycznej. Białka typowo wydzielnicze są natomiast glikozyłowane wewnątrz kanalików siateczki śródplazmatycznej. Być może w podobny sposób mogą wbudowywać się pojedyncze glikoproteidowe jednostki do błon plazmatycznych, lecz jak dotychczas nie zostało to wyjaśnione.

Blobel i Dobberstein [8, 9] uważają, że synteza wszystkich białek w komórce rozpoczyna się na wolnych rybosomach. Białka przemieszczane przez błony różnią się od białek cytoplazmatycznych tzw. „sekwencją sygnałową”. Wyłaniający się podczas procesu translacji z dużej jednostki rybosomowej łańcuch peptydowy zawierający „sekwencję sygnałową” zostaje rozpoznany przez białka błonowe. Dochodzi do luźnej asocjacji białkowych receptorów i utworzenia „tunelu” w błonie, przez który może wniknąć łańcuch peptydowy do światła kanalika ziarnistej siateczki śród-

plazmatycznej. Utworzony „tunel” jest stabilizowany przez białka rybosomowe i nie stanowi trwałej struktury w błonie. Po zakończeniu procesu translacji część łańcucha peptydowego zawierającego „sygnałową sekwencję” zostaje odszczepiona od strony N-końca, rybosom oddysocjowuje od błony, a „tunel” ulega eliminacji. W ten sposób odbywa się synteza białek wydzielniczych oraz białek przemieszczanych przez błony.

Von Heijne i Blomberg [84] krytykują hipotezę o powstawaniu „tunelu” w błonie ziarnistej siateczki śródplazmatycznej podczas procesu translacji białek wydzielniczych i błonowych. Uważają, że tworzenie „tunelu” jest nieuzasadnione z punktu widzenia fizykochemicznego i ewolucyjnego. Komórki na niższym poziomie rozwoju nie mogłyby wówczas produkować białek wydzielniczych. Autorzy zgodni są natomiast co do istnienia części łańcucha peptydowego w białkach wydzielniczych i błonowych spełniającej rolę prekursorową. Ta hydrofobowa część łańcucha o strukturze α -helikalnej wiąże się z błoną, w następstwie czego dochodzi do połączenia dużej jednostki rybosomowej z błoną ziarnistej siateczki śródplazmatycznej. Następnie dokonuje się biosynteza łańcucha peptydowego o charakterze silnie hydrofilowym. Początkowa hydrofobowa część łańcucha wnikająca do kanałika siateczki śródplazmatycznej służy do przemieszczania przez błonę pozostałej części łańcucha i pozwala na związanie nawet silnie hydrofilowej reszty z lipofilowymi składnikami błony. Białka cytoplazmatyczne nie posiadają prekursorowej części łańcucha peptydowego i dlatego są syntetyzowane przez rybosomy nie związane z błonami.

Potwierdzeniem hipotezy o istnieniu prekursorowej części łańcucha peptydowego są badania Lingappa i wsp. [54] oraz Irvinga i wsp. [43]. Specyficzny glikoproteid wirusa wywołującego opryszczkowe zapalenie jamy ustnej, przemieszczany przez błony komórkowe, zawiera „sygnałową sekwencję” od strony N-końca. W skład części łańcucha odpowiedzialnego za „sygnałową sekwencję” wchodzi 16 aminokwasów. Są one odszczepiane w czasie przenikania łańcucha peptydowego przez błony siateczki śródplazmatycznej przed całkowitym zakończeniem jego syntezy. Proces glikozylacji zachodzi w świetle kanałików siateczki śródplazmatycznej. Być może, że „sygnałową sekwencję” zawierają również glikoproteidy błon plazmatycznych, lecz jak dotychczas brak jest na ten temat doniesień.

II. WYMIANA GLIKOPROTEIDÓW BŁON PLAZMATYCZNYCH I ICH DEGRADACJA

Glikoproteidy błon plazmatycznych, podobnie jak wszystkie glikoproteidy i białka komórek eukariotów, ulegają ustawicznej degradacji

i odnowie. Pogląd taki oparto na badaniach glikoproteidów błon komórek wątrobowych [22, 23, 33, 53, 73]. Stwierdzono, że białka błon plazmatycznych rozpuszczalne i nierozpuszczalne w wodzie różnią się okresem połowicznego zaniku. Białka frakcji rozpuszczalnej wykazują krótszy okres połowicznego zaniku [73]. Podobne wyniki uzyskano w odniesieniu do glikoproteidów mózgu szczura [57].

Szybkość degradacji glikoproteidów błon plazmatycznych zależy, podobnie jak białek cytoplazmatycznych, od masy cząsteczkowej. Na ogół glikoproteidy o dużej masie cząsteczkowej ulegają szybszej degradacji niż glikoproteidy o małej masie cząsteczkowej [1, 22, 23, 53]. Podobne spostrzeżenia poczynili inni autorzy w odniesieniu do glikoproteidów błon plazmatycznych komórek wątrobowych myszy [33], rąbka szczoteczkowego komórek kosmków jelitowych szczura [1], błon plazmatycznych komórek nerwiaka N2a [40, 59] oraz glikoproteidów błon plazmatycznych komórek nabłonka kanalików nerkowych małpy Rhesus (komórki MK₂) [45]. Istnieją jednak w komórce glikoproteidy o dużej masie cząsteczkowej, których proces degradacji zachodzi wolniej od glikoproteidów o małej masie cząsteczkowej. I tak, integralnie związany z błoną plazmatyczną glikoproteid — epiglikanina — komórek gruczolaka TA3-Ha myszy o dużej masie cząsteczkowej ma znacznie dłuższy okres połowicznego zaniku w porównaniu z innymi glikoproteidami tych komórek o mniejszej masie cząsteczkowej [60].

Zaobserwowano ponadto, że istnieje korelacja między okresem połowicznego zaniku glikoproteidów błon plazmatycznych a fazą wzrostu oraz zróżnicowaniem komórek [44, 45, 63, 86]. Stwierdzono znaczną heterogenność okresu połowicznego zaniku glikoproteidów błon komórek nabłonka kanalików nerki małpy Rhesus (komórki MK₂) w fazie wykładniczego wzrostu. Komórki w fazie stacjonarnej, wykazujące właściwości hamowania kontaktowego, posiadają glikoproteidy błon o znacznie mniejszych różnicach okresu połowicznego zaniku [45].

W badaniach na fibroblastach myszy stwierdzono znacznie dłuższy okres połowicznego zaniku glikoproteidów błon plazmatycznych w fazie logarytmicznego wzrostu niż w fazie spoczynkowej. Natomiast nie wykazano istotnych różnic w szybkości wbudowywania się radioaktywnych prekursorów ([¹⁴C]-leucyny i [¹⁴C]-glukozaminy) do glikoproteidów błon plazmatycznych tych komórek w obu fazach wzrostu. Na tej podstawie autorzy wnoszą, że komórki będące zarówno w fazie wzrostu, jak i w fazie spoczynkowej syntetyzują z taką samą szybkością glikoproteidy, a związki te różnią się jedynie okresem połowicznego zaniku [85].

W regenerujących się komórkach wątrobowych szczura (po częściowej hepatektomii) stwierdzono tylko nieznaczne przedłużenie okresu połowicznego zaniku glikoproteidów błon plazmatycznych znakowanych fu-

kożą. Wskazuje to, że rozpad cząsteczek znakowanych fukożą zmienia się tylko nieznacznie w czasie regeneracji komórek wątroby [77].

Różnice w okresie połowicznego zaniku glikoproteidów błon plazmatycznych mogą zależeć od funkcji, jaką spełniają one na powierzchni błon komórkowych. Na przykład niektóre glikoproteidy receptorowe hormonów [25] i wirusów [71] mają krótszy okres połowicznego zaniku.

Stwierdzono ponadto, że degradacja glikoproteidów błon komórkowych *in vitro* przy użyciu enzymów hydrolitycznych powoduje przyspieszenie ich odnowy, po usunięciu enzymów ze środowiska [41, 42, 48, 49, 56, 61].

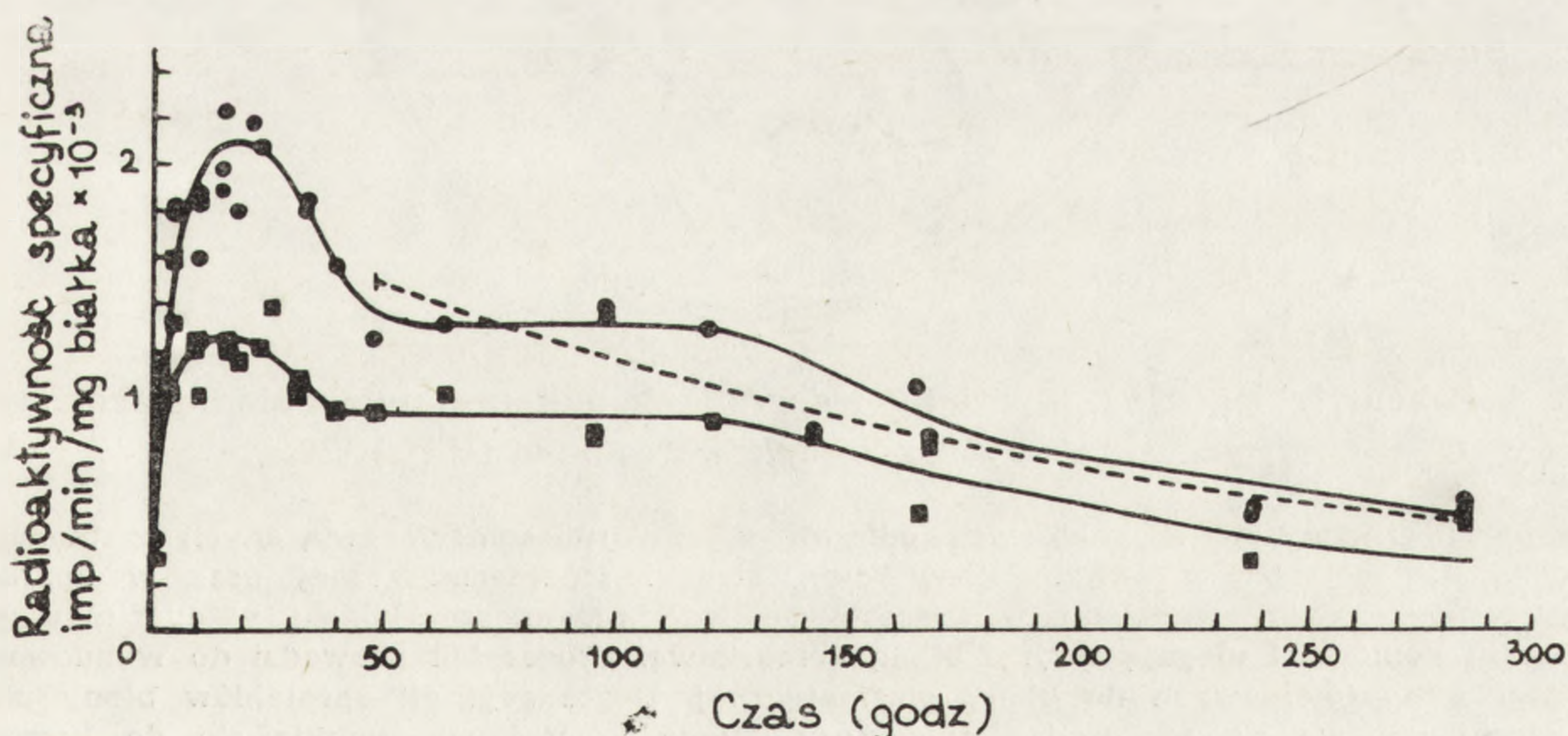
Proces degradacji niektórych glikoproteidów odbywa się na drodze pinocytozy [24, 61, 78, 79]. Stwierdzono, że błony plazmatyczne mogą wpuklać się do komórki i tworzyć pęcherzyki pinocytarne zawierające glikoproteidy błon. Za pomocą technik cytochemicznych (oksydoreduktaza jodek : nadtlenek wodoru [EC 1.11.1.8] oraz dwumetylobenzydyny) stwierdzono, że w fibroblastach oraz makrofagach myszy pojawiają się pęcherzyki pinocytarne, które zlewają się z lizosomami tworząc wtórne lizosomy. W nich są degradowane również glikoproteidy błon komórkowych początkowo przy udziale egzoglikozydaz, a następnie proteaz [19]. Objętość wtórnych lizosomów zmniejsza się w miarę procesu trawienia i przenikania płynnych składników do komórki. Część pęcherzyków pinocytarnych ulega recyklizacji, a glikoproteidy w nich zawarte mogą ponownie wracać na powierzchnię komórki [79, 91]. Podczas recyklizacji reszta oligosacharydowa może być degradowana lub dołączana do innych glikoproteidów, co prowadzi do znacznej heterogenności glikoproteidów na powierzchni błony komórkowej [78]. Doyle i wsp. [24] znakując powierzchnię hodowlanych komórek wątrobiaka ^{125}I i ^{131}I w obecności oksydoreduktaza jodek : nadtlenek wodoru stwierdzili, że po pewnym czasie niewielka ilość znakowanych jodem glikoproteidów znajduje się we frakcji błon siateczki śródplazmatycznej. Na tej podstawie autorzy wnoszą, że część glikoproteidów błon plazmatycznych komórek wątrobiaka ulega degradacji w procesie pinocytozy, przy czym ilość glikoproteidów ulegających w ten sposób przemianom jest stosunkowo mała. Należy przypuszczać, że na uzyskane przez autorów wyniki miały wpływ inne czynniki, jak proces proteolizy glikoproteidów błon plazmatycznych znakowanych jodem. Wiadomo jest, że komórki nowotworowe wydzielają glikoproteidy z ich powierzchni do przestrzeni pozakomórkowej i środowiska hodowlanego, zmniejszając ilość znakowanych związków na ich powierzchni.

Miller i wsp. [60, 61] również uważają, że glikoproteidy błon plazmatycznych ulegają degradacji w drodze pinocytozy. Badania przeprowadzone na komórkach gruczolaka myszy TA3-Ha wykazały, że epiglikanina — integralnie związany z błoną glikoproteid — jest uwalniany

w znacznie mniejszej ilości do środowiska w porównaniu z jej syntezą. Stanowi to dowód, że degradacja tego glikoproteidu odbywa się w przeważającej części w wyniku wpuklania się błon plazmatycznych do wnętrza komórki i tworzenia się pęcherzyków pinocytarnych, w których jest trawiony glikoproteid przez endogenne proteazy. Przemawia za tym m. in. fakt, że dodanie surowicy do środowiska hodowlanego nie hamuje uwalniania tego glikoproteidu. Czynniki zawarte w surowicy mogłyby hamować proces proteolizy zachodzący pod wpływem egzogennych proteaz, natomiast nie mogą posiadać wpływu na degradację zachodzącą przy udziale endogennych proteaz.

Wzmożona biosynteza glikoproteidów błon plazmatycznych w porównaniu z ich powolnym uwalnianiem się do środowiska nie jest charakterystyczna jedynie dla komórek TA3-Ha. Podobne wyniki uzyskano dla niektórych glikoproteidów błon plazmatycznych komórek HeLa [91] oraz glikoproteidów błon limfocytów [83, 89].

Na podstawie dotychczasowych badań przyjmuje się, że synteza i degradacja części oligosacharydowej i polipeptydowej glikoproteidów błon komórkowych są ściśle ze sobą związane i przebiegają równolegle [53, 68, 85]. Kinetyka wbudowania się *in vivo* prekursorów białkowych, np. [³H]-lizyny, i prekursorów oligosacharydowych, np. [¹⁴C]-glukozaminy, do glikoproteidów komórek nabłonka kanalików nerkowych królika oraz zanik radioaktywności przebiegają w sposób bardzo podobny (ryc. 3).



Ryc. 3. Wbudowywanie się radioaktywnych prekursorów do glikoproteidów błony plazmatycznej komórek nabłonkowych kanalików nerkowych królika [68]

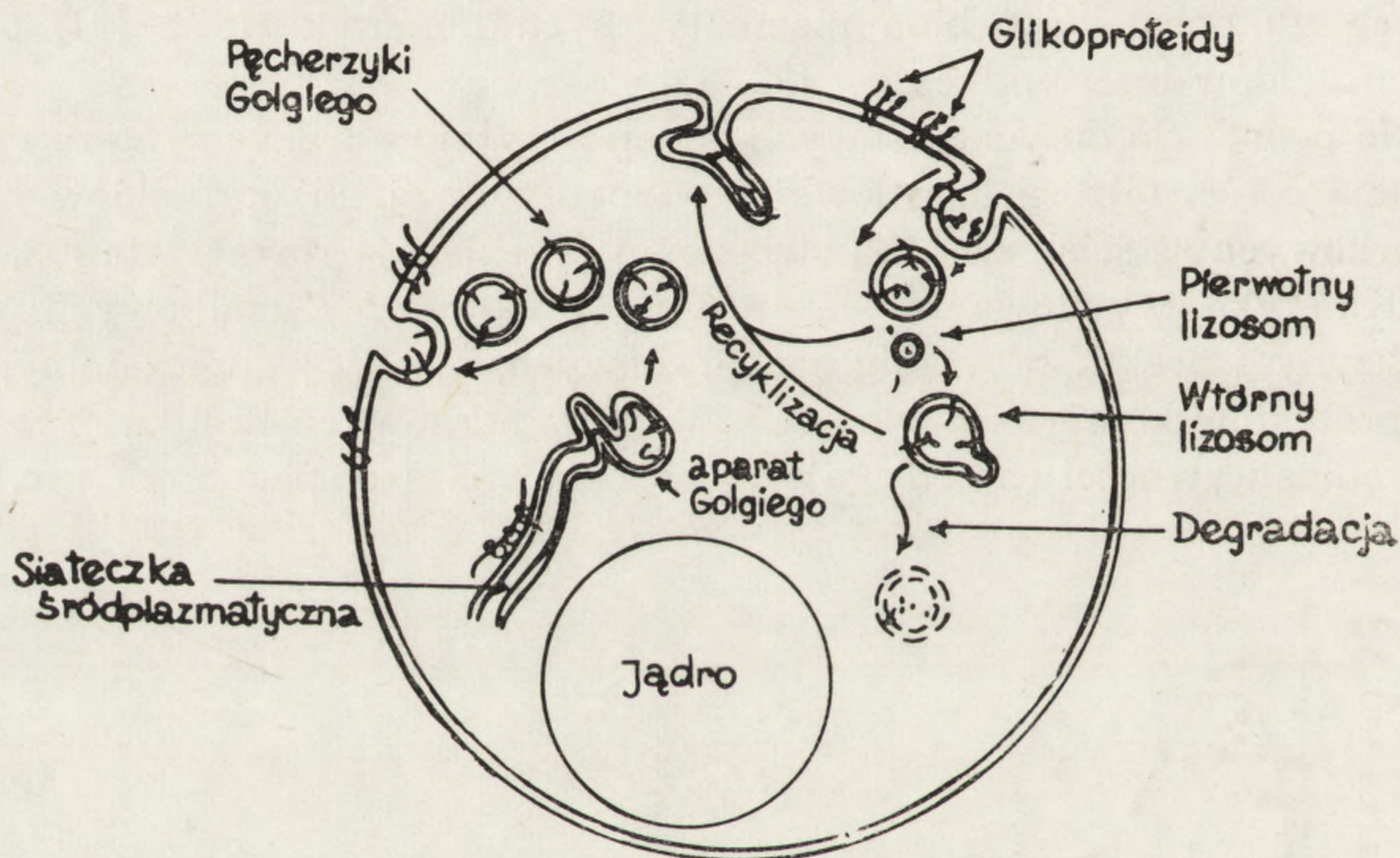
● [¹⁴C]-glukozamina, ■ [³H]-lizyna

Maksymalne znakowanie glikoproteidów rąbka szczoteczkowego tych komórek osiągnęto po 15–20 godz. Radioaktywność znakowanych glikopro-

teidów utrzymywała się na stałym poziomie do 120 godz., następnie powoli zmniejszała się [68].

Poglądy odnośnie do degradacji glikoproteidów błon plazmatycznych do aminokwasów i monosacharydów w komórkach są kontrowersyjne. Jedni autorzy uważają, że białka błon plazmatycznych ulegają tylko częściowej degradacji [40], drudzy — że są degradowane do wolnych aminokwasów [38], inni zaś, że glikoproteidy błonowe są wbudowywane i usuwane z błon jako duże strukturalne jednostki [81].

Przedstawione wyniki badań upoważniają do przyjęcia schematu biogenezy i degradacji glikoproteidów błon plazmatycznych, zaproponowanego przez Doyle'a i wsp. [24] dla glikoproteidów błon plazmatycznych komórek wątrobiaka (ryc. 4). Zdaniem autorów, biogeneza glikoproteidów



Ryc. 4. Schemat biogenezy, wymiany i degradacji glikoproteidów błon plazmatycznych hodowlanych komórek wątrobiaka (HTC) [24]

Biosynteza glikoproteidów błonowych odbywa się na rybosomach związanych z błonami. Glikozylacja zachodzi w świetle kanalików siateczki śródplazmatycznej oraz w aparacie Golgiego. Pęcherzyki wydzielnicze aparatu Golgiego przemieszczają się w kierunku powierzchni komórki i ulegają fuzji z błoną komórkową. Proces ten prowadzi do wbudowania struktur glikoproteidowych do błony plazmatycznej. Degradacja glikoproteidów błony plazmatycznej odbywa się na drodze pinocytozy. Błona komórkowa wpukla się do komórki i tworzy pęcherzyki pinocytarne, które łącząc się z lizosomami tworzą wtórne lizosomy, gdzie glikoproteidy ulegają strawieniu. Możliwy jest proces recykliczacji glikoproteidów błon, tj. ponowne wbudowanie glikoproteidów z pęcherzyków pinocytarnych lub wtórnych lizosomów do błony plazmatycznej.

błon plazmatycznych przebiega w sposób podobny do biosyntezy glikoproteidów wydzielniczych. Związki te różnią się jedynie powinowactwem wobec lipidów błonowych. Ich biosynteza rozpoczyna się na rybosomach

związanych z błonami, a nowo zsyntetyzowane białko jest glikozylowane wewnątrz kanalików siateczki śródplazmatycznej oraz w aparacie Golgiego. Wbudowanie się glikoproteidów do błon komórkowych następuje poprzez pęcherzyki aparatu Golgiego powstające w procesie wydzielniczym. Pęcherzyki zawierają kompleks różnych glikoproteidów oraz białek i lipidów, zmieszanych ze sobą w różnych stosunkach molarnych. Ulegając fuzji z błoną komórkową, stają się źródłem glikoproteidów błon plazmatycznych. Błony plazmatyczne wpuklając się do wnętrza komórki tworzą pęcherzyki pinocytarne. Pęcherzyki te ulegają ponownie recykliczacji i wracają na powierzchnię błony plazmatycznej lub zlewają się z lizosomami, tworząc wtórne lizosomy, zawarte zaś w nich glikoproteidy ulegają degradacji do aminokwasów i monosacharydów. Należy mieć na uwadze, że możliwa jest również degradacja glikoproteidów błon plazmatycznych bez udziału procesu pinocytozy.

LITERATURA

- [1] ALPERS D. H., The relation of size to the relative rates of degradation of intestinal brush border proteins, *J. Clin. Invest.*, **51**: 2621–2630, 1972.
- [2] APPELKVIST E. L., BERGMAN A., DALLNER G., Incorporation of galactose from UDP-galactose into microsomal and Golgi membranes of rat liver, *Biochim. Biophys. Acta*, **512**: 111–122, 1978.
- [3] ATKINSON P. H., Synthesis and assembly of HeLa cell plasma membrane glycoproteins and proteins, *J. Biol. Chem.*, **250**: 2123–2134, 1975.
- [4] AUTUORI F., SVENSSON H., DALLNER G., Biogenesis of microsomal membrane glycoproteins in rat liver. I. Presence of glycoproteins in microsomes and cytosol, *J. Cell Biol.*, **67**: 687–699, 1975.
- [5] — Biogenesis of microsomal membrane glycoproteins in rat liver. II. Purification of soluble glycoproteins and their incorporation into microsomal membranes, *J. Cell Biol.*, **67**: 700–714, 1975.
- [6] BENNETT G., LEBLOND C. P., HADDAD A., Migration of glycoprotein from the Golgi apparatus to the surface of various cell types as shown by radioautography after labelled fucose injection into rats, *J. Cell Biol.*, **60**: 258–284, 1974.
- [7] BERGMAN A., DALLNER G., Incorporation of N-acetylglucosamine from UDP-N-acetylglucosamine into proteins and lipid intermediates in microsomal and Golgi membranes from rat liver, *Biochim. Biophys. Acta*, **512**: 123–135, 1978.
- [8] BLOBEL G., DOBBERSTEIN B., Transfer of proteins across membranes. I. Presence of proteolytically processed and unprocessed nascent immunoglobulin light chains, *J. Cell Biol.*, **67**: 835–851, 1975.
- [9] — Transfer of proteins across membranes. II. Reconstitution of functional rough microsomes from heterologous components, *J. Cell Biol.*, **67**: 852–862, 1975.
- [10] BRETSCHER M. S., Human erythrocyte membranes: specific labelling of surface proteins, *J. Mol. Biol.*, **58**: 775–781, 1971.

- [11] — A major protein which spans the human erythrocyte membrane, *J. Mol. Biol.*, **59**: 351–357, 1971.
- [12] — Membrane structure: Some general principles. Membranes are asymmetric lipid bilayers in which cytoplasmically synthesized proteins are dissolved, *Science*, **181**: 622–629, 1973.
- [13] BRETSCHER M. S., RAFF M. C., Mammalian plasma membranes, *Nature*, **258**: 43–49, 1975.
- [14] BUCK C. A., GLICK M. C., WARREN L., A comparative study of glycoproteins from the surface of control and Rous Sarcoma Virus transformed hamster cells, *Biochemistry*, **9**: 4567–4576, 1970.
- [15] BUCK C. A., FUHRER J. P., SOSLAN G., WARREN L., Membrane glycopeptides from subcellular fractions of control and virus-transformed cells, *J. Biol. Chem.*, **249**: 1541–1550, 1974.
- [16] CABANTCHIK Z. I., ROTHSTEIN A., Membrane proteins related to anion permeability of human red blood cells. I. Localization of disulfonic stilbene binding sites in proteins involved in permeation, *J. Membrane Biol.*, **15**: 207–226, 1974.
- [17] — Membrane proteins related to anion permeability of human red blood cells. II. Effects of proteolytic enzymes on disulfonic stilbene sites of surface proteins, *J. Membrane Biol.*, **15**: 227–248, 1974.
- [18] CUATRECASAS P., TELL G. P., Insulin-like activity of concanavalin A and wheat germ agglutinin — direct interactions with insulin receptors, *Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A.*, **70**: 485–489, 1973.
- [19] CZARTORYSKA B., Glikozydazy lizosomalne w katabolizmie heteropolisacharydów, *Post. Biochem.*, **23**: 229–266, 1977.
- [20] DALLNER G., SIEKEVITZ P., PALADE G. E., Biogenesis of endoplasmic reticulum membranes. I. Structural and chemical differentiation in developing rat hepatocyte, *J. Cell Biol.*, **30**: 73–96, 1966.
- [21] — Biogenesis of endoplasmic reticulum membranes. II. Synthesis of constitutive microsomal enzymes in developing rat hepatocyte, *J. Cell Biol.*, **30**: 97–117, 1966.
- [22] DEHLINGER P. J., SCHIMKE R. T., Effect of size on the relative rate of degradation of rat liver soluble proteins, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **40**: 1473–1480, 1970.
- [23] — Size distribution of membrane proteins of rat liver and their relative rates of degradation, *J. Biol. Chem.*, **246**: 2574–2583, 1971.
- [24] DOYLE D., BAUMANN H., ENGLAND B., FRIEDMAN E., HOU E., TWETO J., Biogenesis of plasma membrane glycoproteins in hepatoma tissue culture cells, *J. Biol. Chem.*, **253**: 965–973, 1978.
- [25] EL-ALLAWY R. M. M., GLIEMANN J., Trypsin treatment of adipocytes: Effect on sensitivity to insulin, *Biochim. Biophys. Acta*, **273**: 97–109, 1972.
- [26] EDELMAN G. M., Surface modulation in cell recognition and cell growth. Some new hypotheses on phenotypic alteration and transmembranous control of cell surface receptors, *Science*, **192**: 218–226, 1976.
- [27] ELHAMMER A., SVENSSON H., AUTUORI F., DALLNER G., Biogenesis of microsomal membrane glycoproteins in rat liver. III. Release of glycoproteins from the Golgi fraction and their transfer to microsomal membranes, *J. Cell Biol.*, **67**: 715–724, 1975.
- [28] FARBISZEWSKI R., WOROWSKI K., Rola błony komórkowej w transformacji nowotworowej, *Postępy Biol. Kom.*, **2**: 131–145, 1975.

- [29] FARBISZEWSKI R., Białka powierzchni komórki związane z transformacją nowotworową, *Postępy Biol. Kom.*, **4**: 225–242, 1977.
- [30] GER I. A., STROUS M., Initial glycosylation of proteins with acetylgalactosaminylserine linkages, *Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A.*, **76**: 2694–2698, 1979.
- [31] GLASER L., Cell-cell adhesion studies with embryonal and cultured cells, *Rev. Physiol. Pharmacol.*, **83**: 89–122, 1978.
- [32] GUIDOTTI G., Membranes proteins, *Ann. Rev. Biochem.*, **41**: 731–752, 1972.
- [33] GURD J. W., EVANS W. H., Relative rates of degradation of mouse-liver surface-membrane proteins, *Eur. J. Biochem.*, **36**: 273–279, 1973.
- [34] HADDAD A., BENNETT G., LEBLOND C. P., Formation and turnover of plasma membrane glycoproteins in kidney tubules of young rats and adult mice, as shown by radioautography after injection of ^3H -fucose, *Can-Amer. J. Anat.*, **148**: 241–273, 1977.
- [35] HINO Y., ASANO A., SATO R., Biochemical studies on rat liver Golgi apparatus. IV. Effects of various treatments in vivo on the Golgi apparatus, *J. Biochem.*, **84**: 1567–1572, 1978.
- [36] HODSON S., BRENCHLEY G., Similarities of the Golgi apparatus membrane and the plasma membrane in rat liver cells, *J. Cell Sci.*, **20**: 167–182, 1976.
- [37] HUBBARD A. L., COHN Z. A., The enzymatic iodination of the red cell membrane, *J. Cell Biol.*, **55**: 390–405, 1972.
- [38] — Externally disposed plasma membrane proteins. II. Metabolic fate of iodinated polypeptides of mouse L cells, *J. Cell Biol.*, **64**: 461–479, 1975.
- [39] HUDGIN R. L., PRICER W. E., ASHWELL G., The isolation and properties of a rabbit liver binding protein specific for asialoglycoproteins, *J. Biol. Chem.*, **249**: 5536–5543, 1974.
- [40] HUDSON J. E., JOHNSON T. C., The degradation and turnover of fucosylated glycoproteins in the plasma membrane of a neuroblastoma cell line, *Biochem. J.*, **166**: 217–223, 1977.
- [41] HUGGINS J. W., CHESNUT R. W., DURHAM N. N., CARRAWAY K. L., Molecular changes in cell surface membrane resulting from trypsinization of Sarcoma 180 tumor cells, *Biochim. Biophys. Acta*, **426**: 630–637, 1976.
- [42] HUGHES R. C., SANFORD B., JEANLOZ R. W., Regeneration of the surface glycoproteins of a transplantable mouse tumor cell after treatment with neuraminidase, *Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A.*, **69**: 942–947, 1972.
- [43] IRVING R. A., TONEGUZZO F., RHEE S. H., HOFMANN T., GHOSH H. P., Synthesis and assembly of membrane glycoproteins : Presence of leader peptide in nonglycosylated precursor of membrane glycoprotein of vesicular stomatitis virus, *Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A.*, **76**: 570–574, 1979.
- [44] KAPLAN J., MOSKOWITZ M., Studies on the turnover of plasma membranes in cultured mammalian cells. I. Rates of synthesis and degradation of plasma membrane proteins and carbohydrates, *Biochim. Biophys. Acta*, **389**: 290–305, 1975.
- [45] — Studies on the turnover of plasma membranes in cultured mammalian cells. II. Demonstration of heterogeneous rates of turnover for plasma membrane proteins and glycoproteins, *Biochim. Biophys. Acta*, **389**: 306–313, 1975.
- [46] KESHGEGIAN A. A., GLICK M., Glycoproteins associated with nuclei of cells before and after transformation by ribonucleic acid virus, *Biochemistry*, **12**: 1221–1226, 1973.
- [47] KORDOWIAK A. M., Aparat Golgiego, izolowanie, charakterystyka i funkcja, *Postępy Biol. Kom.* **5**: 17–47, 1978.

- [48] KRAEMER P. M., Regeneration of sialic acid on the surface of chinese hamster cells in culture. I. General characteristic of the replacement process, *J. Cell Physiol.*, **68**: 85-90, 1966.
- [49] — Complex carbohydrates of animal cells : Biochemistry and physiology of the cell periphery, [w] Biomembranes, editor, L. A. Manson, Plenum Publishing Corp., New York, 1971, vol. 1, str. 67-190.
- [50] KRAMER R. H., CANELLAKIS E. S., The surface glycoproteins of the HeLa cell internalization of wheat germ agglutininreceptors, *Biochim. Biophys. Acta*, **551**: 328-348, 1979.
- [51] KREIBISCH G., DEBEY P., SABATINI D. D., Selective release of content from microsomal vesicles without membrane disassembly. I. Permeability changes induced by low detergent concentrations, *J. Cell Biol.*, **58**: 436-462, 1973.
- [52] KREIBISCH G., SABATINI D. D., Selective release of content from microsomal vesicles without membrane disassembly. II. Electrophoretic and immunological characterization of microsomal subfractions, *J. Cell Biol.*, **61**: 789-807, 1974.
- [53] LANDRY J., MARCEAU N., The relative rates of degradation of the plasma membrane glycoproteins from normal rat liver, *Biochim. Biophys. Acta*, **389**: 154-161, 1975.
- [54] LINGAPPA V. R., KATZ F. N., LODISH H. F., BLOBEL G., A signal sequence for the insertion of transmembrane glycoprotein. Similarities to the signals of secretory proteins in primary structure and function, *J. Biol. Chem.*, **253**: 8667-8670, 1978.
- [55] MARCHESI V. T., TILLACK T. W., JACKSON R. L., SEGREST J. P., SCOTT R. E., Chemical characterization and surface orientation of the major glycoprotein of the human erythrocyte membrane, *Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A.*, **69**: 1445-1449, 1972.
- [56] MARCUS P. I., SCHWARTZ V. G., [w] Biological Properties of the Mammalian Surface Membrane, editor L. A. Manson, Wistar Institute Press, Philadelphia, 1968, str. 143.
- [57] MARGOLIS R. K., GOMEZ Z., Rapid turnover of fucose in the water soluble glycoproteins of brain, *Biochim. Biophys. Acta*, **313**: 226-228, 1973.
- [58] MICHALAK M., SARZAŁA M. G., Asymetria błon biologicznych, *Post. Biochem.*, **23**: 523-539, 1977.
- [59] MILENKOVIC A. G., RACHMALER M., JOHNSON T. C., Growth and metabolism of fucosylated plasma membrane glycoproteins in mouse Neuroblastoma N2a cells, *Biochem. J.*, **176**: 695-704, 1978.
- [60] MILLER D. K., COOPER A. G., Kinetics of release of glucosamine-labeled glycoproteins from the TA3-Ha murine adenocarcinoma cell, *J. Biol. Chem.*, **253**: 8798-8803, 1978.
- [61] MILLER D. K., COOPER A. G., BROWN M. C., Cellular origin of glucosamine-labeled glycoproteins released from the TA3-Ha tumor cell, *J. Biol. Chem.*, **253**: 8804-8811, 1978.
- [62] MORRIS M., MUELLER T. J., HUBER C. T., Transmembrane orientation of the glycoproteins in normal human erythrocytes, *J. Biol. Chem.*, **249**: 2658-2660, 1974.
- [63] NOWAKOWSKI M., ATKINSON P. H., SUMMERS D. F., Incorporation of fucose into HeLa cells plasma membranes during the cell cycle, *Biochim. Biophys. Acta*, **266**: 154-160, 1972.

- [64] OLDEN K., PRATT R. M., JAWORSKI C., YAMADA K. M., Evidence for role of glycoprotein carbohydrates in membrane transport : Specific inhibition by tunicamycin, *Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A.*, **76**: 791-795, 1979.
- [65] PALADE G., Intracellular aspects of the process of protein synthesis, *Science*, **189**: 347-358, 1975.
- [66] PALAMARCZYK G., Glikozylacja białek w układach eukariotycznych, *Post. Biochem.*, **24**: 443-460, 1978.
- [67] PHUTRAKUL S., JONES M. N., The permeability of bilayer lipid membranes on the incorporation of erythrocyte membrane extracts and the identification of the monosaccharide transport proteins, *Biochim. Biophys. Acta*, **550**: 188-220, 1979.
- [68] QUIRK S. J., BYRNE J., ROBINSON G. B., Studies on the turnover of protein and glycoprotein components in rabbit kidney brush border, *Biochem. J.*, **132**: 501-508, 1973.
- [69] ROSEMAN S., The synthesis of complex carbohydrates by multiglycosyltransferase systems and their potential function in intracellular adhesion, [w] *Chemistry and Physics of Lipids*, North Holland Publishing Co., Amsterdam 1970, **5**: 270-297.
- [70] ROTH S., McGUIRE E. J., ROSEMAN S., Evidence for cell-surface glycosyltransferases. Their potential role in cellular recognition, *J. Cell Biol.*, **51**: 536-547, 1971.
- [71] SCHWARTZ B. P., NATHENSON S. G., Regeneration antigens on mouse cells, *Transplant. Proc.*, **3**: 180-182, 1971.
- [72] SEGRET J. P., KAHNE I., JACKSON R. L., MARCHESI V. T., Major glycoprotein of the human erythrocyte membrane: evidence for an amphipathic molecular structure, *Arch. Biochem. Biophys.*, **155**: 167-183, 1973.
- [73] SIMON F. R., BLUMENFELD O. O., ARIAS I. M., Two proteins fractions obtained from hepatic plasma membranes. Studies of their composition and differential turnover, *Biochim. Biophys. Acta*, **219**: 349-360, 1970.
- [74] SINGER S. J., NICOLSON G. L., The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. Cell membranes are viewed as two-dimensional solutions of oriented globular proteins and lipids, *Science*, **175**: 720-731, 1972.
- [75] SINGER S. J., The molecular organization of membranes, *Ann. Rev. Biochem.*, **43**: 805-833, 1974.
- [76] — Thermodynamics the structure of integral membrane proteins and transport, *J. Supramol. Struct.*, **6**: 313-323, 1977.
- [77] SIRICA A. E., GOLDBLATT P. J., McKELVY J. F., Degradation L-[³H]fucose-labeled plasma membrane components from regenerating rat liver, *J. Biol. Chem.*, **252**: 5895-5899, 1977.
- [78] STEINMAN R. M., COHN Z. A., Endocytosis and the vacuolar apparatus, [w] *Biogenesis and Turnover of Membrane Macromolecules*, edited Cook J. S., Raven Press, New York 1976, str. 1-14.
- [79] STEINMAN R. M., BRODIE S. E., COHN Z. A., Membrane flow during pinocytosis. A stereologic analysis, *J. Cell Biol.*, **68**: 665-687, 1976.
- [80] TERRIS S., STEINER D. T., Binding and degradation of ¹²⁵J-insulin by rat hepatocytes, *J. Biol. Chem.*, **250**: 8389-8398, 1975.
- [81] TWETO J., DOYLE D., Turnover of the plasma membrane proteins of hepatoma tissue culture cells, *J. Biol. Chem.*, **251**: 872-888, 1976.
- [82] VARGA J. M., MOELLMANN G., FRITSCH P., GADOWSKA E., LERNER A. B., Association of cell surface receptors for melanotropin with the Golgi

- region in mouse melanoma cells, Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A., **73**: 559-562, 1976.
- [83] VITETTA E. S., UHR J. W., Synthesis of surface H-2 alloantigens in murine splenocytosis, J. Immunol., **115**: 374-381, 1975.
- [84] VON HEIJNE G., BLOMBERG C., Trans-membrane translocation of proteins. The direct transfer model, Eur. J. Biochem., **97**: 175-181, 1979.
- [85] WARREN L., GLICK M. C., Membranes of animal cells. II. The metabolism and turnover of the surface membrane, J. Cell Biol., **37**: 729-746, 1968.
- [86] WEISER M. M., Intestinal epithelial cell surface membrane glycoprotein synthesis. I. An indicator of cellular differentiation, J. Biol. Chem., **248**: 2536-2541, 1973.
- [87] — Intestinal epithelial cell surface membrane glycoprotein synthesis. II. Glycosyltransferases and endogenous acceptors of the undifferentiated cell surface membrane, J. Biol. Chem., **248**: 2542-2548, 1973.
- [88] WEISER M. M., NEUMEIER M., QUAROM A., KIRSCH K., Synthesis of plasmalemmal glycoproteins in intestinal epithelial cells. Separation of Golgi membranes from villus and crypt cell surface membranes; Glycotransferase activity of surface membrane, J. Cell Biol., **77**: 722-734, 1978.
- [89] VERNET D., VITETTA E. S., UHR J. W., BOYSE E. H., Synthesis, intracellular distribution and secretion of immunoglobulin and H-2 antigen in murine splenocytes, J. Exp. Med., **138**: 847-857, 1973.
- [90] WHALEY W. G., DAUWALDER M., KEPHART J. E., Golgi apparatus: Influence on cell surfaces. A role in the assembly of macromolecules makes the organelle a determinant of cell function, Science, **175**: 596-599, 1972.
- [91] YURCHENCO P. D., ATKINSON P. H., Equilibration of fucosyl glycoprotein pools in HeLa cells, Biochemistry, **16**: 944-953, 1977.

Otrzymano: 10 października 1979.

Przyjęto: 29 stycznia 1980.

Adres autorów: Mickiewicza 2, 15-230 Białystok.

WPŁYW HIPERTERMII NA CZYNNOŚĆ I METABOLIZM KOMÓREK PRAWIDŁOWYCH I NOWOTWOROWYCH *

EFFECT OF HYPERTHERMIA ON THE FUNCTION AND METABOLISM OF NORMAL AND NEOPLASTIC CELLS

Marek JANIĄK i Stanisław SZMIGIELSKI

Ośrodek Ochrony Radiologicznej i Radiobiologii
Wojskowego Instytutu Higieny i Epidemiologii, Warszawa

Streszczenie. Komórki nowotworowe wykazują większą wrażliwość na przegrzewanie do temperatur 42–44°C i giną szybciej niż komórki prawidłowe pochodzące z tych samych tkanek. Stanowi to podstawę dla prób praktycznego wykorzystania hipertermii w terapii chorób nowotworowych u ludzi. Mechanizm wybiórczej wrażliwości komórek nowotworowych na przegrzewanie nie został jednak wyjaśniony. W niniejszej pracy dokonano przeglądu badań eksperymentalnych nad wpływem hipertermii w zakresie 42–44°C na czynność i metabolizm komórek prawidłowych i nowotworowych przegrzewanych *in vitro* i *in vivo*. Równocześnie przedstawiono współczesne hipotezy próbujące tłumaczyć mechanizm cytostatycznego i cytobójczego działania temperatury w zakresie 42–44°C, ze szczególnym uwzględnieniem roli uszkodzenia błony komórkowej w tych procesach. Opisano też przypuszczalnie mechanizmy naprawy uszkodzeń termicznych oraz indukcji termooporności w przegrzewanych komórkach.

Summary. Tumour cells are more sensitive to elevated temperatures (42–44°C) as compared to normal cells of the same origin. This provides a basis for attempts of practical application of hyperthermia in the treatment of human cancer. However, the mechanisms of this selective thermosensitivity of tumour cells are still poorly understood. The authors of this paper reviewed the results of experimental work on the effects of hyperthermia 42–44°C upon function and metabolism of normal and neoplastic cells heated *in vitro* and *in vivo*. Recent hypotheses aimed at elucidation of the mechanism(s) of thermal cell-death are also presented, with the special emphasis on the role of the damage of cellular membrane in this process. Additionally, studies are cited on the repair mechanisms and induction of thermo-tolerance in preheated cells.

* Praca niniejsza została wykonana w ramach realizacji Tematu PR-6-210-02 Programu Rządowego „Zwalczanie chorób nowotworowych”.

I. WPROWADZENIE

Poddanie komórek ssaków działaniu temperatury wyższej od fizjologicznej (hipertermii) prowadzi do pobudzenia ich metabolizmu i proliferacji (hipertermia umiarkowana w zakresie 39–41°C) lub do zahamowania czynności i śmierci komórek (hipertermia intensywna w zakresie 42–44°C). Szczególnie podatne na działanie hipertermii 42–44°C są komórki nowotworowe, które w tym zakresie temperatur giną szybciej niż komórki prawidłowe pochodzące z tych samych tkanek [5, 45, 63, 68, 72, 78, 88, 115]. Ta wysoka wrażliwość komórek nowotworowych na przegrzewanie zwróciła uwagę na możliwość wykorzystania intensywnej hipertermii w leczeniu nowotworów złośliwych. Badania prowadzone w ostatnich latach wykazały, że najbardziej skuteczne z terapeutycznego punktu widzenia jest miejscowe przegrzewanie tkanki nowotworowej do temperatury 42–44°C, kojarzone zwykle z radio- i/lub chemioterapią [48, 49, 71]. Takie postępowanie umożliwia wybiórcze zniszczenie większości komórek guza bez nadmiernego uszkodzenia otaczających tkanek zdrowych. Znacznie mniej efektywne wydaje się być przegrzewanie całego ciała chorych w łaźniach wodnych i parafinowych [104, 105].

II. WYBIÓRCZA WRAŻLIWOŚĆ KOMÓREK NOWOTWOROWYCH NA HIPERTERMIE

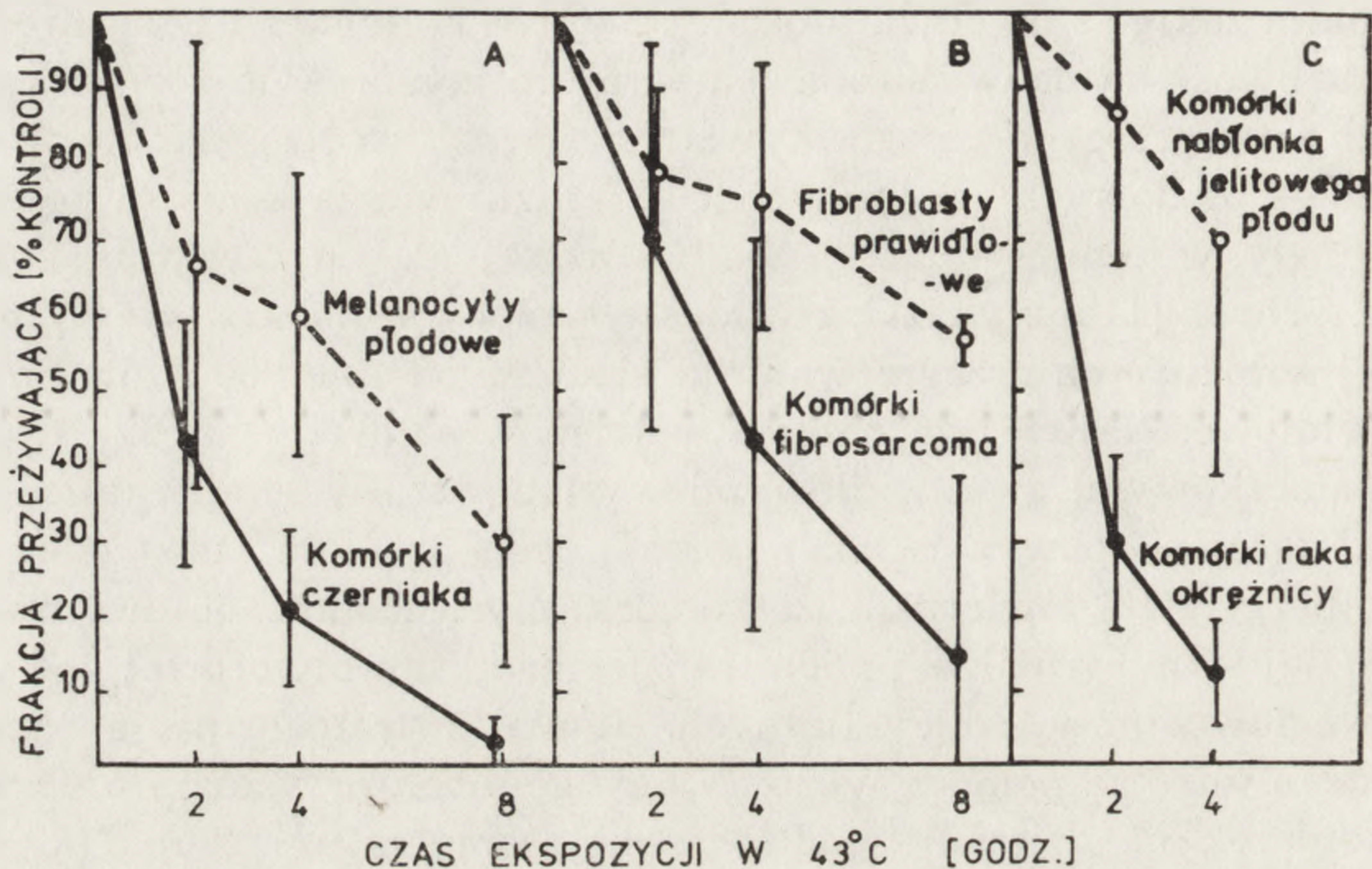
Opisy kliniczne remisji guzów nowotworowych u chorych gorączkujących do 40–41°C z powodu współistniejących zakażeń bakteryjnych, pochodzące z końca XIX w. [13, 14, 20, 21], skłoniły niektórych lekarzy do zastosowania hipertermii jako czynnika przeciwnowotworowego. W roku 1898 Westermarck [145] wywoływał remisje raków szyjki macicy u kobiet stosując gorące kąpiele wodne (42–44°C) zmienionej nowotworowo tkanki. W latach 1903–1907 Jensen [62] i Loeb [77] obserwowali zahamowanie rozwoju mięsaków u szczurów zanurzanych w łaźni wodnej o temperaturze 45–47°C, bez jednoczesnego uszkodzenia otaczających tkanek zdrowych. Te wczesne obserwacje dużej termowrażliwości komórek nowotworowych wymagały jednak potwierdzenia w badaniach *in vitro*. Już w roku 1912 Lambert [68], wykorzystując jeden z pierwszych modeli hodowli tkankowej, wykazał niezbicie, że komórki mięsaków mysich i szczurzych są bardziej wrażliwe na działanie temperatury w zakresie 42–47°C od prawidłowych komórek tkanki łącznej. Lambert określił również „dawkę” hipertermii, tj. czas ekspozycji w danej temperaturze, która działając zabójczo na komórki nowotworowe nie zmniejszała wyraźnie przeżywalności komórek zdrowych (żywołność komórek oceniano według ich zdolności do migracji poza fragmenty tkanki unieruchomionej w skrzepie surowicznym).

Niestety, spostrzeżenia te nie zostały właściwie ocenione i przez długi czas badania nad tym problemem nie były kontynuowane.

Współczesne badania nad wpływem podwyższonych temperatur na komórki wznowione zostały w latach sześćdziesiątych i są prowadzone w szerokim zakresie do chwili obecnej. W 1966 r. Bender i Schram [5] badali wrażliwość na podwyższoną temperaturę komórek 46 różnych guzów ludzkich i zwierzęcych i porównywali ją z wrażliwością komórek prawidłowych — płodowych i dojrzałych. Stwierdzili oni, że komórki nowotworowe ginęły w temperaturze o 1–2°C niższej niż odpowiednie komórki zdrowe. Schrek [115] wykazał, że ludzkie limfocyty białaczkowe są *in vitro* bardziej wrażliwe na przegrzewanie w zakresie od 43 do 50°C niż limfocyty prawidłowe. Największa różnica w termowrażliwości między limfocytami białaczkowymi a prawidłowymi występowała w temperaturze 43°C, malejąc zarówno powyżej, jak i poniżej tego poziomu [114, 115]. Chen i Heidelberger [18] stwierdzili, że komórki mysie hodowane *in vitro* stają się bardziej termowrażliwe po ich transformacji nowotworowej pod wpływem węglowodorów policyklicznych. Również transformacja komórek chomika *in vitro* za pomocą wirusów onkogennych prowadzi do uczulenia tych komórek na działanie podwyższonej temperatury [90]. Giovanella i wsp. [43–45, 122] w swych skrupulatnych badaniach metabolicznych nad termowrażliwością transformowanych chemicznie komórek mysich udowodnili, że zjawisko to jest związane z uwrażliwieniem komórek na przegrzewanie. W badaniach tych 2-godzinne działanie temperatury 43,5°C zabijało 92–95% komórek transformowanych i tylko 10–12% komórek prawidłowych. Podobne wyniki uzyskali inni autorzy [63], przegrzewając *in vitro* prawidłowe i transformowane wirusem fibroblasty ludzkie albo prawidłowe melanocyty ludzkie, bardziej odporne na działanie hipertermii 43°C niż komórki czerniaka złośliwego [123]. Również komórki innych guzów nowotworowych człowieka giną szybciej w temperaturze 43°C niż komórki prawidłowe pochodzące z tych samych tkanek [46] (ryc. 1). W cytowanych badaniach wrażliwość komórek nowotworowych na przegrzewanie nie była związana z różnicą w szybkości proliferacji komórek, jako że w większości przypadków czas podwajania populacji był taki sam w hodowlach prawidłowych i nowotworowych lub nawet był dłuższy w komórkach nowotworowych.

Zmiany histopatologiczne i ultrastrukturalne w tkance nowotworowej przeszczepialnych guzów sutka u myszy, które przegrzewano miejscowo do temperatury 42–45°C, pojawiały się stosunkowo szybko (pełny obraz widoczny był już po kilku godzinach od zakończenia przegrzewania) i obejmowały m. in. obrzęk tkanki, zmniejszenie się objętości cytoplazmy i jądra komórkowego, pyknozę jąder, wakuolizację i wzrost kwasochłonności cytoplazmy oraz zatrzymanie podziałów komórkowych [92, 98].

Zmiany te dotyczyły prawie wyłącznie komórek nowotworowych, a prawidłowe komórki tkanki łącznej i śródbłonka naczyń krwionośnych nie były uszkodzone [92, 98]. Zniszczone były głównie słabo unaczynione komórki centrum guza, co dawało obraz zupełnie różny od tego, jaki obser-



Ryc. 1. Przeżywalność komórek prawidłowych i komórek nowotworowych tego samego pochodzenia poddanych działaniu hipertermii 43°C (wg Giovanella i wsp., 1976)

wuje się po napromieniowaniu nowotworu promieniami X lub gamma [95, 99]. Podobne zmiany morfologiczne w przegrzewanych *in vivo* komórkach nowotworowych opisywali inni [24, 97, 101]. Zmiany te prowadziły do zahamowania rozwoju guza, a nawet do rozpadu chorej tkanki i remisji nowotworu. Stwierdzono jednocześnie, że dawka hipertermii wywołująca te objawy była niewystarczająca dla powstania takich samych uszkodzeń w warunkach *in vitro* [33, 80, 91, 98, 99, 130]. Wynika to z istnienia odmiennych warunków w środowisku otaczającym komórki guza nowotworowego *in vivo* (obniżenie pH, niedotlenienie, niedobór składników odżywczych, nasilona proliferacja) [91, 95] oraz z oddziaływania mechanizmów obronnych gospodarza na ognisko pierwotne i przerzuty nowotworowe [95]. Istotne znaczenie ma tu również nierównomierny rozkład temperatury w tkance nowotworowej spowodowany jej niejednorodnością, nierównomiernym unaczynieniem, a także różnymi sposobami podwyższania temperatury [95], co stwarza możliwość nadmiernego przegrzewania niektórych obszarów guza przy jednoczesnym „niedogrzaniu” innych. Niedostateczne przegrzanie komórek nowotworowych *in vivo* może spowodować przyspieszenie rozwoju ogniska pierwotnego oraz powstanie od-

ległych przerzutów [28]. Dlatego konieczna jest w tych warunkach dokładna kontrola ilości dostarczanego ciepła oraz precyzyjny pomiar temperatury przegrzewanej tkanki.

Różnica wrażliwości komórek nowotworowych i prawidłowych na przegrzewanie *in vitro* i *in vivo* jest nie wyjaśniona. Nie wiadomo co jest bezpośrednią przyczyną śmierci komórek przegrzewanych do temperatury 43–44°C. Nie można więc stwierdzić, czy różnica ta ma jedynie charakter ilościowy, czy też zależy od istnienia jakościowo różnych mechanizmów śmierci termicznej komórek.

III. PROLIFERACJA I METABOLIZM KOMÓREK PRZEGRZEWANYCH IN VITRO I IN VIVO

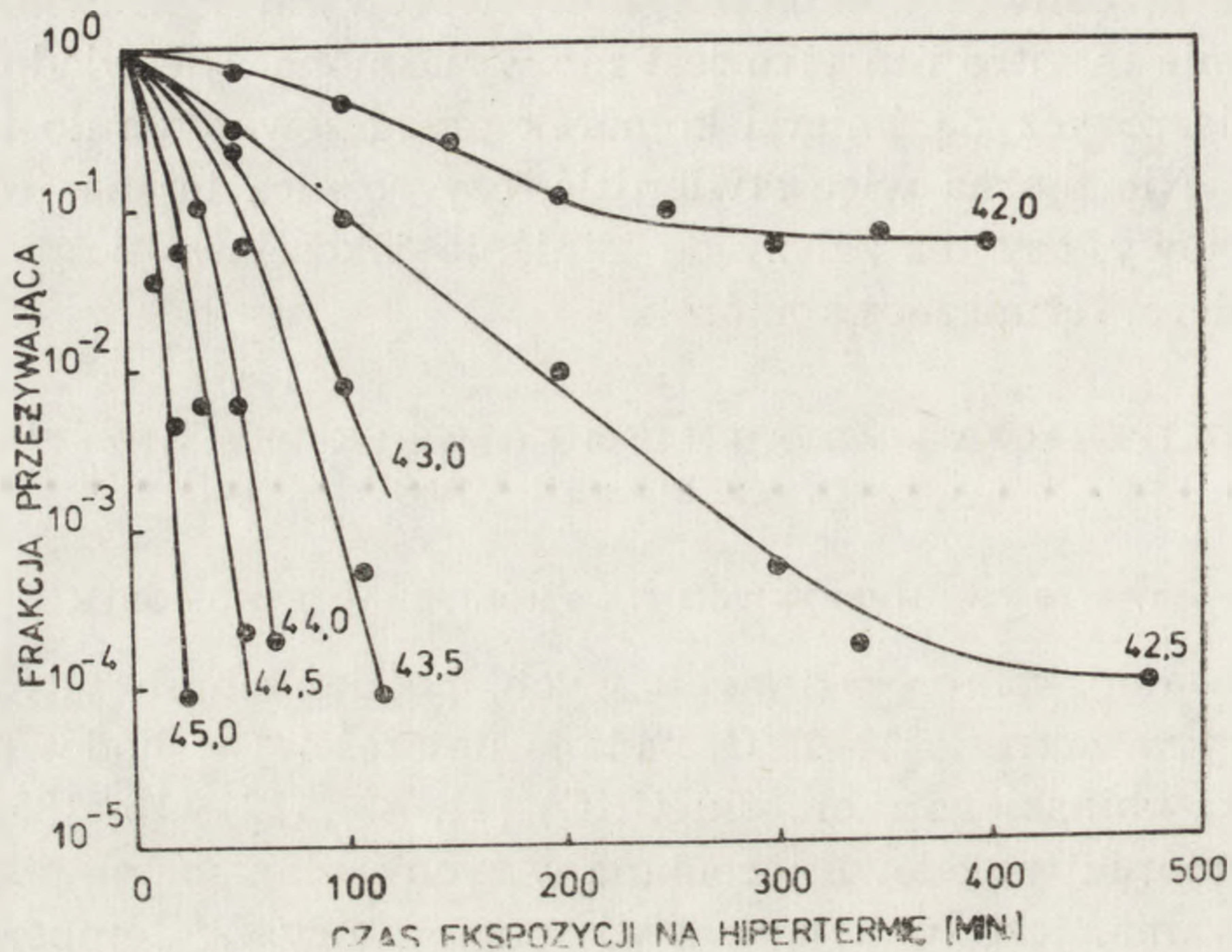
1. WPŁYW HIPERTERMII NA PROLIFERACJĘ KOMÓREK

Przeżywanie komórek prawidłowych, poddanych *in vitro* działaniu temperatury w zakresie 41–46°C, badano najczęściej w hodowlach komórek chomika chińskiego (komórki CHO) [41, 48, 112, 116, 135, 145]. Żywotność komórek w hodowli, oceniana w tych badaniach za pomocą techniki klonowania, jest funkcją czasu i temperatury. W temperaturze 45–48°C wiele komórek ginie, chociaż niektóre z nich wytrzymują tę temperaturę przez około 30 min. W niższych temperaturach (42–43°C) komórki tkanek prawidłowych przeżywają znacznie dłużej i wyraźny wzrost śmiertelności obserwuje się dopiero po 3–4 godzinach przegrzewania [61, 82, 84, 85, 132].

Krzywa przeżycia komórek poddanych przegrzewaniu ma na wykresie półlogarytmicznym kształt sigmoidalny i przypomina krzywą przeżycia po ekspozycji na promieniowanie jonizujące (ryc. 2). Parametry tej krzywej służyć mogą do obliczeń energii aktywacji w procesie śmierci termicznej komórek. Przebieg krzywych przeżycia komórek CHO poddanych działaniu różnych temperatur w różnych okresach czasu wskazuje, że powyżej 43°C wzrostowi ciepłoty o 1°C odpowiada skrócenie czasu przegrzewania o połowę (energia aktywacji około 149 kcal/mol), podczas gdy poniżej 43°C podwojenie czasu przegrzewania jest równoważne obniżeniu temperatury tylko 0,5°C (energia aktywacji około 250 kcal/mol) [39, 135, 145]. Również nachylenie wykładniczego odcinka tych krzywych ulega wyraźnej zmianie w temperaturze 43°C [112, 145]. Sugeruje to, że mechanizm uszkadzającego działania hipertermii na komórki jest różny powyżej i poniżej 43°C albo, że komórki są zdolne do naprawy subletalnych uszkodzeń wywołanych działaniem temperatur niższych od 43°C [39, 112].

W badaniach prowadzonych na hodowlach komórek nowotworowych człowieka [36, 102] i zwierząt laboratoryjnych [30, 36, 131] stwierdzono podobną kinetykę przeżywalności po działaniu temperatur w zakresie

41–46°C. Wydaje się więc, że letalny efekt przegrzewania jest w warunkach *in vitro* jakościowo podobny w komórkach prawidłowych i zmienionych nowotworowo.



Ryc. 2. Przeżywalność komórek CHO w hodowli niezynchronizowanej poddanej działaniu hipertermii 42–45°C (wg Sapareto i wsp., 1978)

W większości badań nad przeżywaniem komórek poddanych działaniu hipertermii *in vitro* stwierdzono, że mniej odporne na przegrzewanie są komórki aktywnie proliferujące w porównaniu z komórkami spoczynkowymi [15, 27, 86, 135, 148], przy czym większą wrażliwość na hipertermię obserwowano zarówno w hodowlach intensywnie dzielących się komórek prawidłowych, jak i nowotworowych. Stwierdzono np., że transformowane fibroblasty ludzkie w fazie wzrostu logarytmicznego są bardziej wrażliwe na przegrzewanie niż spoczynkowa frakcja tych komórek [63, 64]. Dane te zwróciły uwagę na różnicę w termowrażliwości komórek zależnie od fazy cyklu mitotycznego. Komórki HeLa i inne w fazie S cyklu komórkowego są kilkakrotnie bardziej wrażliwe na przegrzewanie niż w fazie G₁ lub G₂ [26, 102, 145]. Równie czułe na hipertermię są komórki w stadium mitozy, a szczególnie metafazy [120, 145]. Przegrzewanie *in vitro* prowadzi do synchronizacji populacji komórkowych, zarówno prawidłowych, jak i nowotworowych, hamując podziały w metafazie mitozy [15, 120, 145]. Hipertermia wstrzymuje również przejście komórek z fazy G₂ w mitozę oraz z fazy S w G₂ [63, 120]. Zatrzymanie komórek CHO w fazie G₂ po ich przegrzewaniu w temperaturze 41,5°C trwa około 4 godziny, po czym komórki wchodzą w metafazę i pokonują ją z szybkością trzykrotnie większą niż normalnie [112]. Te same komórki poddane w fa-

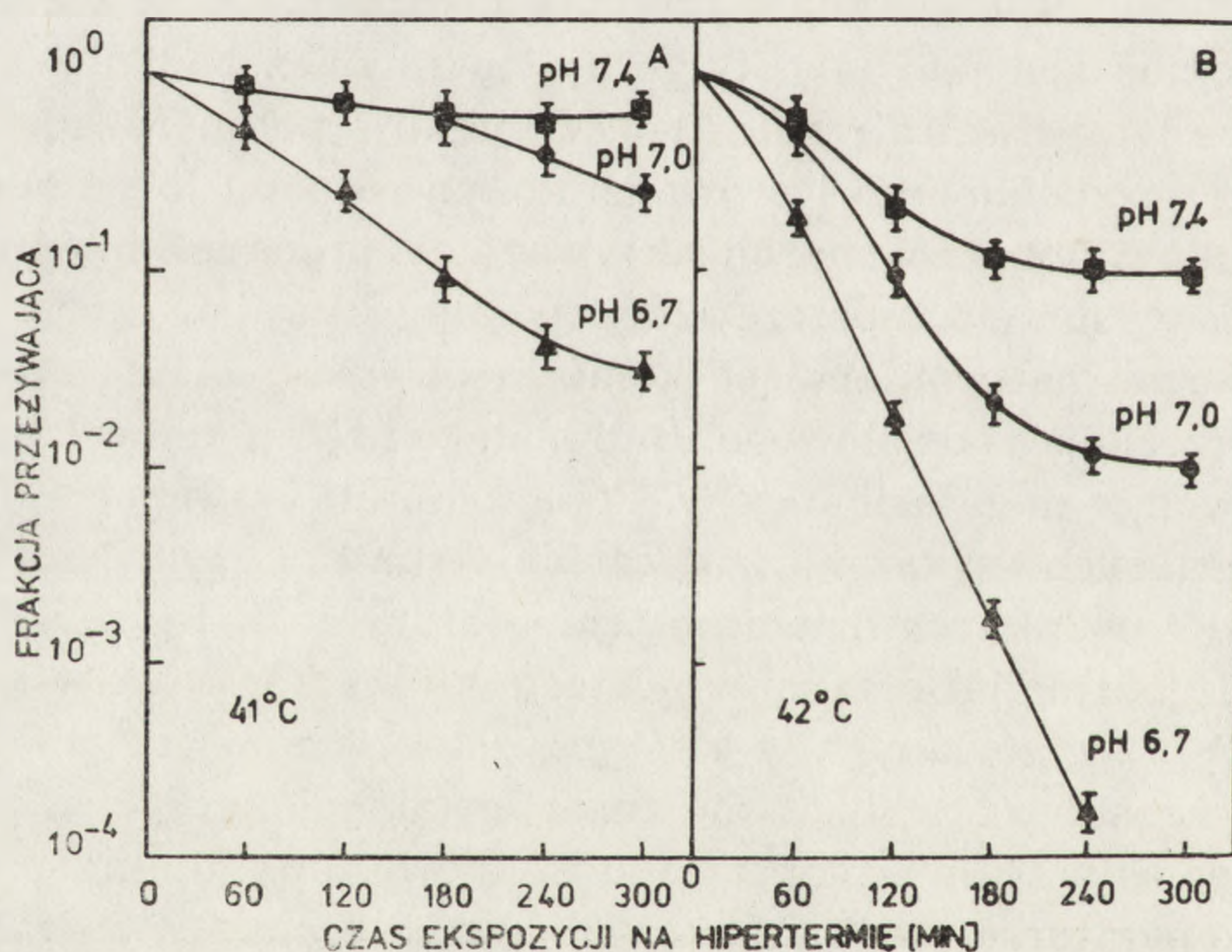
zie S lub G₂ działaniu hipertermii 45,5°C przez 6 min przestają proliferować na około 12 godzin, a podobne przegrzewanie w metafazie prowadzi do zahamowania podziału na około 15 godzin i dodatkowo do zaburzeń przebiegu kario- i cytokinezy, czego wynikiem jest pojawienie się komórek wielojądrzastych i/lub hiperploidalnych [26, 146]. Komórki poddawane hipertermii w innych fazach cyklu mitotycznego nie wykazywały takich zaburzeń, jedynie przegrzewanie ich w późnej fazie S prowadziło niekiedy do pojawienia się aberracji chromosomowych oraz delecji i pęknięć pojedynczych łańcuchów DNA [23, 26]. Przegrzewanie komórek we wszystkich fazach, z wyjątkiem anafazy, prowadzi do wydłużenia tych faz oraz opóźnionego przejścia do interfazy; również w tym przypadku najbardziej wrażliwa okazała się metafaza [120]. Największą oporność na hipertermię wykazywały komórki znajdujące się w fazie G₁ [26, 112, 146].

Wysoka wrażliwość komórek w metafazie na działanie podwyższonych temperatur zwróciła uwagę na możliwość uszkodzenia przez hipertermię struktury i/lub funkcji wrzeciona podziałowego w dzielących się aktywnie komórkach [26, 146]. Sugerują to również badania, w których wykazano, że temperatura rzędu 41–44°C hamuje polimeryzację mikrotubul wrzeciona podziałowego i prowadzi do ich rozpadu [57, 124]. Na podstawie wyników obliczeń energii aktywacji w procesie śmierci termicznej komórek wysunięto hipotezę [146], według której uszkadzające działanie hipertermii na proliferujące komórki polegać ma na depolimeryzacji białek wrzeciona podziałowego i/lub białek chromosomowych, szczególnie wrażliwych w metafazie mitozy. Poparciem dla tej hipotezy mogą być badania, w których wykazano zniszczenie struktury centrosomów w komórkach CHO poddanych działaniu temperatury 45,5°C przez 15 min lub 42°C przez 1 godzinę [4] oraz zmiany stosunku białko : DNA w komórkach HeLa i CHO przegrzewanych w 45°C przez 15–30 min [109, 137]. Okazało się jednak, że hamujące działanie hipertermii na komórki w metafazie ma charakter odwracalny, nawet po stosunkowo długim okresie przegrzewania w temperaturze 42–43°C [91, 146]. Ponadto nie stwierdzono wyraźnej różnicy w termowrażliwości komórek prawidłowych i nowotworowych znajdujących się w stadium mitozy [9], co świadczy przeciw pierwotnemu uszkodzeniu białek wrzeciona podziałowego i genomu komórek poddanych działaniu hipertermii.

2. WPŁYW OBNIŻONEGO pH NA WRAŻLIWOŚĆ TERMICZNA

Wielokrotnie stwierdzana *in vitro* większa termowrażliwość aktywnie dzielących się komórek nie zawsze znajduje potwierdzenie w badaniach *in vivo*. Okazało się bowiem, że przegrzewanie guzów nowotworowych u zwierząt doświadczalnych szczególnie silnie uszkadza nie proliferujące komórki położone w centrum chorej tkanki [2, 27, 48, 91, 95]. Zwróciło to

uwagę na modyfikację działania hipertermii *in vivo* przez zmienione warunki środowiska guza, zwłaszcza niedotlenienie, obniżone pH i niedobór składników odżywczych. Wpływ tych czynników potwierdzony został w doświadczeniach, w których stwierdzono znacznie szybsze pojawianie się nieodwracalnych uszkodzeń w przegrzewanych okolicach ciała zwierząt, jeśli ograniczono uprzednio dopływ krwi do tych okolic [3, 24, 87, 128]. Również *in vitro* wykazano, że niedotlenienie oraz obniżenie pH pożywki zwiększają wrażliwość komórek na działanie hipertermii [29, 39, 41, 42, 51, 65, 94, 96, 116]. Ostatnio stwierdzono, że bezpośrednim czynnikiem odpowiedzialnym za wzrost wrażliwości komórek na przegrzewanie jest spadek pH środowiska, który może być wynikiem deficytu tlennego, jak i niedoboru składników odżywczych [35, 39, 91, 95]. Obniżenie pH pożywki w hodowli komórek CHO z 7,4 do 6,7 obniżyło przeżywanie tych komórek (w wyniku działania temperatury 42°C przez 4 godz.) z 10 do 0,01% [39] (ryc. 3). Zagęszczenie hodowli, prowadzące do zakwaszenia



Ryc. 3. Wpływ obniżonego pH na przeżywalność komórek CHO poddanych działaniu temperatury 41 i 42°C wg Gerwecka, 1977)

pożywki, również zwiększało termowrażliwość komórek, podczas gdy niedotlenienie, jeśli nie trwało zbyt długo i nie powodowało spadku pH, nie wywierało tego efektu [39].

3. EFEKTY METABOLICZNE DZIAŁANIA HIPERTERMII W KOMÓRKACH PRAWIDŁOWYCH I NOWOTWOROWYCH

a. **Synteza kwasów nukleinowych i białka.** Wysoka wrażliwość komórek na przegrzewanie w fazie S cyklu pozwala sądzić, że zasadnicze znaczenie w mechanizmie działania hipertermii może mieć zaburzenie

struktury i metabolizmu kwasów nukleinowych i/lub białka. Badania nad metabolizmem przegrzewanych *in vitro* komórek nowotworowych wykazały, że już po krótkotrwałym działaniu wyraźnie zahamowane jest wbudowywanie urydyny do tych komórek, czemu towarzyszy zablokowanie syntezy RNA, przede wszystkim jego frakcji rybosomowej [30, 53, 72, 85, 125, 127, 143]. Zaburzenie syntezy RNA polega głównie na zahamowaniu dojrzewania RNA jądrowego i przekształcaniu go w RNA rybosomowy. Po krótkiej inkubacji komórek guza wysiękowego Ehrlicha w temperaturze 44°C wbudowywanie urydyny do cząsteczki prekursorowego RNA 45 S było gwałtownie i nieodwracalnie zahamowane, podobnie jak i przemiana 45 S pre-RNA w dojrzałe formy 28 S i 18 S RNA [125]. Również w komórkach prawidłowych poddanych *in vitro* działaniu hipertermii 43–44°C zahamowanie syntezy RNA było zjawiskiem wczesnym, choć słabiej wyrażonym, niż w komórkach nowotworowych [78, 85, 119, 149]. Zmiany te znalazły odzwierciedlenie w zaburzeniach morfologicznych obserwowanych głównie na terenie jąderka i to zarówno w komórkach prawidłowych, jak i nowotworowych. Pod wpływem przegrzewania komórek *in vitro* w temperaturze 45°C przez 15–60 min włókniste składniki jąderka ulegały rozproszeniu, a składniki ziarniste (cząsteczki rybonukleoproteidów) przechodziły do cytoplazmy [78, 85, 119, 120].

Zaburzenie syntezy i dojrzewania rybosomowej frakcji RNA w przegrzewanych komórkach [30, 144] może być tłumaczone kilkoma mechanizmami:

1. powstaniem w jąderku zmienionego prerybosomowego RNA, który nie ulega prawidłowemu dojrzewaniu;
2. uszkodzeniem termowrażliwego enzymu niezbędnego dla prawidłowego przebiegu procesu dojrzewania RNA w jąderku;
3. zablokowaniem niektórych etapów procesu metylacji prerybosomowego RNA.

Bezpośrednia denaturacja cząsteczek kwasu rybonukleinowego w komórkach ssaków poddanych działaniu hipertermii 41–44°C jest mało prawdopodobna, choć opisywana była w organizmach jednokomórkowych [108]. Wydaje się, że blokada dojrzewania i syntezy RNA, zwłaszcza procesów transmetylacji, może częściowo tłumaczyć hamujący wpływ podwyższonych temperatur na proliferację komórek. Wykazano też, że czynniki zaburzające prawidłowy przebieg syntezy RNA w komórce, np. aktynomycyna D, nasilają cytostatyczny wpływ hipertermii [22]. Z drugiej strony wiadomo, że zahamowanie syntezy RNA wywołane umiarkowaną hipertermią ma charakter przejściowy i po zakończeniu przegrzewania cofa się w ciągu 1–2 dni [10, 53, 78, 119, 143]. Ponadto sztuczne obniżenie syntezy RNA w komórce do 50% wartości prawidłowej nie hamuje powstania termooporności w komórkach poddanych frakcjonowanej ekspozycji

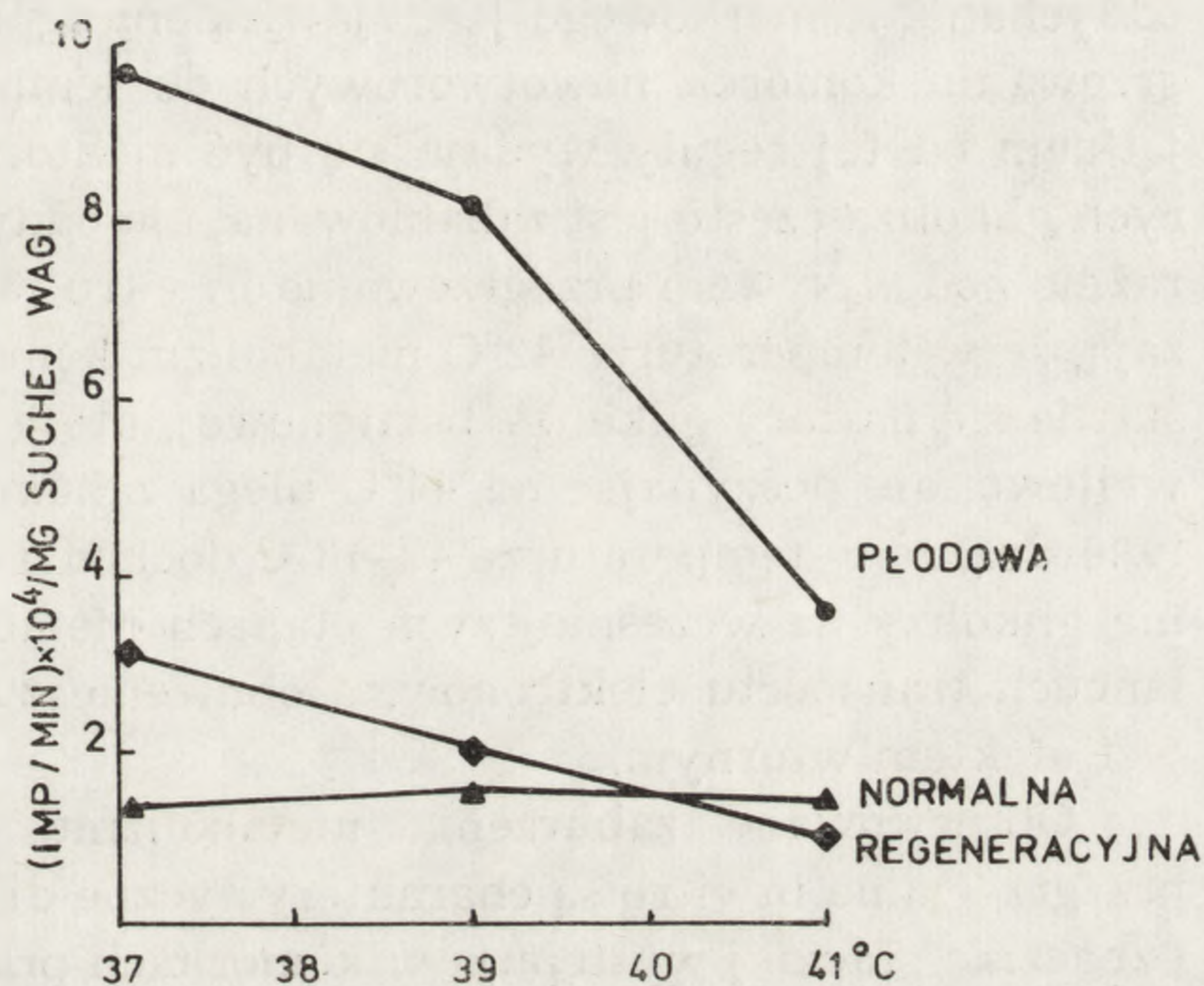
zycji na hipertermię [70]. Fakty te przeczą pierwotnej roli zaburzeń metabolizmu RNA w zabijającym komórki działaniu temperatur w zakresie 42–44°C.

Zaburzenie syntezy i struktury kwasu dezoksyrybonukleinowego i białka w przegrzewanych komórkach ma charakter wtórny i jest słabiej wyrażone niż zaburzenie syntezy RNA [30, 31, 34, 72, 85, 102, 149]. Możliwość uszkadzającego wpływu hipertermii na genom komórki wynika z doniesień o aberracjach chromosomowych i/lub mutacjach wywołanych przegrzewaniem *in vitro* [23, 113, 148]. Jednak bezpośrednio uszkodzenie cząsteczki DNA o typie denaturacji, depurynacji lub destrukcji wiązań estrowych obserwowane jest dopiero w temperaturze powyżej 50°C [73, 133]. W zakresie 42–44°C bardziej prawdopodobna jest denaturacja białek wchodzących w skład kompleksu dezoksyrybonukleoproteinowego i ich agregacja z cząsteczką DNA [26, 109]. Powstawanie kompleksów zdenaturowanego białka z DNA mogłoby tłumaczyć występowanie mutacji i nieprawidłowej ekspresji genów w przegrzewanych komórkach [127]. Tego typu zaburzenia w obrębie genomu sugerują pośrednio obserwacje mikroskopowe, w których wykazano zagęszczenie heterochromatyny oraz zmniejszenie wymiarów jądra w komórkach przegrzewanych *in vitro* oraz *in vivo* [95, 97].

Zaburzenia metabolizmu DNA wywołane działaniem hipertermii polegają przede wszystkim na zahamowaniu aktywności enzymów — kinazy tymidynowej i polimerazy [6, 7]. Polimeraza DNA zostaje przejściowo unieczynniona w temperaturze do 42°C, a powyżej tego poziomu ulega nieodwracalnemu uszkodzeniu [6]. Obserwowano również zahamowanie fosforylacji monofosforanu tymidyny i tworzenie dwufosforanu oraz blokadę procesów metylacji. Upośledzone wbudowywanie ³H-tymidyny do cząsteczki DNA było wyraźniejsze w komórkach aktywnie proliferujących, co wykazano *in vitro* w komórkach wątroby prawidłowej, płodowej i regenerującej [149] (ryc. 4). Zaburzenia enzymatyczne w obrębie genomu komórkowego polegać też mogą na blokowaniu przez hipertermię enzymów biorących udział w naprawie uszkodzonej cząsteczki DNA. Okazało się, że przegrzewanie nasila letalny i subletalny wpływ czynników uszkadzających wybiórczo cząsteczkę DNA — promieniowania jonizującego i związków cytostatycznych [6, 7, 12, 24, 25, 35, 50, 95, 117, 135]. Stwierdzono również, że hipertermia 42–44°C hamuje naprawę subletalnych uszkodzeń w komórkach, wywoływanych działaniem promieniowania jonizującego, a więc modyfikuje funkcje enzymów biorących udział w tej naprawie [7, 12, 95, 135].

Upośledzenie metabolizmu DNA i RNA w przegrzewanych komórkach prowadzić musi do zachwiania syntezy białek cytoplazmatycznych, zarówno enzymatycznych, jak i strukturalnych. Hipertermia może rów-

niez bezpośrednio uszkadzać cząsteczki białka komórkowego, prowadząc do nasilenia już istniejących zaburzeń czynnościowych [25, 107, 142]. Po podatność białek na uszkodzenia termiczne warunkuje możliwość adaptacji komórek do życia w określonym przedziale temperatur. Wykazano np., że białka organizmów termofilowych są bardziej odporne na denaturację



Ryc. 4. Wbudowywanie ³H-TdR do komórek wątroby płodowej, dojrzałej i regenerującej poddanych działaniu temperatur 37, 39 i 41°C (wg Wüsta i wsp., 1973)

cieplną niż białka komórek ssaków [79, 150]. Wydaje się jednak, że zaburzenie metabolizmu i struktury białek w przegrzewanych komórkach organizmów wyższych jest zjawiskiem późnym i ma charakter wtórny w stosunku do obserwowanych zmian syntezy RNA [82]. Z drugiej strony, wyniki niektórych badań sugerują, że hipertermia w zakresie 41–45°C może stymulować syntezę nowych cząstek białkowych, które działają uszkadzająco na struktury komórkowe [22, 103] lub są związane z powstawaniem termotolerancji w komórkach poddanych frakcjonowanemu przegrzewaniu *in vitro* [54].

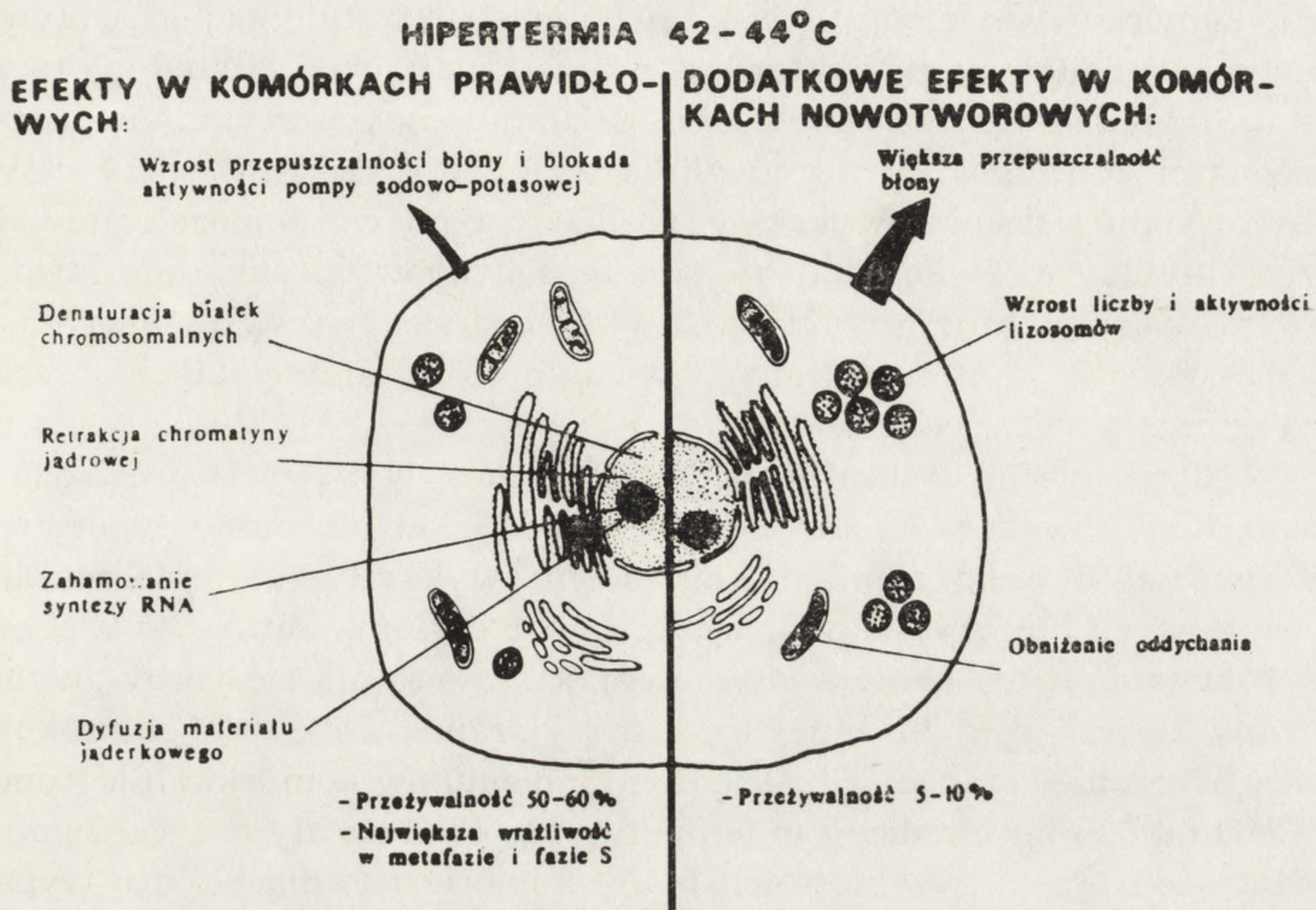
b. Oddychanie i glikoliza. Upośledzenie oddychania i w mniejszym stopniu glikolizy w komórkach nowotworowych przegrzewanych *in vitro* jest zjawiskiem znanym od dawna. Już w 1927 r. Westermarck [144] stwierdził gwałtowne zahamowanie metabolizmu tlenowego i glikolizy w skrawkach hodowlanych komórek nowotworów szczurzych (rak Flexner-Jobling i mięsak Jensena) poddanych działaniu temperatury 45°C przez 90 min. Prawidłowe komórki wątroby i śledziony nie wykazywały zaburzeń w tych warunkach. Nowsze badania [1, 15, 84], przeprowadzone na hodowlach różnego rodzaju komórek nowotworowych pobranych od myszy i szczurów (wątrobiaki Novikoffa i Morrisa, rak wysiękowy Ehrlicha, mięsak wysiękowy Yoshida), a także od człowieka (czerniak złośliwy, mięsak kości), potwierdziły wyniki Westermarcka, chociaż zahamowa-

nie glikolizy było tu zjawiskiem późnym i słabiej zaznaczonym niż zaburzenie metabolizmu tlenowego. Stwierdzono również wyraźny spadek wykorzystania tlenu przez hodowle komórek nowotworowych (będący miarą oddychania komórkowego) przy jednocześnie niewielkim upośledzeniu produkcji CO₂ (miara nasilenia glikolizy) [28, 30, 31, 88, 89]. Upośledzenie oddychania komórkowego jest zjawiskiem ogólnym, towarzyszącym przegrzewaniu komórek nowotworowych do temperatury 42–44°C [84]. Wyjątkiem od tej reguły wydają się być niektóre nowotwory ludzkie, których glikoliza często jest zahamowana, ale oddychanie nie zmienia się wyraźnie pod wpływem przegrzewania *in vitro* [32]. Niektórzy autorzy uważają, że w temperaturze 42°C metabolizm komórek nowotworowych przedstawia się na tory glikolizy beztlenowej, która początkowo przebiega prawidłowo, ale poczynając od 44°C ulega zahamowaniu [15, 84]. Inni [106] twierdzą, że w temperaturze 42–43°C dochodzi do pierwotnego zahamowania glikolizy na wcześniejszych etapach metabolizmu energetycznego niż łańcuch transportu elektronów, a obniżenie zużycia tlenu przez komórki jest efektem wtórnym.

Obserwowane zaburzenia metabolizmu tlenowego pod wpływem przegrzewania *in vitro* są charakterystyczne dla komórek nowotworowych i znacznie rzadziej występują w komórkach prawidłowych. I tak np. 2-godzinne działanie temperaturą 42°C hamowało nieodwracalnie oddychanie w komórkach wątrobiaka Novikoffa, podczas gdy komórki wątroby prawidłowej i regenerującej wykorzystywały tlen w normalnym zakresie [82, 84]. Okazało się jednak, że w niektórych komórkach nowotworowych zahamowanie oddychania jest słabo zaznaczone i występuje dopiero po kilku godzinach działania temperatury 42–44°C [82]. Badając wiele różnych rodzajów komórek nowotworowych Dickson stwierdził, że nieodwracalne zahamowanie oddychania po działaniu temperaturą 42°C powiązane jest z nieodwracalnym zaburzeniem proliferacji komórek *in vitro* [30] oraz z utratą zdolności tych komórek do wzrostu nowotworowego *in vivo* [30, 31, 88]. Podobne wyniki uzyskał już Westermarck [144] w swych pionierskich badaniach w 1927 r. Na tej podstawie Dickson [27] doszedł do wniosku, że stopień wykorzystania tlenu i produkcji dwutlenku węgla w komórkach nowotworowych *in vitro* może być dobrym wskaźnikiem wrażliwości tych komórek na działanie hipertermii *in vivo*.

Podsumowując wyniki badań nad wpływem podwyższonych temperatur na metabolizm komórkowy wydaje się, że wyraźne zahamowanie oddychania w komórkach nowotworowych może tłumaczyć ich większą wrażliwość na przegrzewanie w porównaniu z komórkami prawidłowymi. Wiadomo jednak, że zaburzenie metabolizmu tlenowego i glikolizy występuje w przegrzewanych komórkach stosunkowo późno i jest raczej wynikiem, a nie przyczyną nieodwracalnych uszkodzeń struktury i funkcji ko-

mórki. Stwierdzenie takich zaburzeń in vitro może być natomiast przydatne w ocenie termowrażliwości komórek guzów nowotworowych in situ (ryc. 5).



Ryc. 5. Zaburzenia morfologiczne i metaboliczne w komórkach prawidłowych i nowotworowych poddanych działaniu hipertermii 43°C — schemat (wg Janiaka, 1978)

IV. USZKODZENIE BŁON BIOLOGICZNYCH WYWOŁANE DZIAŁANIEM HIPERTERMII

1. BŁONA KOMÓRKOWA

Uszkodzenie błony komórkowej pod wpływem czynników zewnętrznych może w istotny sposób modyfikować procesy metaboliczne odpowiedzialne za utrzymanie prawidłowego stanu czynnościowego i strukturalnego komórki [110, 141]. Zarówno obniżenie, jak i podniesienie temperatury środowiska może prowadzić do zaburzeń stanu fizykochemicznego błon biologicznych, wynikających z tzw. zmian fazowych fosfolipidów [142]. Wykazano, że zmiany temperatury w granicach 38-44°C prowadzą do przemian fazowych fosfolipidów i związanych z tym zaburzeń płynności (fluidity) błony komórkowej [16, 142]. Cholesterol „buforuje” zmiany fazowe fosfolipidów błonowych, co sprawia, że gwałtowne przejścia fazowe w błonach komórek organizmów wyższych są zjawiskiem rzadkim przy działaniu temperaturą 38-44°C [58, 142]. Istnieje jednak możliwość wybiórczego uszkodzania przez hipertermię niektórych obszarów błony

pozbawionych cholesterolu (tzw. termotropowa segregacja fazowa) [142]. Znaczny wpływ na zmiany fazowe lipidów w błonach poddawanych działaniu nefizjologicznych temperatur mają wzajemne oddziaływania składników białkowych i lipidowych błony [142]. Częsteczki białkowe w błonach komórkowych mogą ulegać zmianom strukturalnym pod wpływem przegrzewania (zmiany struktury 3- i 4-rzędowej), choć zaburzenia te występują głównie przy równoczesnym działaniu innych czynników, przede wszystkim obniżonego pH środowiska [59, 142]. Badania przy użyciu spektroskopii laserowej wykazały, że białka błonowe komórek prawidłowych (limfocyty B chomika) ulegają termotropowym zmianom strukturalnym w temperaturze wyższej od 39°C, podczas gdy w błonie tych samych komórek transformowanych wirusem SV₄₀ zmiany takie obserwowano poniżej 39°C [140].

Modyfikacje strukturalne białek i lipidów błonowych prowadzą do zmian struktury powierzchni komórek poddanych działaniu hipertermii. Obserwacje w mikroskopie skaningowym wykazały, że przegrzewanie prawidłowych limfocytów bydlęcych *in vitro* do temperatury 45°C prowadzi do pofałdowania błony komórkowej, która stawała się jakby „wybrukowana kocimi łbami”, czemu towarzyszył zanik większości mikrokosmków i tworzenie „czapeczki” na jednym z biegunów komórki [76]. Komórki CHO po 30 min inkubacji w temperaturze 43°C traciły przyczepność do podłoża, ale przepuszczalność ich błony komórkowej dla błękitu trypanu (a więc dużej cząsteczki) nie ulegała zmianie [75]. Stwierdzono też, że umiarkowana hipertermia modyfikuje powierzchnię komórek nowotworowych prowadząc do wzrostu ich własności immunogennych [17, 83] oraz zwiększając podatność tych komórek na immunolizę w reakcji z kompleksem przeciwciało–dopełniacz [126]. Zmiany te również nie były związane ze wzrostem przepuszczalności błony komórkowej dla związków wielko-cząsteczkowych.

Szereg danych wskazuje, że zmiany w obrębie błony komórkowej są szczególnie nasilone w komórkach nowotworowych i że mają one charakter pierwotny w stosunku do większości zmian metabolicznych w obrębie cytoplazmy i jądra. Zwiększenie temperatury pożywki w hodowli komórek wątrobiaka Novikoffa z 38 do 42°C, a nawet do 40°C, hamowało nieodwracalnie transport glutaminianu przez błonę komórkową, podczas gdy w komórkach wątroby prawidłowej efektu tego nie obserwowano [128]. Inkubacja komórek wątrobiaka Novikoffa w temperaturze 47°C przez 5 min prowadziła do nieodwracalnej utraty przez komórki zdolności do pobierania z pożywki 2-dezoksyglukozy, tymidyny oraz rybonukleotydów [126]. Zjawisko to związane było z inaktywacją cząstek nośnika w błonie komórkowej (obniżenie V_{max}) i korelowało z zaburzeniem syntezy kwasów nukleinowych w komórkach. Przegrzewanie przez 2 godziny w tem-

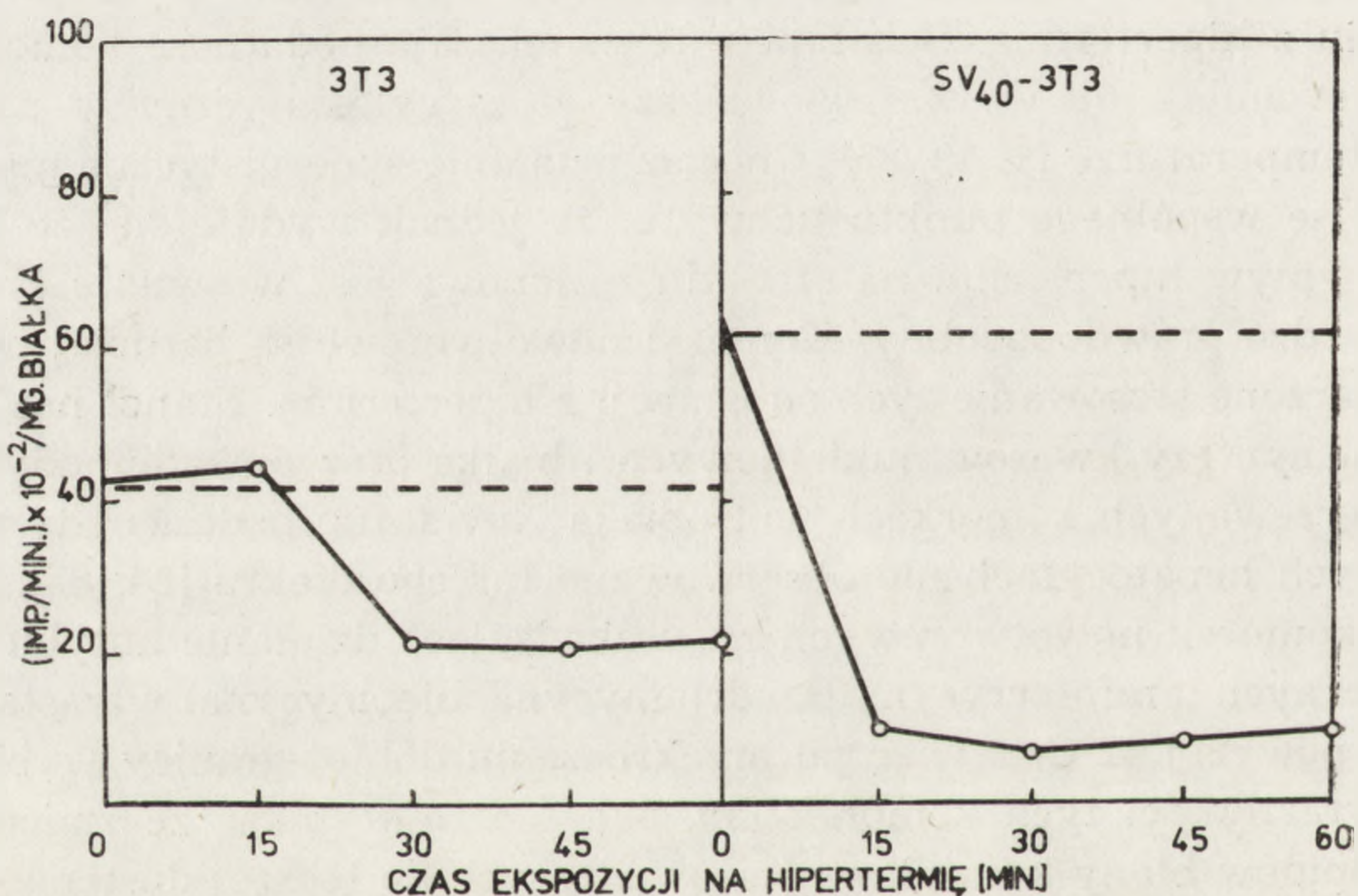
peraturze 43°C powodowało zahamowanie transportu kwasu aminoizomalousowego (AIB) do wnętrza komórek białaczkowych człowieka pochodzących z limfocytów T [67]. Takie samo przegrzewanie prawidłowych tymocytów ludzkich prowadziło początkowo do pobudzenia transportu AIB do wnętrza komórek, a następnie jego spadku do 10% wartości kontrolnej [67]. W obu przypadkach zahamowanie transportu AIB związane było ze zmniejszeniem się liczby cząstek nośnika w błonie, prawdopodobnie w wyniku zmiany struktury 3- i 4-rzędowej białek biorących udział w tym transporcie.

Niektóre leki i związki chemiczne reagujące wybiórczo z lipidami błonowymi, a zwłaszcza antybiotyki polieniczne [49, 50, 84], etanol [84, 85] oraz dwumetylosulfotlenek [114], wykazują synergizm w skojarzonym działaniu z hipertermią. Substancje te zwiększają podatność komórek na przegrzewanie i/lub wywierają większy efekt cytostatyczny w podwyższonej temperaturze [1, 49, 85]. Chociaż działanie synergistyczne nie oznacza per se wspólnego punktu uchwytu, to jednak wydaje się, że bezpośredni wpływ hipertermii na struktury błonowe jest w świetle tych danych bardzo prawdopodobny. Komórki nowotworowe są bardziej podatne na skojarzone stosowanie tych substancji z hipertermią. Etanol nasilał zaburzenie syntezy kwasów nukleinowych i białka oraz blokadę oddychania w przegrzewanych komórkach wątrobiaka Novikoffa, podczas gdy w prawidłowych hepatocytach nie obserwowano takiego efektu [84, 85]. Wrażliwość komórek nowotworowych na uszkadzające działanie antybiotyków polienicznych (amfoterycyna B, adriamycyna, bleomycyna) wzrasta gwałtownie powyżej 42°C, a więc po przekroczeniu dolnej granicy wybiórczej termowrażliwości tych komórek [49, 50]. Ma to wynikać ze zmian fazowych lipidów błony komórkowej prowadzących do lepszej dostępności receptorów powierzchniowych i/lub wzrostu przepuszczalności błony dla badanych antybiotyków [49].

W badaniach własnych nad termowrażliwością komórek prawidłowych i transformowanych wirusem onkogennym posłużono się zestawem testów radioizotopowych, pozwalających ocenić stan czynnościowy (czynny transport jonu potasowego przy udziale $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPazy}$) oraz zmiany przepuszczalności błony komórkowej *in vitro* [60, 66, 134]. Do doświadczeń użyto hodowli prawidłowych komórek nerki królika (RK 13) oraz fibroblastów mysich prawidłowych (3T3) i transformowanych wirusem SV₄₀ (3T3-SV₄₀). Komórki przegrzewano w łaźni wodnej o temperaturze 43°C przez 15–180 min. Dla oceny aktywnego transportu potasu posłużono się niefizjologicznym równoważnikiem tego jonu — rubidem 86 [60, 111]. Aktywność $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPazy}$ badano również bezpośrednio, mierząc stopień wiązania przez komórki swoistego inhibitora pompy sodowo-potasowej — ouabainy. Zmiany przepuszczalności błony oceniano według ilości

uwolnionych z uprzednio wyznakowanych komórek jonów $^{86}\text{Rb}^+$ oraz związków o wzrastającym ciężarze cząsteczkowym: kwasu aminoizomasłowego (^{14}C -AIB, c.c.: 103) urydyny (^3H -UdR, c.c.: około 1000) oraz białek cytoplazmatycznych wyznakowanych chromem 51 (c.c.: ponad 100 000).

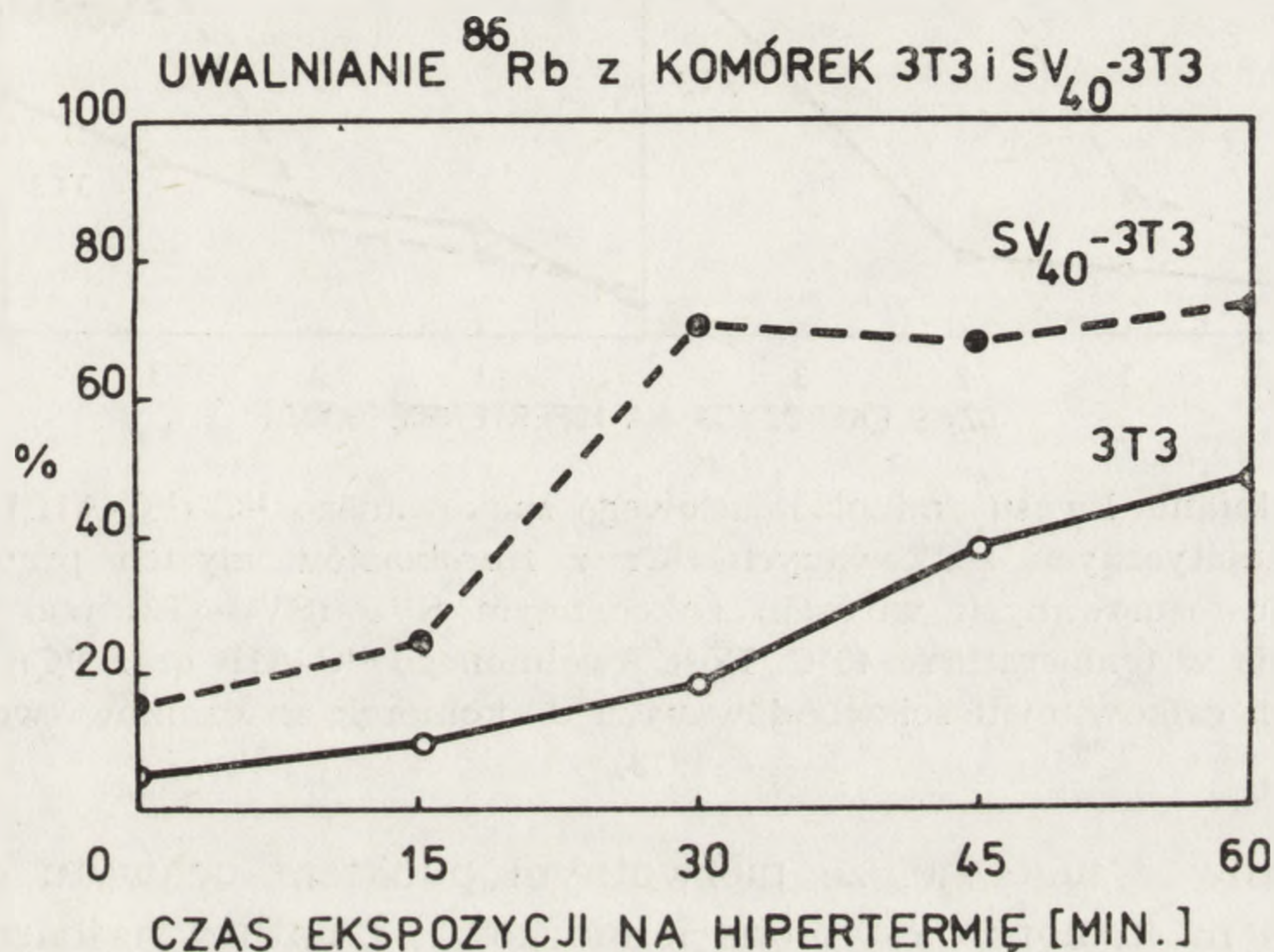
Najwcześniej obserwowaną zmianą w przegrzewanych komórkach był spadek wychwytu $^{86}\text{Rb}^+$ oraz zahamowanie wiązania ouabainy, zarówno w hodowlach prawidłowych, jak i transformowanych. Jednakże w komórkach prawidłowych upośledzenie aktywnego transportu rubidu obserwowano po 15–30 min inkubacji w 43°C , podczas gdy w komórkach transformowanych zaburzenie to występowało wcześniej i było maksymalnie wyrażone już po 15 min przegrzewania (ryc. 6). Również uwalnianie jonu



Ryc. 6. Wnikanie ^{86}Rb do fibroblastów mysich prawidłowych (3T3) oraz stransformowanych wirusem onkogennym SV₄₀ (SV₄₀-3T3) poddanych *in vitro* działaniu temperatury 43°C (wg Janiaka, 1978)

$^{86}\text{Rb}^+$ było bardziej nasilone w komórkach transformowanych, ale występowało nieco później niż upośledzenie aktywnego transportu rubidu do wnętrza tych komórek (ryc. 7). Według obecnych poglądów badania aktywności pompy sodowo-potasowej oraz biernego uwalniania jonów z komórek należą do najbardziej czułych metod oceny zaburzeń czynności i przepuszczalności błony komórkowej [11, 111]. Wykazano również, że procesy transportu jonowego warunkują wzrost i proliferację komórek i poprzedzają zmiany metaboliczne zachodzące w obrębie cytoplazmy i jądra [118, 121]. Z drugiej strony, procesy te są bardzo wrażliwe na zmiany warunków środowiska, w tym również na zmiany temperatury [60, 147]. Badania własne wykazały wyraźnie większą termowrażliwość

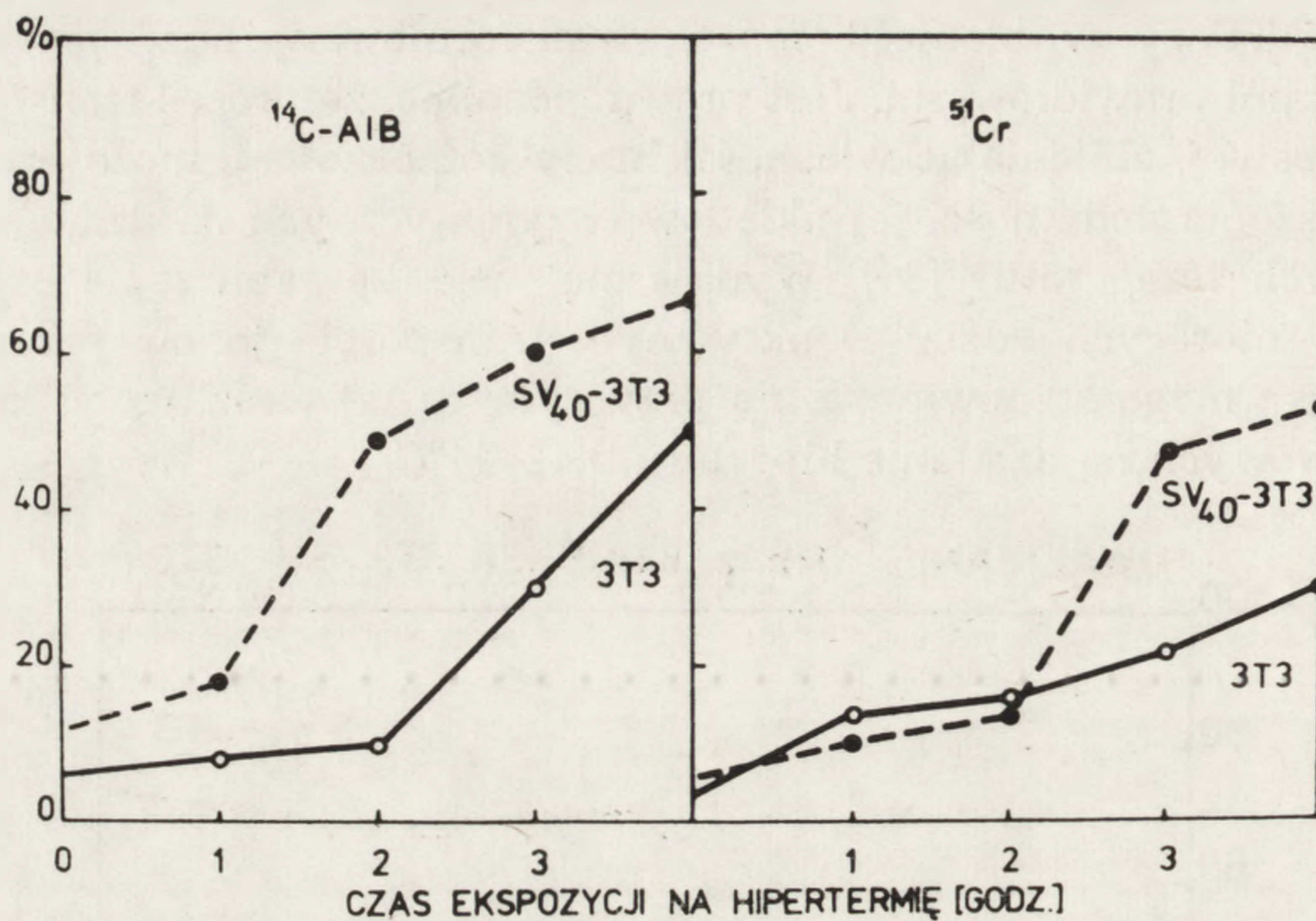
Na^+ - K^+ -ATPazy w błonie komórek transformowanych w porównaniu z komórkami prawidłowymi. Jest prawdopodobne, że proces transformacji nowotworowej, zmieniając właściwości błony komórkowej, może prowadzić do zwiększenia podatności jej układów enzymatycznych na działanie podwyższonych temperatur [81]. Wydaje się więc, że zaburzenia czynności enzymów biorących udział w aktywnym transporcie jonów przez błonę komórkową mogą stanowić istotną przyczynę dużej wrażliwości komórek nowotworowych na działanie hipertermii 42–44°C.



Ryc. 7. Uwalnianie ^{86}Rb z fibroblastów mysich prawidłowych (3T3) i stransformowanych wirusem onkogennym SV₄₀ (SV₄₀-3T3) pod wpływem przegrzewania w temperaturze 43°C. Ilość uwolnionego rubidu wyrażona jest w procentach całkowitej ilości wbudowanego do komórek znacznika (wg Janiaka, 1978)

Wzrost przepuszczalności błony przegrzewanych komórek dla związków o różnej wielkości cząsteczki, opisywany przez wielu autorów [49, 50, 126, 128], potwierdzony został również w badaniach własnych, przy czym zaburzenie to występowało wcześniej i było silniej wyrażone w komórkach transformowanych (ryc. 8). Stwierdzono ponadto, że wyraźny wzrost uwalniania ^{14}C -AIB z komórek, zwłaszcza transformowanych, znacznie wyprzedza pojawienie się zmian morfologicznych, a także zaburzeń aktywności niektórych enzymów wewnątrzkomórkowych i wzrostu śmiertelności komórek poddanych działaniu temperatury 43°C [60].

Wyniki badań własnych wskazują, że proces uszkodzenia błony komórek prawidłowych i transformowanych nowotworowo jest jakościowo podobny, ale w komórkach transformowanych uszkodzenie to występuje wcześniej i jest silniej wyrażone [60, 61]. Potwierdza to spostrzeżenia in-



Ryc. 8. Uwalnianie kwasu aminoizomasłowego znakowanego ^{14}C (^{14}C -AIB) oraz białek cytoplazmatycznych znakowanych ^{51}Cr z fibroblastów mysich prawidłowych (3T3) i stransformowanych wirusem onkogennym SV₄₀ (SV₄₀-3T3) pod wpływem przegrzewania w temperaturze 43°C. Ilość uwolnionego ^{14}C -AIB oraz ^{51}Cr wyrażono w procentach całkowitej ilości wbudowanych do komórek znaczników (wg Janiaka, 1978)

nych autorów i sugeruje, że pierwotnym punktem uchwytu działania hipertermii na komórki jest błona komórkowa, z natury najbardziej narażona na uszkodzający wpływ czynników zewnętrznych. Dla poparcia tej hipotezy konieczne jest jednak przeprowadzenie bardziej kompleksowych badań biochemicznych, biofizycznych i ultrastrukturalnych błon komórkowych poddanych działaniu podwyższonych temperatur *in vitro* i *in vivo*.

2. LIZOSOMY, MITOCHONDRIA I INNE STRUKTURY KOMÓRKOWE

Badania ultrastrukturalne i histochemiczne guzów nowotworowych przegrzewanych *in vivo* zwróciły uwagę na wzrost aktywności enzymów lizosomalnych i liczby lizosomów w komórkach tych guzów [91, 95, 98, 99]. Według niektórych autorów stymulacja aktywności lizosomów jest zaburzeniem pierwotnym, potęgowanym dodatkowo przez zahamowanie metabolizmu tlenowego i związany z tym spadek pH wnętrza komórek [8, 91, 100]. Von Ardenne [1, 2] twierdzi, że zakwaszenie środowiska komórek nowotworowych labilizuje błony lizosomalne i w ten sposób zmniejsza ich odporność na uszkodzające działanie hipertermii. Dla zniszczenia komórek nowotworowych *in vivo* trzeba więc, poza wybiórczym ich przegrzewaniem, stale utrzymywać odpowiednie zakwaszenie komórek, np. poprzez ciągły wlew glukozy, stanowiącej substrat wyjściowy

w procesie glikolizy. Te założenia stanowią podstawę opracowanej przez von Ardenne i wsp. [2] metody wielostopniowej terapii nowotworów (Krebs-Mehrschritt-Therapie), w której skojarzono działanie hipertermii, niedotlenienia i hiperglikemii.

Pierwotna rola uszkodzenia lizosomów w mechanizmie termowrażliwości komórek nowotworowych jest jednak kwestionowana. Gerweck [33, 39] np. twierdzi, że obniżenie stężenia jonów wodorowych we wnętrzu komórki prowadzi początkowo do uszkodzenia struktur jądrowych, a wzrost aktywności enzymów lizosomalnych ma charakter wtórny. Ponadto badania nad kinetyką procesów patologicznych na poziomie komórkowym wskazują, że uszkodzenie lizosomów jest zjawiskiem stosunkowo późnym i stanowi raczej wynik, a nie przyczynę zaburzeń na terenie cytoplazmy i jądra [138]. Wykazano również, że uszkadzające działanie hipertermii jest w komórkach nowotworowych skierowane pierwotnie na ich błonę komórkową, a labilizacja błon lizosomalnych jest zjawiskiem późniejszym [139].

Obserwowane wielokrotnie zaburzenia metabolizmu oddechowego w przegrzewanych komórkach mogą być tłumaczone uszkadzającym wpływem hipertermii na czynność i strukturę mitochondriów. Overgaard [93] obserwował wyraźną redukcję aktywności oksydazy cytochromowej w komórkach guza przeszczepialnego myszy C3H, przegrzewanych przez 60 min w temperaturze 42,5°C. Mitochondria komórek nowotworowych nie zmieniają jednak swej struktury po ekspozycji na hipertermię [53, 72], a w dodatku wykorzystanie tlenu przez komórki obniża się wyraźnie dopiero po długotrwałym przegrzewaniu. Wykazano również, że mitochondria wyizolowane z komórek wątrobiaka Novikoffa nie są szczególnie wrażliwe na działanie hipertermii oraz że metabolizm tlenowy komórek prawidłowych i nowotworowych nie ulegał zaburzeniu po przeniesieniu hodowli z temperatury 38 do 43°C [84].

Brak jest też danych wskazujących, że uszkodzenie innych struktur komórkowych może odgrywać istotną rolę w mechanizmie cytobójczego działania hipertermii. Nie wykazano zmian w obrębie aparatu Golgiego ani retikulum endoplazmatycznego w komórkach poddanych działaniu podwyższonych temperatur *in vivo* i *in vitro*, podczas gdy metabolizm tlenowy oraz synteza kwasów nukleinowych w tych komórkach były wyraźnie zaburzone [19, 53, 72].

V. NAPRAWA USZKODZEŃ TERMICZNYCH I TERMOTOLERANCJA

Większość omawianych dotychczas zaburzeń czynnościowych i strukturalnych wywołanych działaniem hipertermii ma charakter odwracalny i komórki (po kilkunastu godzinach) powracają do stanu prawidłowego.

W tym czasie dochodzi do pełnej reorganizacji struktur komórkowych, prawdopodobnie w wyniku wzmożonej aktywności enzymów naprawczych [119]. O tym, że komórki zdolne są do naprawy subletalnych uszkodzeń wywołanych działaniem hipertermii świadczy m. in. przebieg krzywych przeżycia komórek przegrzewanych *in vitro*, w których część wykładnicza poprzedzona jest ramieniem (shoulder) o różnej szerokości, zależnie od temperatury i czasu ekspozycji.

Badania kinetyki naprawy uszkodzeń termicznych prowadzono stosując frakcjonowane dawki hipertermii *in vitro* (split-dose survival experiments), tzn. badając przeżywalność komórek poddanych dwukrotnemu przegrzewaniu i porównując ją z przeżywalnością po jednorazowej ekspozycji na hipertermię. Komórki CHO zsynchronizowane w fazie S poddawano „szokowi termicznemu” (45,5°C) w dawce jednorazowej (15 min) lub dwóch dawkach (7 min i 9,5 min) oddzielonych różnej długości okresami inkubacji w 37°C [40]. Naprawę uszkodzeń i wzrost przeżywalności komórek obserwowano już w ciągu pierwszej godziny od zastosowania „szoku termicznego”, przy czym okazało się, że żywotność hodowli jest większa po dwukrotnym niż po jednorazowym przegrzewaniu. Naprawa uszkodzeń termicznych w komórkach CHO rozpoczyna się już po kilkunastu minutach od zakończenia przegrzewania (45°C, 35 min) i trwa około 12 godzin [69]. Przeżywalność komórek poddanych dwukrotnemu przegrzewaniu (2 razy po 17,5 min), z kilkugodzinną przerwą między ekspozycjami, była większa niż po jednorazowym zastosowaniu całej dawki hipertermii (45°C, 35 min). Wzrost ten związany był z jednej strony z naprawą uszkodzeń subletalnych (głównie w ciągu pierwszych 4 godzin od zakończenia ekspozycji), a z drugiej — z nabyciem przez komórki odporności na hipertermię pod wpływem pierwszej ekspozycji na podwyższoną temperaturę.

Już w 1957 r. Selawry i wsp. [117] donosili, że komórki nowotworowe guzów ludzkich *in vitro* stają się mniej wrażliwe na hipertermię pod wpływem ich wielokrotnego przegrzewania. W innych badaniach pojedyncza 2-godzinną dawka hipertermii zmniejszała przeżywalność komórek HeLa o 46%. Dwukrotne przegrzewanie (2 razy po 1 godz.) z przerwą 6-godzinną (inkubacja w 37°C) było mniej szkodliwe i aż 70% komórek przeżywało w tych warunkach, co tłumaczy się naprawą subletalnych uszkodzeń w przegrzewanych komórkach [102]. Przeżywalność komórek CHO poddanych działaniu dwóch dawek hipertermii (2 razy po 17,5 min w 45°C) oddzielonych 12-godzinną przerwą (inkubacja w 37°C) wynosiła 70% wartości kontrolnej, gdy tymczasem po równoważnej ekspozycji jednorazowej (35 min w 45°C) przeżywało tylko 0,02% tych komórek [56]. Dane te nie rozstrzygały jednak, czy u podłoża wymienionych zjawisk leżą mechanizmy naprawcze, czy też powstanie tolerancji w przegrzewanych ko-

mórkach. Obecnie uważa się, że hipertermia w zakresie 41–46°C prowadzi może w pewnych warunkach do wzrostu odporności komórek na przegrzewanie. Okazało się, że termotolerancja, definiowana jako wzrost D_0 krzywej przeżycia*, może być wywołana zarówno przez krótkotrwałe przegrzewanie w temperaturze powyżej 43°C, z następującym po tym okresem inkubacji w warunkach fizjologicznych (acute conditioning) [37, 52, 55, 56], jak i w drodze przewlekłego przegrzewania w zakresie 41,5–42,5°C (chronic conditioning) [25, 39]. Nie stwierdzono jednakże, czy mechanizm termotolerancji jest w obu przypadkach jednakowy.

1. METODA UDERZENIOWA:

Dawka warunkująca: 43°C; 5–15 min

↓
Okres wywoławczy: 37–38°C; 5–20 godz.

↓
Termooporność

2. METODA PRZEWLEKŁA

Dawka warunkująca: 41,5–42,5°C; 2–8 godz.

{Brak okresu wywoławczego}

↓
Termooporność

Schemat. Metody indukowania termooporności w komórkach in vitro

Powstanie termotolerancji komórek zależy głównie od dawki hipertermii, która ją wywołuje (tzw. „dawka warunkująca”) [54, 55]. Po przegrzaniu np. komórek CHO w 45°C przez 10 min największa odporność na hipertermię występowała po około 18 godzinach inkubacji w 37°C, podczas gdy skrócenie ekspozycji do 5 min prowadziło do znacznie szybszego powstania termotolerancji — maksymalny wzrost D_0 obserwowano w tym przypadku już po 2 godzinach inkubacji w 37°C [54]. Istotne znaczenie mają również warunki inkubacji, czyli tzw. „okresu wywoławczego” (developing period), przy czym optymalne jest utrzymywanie temperatury tego okresu w zakresie zbliżonym do fizjologicznego (36–38°C dla komórek ssaków) [54]. Inkubacja w temperaturze rzędu 39–41°C nie hamowała wprawdzie powstawania termotolerancji, ale znacznie redukowała przeżywalność komórek [54]. Sugeruje się, że jest to związane z utrwalaniem subletalnych uszkodzeń w podwyższonych temperaturach „okresu wywoławczego” [55].

* D_0 — czas trwania ekspozycji w danej temperaturze, po której przeżycie komórek obniża się o 1/e na wykładniczej części krzywej przeżycia (e — podstawa logarytmu naturalnego).

Nabyta odporność komórek na hipertermię ma charakter przejściowy, ale czas jej trwania jest trudny do określenia ze względu na niewielką ilość badań w tym zakresie. Wstępne dane wskazują, że komórki CHO tracą odporność na przegrzewanie w okresie 48–72 godzin od zastosowania „dawki warunkującej” [56]. Jednakże zarówno powstanie, jak i utrata termotolerancji mogą być zahamowane przez przetrzymywanie komórek w temperaturze zbliżonej do 0°C [54].

Mechanizm powstawania tolerancji na przegrzewanie jest nie wyjaśniony. Stwierdzono jednak, że istnieje korelacja między czasem pojawiania się maksymalnej odporności na hipertermię a okresem niezbędnym dla odnowy syntezy białka, zaburzonej działaniem podwyższonych temperatur [54, 70]. Ponadto przegrzewanie w znacznie mniejszym stopniu upośledzało metabolizm białek w komórkach o zmniejszonej wrażliwości na hipertermię w porównaniu z komórkami kontrolnymi [54]. Istnieją przypuszczenia, że powstanie termotolerancji związane jest z syntezą nowej cząsteczki krótkożyjącego RNA i/lub białka, która wpływa stabilizująco na polisomy komórkowe, a zwłaszcza na termowrażliwą fazę translacji [47, 54]. Niektórzy autorzy postulują również udział błony komórkowej w tym mechanizmie. Reeves [107] stwierdził, że np. błona odpornych na hipertermię komórek nerki świni jest mniej przepuszczalna dla ³H-urydyny niż błona komórek wrażliwych na przegrzewanie. Hahn i wsp. [49] wykazali również, że cofanie się odporności komórek na hipertermię przebiega równolegle z odnową ich podatności na działanie adriamycyny. Li i Hahn [74] stwierdzili ostatnio, że inkubacja komórek HA-1 w pożywce z etanolem prowadzi do powstania w tych komórkach odporności na przegrzewanie oraz do zmniejszenia ich wrażliwości na toksyczne działanie alkoholu etylowego. Wydaje się więc, że zmiany stanu fizykochemicznego błony komórkowej, zwłaszcza jej składników lipidowych, mogą decydować zarówno o podatności, jak i odporności komórek na działanie podwyższonych temperatur.

Szczególnie istotne znaczenie z terapeutycznego punktu widzenia mają badania nad powstawaniem termotolerancji w komórkach przegrzewanych *in vivo*. W 1963 r. Crile [24] wykazał, że przegrzewanie guzów nowotworowych umiejscowionych w obrębie łap myszy (hipertermia miejscowa w łaźni wodnej o temperaturze 44°C przez 90 min) prowadzi do martwicy kończyn u 95% zwierząt. Jeżeli jednak zabieg ten poprzedzono dodatkową ekspozycją na hipertermię (44°C, 30 min), to destrukcja kończyn występowała tylko u 13% myszy. Podobnie, regresja mięsaka mysiego S 180, obserwowana po przegrzewaniu miejscowym (44°C, 30 min) w 80% przypadków, zmniejszała się do 20%, jeżeli guzy przegrzewano dzień wcześniej w temperaturze 44°C przez 15 min [24]. W obu przypadkach stwierdzona odporność na hipertermię zanikała po około 2 dniach

od zastosowania „dawki warunkującej”. Komórki tkanek prawidłowych także stają się mniej wrażliwe na podwyższone temperatury pod wpływem wielokrotnego przegrzewania *in vivo*. Suit [129] wykazał, że całkowita amputacja zdrowej kończyny u myszy wywołana jej miejscowym przegrzewaniem w temperaturze 43,5°C występowała po 173 min, jeśli hipertermię stosowano jednorazowo, i po 530 oraz 915 min, jeśli przegrzewanie stosowano odpowiednio 5 i 10 razy, z przerwami 24-godzinnymi. Z drugiej strony, Overgaard i Suit [101] obserwowali tylko niewielki wzrost czasu trwania efektywnej hipertermii miejscowej, prowadzącej do regresji mięsaka przeszczepialnego FSa u myszy, jeśli przegrzewanie stosowano w dawkach frakcjonowanych. W badaniach tych autorów przy dwukrotnej ekspozycji guza na temperaturę 42,5 lub 44,5°C (z 24-godzinną przerwą) wskaźnik TCD₅₀* wzrastał tylko 1,2 oraz 1,4 razy w porównaniu z przegrzewaniem jednorazowym. Podobnie, wielokrotne przegrzewanie komórek raka sutka myszy nie prowadziło do powstania u nich termotolerancji [136].

Wykorzystanie hipertermii jako metody wspomagającej w terapii nowotworów u ludzi zależy w dużej mierze od tego, czy frakcjonowanie dawek nie spowoduje powstania odporności na przegrzewanie w tkance nowotworowej i nie doprowadzi do konieczności ryzykownego podnoszenia temperatury ekspozycji. W świetle obecnych badań wydaje się, że indukcja termotolerancji w komórkach nowotworowych *in vivo* jest sprawą kontrowersyjną i wymaga dalszych badań, z uwzględnieniem różnych czynników mających wpływ na kinetykę tego procesu (wielkość „dawki warunkującej”, czas trwania „okresu wywoławczego”, itp.) oraz specyficznych warunków panujących w środowisku guza nowotworowego *in situ* (obniżenie pH, niedotlenienie, niedobór składników odżywczych). Ostatnie badania Gerwecka [39], wskazujące, że obniżenie pH pożywki hamuje rozwój termotolerancji w komórkach przegrzewanych *in vitro*, sugerują, że frakcjonowana hipertermia mogłaby efektywnie niszczyć komórki nowotworowe *in vivo*, powodując jednocześnie mniejsze uszkodzenie otaczających tkanek prawidłowych.

LITERATURA

- [1] ARDENNE M. v., Krebszellkinetik und Krebs-Mehrschritt-Therapie, Z. Naturforsch., **27b**: 1547–1566, 1972.
- [2] — Prinzipien und Konzept 1974 der Krebs-Mehrschritt-Therapie, Radiobiol. Radiother., **16**: 99–119, 1975.

* TCD₅₀ — czas działania temperatury 43,5°C, po którym zahamowanie wzrostu guza nowotworowego występuje u 50% myszy.

- [3] BAKER G. M., WRIGHT F. A., Effects of hypoxia and heat on mammary carcinoma in C3H mice, *Brit. J. Radiol.*, **49**: 809, 1976.
- [4] BARRAU M. D., BLACKBURN G. R., DEWEY W. C., Effects of heat on the centrosomes of Chinese hamster ovary cells, *Cancer Res.*, **38**: 2290–2293, 1978.
- [5] BENDER E., SCHRAM T., Untersuchungen zur Thermostabilität von Tumor- und Normalzellen in vitro, *Acta Biol. Med. Ger.*, **17**: 527–543, 1966.
- [6] BEN-HUR E., ELKIND M. M., BRONK B. V., Thermally enhanced radio-response of cultured Chinese hamster cells. Inhibition of repair of sub-lethal damage and enhancement of lethal damage, *Radiat. Res.*, **58**: 38–51, 1974.
- [7] BEN-HUR E., ELKIND M. M., RIKLIS E., The combined effects of hyperthermia and radiation in cultured mammalian cells, [w] *Proc. 2nd Int. Symp. "Cancer Therapy by Hyperthermia and Radiation"*, Essen, 1977, Urban and Schwarzenberg, 1978, 29–36.
- [8] BICHEL P., OVERGAARD J., Hyperthermic effect of exponential and plateau ascites tumor cells in vitro dependent on environmental pH, *Radiat. Res.*, **70**: 449–454, 1977.
- [9] BIERI V. G., WALLACH D. F. H., Variations of lipid-protein interactions in erythrocyte ghosts as a function of temperature and pH in physiological and non-physiological ranges. A study using paramagnetic quenching of protein fluorescence by nitroxide lipid analogues, *Biochim. Biophys. Acta*, **406**: 415–423, 1975.
- [10] BLEIBERG I., SOHAR E., The effect of heat treatment on the damage and recovery of the protein synthesis mechanism of human kidney cell line, *Virchows Arch., Abt. B*, **17**: 269–278, 1975.
- [11] BOYLE M. D., OHANIAN S. H., BORSOS T., Lysis of tumor cells by antibody and complement. VII. Complement-dependent ⁸⁶Rb release — a non-lethal event? *J. Immunol.*, **117**: 1346–1350, 1976.
- [12] BRONK B. V., Thermal potentiation of mammalian cell killing: clues for understanding and potential for tumor therapy, [w] *Advances in Radiation Biology*, red. J. T. Lett i H. Adler, Acad. Press, New York, San Francisco, London 1976, **6**: 267–324.
- [13] BRUNS P., Die Heilwirkung des Erysipels auf Geschwülste, *Beitr. Klin. Chir.*, **3**: 443–466, 1887.
- [14] BUSCH W., Über den Einfluss, welchen heftigere Erysipeln zuweilen auf organisierte Neubildungen ausüben, *Verhandl. Naturh. Preuss. Rhein. Westphal.*, **23**: 28–30, 1866.
- [15] CAVALIERE R., CIOCATTO E. C., GIOVANELLA B. C., HEIDELBERGER C., JOHNSON R. O., MARGOTTINI M., MONDOVI B., MORICCA G., ROSSI-FANELLI A., Selective heat sensitivity of cancer cells — biochemical and clinical studies, *Cancer*, **20**: 1351–1381, 1967.
- [16] CHAPMAN D., The effect of heat on membranes and membrane constituent, [w] *Thermobiology*, red. A. H. Rose, Acad. Press. London 1967, 122.
- [17] CHECK J. H., CHILDS T. C., BRADY L. W., DERASSE A. R., FUSCALDO K. E., Protection against spontaneous mouse mammary adenocarcinoma by inoculation of heat-treated syngeneic mammary tumor cells, *Int. J. Cancer*, **7**: 403–408, 1971.
- [18] CHEN T. T., HEIDELBERGER C., Quantitative studies on the malignant transformation of mouse prostate cells by carcinogenic hydrocarbons in vitro, *Int. J. Cancer*, **4**: 166–178, 1969.
- [19] CHRISTIANSEN E. N., KVAMME E., Effect of thermal treatment on mito-

- chondria of brain, liver and ascites cells, *Acta Physiol. Scand.*, **76**: 472-484, 1969.
- [20] COLEY W. B., The treatment of malignant tumors by repeated inoculations of erysipelas — with a report of ten original cases, *Amer. J. Med. Sci.*, **105**: 487-511, 1893.
- [21] COLEY-NAUTS H., FOWLER G. A., BOGATHO F. H., A review of the influence of bacterial products (Coley's toxin) on malignant tumors in man, *Acta Med. Scand.*, **145**, suppl., **276**: 1-103, 1953.
- [22] McCORMICK W., PENMAN S., Regulation of protein synthesis in HeLa cells: translation at elevated temperatures, *J. Molec. Biol.*, **39**: 315-333, 1969.
- [23] CORRY P. M., ROBINSON S., GETZ S., Hyperthermic effects on DNA repair mechanisms, *Radiology*, **123**: 475-482, 1977.
- [24] CRILE G., The effect of heat and radiation on cancer implanted in feet of mice, *Cancer Res.*, **23**: 372-380, 1963.
- [25] DEWEY W. C., HOPWOOD L. E., SAPARETO S. A., GERWECK L. E., Cellular responses to combination of hyperthermia and radiation, *Radiology*, **123**: 463-474, 1977.
- [26] DEWEY W. C., WESTRA A., MILLER H. H., NAGASAWA H., Heat-induced lethality and chromosomal damage in synchronized Chinese hamster cells treated with 5-bromodeoxyuridine, *Int. J. Radiat. Biol.*, **20**: 505-521, 1971.
- [27] DICKSON J. A., The effects of hyperthermia in animal tumor system, [w] *Selective Heat Sensitivity of Cancer Cells*, red. A. Rossi-Fanelli, R. Cavaliere, B. Mondovi, G. Moricca, *Rec. Res. Cancer Res.*, **59**, Springer Verl., 1977, 43-111.
- [28] DICKSON J. A., ELLIS H. A., Stimulation of tumour cell dissemination by raised temperature (42°C) in rats with transplanted Yoshida tumours, *Nature (Lond.)*, **248**: 354-358, 1974.
- [29] DICKSON J. A., OSWALD B. E., The sensitivity of a malignant cell line to hyperthermia (42°C) at low intracellular pH, *Brit. J. Cancer* **34**: 262-271, 1976.
- [30] DICKSON J. A., SHAH D. M., The effects of hyperthermia (42°C) on the biochemistry and growth of a malignant cell line, *Europ. J. Cancer*, **8**: 561-571, 1972.
- [31] DICKSON J. A., SUZANGAR M., In vitro — in vivo studies on the susceptibility of the solid Yoshida sarcoma to drugs and hyperthermia (42°C), *Cancer Res.*, **34**: 1263-1274, 1974.
- [32] — In vitro screening system for human cancer to drugs and hyperthermia (42°C), *Brit. J. Cancer*, **28**: 81, 1973.
- [33] DIETZEL F., Tumor und Temperatur, Aktuelle Probleme bei der Anwendung thermischer Verfahren in Onkologie und Strahlentherapie, Urban and Schwarzenberg, München, Berlin, Wien 1975.
- [34] EIGNER J., BOEDTKER H., MICHAELS G., The thermal degradation of nucleic acids, *Biochim. Biophys. Acta*, **51**: 165-168, 1961.
- [35] FIELD S. B., The response of normal tissues to hyperthermia alone or in combination with X-rays, [w] *Proc. 2nd Int. Symp. "Cancer Therapy by Hyperthermia and Radiation"*, Essen 1977, Urban and Schwarzenberg, 1978, 37-48.
- [36] GERNER E. W., CONNOR W. G., BOONE M. L. M., DOSS J. D., MAYER E. G., MILLER R. C., The potential of localized heating as an adjunct to radiation therapy, *Radiology*, **116**: 433-439, 1975.
- [37] GERNER E. W., SCHNEIDER M. J., Induced thermal resistance in HeLa cells, *Nature*, **256**: 500-502, 1975.

- [38] GERWECK L. E., The lethal response of cells to radiation or hyperthermia under acute and chronic hypoxic conditions, *Radiat. Res.*, **70**: 612–613, 1977.
- [39] — Modification of cell lethality at elevated temperatures. The pH effect, *Radiat. Res.*, **70**: 224–235, 1977.
- [40] GERWECK L. E., DEWEY W. C., Variation in response to heat during the mammalian cell cycle, [w] Proc. Int. Symp. "Cancer Therapy by Hyperthermia and Radiation", Washington D. C., 1975, Amer. Coll. Radiol., 1976, 16–26.
- [41] GERWECK L. E., GILLETE E. L., DEWEY W. C., Killing of Chinese hamster cells in vitro by heating under hypoxic or aerobic conditions, *Europ. J. Cancer*, **10**: 691–693, 1974.
- [42] GERWECK L. E., ROTTINGER E., Enhancement of mammalian cell sensitivity to hyperthermia by pH alternation, *Radiat. Res.*, **67**: 508–511, 1976.
- [43] GIOVANELLA B. C., Actions of hyperthermia on tumor cells cultured in vitro, [w] Selective Heat Sensitivity of Cancer Cells, red. A. Rossi-Fanelli, R. Cavaliere, B. Mondovi, G. Moricca, *Rec. Res. Cancer Res.*, 59, Springer Verl. 1977, 36–42.
- [44] GIOVANELLA B. C., LOHMAN W. A., HEIDELBERGER C., Effects of elevated temperatures and drugs on the viability of L1210 leukemia cells, *Cancer Res.*, **30**: 1623–1631, 1970.
- [45] GIOVANELLA B. C., MORGAN A. C., STEHLIN J. C., WILLIAMS L. J., Selective lethal effect of supranormal temperature on mouse sarcoma cells, *Cancer Res.*, **33**: 2568–2578, 1973.
- [46] GIOVANELLA B. C., STEHLIN J. S., MORGAN A. C., Selective lethal effect of supranormal temperatures on human neoplastic cells, *Cancer Res.*, **36**: 3944–3950, 1976.
- [47] GOLDSTEIN E. S., PENMAN S., Regulation of protein synthesis in mammalian cells. V. Further studies on the effect of Actinomycin-D on translation control in HeLa cells, *J. Mol. Biol.*, **80**: 243–245, 1973.
- [48] HAHN G. M., Metabolic aspects of the role of hyperthermia in mammalian cell inactivation and their possible relevance to cancer treatment, *Cancer Res.*, **34**: 3117–3123, 1974.
- [49] — Interactions of drugs and hyperthermia in vitro and in vivo, [w] Proc. 2nd Int. Symp. "Cancer Therapy by Hyperthermia and Radiation", Essen, 1977, Urban and Schwarzenberg, 1978, 72–79.
- [50] HAHN G. M., BRAUN J., HAR-KEDAR I., Thermochemotherapy: synergism between hyperthermia (42–43°C) and adriamycin (or bleomycin) in mammalian cell inactivation, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **79**: 937–940, 1975.
- [51] HARISIADIS L., HALL F. J., KRALJEVIC U., BOREK C., Hyperthermia — biological studies at cellular level, *Radiology*, **117**: 447–453, 1975.
- [52] HARRIS M., Temperature resistant variants in clonal populations of pig kidney cells, *Exp. Cell. Res.*, **46**: 301–314, 1967.
- [53] HEINE V., SVERAK L., KONDRATICK J., BONAR R. A., The behavior of HeLa-S₃ cells under the influence of supranormal temperatures, *J. Ultrastruct. Res.*, **34**: 375–396, 1971.
- [54] HENLE K. J., DETHLEFSEN L. A., Heat fractionation and thermotolerance: a review, *Cancer Res.*, **38**: 1843–1851, 1978.
- [55] HENLE K. J., KARAMUZ J. E., LEEPER D. B., Induction of thermotolerance in Chinese hamster ovary cells by high (45°) or low (40°) hyperthermia, *Cancer Res.*, **38**: 570–574, 1978.

- [56] HENLE K. J., LEEPER D. B., Interaction of hyperthermia and radiation in CHO cells: recovery kinetics, *Radiat. Res.*, **66**: 505–518, 1976.
- [57] HINKLEY R. E. Jr., SAMSON F. E. Jr., The effects of an elevated temperature, Colchicine and Vinblastine on axonal microtubules of the crayfish (*Procambarus clarkii*), *J. Exp. Zool.* **188**: 321–325, 1974.
- [58] HINZ H. J., STURTEVANT J. M., Calorimetric investigation of the influence of cholesterol on the transmission properties of bilayers formed from synthetic L- α -lecithins in aqueous suspension, *J. Biol. Chem.*, **247**: 3697–3701, 1972.
- [59] JACKSON W. M., KOSTYLA J., NORDIN J. H., BRANDTS J. F., Calorimetric study of protein transition in human erythrocyte ghosts, *Biochemistry*, **12**: 3662–3667, 1973.
- [60] JANIĄK M., Ocena uszkodzenia błon komórkowych w hodowli komórek prawidłowych i transformowanych wirusem SV-40 poddanych działaniu hipertermii 43°C, Praca doktorska, Wojskowy Instytut Higieny i Epidemiologii, Warszawa 1978.
- [61] JANIĄK M., SZMIGIELSKI S., Membrane injury in cells exposed in vitro to 43°C hyperthermia, [w] Proc. 2nd Int. Symp. "Cancer Therapy by Hyperthermia and Radiation", Essen 1977, Urban and Schwarzenberg, 1978, 169–171.
- [62] JENSEN C. O., Experimentelle Untersuchungen über Krebs bei Mäusen, *Zbl. Bakteriol.*, **34**: 28–122, 1903.
- [63] KASE K., HAHN G. M., Differential heat response of normal and transformed human cells in tissue culture, *Nature*, **255**: 228–230, 1975.
- [64] KASE K. R., HAHN G. M., Comparison of some response to hyperthermia by normal human diploid cells and neoplastic cells from the same origin, *Europ. J. Cancer.*, **12**: 481–491, 1976.
- [65] KIM S. H., KIH J. H., HAHN E. W., Enhanced killing of hypoxic tumor cells by hyperthermia, *Brit. J. Radiol.*, **48**: 872–874, 1975.
- [66] KIMELBERG K., Active potassium transport and (Na⁺-K⁺) ATP-ase activity in cultured glioma and neuroblastoma cells, *J. Neurochem.*, **22**: 971–976, 1974.
- [67] KWOCK L., LIN P.-S., HEFTER K., WALLACH D. F. H., Impairment of Na-dependent aminoacid transport in a cultured human T cell line by hyperthermia and irradiation, *Cancer Res.*, **38**: 83–87, 1978.
- [68] LAMBERT R. A., Demonstration of the greater sensitivity to heat of sarcoma cells as compared with actively proliferating connective tissue cells, *JAMA*, **59**: 2147–2148, 1912.
- [69] LEEPER D. B., HENLE K. J., Hyperthermia: effects of different temperatures on normal and tumor cells, [w] Proc. Int. Symp. "Cancer Therapy by Hyperthermia and Radiation", Washington D. C., 1975, Amer. College Radiol., 1976, 47–60.
- [70] LEEPER D. B., KARAMUZ J. E., HENLE K. J., Effect of inhibition of macromolecular synthesis on the induction of thermotolerance, *Proc. Am. Assoc. Cancer Res.*, **18**: 139, 1977.
- [71] LEITH J. T., MILLER R. C., GERNER E. W., BOONE M. L. M. Hyperthermic potentiation. Biological aspects and applications to radiation therapy, *Cancer*, **39**: 766–779, 1977.
- [72] LEVINE E. M., ROBBINS E. B., Differential temperature sensitivity of normal and cancer cells in culture, *J. Cell. Physiol.*, **76**: 373–380, 1970.
- [73] LEWIN S., PEPPER D. S., Variation of the melting temperature of calf thymus DNA with pH and type of buffer, *Arch. Biophys. Biochem.*, **109**: 192–194, 1965.

- [74] LI G. C., HAHN G. M., Ethanol-induced tolerance to heat and to adriamycin, *Nature*, **274**: 699-701, 1978.
- [75] LIN P.-S., BUTTERFIELD C. E., WALLACH D. F. H., Hyperthermic treatment (43°) rapidly impedes attachment of fibroblasts to culture substrates, *Cell Biol. Int. Rep.*, **1**: 57-60, 1977.
- [76] LIN P.-S., WALLACH D. F. H., TSAI S., Temperature-induced variations in the surface topology of cultured lymphocytes are revealed by scanning electron microscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **70**: 2492-2496, 1973.
- [77] LOEB L., Über Transplantation von Tumoren, *Virchow's Arch. Path. Anat.*, **172**: 345-368, 1903.
- [78] LOVE R., SORIANO R. Z., WALSH R. J., Effect of hyperthermia on normal and neoplastic cells in vitro, *Cancer Res.*, **30**: 1525-1533, 1970.
- [79] MANNING G. B., CAMPELL L. L., Thermostable α -amylase of *Bacillus stearothermophilus*, *J. Biol. Chem.*, **236**: 2952-2957, 1961.
- [80] MARMOR J. B., HAHN N., HAHN G. M., Tumor cure and cell survival after localized radiofrequency heating, *Cancer Res.*, **37**: 879-883, 1977.
- [81] MARX J. L., Biochemistry of cancer cells: focus on the cell surface, *Science*, **183**: 1279-1282, 1974.
- [82] MONDOVI B., Biochemical and ultrastructural lesions, [w] *Proc. Int. Symp. "Cancer Therapy by Hyperthermia and Radiation"*, Washington D. C., 1975, *Amer. College Radiol.*, 1976, 3-15.
- [83] MONDOVI B., SCIOSCIA-SANTORO A., STROM R., FAIOLA R., ROSSI-FANELLI A., Increased immunogenicity of Ehrlich ascites cells after heat treatment, *Cancer*, **30**: 885-888, 1972.
- [84] MONDOVI B., STROM R., ROTILIO G., FINAZZI-AGRO A., CAVALIERE R., ROSSI-FANELLI A., The biochemical mechanism of selective heat sensitivity of cancer cells. I. Studies on cellular respiration, *Europ. J. Cancer*, **5**: 129-136, 1969.
- [85] MONDOVI B., FINAZZI-AGRO A., ROTILIO G., STROM R., MORICCA G., ROSSI-FANELLI A., The biochemical mechanism of selective heat sensitivity of cancer cells. II. Studies on nucleic acids and protein synthesis, *Europ. J. Cancer*, **5**: 137-146, 1969.
- [86] MORICCA G., CAVALIERE R., CAPUTO A., BIGOTTI A., COLISTRO F., Hyperthermic treatment of tumours: experimental and clinical applications, [w] *Selective Heat Sensitivity of Cancer Cells*, red. A. Rossi-Fanelli, R. Cavaliere, B. Mondovi, G. Moricca, *Rec. Res. Cancer Res.*, **59**, Springer Verl., 1977, 112-152.
- [87] MORRIS C. C., MYERS R., FIELD S. B., The response of the rat tail to hyperthermia, *Brit. J. Radiol.*, **50**: 576-580, 1977.
- [88] MUCKLE D. S., DICKSON J. A., The selective inhibitory effect of hyperthermia on the metabolism and growth of malignant cells, *Brit. J. Cancer.*, **25**: 771-778, 1971.
- [89] — Hyperthermia (42°C) as an adjunct to radiotherapy and chemotherapy in the treatment of the allogenic VX₂ carcinoma in the rabbit, *Brit. J. Cancer.*, **27**: 307-315, 1973.
- [90] OSSOVSKI L., SACHS L., Temperature sensitivity of polyoma virus: induction of cellular DNA synthesis and multiplication of transformed cells at high temperature, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **58**: 1938-1943, 1967.
- [91] OVERGAARD J., Effect of hyperthermia on malignant cells in vivo. A review and a hypothesis, *Cancer*, **39**: 2637-2646, 1977.

- [92] — Ultrastructure of a murine mammary carcinoma exposed to hyperthermia in vivo, *Cancer Res.*, **36**: 983–995, 1976.
- [93] — Effect of hyperthermia on the cytochrome C oxidase activity in tumour cells, *IRCS J. Med. Sci.*, **3**: 225, 1975.
- [94] — Influence of extracellular pH on the viability and morphology of tumor cells exposed to hyperthermia, *J. Natl. Cancer Inst.*, **56**: 1243–1250, 1976.
- [95] — The effect of local hyperthermia alone and in combination with radiation on solid tumors, [w] *Proc. 2nd Int. Symp. "Cancer Therapy by Hyperthermia and Radiation"*, Essen 1977, Urban and Schwarzenberg, 1978, 49–61.
- [96] OVERGAARD J., BICHEL P., The influence of hypoxia and acidity on the hyperthermic response of malignant cells in vitro, *Radiology*, **123**: 511–514, 1977.
- [97] OVERGAARD K., OVERGAARD J., Hyperthermic tumor-cell devitalization in vivo, *Acta Radiol. Ther. Phys. Boil.*, **16**: 1–16, 1977.
- [98] — Investigations on the possibility of a thermic tumor therapy. I. Short-wave treatment of a transplanted isologous mouse mammary carcinoma, *Europ. J. Cancer*, **8**: 65–78, 1972.
- [99] — Pathology of heat damage, [w] *Proc. Int. Symp. "Cancer Therapy by Hyperthermia and Radiation"*, Washington D. C., 1975, Amer. College Radiol., 1976, 115–127.
- [100] OVERGAARD J., SKOVGAARD-POULSEN H., Effect of hyperthermia and environmental acidity on the lysosomal activity in murine ascites tumor cells, *J. Natl. Cancer Inst.*, **58**: 1159–1161, 1977.
- [101] OVERGAARD J., SUIT H. D., Hyperthermia in vivo: time-temperature relation and split dose effect, *Radiat. Res.* **70**: 634, 1977.
- [102] PALZER R. J., HEIDELBERGER C., Studies on the quantitative biology of hyperthermic killing of HeLa cells, *Cancer Res.*, **33**: 415–421, 1973.
- [103] — Influence of drugs and synchrony on the hyperthermic killing of HeLa cells, *Cancer Res.*, **33**: 422–427, 1973.
- [104] PETTIGREW R. T., Cancer therapy by whole body heating, [w] *Proc. Int. Symp. "Cancer Therapy by Hyperthermia and Radiation"*, Washington D. C., 1975, Amer. College Radiol., 1976, 87–98.
- [105] PETTIGREW R. T., LUGGAGE C. M., Whole-body hyperthermia. A systemic treatment for disseminated cancer, [w] *Selective Heat Sensitivity of Cancer Cells*, red. A. Rossi-Fanelli, R. Cavaliere, B. Mondovi, G. Moricca, *Rec. Res. Cancer Res.*, **59**, Springer Verl., 1977, 153–170.
- [106] RAPOPORT S., NIEDART-HIEBSCH C., THAMM R., Über den Einfluss der Hyperthermie auf die Verwertung von Substraten in Ehrlich-Aszites-Tumorzellen und Kaninchenretikulozyten, *Acta Biol. Med. Germ.*, **26**: 483–500, 1971.
- [107] REEVES R. O., Mechanism of acquired resistance to acute heat shock in cultured mammalian cells, *J. Cell. Physiol.*, **79**: 157–170, 1972.
- [108] ROSENTHAL L. J., JANDOLO J. J., Thermally induced intracellular alterations of ribosomal ribonucleic acid, *J. Bact.*, **103**: 833–835, 1970.
- [109] ROTI ROTI J. L., WINWARD R. T., The effects of hyperthermia on the protein-to-DNA ratio of isolated HeLa cell chromatin, *Radiat. Res.*, **74**: 159–169, 1978.
- [110] ROZENGURT E., Coordination of early membrane changes in growth stimulation, *J. Cell. Physiol.*, **89**: 627–632, 1977.
- [111] ROZENGURT E., HEPPEL L. A., Serum rapidly stimulates ouabain-sensitive

- ⁸⁶Rb influx in quiescent 3T3 cells, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., **38**: 393-400, 1975.
- [112] SAPARETO S. A., HOPWOOD L. E., DEWEY W. C., RAJU M. R., GRAY J. W., Effects of hyperthermia on survival and progression of CHO cells, Cancer Res., **38**: 393-400, 1978.
- [113] SCHENBERG-FRASCINO A., Lethal and mutagenic effects of elevated temperature on haploid yeast. II. Recovery from thermolesions, Molec. Gen. Genet., **117**: 239-253, 1972.
- [114] SCHREK R., Effect of heat and dimethyl sulfoxide on normal and leukemic lymphocytes, Lancet II, 1020-1021, 1965.
- [115] — Sensitivity of normal and leukemic lymphocytes and leukemic myeloblasts to heat, J. Natl. Cancer Inst., **37**: 649-654, 1966.
- [116] SCHULMAN N., HALL E. J., Hyperthermia: its effect on proliferative and plateau phase cell cultures, Radiology, **113**: 207-209, 1974.
- [117] SELAWRY O. S., GOLDSTEIN M. N., McCORMICK T., Hyperthermia in tissues-cultured cells of malignant origin, Cancer Res., **17**: 785-791, 1957.
- [118] SHANK B. B., SMITH N. E., Regulation of cellular growth by sodium pump activity, J. Cell. Physiol., **87**: 377-388, 1976.
- [119] SIMARD R., BERNHARD W., A heat-sensitive cellular function located in the nucleolus, J. Cell Biol., **34**: 61-76, 1967.
- [120] SISKEN J., MORASCA E., KIBBY S., Effects of temperature on kinetics of mitotic cycle of mammalian cells in culture, Exp. Cell. Res., **39**: 103-116, 1965.
- [121] SPAGGIARE S., WALLACH M. J., TUPPER J. T., Potassium transport in normal and transformed mouse 3T3 cells, J. Cell Physiol., **89**: 403-416, 1976.
- [122] STEHLIN J. S. Jr., GIOVANELLA B. C., DeIPOLYI P. D., MUENZ L. R., ANDERSON R. F., GUTIERREZ A. A., Hyperthermic perfusion of extremities for melanoma and soft tissue sarcomas, [w] Selective Heat Sensitivity of Cancer Cells, red. A. Rossi-Fanelli, R. Cavaliere, B. Mondovi, G. Moricca, Rec. Res. Cancer Res., 59, Springer Verl., 1977, 171-185.
- [123] STEHLIN J. S., GIOVANELLA B. C., DeIPOLYI P. D. MUENZ L. R., ANDERSON R. F., Results of hyperthermic perfusion of melanoma of the extremities, Surg. Gynec. Obstet., **140**: 339-348, 1975.
- [124] STEPHENS R. E., Thermal fractionation of outer fiber doublet microtubules into A- and B-subfiber components: A- and B-tubulin, J. Mol. Biol., **47**: 353-355, 1970.
- [125] STROM R., BOZZI A., SANTORO S., CRIFO C., MONDOVI B., ROSSI-FANELLI A., Studies on the mechanism of inhibition of polyenic antibodies of nucleic acids biosynthesis in ascites tumor cells, Cancer Res., **32**: 868, 1972.
- [126] STROM R., CRIFO C., ROSSI-FANELLI A., MONDOVI B., Biochemical aspects of heat sensitivity of tumour cells, [w] Selective Heat Sensitivity of Cancer Cells, red. A. Rossi-Fanelli, R. Cavaliere, B. Mondovi, G. Moricca, Res. Cancer Res., 59, Springer Verl., 1977, 7-35.
- [127] STROM R., SANTORO A. S., CRIFO C., BOZZI A., MONDOVI B., ROSSI-FANELLI A., The biochemical mechanism of selective heat sensitivity of cancer cells. IV. Inhibition of RNA synthesis, Europ. J. Cancer, **9**: 103-112, 1973.
- [128] STROM R., CAIAFA P., MONDOVI B., ROSSI-FANELLI A., Effect of temperature on potassium-dependent stimulation of transcellular migration in normal and neoplastic cells, FEBS Lett., **3**: 343-347, 1969.
- [129] SUIT H. D., Hyperthermia in the treatment of tumors, [w] Proc. Int. Symp.

- "Cancer Therapy by Hyperthermia and Radiation", Washington D. C., 1975, Amer. College Radiol., 1976, 107-114.
- [130] — Hyperthermic effects on animal tissues, *Radiology*, **123**: 483-487, 1977.
- [131] SUIT H. D., SHWAYDER M., Hyperthermia: potential as an anti-tumor agent, *Cancer*, **34**: 122-129, 1974.
- [132] SZMIGIELSKI S., KOBUS M., JANIĄK M., Enhanced cytotoxic effect of hyperthermia 43°C for Colcemide-treated normal and SV-40-transformed cells in vitro, *Arch. Geschwulstforsch.*, **47**: 396-399, 1977.
- [133] SZYBALSKI W., Effect of elevated temperatures on DNA and on some polynucleotides: denaturation, renaturation and cleavage of glycosidic and phosphate ester bonds, [w] *Thermobiology*, red. A. N. Rose, Acad. Press, London 1967, 73.
- [134] THELESTAM M., Methods for qualitative and quantitative evaluation of damage to the plasma membrane, *Praca doktorska*, Stockholm 1975.
- [135] THRALL D. E., GERWECK L. E., GILLETTE E. L., DEWEY W. C., Response of cells in vitro and tissues in vivo to hyperthermia and X-irradiation, [w] *Advances in Radiation Biology*, Acad. Press, **6**: 211-227, 1976.
- [136] THRALL D. E., GILLETTE E. L., BAUMAN C. L., Effect of heat on the C3H mouse mammary adenocarcinoma evaluated in terms of tumor growth, *Europ. J. Cancer*, **9**: 871-875, 1973.
- [137] TOMASOVIC S. P., TURNER G. N., DEWEY W. C., Effect of hyperthermia on non-histone proteins isolated with DNA, *Radiat. Res.*, **73**: 535-552, 1978.
- [138] TRUMP B. F., ARSTILA A. U., Cellular reaction to injury, [w] *Principles of Pathobiology*, red. M. F. LaVia, R. B. Hill, Oxford Univ. Press, New York 1975.
- [139] TURANO C., FERRARO A., STROM R., CAVALIERE R., ROSSI-FANELLI A., The biochemical mechanism of selective heat sensitivity of cancer cells. III. Studies on lysosomes, *Europ. J. Cancer*, **6**: 67-72, 1970.
- [140] VERMA S. P., SCHMIDT-ULLRICH R., THOMPSON W. S., WALLACH D. F. H., Differences between the structural dynamics of plasma membrane of normal hamster lymphocytes and lymphoid cells neoplastically transformed by simian virus 40 revealed by laser Raman spectroscopy, *Cancer Res.*, **37**: 3490-3493, 1977.
- [141] WALLACH D. F. H., *The Plasma Membrane. Dynamic Perspectives*, Genetics and Pathology, Engl. Univ. Press, London, Springer Verl., New York, Heidelberg, Eerlin 1972.
- [142] — Action of hyperthermia and ionizing radiation on plasma membranes, [w] *Proc. 2nd Int. Symp. "Cancer Therapy by Hyperthermia and Radiation"*, Essen, 1977, Urban and Schwarzenberg, 1978, 19-28.
- [143] WAROCQUIER R., SCHERRER K., RNA metabolism in mammalian cells at elevated temperature, *Europ. J. Biochem.*, **10**: 362-370, 1970.
- [144] WESTERMARK H., The effect of heat upon rat tumors, *Scand. Arch. Physiol.*, **52**: 257-322, 1927.
- [145] WESTERMARK F., Über die Behandlung des ulcerierenden Cervixcarcinoms mittels konstanter Wärme, *Zbl. Gynäkol.*, **22**: 1335-1339, 1898.
- [146] WESTRA A., DEWEY W. C., Variation in sensitivity to heat shock during the cell cycle of Chinese hamster cells in vitro, *Int. J. Radiat. Biol.*, **19**: 467-477, 1971.
- [147] WISNIESKI B. J., PARKES J. G., HUANG Y. O., FOX C. F., Physical and physiological evidence for two phase transitions in cytoplasmic membranes of animal cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **71**: 4381-4385, 1974.

- [148] WOODCOCK E., GRIGG C. W., Repair of thermally induced DNA breakage in *E. coli*, *Nature (New Biol.)*, **237**: 76-79, 1972.
- [149] WÜST G. P., NORPTH K., WITTING U., OBERWITLER W., Der in vitro Effekt der Hyperthermie auf dem Einbau von Nukleinsäurevorläufern in Tumoren und normalen Gewebe, *Z. Krebsforsch.*, **79**: 193-201, 1973.
- [150] ZEIKUS J. G., GROCK T. D., Protein synthesis at high temperatures: aminoacylation of t-RNA, *Biochim. Biophys. Acta*, **228**: 736-745, 1971.

Otrzymano: 14 września 1979.

Przyjęto: 8 lutego 1980.

Adres autorów: ul. Szaserów 128, 00-909 Warszawa.

KATEPSYNA D

CATHEPSIN D

Krzysztof WOROWSKI i Halina OSTROWSKA

Zakład Chemii Analitycznej Instytutu Biochemii i Analityki Medycznej
Akademii Medycznej w Białymstoku

Streszczenie. Katepsyna D jest proteazą występującą w lizosomach wielu tkanek i narządów. Enzym ten jest glikoproteidem o masie cząsteczkowej 42 000 daltonów, posiada jako aminokwas N-końcowy glicynę i charakteryzuje się znaczną heterogennością molekularną. Katepsyna D trawi białka i peptydy o co najmniej pięciu resztach aminokwasowych w cząsteczce. Rozszczepia ona wiązania peptydowe utworzone przez grupy karboksylowe, głównie aminokwasów hydrofobowych. Katepsyna D jest proteazą o karboksylowym miejscu katalitycznym. Optimum działania katepsyny D przypada na pH 2,8–5,5, w zależności od pochodzenia gatunkowego i narządowego tego enzymu i użytego substratu. Inhibitorem katepsyny D jest ester metylowy dwuazoacetylowo-D,L-norleucyny i pepstatyna.

Summary. Cathepsin D is a protease occurring in the lysosomes of many tissues and organs. This enzyme is a glycoprotein of the molecular weight 42 000, contains glycine as the N-terminal amino acid and reveals a considerable molecular heterogeneity. Cathepsin D digests protein and peptides containing at least five amino acid residues in the molecule. It hydrolyses peptide bonds formed mainly by the carboxyl groups of hydrophobic amino acids. Cathepsin D is a protease with a carboxyl catalytic site. The optimal action of cathepsin D occurs at pH 2.8–5.5 depending on the origin of the enzyme from various species and organs and the substrate used. Diazoacetyl-D,L-norleucine methyl ester and pepstatine inhibit cathepsin D activity.

WSTĘP

Aktywność proteolityczną tkanek zwierzęcych wykrył w 1904 r. Heidin [79]. W 1937 r. Anson [2] wyizolował ze śledziony wołu proteazę, która rozkłada hemoglobinę. W początkach lat sześćdziesiątych Press i wsp. [160] udoskonalili izolowanie i oczyszczanie tej proteazy i nazwali ją katepsyną D. Katepsyna D różni się od innych proteaz lizosomalnych m. in.

specyficznością substratową. Enzym ten nie działa na syntetyczne substraty katepsyny A, B i C [39, 89, 160, 207], a substraty rozkładane także przez katepsynę E degradowuje w innym optimum pH [17, 120, 122].

Obecnie katepsynę D (EC-3.4.4.23) definiuje się jako lizosomalną hydrolazę peptydylopeptydów (endopeptydazę) rozszczepiającą w peptydach i białkach wiązania peptydowe utworzone przez grupy karboksylowe aminokwasów hydrofobowych. Według podziału enzymów proteolitycznych, opartego na różnicach w strukturze miejsca katalitycznego, katepsynę D zalicza się do proteaz karboksylowych [75].

ROZMIESZCZENIE W TKANKACH I FRAKCJACH PODKOMÓRKOWYCH ORAZ IZOLOWANIE I OCZYSZCZANIE KATEPSYNY D

Przegląd tkanek i narządów, z których została wyizolowana katepsyna D, znajduje się w tabeli 1. Do tkanek i narządów, w których występuje aktywność katepsyny D, ale z których ten enzym nie był dotychczas wyizolowany, należy błona śluzowa żołądka [33], chrząstka stawowa i błona maziowa wołu [29], komórki zębinotwórcze [128], żyły [69], płytki krwi [21, 152], tkanki nowotworowe [62] i tkanki zwierząt niższych [208]. Nie wielkie ilości katepsyny D występują także w płynach ustrojowych, takich jak osocze krwi [74, 151], mocz [112], płyn mózgowo-rdzeniowy [37], płyn owodniowy [145], płyn stawowy [29], sok żołądkowy [195] oraz płyny pojawiające się w jamach ciała w stanach patologicznych [59, 100].

Katepsyna D jest syntetyzowana w rybosomach komórkowych, z których transportowana jest przez kanały siateczki śródplazmatycznej do pęcherzyków aparatu Golgiego. Z pęcherzyków tych tworzą się lizosomy pierwotne, które zawierają katepsynę D i inne enzymy hydrolityczne o optimum działania w kwaśnym przedziale pH. Do przestrzeni pozakomórkowych i płynów ustrojowych enzym ten przedostaje się drogą egzocytozy oraz na skutek rozpadu fizjologicznie zużytych komórek [123, 159, 192]. Z krwi katepsyna D jest eliminowana przez komórki układu siateczkowo-śródbłonkowego [91, 130, 141].

Poszczególne tkanki i narządy różnią się aktywnością katepsyny D. W tabeli 2 przedstawiono aktywność tego enzymu w różnych narządach szczura. Aktywność katepsyny D wykazuje również znaczne różnice w różnych komórkach tego samego narządu. Spośród komórek budujących wątrobę najwyższą aktywność katepsyny D wykazują komórki Browicza-Kupffera i komórki śródbłonkowe (tabela 3).

Z powodu heterogenności lizosomów część tych struktur podczas różnicowego wirowania osadza się z innymi organellami komórkowymi. Z powodu zanieczyszczenia lizosomami aktywność katepsyny D występuje nie tylko w lizosomach, ale także w innych frakcjach podkomórkowych

TABELA 1

Przegląd narządów i tkanek, z których wyizolowano katepsynę D

Gatunek zwierzęcia	Narząd lub tkanka	Literatura
Człowiek	erytrocyty	[164]
	leukocyty	[90]
	tarczyca	[133]
	wątroba	[13, 16]
	wysięk otrzewnowy	[59]
Dorsz	mięśnie	[182]
	śledziona	[181]
Koń	śledziona	[55]
Królik	chrząstka stawowa	[223]
	płuca	[168]
	śledziona	[120, 121, 122]
	wątroba	[12]
Kura	mięsień piersiowy	[89]
	śledziona	[64]
	wątroba	[93]
Małpa	płuca	[150]
Morszczuk	mięśnie	[67]
Mysz	guz wysiękowy Ehrlicha	[100]
Świnia	mózg	[27]
	nerki	[118]
	śledziona	[38]
	tarczyca	[116, 183]
Szczur	guz nowotworowy	[95]
	jelito	[114]
	mózg	[139]
	skóra	[80]
	tkanka limfatyczna	[235]
	wątroba	[93, 142, 212]
	ziarniniak	[189]
Wół	aorta	[163]
	grasica	[72, 184]
	gruczoły ślinowe	[58]
	macica	[174]
	mózg	[27, 137, 157, 211]
	miazga zębowa	[177]
	nabłonek barwnikowy siatkówki	[76]
	nadnercza	[52, 196]
	płuca	[168]
	przysadka mózgowa	[166]
	śledziona	[4, 72, 93, 98, 160, 184]
	tarczyca	[11]

TABELA 2

Aktywność katepsyny D różnych narządów szczura [60]

Narząd	Białko mg/ml	Aktywność katepsyny D	
		$\mu\text{g Tyr/godz/ml}$	$\mu\text{g Tyr/godz/mg białka}$
Śledziona	$7,13 \pm 0,21$	4812,75	675 ± 39
Szpik kostny	$7,34 \pm 0,62$	3614,28	492 ± 110
Nerka	$6,48 \pm 0,36$	1078,82	167 ± 18
Płuco	$9,80 \pm 0,78$	607,70	$62 \pm 5,9$
Jelito	$2,58 \pm 0,39$	480,52	194 ± 24
Wątroba	$7,69 \pm 0,27$	476,78	$62 \pm 4,7$
Serce	$4,64 \pm 0,48$	385,12	$83 \pm 8,7$
Skóra	$1,67 \pm 0,29$	210,42	126 ± 22
Mięsień	$3,85 \pm 0,36$	111,65	$29 \pm 3,3$

TABELA 3

Aktywność katepsyny D różnych komórek wątroby szczura [108]

Komórki	Aktywność katepsyny D	
	nmole Trp/min/mg białka	nmole Trp/min/ 10^6 komórek
Wątrobowe	$0,52 \pm 0,03$	$0,66 \pm 0,04$
Zatokowe	$8,44 \pm 0,84$	$0,51 \pm 0,07$
Śródbłonkowe	$6,12 \pm 1,22$	$0,25 \pm 0,05$
Browicza-Kupffera	$17,97 \pm 2,87$	$2,11 \pm 0,26$

(tabela 4). Znaczna trwałość błon lizosomowych powoduje, że jeszcze po 48 godzinach przechowywania lizosomów w 0,7 M sacharozie w temperaturze 0°C ujawnia się zaledwie 5–10% aktywności katepsyny D w środowisku otaczającym. Całkowitą aktywność katepsyny D w homogenatach tkankowych lub w wyizolowanej frakcji lizosomalnej daje się zmierzyć dopiero po rozerwaniu błony lizosomalnej. W tym celu stosuje się kilka-

TABELA 4

Rozmieszczenie katepsyny D we frakcjach podkomórkowych

Frakcja	Wątroba szczura [44]			Płuco świnki morskiej [66]		
	Białko [%]	Aktywność względna [%]	Specyficzna aktywność względna*	Białko [%]	Aktywność względna [%]	Specyficzna aktywność względna*
Jądrowa	$13,3 \pm 2,6$	$4,0 \pm 2,0$	0,30	$21,3 \pm 12,5$	$17,5 \pm 4,8$	0,82
Mitochondriów	$16,3 \pm 4,2$	$35,0 \pm 11,0$	2,14	$13,2 \pm 3,3$	$20,5 \pm 5,8$	1,47
Lizosomowa	$7,4 \pm 3,1$	$42,9 \pm 9,3$	5,70	$9,9 \pm 4,0$	$20,8 \pm 5,7$	2,10
Mikrosomowa	$24,4 \pm 3,3$	$7,5 \pm 3,8$	0,31	$11,5 \pm 4,5$	$7,6 \pm 2,8$	0,66
Cytoplazmatyczna	$37,5 \pm 5,2$	$17,1 \pm 8,3$	0,47	$42,2 \pm 7,2$	$33,6 \pm 4,4$	0,76

* Otrzymana przez podzielenie aktywności względnej przez procentową zawartość białka.

krotne zamrażanie i odmrażanie, wodę destylowaną lub detergenty, takie jak Triton X-100, Triton WR-1339 i digitonina [31, 88].

Materiałem wyjściowym do izolowania i oczyszczania katepsyny D jest homogenat tkankowy lub frakcja lizosomalna. Z materiału tego enzym ekstrahuje się wodą destylowaną lub rozcieńczonymi roztworami soli z dodatkiem Tritonu X-100. We wstępnych etapach preparatyki katepsyny D stosuje się metody używane powszechnie do izolowania i oczyszczania białek, takie jak wytrącanie białek balastowych w punkcie izoelektrycznym, frakcjonowanie siarczanem amonu lub rozpuszczalnikami organicznymi, sączenie molekularne w żelach molekularnych Sephadex oraz chromatografia jonowymienna. Końcowe etapy oczyszczania stanowi najczęściej ogniskowanie izoelektryczne [13, 38, 174, 184, 212] lub chromatografia powinowactwa [27, 72, 93, 115, 184, 211]. Różnice w składzie chemicznym tkanek i narządów, wymagające indywidualnych rozwiązań preparatywnych, oraz dążność do zwiększenia wydajności i stopnia oczyszczania enzymu izolowanego z tego samego narządu są przyczyną stałego rozwoju tych metod.

STRUKTURA CHEMICZNA I WŁAŚCIWOŚCI FIZYKOCHEMICZNE

Katepsyna D jest glikoproteidem, którego cząsteczkę stanowi jeden łańcuch polipeptydowy [14, 55, 183, 212]. Skład aminokwasowy katepsyny D izolowanej z różnych narządów jest bardzo podobny (tabela 5). Zwraca w nim uwagę znaczna ilość glicyny, około dwukrotnie większa zawartość aminokwasów kwaśnych i ich amidów niż aminokwasów zasadowych oraz występowanie od 7 do 9 reszt cysteiny. Dzięki resztom cysteiny katepsyna D posiada mostki dwusiarczkowe [55]. Zarówno składnik cukrowy, jak i mostki dwusiarczkowe pojawiają się dopiero w wyniku porybosomalnej modyfikacji cząsteczki tego enzymu. N-końcowym aminokwasem katepsyny D jest glicyna [55, 98, 160]. Łańcuch polipeptydowy katepsyny D zawiera 26% β -struktury, 5% struktury α -helisy, a pozostała część struktury jest nie uporządkowana [198]. Miejsce katalityczne katepsyny D stanowi kwas asparaginowy. Sekwencja aminokwasów wokół kwasu asparaginowego miejsca katalitycznego jest następująca: Ile-Val-Asp*-(Thr, Gly, Thr, Ser) [103].

Masa cząsteczkowa katepsyny D wyizolowanej z różnych narządów różnych zwierząt, wyznaczona różnymi metodami, waha się w granicach 28 000–60 000 daltonów [12–14, 38, 116, 160, 199]. Większość dotychczas otrzymanych preparatów katepsyny D posiada masę cząsteczkową około 42 000 daltonów [17, 55]. Uzyskano także preparaty katepsyny D o masach cząsteczkowych niższych oraz wyższych od podanego zakresu. Cząsteczki o niskich masach są prawdopodobnie produktami częściowej degra-

TABELA 5

Skład aminokwasowy katepsyny D wyizolowanej z różnych narządów różnych zwierząt

Aminokwas	Liczba reszt aminokwasowych w cząsteczce katepsyny D									
	mózgu wołu [211]	płuca małpy [150]	śledziony konia [55]	śledziony świni [38]	śledziony wołu [102]	tarczycy świni [183]	wątroby człowieka [17]	wątroby kury [14]		
Lys	16	7	32	18	28	11	25	30		
His	8	3	5	5	6	3	5	6		
Arg	8	5	8	11	18	5	10	5		
Asx	35	32	35	29	45	17	32	31		
Thr	22	25	23	18	33	12	20	25		
Ser	67	32	25	32	40	14	26	24		
Glx	59	45	28	32	48	16	36	34		
Pro	17	19	9	21	30	11	23	24		
Gly	52	33	30	31	51	21	41	40		
Ala	26	18	20	25	50	10	20	18		
Cys	5	2	9	8	10	4	8	7		
Val	21	21	27	23	49	15	32	29		
Met	9	7	6	7	10	4	14	15		
Ile	10	13	17	15	32	11	22	24		
Leu	22	27	35	27	47	15	35	34		
Tyr	12	17	14	13	23	9	21	18		
Phe	12	15	17	10	21	7	15	21		
Trp	n.o.	3	4	4	n.o.	3	4	n.o.		
Suma aminokwasów	401*	324	344	329	541*	188	389	385*		
Masa cząsteczkowa	48 000	35 000	42 500	34 000	58 000	21 000	42 000	42 000		

* bez uwzględnienia tryptofanu; n. o. — nie oznaczono.

dacji [198, 224]. Tkanka limfatyczna szczura [235] oraz komórki leukemiczne myszy [32] zawierają katepsynę D o masie cząsteczkowej 95 000 daltonów. Po redukcji β -merkaptoetanołem następuje rozpad cząsteczek tego enzymu na aktywne formy o masie cząsteczkowej 45 000 daltonów.

Katepsyna D charakteryzuje się znaczną heterogennością molekularną. W macicy bydłej występuje 12 izoenzymów [174], a w śledzionie tego zwierzęcia — 10 izoenzymów [160] katepsyny D. Występowanie wielu form molekularnych katepsyny D stwierdzono także w miazdze zęba wołu [177], mózgu wołu [157], wątrobie kury [13] oraz mózgu, nerce i wątrobie szczura [212]. Różne formy molekularne katepsyny D wyizolowane z określonego narządu różnią się między sobą ruchliwością elektroforetyczną, właściwościami chromatograficznymi i wartością punktów izoelektrycznych [174]. Punkty izoelektryczne różnych form molekularnych katepsyny D wyizolowanych z różnych narządów leżą w zakresie pH od 4,0 do 6,5 [13, 14, 80, 174]. Izoenzymy pochodzące z tego samego gatunku zwierzęcia nie wykazują różnic immunologicznych [14, 168, 197].

Katepsyna D jest oporna na autolizę [17] i działanie wysokich stężeń mocznika [232], co związane jest zapewne z występowaniem znacznej liczby mostków dwusiarczkowych w cząsteczce tego enzymu. Obecność substratu zwiększa stabilność katepsyny D [116, 139]. Katepsyna D ulega szybkiej inaktywacji w pH poniżej 3,0 [56, 160] oraz w temperaturze powyżej 45°C [56, 67, 160].

SPECYFICZNOŚĆ I MECHANIZM DZIAŁANIA

Specyficzność enzymów proteolitycznych zależy od struktury miejsca wiążącego substrat. Proces rozszczepiania wiązania peptydowego dokonany jest natomiast przez aminokwasy tworzące miejsce katalityczne.

Wymogi strukturalne działania katepsyny D poznano w badaniach przeprowadzonych na syntetycznych i naturalnych peptydach o znanej strukturze pierwszorzędowej [65, 95, 173, 178, 198, 224]. Na działanie katepsyny D podatne są jedynie peptydy zawierające co najmniej pięć reszt aminokwasowych w cząsteczce. W heptapeptydzie o sekwencji Gly₁-Phe₂-Phe₃-Tyr₄-Thr₅-Pro₆-Lys₇ katepsyna D rozszczepia dwa wiązania peptydowe zlokalizowane między Phe₂-Phe₃ i Phe₃-Tyr₄. Natomiast w heksapeptydzie Gly₁-Phe₂-Leu₃-Gly₄-Phe₅-Leu₆ enzym ten rozszczepia tylko wiązanie Phe₂-Leu₃. Analogi tego heksapeptydu posłużyły do badania wpływu efektów sterycznych na degradację enzymatyczną. Hydroлиза heksapeptydów o analogicznej strukturze, lecz zawierających D-aminokwasy jest znacznie utrudniona, a ponadto hamują one rozkład heksapeptydu zbudowanego wyłącznie z L-aminokwasów. Podatność na hydroлизę i stopień inhibicji katepsyny D przez te analogi zależy od rozmieszczenia D-aminokwasów w cząsteczce (tabela 6). Największą podatność na

TABELA 6

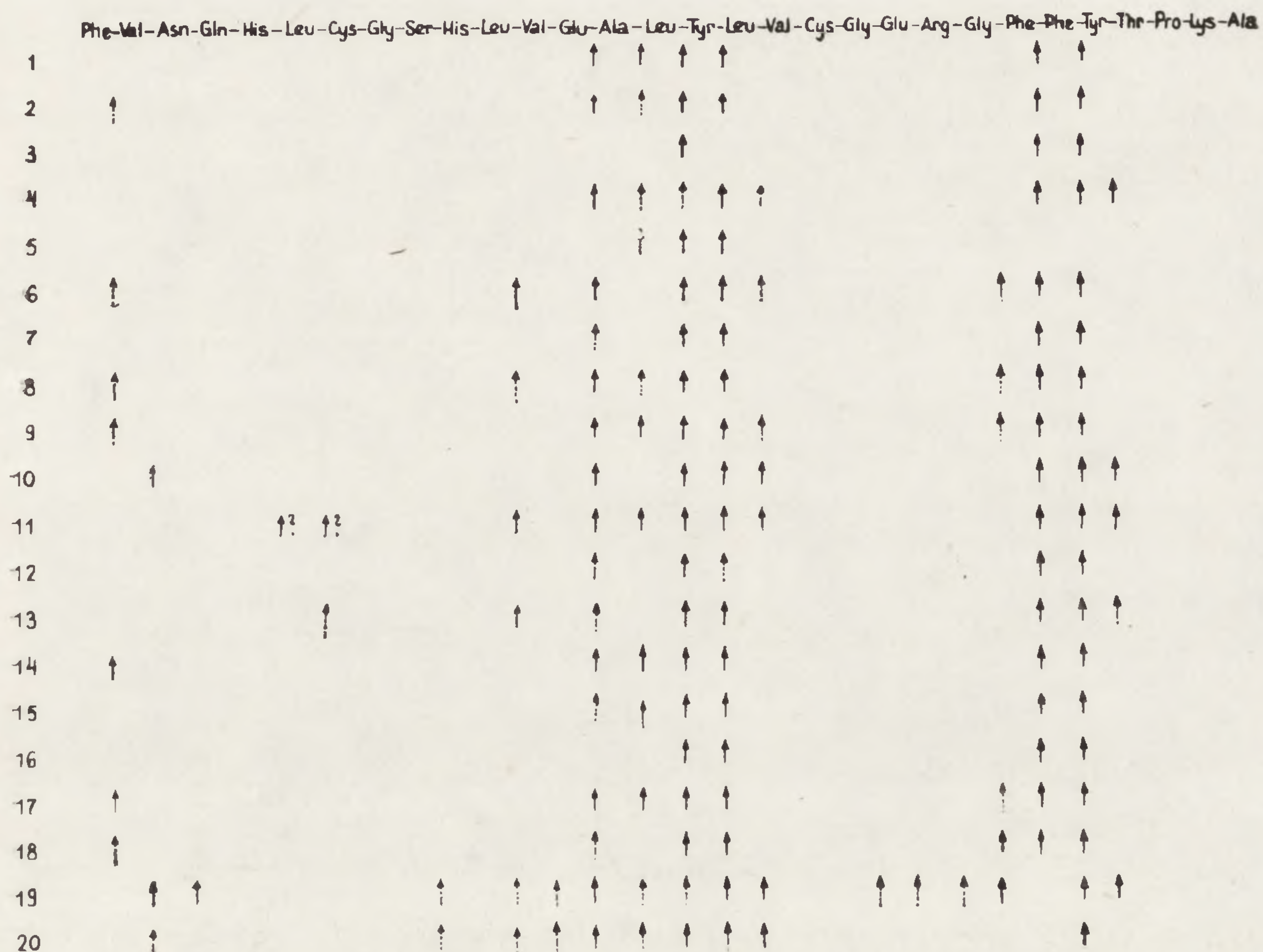
Rozkład przez katepsynę D heksapeptydu Gly₁-Phe₂-Leu₃-Gly₄-Phe₅-Leu₆ i jego analogów zawierających D-aminokwasy oraz hamowanie rozkładu tego heksapeptydu w obecności analogów [97]

Heksapeptyd	Stopień rozkładu [%]	Stopień hamowania [%/]
Gly-Phe-Leu-Gly-Phe-Leu	100	—
Gly-Phe-Leu-Gly-Phe-D-Leu	6	89,2
Gly-Phe-Leu-Gly-D-Phe-Leu	3	73,4
Gly-D-Phe-Leu-Gly-Phe-Leu	0	63,1
Gly-D-Phe-Leu-Gly-D-Phe-Leu	0	0
Gly-Phe-Leu-Gly-Phe-Leu	0	0

działanie katepsyny D wykazują analogi posiadające w cząsteczce tylko jeden D-aminokwas, który jest maksymalnie oddalony od miejsca wrażliwego na działanie tego enzymu. Znaczne podobieństwo struktury do heksapeptydu zbudowanego wyłącznie z L-aminokwasów umożliwia silne wiązanie takich analogów z enzymem, a różnice strukturalne utrudniają jego rozkład, co jest tym samym powodem zablokowania enzymu. Natomiast analogi zawierające dwa D-aminokwasy, z których jeden występuje w obrębie wiązania peptydowego Phe₂-Leu₃, oraz heksapeptyd cykliczny, ze względu na znaczne różnice struktury, nie są w ogóle wiązane z enzymem i tym samym nie są hydrolizowane i nie przejawiają działania inhibicyjnego. Wyniki badań specyficzności substratowej katepsyny D wyizolowanej z różnych narządów, przeprowadzonych na utlenionym łańcuchu B insuliny wołu, podano na ryc. 1. Region działania katepsyny D zawarty jest między 13 a 17 oraz między 24 a 26 resztą aminokwasową łańcucha B insuliny. W zależności od pochodzenia tkankowego występują pewne niewielkie różnice w specyficzności działania tego enzymu. Syntetyczne peptydy o sekwencji odpowiadającej 13–17 [220] oraz 23–29 [98, 99] reszcie aminokwasowej łańcucha B insuliny są również degradowane przez katepsynę D. Z badań przeprowadzonych na syntetycznych peptydach i łańcuchu B insuliny wynika, że katepsyna D rozszczepia wiązania peptydowe głównie za resztami aminokwasów hydrofobowych. Na tej podstawie można wnosić, że miejsce wiążące katepsyny D stanowią również aminokwasy hydrofobowe, łączące enzym z substratem za pomocą niekwalencyjnych wiązań hydrofobowych. Występowanie takich wiązań potwierdza brak wpływu na aktywność enzymu wysokich stężeń mocznika [232] oraz wyniki badań nad mechanizmem działania inhibitorów tego enzymu [113].

Niektórzy autorzy wysuwają przypuszczenie, że miejsce katalityczne katepsyny D stanowią dwie grupy karboksylowe aminokwasów kwaśnych, z których jedna występuje prawdopodobnie w formie zdysocjowanej [17,

103]. Istnieją dane eksperymentalne wskazujące na udział reszt histydyny w reakcjach katalizowanych przez katepsynę D [94]. Na podstawie poglądu głoszącego znaczne podobieństwa mechanizmu działania proteaz o podobnej strukturze miejsca katalitycznego i wiadomości o mechanizmie działania pepsyny i innych proteaz o karboksylowym miejscu katali-

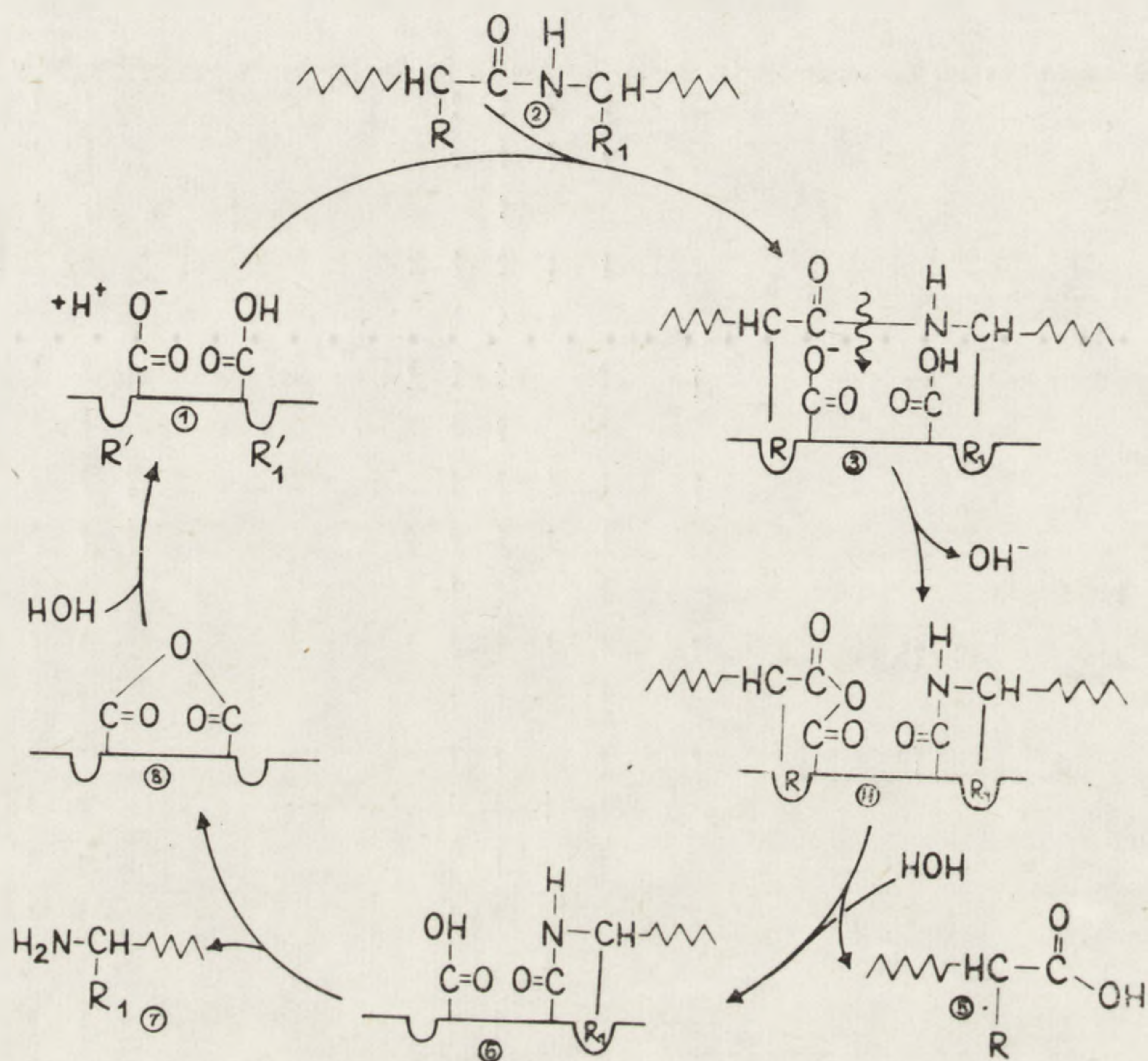


Ryc. 1. Specyficzność substratowa katepsyny D wyizolowanej z różnych narządów badana na utlenionym łańcuchu B insuliny wołu

Katepsyna D: 1 — chrząstki królika [223], 2 — macicy bydłowej [225], 3 — miążgi zęba [178], 4 — mięśnia dorsza [182], 5 — mięśnia królika [8], 6 — mózgu wołu [129], 7 — nadnercza wołu [52], 8 — płuca wołu [39], 9 — przysadki wołu [36], 10 — śledziony dorsza [181], 11 — śledziony królika [162], 12 — śledziony wołu [160], 13 — śledziony świni [38], 14 — tarczycy świni [116], 15 — tarczycy świni [53], 16 — tętnicy wołu [163], 17 — gruczołakoraka żołądka 1A [61], 18 — gruczołakoraku żołądka 1B [61], 19 — guza Ehrlicha I [101], 20 — guza Ehrlicha II [101]. ↑ — działanie szybkie, ↑ — działanie powolne.

tycznym [109, 154, 194, 206, 229], przedstawiono na ryc. 2 hipotetyczny model rozszczepiania wiązań peptydowych przez katepsynę D. Po wytworzeniu kompleksu katepsyny D z substratem dochodzi do oddziaływania miejsca katalitycznego na atakowane wiązanie peptydowe. Powoduje to przegrupowanie elektronów w obrębie tego wiązania, a następnie rozszczepienie go. Powstaje acylo-amino-enzym, z którego uwalniany jest najpierw produkt reakcji z wolną grupą karboksylową. W następnej kolejności odszczepiany jest produkt reakcji z wolną grupą aminową. Enzym

przechodzi natomiast w formę bezwodnikową, która ulega gwałtownej hydrolizie, przez co odtwarza się sytuacja wyjściowa. Ponieważ proces katalityczny zależy od dysocjujących grup karboksylowych, na jego szybkość wpływa w istotny sposób pH środowiska.



Ryc. 2. Prawdopodobny mechanizm hydrolizy wiązań peptydowych przez katepsynę D

1 — enzym, 2 — substrat, 3 — kompleks enzym-substrat, 4 — acylo-amino-enzym, 5 — pierwszy produkt reakcji z wolną grupą karboksylową, 6 — amino-enzym, 7 — drugi produkt reakcji z wolną grupą aminową, 8 — bezwodnikowa forma enzymu, miejsca wiążące: R, R₁ — substratu, R', R₁' — enzymu

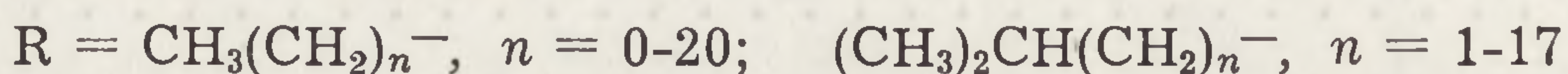
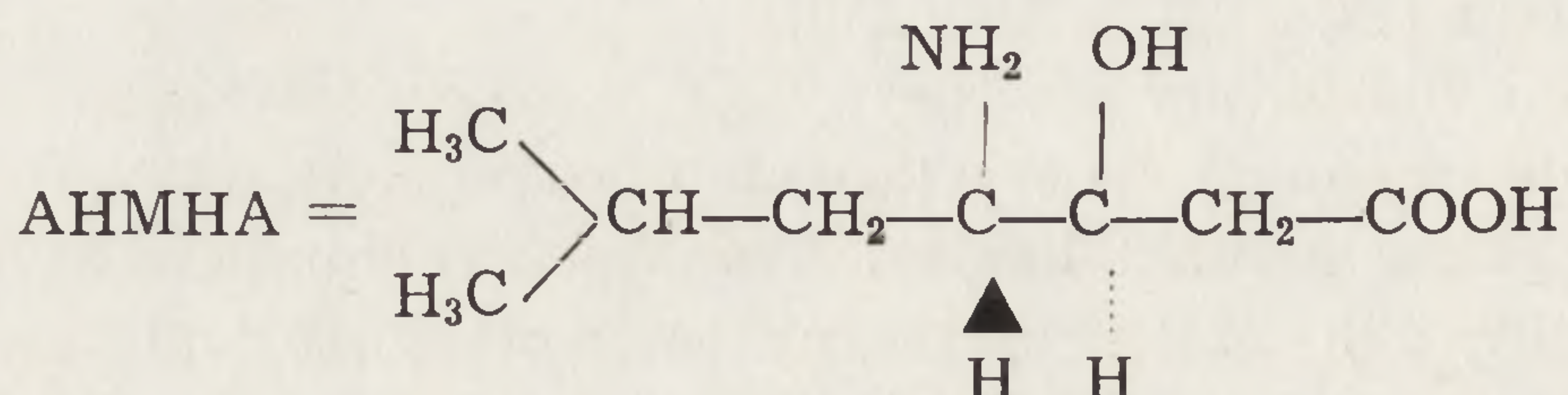
INHIBITORY KATEPSYNY D

Syntetycznymi inhibitorami katepsyny D jest ester metylowy dwuazoacetylo-D-L-norleucyny [51, 183], ester metylowy dwuazoacetylo-L-feniloalaniny [14], ester etylowy dwuazoacetylo-glicyny [14], dwuazoacetylo-2,4-dwunitrofenylo-etylenodwuamina [188] i inne związki dwuazowe [113]. Związki te blokują grupy karboksylowe miejsca katalitycznego enzymu, przy czym warunkiem tej reakcji jest obecność jonów miedziowych [96, 113]. Reakcje katepsyny D z estrem metylowym dwuazoacetylo-D, L-norleucyny i innymi związkami dwuazowymi zachodzi najszybciej w pH = 4,5 [113]. Związanie wymienionego inhibitora znakowanego wę-

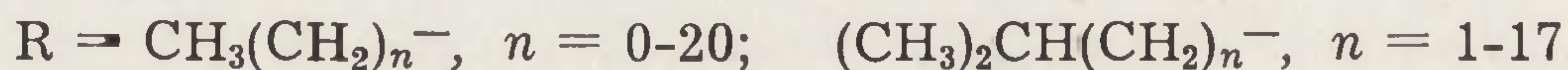
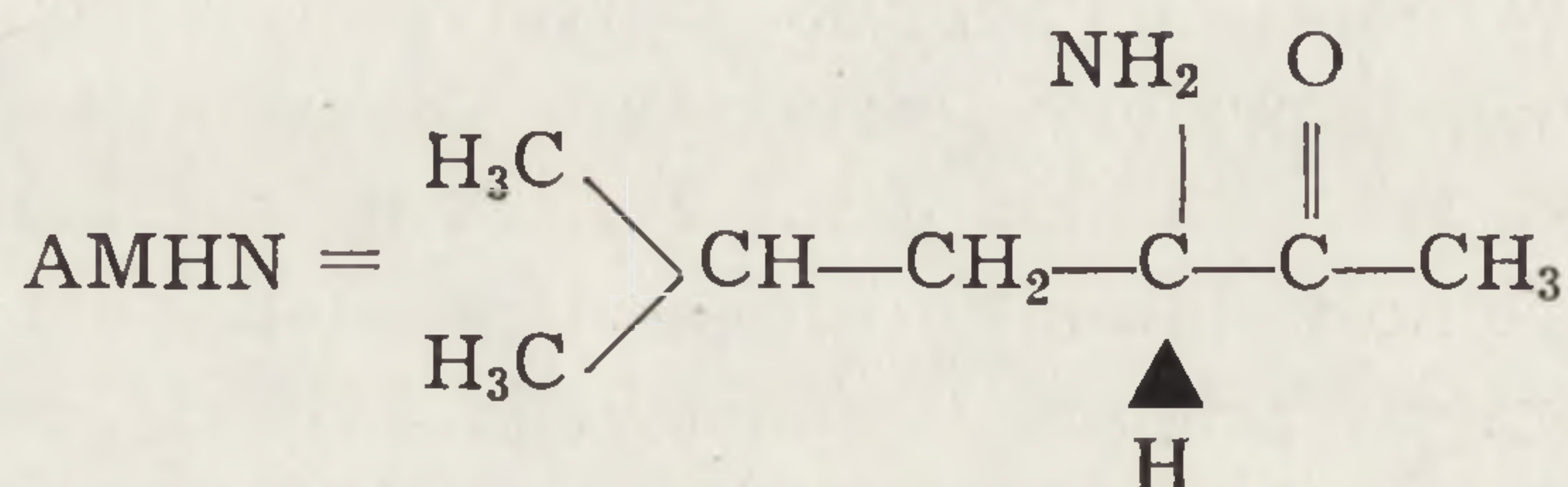
głem ^{14}C z katepsyną D pozwoliło na wyizolowanie fragmentu enzymu zawierającego ten znacznik, identyfikację aminokwasu stanowiącego miejsce katalityczne i ustalenie sekwencji aminokwasowej jego najbliższej okolicy [103]. Aktywność katepsyny D hamuje również dwutiofosgen i 2,2-dwuchloro-1,3-dwutiocyklobutanon [161]. Katepsyna D jest niewrażliwa na syntetyczne inhibitory proteaz sulfhydrylowych, serynowych i metaloproteaz [12, 14, 116, 160, 220].

Naturalne inhibitory katepsyny D są wytwarzane przez niektóre drobnoustroje, rośliny i zwierzęta. Inhibitorami katepsyny D wytwarzanymi przez różne gatunki bakterii rodzaju *Streptomyces* są pepstatyny [5, 19, 49, 107, 138, 221]. Pepstatyny są pentapeptydami zawierającymi w swej strukturze nietypowe aminokwasy i składniki nieaminokwasowe. Zbudowane są one kolejno z 1 reszty kwasu karboksylowego blokującej N-końcową grupę aminową cząsteczki, 2 reszt waliny, 1 reszty kwasu 3S,4S-4-amino-3-hydroksy-6-metyloheptanowego (AHMHA), 1 reszty alaniny i reszty AHMHA [147, 202]. W zależności od struktury reszty kwasu karboksylowego wyróżnia się: acetylo-pepstatynę, propionilo-pepstatynę, butyrylo-pepstatynę, izowalerylo-pepstatynę, heksanoilo-pepstatynę, antyzoheptanoilo-pepstatynę i oktanoilo-pepstatynę. Pochodnymi pepstatyn o zachowanej aktywności inhibitorowej jest pepstanon i hydroksypepstatyna. W pepstanonie w miejscu C-końcowego AHMHA znajduje się 3S-3-amino-5-metyloheksanon-2 (AMHN) [146]. Hydroksypepstatyna w miejscu alaniny zawiera serynę [203]. Zarówno pepstanon, jak i hydroksypepstatyna zawiera najczęściej resztę kwasu izowalerianowego. Strukturę chemiczną pepstatyn przedstawiono na ryc. 3. Siła działania inhibicyjnego pepstatyn na katepsynę D nie zależy od długości łańcucha węglowego rodnika kwasowego [6, 7, 202]. Działanie inhibicyjne hydroksypepstatyny jest również tego samego rzędu co pepstatyn. Natomiast siła działania inhibicyjnego pepstanonu, w związku z wystąpieniem grupy ketonowej w C-końcowym fragmencie struktury, jest mniejsza. Wskazuje to na znaczenie występowania grup hydroksylowych w C-końcowym fragmencie struktury dla działania inhibicyjnego tych inhibitorów [6, 117, 201]. Pepstatyny działają inhibicyjnie najprawdopodobniej na skutek strukturalnego podobieństwa do tetraedrycznego produktu pośredniego, pojawiającego się w czasie rozszczepiania wiązań peptydowych przez proteazy posiadające karboksylowe miejsca katalityczne [134, 135]. Inhibitory te znalazły zastosowanie w badaniach struktury centrum aktywnego i mechanizmu działania proteaz karboksylowych [167, 190, 193]. Użycie pepstatyn pozwoliło wyjaśnić znaczenie katepsyny D, występującej w mieszaninie z innymi proteazami komórkowymi, w degradacji białek [42, 46, 85]. Pepstatyny stosowane były także w stanach chorobowych, w których dochodzi do wzrostu aktywności katepsyny D, takich jak zapalenia, opa-

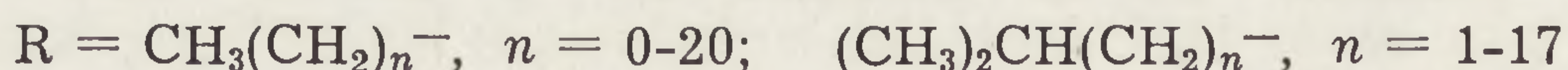
rzenia, wrzody i inne schorzenia [87, 127, 136, 191, 204]. Zaletą tych inhibitorów jako ewentualnych środków leczniczych jest mała toksyczność [202–204] i niski ciężar cząsteczkowy umożliwiający penetrację do tkanek i komórek [123, 202].



Pepstatyny



Pepstanony



Hydroksypepstatyny

Ryc. 3. Struktura pepstatyn, pepstanonów i hydroksypepstatyn [202]

Spośród wielu roślin zawierających inhibitory różnych enzymów proteolitycznych, jedynie bulwy ziemniaka zawierają inhibitor katepsyny D [104, 105, 231]. Opisano metody izolowania i oczyszczania ziemniaczanego inhibitora katepsyny D oraz poznano jego właściwości fizykochemiczne i ustalono skład aminokwasowy [171]. Ziemniaczany inhibitor katepsyny D posiada masę cząsteczkową 22 000 daltonów [106, 230]. Cząsteczka tego inhibitora zbudowana jest ze 199 reszt aminokwasowych i zawiera sześć reszt cysteiny, które tworzą trzy mostki dwusiarczkowe [106]. Sekwencja siedemnastu N-końcowych aminokwasów tego inhibitora jest następująca: Glu-Ser-Pro-Leu-Pro-Lys-Pro-Wal-Leu-Asp-X-Asn-Gly-Lys-Glu-Leu-Gln [171].

Do inhibitorów katepsyny D wytwarzanych w organizmach zwierzęcych należą glikozaminoglikany [9], specyficzne przeciwciała skierowane przeciwko katepsynie D [209] i α_2 -makroglobulina [20]. Stopień zahamowania aktywności katepsyny D przez glikozaminoglikany zależy od pH [9]. Największe zahamowanie aktywności stwierdzono w $\text{pH} = 4,0-4,5$. Wraz ze wzrostem pH działanie inhibicyjne tych związków zmniejsza się. Efekt inhibicyjny glikozaminoglikanów znoszą białka zasadowe. Najbardziej specyficznymi inhibitorami katepsyny D są przeciwciała skierowane przeciwko temu enzymowi [209]. Przeciwciała skierowane przeciwko katepsynie D wyizolowanej z określonego narządu hamują również aktywność tego enzymu wyizolowanego z innych narządów tego samego gatunku zwierzęcia, ale nie reagują z katepsyną D innych gatunków zwierząt [125, 166, 185]. Tworzenie kompleksów katepsyny D z przeciwciałami zależy od pH środowiska. Zachodzi ono najintensywniej w $\text{pH} = 5,0-6,0$. W miarę obniżania się pH ilość powstających kompleksów zmniejsza się, a w pH poniżej 3,0 nie powstają one w ogóle i enzym wykazuje pełną aktywność. Antykatepsynowych przeciwciał użyto do badań nad rolą katepsyny D w degradacji białek makrofagów [50] i proteoglikanów chrząstki [47, 48, 210]. Związanie tych przeciwciał z fluoresceiną pozwoliło na zastosowanie ich w ustaleniu lokalizacji katepsyny D w obrębie komórek i tkanek [43, 50, 158, 159].

METODY OZNACZANIA AKTYWNOŚCI KATEPSYNY D

Aktywność katepsyny D oznacza się na substratach białkowych i przy użyciu syntetycznych peptydów [227]. Podatność różnych białek na działanie katepsyny D przedstawia tabela 7. Do oznaczania aktywności katepsyny D używana jest najczęściej hemoglobina zdenaturowana mocznikiem [2, 3] lub kwasem solnym [12, 88, 142] oraz kazeina zdenaturowana mocznikiem [232]. Wrażliwość na działanie katepsyny D hemoglobiny zdenaturowanej obydwojma wymienionymi sposobami jest prawie jednakowa. Hemoglobina zdenaturowana mocznikiem jest jednak lepiej rozpuszczalna w pH odpowiadającym punktowi izoelektrycznemu tego białka. Zdenaturowana mocznikiem kazeina przewyższa zdenaturowaną hemoglobinę zarówno pod względem wrażliwości na działanie katepsyny D, jak i pod względem rozpuszczalności [232]. Kwasorozpuszczalne produkty degradacji hemoglobiny lub kazeiny oznacza się ilościowo przez bezpośredni pomiar absorpcji przy 280 nm lub przez pomiar absorpcji przy odpowiedniej długości fali po dodaniu odczynnika wybarwiającego. Przy pracy na nie oczyszczonym materiale bezpośredni pomiar absorpcji przy 280 nm jest często obciążony błędem. Zawarte w tym materiale kwasy nukleinowe są degradowane przez nukleazy, a uwolnione nukleotydy podwyższają

TABELA 7

Porównanie podatności różnych białek na działanie katepsyny D wyizolowanej ze śledziony wołu [126]

Substrat	pH pomiaru	Stopień rozkładu [%]
Hemoglobina wołu	3,5	100
Kazeina	2,5	10
Albumina surowicy ludzkiej	3,2	2
Albumina surowicy wołu	3,0	12
α -globulina wołu	3,5	20
β -globulina wołu	3,0	17
γ -globulina wołu	3,5	2
Fibrynogen	3,0	13
Fibryna	3,0	7
Elastyna	5,5	3
Kolagen	3,0	3
Albumina jaja	2,5	4

wynik pomiaru [11, 140]. W przypadkach takich niekorzystne jest również stosowanie metody ninhydrynowej, ze względu na dużą zawartość niskocząsteczkowych związków ninhydrynododatnich. Od związków takich można uwolnić próby wykonując przed inkubacją dializę. Wymienione trudności można wyeliminować bez stosowania dodatkowych zabiegów, używając hemoglobinę znakowaną fluoresceiną [132, 175] lub radiopierwiastkami [14, 81, 170, 215]. Hemoglobina znakowana radiopierwiastkami, w porównaniu z hemoglobina nie znakowaną, zapewnia liniowe przyrosty produktów reakcji zarówno przy dłuższych czasach inkubacji, jak i wyższych stężeniach enzymu [215]. Ponadto użycie hemoglobiny znakowanej wymaga znacznie mniejszych ilości enzymu niż w przypadku użycia hemoglobiny nie znakowanej (tabela 8).

TABELA 8

Porównanie ilości katepsyny D niezbędnych do wykonania pomiaru aktywności tego enzymu różnymi metodami przy użyciu substratu hemoglobinowego [15, 17]

Metoda pomiaru	Niezbędna ilość katepsyny D [j $\times 10^{-3}$]*	
	na próbę	na pomiar**
E _{280nm}	60	120
Lowry, E _{670nm}	30	60
Radiochemiczna	2	2

* 1 jednostka odpowiada około 1,2 μ g katepsyny D.

** Metody chemiczne wymagają wykonania nie inkubowanych prób kontrolnych.

Syntetyczne substraty używane do oznaczania aktywności katepsyny D posiadają zablokowaną N-końcową grupę aminową. Najczęściej używany jest pentapeptyd o sekwencji aminokwasów: N-acetylo-Gly₁-Phe₂-Leu₃-Gly₄-Phe₅ [97]. Katepsyna D rozszczepia w tym substracie wiązanie między Phe₂-Leu₃, a uwolnione grupy aminowe oznacza się metodą ninhydrynową. Rzadziej stosowany jest oktapeptyd o sekwencji: karbo-benzoksy-Pro₁-Phe₂-His₃-Leu₄-Leu₅-Val₆-Tyr₇-Ser₈-β-naftyloamid [166]. W związku tym katepsyna D rozszczepia wiązania między Phe₂-His₃ i Leu₄-Leu₅. Pojawienie się wolnej grupy aminowej w częściowo zdegradowanym przez katepsynę D peptydzie umożliwia działanie aminopeptydazy M, która odszczepiając kolejno aminokwasy N-końcowe uwalnia β-naftyloaminę. Ilość uwolnionej β-naftyloaminy mierzy się fluoryme-

TABELA 9
Przegląd metod oznaczania aktywności katepsyny D

Substrat	pH pomiaru	Odczynnik wybarwiający	Pomiar produktu reakcji	Literatura
Hemoglobina zdenaturowana kwasem solnym	3,5	—	E _{280nm}	[156]
Hemoglobina zdenaturowana mocznikiem	4,0	Biuretowy Ninhydrynowy Folina-Ciocalteau Lovry	E _{555nm}	[121]
Kazeina zdenaturowana mocznikiem	4,0		E _{570nm}	[139]
			E _{650nm}	[3, 232]
			E _{670nm}	[15, 17]
Hemoglobina znakowana fluoresceiną	4,0	—	Fluorescencja, 475 nm	[175]
Hemoglobina znakowana ³ H, ¹⁴ C, ¹²⁵ I	4,0	—	Pomiar promieniotworyczności	[170, 215]
N-Ac-Gly-Phe-Leu-Gly-Phe	4,3	Ninhydrynowy	E _{570nm}	[97]
Z-Pro-Phe-His-Leu-Leu-Val-Tyr-Ser-β-NaA	3,8	—	Fluorescencja, 410 nm	[166]
Białka zasadowe	3,5	Sakaguchi	E _{500nm}	[40]
Proteoglikany	5,0	—	Pomiar lepkości	[173]

trycznie. Przy założeniu, że działanie aminopeptydazy jest wyczerpujące, ilość uwolnionej β-naftyloaminy zależy od aktywności katepsyny D. Do wykrywania aktywności katepsyny D w elektroforogramach stosuje się metodę Uriela [205]. Przegląd metod oznaczania aktywności katepsyny D znajduje się w tabeli 9.

ZNACZENIE BIOLOGICZNE KATEPSYNY D

Katepsyna D spełnia istotną rolę w metabolizmie białek komórkowych i białek pozakomórkowych wnikających do komórki w drodze pino-cytozy i fagocytozy [10, 45, 144]. Katepsyna D degradowuje białka cytoplazmy [41, 42, 118], organelli komórkowych [68], białka zasadowe [25, 26, 118, 173], albuminę surowicy krwi [12, 64], α -, β - i γ -globuliny surowicy krwi [56], antygeny [187], immunoglobuliny [63, 64, 131], fibrynogen i fibrynę [56, 111], hemoglobinę [118], globinę [116], proteoglikany [1, 44, 149, 172, 218], tyreoglobulinę [11, 143], myozynę [28, 89, 179], rybonukleazę [64, 177], kolagen [180, 216], żelatynę [12], elastynę [217], kazeinę [56] i inne białka [30, 35, 56, 64, 78, 153, 176] oraz hormony peptydowe [22–24, 34, 70] i biologicznie czynne peptydy [54, 71, 73, 148].

Optimum działania katepsyny D leży w zakresie $\text{pH} = 2,8\text{--}5,0$, a jego wartość zależy od pochodzenia gatunkowego i narządowego enzymu i od użytego substratu. Hemoglobinę zdenaturowaną kwasem enzym wyizolowany z tkanek zwierzęcych degradowuje najszybciej w $\text{pH} = 3,0\text{--}3,5$ [12, 160, 225], w działaniu na hemoglobinę zdenaturowaną mocznikiem wykazuje on najwyższą aktywność w $\text{pH} = 3,8\text{--}4,0$ [77, 172, 225], natomiast albuminę, globulinę i chondromukoproteidy najszybciej degradowuje w $\text{pH} = 4,0\text{--}5,0$ [14, 160, 173, 219, 222]. Optimum pH katepsyny D wyizolowanej z mięśnia i wątroby kury jest niższe i wynosi przy pomiarach wykonanych na hemoglobinie zdenaturowanej kwasem 2,8 [15], a optimum pH katepsyny D mięśnia morszczuka wyznaczone na tym substracie wynosi 4,5 [67]. Katepsyna D przejawia znaczną aktywność również w pH wyższym od optymalnego, natomiast w pH niższym enzym ten wykazuje jedynie śladową aktywność. Przesunięcie optimum pH degradacji niektórych białek w kierunku pH obojętnego oraz fakt hydrolizowania substratów przez katepsynę D w szerokim zakresie powyżej optymalnego pH ma istotne znaczenie fizjologiczne. Optimum pH katepsyny D wyznaczone *in vitro* nie musi odpowiadać wartości *in vivo*. Nie jest wykluczone, że w warunkach naturalnych enzym ten związany jest strukturalnie z lizosomami, co może podwyższać optimum pH jego działania. Za przypuszczeniem tym przemawia fakt przesunięcia w kierunku zasadowym optimum pH katepsyny D związanej ze stałym nośnikiem [92]. Inną możliwością dostosowania się do zmieniających się ciągle warunków środowiska jest występowanie izoenzymów katepsyny D, różniących się szeregiem właściwości ważnych w katalizie, takich jak powinowactwo do substratów, optima pH i inne [150, 174].

Katepsyna D jako endopeptydaza zapoczątkowuje hydrolizę białek. Powstające w wyniku jej działania peptydy są substratami innych katepsyn [1, 84, 89].

Na zawartość katepsyny D wywierają wpływ niektóre hormony [119, 165]. Warunkiem sprawnego przebiegu degradacji białek przez katepsynę D i inne proteazy komórkowe jest integralność strukturalna i funkcjonalna lizosomów, w których ten proces zachodzi [228]. Możliwość regulacji proteolizy komórkowej sprowadza się do modulowania przepuszczalności błon lizosomalnych [57, 86, 110] oraz stosowania inhibitorów tego enzymu [226]. Jest to uzasadnione w przypadkach uszkodzenia błon lizosomalnych i uwalniania z nich enzymów, co ma miejsce w ogniskach zapalnych [124], uszkodzeniach termicznych, chorobie reumatycznej [159] i innych stanach patologicznych [18, 43, 82, 159, 169, 186, 200, 213, 214, 233, 234]. Ponieważ w niektórych schorzeniach katepsyna D przechodzi do krwi, moczu i płynu mózgowo-rdzeniowego, oznaczanie aktywności tego enzymu ma znaczenie diagnostyczne [74, 83, 151].

LITERATURA

- [1] ALI S. Y., EVANS L., Studies on the cathepsins in elastic cartilage, *Biochem. J.*, **112**: 427-433, 1969.
- [2] ANSON M. L., The estimation of cathepsin with hemoglobin and partial purification of cathepsin, *J. Gen. Physiol.*, **20**: 565-574, 1937.
- [3] — The estimation of pepsin, trypsin, papain and cathepsin with hemoglobin, *J. Gen. Physiol.*, **22**: 79-89, 1938.
- [4] — The purification of cathepsin D, *J. Gen. Physiol.*, **23**: 695-704, 1940.
- [5] AOYAGI T., KUNIMOTO S., MORISHIMA H., TAKEUCHI T., UMEZAWA H., Effect of pepstatin on acid proteases, *J. Antibiot.*, **24**: 687-694, 1971.
- [6] AOYAGI T., MORISHIMA H., NISHIZAWA R., KUNIMOTO S., TAKEUCHI T., UMEZAWA H., Biological activity of pepstatins, pepstatone A and partial peptides on pepsin, cathepsin D, and renin, *J. Antibiot.*, **25**: 689-694, 1972.
- [7] AOYAGI T., YAGISAWA Y., KUMAGAI M., HAMADA M., MORISHIMA H., TAKEUCHI T., UMEZAWA H., New pepstatins Bu, Pr and Ac produced by *Streptomyces*, *J. Antibiot.*, **26**: 539-540, 1973.
- [8] ATSUSHI S., OKITANI A., FUJIMA M., Studies on proteolysis in stored muscle. III. Some physicochemical properties and proteolysis specificity of the rabbit muscular cathepsin D, *Agr. Biol. Chem.*, **33**: 579-582, 1969.
- [9] AVILA J. L., CONVIT J., Inhibition of leucocytic lysosomal enzymes by glycosaminoglycans in vitro, *Biochem. J.*, **152**: 57-64, 1975.
- [10] AXLINE S. G., COHN Z. A., In vitro induction of lysosomal enzymes by phagocytosis, *J. Exp. Med.*, **131**: 1239-1260, 1970.
- [11] BALASUBRAMANIAM K., DEISS W. P., Characteristics of thyroid lysosomal cathepsin, *Biochim. Biophys. Acta*, **110**: 564-575, 1965.
- [12] BARRETT A. J., Lysosomal acid proteinase of rabbit liver, *Biochem. J.*, **104**: 601-608, 1967.
- [13] — Cathepsin D. Purification of isoenzymes from human and chicken liver, *Biochem. J.*, **117**: 601-607, 1970.
- [14] — Purification and properties of cathepsin D from liver of chicken, rabbit

- and man, [w] *Tissue Proteinases*, red. A. J. Barrett, J. T. Dingle, North-Holland Publishing Company, Amsterdam 1971, 109–133.
- [15] — Lysosomal enzymes, [w] *Lysosomes a Laboratory Handbook*, red. J. T. Dingle, North-Holland Publishing Company, Amsterdam 1972, 47–135.
- [16] — Human cathepsin B₁ purification and some properties of the enzyme, *Biochem. J.*, **131**: 809–822, 1973.
- [17] — Cathepsin D and other carboxyl proteinases, [w] *Proteinases in Mammalian Cells and Tissues*, red. A. J. Barrett, North-Holland Publishing Company, Amsterdam 1977, 209–348.
- [18] — The diversity of cellular proteinases in physiology and pathology, *Acta. Biol. Med. Germ.*, **36**: 1959–1968, 1977.
- [19] BARRETT A. J., DINGLE J. T., The inhibition of tissue proteinases by pepstatin, *Biochem. J.*, **127**: 439–441, 1972.
- [20] BARRETT A. J., STARKEY P. M., MUNN E. A., The unique nature of the interaction of α_2 -makroglobulin with proteinases, [w] *Proteinase Inhibitors*, red. H. Fritz, H. Tschesche, L. J. Greene, E. Truscheit, Springer Verlag, Berlin 1974, 72–77.
- [21] BEESE J., FARR W., GRÜNER E., HASCHEN R. J., Proteolytische enzyme in normalen menschlichen blutplättchen, *Klin. Wschr.*, **44**: 1049–1053, 1966.
- [22] BENUCK M., GRYNBAUM A., MARKS N., Breakdown of somatostatin and substance P by cathepsin D purified from calf brain by affinity chromatography, *Brain Res.*, **143**: 181–185, 1977.
- [23] BENUCK M., GRYNBAUM A., COOPER T. B., MARKS N., Conversion of lipotropic peptides by purified cathepsin D of human pituitary: release of γ -endorphin by cleavage of Leu₇₇-Phe₇₈ bond, *Neuroscience Letters*, **10**: 3–9, 1978.
- [24] BENUCK M., MARKS N., Enzymatic inactivation of substance P by a partially purified enzyme from rat brain, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **65**: 153–160, 1975.
- [25] BENUCK M., MARKS N., HASHIM G. A., Metabolic instability of myelin proteins. Breakdown of basic protein induced by brain cathepsin D, *Europ. J. Biochem.*, **52**: 615–621, 1975.
- [26] — Metabolic instability of myelin proteins. Breakdown of basic protein induced by brain cathepsin D, *Eur. J. Biochem.*, **52**: 615–621, 1975.
- [27] BEREZIN V. A., REVA A. D., SHMATCHENKO N. A., KOROBOW V. I., Wydielenije i oczistka katepsyna D iz kory golownowo mozga byka i swini, *Biochimija*, **44**: 1030–1035, 1979.
- [28] BIRD J. W. C., SCHWARTZ W. N., SPANIER A. M., Degradation of myofibrillar proteins by cathepsin B and D, *Acta Biol. Med. Germ.*, **36**: 1587–1604, 1977.
- [29] BJELLE A., OSTERLIN S., Cathepsin D activity in bovine articular cartilage, synovial membrane and fluid: degradation of cartilage proteoglycans from same joint, *J. Rheumat.*, **3**: 400–408, 1976.
- [30] BOHLEY P., KIRSCHKE H., LANGER J., ANSORGE S., WIEDERMANS B., HANSON H., Intracellular protein breakdown, [w] *Tissue Proteinases*, red. A. J. Barret, J. T. Dingle, North-Holland Publishing Company, Amsterdam 1971, 187–219.
- [31] BOWERS W. E., Distribution of tissue proteinases in lymphoid tissues, [w] *Tissue Proteinases*, red. A. J. Barrett, J. T. Dingle, North-Holland Publishing Company, Amsterdam 1971, 221–239.

- [32] BOWERS W. E., BEYER C. F., JAGO N., Cathepsin D of mouse leukemia L1210 cells. Unusual intracellular localization and biochemical properties, *Biochim. Biophys. Acta*, **497**: 272-279, 1977.
- [33] BOUTROS M. I., GOURGI M. M., HIMAL H. S., WALDRON-EDWARD D., Establishment of the integrity of lysosomes in a glycoproteinrich matrix. Distribution pattern of seven lysosomal enzymes in gastric mucosa, *Biochim. Biophys. Acta*, **444**: 508-518, 1976.
- [34] BRIGGS D. W., GEORGE W. J., FISHER J. W., Inactivation of erythroprotein by hepatic lysosomes, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **144**: 394-399, 1973.
- [35] BROSTOFF S. W., REUTER W., HICHENS M., EYLAR E. H., Specific cleavage of the A1 protein from myelin with cathepsin D, *J. Biol. Chem.*, **249**: 559-567, 1974.
- [36] CALLAHAN P. X., ELLIS S., Action of pituitary proteinase I on the insulin B_{0x} chain, *Biochim. Biophys. Acta*, **221**: 413-416, 1970.
- [37] CICVÁREK Z., *Klinicka biochemia cerebro-spinalneho likvoru*, Vyd. Osveta, Martin, 1974, 219-221.
- [38] CUNNINGHAM M., TANG J., Purification and properties of cathepsin D from porcine spleen, *J. Biol. Chem.*, **251**: 4528-4536, 1976.
- [39] DANNENBERG A. M., SMITH E. L., Proteolytic enzymes of lung, *J. Biol. Chem.*, **215**: 45-54, 1955.
- [40] DAVIES P., KRAKAUER K., WEISSMANN G., Calf thymus histone as a substrate for neutral and acid proteases of leucocyte lysosomes and other proteolytic enzymes, *Anal. Biochem.*, **45**: 428-440, 1972.
- [41] DEAN R. T., Lysosomal enzymes as agents of turnover of soluble cytoplasmic proteins, *Eur. J. Biochem.*, **58**: 9-14, 1975.
- [42] — The role of cathepsins B₁ and D in the digestion of cytoplasmic proteins in vitro by lysosomal extracts, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **68**: 518-523, 1976.
- [43] DECKER R. S., POOLE, A. R., GRIFFIN E. E., DINGLE J. T., WILDENTHAL K., Altered distribution of lysosomal cathepsin D in ischemic myocardium, *J. Clin. Invest.*, **59**: 911-921, 1977.
- [44] De DUVE C., PRESSMAN B. C., GIANETTO R., WATTIAUX R., APPELMANS F., Tissue fractionation studies. 6. Intracellular distribution of enzymes in rat-liver tissue, *Biochem. J.*, **60**: 604-617, 1955.
- [45] De DUVE C., WATTIAUX R., Functions of lysosomes, *Ann. Rev. Physiol.*, **28**: 435-492, 1966.
- [46] De MARTINO G. N., DAEBBER T. W., MILLER L. L., Pepstatin-insensitive proteolytic activity of rat liver lysosomes, *J. Biol. Chem.*, **252**: 7511-7516, 1977.
- [47] DINGLE J. T., The immunoinhibition of cathepsin D-mediated cartilage degradation, [w] *Tissue Proteinases*, red. A. J. Barret, J. T. Dingle, North-Holland Publishing Company, Amsterdam 1971, 313-324.
- [48] DINGLE J. T., BARRETT A. J., WESTON P. D., Cathepsin D. Characteristics of immunoinhibition and the confirmation of a role in cartilage breakdown, *Biochem. J.*, **123**: 1-13, 1971.
- [49] DINGLE J. T., BARRETT A. J., POOLE A. R., Inhibition by pepstatin of human cartilage degradation, *Biochem. J.*, **127**: 443-444, 1972.
- [50] DINGLE J. T., POOLE A. R., LAZARUS G. S., BARRETT A. J., Immunoinhibition of intracellular protein digestion in macrophages, *J. Exptl. Med.*, **137**: 1124-1141, 1973.
- [51] DIONYSSIOU-ASTERIOU A., RAKITZIS E. T., Inactivation of cathepsin D

- from human gastric mucosa and from stomach carcinoma by diazoacetyl-D,L-norleucine methyl ester, *Biochem. Pharmacol.*, **27**: 827-829, 1978.
- [52] DOPHEIDE T. A. A., TODD P. E. E., Hydrolysis of the A and B chain of oxidized insulin by adrenal acid proteinase, *Biochim. Biophys. Acta*, **86**: 130-135, 1964.
- [53] DOPHEIDE T. A. A., TRIKOJUS V. M., Hydrolysis of the A and B chain of oxidized insulin by thyroid acid proteinase, *Biochim. Biophys. Acta*, **118**: 435-437, 1966.
- [54] DORER F. E., LENTZ K. E., KAHN J. R., LEVIN M., SKEGGS L. T., A comparison of the substrate specificities of cathepsin D and pseudorenin, *J. Biol. Chem.*, **253**: 3140-3142, 1978.
- [55] DUCASTAING A., AZANZA J. L., ROBIN J. M., RAYMOND J., CREACH P., La cathepsin D de rate de cheval. I. Purification et étude de quelques propriétés physico-chimiques, *Biochimie*, **58**: 771-782, 1976.
- [56] — La cathepsine D de rate de cheval. II. Etude de quelques propriétés enzymatiques, *Biochimie*, **58**: 783-791, 1976.
- [57] EILON G., RAISZ L. G., Comparison of the effects of stimulators and inhibitors of resorption on the release of lysosomal enzymes and radioactive calcium from fetal bone in organ culture, *Endocrinology*, **103**: 1969-1975, 1978.
- [58] ELLIS S., Pituitary proteinase I: purification and action on growth hormone and prolactin, *J. Biol. Chem.*, **235**: 1694-1699, 1960.
- [59] ESUMI H., SATO S., SUGIMURA T., OKASAKI N., Purification and properties of an acid protease from human ascitic fluid, *Biochim. Biophys. Acta*, **523**: 191-197, 1978.
- [60] ETHERINGTON D. J., The nature of the collagenolytic cathepsin of rat liver and its distribution in other rat tissues, *Biochem. J.*, **127**: 685-692, 1972.
- [61] ETHERINGTON D. J., TAYLOR W. H., The proteinases of human gastric adenocarcinoma: their identification, separation and sites of action on the B — chain of oxidized insulin, *Clin. Sci.*, **42**: 79-90, 1972.
- [62] FARBISZEWSKI R., WOROWSKI K., Enzymy proteolityczne tkanek nowotworowych, *Post. Biochem.*, **21**: 407-423, 1975.
- [63] FEHR K., LOSPALLUTO J., ZIFF M., Degradation of immunoglobulin G by lysosomal acid proteases, *J. Immunol.*, **105**: 973-983, 1970.
- [64] FERENČIK M., STEFANOVIČ J., Purification and properties of cathepsin D from chicken spleen, *Biologia, Bratislava*, **29**: 453-463, 1974.
- [65] FERGUSON J. B., ANDREWS J. R., VOYNICK I. M., FRUTON J. S., The specificity of cathepsin D, *J. Biol. Chem.*, **248**: 6701-6708, 1973.
- [66] FERREN L. G., STAUBER W. T., KALNITSKY G., Differential centrifugation studies of guinea pig lung proteases, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **159**: 239-244, 1978.
- [67] FIK M., Niektóre właściwości częściowo oczyszczonej katepsyny mięśni morszczuka, *Bromat. Chem. Toksykol.*, **6**: 225-232, 1973.
- [68] GLAUMAN H., BEREZESKY J. K., ERICSSON J. L. E., TRUMP B. F., Lysosomal degradation of cell organelles. II. Ultrastructural analysis of uptake and digestion of intravenously injected microsomes and ribosomes by Kupffer cells, *Lab. Invest.*, **33**: 252-261, 1975.
- [69] GŁOWIŃSKI S., WOROWSKI K., Cathepsin D activity of venous and polyester vascular grafts implanted in the abdominal aorta of the dogs, *Atherosclerosis*, **32**: 43-46, 1979.
- [70] GRAF L., KENESSEY A., PATTHY A., GRYNBAUM A., MARKS N., LAJTHA

- A., Cathepsin D generates γ -endorphin from β -endorphin, *Arch. Biochem. Biophys.*, **193**: 101–109, 1979.
- [71] GREENBAUM L. M., GREBOW P., JOHNSTON M., PRAKASH A., SEMENTE G., Pepstatin, an inhibitor of leukokinin formation and ascitic fluid accumulation, *Cancer Res.*, **35**: 706–710, 1975.
- [72] GUBENSEK F., BARSTOW L., KREGAR I., TURK V., Rapid isolation of cathepsin D by affinity chromatography on the immobilized synthetic inhibitor, *FEBS Letters*, **71**: 42–44, 1976.
- [73] HACKENTHAL E., HACKENTHAL R., HILGENFELDT U., Isorenin, pseudo-renin, cathepsin D and renin. A comparative enzymatic study of angiotensin-forming enzymes, *Biochim. Biophys. Acta*, **522**: 574–588, 1978.
- [74] HAŃCZYCOWA H., WOŹNIAK M., Przydatność oznaczania niektórych enzymów lizosomalnych w diagnostyce chorób wątroby, *Pol. Tyg. Lek.*, **34**: 249–251, 1979.
- [75] HARTLEY B. S., Proteolytic enzymes, *Ann. Rev. Biochem.*, **29**: 45–72, 1960.
- [76] HAYASAKA S., HARA S., MIZUNO K., Partial purification and properties of cathepsin D in the retinal pigment epithelium, *Invest. Ophthalmol.*, **14**: 617–620, 1975.
- [77] — Distribution and some properties of cathepsin D in the retinal pigment epithelium, *Exp. Eye. Res.*, **21**: 307–313, 1975.
- [78] — Degradation of rod outer segment proteins by cathepsin D, *J. Biochem.*, **78**: 1365–1367, 1975.
- [79] HEDIN S. G., Investigations on the proteolytic enzymes of the spleen of the ox, *J. Physiol.*, **30**: 155–175, 1904.
- [80] HEIKKINEN J. E., JÄRVINEN M., JANSEN C. R., M. D., Purification and biochemical characterization of rat skin cathepsin D, *J. Invest. Dermat.*, **65**: 272–278, 1975.
- [81] HILLE M. B., BARRETT A. J., DINGLE J. T., FELL H. B., Microassay for cathepsin D shows an unexpected effect of cycloheximide on limbbone rudiments in organ culture, *Exp. Cell. Res.*, **61**: 470–478, 1970.
- [82] HIRSCH H. E., PARKS M. E., Acid proteinases and other acid hydrolases in experimental allergic encephalomyelitis: pinpointing the source, *J. Neurochem.*, **24**: 853–858, 1975.
- [83] HOMOLKA J., SOUSEK O., Autoproteolytická katepsinová aktivita v průběhu infekční žloutenky, *Čas. Lek. Čs.*, **101**: 234–238, 1962.
- [84] HUANG F. L., TAPPEL A. L., Action of cathepsin C and D in protein hydrolysis, *Biochim. Biophys. Acta*, **236**: 739–748, 1971.
- [85] HUISMAN W., LANTING L., DODDEMA H. J., BOUMA J. M. W., GRUBER M., Role of individual cathepsins in lysosomal protein digestion as tested by specific inhibitors, *Biochim. Biophys. Acta*, **370**: 297–307, 1974.
- [86] IGNARRO L. J., PADDOCK R. J., GEORGE W. J., Hormonal control of neutrophil lysosomal enzyme release: effect of epinephrine on adenosine 3',5'-monophosphate, *Science*, **183**: 855–857, 1974.
- [87] LODICE A. A., The inhibition by pepstatin of cathepsin D and autolysis of dystrophic muscle, *Life Sci.*, **19**: 1351–1358, 1976.
- [88] IODICE A. A., CHIN J., PERKER S., WEINSTOCK I. M., Cathepsins A, B, C, D and autolysis during development of breast muscle of normal and dystrophic chickens, *Arch. Biochem. Biophys.*, **152**: 166–174, 1972.
- [89] IODICE A. A., LEONG V., WEINSTOCK I. M., Separation of cathepsins A and D of skeletal muscle, *Arch. Biochem. Biophys.*, **117**: 477–486, 1966.

- [90] ISHIKAWA I., CIMASONI G., Isolation of cathepsin D from human leucocytes, *Biochim. Biophys. Acta*, **480**: 228–240, 1977.
- [91] JUDKIEWICZ L., AUGUSTYNIAK W., Rola układu siateczkowo-śródbłonkowego w patologii, *Pol. Tyg. Lek.*, **34**: 1005–1007, 1979.
- [92] KAZAKOVA O. V., OREKHOVICH V. N., Some properties of cathepsins chemically fixed to carriers, *Int. J. Pept. Protein Res.*, **7**: 23–29, 1975.
- [93] — Wydzielenie katepsinow grupy D s pomoszczu chromatografii po srodstwu, *Biochimija*, **40**: 969–972, 1975.
- [94] — Isledowanie funkcjonalno-aktywnych grup katepsinow D, *Biochimija*, **37**: 1026–1028, 1972.
- [95] KAZAKOVA O. V., OREKHOVICH V. N., POURCHOT L., SCHUCK J. M., Effect of cathepsins D from normal and malignant tissues on synthetic peptides, *J. Biol. Chem.*, **247**: 4224–4228, 1972.
- [96] KEILOVÁ H., Inhibition of cathepsin D by diazoacetylonorleucine methyl ester, *FEBS Letters*, **6**: 312–314, 1970.
- [97] — On the specificity and inhibition of cathepsin D and B, [w] *Tissue Proteinases*, red. A. J. Barret, J. T. Dingle, North-Holland Publishing Company, Amsterdam 1971, 45–67.
- [98] KEILOVÁ H., BLÁHA K., KEIL B., Specificity of cleavage of heptapeptide substrate with bovine spleen cathepsin D, *Collection Czechoslov. Chem. Commun.*, **33**: 131–140, 1968.
- [99] — Effect of steric factors on digestibility of peptides containing aromatic amino acids by cathepsin D and pepsin, *Eur. J. Biochem.*, **4**: 442–447, 1968.
- [100] KEILOVÁ H., KEIL B., Proteinases of the Ehrlich ascites tumour. II. Separation of proteinases of the ascites fluid and ascites cells, *Collection Czechoslov. Chem. Commun.*, **27**: 2193–2201, 1962.
- [101] KEILOVÁ H., KEIL B., ŠORM F., Proteinases of Ehrlich ascites tumor. III. Purification and characterization of cellular cathepsin I and II, *Collection Czechoslov. Chem. Commun.*, **29**: 2216–2225, 1964.
- [102] KEILOVÁ H., MARKOVIC O., KEIL B., Characterization and chemical modification of cathepsin D from bovine spleen, *Collection Czechoslov. Chem. Commun.*, **34**: 2154–2157, 1969.
- [103] KEILOVÁ H., TOMÁŠEK V., Contribution to studies on active site of cathepsin B₁ and D, [w] *Intracellular Protein Catabolism*, red. H. Hanson, P. Bohley, *Wissenschaftliche Beitrage der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Halle (Saale) 1974/6*, 237–251.
- [104] — Isolation and some properties of cathepsin D inhibitor from potatoes, *Collection Czechoslov. Chem. Commun.*, **41**: 489–497, 1976.
- [105] — Further characteristics of cathepsin D inhibitor from potatoes, *Collection Czechoslov. Chem. Commun.*, **41**: 2440–2447, 1976.
- [106] — Naturally occurring inhibitors of intracellular proteinases, *Acta Biol. Med. Germ.*, **36**: 1873–1881, 1977.
- [107] KNIGHT C. G., BARRETT A. J., Interaction of human cathepsin D with the inhibitor pepstatin, *Biochem. J.*, **155**: 117–125, 1976.
- [108] KNOOK D. L., The role of lysosomal enzymes in protein degradation in different types of rat liver cells, *Acta Biol. Med. Germ.*, **36**: 1747–1752, 1977.
- [109] KNOWLES J. R., On the mechanism of action of pepsin, *Trans. Roy. Soc. B*, **257**: 135–138, 1970.
- [110] KOĆMIERSKA-GRODZKA D., Farmakologiczna regulacja trawienia wewnątrzkomórkowego, *Post. Hig. Med. Dośw.*, **29**: 719–737, 1976.

- [111] KOPITAR M., KREGAR I., LEBEZ D., Leucocyte proteinases. II. Partial purification of proteinases present in cathepsin D preparation, *Enzymologia*, **41**: 129-139, 1971.
- [112] KRAMAR R., LAMBRECHTER R., RAAB W., Die katheptische aktivität im harn, *Wien. Klin. Wschr.*, **82**: 410-411, 1970.
- [113] KREGAR I., STANOVNIK B., TIŠLER M., NISI C., GUBENŠEK F., TURK V., Inactivation studies of cathepsin D with diazo compounds, *Acta Biol. Med. Germ.*, **36**: 1927-1930, 1977.
- [114] KREGAR I., TURK V., LEBEZ D., Some properties of the cathepsin from the mucosa of rat colon, *Z. Naturforschung*, **22b**: 1360, 1967.
- [115] KREGAR I., URH I., SMITH R., UMEZAWA H., TURK V., Isolation of cathepsin D by affinity chromatography on immobilized pepstatin, [w] *Intracellular Protein Catabolism II*, red. V. Turk, N. Marks, Plenum Press, New York, London 1977, 250-254.
- [116] KRESS L. F., PEANSKY R. J., KLITGAARD H. M., Purification, properties, and specificity of hog thyroid proteinase, *Biochim. Biophys. Acta*, **113**: 375-389, 1966.
- [117] KUNIMOTO S., AOYAGI T., NISHIZAWA R., KOMAI T., TAKEUCHI T., UMEZAWA H., Mechanizm of inhibition of pepsin by pepstatin, *J. Antybiot.*, **27**: 413-418, 1974.
- [118] KURECKI T., TOCZKO K., Kwaśna proteaza lisosomów kory nerek świni, *Acta Physiol. Polon.*, **22**: 507-516, 1971.
- [119] KYAW A., MELLORS A., The effect of cortisone acetate on lysosomal enzyme levels in rat liver, *Canad. J. Biochem.*, **50**: 20-24, 1972.
- [120] LAPRESLE C., Rabbit cathepsins D and E, [w] *Tissue Proteinases*, red. A. J. Barret, J. T. Dingle, North-Holland Publishing Company, Amsterdam 1971, 135-155.
- [121] LAPRESLE C., WEBB T., Study of proteolytic enzyme from rabbit spleen, *Biochem. J.*, **76**: 538-549, 1960.
- [122] — The purification and properties of a proteolytic enzyme, rabbit cathepsin E, and further studies on rabbit cathepsin D, *Biochem. J.*, **84**: 455-462, 1962.
- [123] LASCH J., KOELSCH R., BREZESINSKI G., HERMANN V., RIEMANN S., BOHLEY P., Pepstatyn- and leupeptin-loaded liposomes: a tool in protein breakdown studies, *Acta Biol. Med. Germ.*, **36**: 1829-1831, 1977.
- [124] LAZARUS G. S., The role of neutral proteinase and cathepsin D in turpentine-induced inflammation, *J. Invest. Dermatol.*, **62**: 367-371, 1974.
- [125] LAZARUS G. S., DINGLE J. T., Cathepsin D of rabbit skin: an immunoenzymic study, *J. Invest. Dermat.*, **62**: 61-66, 1974.
- [126] LEBEZ D., KOPITAR M., TURK V., KREGAR I., Comparison of properties of cathepsins D and E with some new cathepsins, [w] *Tissue Proteinases*, red. A. J. Barret, J. T. Dingle, North-Holland Publishing Company, Amsterdam 1971, 167-176.
- [127] LIN T. Y., WILLIAMS H. R., Inhibition of the local hemorrhagic Shwartzman reaction by an acid proteinase inhibitor, pepstatin, *Experientia*, **31**: 209-212, 1975.
- [128] LINDE A., PERSLIDEN B., Cathepsin D activity in isolated odontoblasts, *Calc. Tiss. Res.*, **23**: 33-38, 1977.
- [129] LISZKO W. K., Issledowanija specyficznosti katepsina mozga velikoi rogatoi hidoby, *Ukr. Biochim. Z.*, **37**: 163-168, 1965.
- [130] LOEGERING D. J., CARR F. K., SABA T. M., Cathepsin clearance from the

- circulation and reticuloendothelial function, *Exptl. Mol. Pathol.*, **27**: 277-283, 1977.
- [131] LoSPALLUTO J., FEHR K., ZIFF M., Intracellular proteases and digestion of immunoglobulins, [w] *Tissue Proteinases*, red. A. J. Barrett, J. T. Dingle, North-Holland Publishing Company, Amsterdam 1971, 263-286.
- [132] LUMEN B. O., TAPPEL A. L., Fluorescein-hemoglobin as a substrate for cathepsin D and other proteases, *Anal. Biochem.*, **36**: 22-29, 1970.
- [133] LUNDBLAD G., BERNBÄCK M. L., WIDEMAN C., Proteolytic activity in human thyroid extracts. I. Purification and properties of some proteinases, *Acta Chem. Scand.*, **20**: 675-688, 1966.
- [134] MARCINISZYN J. P., HARTSUCK J. A., TANG J. J. N., The mode of inhibition of acid proteases by pepstatin, *Fed. Proc.*, **34**: 484, 1975.
- [135] MARCINISZYN J., HARTSUCK J. A., TANG J., Mode of inhibition of acid proteases by pepstatin, *J. Biol. Chem.*, **251**: 7088-7094, 1976.
- [136] MARIAK R. T., WOROWSKI K., Wewnątrzkomórkowe peptydazy tkanek zwierzęcych, *Post. Biochem.*, **19**: 279-297, 1973.
- [137] MARKS N., BENUCK M., HASHIM G., Hydrolysis of myelin basic protein with brain acid proteinase, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **56**: 68-74, 1974.
- [138] MARKS N., GRYNBAUM A., LAJTHA A., Pentapeptide (pepstatin) inhibition of brain acid proteinase, *Science*, **181**: 949-951, 1973.
- [139] MARKS N., LAJTHA A., Separation of acid and neutral proteinases of brain, *Biochem. J.*, **97**: 74-83, 1965.
- [140] MARRINK J., GRUBER M., Use of casein in assays for proteolytic activity in tissue extracts: a warning, *Biochim. Biophys. Acta*, **118**: 438-439, 1966.
- [141] MASON M. S., WANGENSTEEN S. L., The effects of purified cathepsin D infusion in intact animals, *Am. J. Surg.*, **134**: 277-282, 1977.
- [142] MATSUDA K., MISAKA E., Studies on cathepsins of rat liver lysosomes, *J. Biochem.*, **76**: 639-649, 1974.
- [143] McQuillan M. T., TRIKOJUS V. M., Thyroid acid proteinase, [w] *Tissue Proteinases*, red. A. J. Barrett, J. T. Dingle, North-Holland Publishing Company, Amsterdam 1971, 157-166.
- [144] MEGO J. L., Protein digestion in isolated heterolysosomes, [w] *Lysosomes in Biology and Pathology*, red. J. T. Dingle, North-Holland Publishing Company, Amsterdam **3**: 138-168, 1972.
- [145] MIECZNIKOWSKI A., SCHMIDT M., Aktywność hydrolaz lizosomalnych w płynie owodniowym, *Przegl. Lek.*, **29**: 952-955, 1972.
- [146] MIYANO T., TOMIYASU M., LIZUKA H., TOMISAKA S., TAKITA T., AOYAGI T., UMEZAWA H., New pepstatins, pepstatins B and C, and pepstatone A, produced by *Streptomyces*, *J. Antibiot.*, **25**: 489-491, 1972.
- [147] MORISHIMA H., TAKITA T., AOYAGI T., TAKEUCHI T., UMEZAWA H., The structure of pepstatin, *J. Antibiot.*, **23**: 263-265, 1970.
- [148] MORRIS B. J., REID I. A., A "renin-like" enzymatic action of cathepsin D and the similarity in subcellular distributions of "renin-like" activity and cathepsin D in the midbrain of dogs, *Endocrinology*, **103**: 1289-1296, 1978.
- [149] MORRISON R. J. G., BARRETT A. J., DINGLE J. T., PRIOR D., Cathepsin B₁ and D. Action on human cartilage proteoglycans, *Biochim. Biophys. Acta*, **302**: 411-419, 1973.
- [150] MORIYAMA A., TAKAHASKI K., The structure and function of acid proteases. VIII. Purification and characterization of cathepsins D from Japanese monkey lung, *J. Biochem.*, **83**: 441-451, 1978.

- [151] MÜLLER R., NEČAS S., Význam stanovenia katepsinu pri virusovej hepatide, *Biochem. Clin. Bohemoslov.*, **7**: 29–33, 1978.
- [152] NACHMANN R. L., FERRIS B., Studies on human platelet protease activity, *J. Clin. Invest.*, **47**: 2530–2540, 1968.
- [153] NAKAI T., OTTO P. S., WHAYNE T. F. Jr., Proteolysis of canine apolipoproteins by acid proteases in canine liver lysosomes, *Biochim. Biophys. Acta*, **422**: 380–389, 1976.
- [154] NEVMARK A. K., KNOWLES J. R., Acyl- and amino-transfer routes in pepsin-catalyzed reactions, *J. Am. Chem. Soc.*, **97**: 3557–3559, 1975.
- [155] NIEDWOROK J., SPYCHALSKI E., Badania nad zachowaniem się niektórych enzymów lizosomalnych krwinek białych u królików w przebiegu doświadczalnej choroby oparzeniowej, *Acta Physiol. Polon.*, **6**: 987–994, 1972.
- [156] NORTHROP J. H., KUNITZ M., HERRIOTT R. M., *Crystalline enzymes*, Columbia University Press, New York 1948, str. 305.
- [157] OJA S. S., HEINÄMÄKI A., JOKELA H., Purification of acid proteinases from calf brain. *Acta Chem. Scand. B*, **32**: 727–732, 1978.
- [158] POOLE A. R., DINGLE J. T., BARRETT A. J., The immunocytochemical demonstration of cathepsin D, *J. Histochem. Cytochem.*, **20**: 261–265, 1972.
- [159] POOLE A. R., HEMBRY R. M., DINGLE J. T., PINDER I., RING E. F. J., COSH J., Secretion and localization of cathepsin D in synovial tissues removed from rheumatoid and traumatized joints, *Arthritis Rheum.*, **19**: 1295–1307, 1976.
- [160] PRESS E., PORTER R. R., CEBRA J., Isolation and properties of a proteolytic enzyme, cathepsin D, from bovine spleen, *Biochem. J.*, **74**: 501–514, 1960.
- [161] RAKITZIS E. T., MOLLIPOULOU T. B., Inactivation of cathepsin D by dithiophosgene and by 2,2-dichloro-1,3-dithiacyclobutanone, *Biochem. J.*, **153**: 737–739, 1976.
- [162] RANGEL H., LAPRESLE C., Etude de la spécificité sur la chaîne B de l'insuline des cathepsines D et E de lapin, *Biochim. Biophys. Acta*, **128**: 372–379, 1966.
- [163] REICH G., BUDDECKE E., Darstellung und Eigenschaften eines kathepsins aus reinderarteriengewebe, *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, **348**: 1616–1628, 1967.
- [164] REICHETT D., JACOBSON E., HASHEN R. J., Purification and properties of cathepsin D from human erythrocytes, *Biochim. Biophys. Acta*, **341**: 15–26, 1974.
- [165] REICHERT L. E., Further studies on proteinases of the rat ovary, *Endocrinology*, **71**: 838–839, 1962.
- [166] REINHARZ A., ROTH M., Studies on pituitary cathepsin D with artificial substrates, *Enzyme*, **12**: 458–466, 1971.
- [167] RICH D. H., SUN E., SINGH J., Synthesis of dideoxy-pepstatin. Mechanism of inhibition of porcine pepsin, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **74**: 762–767, 1977.
- [168] ROJAS-ESPINOSA O., DANNENBERG A. M. J., MURPHY P. A., STRAAT P. A., HUANG P. C., JAMES S. P., Purification and properties of the cathepsin D type proteinase from beef and rabbit lung and its identification in macrophages, *Infect. Immunity*, **8**: 1000–1008, 1973.
- [169] ROJAS-ESPINOSA O., DANNENBERG A. M., STERNBERGER L. A., TSUDA T., The role of cathepsin D in the pathogenesis of tuberculosis, *Am. J. Pathol.*, **74**: 1–12, 1974.

- [170] ROTH J. S., LOSTY T., WIERBICKI E., Assay of proteolytic enzyme activity using a ^{14}C -labeled hemoglobin, *Anal. Biochem.*, **42**: 214–221, 1971.
- [171] RUPOVÁ L., KEILOVÁ H., TOMÁŠEK V., Chemical characterization of cathepsin D inhibitor from potatoes, *Collection Czechoslov. Chem. Commun.*, **42**: 2279–2286, 1977.
- [172] SAPOLSKY A. I., ALTMAN R. D., HOWELL D. S., Cathepsin D activity in normal and osteoarthritic human cartilage, *Fed. Proc.*, **32**: 1489–1493, 1973.
- [173] SAPOLSKY A. I., HOWELL D. S., WOESSNER J. F. Jr., Neutral proteases and cathepsin D in human articular cartilage, *J. Clin. Invest.*, **53**: 1044–1053, 1974.
- [174] SAPOLSKY A. I., WOESSNER J. F. Jr., Multiple forms of cathepsin D from bovine uterus, *J. Biol. Chem.*, **247**: 2069–2076, 1972.
- [175] SCHWABE C., A fluorescent assay for proteolytic enzymes, *Anal. Biochem.*, **53**: 484–490, 1973.
- [176] SCHWABE C., KALNITSKY G., Proteolytic activity in bovine dental pulp, *Arch. Biochem. Biophys.*, **109**: 68–75, 1965.
- [177] — A peptidohydrolase from mammalian fibroblasts (bovine dental pulp), *Biochemistry*, **5**: 158–168, 1966.
- [178] SCHWABE C., SWEENEY S. C., The specificity of a bovine fibroblast cathepsin D. I. Action on the S-sulfo derivatives of the insulin A and B chains and of porcine glucagon, *Biochim. Biophys. Acta*, **284**: 465–472, 1972.
- [179] SCHWARTZ W. N., BIRD J. W. C., Degradation of myofibrillar proteins by cathepsins B and D, *Biochem. J.*, **167**: 811–820, 1977.
- [180] SCOTT P. G., PEDERSON C. H., Cathepsin D: cleavage of soluble collagen and crosslinked peptides, *FEBS Letters*, **88**: 41–45, 1978.
- [181] SIEBERT G., SCHMITT A., TRÄXLER G., Reinigung und proteolytische spezifität eines neuen kathepsins aus dorschmilz, *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, **332**: 160–177, 1963.
- [182] SIEBERT G., SCHMITT A., MALORTIE R., Reinigung und eigenschaften von dorschmuskel-kathepsin, *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, **342**: 20–39, 1965.
- [183] SMITH G. D., MURRAY M. A., NICHOL L. W., TRIKOJUS V. M., Thyroid acid proteinase. Properties and inactivation by diazoacetyl-norleucine methyl ester. *Biochim. Biophys. Acta*, **171**: 288–298, 1969.
- [184] SMITH R., TURK V., Cathepsin D: rapid isolation by affinity chromatography on haemoglobin-agarose resin, *Eur. J. Biochem.*, **48**: 245–254, 1974.
- [185] ŠTEFANOVIČ J., FERENČIK M., BELÁN J., Inhibicia kralicieho kathepsinu D pepstatinom a antikathepsinovým serom, *Bratisl. Lek. Listy*, **62**: 513–530, 1974.
- [186] ŠTEFANOVIČ J., FERENČIK M., KOTULOVA D., MURGAŠOVÁ I., Interaction of intracellular proteases and immune mechanism, *Acta Biol. Med. Germ.*, **36**: 1955–1958, 1977.
- [187] ŠTEFANOVIČ J., FERENČIK M., MURGAŠOVÁ I., Porovnanie degradacie proteinovych antigenov serovymi a bunkovymi proteazami, *Bratisl. lek. Listy*, **58**: 167–174, 1972.
- [188] STEPANOW V. M., OREKHOVICH V. N., Deistwie inhibitora pepsina na kathepsin D byczei selezenki, *Biochimija*, **34**: 209–210, 1969.
- [189] STRAŽIŠČAR S., TURK V., Izolacija in opis kathepsina D iz poskusnega granuloma, *Zdrav. vestn.*, **42**: 579–581, 1973.
- [190] SUBRAMANIAN E., SWAN I. D. A., LIU M., DAVIES D. R., JENKINS J. A., TICKLE I. J., BLUNDELL T. L., Homology among acid proteases: Comparison

- of crystal structures et 3 Å resolution of acid proteases from *Rhizopus chinensis* and *Endothia parasitica*, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., **74**: 556–559, 1977.
- [191] SVENDSEN L. B., GULDAGER N., CHRISTENSEN L., CHRISTENSEN P. M., Effect of a pepsin-inhibitory pentapeptide upon the peptic activity and acidity of gastric secretion, Scand. J. Gastroent., **11**: 459–464, 1976.
- [192] SYLVEN B., BOIS-SVENSSON I., On the chemical pathology of interstitial fluid. I. Proteolytic activities in transplanted mouse tumors, Cancer Res., **25**: 458–468, 1965.
- [193] TAKAHASKI K., CHANG W. J., KO J. S., Specific inhibition of acid proteases from brain, kidney, skeletal muscle, and insectivorous plants by diazoacetyl-D, L-norleucine methyl ester and by pepstatin, J. Biochem., **76**: 897–899, 1974.
- [194] TAKAHASKI M., HOFMANN T., Acyl intermediates in penicillopepsin-catalysed reactions and a discussion of the mechanism of action of pepsins, Biochem. J., **147**: 549–563, 1975.
- [195] TAYLOR W. H., Proteinases of the stomach in health and disease, Physiol. Rev., **42**: 519–553, 1962.
- [196] TODD P. E. E., TRIKOJUS V. M., Purification and properties of adrenal acid proteinase, Biochim. Biophys. Acta, **45**: 234–242, 1960.
- [197] TURK V., KREGAR I., GUBENŠEK F., BABNIK J., Some characteristics of cathepsin D isolated by classical purification procedure, Biol. vestn., **23**: 107–118, 1975.
- [198] TURK V., KREGAR I., GUBENŠEK F., LAPANJE S., URH I., KOVAČIC M., Studies on bovine spleen cathepsin D, Acta Biol. Med. Germ., **36**: 1531–1535, 1977.
- [199] TURK V., KREGAR I., LEBEZ D., Molecular weight of cathepsin from different organs, Naturwissenschaften, **53**: 528–529, 1966.
- [200] TZAMOURANIS A., MATTHYS J., ISHIKAWA I., CIMASONI G., Increase of extracellular cathepsin D activity in gingival washings during experimental gingivitis, in man, Arch. oral Biol., **22**: 375–378, 1977.
- [201] UMEZAWA H., Enzyme inhibitors of microbial origin, University Park Press, Baltimore, London, Tokyo 1972, 15–52.
- [202] — Protease inhibitors produced by microorganism, Acta Biol. Med. Germ., **36**: 1899–1915, 1977.
- [203] UMEZAWA H., AOYAGI T., Activities of proteinase inhibitors of microbial origin, [w] Proteinases in Mammalian Cells and Tissues, red. A. J. Barret, North-Holland Publishing Company, Amsterdam 1977, 637–662.
- [204] UMEZAWA H., AOYAGI T., MORISHIMA H., MATSUZAKI M., HAMA-DA M., TAKEUCHI T., Pepstatin, a new pepsin inhibitor produced by Actinomycetes, J. Antibiot., **23**: 259–262, 1970.
- [205] URIEL J., A method for the direct detection of proteolytic enzymes after electrophoresis in agar gel, Nature, **188**: 853–854, 1960.
- [206] WANG T. T., HOFMANN T., Acyl and amino intermediates in reactions catalysed by pig pepsin. Analysis of transpeptidation products, Biochem. J., **153**: 691–699, 1976.
- [207] WEBB T., LAPRESLE C., Action on some synthetic peptides of a protease from rabbit spleen, Nature, **188**: 66–67, 1960.
- [208] WEBER R., On the biological function of cathepsin in tail tissue of *Xenopus larvae*, Experientia, **13**: 153–155, 1957.
- [209] WESTON P. D., A specific antiserum to lysosomal cathepsin D, Immunology, **17**: 421–428, 1969.

- [210] WESTON P. D., BARRETT A. J., DINGLE J. T., Specific inhibition of cartilage breakdown, *Nature*, **222**: 285–286, 1969.
- [211] WHITAKER J. N., SEYER J. M., Isolation and characterization of bovine brain cathepsin D, *J. Neurochem.*, **32**: 325–333, 1978.
- [212] WIEDERANDERS B., ANSORGE S., BOHLEY P., BROGHAMMER U., KIRSCHKE H., LANGNER J., Intrazellulärer proteinabbau. VI. Isolierung, eigenschaften und biologische bedeutung von kathepsin D aus der rattenleber, *Acta Biol. Med. Germ.*, **35**: 269–283, 1976.
- [213] WILDENTHAL K., MUELLER E. A., Increased myocardial cathepsin D activity during regression of thyrotoxic cardiac hypertrophy, *Nature*, **249**: 478–479, 1974.
- [214] WILDENTHAL K., POOLE A. R., DINGLE J. T., Influence of starvation on the activities and localization of cathepsin D and other lysosomal enzymes in hearts of rabbits and mice, *J. Mol. Cell. Cardiol.*, **7**: 841–855, 1975.
- [215] WILLIAMS H. R., Methyl-¹⁴C-glycinated hemoglobin as a substrate for proteases, *Biochim. Biophys. Acta*, **250**: 603–607, 1971.
- [216] WOESSNER J. F. Jr., Acid hydrolases of the rat uterus in relation to pregnancy, post-partum involutien and collagen breakdown, *Biochem. J.*, **97**: 855–867, 1965.
- [217] WOESSNER J. F., Acid hydrolases of connective tissue, [w] *International Review of Connective Tissue Research*, red. D. A. Hall, Academic Press, New York, **3**: 201–263, 1965.
- [218] — Digestion of protein-polysaccharide complex by cathepsin D, *Fed. Proc.*, **26**: 607, 1967.
- [219] — Acid cathepsins of cartilage, [w] *Cartilage: Degradation and Repair*, red. C. A. L. Bassett, Nat. Res. Council, Nat. Acad. Sci., Washington, D. C., 1967, 99–106.
- [220] WOESSNER J. F. Jr., Cathepsin D. Enzymic properties and role in connective tissue breakdown, [w] *Tissue Proteinases*, red. A. J. Barrett, J. T. Dingle, North-Holland Publishing Company, Amsterdam 1971, 291–308.
- [221] — Pepstatin inhibitors the digestion of hemaglobin and protein-polysaccharide complex by cathepsin D, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **47**: 965–970, 1972.
- [222] — Cartilage cathepsin D and its action on matrix components, *Fed. Proc.*, **32**: 1485–1488, 1973.
- [223] — Purification of cathepsin D from cartilage and uterus and its action on the protein-polysaccharide complex of cartilage, *J. Biol. Chem.*, **248**: 1634–1642, 1973.
- [224] — Specificity and biological role of cathepsin D, [w] *Acid Proteases, Structure, Function and Biology*, red. J. Tang, Plenum Press, New York 1977, 313–327.
- [225] WOESSNER J. F. Jr., SHAMBERGER R. J. Jr., Purification and properties of cathepsin D from bovine uterus, *J. Biol. Chem.*, **246**: 1951–1960, 1971.
- [226] WOROWSKI K., Inhibitory komórkowych enzymów proteolitycznych, *Postępy Biol. Kom.*, **3**: 51–74, 1976.
- [227] — Metody pomiarów aktywności proteaz tkankowych, *Diagn. Lab.*, **12**: 335–346, 1976.
- [228] — Proteoliza komórkowa i mechanizmy jej regulacji, *Postępy Biol. Kom.*, **4**: 243–278, 1977.
- [229] — Mechanizm działania enzymów proteolitycznych, *Post. Hig. Med. Dośw.*, **32**: 467–491, 1978.

- [230] — Izolowanie inhibitora katepsyny D z bulw ziemniaka, *Acta Pol. Pharm.*, **35**: 685-693, 1978.
- [231] — Specyficzność działania ziemniaczanych inhibitorów proteaz, *Acta Pol. Pharm.*, **36**: 487-490, 1979.
- [232] WÓROWSKI K., ROSZKOWSKA W., Rozpuszczalność i podatność na proteolizę natywnej i zdenaturowanej hemoglobiny i kazeiny, *Acta Polon. Pharmac.*, **36**: 721-724, 1979.
- [233] WROGEMANN K., JACOBSON B. E., BLANCHER M. C., Nucleic acid and lysosomal hydrolases in the skeletal muscle of BIO 14.6 dystrophic hamster, *Enzyme*, **12**: 322-328, 1971.
- [234] ZABŁOCKI B., ZABŁOCKA E., Lizosomy i ich znaczenie w immunologii, *Post. Hig. Med. Dośw.*, **25**: 531-545, 1971.
- [235] YAGO N., BOWERS W. E., Unique cathepsin D-type proteases in rat thoracic duct lymphocytes and in rat lymphoid tissues, *J. Biol. Chem.*, **250**: 4749-4754, 1975.

INFORMACJE DLA AUTORÓW

POSTĘPY BIOLOGII KOMÓRKI drukują artykuły przeglądowe, omawiające najnowsze osiągnięcia w dziedzinie biologii komórki, nie publikowane dotąd w innych wydawnictwach. Autorzy odpowiadają za ścisłość podawanych informacji. Obowiązuje terminologia zgodna z polskim mianownictwem histologicznym, anatomicznym i embriologicznym.

Artykuły drukowane w POSTĘPACH BIOLOGII KOMÓRKI nie mogą być bez zgody Redakcji publikowane w innych periodykach.

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

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

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

Przykłady cytowania literatury:

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

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

Redakcja zastrzega sobie prawo dokonywania skrótów.

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

Artykuły honorowane są według ustalonych stawek, autorzy otrzymują 25 nadbitek bezpłatnie.

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 I półrocze roku następnego i na cały rok następny,
- do dnia 10 czerwca na II półrocze roku bieżącego.

Jednostki gospodarki uspołecznionej, instytucje, organizacje i wszelkiego rodzaju zakłady pracy zamawiają prenumeratę w miejscowych Oddziałach RSW „Prasa-Książka-Ruch”, w miejscowościach zaś, w których nie ma Oddziałów RSW — w urzędach pocztowych.

Czytelnicy indywidualni opłacają prenumeratę wyłącznie w urzędach pocztowych i u doręczycieli.

Prenumeratę za zleceniem wysyłki za granicę przyjmuje RSW „Prasa-Książka-Ruch”, Centrala Kolportażu Prasy i Wydawnictw, ul. Towarowa 28, 00-958 Warszawa; konto NBP XV, Oddział w Warszawie, Nr 1153-201045-139-11, w terminach podanych dla prenumeraty krajowej.

Prenumerata ze zleceniem wysyłki za granicę jest droższa od prenumeraty krajowej o 50% dla zleceniodawców indywidualnych i o 100% dla instytucji i zakładów pracy.

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, 00-068 Warszawa, 7 Krakowskie Przedmieście, P. O. Box 1001, POLAND.

Payments are to be sent to the account of Ars Polona in Bank Handlowy S. A., 7 Traugutt Street, 00-067 Warszawa, POLAND.

SPIS TREŚCI

A. JASIŃSKI, Ewolucja pojęcia neurosekrecji	53
D. KILCZEWSKA i R. FARBISZEWSKI, Biogeneza i degradacja glikoproteidów błon plazmatycznych eukariotów	69
M. JANIĄK i S. SZMIGIELSKI, Wpływ hipertermii na czynność i metabolizm komórek prawidłowych i nowotworowych	87
K. WOROWSKI i H. OSTROWSKA, Katepsyna D	119