

PL ISSN 0324-833X

**POLSKIE
TOWARZYSTWO
ANATOMICZNE**

TOM 7-NR 3
1980 (149-232)

Postępy Biologii Komórki

<http://rcin.org.pl> **PWN-WARSZAWA**

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. 7. Ark. druk. 5,25 + 1/8 wkł. Papier druk. sat. III kl., 80 g,
70 × 100 cm. Oddano do składania w maju 1980 r. Podpisano do druku w sierpniu 1980 r.
Druk ukończono w sierpniu 1980 r. Zam. 2237/80 — Cena zł 20.—

Wrocławska Drukarnia Naukowa, Wrocław, ul. Lelewela 4

WYMIANY SIOSTRZANYCH CHROMATYD — MECHANIZMY I ZASTOSOWANIE

SISTER CHROMATID-EXCHANGES — THE MECHANISMS AND APPLICATION

Henryk HÜBNER i Zygmunt POJDA

Zakład Biologii, Instytut Biologiczno-Morfologiczny,
Wojskowa Akademia Medyczna, Łódź

Streszczenie. Omówiono ogólne wyniki badań oraz postulowane mechanizmy powstawania wymian siostrzanych chromatyd. Mechanizmy powstawania wymian rozpatrywano na poziomie molekularnym, subchromatydowym (fibrylarnym) i chromatydowym. Przedstawiono wyniki badań nad zastosowaniem wymian siostrzanych chromatyd jako testu oceny mutagenów fizycznych, chemicznych i wpływu wirusów na materiał genetyczny. Omówiono także zmiany w częstości występowania wymian związane z niektórymi zespołami chorobowymi.

Summary. This paper presents the results of investigations and the proposed mechanisms for forming sister chromatid exchanges (SCE). These mechanisms have been discussed on molecular, subchromatid and chromatid level. The results demonstrating the use of SCE as the test for physical and chemical mutagens estimation and the influence of viruses on genetic material have been given. Changes in frequency of SCE connected with the some pathologic syndromes are also discussed.

WSTĘP

Wymiany siostrzanych chromatyd (sister chromatid exchange — SCE) zachodzą w obrębie jednego chromosomu, różnią się więc zasadniczo od zjawiska crossing-over, dotyczącego chromatyd chromosomów homologicznych. Obserwowane w okresie I profazy mejozy chiazmy dowodzą trwania w trakcie podziału tego typu wymiany materiału genetycznego, gdy tymczasem SCE zachodzą w okresie poprzedzającym podział mitotyczny. Te łatwo dostrzegalne różnice cytologiczne mogą dowodzić, że oba typy wymiany materiału genetycznego są zupełnie różnymi procesami, lecz nie można również wykluczyć, że istnieją podobieństwa na poziomie molekularnych mechanizmów wymian. Nie

rozwiązane problemy, które dotyczą pozornych podobieństw (lub pozornych różnic), przyczyn, mechanizmów na poziomie molekularnym, fibrylarnym (subchromatydowym) i chromatydowym oraz skutków — poza znanym dla mejozy zjawiskiem rekombinacji genetycznej — między obu typami wymian materiału genetycznego, spowodowały, że badania nad zjawiskiem SCE są w ostatnich latach szeroko rozwijane [17, 34, 92, 113, 126, 127, 150, 173, 174]. Zainteresowanie badaczy SCE wiąże się również z tym, że proces ten, występujący jako normalne zjawisko u wszystkich dotychczas przebadanych gatunków *Eukaryota*, znalazł dość szerokie praktyczne zastosowanie, przede wszystkim jako test pozwalający na ocenę związków chemicznych podejrzanych o właściwości mutagenne.

GENOM A CZĘSTOŚĆ WYSTĘPOWANIA SCE

Proces SCE zachodzi w komórkach somatycznych *in vivo* i *in vitro*. Był on badany u różnych przedstawicieli *Eukaryota*. Poza człowiekiem [9, 32, 33, 47, 48, 50, 68, 75, 81 - 83, 114, 159, 174] wymiany były analizowane u owadów [103, 117, 162], ryb [73], ptaków [15, 99], ssaków [16, 29, 112, 128, 148] i roślin [70, 71, 133]. Ponieważ genomy poszczególnych badanych gatunków różnią się liczbą i wymiarami chromosomów, podjęto próbę znalezienia korelacji między genomem a częstością występowania SCE.

TABELA

Częstość występowania SCE w chromosomach zwierząt
(wg [112])

| Gatunek | 2n | SCE/komórkę |
|---------------------------|----|-------------|
| <i>Muntiacus muntiac</i> | 7 | 8,8 |
| <i>Cricetulus griseus</i> | 22 | 8,6 |
| <i>Felix nigripes</i> | 38 | 9,4 |
| <i>Mus musculus</i> | 40 | 9,8 |
| <i>Homo sapiens</i> | 46 | 9,3 |
| <i>Bos taurus</i> | 60 | 7,8 |
| <i>Rangifer tarandus</i> | 70 | 9,2 |

U ssaków w jednolitych warunkach hodowli komórkowych występują zbliżone częstości wymian (tabela), jednakże stwierdzono rozbieżności między różnymi szczepami tego samego gatunku [76]. Wydaje się, że niemożność sformułowania wiążącego wniosku wypływa ze zbyt małej ilości przeprowadzonych badań porównawczych oraz ze stosowania różnych metod badawczych.

U człowieka badania nad omawianym zjawiskiem SCE, przeprowadzone na różnych typach hodowanych komórek, wykazały, że istnieją

wyraźne różnice częstości występowania wymian. Niektórzy autorzy [87, 119, 145] uważają, że dotyczy to również limfocytów krwi obwodowej, wśród których pewna — bliżej nie scharakteryzowana — frakcja ma szczególnie dużo wymian.

MECHANIZM ZRÓŻNICOWANEGO WYBARWIANIA SIOSTRZANYCH CHROMATYD

Okres intensywnych badań nad SCE rozpoczął się po stwierdzeniu przez Zakharova i Egolinę [173], że po hodowaniu komórek w płynie odżywczym wzbogaconym o analog tymidyny 5-bromodezoksyurydynam (BrdU), chromatydy mające wbudowaną BrdU w obie nici DNA (chromatydy B - B) wiążą mniej barwnika Giemsy w porównaniu z chromatydami mającymi BrdU tylko w jednej nici (chromatydy T - B). Podobny efekt daje użycie 5-jododezoksyurydynam (IdU) [57] lub 5-bromodezoksyocytidynam (BrdC) [28]. Wykazano, że zróżnicowane wybarwienie siostrzanych chromatyd można także uzyskać barwiąc chromosomy oranżem akrydynowym [36, 37, 63, 130] lub DAPI [88, 89]. Udoskonaleniem metody badania SCE było wprowadzenie przez Latta [81 - 83] jako barwnika fluorochromu 33258 Hoechst. Badania nad zależnościami między tym fluorochromem a SCE zostały przeprowadzone przez Stetkę i Carrano [144]. Stwierdzili oni zależność częstości występowania SCE od stosunku liczby cząsteczek fluorochromu do liczby par zasad DNA oraz od podobnego stosunku odnoszącego się do BrdU. W hodowli komórek chomika efekt nasycenia występował powyżej stosunków:

$$\frac{\text{liczba cząsteczek 33258 Hoechst}}{\text{liczba par zasad DNA}} = 2$$

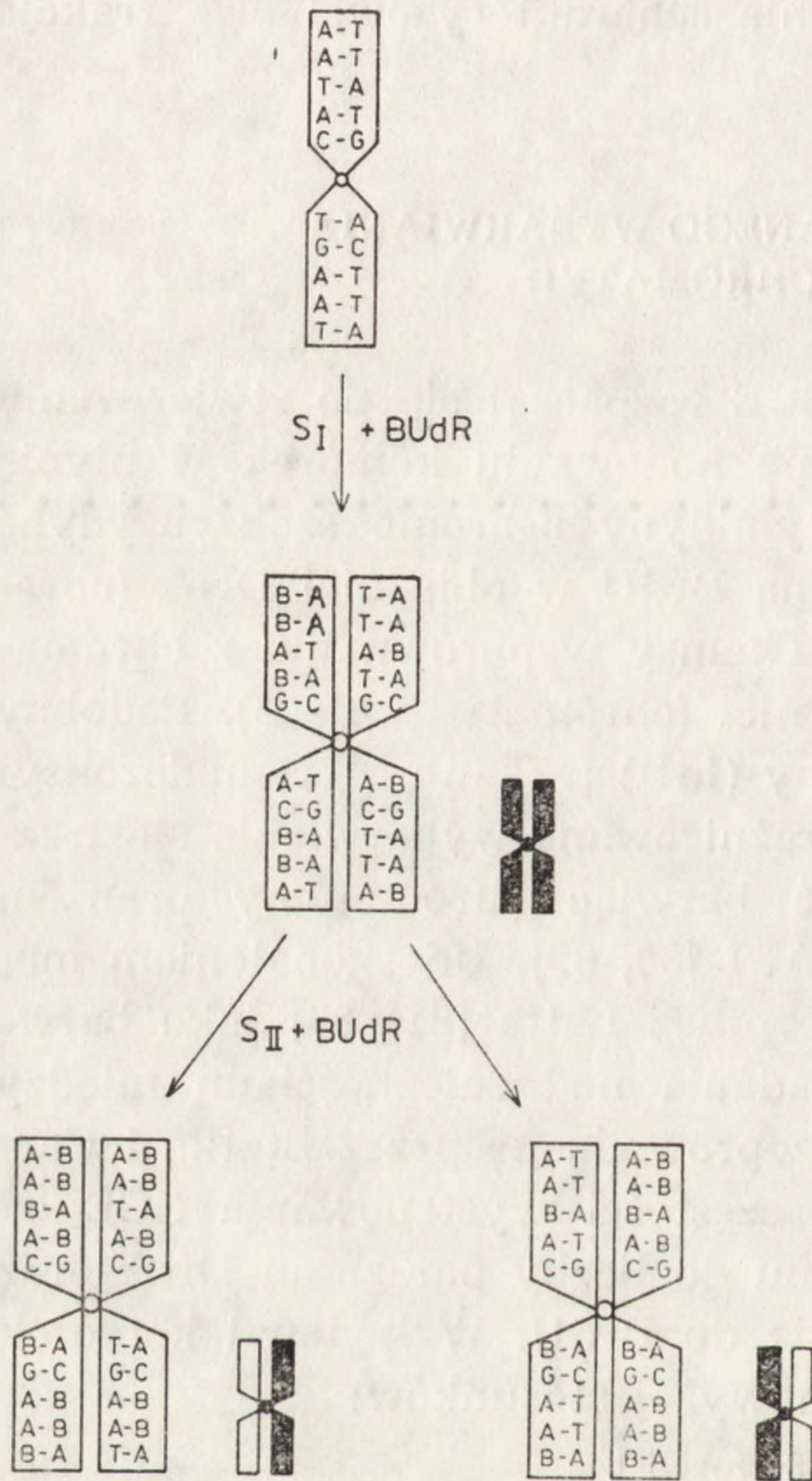
oraz

$$\frac{\text{liczba cząsteczek BrdU}}{\text{liczba par zasad DNA}} = 6.$$

Fluorochrom 33258 Hoechst działa synergistycznie z BrdU w indukowaniu SCE, przy czym efekt tego działania okazał się wyższy od efektu addytywnego. Fluorescencja tego związku jest wygaszana przez chromatydy B - B przy równoczesnym intensywnym świeceniu chromatyd T - B. Metoda zróżnicowanego wybarwienia siostrzanych chromatyd została następnie rozwinięta [114] w kierunku uzyskania trwałych preparatów, co okazało się możliwe po podwójnym barwieniu chromosomów: wstępnym — fluorochromem 33258 Hoechst i końcowym — barwnikiem Giemsy.

Do tej pory opracowano szereg dalszych metod zróżnicowanego wybarwienia chromatyd T - B i B - B [49, 50, 75, 96, 148, 161, 163]. Znane

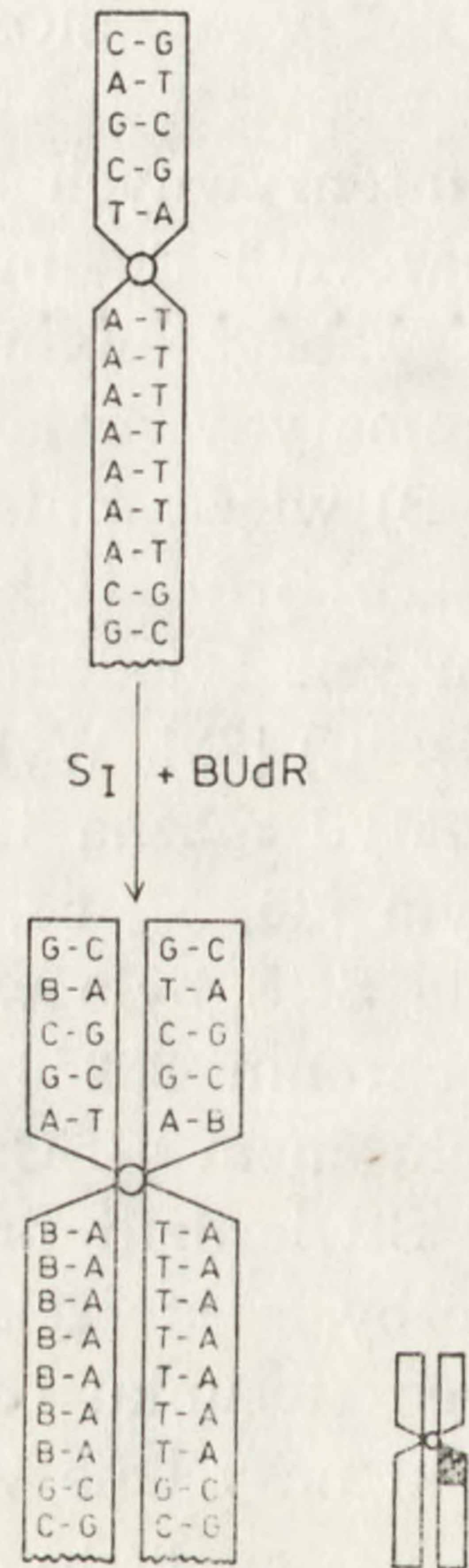
są również sposoby otrzymywania na tych samych preparatach SCE i wzorów prążków Q [78, 82, 83, 172] oraz G [111, 161, 165].



Ryc. 1. Powstawanie chromatyd T - B i B - B oraz ich wybarwienie roztworem Giemsy

Chromatyd T - B wiążące więcej barwnika są na schemacie zaczernione. S_I i S_{II} — kolejne cykle replikacyjne w obecności BUdR

Badanie SCE opiera się na modelu semikonserwatywnej replikacji DNA. Komórki zwierzęce lub ludzkie hoduje się w płynie zawierającym dodatek BrdU (IdU lub BrdC) przez 2 cykle replikacyjne (ryc. 1). W pierwszym z nich komórki wbudowują najczęściej używaną do doświadczeń BrdU do jednej, a w drugim do drugiej nici podwójnego łańcucha DNA. Wobec tego w mitozie po pierwszym cyklu replikacyjnym obie chromatyd są typu T - B i posiadają jednakową zdolność wiązania barwnika. Wymiany, które zachodziły w tym cyklu replikacyjnym, nie będą więc widoczne w metafazach I pokolenia komórkowego.



Ryc. 2. Nagromadzenie par A - T w pobliżu centromeru powoduje, że już po pierwszym cyklu replikacyjnym segment T - A wiąże znacznie więcej barwnika niż pozostałe części chromosomu z większym lub mniejszym nagromadzeniem par B - A

W mitozie po drugim cyklu replikacyjnym jedna chromatyda będzie typu T - B, a druga B - B, a tym samym ocena SCE staje się możliwa. Liczba obserwowanych wymian w komórkach II pokolenia jest wypadkową ich częstości po pierwszym i drugim cyklu replikacyjnym.

Analizę częstości występowania SCE przeprowadza się na chromosomach metafazowych. Po 2 cyklach zróżnicowane wybarwienie siostrzanych chromatyd jest widoczne we wszystkich chromosomach i na całej ich długości. Jeżeli hodowla w obecności BrdU trwa dalej, a komórki dzielą się po raz trzeci, to na skutek mitotycznej segregacji chromosomów zróżnicowane wybarwienie siostrzanych chromatyd nie obejmuje już wszystkich chromosomów metafazowych komórki III pokolenia, a ponadto w tych, w których ono występuje, odcinki chromatyd T - B mają różną długość, co jest wynikiem wymian w II pokoleniu.

W chromosomach roślinnych lepsze zróżnicowane wybarwienie siostrzanych chromatyd uzyskuje się po inkubacji komórek w środowisku zawierającym BrdU tylko przez 1 cykl replikacyjny. Ten sposób postępowania jest analogiczny do metody wbudowywania do DNA ^3H -tymidyny.

Jeżeli chromosomy badanego gatunku posiadają regiony szczególnie bogate w pary A - T, to efekt zróżnicowanego wybarwienia siostrzanych chromatyd może być widoczny już po jednym cyklu replikacyjnym zachodzącym przy obecności BUdR w środowisku [87]. W tym przypadku powstaje zjawisko niesymetrycznego wybarwiania się chromatyd siostrzanych, co zostało przedstawione na ryc. 2.

Minimalne stężenie BUdR, umożliwiające fluorescencyjną identyfikację tych chromosomów, które w jej obecności przeszły dwukrotnie przez cykl replikacyjny, wynosi około $3 \mu\text{M/ml}$ hodowli. Uzyskanie efektu zróżnicowanego wybarwienia siostrzanych chromatyd, w celu uwidocznienia SCE, wymaga obecności około $6 \mu\text{M/ml}$. Wzrost stężenia BUdR $6 - 24 \mu\text{M/ml}$ hodowli zwiększa częstość wymian o 20%, a dalszy zwiększenia $24 - 94 \mu\text{M/ml}$ — ponad dwukrotną indukcję wymian. Ilość wbudowanej do DNA ^3H -BUdR jest w chromosomach komórek po 2 cyklach replikacyjnych 1,5 raza wyższa niż po pierwszej replikacji. Jest to dalsze potwierdzenie semikonserwatywnego sposobu replikacji DNA [84].

Wykazano [31], że hodowle limfocytów w płynie odżywczym wzbogaconym o BUdR trwające 2 doby wykazują wyższy indeks mitotyczny [4, 55] niż hodowle 3-dobowe [2, 95]. To statystycznie istotne obniżenie indeksu mitotycznego wydaje się być następstwem toksycznego działania BUdR. Ważne jest zatem określenie dawki BUdR, której obecność w płynie hodowlanym pozwoli na uzyskanie efektu zróżnicowanego wybarwienia siostrzanych chromatyd, jednocześnie nie wpływając na istotne zwiększenie częstości występowania SCE. Zakres stosowanego „bezpie-

cznego" stężenia BrdU waha się od 10 do 60 $\mu\text{M}/\text{ml}$ hodowli ludzkich limfocytów [118].

Na częstość występowania SCE mają stymulujący wpływ promienie światła widzialnego [57, 58], w związku z czym hodowla komórkowa powinna być prowadzona w pełnej ciemności. Wykazano, że chromatydy B-B są dwukrotnie bardziej wrażliwe na światło niż chromatydy T-B [58]. W hodowlach tkankowych na częstość występowania SCE mają również wpływ inne czynniki. Kato [67] wykazał, że najwyższy poziom SCE obserwuje się w hodowlach z dodatkiem nieinaktywowanej surowicy, niższy jeżeli była ona dializowana, a najniższy z surowicą inaktywowaną termicznie. Ten sam autor podkreśla również zależności częstości SCE od stężenia surowicy w pożywce, przy czym produkty różnych firm wywierają efekt odmienny. Na podstawie tych badań można sądzić, że surowica zawiera czynnik (czynniki?) indukujący SCE, z których część zostaje usunięta poprzez ogrzewanie lub dializę. W chromosomach fibroblastów *in vitro* liczba SCE jest niższa na początku i wzrasta wraz z czasem trwania hodowli [64].

Kato [69] badał wpływ zmiany temperatury (w zakresie 31° - 42°C) na częstość występowania SCE. Liczba wymian na hodowaną komórkę chomika chińskiego wynosiła: 2,5, 4,5 i 14 (odpowiednio w temperaturach 31° , 37° i 42°C). Liczba wymian zwiększa się jedynie wówczas, gdy szok termiczny stosowano w okresie fazy S.

MOLEKULARNE MECHANIZMY POWSTAWANIA SCE

Mechanizm powstawania SCE może być rozpatrywany na kilku poziomach, a mianowicie: molekularnym, fibrylarnym i chromatydowym. Molekularny mechanizm SCE nie jest do tej pory wyjaśniony. Wyniki badań dowodzące, że można je indukować mutagenami sugerują związek SCE z enzymatycznymi procesami naprawy DNA.

Proponowany przez Shafera i wsp. [135] model mechanizmu powstawania SCE zakłada, że wymiany są morfologicznym odbiciem zjawisk zachodzących podczas replikacji DNA dla ominięcia jego nie naprawionych krzyżowych połączeń. Zgodnie z propozycją autorów, dwukierunkowa replikacja omijałaby miejsca uszkodzeń przez wycięcie obu przeciwległych segmentów nici macierzystej po stronach 5' krzyżowego połączenia i na powtórny ich połączeniu w potomnym podwójnym łańcuchu przez powiązanie przyległych końców lub przez komplementację podwójnego łańcucha DNA powstałego z dwóch różnych cząstek wyjściowych.

Mechanizm ten pozwala na kontynuowanie replikacji przed naprawą

krzyżowego połączenia, jednakże w konsekwencji wymienione zostają macierzyste nici DNA różniące się obecnością BUdR.

Na podstawie przedstawionego założenia oraz znajomości natężenia syntezy DNA zachodzącej w określonym etapie fazy S przewidziano, że różne mutageny, jak mitomycyna C lub promieniowanie UV, powinny dawać specyficzne typy indukcji SCE. Teoretycznie bowiem jedynie krzyżowe połączenia (powstałe spontanicznie lub indukowane przez mutagen) w odcinku DNA przed jego replikacją prowadzi będą do powstania SCE. Zakładając, że mitomycyna C prowadzi do powstania trwałych krzyżowych połączeń, podawanie jej w sposób pulsacyjny komórkom znajdującym się w fazie G1 powinno wywołać maksymalny wzrost liczby wymian. Takie samo podawanie tego antybiotyku w fazie S powinno prowadzić do stopniowego obniżania się liczby SCE, a jego podawanie w fazie G2 nie powinno zmieniać częstości SCE. W badaniach przeprowadzonych na hodowanych ludzkich limfocytach Shafer i wsp. [135] potwierdzili doświadczalnie te przewidywania. Wykreślona krzywa częstości występowania SCE ma kształt odwróconego wykresu syntezy DNA. Jeżeli z kolei założyć, że uszkodzenia DNA powstałe pod wpływem promieni UV są mniej trwałe lub szybciej naprawiane, to wykres częstości SCE po działaniu promieni UV powinien wyprzedzać krzywą uzyskaną po zadziałaniu mitomycyny C. Wyniki doświadczeń wykazały, że częstość SCE stosunkowo szybko zwiększała się po działaniu promieniowania UV na komórki znajdujące się w fazie G1 i we wczesnej fazie S, osiągnęła szczyt w środku fazy S i szybko opadała w jej końcowym etapie. Wyniki tych doświadczeń stanowią bezpośredni dowód, świadczący o istnieniu związku między SCE a mechanizmem replikacji DNA. Wiadomo, że ilość SCE podwaja się, jeżeli na hodowlę komórkową działa się światłem dziennym mogącym powodować fotolizę DNA zawierającego BUdR [163].

Jeżeli do utworzenia SCE wystarczy przerwa w jednym z dwu łańcuchów podwójnej spirali DNA, to naświetlając komórki z chromosomami mającymi 1 lub 3 łańcuchy DNA z wbudowaną BUdR powinno się otrzymać różną częstość SCE. Przypuszczenie to byłoby słuszne wówczas, gdyby naprawa poreplikacyjna była mechanizmem warunkującym powstawanie SCE.

Badania, które miały na celu potwierdzenie hipotezy, w myśl której mechanizm powstawania SCE byłby powiązany z poreplikacyjną naprawą DNA, zostały przeprowadzone przez Kato [62, 65]. Do hodowli użył on linii komórkowej posiadającej enzym umożliwiający fotoreaktywację. Komórki naświetlano promieniami UV, a następnie jedną ich część hodowano w ciemności, a drugą — z dostępem światła. Wymiany siostrzanych chromatyd badano metodą autoradiograficzną. Autor stwierdził wyższy poziom SCE w komórkach hodowanych w ciemnościach,

a niższy w warunkach dostępu światła. Dowodzi to, że powstałe dimery pirymidynowe są eliminowane przez proces fotoreaktywacji. Na podstawie tych badań Kato wnioskuje, że tworzenie się SCE po zadziaaniu promieni UV na komórki zależy od poreplikacyjnej naprawy DNA.

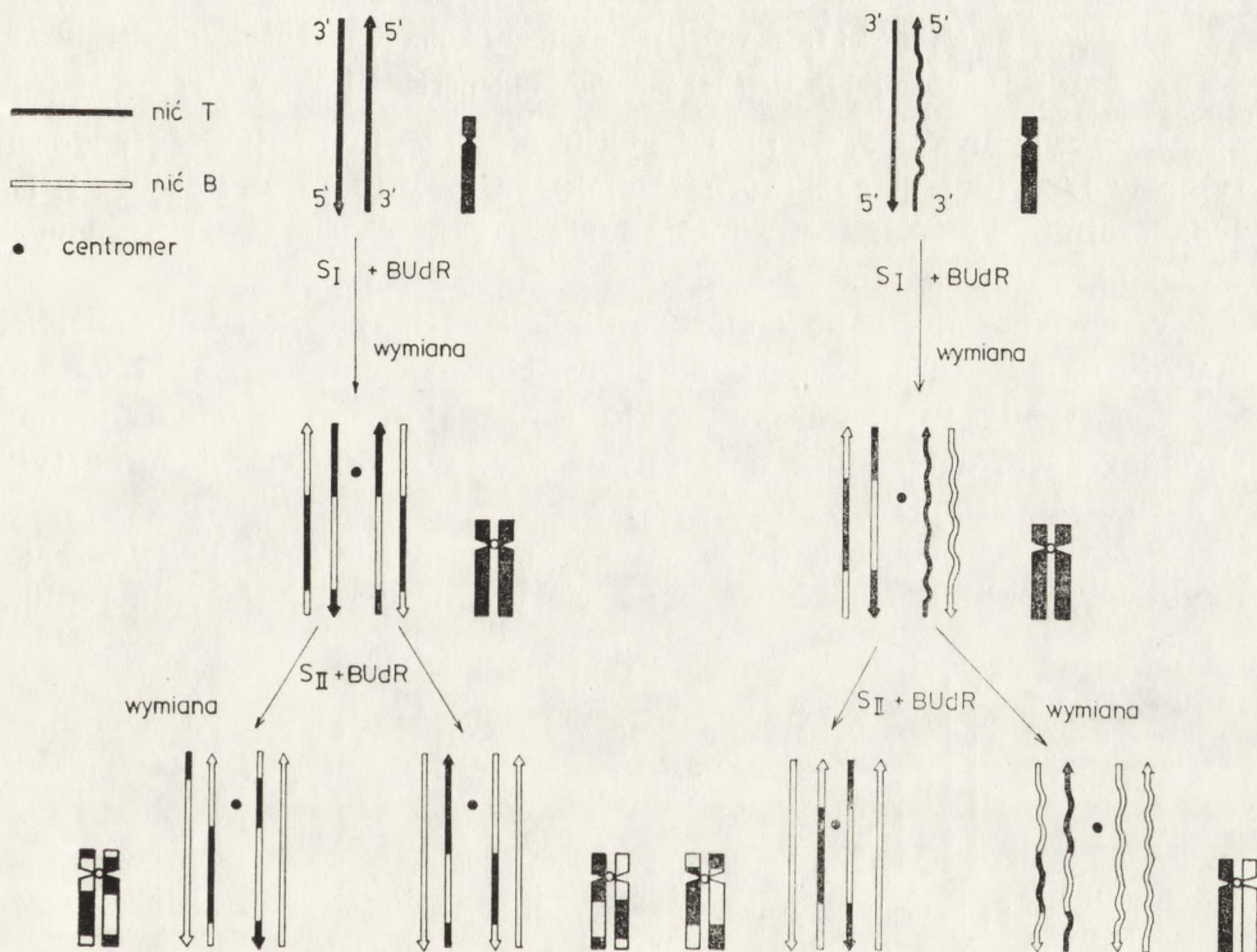
Naprawa poreplikacyjna była pierwszym z mechanizmów doświadczalnie badanych przez Kato [65]. Drugi z mechanizmów może polegać na możliwości powstawania SCE w trakcie replikacji DNA, w widełkach punktów replikacyjnych. Przy założeniu, że wymiany są następstwem procesu poreplikacyjnej naprawy DNA, należy oczekiwać, że w trakcie odpowiednich doświadczeń powinien uwidocznić się wpływ kofeiny hamującej ten proces. Przeprowadzone badania nie wykazały większych różnic w częstości SCE między chromosomami metafazowymi z jedną chromatydą A - B, a drugą A - T oraz chromosomami o chromatydach B - B i A - B. Po kofeinie stwierdzono znaczną redukcję liczby SCE w chromosomach o chromatydach A - B i A - T oraz zwiększenie w chromosomach i chromatydach B - B i A - B. Na podstawie tych doświadczeń Kato [65] uważa, że za SCE odpowiedzialne są 2 mechanizmy: zasadniczy, zachodzący w punktach replikacji DNA, i dodatkowy — w czasie naprawy poreplikacyjnej.

Naświetlanie komórek promieniami UV powoduje wzrost częstości SCE. Jeżeli jednak naświetlone komórki hoduje się w obecności kofeiny, to częstość wymian spada. Zauważono, że po zadziaaniu obu wymienionych czynników wzrasta silnie liczba delecji chromatydowych. Wyniki tych badań także sugerują związek SCE z mechanizmem poreplikacyjnej naprawy DNA. W tych samych badaniach wykazano, że promienie UV silniej niż promienie X indukują wymiany chromatyd. Częstość SCE pozostaje podwyższona jeszcze po kilku dniach po jednorazowym zadziaaniu promieni UV [61].

Problemem obniżania częstości występowania SCE przez kofeinę zajmowali się również Vogel i Bauknecht [158]. Autorzy ci stwierdzili, że kofeina nie hamuje procesu powstawania SCE. Zaobserwowany spadek częstości występowania wymian w chromosomach komórek poddanych działaniu promieni UV lub traziqonu (oraz jednocześnie kofeiny) autorzy tłumaczą wybiórczym rozpadem płytek metafazowych bardziej uszkodzonych i mających jednocześnie najwięcej SCE.

Wolff i wsp. [166] przeprowadzili badania na komórkach ludzkich pochodzących z biopsji skóry pobranej od dawców zdrowych oraz od różnych chorych z rozpoznaniem galaktozemii, zespołu Lesh-Nyhana lub Xeroderma pigmentosum. W komórkach pobranych od chorych z tym ostatnim zespołem zdolność naprawy DNA przez wycinanie wahała się od 0 do 33 - 50% w porównaniu z normą. Badania wykazały, że częstość występowania SCE była w komórkach z defektem naprawy przez wyci-

nanie taka sama, jak w normie. Z danych tych wynika, że mechanizm powstawania wymian nie daje się wytłumaczyć jedynie prostym zaburzeniem enzymatycznej naprawy DNA (z grupy dotychczas poznanych procesów enzymatycznych).



Ryc. 3. SCE zachodząca w czasie I cyklu replikacyjnego jest widoczna dopiero po II replikacji. Wymiana zachodząca w czasie II cyklu replikacyjnego jest widoczna w najbliższej mitozie. Wymiana, która nastąpiła w I cyklu replikacyjnym jest widoczna w obu chromosomach metafazowych po II cyklu replikacyjnym, a SCE mająca miejsce w II cyklu replikacyjnym jest widoczna tylko w tejże komórce

Ryc. 4. Przy niespolaryzowanym łączeniu się łańcuchów DNA (3' - 5' z 5' - 3') wymiana byłaby widoczna tylko w połowie komórek drugiego pokolenia. Wymiany, które zachodzą w II cyklu replikacyjnym nie są przy omawianym typie wymiany widoczne w metafazie

Do molekularnych mechanizmów związanych z powstawaniem SCE należy także sposób łączenia się poszczególnych nici odcinka DNA po ich wymianie. Łączące się z tym zjawisko polaryzacji nici DNA polega na zachowaniu tego samego położenia obu nici w chromatydzie (ryc. 3). Jeżeli w trakcie wymiany zachowana jest polaryzacja nici DNA, to SCE

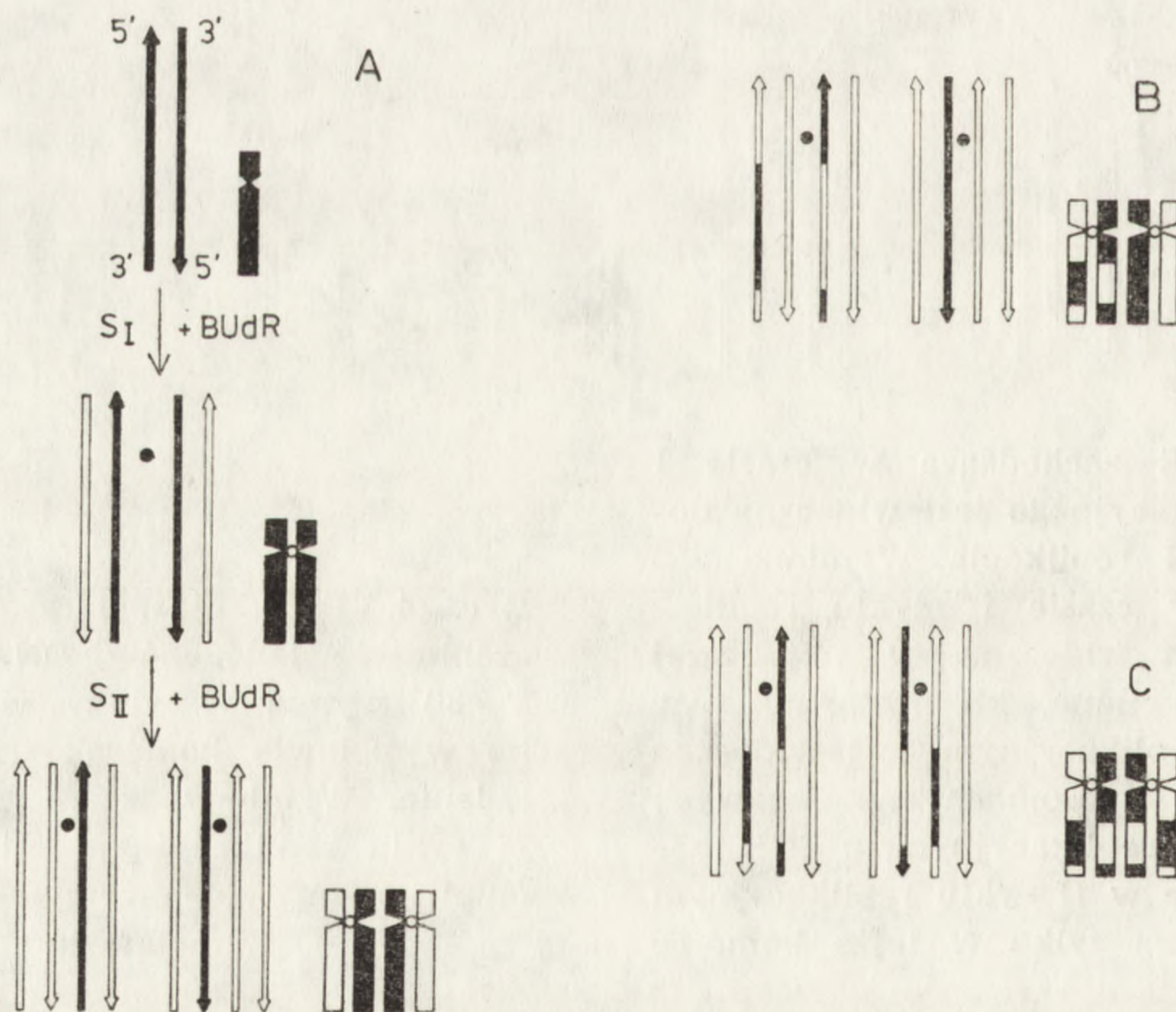
następujące w I pokoleniu komórek byłyby widoczne w ich II pokoleniu. Przy łączeniu się w sposób niespolaryzowany, wymiany te byłyby niewidoczne lub widoczne w połowie komórek II pokolenia (ryc. 4). Jeżeli chromatydy łączyłyby się w sposób spolaryzowany, to teoretycznie obliczone częstości występowania SCE byłyby następujące:

$$\frac{\text{częstości SCE w I i II pokoleniu komórek}}{\text{częstość SCE w III pokoleniu komórek}} = \frac{2}{1}$$

Ze względu na to, że po III cyklu replikacyjnym SCE są widoczne tylko w 1/2 długości genomu, stosunek ten przyjmuje wartość 4 : 1. Doświadczalnie wykazano stosunek 4,05 : 1 [152], co dowodzi spolaryzowanego łączenia się nici DNA.

W chromosomach po endoreduplikacji później syntetyzowane chromatydy układają się zewnątrz do osi chromosomu (ryc. 5). Wymiany, które nastąpiły w pierwszym cyklu replikacyjnym, są widoczne na 4 chromatydach, a te, które nastąpiły w drugim cyklu są widoczne tylko w 2 chromatydach [165].

Przytoczone obserwacje dowodzą, że liczba SCE II pokolenia komórkowego jest sumą odbywających się wymian w I i II cyklu replika-



Ryc. 5. A — W komórkach z endoreduplikacją w metafazie nowo zsyntetyzowane chromatydy (typu B-B) układają się po zewnętrznej stronie. B — Jeżeli w komórkach z endoreduplikacją SCE ma miejsce w trakcie II cyklu replikacyjnego, w najbliższej metafazie obserwuje się wymianę pojedynczą. C — Wymianę bliźniaczą obserwuje się, jeżeli SCE zachodzi w I cyklu replikacyjnym

cyjnym. Jest to również pośredni dowód na spolaryzowane łączenie się nici DNA. Bezpośrednie dowody na powstawanie SCE w I pokoleniu komórkowym uzyskano dzięki obserwacji chromosomów pochodzących z metafaz komórek nowotworu myszy po jednym cyklu replikacji w obecności BUdR [87]. Chromosomy te mają postać chromosomów metacentrycznych, powstałych przez połączenie akrocentrycznych chromosomów

mysich w centromerze. Okolice centromerów chromosomów myszy wykazują kontrastowe zabarwienie siostrzanych chromatyd już po jednym cyklu replikacyjnym w obecności BUdR. Spowodowane jest to asymetryczną lokalizacją par A - T w DNA tej okolicy. Skutkiem tego zjawiska jest asymetria lokalizacji wbudowanej BUdR, a w efekcie ostatecznym — kontrastowe zabarwienie siostrzanych chromatyd. Badane chromosomy linii RAG, mające 2 symetryczne w stosunku do centromeru okolice kontrastowo barwiące się po I cyklu replikacyjnym, umożliwiły obserwację zachodzących w tym cyklu SCE [87]. Asymetria lokalizacji par A - T, charakterystyczna dla niektórych okolic zawierających frakcje satelitarnego DNA, obserwowana była również w chromosomie Y człowieka, jednak kontrast chromatyd był w tym przypadku znacznie mniejszy niż w chromosomach myszy. Niewykluczone, że jest to efekt mniejszej długości odcinków DNA, jednorodnych pod względem lokalizacji par A - T, albo bardziej równomiernego rozkładu par A - T w stosunku do obu nici spirali DNA.



Ryc. 6. Schemat przedstawia konsekwencję wymiany odcinków DNA o różnej długości

Jeżeli wymianie ulegają bardzo długie odcinki DNA, to wtedy powstają typowe SCE, zajmujące całą szerokość chromatyd. SCE mogą jednak zajmować tylko połowę albo jeszcze mniejszą część szerokości chromatyd, co jest dobrze widoczne w chromosomach roślinnych lub na dużych powiększeniach zdjęć fotograficznych chromosomów zwierzęcych i człowieka

FIBRYLARNE MECHANIZMY POWSTAWANIA SCE

Sama nazwa — wymiana siostrzanych chromatyd — sugeruje, że aczkolwiek proces ten zachodzi na poziomie molekularnym, to SCE jako takie uwidaczniają się na poziomie chromatydowym. Jest to uproszczony schemat, który nie uwzględnia poziomu fibrylarnego, a więc mechanizmów zachodzących na poziomie subchromatydowym. Upakowanie fibryli chromatyny w chromatydzie nie jest w pełni wyjaśnione. Niezależnie od tego zagadnienia, obserwacje poczynione na chromosomach roślinnych [133], jak również nasze wstępne obserwacje przeprowadzone

na chromosomach człowieka dowodzą, że wymianie może ulegać DNA, którego fibryle nie zajmują całej szerokości chromatydy. Można sądzić, że część SCE dotycząca niewielkich odcinków fibryli obu chromatyd jest niewidoczna w badaniu mikroskopowym. Inne wymiany, obejmujące większy odcinek fibryli, mogą być zaobserwowane, jeżeli ich wymiary przekraczają zdolność rozdzielczą mikroskopu świetlnego. Jest możliwe, że liczba wymian mających wymiary subchromatydowe, przekracza liczbę wymian obejmujących całą szerokość chromatydy. Wymiany subchromatydowe zostały schematycznie przedstawione na ryc. 5. Zagadnienie wymian subchromatydowych zasługuje na dokładne poznanie, może ono bowiem dostarczyć informacji o upakowaniu fibryli chromatynowych w chromosomie.

MECHANIZMY POWSTAWANIA SCE NA POZIOMIE CHROMATYDOWYM I CHROMOSOMOWYM

Przedmiotem badań nad SCE na poziomie chromatydowym i chromosomowym był przede wszystkim rozkład wymian wzdłuż chromosomów oraz ich lokalizacja w odniesieniu do rozmieszczenia hetero- i euchromatyny. Badano także rozkład częstości wymian między poszczególnymi chromosomami. Jeżeli chodzi o to ostatnie zagadnienie, to okazało się, że rozkład częstości występowania SCE między chromosomami jest w przybliżeniu zależny od ich długości, chociaż i tu istnieją odchylenia od tej reguły. U człowieka częstość wymian, wyższa od oczekiwanej, została stwierdzona w chromosomach grupy A (poza parą nr 3) i grupy B, a niższa — w chromosomach grup E, F i G [9, 32, 42, 74, 98].

Carrano i Wolff [21] stwierdzili, że rozkład SCE na poszczególnych chromosomach jest zgodny z rozkładem Poissona, z wyjątkiem rzadziej występujących wymian w obrębie heterochromatyny konstytutywnej oraz częstszych w okolicy styku hetero- i euchromatyny [54]. Nieprzypadkowy rozkład SCE w chromosomach stwierdzili również Galloway i Evans [42]. Okolica centromeru była rzadziej zajmowana przez wymiany, natomiast nagromadzały się one w środkowej części ramion. Wspomnieni autorzy nie znaleźli żadnych danych przemawiających za wzrostem liczby SCE w prążkach bogatych w pary A - T.

Zack i wsp. [172] opracowali model automatycznego przetwarzania fotometrycznych danych uzyskanych ze zdjęć chromosomów człowieka fluoryzujących po kolejnych wybarwieniach atebryną i fluorochromem 33258 Hoechst. Przeprowadzona w ten sposób kolejna analiza prążków Q i SCE pozwoliła na ocenę lokalizacji punktów wymian w stosunku do prążków Q. Autorzy ci wykazali, że SCE są umiejscowione w ujemnych prążkach Q i na styku dodatnich i ujemnych prążków Q.

Kilka okolic chromosomów nr 1 człowieka, przylegających do bardzo jasnych prążków Q, jest miejscami niezwykle częstego występowania SCE. W tym samym chromosomie złamania indukowane przez BudR są zlokalizowane w obrębie prążków Q. Te spostrzeżenia [83] nie są zgodne z oczekiwanym rozkładem SCE wzdłuż tego autosomu oraz są trudne do interpretacji wobec faktu, że prążki Q są względnie bogate w pary A - T. Zależności między lokalizacją SCE a wzorem prążków G badali inni autorzy. Morgan i Crossen [98] stwierdzili, że punkty wymian są zlokalizowane w prążkach G-ujemnych lub na pograniczu prążków dodatnich i ujemnych. Autorzy nie obserwowali lokalizacji miejsc wymian w obrębie heterochromatynowych prążków G.

Porównano także częstość lokalizacji SCE w prążkach C i poza nimi. Stwierdzono względnie niską częstość położenia CSE w obszarze prążków C, wysoką natomiast na styku prążków C z euchromatyną [16]. Latt [82] nie stwierdził częstszej lokalizacji SCE w chromosomach nr 1, 9 i 16, które posiadają duże obszary konstytutywnej heterochromatyny.

W zespole chromosomów *Microtus agrestis* heterochromosomy X posiadają duże obszary heterochromatynowe. Na tym materiale Natarajan i Klasterska [103] stwierdzili znacznie wyższy odsetek SCE w odcinkach heterochromatynowych. Autorzy tłumaczą to wyższą podatnością odcinków heterochromatynowych na spontaniczne i indukowane aberracje, wysokim stopniem kondensacji fibryli chromatynowych w interfazie oraz tendencją tych obszarów do przylegania w siostrzanych chromatydach.

Carrano i Johnson [22] indukowali SCE przy użyciu mitomycyny C i wykazali, że zlokalizowane są one często w miejscu połączenia hetero- i euchromatyny. Częstość położenia wymian w odcinkach heterochromatynowych była niższa od oczekiwanej.

Duże chromosomy człowieka wykazują nagromadzenie wymian w środkowych rejonach ramion; wymiany w centromerach i telomerach są rzadziej obserwowane [32, 42, 72]. Jest interesujące, że wymiany są częściej obserwowane w telomerach pod wpływem 8-metoksypsoralenu i jednoczesnego naświetlania promieniami UV [24].

W metodyce badania SCE istotne znaczenie ma szereg momentów. Przede wszystkim BrdU jest mutagenem i indukuje z jednej strony strukturalne aberracje chromosomowe, a z drugiej — SCE. Zagadnienia te zostały w naszym piśmiennictwie omówione w przeglądowym artykule Pojdy i wsp. [118]. Perry i Evans [115] sugerują, że SCE zachodzi często w miejscach złamań chromosomów, translokacji i delecji.

Celem badań przeprowadzonych przez Ikushimę [58] było prześledzenie, czy delecje i przerwy chromatydowe można uważać za niekompletne SCE, czy też za proste złamania chromatyd. Autor indukował

SCE w hodowanych komórkach chomika linii CHO i stwierdził, że na 42 delecje chromatydowe tylko 1 wymiana była zlokalizowana w tym samym miejscu. Podobne wyliczenia przeprowadzone dla przerw wykazały proporcję 1 : 27. Dane te dowodzą, że między tymi zjawiskami nie ma żadnych zależności.

ZASTOSOWANIE TESTU ANALIZY SCE

Analiza SCE jest coraz częściej uważana z czuły test w ocenie mutagenów chemicznych [1 - 3, 6, 13, 14, 18, 19, 23, 38 - 40, 45, 46, 53, 56, 59, 80, 85, 93, 101, 102, 104, 105, 107 - 109, 116, 120, 123 - 125, 139 - 141, 143, 146, 156, 157, 167 - 169]. Przystępując do tego typu badania należy rozważyć, czy badany związek wymaga lub nie wymaga przeprowadzenia jego aktywacji *in vivo*. Jeżeli testowany preparat chemiczny nie wymaga aktywacji, to można go dodawać do hodowli komórek zwierzęcych lub ludzkich w odpowiednim stężeniu i po wyjałowieniu. Badanie związków chemicznych działających mutagennie jedynie po aktywacji *in vivo* jest również możliwe. Obecnie do wyboru są dwie drogi postępowania: badanie SCE *in vivo* (co zostanie omówione) oraz metoda aktywacji mutagenów *in vitro* przy użyciu frakcji mikrosomalnej z wątroby człowieka [155] lub szczura [121, 122, 149]. Jest to zastosowanie do badań cytogenetycznych testu wprowadzonego do badań bakteriologicznych przez Ames i wsp. [8].

Związki nieaktywne mogą, po ich aktywacji *in vitro*, wykazać wpływ na częstość występowania SCE. Odmianą tej metody jest aktywowanie mutagenów przy użyciu tzw. systemu Udenfrienda — nieenzymatycznego układu utleniającego [91].

Opracowano również metody badania SCE *in vivo*. U małych ssaków laboratoryjnych (mysz, chomik) efekt wytworzenia się chromatyd typu T - B i B - B uzyskuje się poprzez ciągłe podawanie zwierzęciu BrdU na drodze wstrzyknięć dootrzewnowych [4, 5, 12], kroplówki [76, 77] lub podskórnego wszczepienia zawierających ją tabletek [6, 7]. Chromosomy do zróżnicowanego barwienia siostrzanych chromatyd uzyskuje się metodą bezpośredniego badania komórek szpiku kostnego. Jednakże przy najdokładniejszym postępowaniu u części badanych zwierząt nie daje się uzyskać zróżnicowanego wybarwienia chromatyd. Zwierzętom doświadczalnym, którym podawano mutagen (lub związek podejrzany o takie działanie) w dawkowaniu przewlekłym lub ostrym, podaje się po 1 dniu przerwy BrdU jednym z omówionych sposobów. Należy zaznaczyć, że częstość SCE badana metodą *in vivo* jest niższa od wyników uzyskanych metodą badania *in vitro* [119]. Metoda badania *in vivo* pozwala na ocenę wpływu na genom tych związków chemicznych, które wymagają aktywacji. W tym przypadku końcowy efekt działania takiego związku jest

wypadkową jego bezpośredniego wpływu oraz wpływu metabolitów powstałych w ustroju.

Badania SCE w komórkach poddanych działaniu czynników szkodliwych *in vivo* jest także możliwe przy zastosowaniu metody pośredniej. W tym przypadku zwierzęciu doświadczalnemu podaje się czynnik mutageny, a częstość SCE jest oceniana na hodowanych *in vitro* limfocytach [145, 153]. Ta metoda jest oprócz badania komórek szpiku kostnego sposobem oceny *in vivo* różnych czynników uszkadzających DNA i wpływających na SCE u ludzi narażonych zawodowo lub przypadkowo. Do analizy mutagennego działania różnych związków chemicznych na genom wykorzystano również hodowlę komórek w komorach dyfuzyjnych wszczepianych do jamy otrzewnowej zwierzęcia, któremu podaje się testowany związek chemiczny [41, 55].

Badania przeprowadzone przez Carrano i wsp. [23] miały na celu wykazanie korelacji między częstościami mutacji punktowych i SCE. W komórkach jajnika chomika chińskiego analizowano mutację genu fosforybozylotransferazy hypoksantyny pod wpływem niektórych mutagenów, jak siarczan proflawiny i mitomycyna C. W przypadku każdego badanego mutagenu wykazano liniową zależność między częstością SCE i częstością indukowanych mutacji punktowych. Jednakże nie wszyscy autorzy są zgodni co do istnienia takiej zbieżności.

Z mutagenów chemicznych najsilniej działają wieloczynnościowe związki alkilujące, jak mitomycyna C i iperyt azotowy. Związki o jednej grupie alkilującej są mniej efektywne zarówno w indukowaniu SCE, jak i aberracji chromosomowych. Według Perry'ego i Evansa [115] zdolność środków alkilujących do wywołania SCE może być porównywana z ich zdolnością do indukowania aberracji chromosomowych, nie jest natomiast porównywalna ze zdolnością indukowania mutacji punktowych.

Abe i Sasaki [2] badali wpływ różnych związków chemicznych na częstość SCE i aberracji chromosomowych w hodowanych komórkach chomika chińskiego (pseudodiploidalna pochodna linii Don). Niektóre uznane związki onkogenne indukowały zarówno wzrost liczby SCE, jak i aberracji chromosomowych do poziomu około 2-krotnie wyższego od normy. Inne związki onkogenne nie powodowały (lub tylko nieznacznie podwyższały) wzrostu częstości SCE i aberracji chromosomowych. Zaobserwowano również, że niektóre związki wpływały tylko na jedno z tych dwu zjawisk. Udowodniono tym samym, że test oceny SCE nie zawsze jest czulszy od testu analizy aberracji chromosomowych, a ponadto, że obu testów nie można stosować wymiennie.

W przeprowadzonych badaniach porównawczych [12] nad indukcją mikrojąder i SCE w komórkach szpiku kostnego myszy po podaniu *in vivo* różnych mutagenów stwierdzono, że test SCE jest od 10 do 100

razy czulszy od testu mikrojądrowego. Pozytywne wyniki indukcji uzyskano albo w obu testach, albo w żadnym.

U niektórych zwierząt badanie rozkładu SCE między komórkami sugeruje istnienie frakcji limfocytów cechujących się wysokim poziomem SCE [145]. O istnieniu podobnych frakcji u człowieka wspomniano już wcześniej [119]. Obserwacje te muszą być brane pod uwagę przy analizie wpływu związków chemicznych na częstość występowania SCE.

Stetka i wsp. [145] porównywali u zwierząt wpływ sposobu podawania mitomycyny C na częstość SCE. Jednokrotna dawka antybiotyku spowodowała po 1 dobie znaczny wzrost liczby SCE; po krótkim czasie liczba SCE wracała do normy. Podawanie mniejszych dawek w odstępach tygodniowych spowodowało istotny wzrost liczby SCE dopiero po 4 - 5 tygodniach, jednakże zmiana utrzymywała się przez szereg tygodni.

W przeciwieństwie do mutagenów chemicznych promieniowanie X powoduje mniejszy wzrost liczby SCE niż aberracji chromosomowych. W doświadczeniach Perry'ego i Evansa [115] napromienienie komórek dawką 400 radów spowodowało jedynie podwojenie liczby wymian przy 20-krotnym wzroście częstości aberracji chromosomowych. W porównaniu z grupą kontrolną oraz z grupą ludzi narażonych okresowo na promieniowanie jonizujące stwierdzono wzrost liczby SCE u osób ciągle narażonych na małe dawki energii jonizującej [134].

Wpływ infekcji wirusowej na SCE nie jest jednoznaczny. Stwierdzono wzrost ich liczby w chromosomach limfocytów ludzi poddanych szczepieniom przeciwospowym, ale również spadek liczby wymian zakażonych wirusem [74, 97]. Wpływ infekcji wirusowej (typ 1 i 2 wirusa opryszczki) na częstość SCE i aberracji chromosomowych badali również Kato i Sandberg [66]. W początkowym okresie trwania doświadczenia autorzy stwierdzili wzrost delecji i przerw chromatydowych, co nie było jednak powiązane ze wzrostem SCE. Dopiero po namnożeniu się wirusów częstość SCE malała w sposób statystycznie nieistotny (w kontroli — 6,03, a po infekcji wirusowej — 5,07 wymian na komórkę). Analiza miejsc uszkodzeń chromosomów nie wykazała zbieżności między lokalizacją złamań chromatydowych a SCE.

Ze względu na istniejące podobieństwo między SCE a złamaniami chromosomów podjęto badania nad wymianami w tych jednostkach chorobowych, które cechują się zwiększoną częstością występowania złamań, jak zespół Blooma [10, 25, 27, 35, 132, 136, 138, 154], zespół skóry pergaminowej i barwnikowej [0, 26, 51, 131], ataxia teleangiectasia [10, 43] i niedokrwistość Fanconiego [84, 142, 160]. Udowodniono, że mitomycyna C, indukująca silnie SCE w limfocytach zdrowych ludzi, wykazuje w analogicznych komórkach pobranych od chorego z anemią Fanconiego działania o połowę słabsze [84]. Wzrost

częstości SCE stwierdzono jedynie w zespole Blooma z homozygotycznym układem genów [10, 35, 154]. Po hodowli w jednym naczyniu fibroblastów pobranych od chorego z zespołem Blooma z fibroblastami osoby zdrowej stwierdzono wzrost liczby SCE w normalnych fibroblastach. Taki sam efekt uzyskano po hodowaniu normalnych fibroblastów w płynie po hodowli komórek patologicznych. Na tej podstawie Tice i wsp. [154] przypuszczają, że komórki ludzi z zespołem Blooma produkują rozpuszczający się w podłożu czynnik posiadający zdolność zwiększania liczby SCE. Po mitomycynie C działającej na hodowane limfocyty ludzi zdrowych częstość SCE wzrasta 10-krotnie (odpowiednie wartości wynosiły 6,4 oraz 61,7/komórkę). Po użyciu do doświadczeń limfocytów pobranych od chorych z zespołem Blooma zaobserwowano jedynie 2-krotny wzrost częstości wymian (odpowiednio 80,6 i 139,3) [139]. U chorych z zespołem skóry pergaminowej i barwnikowej stwierdzono (po stymulacji mutagenem) większą niż w normie częstość SCE [131] oraz nie stwierdzono różnic w limfocytach chorych na ataxia teleangiectasia [43].

Analizowano również częstość występowania SCE po indukcji benzo-pirenem limfocytów od chorych na raka płuc [125, 130], u ludzi, którzy przeżyli wybuch atomowy w Hiroszynie [110], w łuszczycy [24, 79, 100], we wrodzonej dyskeratozie [20] w zespołach aberracji chromosomowych [11, 86, 94, 147, 171] i w chorobach nowotworowych [102]. Uzyskane wyniki badań, poza niektórymi przypadkami łuszczycy [170] i ostrą białaczką [95], nie wykazały wzrostu częstości SCE. Nie uzyskano zatem jednoznacznych wyników badań nad związkiem między złamaniami chromosomów a SCE, bowiem złamania i delecje jedynie rzadko pokrywają się z wymianami. Wydaje się więc, że mechanizmy powstawania złamań i wymian są odmienne.

Badania nad SCE znalazły także zastosowanie w badaniach nad mitotyczną segregacją chromosomów. Wykazano, że hipoteza o nieprzypadkowej segregacji w procesie różnicowania się komórek nie jest prawdziwa [99]. Różnicowe wybarwienie chromatyd wykorzystano także do badania zjawiska crossing-over, co jest możliwe, jeżeli wymiana materiału genetycznego między homologami dotyczyła ich jasnych i ciemnych chromatyd [151].

Dużą przydatność mają metody różnicowego wybarwienia chromatyd siostrzanych w badaniach nad czasem trwania cyklu komórkowego *in vivo* i *in vitro* [29 - 31, 60, 129, 164]. Po 24-godzinnej kroplówce roztworu BrdU do żyły ogonowej szczura stwierdzono, że komórki szpiku kostnego tego gatunku dzielą się co 9,2 godz. Crossen i wsp. [29] badali czas trwania cyklu komórkowego hodowanych limfocytów chomika chińskiego i człowieka. Stwierdzono, że wszystkie 48-godzinne hodowle zawierają metafazy po II cyklu replikacyjnym. Wyniki tych badań świad-

czą, że zalecany (przy badaniu uszkodzeń chromosomów osób narażonych na działanie mutagenów) 48 - 52-godziny czas hodowli, w celu uzyskania wyłącznie chromosomów metafazowych po I cyklu replikacyjnym, jest zbyt długi. Do tych badań bardziej odpowiedni jest 38 - 40-godzinny czas hodowli limfocytów. Należy jednak unikać stosowania testu SCE do badania mutagenów fizycznych, a szczególnie promieniowania jonizującego [44, 46, 90].

Za pomocą metod zróżnicowanego barwienia siostrzanych chromatyd wyjaśniono również, że figury „trójpromienne”, obserwowane w hodowlach z dużą ilością przerw chromosomowych, nie powstają na drodze selektywnej endoreduplikacji fragmentów ramion chromosomów [52, 106]. Shiraishi [137] wykazał, że ludzkie limfocyty T i B różnią się wyraźnie zdolnością wbudowywania różnych prekursorów DNA, co jest przyczyną wyraźnych różnic w częstości SCE i w intensywności zróżnicowanego wybarwienia chromatyd siostrzanych.

Jak wynika z przeglądu dotychczasowego piśmiennictwa na temat SCE i zróżnicowanego wybarwienia siostrzanych chromatyd, nieznaną mechanizmu wymian nie jest przeszkodą do wykorzystywania tych metod do badania szeregu problemów genetycznych i cytogenetycznych, jak również problemów ogólnobiologicznych.

LITERATURA

- [1] ABE S., SASAKI M., Chromosome aberrations and sister chromatid exchanges in Chinese hamster cells exposed to various chemicals, *J. Natl. Cancer Inst.*, **58**: 1635-1641, 1977.
- [2] — Studies on chromosomal aberrations and sister chromatid exchanges induced by chemicals, *Proc. Jpn. Acad.*, **53**: 46, 1977.
- [3] ABRAMOVSKY J., VORSANGER G., HIRSCHHORN K., Sister chromatid exchange induced by X-ray of human lymphocytes and the effect of L-cysteine, *Mutat. Res.*, **50**: 93-100, 1978.
- [4] ALLEN J. W., LATT S. A., In vivo BrdU — 33258 Hoechst analysis of DNA replication kinetics and sister chromatid exchange formation in mouse somatic and meiotic cells, *Chromosoma*, **58**: 325-340, 1976.
- [5] — Analysis of sister chromatid exchange formation in vivo in mouse spermatogonia as a new system for environmental mutagens, *Nature*, **260**: 449-451, 1976.
- [6] ALLEN J. W., SHULER C. F., MENDES R. W., LATT S. A., A simplified technique for in vivo analysis of sister chromatid exchanges using 5-bromodeoxyuridine tablets, *Cytogenet. Cell Genet.*, **18**: 231-237, 1977.
- [7] ALLEN J. W., SHULER C. F., LATT S. A., Bromodeoxyuridine tablet methodology for in vivo studies of DNA synthesis, *Somatic Cell Genet.*, **4**: 393-407, 1978.
- [8] AMES B. N., McCANN J., YAMASAKI E., Method for detecting carcinogens and mutagens with the Salmonella mammalian-microsome mutagenicity test, *Mutat. Res.*, **31**: 347-364, 1975.

- [9] BAIRAMIAN T. L., Sister chromatid exchanges in human lymphocytes as observed using 5-bromodeoxyuridine, *Genetika*, **14**: 1085-1093, 1978.
- [10] BARTRAM C. R., KOSKE-WESTPHAL T., PASSARGE E., Chromatid exchanges in ataxia telangiectasia, Bloom syndrome, Werner syndrome and xeroderma pigmentosum, *Ann. Hum. Genet.*, **40**: 79-86, 1976.
- [11] BARTRAM C. R., Sister chromatid exchanges in a ring chromosome 4, *Cytogenet. Cell Genet.*, **18**: 238-241, 1977.
- [12] BAUKNECHT T., VOGEL W., BAYER U., WILD D., Comparative in vivo mutagenicity testing by SCE and micronucleus induction in mouse bone marrow, *Hum. Genet.*, **35**: 299-307, 1977.
- [13] BAYER U., The in vivo induction of sister chromatid exchanges in the bone marrow of the Chinese hamster. II. N-nitrosodiethylamine (DEN) and N-isopropyl-alfa-(2-methylhydrazino)-p-toluamide (Natulan), two carcinogenic compounds with specific mutagenicity problems, *Mutat. Res.*, **56**: 305-309, 1978.
- [14] BEEK B., OBE G., The human leukocyte test system. VI. The use of sister chromatid exchanges as possible indicators for mutagenic activities, *Human-genetik*, **29**: 127-134, 1975.
- [15] BLOOM S. E., HSU T. C., Differential fluorescence of sister chromatids in chicken embryos exposed to 5-bromodeoxyuridine, *Chromosoma*, **51**: 261-269, 1975.
- [16] BOSTOCK C. J., Analysis of the frequency of sister chromatid exchange in different regions of chromosomes of the kangaroo rat (*Dipodomys ordii*), *Chromosoma*, **56**: 275-281, 1976.
- [17] BREWEN J. G., PEACOCK W. J., The effect of tritiated thymidine on sister-chromatid exchange in a ring chromosome, *Mutat. Res.*, **7**: 433-440, 1969.
- [18] BROWN R. F., WU Y., Induction of sister chromatid exchanges in Chinese hamster cells by chlorpropamide, *Mutat. Res.*, **56**: 215-217, 1977.
- [19] BURGDORF W., KURVINK K., CERVENKA J., Elevated sister chromatid exchange rate in lymphocytes of subjects treated with arsenic, *Hum. Genet.*, **36**: 69-73, 1977.
- [20] BURGDORF W., Sister chromatid exchange in dyskeratosis congenita lymphocytes, *J. Med. Genet.*, **14**: 256-257, 1977.
- [21] CARRANO A. V., WOLFF S., Distribution of sister chromatid exchanges in the euchromatin and heterochromatin of the *Indian muntjac*, *Chromosoma*, **53**: 361-369, 1975.
- [22] CARRANO A. V., JOHNSON G. R., The distribution of mitomycin C-induced sister chromatid exchanges in the euchromatin and heterochromatin of the *Indian muntjac*, *Chromosoma*, **64**: 97-107, 1977.
- [23] CARRANO A. V., THOMPSON L. H., LINDL P. A., MINKLER J. L., Sister chromatid exchange as an indicator of mutagenesis, *Nature*, **271**: 551-553, 1978.
- [24] CARTER D. M., WOLFF K., SCHNEDL W., 8-methoxypsoralen and UVA promote sister chromatid exchanges, *J. Invest. Dermatol.*, **67**: 548-551, 1976.
- [25] CHAGANTI R. S. K., SCHONBERG S., GERMAN J., A. manifold increase in sister chromatid exchanges in Bloom's syndrome lymphocytes, *Proc. Nat. Acad. Sci. (Wash.)*, **71**: 4508-4512, 1974.
- [26] CLEAVER J. E., Repair replication and sister chromatid exchanges as indicators of excisable and nonexcisable damage in human (xeroderma pigmentosum) cells, *J. Toxicol. Environ. Health*, **2**: 1387-1394, 1977.
- [27] COMINGS D. E., Implications of somatic recombination and sister chromatid

exchange in Bloom's syndrome and cells treated with mitomycin C, *Human-genetik*, **28**: 191-197, 1975.

- [28] CONNER M. K., BOGGS S. S., TURNER J. H., Comparisons of in vivo BrdU labelling methods and spontaneous sister chromatid exchange frequencies in regenerating murine liver and bone marrow cells, *Chromosoma*, **68**: 303-313, 1978.
- [29] CROSSEN P. E., PATHAK S., ARRIGHI F. E., A high resolution study of the DNA replication patterns of Chinese hamster chromosomes using sister chromatid differential staining technique, *Chromosoma*, **52**: 339-349, 1975.
- [30] CROSSEN P. E., Proliferation of PHA-and PWM-stimulated lymphocytes measured by sister chromatid differential staining, *Cell Immunol.*, **32**: 432-438, 1977.
- [31] CROSSEN P. E., MORGAN W. F., Analysis of human lymphocyte cell cycle time in culture measured by sister chromatid differential staining, *Exp. Cell Res.*, **104**: 453-457, 1977.
- [32] CROSSEN P. E., DRETS M. E., ARRIGHI F. E., JOHNSTON D. A., Analysis of the frequency and distribution of sister chromatid exchanges in cultured human lymphocytes, *Hum. Genet.*, **35**: 345-352, 1977.
- [33] DAOUD C., SHAW M. W., CRAIG-HOLMES A., Sister chromatid exchange frequency among normal individuals and breast cancer patients, *Mammalian Chromosomes Newsletter*, **17**: 26, 1976.
- [34] DEWEY W. C., STONE L. E., Sister chromatid exchanges and lack of isolabelling in Chinese hamster chromosomes, *Exp. Cell Res.*, **94**: 229-310, 1975.
- [35] DICKEN C. H., DEWALD G., GORDON H., Sister chromatid exchanges in Bloom's syndrome, *Arch. Dermatol.*, **114**: 755-760, 1978.
- [36] DUTRILLAUX B., FOSSE A. M., PRIEUR M., LEJEUNE J., Analyse des échanges de chromatides dans les cellules somatiques humaines. Traitement au BUDR (5 bromodéoxyuridine) et fluorescence bicolore par l'Acridine Orange, *Chromosoma*, **48**: 327-340, 1974.
- [37] DUTRILLAUX B., AURIAS A., FOSSE A. M., Différenciation des mécanismes induisant la segmentation et l'asymétrie des chromatides, après traitement par le 5-bromodéoxyuridine, *Exp. Cell Res.*, **97**: 313-322, 1976.
- [38] FAED M. J. W., MOURELATOS D., Enhancement by caffeine of sister-chromatid exchange frequency in lymphocytes from normal subjects after treatment by mutagens, *Mutat. Res.*, **49**: 437-440, 1978.
- [39] FUNES-CRAVIOTO F., ZAPATA-GAYON C., KOLMODIN-HEDMAN B., LAMBERT B., LINDSTEN J., NORBERG E., NORDENSKJÖLD M., OLIN R., SWENSSON A., Chromosome aberrations and sister-chromatid exchange in workers in chemical laboratories and a rotoprint factory and in children of women laboratory workers, *Lancet*, **2**: 322-325, 1977.
- [40] FURUKAWA M., Sister chromatid exchanges and growth inhibition induced by the flame retardant tris(2,3)-dibromopropyl phosphate in Chinese hamster cells, *J. Natl. Cancer Inst.*, **60**: 1179-1181, 1978.
- [41] FURUKAWA M., HUANG C. C., Sister chromatid exchanges induced by cyclophosphamide in V 79 cells cultured in diffusion chambers in mice, *Mutat. Res.*, **57**: 233-239, 1978.
- [42] GALLOWAY S. M., EVANS H. J., Sister chromatid exchange in human chromosomes from normal individuals and patients with ataxia telangiectasia, *Cytogenet. Cell Genet.*, **15**: 17-29, 1975.
- [43] GALLOWAY S., Ataxia telangiectasia: the effects of chemical mutagens and

- X-rays on sister chromatid exchanges in blood lymphocytes, *Mutat. Res.*, **45**: 343–349, 1977.
- [44] GATTI M., PIMPINELLI S., OLIVIERI G., The frequency and distribution of isolabelling in Chinese hamster chromosomes after exposure to X-rays, *Mutat. Res.*, **23**: 229–238, 1974.
- [45] GEBHART E., KAPPAUF H., Bleomycin and sister chromatid exchange in human lymphocyte chromosomes, *Mutat. Res.*, **58**: 121–124, 1978.
- [46] GIBSON D. A., PRESCOTT D. M., Induction of sister chromatid exchanges in chromosomes of rat kangaroo cells by tritium incorporated into DNA, *Exp. Cell Res.*, **74**: 397–402, 1972.
- [47] — Sister chromatid exchanges in isolabelling, *Exp. Cell Res.*, **83**: 445–447, 1973.
- [48] GOTO K., AKEMATSU T., SHIMAZU H., SUGIYAMA T., Simple differential Giemsa staining of sister chromatids after treatment with photosensitive dyes and exposure to light and the mechanism of staining, *Chromosoma*, **53**: 223–231, 1975.
- [49] GOTO K., MAEDA S., KANO Y., SUGIYAMA T., Factors involved in differential Giemsa-staining of sister chromatids, *Chromosoma*, **66**: 351–361, 1978.
- [50] GOYANES U. J., Differential silver carbonate staining of sister chromatids in BrdU — substituted chromosomes, *Hum. Genet.*, **40**: 205–208, 1978.
- [51] HARTLEY-ASP B., The influence of caffeine on the mitomycin C-induced chromosome aberration frequency in normal human and xeroderma pigmentosum cells, *Mutat. Res.*, **49**: 117–126, 1978.
- [52] HERREROS B., GIANELLI F., Spatial distribution of old and new chromatid subunits and frequency of chromatid exchanges in induced human lymphocyte endoreduplications, *Nature (Lond.)*, **216**: 286–288, 1967.
- [53] HONEYCOMBE J. R., The effects of busulphan on the chromosomes of normal lymphocytes, *Mutat. Res.*, **57**: 35–49, 1978.
- [54] HSU T. C., PATHAK S., Differential rates of sister chromatid exchanges between euchromatin and heterochromatin, *Chromosoma*, **58**: 269–273, 1976.
- [55] HUANG C. C., FURUKAWA M., Sister chromatid exchanges in human lymphoid cell lines cultured in diffusion chambers in mice. A host-mediated assay system for mutagenicity, *Exp. Cell Res.*, **111**: 458–461, 1978.
- [56] HUTTNER K. M., RUDDLE F. H., Study of mitomycin C — induced chromosomal exchange, *Chromosoma*, **56**: 1–13, 1976.
- [57] IKUSHIMA T., WOLFF S., Sister chromatid exchanges induced by light flashes to 5-bromodeoxyuridine — and 5-iododeoxyuridine substituted Chinese hamster chromosomes, *Exp. Cell Res.*, **87**: 15–19, 1974.
- [58] IKUSHIMA T., Role of sister chromatid exchanges in chromatid aberration formation, *Nature*, **268**: 235–236, 1977.
- [59] ISHII Y., BENDER M., Factors influencing the frequency of mitomycin C — induced sister — chromatid exchanges in 5-bromodeoxyuridine — substituted human lymphocytes in culture, *Mutat. Res.*, **51**: 419–425, 1978.
- [60] JHANWAR S. C., CHAGANTI R. S. K., In vivo chromosome replication and sister chromatid exchange in Chinese hamster bone marrow cells, XIV International Congress of Genetics, Abstr. Part I, 364, Moscow, 1978.
- [61] KATO H., Induction of sister chromatid exchanges by UV light and its inhibition by caffeine, *Exp. Cell Res.*, **82**: 383–390, 1973.
- [62] — Photoreactivation of sister chromatid exchanges induced by ultraviolet irradiation, *Nature*, **249**: 552–553, 1974.

- [63] — Spontaneous sister chromatid exchanges detected by a BUdR-labelling method, *Nature (Lond.)* **251**: 70–72, 1974.
- [64] KATO H., STICH H. F., Sister chromatid exchanges in ageing and repair — deficient human fibroblasts, *Nature*, **260**: 447–448, 1976.
- [65] KATO H., Mechanisms for sister chromatid exchanges and their relation to the production of chromosomal aberrations, *Chromosoma*, **59**: 179–191, 1977.
- [66] KATO H., SANDBERG A. A., Effects of herpes simplex virus on sister chromatid exchange and chromosome abnormalities in human diploid fibroblasts, *Exp. Cell Res.*, **109**: 423–427, 1977.
- [67] KATO H., The effect of sera on sister chromatid exchanges in vitro, *Exp. Cell Res.*, **109**: 445–448, 1977.
- [68] — Spontaneous and induced sister chromatid exchanges as revealed by the BUdR-labelling method, *Int. Rev. Cytol.*, **49**: 55–97, 1977.
- [69] — Effects of temperature on the incidence of sister chromatid exchanges, XIV International Congress of Genetics, Abstr. Part I, 366, Moscow 1978.
- [70] KIHLMAN B. A., KRONBORG D., Sister chromatid exchanges in *Vicia faba*. I. Demonstration by a modified fluorescent plus Giemsa (FPG) technique, *Chromosoma*, **51**: 1–10, 1975.
- [71] KIHLMAN B. A., Sister chromatid exchanges in *Vicia faba*. II. Effects of thiotepa, caffeine and 8-ethoxycaffeine on the frequency of SCE's, *Chromosoma*, **51**: 11–18, 1975.
- [72] KIM A., Chromatidaustausch und Heterochromatinveränderungen menschlicher Chromosomen nach BUdR-Markierung, *Humangenetik*, **25**: 179–188, 1974.
- [73] KLINGERMAN A. D., BLOOM S. E., Sister chromatid differentiation and exchanges in adult mudminnows (*Umbra limi*) after in vivo exposure to 5-bromodeoxyuridine, *Chromosoma*, **56**: 101–109, 1976.
- [74] KNUUTILA S., MÄKI-PAAKKANEN J., KÄHKONEN M., HOKKANEN E., An increased frequency of chromosomal changes and SCE's in cultured blood lymphocytes of 12 subjects vaccinated against smallpox, *Hum. Genet.*, **41**: 89–96, 1978.
- [75] KORENBERG J. R., FREEDLENDER E. F., Giemsa technique for the detection of sister chromatid exchanges, *Chromosoma*, **48**: 355–360, 1974.
- [76] KRAM D., SCHNEIDER E. L., Reduced frequencies of mitomycin-C induced sister chromatid exchanges in AKR mice, *Hum. Genet.*, **41**: 45–51, 1978.
- [77] KRAM D., The effects of high and low fluoride diets on the frequencies of sister chromatid exchanges, *Mutat. Res.*, **57**: 51–55, 1978.
- [78] LAMBERT B., HANSSON K., LINDSTEN J., STEN M., WERELIUS B., Bromodeoxyuridine-induced sister chromatid exchanges in human lymphocytes, *Hereditas*, **83**: 163–174, 1976.
- [79] LAMBERT B., Sister chromatid exchanges in lymphocytes from psoriasis patients treated with 8-methoxypsoralen and longwave ultraviolet light, *Acta Derm. Venereol. (Stockh.)*, **58**: 13–16, 1978.
- [80] LAMBERT B., RINGBORG U., LINDBLAD A., NORDENSKJÖLD M., HARPER E., The incidence of sister chromatid exchanges in human lymphocytes: effects of smoking, cytostatic treatment and laboratory work, XIV International Congress of Genetics, Abstr. Part I, 327, Moscow 1978.
- [81] LATT S. A., Microfluorometric detection of deoxyribonucleic acid replication in human metaphase chromosomes, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **70**: 3395–3399, 1973.
- [82] — Sister chromatid exchanges, induces of human chromosome damage and

- repair: detection by fluorescence and induction by Mitomycin C, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **71**: 3162-3166, 1974.
- [83] — Localization of sister chromatid exchanges in human chromosomes, *Science*, **185**: 74-76, 1974.
- [84] LATT S. A., STETTEN G., JUERGENS L. A., BUCHANAN G. R., GERRALD P. S., Induction by alkylating agents of sister chromatid exchanges and chromatid breaks in Fanconi's anemia, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **72**: 4066-4071, 1975.
- [85] LATT S. A., LOVEDAY K. S., Characterization of sister chromatid exchange induction by 8-methoxypsoralen plus UV light, *Cytogenet. Cell Genet.*, **21**: 184-201, 1978.
- [86] LEZANA E. A., BIANCHI N. O., BIANCHI M. S., ZABALA-SUAREZ J. E., Sister chromatid exchanges in Down syndromes and normal human beings, *Mutat. Res.*, **45**: 85-90, 1977.
- [87] LIN M. S., DAVIDSON R. L., Centromeric asymmetry and induction of translocations and sister chromatid exchanges in mouse chromosomes, *Nature*, **254**: 354-356, 1975.
- [88] LIN M. S., ALFI O. S., DONNELL G. N., Differential fluorescence of sister chromatids with 4'-6-diamidino-2-phenylindole, *Can. J. Genet. Cytol.*, **18**: 545-549, 1976.
- [89] LIN M. S., ALFI O. S., Detection of sister chromatid exchanges by 4'-6-diamidino-2-phenylindole fluorescence, *Chromosoma*, **57**: 219-227, 1976.
- [90] LUCHNIK N. U., PORJADKOVA N. A., Isolabelling is a radiation-induced phenomenon, *Chromosoma*, **63**: 11-20, 1977.
- [91] MADLE S., OBE G., In vitro testing of an indirect mutagen (cyclophosphamide) with human leukocyte cultures. Activation by a non-enzymatic hydroxylation system (Udenfriend system), *Mutat. Res.*, **49**: 149-151, 1978.
- [92] MARIN G., PRESCOTT D. M., The frequency of sister chromatid exchanges following exposure to various doses of H³-thymidine or X-rays, *J. Cell Biol.*, **21**: 159-167, 1964.
- [93] MARQUARDT H., BAYER U., The induction in vivo of sister chromatid exchanges in the bone marrow of the Chinese hamster. I. The sensitivity of the system (methyl methanesulphonate), *Mutat. Res.*, **56**: 169-176, 1977.
- [94] MICHALOVÁ K., MÁSKOVÁ J., Cell division and sister chromatid exchanges in 45, X (46, X, i/Xq) mosaicism, *Hum. Genet.*, **39**: 87-90, 1977.
- [95] MICHALOVÁ K., MALKOVÁ J., CINÁTL J., PLACEROVÁ J., Chromosomal characteristics and non-random distribution of sister chromatid exchanges in lymphoblastoid cell lines isolated from acute leukemias, *Neoplasma*, **24**: 537-545, 1977.
- [96] MIDRO A., WIŚNIEWSKI L., Modified method of investigation of the sister chromatid exchanges, *Folia Morphol. (Warsz.)*, **38**: 167-176, 1979.
- [97] MIDRO A., Wpływ wirusa opryszczki na chromosomy człowieka, *Praca doktorska*, AM w Białymstoku, 1979.
- [98] MARGAN W. F., CROSSEN P. E., The frequency and distribution of sister chromatid exchanges in human chromosomes, *Hum. Genet.*, **38**: 271-278, 1977.
- [99] MORRIS V. B., Random segregation of sister chromatids in developing chick retinal cells demonstrated in vivo using the fluorescence plus Giemsa technique, *Chromosoma*, **60**: 139-145, 1977.
- [100] MOURELATOS D., FAED M. J. W., GOUD P. U., JOHNSON B. E., FRAINBELL W., Sister chromatid exchanges in lymphocytes of psoriatics after treat-

- ment with 8-methoxypsoralen and long wave ultraviolet radiation, *Br. J. Dermatol.*, **97**: 649-654, 1977.
- [101] MOURELATOS D., FAED M. J. W., JOHNSON B. E., Sister chromatid exchanges in human lymphocytes exposed to 8-methoxypsoralen and long wave UV irradiation prior to incorporation of bromodeoxyuridine, *Experientia*, **33**: 1091-1093, 1977.
- [102] MUSILOVÁ J., MICHALOVÁ K., The effects of cytostatics on sister chromatid exchanges and chromosomal breakage in patients with malignant and non-malignant diseases, XIV International Congress of Genetics. Abstr. Part I, 335, Moscow 1978.
- [103] NATARAJAN A. T., KLASTERSKA I., Heterochromatin and sister chromatid exchanges in the chromosome of *Microtus agrestis*, *Hereditas*, **79**: 150-154, 1975.
- [104] NAWROWSKA-LUCZAK M. I., SZYFTER K., Protective effect of selenium compounds in carcinogen induced increased frequency of sister chromatid exchanges, XIV International Congress of Genetics. Abstr. Part I, 335, Moscow, 1978.
- [105] NEVSTAD N. P., Sister chromatid exchanges and chromosomal aberrations induced in human lymphocytes by the cytostatic drug adriamycin in vivo and in vitro, *Mutat. Res.*, **57**: 253-258, 1978.
- [106] NOËL B., QUACK B., MOTTET J., NANTOIS Y., DUTRILLAUX B., Selective endoreduplication or branched chromosome? *Exp. Cell Res.*, **104**: 423-426, 1977.
- [107] OBE G., RISTOW H., Acetaldehyde, but not ethanol, induces sister chromatid exchanges in Chinese hamster cells in vitro, *Mutat. Res.*, **56**: 211-213, 1977.
- [108] PAL K., TIERNEY B., GROVER P. L., SIMS P., Induction of sister-chromatid exchanges in Chinese hamster ovary cells treated in vitro with non-K-region dihydrodiols of 7-methylbenz (a) anthracene and benzo(a)pyrene, *Mutat. Res.*, **50**: 367-375, 1978.
- [109] PALITTI F., BECCHETTI A., Effect of caffeine on sister chromatid exchanges and chromosomal aberrations induced by mutagens in Chinese hamster cells, *Mutat. Res.*, **45**: 157-159, 1977.
- [110] PANT G. S., KAMADA N., TANAKA R., Sister chromatid exchanges in peripheral lymphocytes of atomic bomb survivors and of normal individuals exposed to radiation and chemical agents, *Hiroshima J. Med. Sci.*, **25**: 99-105, 1976.
- [111] PATHAK S., STOCK A. D., LUSBY A., A combination of sister chromatid differential staining and Giemsa banding, *Experientia*, **31**: 916-918, 1975.
- [112] PATHAK S., WARD O. G., HSU T. C., Rate of sister chromatid exchanges in mammalian cells differing in diploid numbers, *Experientia*, **33**: 875-876, 1977.
- [113] PERA F., MATTIAS P., Labelling of DNA and differential sister chromatid staining after BrdU treatment in vivo, *Chromosoma*, **57**: 13-18, 1976.
- [114] PERRY P., WOLFF S., New Giemsa method for the differential staining of sister chromatids, *Nature*, **251**: 156-158, 1974.
- [115] PERRY P., EVANS H. J., Cytological detection of mutagen-carcinogen exposure by sister chromatid exchange, *Nature*, **258**: 121-125, 1975.
- [116] PERRY P. E., SEARLE C. E., Induction of sister chromatid exchanges in Chinese hamster cells by the hair dye constituents 2-nitro-phenylenediamine and 4-nitro-o-phenylenediamine, *Mutat. Res.*, **56**: 207-210, 1977.
- [117] PIMPINELLI S., SANTINI G., GATTI M., OLIVIERI G., Sister chromatid

- exchanges (SCEs) in *Drosophila melanogaster*, *Atti Associazione Genetica Italiana*, **22**: 223–225, 1977.
- [118] POJDA Z., STRÓŻYŃSKI H., OSIECKA R., Nowe metody badania wymian siostrzanych chromatyd, *Postępy Biol. Kom.*, **3**: 357–368, 1976.
- [119] POJDA Z., Badania nad niektórymi parametrami cytogenetycznego modelu oceny mutagenów chemicznych, *Praca doktorska*, WAM, Łódź 1979.
- [120] POPESCU N. C., TURNBULL D., DiPAOLO J. A., Sister chromatid exchange and chromosome aberration analysis with the use of several carcinogens and noncarcinogens, *J. Nat. Cancer Inst.*, **59**: 289, 1977.
- [121] RAAT de W. K., The induction of sister chromatid exchanges by cyclophosphamide in the presence of differently induced microsomal fractions of rat liver, *Chem. Biol. Interact.*, **19**: 125–131, 1977.
- [122] — Induction of sister chromatid exchanges by styrene and its presumed metabolite styrene oxide in the presence of rat liver homogenate, *Chem. Biol. Interact.*, **20**: 163–170, 1978.
- [123] RAPOSA T., Sister chromatid exchange studies for monitoring DNA damage and repair capacity after cytostatic therapy, *Mutat. Res.*, **57**: 241–251, 1978.
- [124] RISTOW H., OBE G., Acetaldehyde induces cross-links in DNA and causes sister-chromatid exchanges in human cells, *Mutat. Res.*, **58**: 115–119, 1978.
- [125] RÜDIGER H. W., KOHL F., MANGELS W., von WICHERT P., BARTRAM C. R., WÖHLER W., PASSARGE E., Benzpyrene induces sister chromatid exchanges in cultured human lymphocytes, *Nature*, **262**: 290–292, 1976.
- [126] SASAKI M. S., Sister chromatid exchange and chromatid interchange as possible manifestation of different DNA repair processes, *Nature*, **269**: 623–625, 1977.
- [127] SCHERES J. M., HUSTINX T. W. J., RUTTEN F. J., MERKX G. F. M., „Reverse” differential staining of sister chromatids, *Exp. Cell Res.*, **109**: 466–468, 1977.
- [128] SCHNEIDER E. L., CHAILLET J. R., TICE R. R., In vivo BUdR labelling of mammalian chromosomes, *Exp. Cell Res.*, **100**: 396–399, 1976.
- [129] SCHNEIDER E. L., STERNBERG H., TICE R. R., In vivo analysis of cellular replication, *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, **74**: 2041–2044, 1977.
- [130] SCHÖNWALD A. D., BARTRAM C. R., RÜDIGER H. W., Benzpyreneinduced sister chromatid exchanges in lymphocytes of patients with lung cancer, *Hum. Genet.*, **36**: 261–264, 1977.
- [131] SCHÖNWALD A. D., PASSARGE E., UV-light induced sister chromatid exchanges in xeroderma pigmentosum lymphocytes, *Hum. Genet.*, **36**: 213–218, 1977.
- [132] SCHROEDER T. M., Sister chromatid exchanges and chromatid interchanges in Bloom’s syndrome, *Humangenetik*, **30**: 317–325, 1975.
- [133] SCHVARTZMAN J. B., CORTES F., Sister chromatid exchanges in *Allium cepa*, *Chromosoma*, **62**: 119–133, 1977.
- [134] SERRA A., BOVA R., BRANDI G., Sister chromatid exchanges in human lymphocytes „in vitro” as a monitor-system of „in vivo” mutagenicity from chronic exposure to low-let irradiation, *XIV International Congress of Genetics. Abstr. Part I*, 598, Moscow 1978.
- [135] SHAFER D. A., KLEINMAN K. S., FALEK A., Replication bypass model of sister chromatid exchanges: mutagen specific SCE induction curves through human cell cycles predicted for MMC and UV, *XIV International Congress of Genetics, Abstr. Part I*, Moscow 1978.

- [136] SHIRAISHI Y., Increased sister chromatid exchanges in bone marrow and blood cells from Bloom's syndrome, *Cytogenet. Cell Genet.*, **17**: 162-173, 1976.
- [137] — Dependency of sister chromatid exchange in T- and B-cells on the incorporation of deoxyribonucleosides into chromosomal DNA, *J. Natl. Cancer Inst.*, **57**: 1217-1224, 1976.
- [138] SHIRAISHI Y., FREEMAN A. J., SANDBERG A. A., The relationship between sister chromatid exchanges and chromosome aberrations in Bloom's syndrome, *Cytogenet. Cell Genet.*, **18**: 13-23, 1977.
- [139] SHIRAISHI Y., SANDBERG A. A., Effects of mitomycin C on sister chromatid exchange in normal and Bloom's syndrome cells, *Mutat. Res.*, **49**: 233-238, 1978.
- [140] SHIRAISHI Y., Chromosome aberrations by monomeric acrylamide in bone marrow and germ cells of mice, *Mutat. Res.*, **57**: 313-324, 1978.
- [141] SOLOMON E., BOBROW M., Sister chromatid exchanges — a sensitive assay of agents damaging human chromosomes, *Mutat. Res.*, **30**: 273-278, 1975.
- [142] SPERLING K., WEGNER R. D., RIEHM H., OBE G., Frequency and distribution of sister-chromatid exchanges in a case of Fanconi's anemia, *Human-genetik*, **27**: 227-230, 1975.
- [143] STETKA D., WOLFF S., Sister chromatid exchange as an assay for genetic damage induced by mutagen-carcinogens. In vitro test for compounds requiring metabolic activation, *Mutat. Res.*, **41**: 343-350, 1976.
- [144] STETKA D. G., CARRANO A. V., The interaction of Hoechst 33258 and BrdU substituted DNA in the formation of sister chromatid exchanges, *Chromosoma*, **63**: 21-31, 1977.
- [145] STETKA D. G., MINKLER J., CARRANO A. U., Induction of long-lived chromosome damage, as manifested by sister-chromatid exchanges, in lymphocytes of animals exposed to mitomycin-C, *Mutat. Res.*, **51**: 383-396, 1978.
- [146] STOLL C., Effect of vincristine on sister chromatid exchanges of normal human lymphocytes, *Cancer Res.*, **36**: 2710-2713, 1976.
- [147] STOLL C., BORGAONKAR D. S., BIGEL P., Sister chromatid exchanges in balanced translocation carriers and in patients with unbalanced karyotypes, *Hum. Genet.*, **37**: 27-32, 1977.
- [148] TAKAYAMA S., SAKANISHI S., Differential Giemsa staining of sister chromatids after extraction with acids, *Chromosoma*, **64**: 109-115, 1977.
- [149] TAKEHISA S., WOLFF S., The induction of sister chromatid exchanges in Chinese hamster ovary cells by prolonged exposure to 2-acetylaminofluorene and S-9 mix, *Mutat. Res.*, **58**: 103-106, 1978.
- [150] TAYLOR J. H., Sister chromatid exchanges in tritium-labelled chromosomes, *Genetics*, **43**: 515-529, 1958.
- [151] TEASE C., Cytological detection of crossing-over in BUdR substituted meiotic chromosomes using the fluorescent plus Giemsa technique, *Nature*, **272**: 823-824, 1978.
- [152] TICE R., CHAILLET J., SCHNEIDER E. L., Evidence derived from sister chromatid exchanges of restricted rejoining of chromatid subunits, *Nature*, **265**: 642-644, 1975.
- [153] TICE R., CHAILLET J., SCHNEIDER E. L., Demonstration of spontaneous sister chromatid exchanges in vivo, *Exp. Cell Res.*, **102**: 426-429, 1976.
- [154] TICE R., WINDLER G., RARY J. M., Effect of cocultivation on sister chromatid exchange frequencies in Bloom's syndrome and normal fibroblast cells, *Nature*, **273**: 538-540, 1978.

- [155] THUST R., WARZOK R., GRUND E., MENDEL J., Use of human-liver microsomes from kidney-transplant donors for the induction of chromatid aberrations and sister-chromatid exchanges by means of precarcinogens in Chinese hamster cells in vitro, *Mutat. Res.*, **51**: 397-402, 1978.
- [156] VEDA N., VENAKA H., AKEMATSU T., SUGIYAMA T., Parallel distribution of sister chromatid exchanges and chromosome aberrations, *Nature*, **262**: 581-583, 1976.
- [157] VOGEL W., BAUKNECHT T., Differential chromatid staining by in vivo treatment as a mutagenicity test system, *Nature*, **260**: 448-449, 1976.
- [158] — Effects of caffeine on sister chromatid exchange (SCE) after exposure to UV light or trazuquone studied with a fluorescence plus Giemsa (FPG) technique, *Hum. Genet.*, **40**: 193-198, 1978.
- [159] VOGEL W., SCHEMPP W., PUEL U., Silver-staining specificity in metaphase after incorporation of 5-bromodeoxyuridine (BUdR), *Human Genet.*, **40**: 199-203, 1978.
- [160] VULPIS N., PURROT R. J., LLOYD D. C., The use of harlequin staining to assess radiation effects on the in vitro cell cycle kinetics of human lymphocytes, *Mutat. Res.*, **51**: 145-148, 1978.
- [161] WANG H. C., MUKERJI S., Dotted chromosomes produced in sodium phosphate solution supersaturated with NaHCO₃, *Chromosoma*, **58**: 263-267, 1976.
- [162] WIENBERG J., BrdU-Giemsa technique for the differentiation of sister chromatids in somatic cells of *Drosophila melanogaster*, *Mutat. Res.*, **44**: 283-286, 1977.
- [163] WOLFF S., PERRY P., Differential Giemsa staining of sister chromatids and study of sister chromatid exchanges without autoradiography, *Chromosoma*, **48**: 341-353, 1974.
- [164] WOLFF S., BODYCOTE J., PAINTER R. B., Sister chromatid exchanges induced in Chinese hamster cells by UV irradiation of different stages of the cell cycle. The necessity for cells to pass through S, *Mutat. Res.*, **25**: 78-81, 1974.
- [165] WOLFF S., PERRY P., Insights on chromosome structure from sister chromatid exchange ratios and the lack of both isolabelling and heterolabelling as determined by the FPG technique, *Exp. Cell Res.*, **93**: 23-30, 1975.
- [166] WOLFF S., BODYCOTE J., THOMAS G. H., CLEAVER J. E., Sister chromatid exchange in *Xeroderma pigmentosum* cells that are defective in DNA excision repair or post-replication repair, *Genetics*, **81**: 349-355, 1975.
- [167] WOLFF S., BODYCOTE J., The induction of chromatid deletions in accord with the breakage-and-reunion hypothesis, *Mutat. Res.*, **29**: 85-91, 1975.
- [168] WOLFF S., RODIN B., CLEAVER J. E., Sister chromatid exchanges induced by mutagenic carcinogen in normal and xeroderma pigmentosum cells, *Nature*, **265**: 347-349, 1977.
- [169] WOLFF S., RODIN B., Saccharin — induced sister chromatid exchanges in Chinese hamster and human cells, *Science*, **200**: 543-545, 1978.
- [170] WOLFF-SCHREINER E. C., CARTER M., SCHWARZACHER H. G., WOLFF K., Sister chromatid exchanges in photochemotherapy, *J. Invest. Dermatol.*, **69**: 387-391, 1977.
- [171] YU C. W., BORGAONKAR D. S., Normal rate of sister chromatid exchange in Down syndrome, *Clin. Genet.*, **11**: 397-401, 1977.
- [172] ZACK G. W., SPRIET J. A., LATT S. A., GRANLUND G. H., YOUNG I. T.,

- Automatic detection and localization of sister chromatid exchanges, *J. Histochem. Cytochem.*, **24**: 168-177, 1976.
- [173] ZAKHAROV A. F., EGOLINA N. A., Differential spiralization along mitotic chromosomes. I. BUDR-revealed differentiation in Chinese hamster chromosomes, *Chromosoma*, **38**: 341-365, 1972.
- [174] ZAKHAROV A. F., BARANOVSKAYA L. I., IBRAIMOV A. I., BENJUSCH V. A., DEMITSEVA V. S., OBLAPENKO N. G., Differential spiralization along mammalian mitotic chromosomes. II. 5-bromodeoxyuridine revealed differentiation in human chromosomes, *Chromosoma*, **44**: 343, 1974.

Otrzymano: 8 lutego 1980.

Przyjęto: 26 lutego 1980.

Adres autorów: 9 Maja 1, 90 - 647 Łódź.

MOŻLIWOŚCI ZASTOSOWAŃ SPEKTROSKOPII DIELEKTRYCZNEJ W BADANIACH BIOLOGICZNYCH

THE POSSIBILITY OF APPLICATION OF DIELECTRIC SPECTROSCOPY TO BIOLOGICAL RESEARCHES

Józef TERLECKI

Instytut Biologii Medycznej Akademii Medycznej w Gdańsku

Streszczenie. W artykule przedstawiono elementy spektroskopii dielektrycznej pod kątem zastosowań w badaniach układów biologicznych, z ukazaniem zależności wielkości fizycznych charakteryzujących oddziaływanie pola elektromagnetycznego z obiektami biologicznymi od ich struktury. Ponadto artykuł zawiera krótki przegląd zastosowań metod spektroskopii dielektrycznej w badaniach biologicznych podstawowych i praktycznych.

Summary. In this article the elements of dielectric spectroscopy in view of their application to the researches of biological systems has been presented. There has been shown the dependences of physical quantities, characterizing the electrical field interaction with biological objects on their structure. Furthermore this article contains a short review of application of dielectric spectroscopy methods in basical and practical biological reserches.

1. WPROWADZENIE

Ogólnie spektroskopię dielektryczną można określić jako ten dział spektroskopii, którego przedmiotem są badania oddziaływań długofalowej części widma elektromagnetycznego (od ułamków Hz do kilkuset GHz) z cząsteczkami i układami cząsteczek.

Podstawowymi metodami badań są pomiary dyspersji¹ przewodności i przenikalności elektrycznej substancji.

W zastosowaniach do biologii spektroskopia dielektryczna obejmuje badania oddziaływań pola elektromagnetycznego z układami biologicznymi o różnych poziomach organizacji, od molekuł do całych organizmów żywych. Ze względu na złożoną strukturę tych układów i związane z nią specyficzne właściwości elektryczne,

¹ Dyspersja oznacza zależność od częstotliwości pola.

stopień trudności w opracowaniu modeli matematycznych dyspersji układów biologicznych i wymagania odnośnie do techniki pomiarowej są znacznie większe niż w klasycznej spektroskopii dielektrycznej.

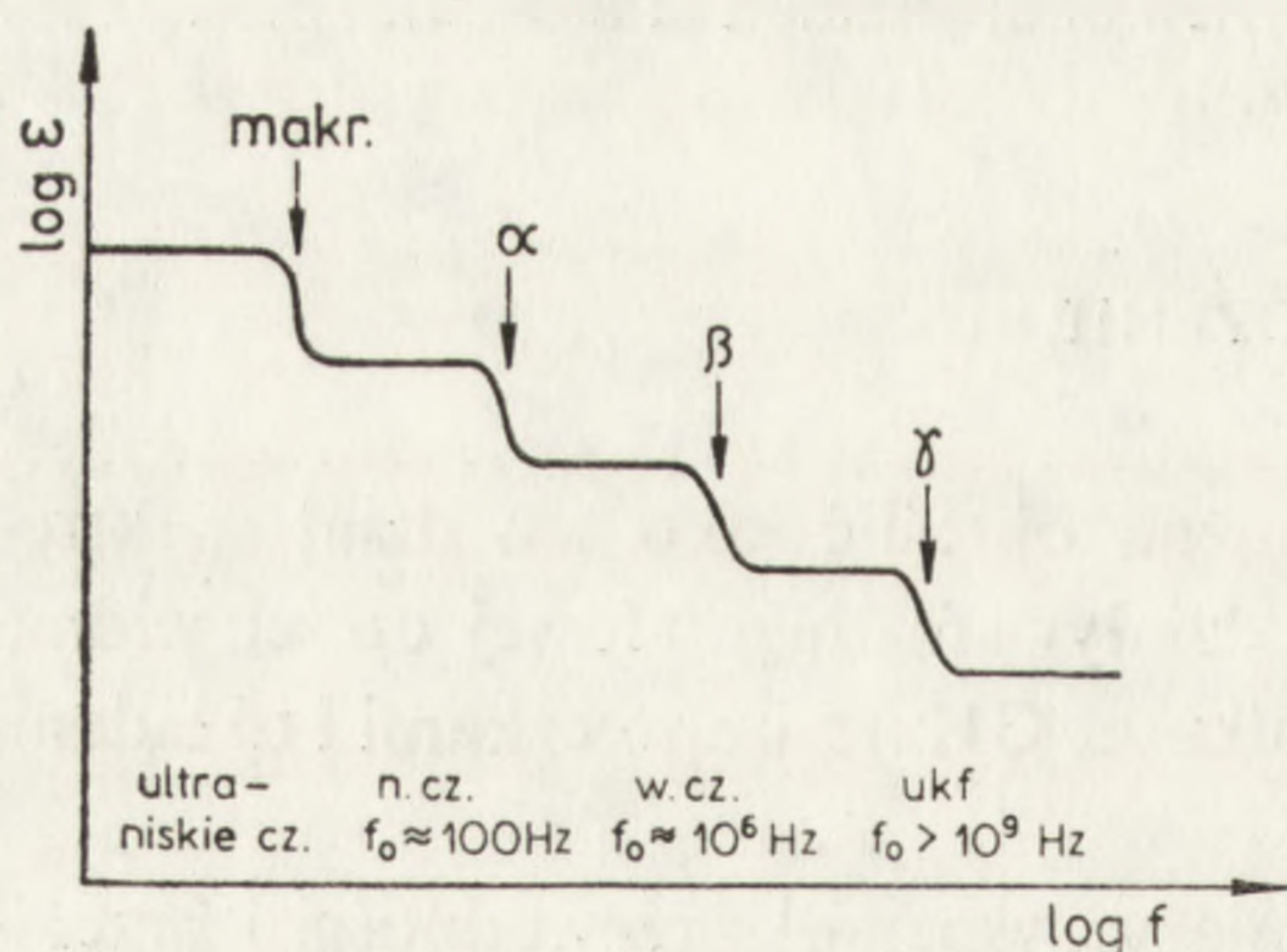
Mimo wspomnianych trudności wykonane zostały już prace, w których z powodzeniem wykorzystano wyniki pomiarów dyspersji wielkości elektrycznych biernych w badaniach struktury komórek i procesów wewnątrzkomórkowych. Niektóre z publikacji wskazują na szerokie możliwości wykorzystania spektroskopii dielektrycznej w biologii i medycynie.

2. GŁÓWNE ZAKRESY DYSPERSJI PRZEWODNOŚCI (κ) I PRZENIKALNOŚCI ELEKTRYCZNEJ (ϵ)

Tkanki żywe o dużej i średniej zawartości wody traktowane są często modelowo jako zawiesiny komórek w płynie pozakomórkowym. Wykazują one szereg typowych obszarów anomalnej dyspersji przewodności i przenikalności elektrycznej. Główne zakresy dyspersji przenikalności elektrycznej przedstawia schematycznie ryc. 1. Przebieg dyspersji przewodności jest w przybliżeniu symetryczny, tzn. poszczególnym obszarom dyspersji ϵ , dla których pochodna ϵ względem długości fali λ $d\epsilon/d\lambda > 0$, odpowiadają obszary dyspersji κ charakteryzujące się $d\kappa/d\lambda < 0$.

Początkowy obszar dyspersji (makroskopowej) stanowi superpozycję kilku zakresów, które doświadczalnie trudno jest oddzielić od polaryzacji elektrodowej². Nie ma dotychczas teorii wyjaśniającej zjawiska dyspersyjne w zakresie ultraniskich częstotliwości.

Obszar α -dyspersji obejmuje niskie częstotliwości. Częstotliwość relaksacyjna³



Ryc. 1. Zakresy dyspersji przenikalności elektrycznej tkanki biologicznej

² Polaryzacja elektrodowa jest procesem wywołanym przepływem prądu elektrycznego przez granicę układu elektroda-elektrolit, prowadzącym do zmian stanu powierzchni elektrody i jej potencjału elektrycznego.

³ Częstotliwość relaksacyjna f_0 ogólnie charakteryzuje proces przejścia układu ze stanu nierównowagi termodynamicznej do stanu równowagi. Częstotliwości tej odpowiada tzw. okres relaksacji $\tau_0 = 1/2\pi f_0$. Jeżeli odchylenie od stanu równowagi następuje pod wpływem pola elektrycznego (np. uporządkowanie dipoli), to τ_0 oznacza czas, po którego upływie od momentu wyłączenia pola odchylenie to zmaleje e -krotnie ($e = 2,72$).

f_0 (średnia) tej dyspersji zależy m. in. od wymiarów komórek (cząstek biologicznych) i od struktury elektrycznej ich warstw powierzchniowych.

Czasowo zależna polaryzacja warstwy granicznej występująca między cząstką i ośrodkiem wpływa na wartość częstotliwości relaksacyjnej tego zakresu. Opis matematyczny α -dyspersji podał Schwarz [23] dla układu modelowego zawiesiny cząstek w roztworach elektrolitu, wprowadzając zależną od częstotliwości elektryczną impedancję⁴ powierzchniową cząstek.

Obszar β -dyspersji obejmuje częstotliwości od kilku kHz do około 30 MHz, z częstotliwością środkową $f_0 \approx 1$ MHz. Źródłem tej dyspersji jest niejednorodna struktura elektryczna tkanki biologicznej i zawiera ona informacje o błonach komórkowych.

β -dyspersja jest teoretycznie stosunkowo najlepiej opracowana. Teorie Pauliego i Schwana [17], Bielicz i współautorów [3] oraz Irimajiri i współautorów [9] umożliwiają w tym zakresie m. in. określenie parametrów elektrycznych (κ , ϵ) tkanek na podstawie znanych parametrów komórek i odwrotnie.

Dyspersja γ występuje w zakresie fal centymetrowych, z częstotliwością charakterystyczną f_0 powyżej 1 GHz. Jest ona związana głównie z właściwościami polarnymi molekuł wody wolnej. Np. w temperaturze 310 K częstotliwość relaksacyjna wolnej wody komórkowej wynosi około 25 GHz. Poza uwidocznionymi na rys. 1 zakresami dyspersji, obserwuje się również słabiej zaznaczone relaksacje tzw. wody związanej, biomolekuł i struktur subkomórkowych. Częstotliwości relaksacyjne wody związanej leżą w granicach 10^2 - 10^3 MHz.

3. ZALEŻNOŚĆ PARAMETRÓW CHARAKTERYZUJĄCYCH DYSPERSJE κ ORAZ ϵ OD STRUKTURY SUBSTANCJI BIOLOGICZNEJ

3.1 ŚREDNI OKRES RELAKSACJI τ_0 LUB CZĘSTOTLIWOŚĆ CHARAKTERYSTYCZNA f_0

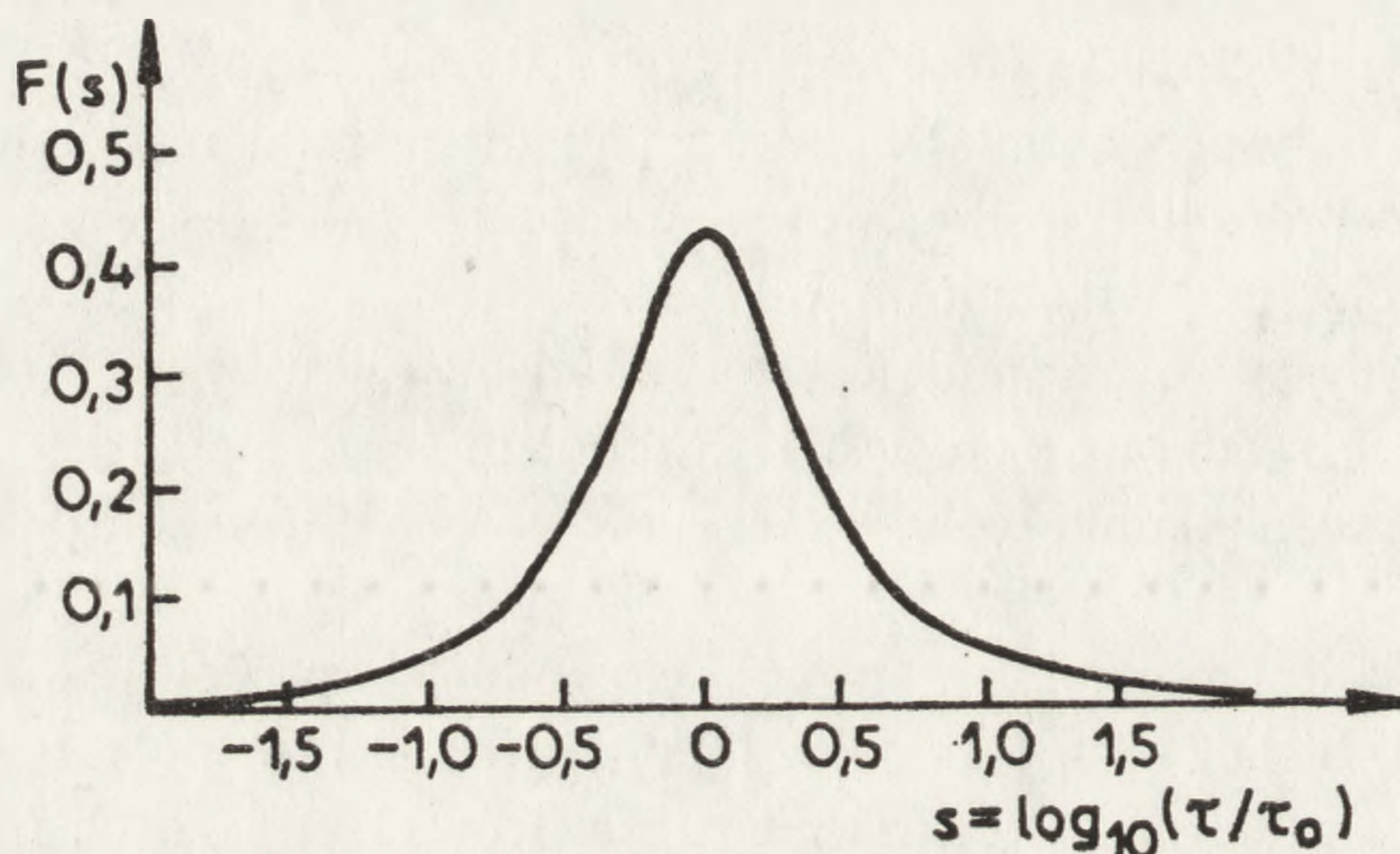
Substancja, dla której stwierdzono by pojedynczy okres relaksacji, musiałaby się składać z identycznych elementów strukturalnych, między którymi nie występowałyby żadne oddziaływania. W tkankach biologicznych występuje zarówno zróżnicowanie wymiarów strukturalnych, jak i wzajemne oddziaływanie, co prowadzi do widma czasów relaksacji, które daje się opisać funkcją podaną przez Cole'a-Cole'a. Funkcję tę, przedstawioną graficznie na ryc. 2, charakteryzują średni okres relaksacji τ_0 ($\tau_0 = 1/2\pi f_0$) i pewien parametr α . Wartość tego parametru leży w granicach od zera do jedności.

W obszarze α -dyspersji znana jest następująca relacja między promieniem R cząstki zawiesiny modelowej i częstotliwością f_0 [22]:

⁴ Impedancja elektryczna oznacza opór wypadkowy dla prądu zmiennego, który dla substancji biologicznej utworzony jest z oporu rzeczywistego (rezystancji) i oporu pojemnościowego (reaktancji pojemnościowej). Odwrotność impedancji nazywamy admitancją. W przypadku warstwy granicznej między cząstką i elektrolitem, w opisie jej właściwości elektrycznych biernych, podaje się jej opór elektryczny i pojemność elektryczną lub wartość impedancji.

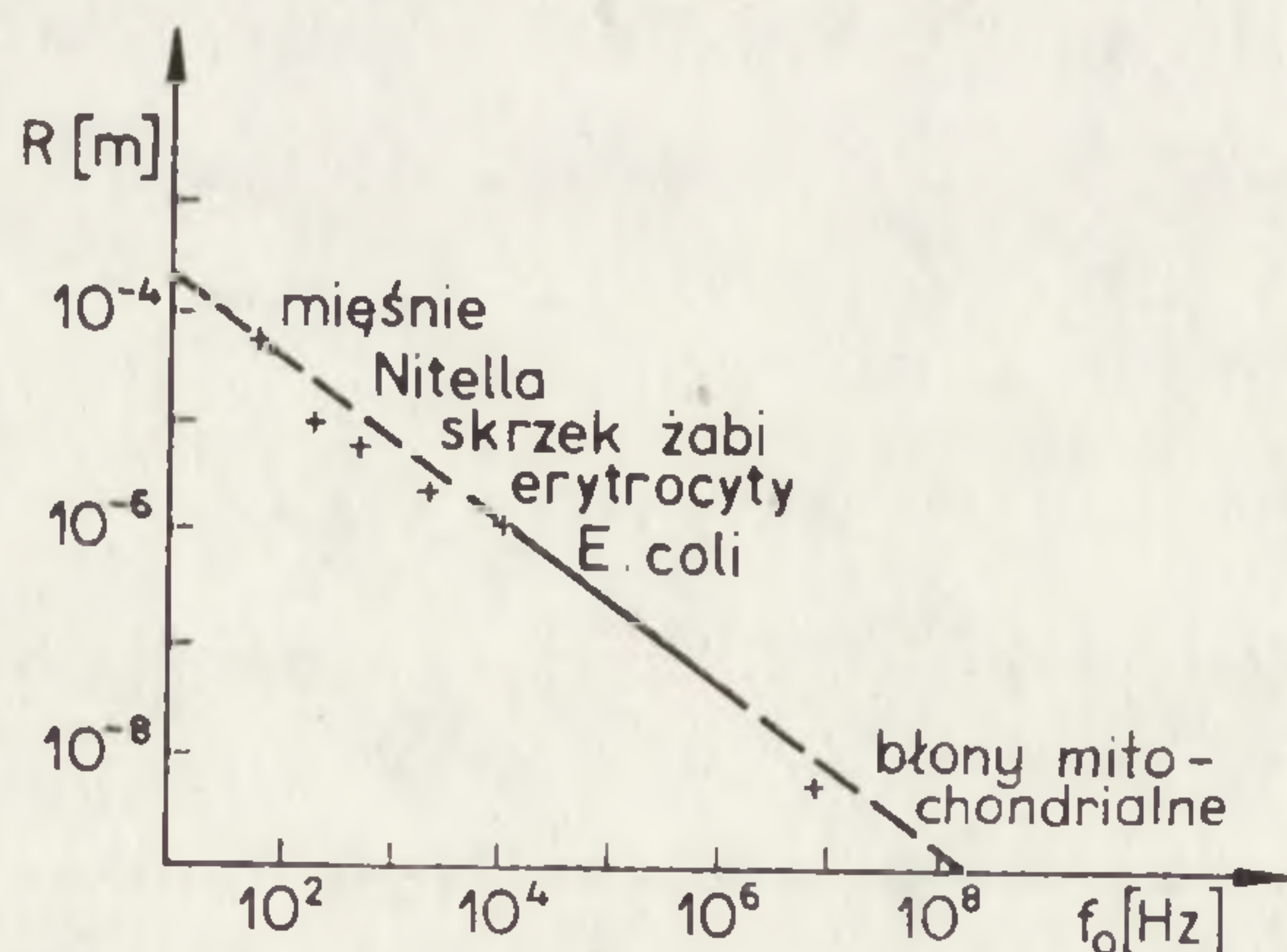
$$\log f_0 = -a \log R + b, \quad (1)$$

gdzie a, b — stałe.



Ryc. 2. Rozkład czasów relaksacji $f(s)$ obliczony dla $a = 0,23$

Zależność ta jest słuszna również dla materiału biologicznego [19]. Na ryc. 3 linia prosta przedstawia zależność (1) dla układu modelowego, natomiast punkty doświadczalne odpowiadają podanym obiektom biologicznym.



Ryc. 3. Zależność średniej częstotliwości relaksacyjnej f_0 od średnicy cząstek układu modelowego (linia prosta). Punkty doświadczalne wg pracy [19]

W obszarze β -dyspersji wartość okresu relaksacji τ_0 uwarunkowana jest w pierwszej kolejności właściwościami elektrycznymi κ_0, ϵ_0 błony komórkowej ($\tau_0 \approx R_b C_b$); dokładne wyrażenie na τ_0 zawiera teoria [17]. Tkanki, których część komórek posiada zmienione lub uszkodzone błony cytoplazmatyczne, wykazują zmianę rozkładu czasów relaksacji i odpowiednio inne wartości τ_0 .

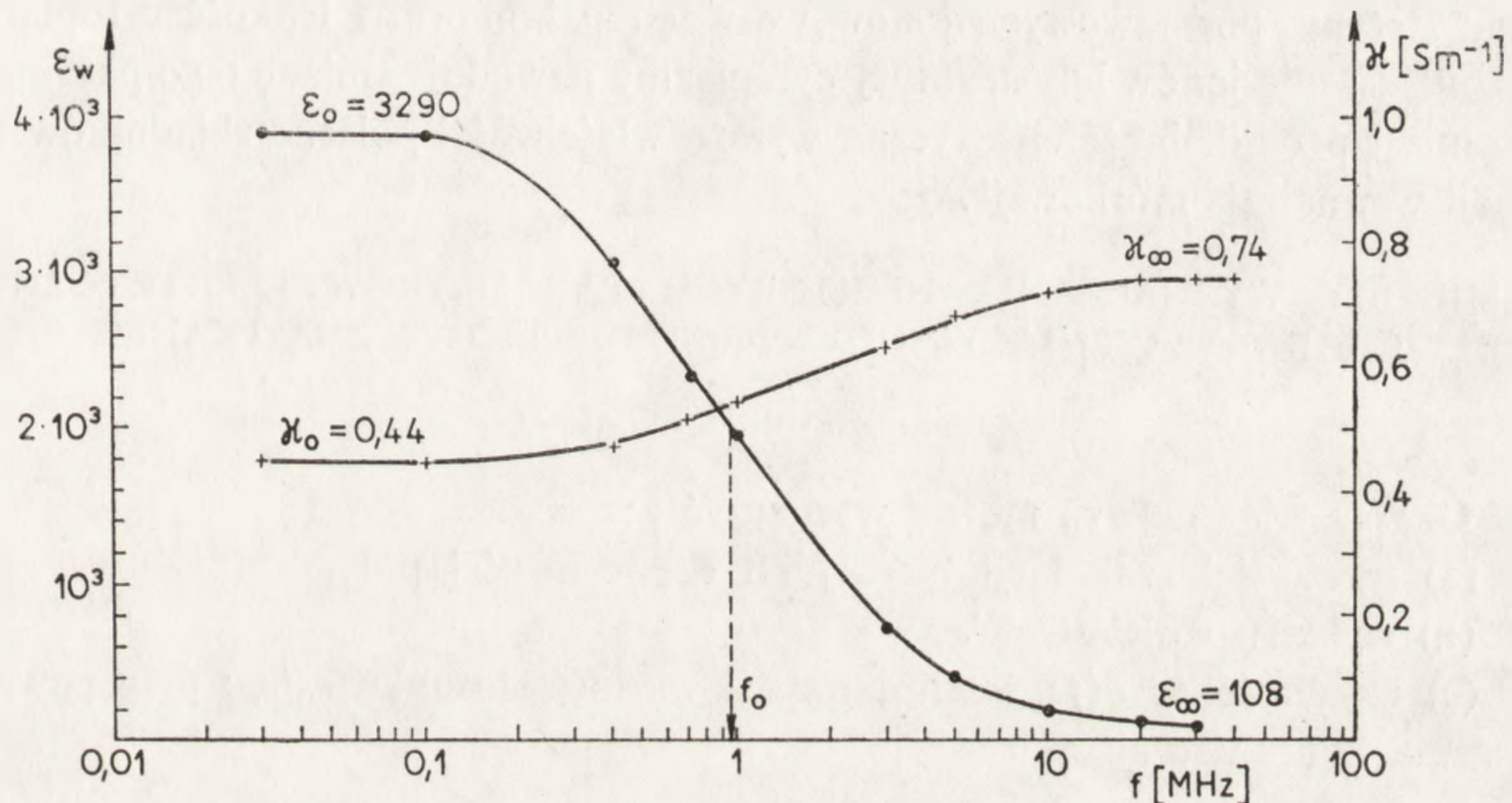
3.2. PARAMETR ROZKŁADU CZASÓW RELAKSACJI

Parametr a zawiera składnik strukturalny oraz składnik wyrażający oddziaływanie cząstek. Empirycznie stwierdzono, że ze wzrostem stopnia zróżnicowania kształtów komórek a rośnie.

3.3. WARTOŚCI GRANICZNE (ϵ_0 , ϵ_∞), (κ_0 , κ_∞)

Wartości graniczne ϵ i κ mierzone są po obu stronach wybranego obszaru dyspersji (ryc. 4).

Poniżej pasma dyspersji β ze wzrostem wielkości cząstek ϵ_0 rośnie i zmienia się znacznie w procesie autolizy. ϵ_0 zależy tu również od stopnia agregacji komórek.



Ryc. 4. Dyspersja przewodności elektrycznej właściwej κ i przenikalności elektrycznej ϵ (względnej) w pasmie β [2]

Poniżej pasma β procesowi obumierania komórek towarzyszy wzrost przewodności κ_0 tkanek. Zwykle stosowane są jako parametry charakteryzujące zmiany strukturalne czy nawet fizjologiczne zachodzące w tkance różnice $\epsilon_0 - \epsilon_\infty$ lub $\kappa_\infty - \kappa_0$ oraz stosunki $\epsilon_0/\epsilon_\infty$ lub κ_∞/κ_0 .

3.4. TANGENS δ

Ogólnie, współczynnik stratności $\text{tg } \delta$ stosuje się do określenia strat energii elektrycznej w próbce umieszczonej w polu elektrycznym kondensatora. Jest on odwrotnością $\text{tg } \varphi$, gdzie φ oznacza kąt przesunięcia fazowego między natężeniem prądu płynącego przez kondensator z próbką i napięciem na tym kondensatorze.

Zależność częstotliwościowa $\text{tg } \delta$ dla obiektów biologicznych wykazuje charakterystyczne maksima. Częstotliwość f_m , dla której występuje maksimum, zależy od czasów relaksacji elementów struktury komórek; na ogół ze wzrostem stopnia uszkodzenia tkanki maleje τ_0 i wzrasta f_m . Wysokość obserwowanych maksimów wiąże się również ze stanem struktury tkanki, np. krioefekty czy autoliza powodują wzrost maksimum $\text{tg } \delta$, przy czym maksimum przesuwa się w kierunku wyższych częstotliwości. Metoda $\text{tg } \delta$ ze względu na prostotę pomiaru jest szczególnie przydatna w tych

przypadkach, gdy chodzi o obserwację względnych zmian strukturalnych obiektów biologicznych.

3.5. PRZEWODNOŚĆ I PRZENIKALNOŚĆ ELEKTRYCZNA WŁAŚCIWA SUBSTANCJI WEWNĄTRZKOMÓRKOWEJ

Przewodność elektryczna właściwa substancji wewnątrzkomórkowej odzwierciedla stężenia podstawowych jonów we wnętrzu komórki i lepkość cytoplazmy. Zmiana stężenia jonów lub struktury cytoplazmy powoduje zmianę tego parametru. Natomiast przenikalność elektryczna wyraża właściwości polarne składników substancji wewnątrzkomórkowej⁵.

4. METODY WYZNACZANIA NIEKTÓRYCH PARAMETRÓW ELEKTRYCZNYCH CHARAKTERYZUJĄCYCH DYSPERSJĘ DIELEKTRYCZNĄ TKANEK

4.1. ŚREDNI OKRES RELAKSACJI

Okresy relaksacji τ_0 można wyznaczyć z:

(a) zależności reaktancji biernej od częstotliwości pola,

(b) wykresu Cole'a-Cole'a,

(c) zależności $\text{tg } \delta(f)$, jeżeli dana jest wartość stosunku $\epsilon_0/\epsilon_\infty$; przy pewnych założeniach upraszczających

$$\tau_0 \approx \frac{1}{2\pi f_m} (\epsilon_0/\epsilon_\infty)^{\frac{1}{2(1-a)}}, \quad a \approx \frac{2}{\pi} \left(\frac{1}{\text{tg } \delta_m} - e^{-\frac{1}{2} \ln(\epsilon_0/\epsilon_\infty)} \right), \quad (2)$$

gdzie f_m oznacza częstotliwość, przy której $\text{tg } \delta$ osiąga maksimum. Stosowane są również inne sposoby wyznaczania τ_0 .

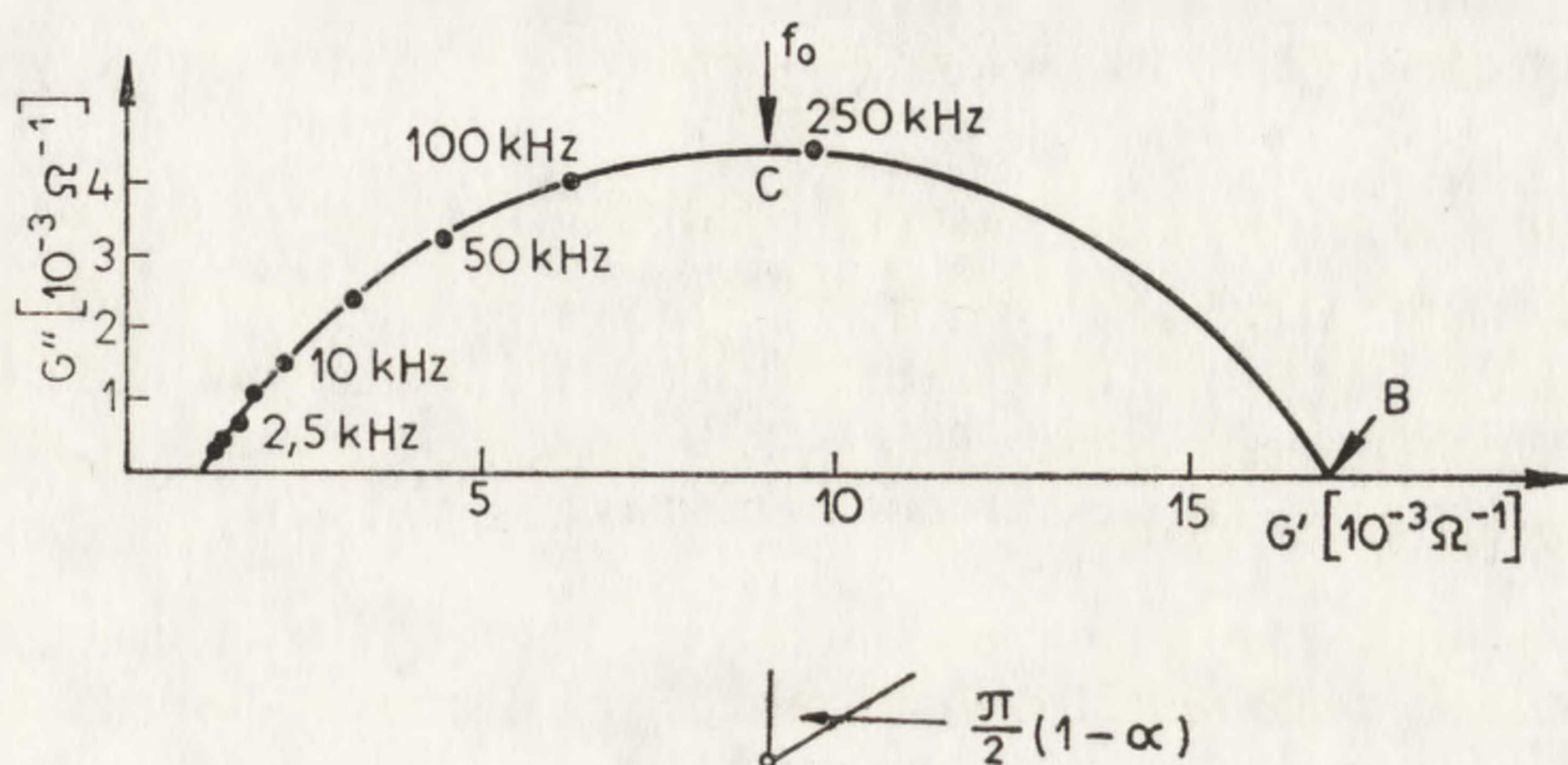
Szerszego omówienia wymaga wykres Cole'a-Cole'a. Jest to wektorowy wykres kołowy zależności częstotliwościowej admitancji, impedancji lub przenikalności elektrycznej. Wykresy takie konstruuje się następująco (ryc. 5): traktując formalnie wybraną wielkość jako zespoloną, np. admitancję G^* jako sumę części rzeczywistej $G'(\omega)$ i urojonej $G''(\omega)$ — $G^*(\omega) = G'(\omega) + jG''(\omega)$ — odkładamy na osi odciętych wartości $G'(\omega)$ dla poszczególnych częstotliwości, a na osi rzędnych — wartości admitancji biernej dla tych samych częstotliwości. Tak odłożone punkty na obu osiach wyznaczają współrzędne punktów na płaszczyźnie zespolonej dla wybranych częstotliwości pomiarowych. Łącząc te punkty otrzymujemy tzw. łuk Cole'a-Cole'a, którego środek (punkt 0) dla tkanek żywych leży poniżej osi odciętych.

Podobnie konstruuje się taki wykres dla przenikalności elektrycznej zespolonej, przy czym składową urojoną tej wielkości ϵ'' oblicza się ze wzoru

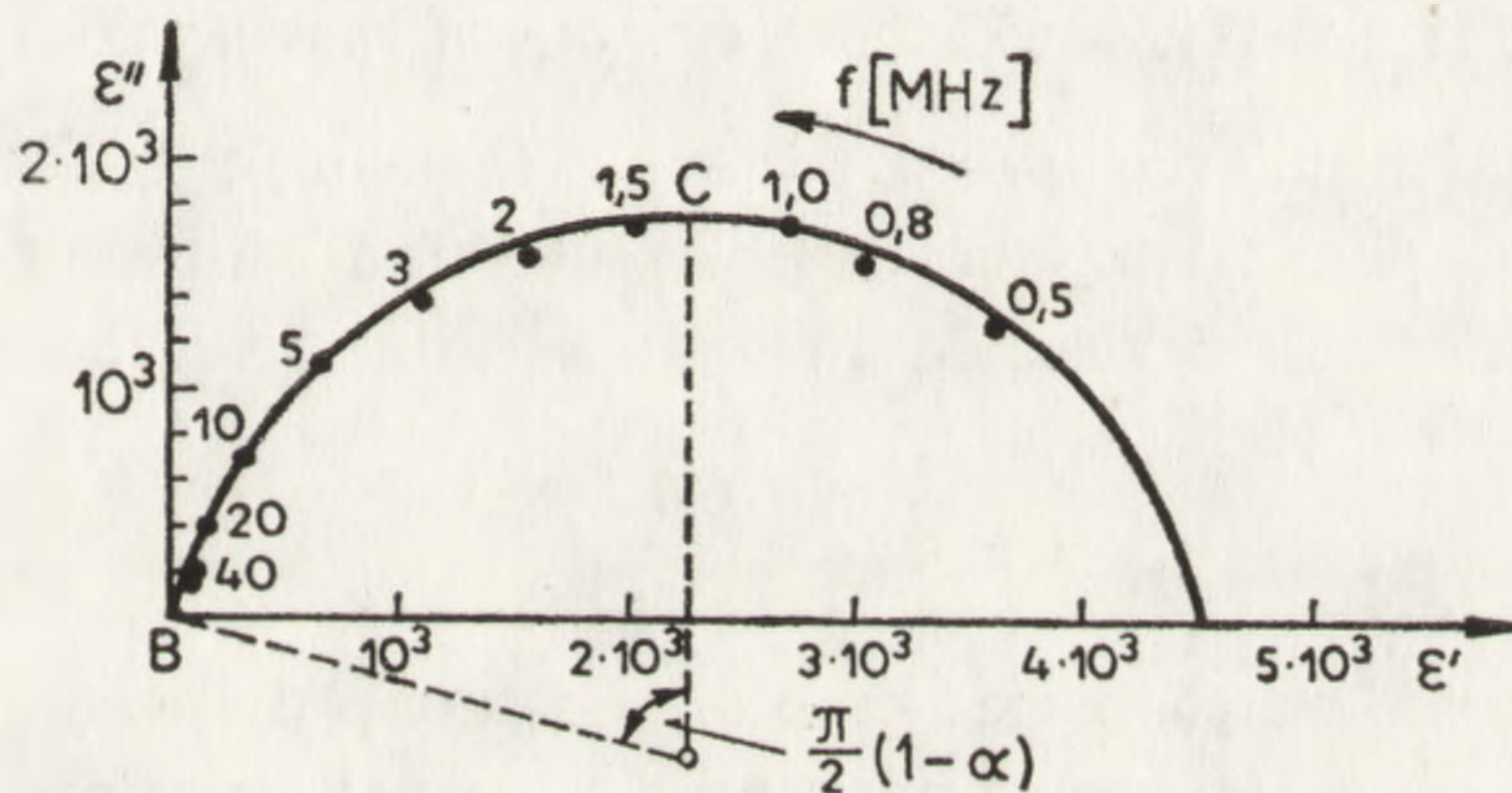
$$\epsilon'' = \frac{\kappa}{2\pi f \epsilon_0},$$

⁵ Substancją wewnątrzkomórkową przyjęto tu nazywać wszystkie elementy komórki (cytoplazma i substancja zawarta w organelach) z pominięciem błony cytoplazmatycznej i błon otaczających organelle.

gdzie κ oznacza tu przewodność elektryczną właściwą tkanki, pomniejszoną o przewodność próbki dla prądu stałego, ϵ_0 — przenikalność elektryczną próżni (ryc. 6).



Ryc. 5. Zespolona admitancja elektryczna



Ryc. 6. Zespolona przenikalność elektryczna

Po wyznaczeniu z wykresu f_0 , odpowiadającego maksimum łuku (punkt G), obliczamy średni czas relaksacji ze wzoru

$$\tau_0 = \frac{1}{2\pi f_0},$$

Za pomocą takich wykresów wyznacza się również parametr rozkładu czasów relaksacji α . Jak widać z ryc. 5 i 6, kąt, który tworzą odcinki łączące środek łuku z punktami (C, B) wynosi:

$$\Psi = \frac{\pi}{2} (1 - \alpha).$$

4.2. WSPÓŁCZYNNIK STRATNOŚCI $\text{tg } \delta$ I SKŁADOWE ADMITANCJI ELEKTRYCZNEJ

Do pomiarów zależności częstotliwościowej $\text{tg } \delta$ tkanek biologicznych można użyć specjalnych mierników stratności, które posiadają możliwość odczytu na skali bezpośrednio wartości $\text{tg } \delta$ lub odpowiednich Q -metrów (mierników dobroci obwo-

dów), z których odczyt można łatwo przeliczyć na $\operatorname{tg} \delta$. W praktyce łatwiej dostępne są odpowiednie mierniki impedancji lub admitancji, które również nadają się do tego celu. Z odczytu na skalach tych mierników otrzymuje się np. wartości modułu impedancji (Z) i kąta przesunięcia fazowego φ , za pomocą których obliczamy ewentualnie składowe admitancji

$$G' = \frac{\cos \varphi}{|Z|}, \quad G'' = \frac{\sin \varphi}{|Z|} \quad \text{lub} \quad \operatorname{tg} \delta = \frac{G'}{G''}.$$

4.3. WARTOŚCI GRANICZNE ($\varepsilon_0, \varepsilon_\infty$) (κ_0, κ_∞)

Wyznacza się je z:

- (a) bezpośrednich pomiarów na krawędziach obszarów dyspersji (zob. ryc. 4);
- (b) ekstrapolacji wykresów Cole'a-Cole'a do przecięcia z osią wartości rzeczywistych (zob. ryc. 6).

4.4. PRZEWODNOŚĆ ELEKTRYCZNA WŁAŚCIWA SUBSTANCJI WEWNĄTRZKOMÓRKOWEJ (κ_i)

- (a) Bezpośredni pomiar wypreparowanej cytoplazmy;
- (b) bezpośredni pomiar przy użyciu mikroelektrod wkłuwanych do komórki;
- (c) pomiar pośredni bezuszkodzeniową metodą dwuczęstotliwościową [13]

$$\kappa_i = \kappa_z + a \frac{\kappa_z(\kappa_\infty - \kappa_0)}{\kappa_z - \kappa_0}, \quad (3)$$

gdzie κ_0 i κ_∞ oznaczają wartości graniczne dla obszaru β -dyspersji, κ_z — przewodność właściwą substancji międzykomórkowej, a — współczynnik empiryczny.

4.5. PRZENIKLIWOŚĆ ELEKTRYCZNA SUBSTANCJI WEWNĄTRZKOMÓRKOWEJ

- (a) Bezpośredni pomiar wypreparowanej cytoplazmy;
- (b) pomiar pośredni bezuszkodzeniową metodą dwuczęstotliwościową [2]:

$$\varepsilon_i = \varepsilon_z + a \frac{\varepsilon_z(\varepsilon_\infty - \varepsilon_0)}{\varepsilon_z - \varepsilon_0}. \quad (4)$$

Użyte indeksy mają takie same znaczenie jak we wzorze (3).

5. PRZYKŁADY ZASTOSOWAŃ SPEKTROSKOPII DIELEKTRYCZNEJ W BADANIACH BIOLOGII KOMÓRKI

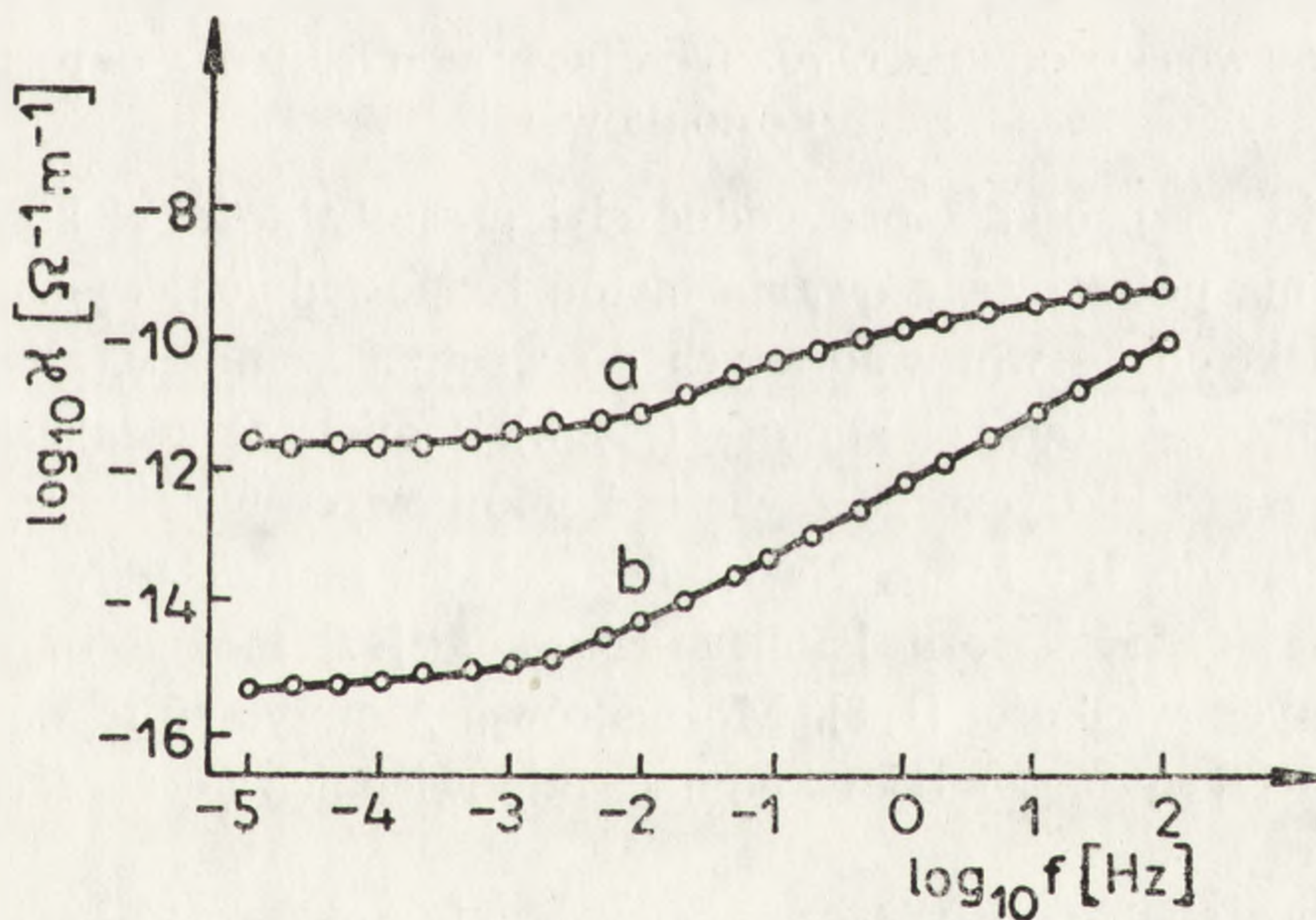
Większość prac dotyczących praktycznego wykorzystania spektroskopii dielektrycznej w biologii i medycynie została wykonana w latach siedemdziesiątych. Jako materiał badawczy stosowano najczęściej stosunkowo łatwo dostępną krew ludzką. Opracowane dotychczas metody nie znalazły dotychczas szerszego zastosowania prawdopodobnie dlatego, że nie są jeszcze szerszej znane. Autorzy publikacji

z tej dziedziny spodziewają się (nie bez racji), że w wyniku dalszych badań zakres możliwości zastosowań tej metody znacznie wzrośnie.

5.1. BADANIA WŁASNOŚCI ELEKTRONOWYCH KOMPLEKSÓW BIAŁKOWO-METYLOGLIOKSALOWYCH

Tego rodzaju badania mają na celu w pierwszej kolejności poznanie mechanizmu przewodnictwa elektrycznego w białkach, w których pewne grupy funkcyjne aminokwasów podstawiono metyloglioksałm; chodzi tu m. in. o wyjaśnienie procesu transportu elektronów w łańcuchu oddechowym mitochondriów, w chloroplastach i w chromatoforach za pomocą badań prostszych układów modelowych.

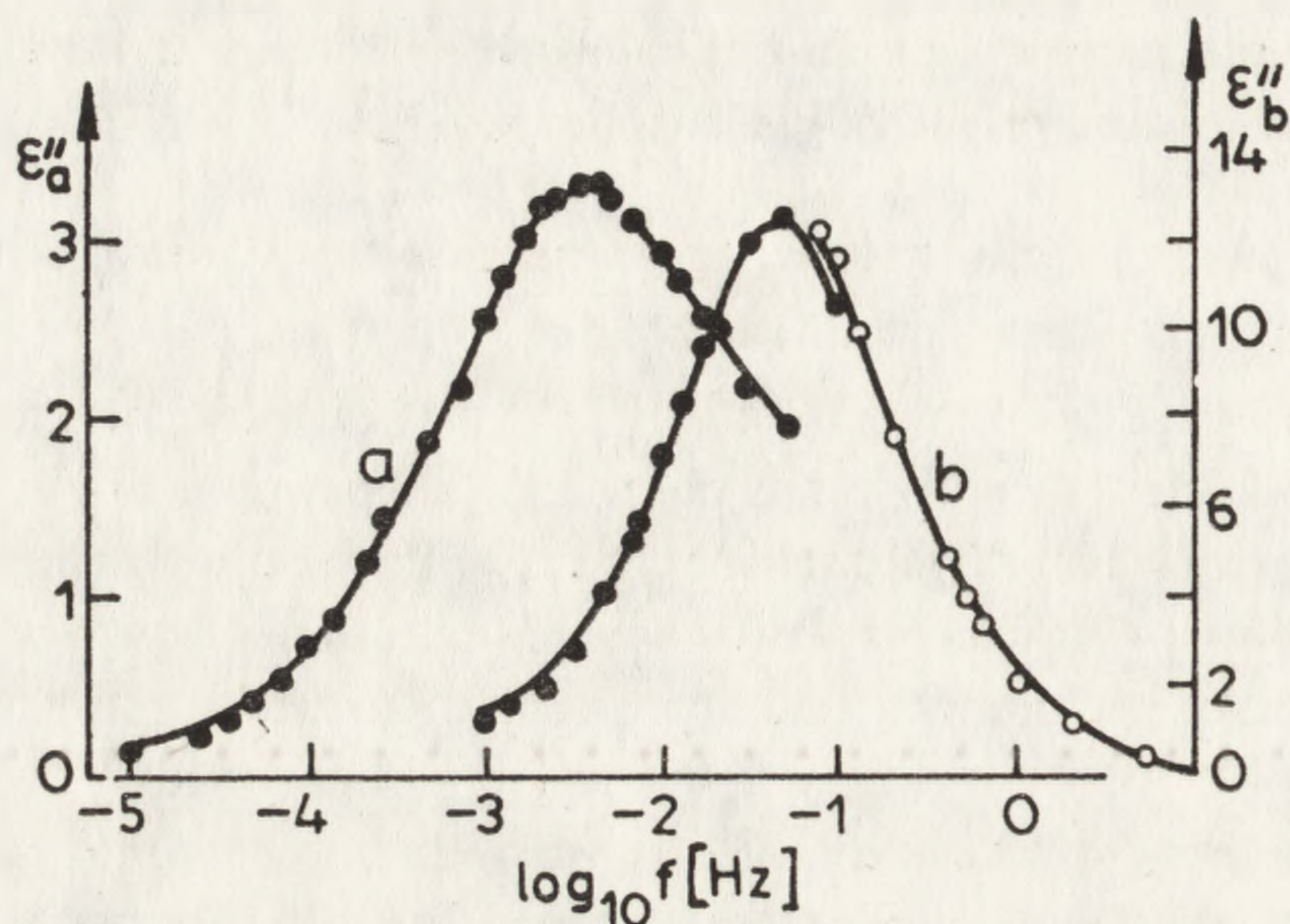
W pracach [4, 15, 16] wykorzystano metody pomiarów dyspersji przewodności elektrycznej i współczynnika strat dielektrycznych bezpośrednio do zbadania oddziaływań niektórych białek z metyloglioksałem. Przebiegi dyspersji podanych wielkości w pasmie makroskopowym, charakterystyczne dla tego rodzaju kompleksów, przedstawiają wykresy na ryc. 7 i 8.



Ryc. 7. Zależność częstotliwościowa przewodności elektrycznej właściwej w temperaturze 294 K
a - kompleksu albumina - metyloglioksał, b - albumina [4]

Dokładna, fizyczna analiza takich zależności wskazuje na wzrost aktywności elektronowej białek na skutek oddziaływania z metyloglioksałem, związanej z generacją w paśmie walencyjnym cząsteczek białek ruchliwych nośników dodatnich ładunku elektrycznego, tzw. dziur elektronowych.

Można ogólnie stwierdzić, że ten kierunek badań zmierza do pełniejszego poznania następujących, podstawowych procesów: fotosyntezy, termoluminescencji układów fotosyntetyzujących, przenoszenia elektronów w chloroplastach i w chromatoforach, roli mechanizmu tunelowego przenoszenia elektronów w funkcjonowaniu łańcucha transportu elektronów w błonach mitochondrialnych.



Ryc. 8. Zależność częstotliwościowa współczynnika strat dielektrycznych w temperaturze 294 K
 a – kompleksu kazeina-metyloglyksal, b – albumina-metyloglyksal [4]

5.2. WYZNACZANIE WIELKOŚCI ELEKTRYCZNYCH BIERNYCH (κ , ϵ) DLA CYTOPLAZMY I BŁONY KOMÓRKOWEJ

Obecnie do wyznaczania przewodności i przenikalności elektrycznej w tym problemie nie ma potrzeby stosowania metod bezpośrednich, wymagających albo użycia mikroelektrod — wprowadzanych do wnętrza komórek, albo wypreparowania elementów składowych komórki (p.4.4.). Pomiarzy zasadzają się na obserwacji zachowania się dielektrycznego zawiesin komórkowych w zakresie częstotliwości od około 10 kHz do 100 MHz. Następnie, stosując metodę numerycznej analizy wzorów wynikających z teorii Pauliego-Schwana [17] można określić wartości liczbowe badanych wielkości [1, 8]. Można również otrzymać te wartości w inny sposób; w pracy [2] wyznaczono je za pomocą odpowiednich zależności empirycznych (wzory 3 i 4).

W tabeli 1 zestawiono niektóre nowsze dane dla wybranych rodzajów komórek, otrzymane wzmiankowanymi metodami.

TABELA 1

| Rodzaj komórek | κ_i [S·m ⁻¹] | ϵ_i | ϵ_b | f [MHz] | T [K] |
|-------------------------|------------------------------------|--------------|--------------|--------------|------------|
| Erytrocyty ludzkie | 0,53 [2] | 128 [2] | — | 30 | 294 |
| Bakteria <i>E. coli</i> | — | 59 [2] | — | 100 | 299 |
| Drożdże | 0,25 [1] | 51,7 [1] | 6,5 [1] | 80 | 298 |
| Synaptosomy | | 15,7 [8] | | | |

Objaśnienia symboli:

κ_i — przewodność elektryczna właściwa cytoplazmy; ϵ_i — przenikalność elektryczna cytoplazmy; ϵ_b — przenikalność elektryczna błony komórkowej.

Wartości κ_i , ε_i zostały wyznaczone dla podanych w tabeli wartości częstotliwości i temperatury.

Badania elektrycznych parametrów fazowych κ , ε komórek mają z jednej strony na celu uściślenie modeli struktury komórek, z drugiej — uściślenie opisu niektórych procesów wewnątrzkomórkowych oraz oddziaływań pól elektromagnetycznych z komórkami i układami komórkowymi. Jak już była o tym mowa w p. 3.5, wartość przewodności elektrycznej właściwej cytoplazmy jest określona przez stężenia, ruchliwości i ładunki podstawowych jonów we wnętrzu komórki. Empiryczna wartość κ stwarza np. możliwość (przy znanych stężeniach jonów) wyznaczenia ruchliwości jonów — bardzo ważnej wielkości w problemie transportu jonów we wnętrzu komórki. Dalej, na podstawie tych danych można pokusić się np. o weryfikację podstawowego założenia w teoriach sorpcyjnych transportu kationów przez błonę komórkową, mianowicie koncepcji, według której cytoplazma jest układem koacerwatów.

Pomiary κ i ε zinterpretowane za pomocą odpowiedniej teorii stanowiły w pracy [8] podstawę do wyznaczenia struktury wewnątrzsynaptosomalnej. W tej samej pracy wykorzystano omawiane wielkości jako parametry mierzalne do kontroli wpływu środowiska — w którym zawieszano badane komórki — na substancję wewnątrzkomórkową.

W pracy [24] te same parametry pomiarowe zastosowano do detekcji wpływu promieniowania elektromagnetycznego na organizmy żywe. Badania przeprowadzono na szczurach, które poddawano działaniu pola elektromagnetycznego o częstotliwości 50 Hz przez okres 6 dni, po 4 godziny dziennie. Stwierdzono wyraźny wzrost przewodności elektrycznej substancji wewnątrzkomórkowej erytrocytów (około 13%) i obniżenie wartości jej przenikalności elektrycznej. Analiza tych wyników, przy uwzględnieniu wyników badań biochemicznych, wskazuje m. in. na zmianę struktury cytoplazmy komórkowej pod wpływem działania pola elektromagnetycznego.

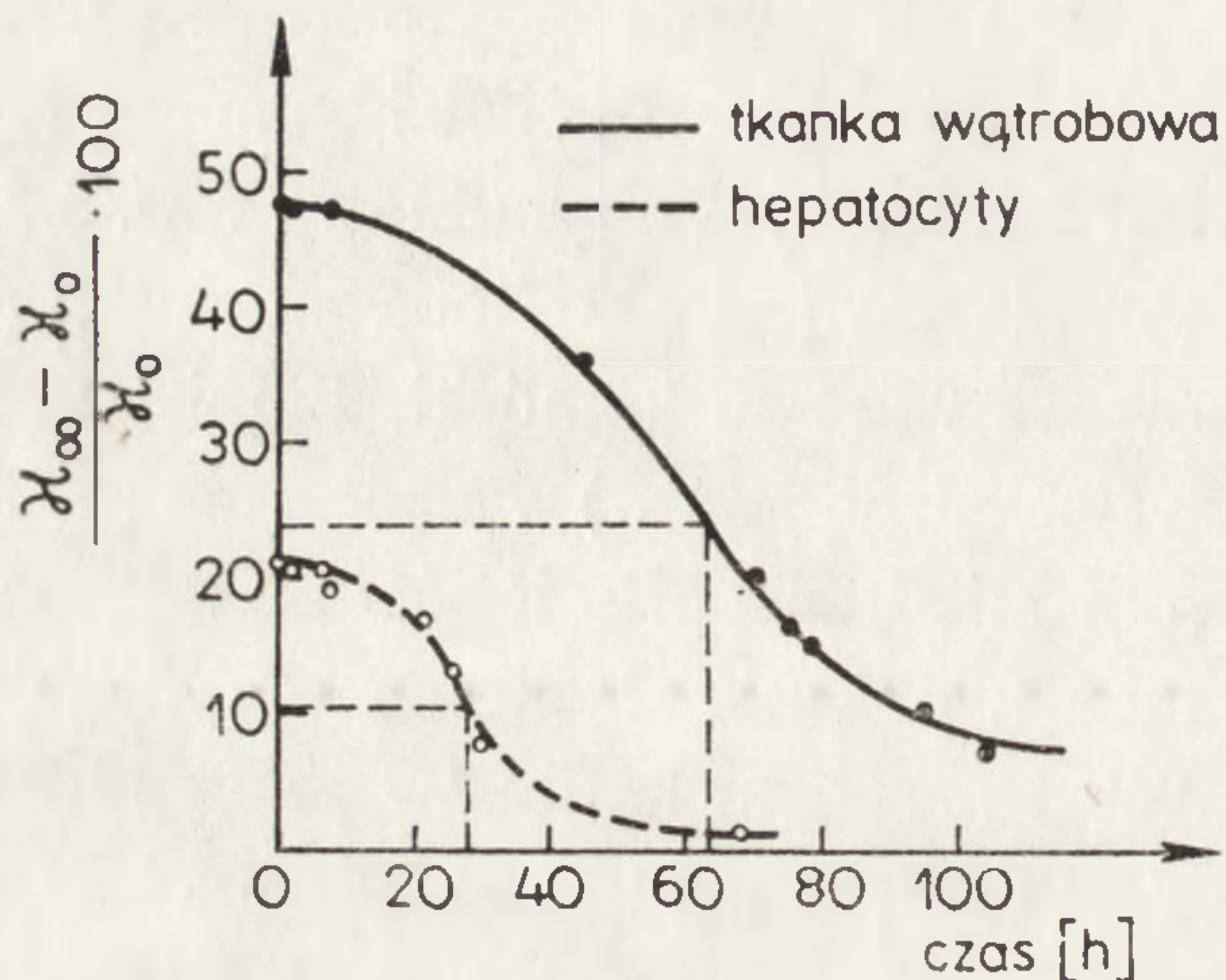
5.3. KONTROLA PRZEŻYWALNOŚCI KOMÓREK

W pracach Kozłowskiej i wsp. [11, 12] z dziedziny histochemii wykorzystano pomiary dielektryczne do kontroli przeżywalności komórek. W metodzie stosowanej przez podanych autorów miarą żywotności populacji komórek była wartość stosunku $(\kappa_\infty - \kappa_0)/\kappa_0$ dla obszaru dyspersji β (ryc. 9).

W pracy [14] wykazano również przydatność tego parametru i przewodności elektrycznej substancji wewnątrzkomórkowej dla kontroli jakości krwi konserwowanej.

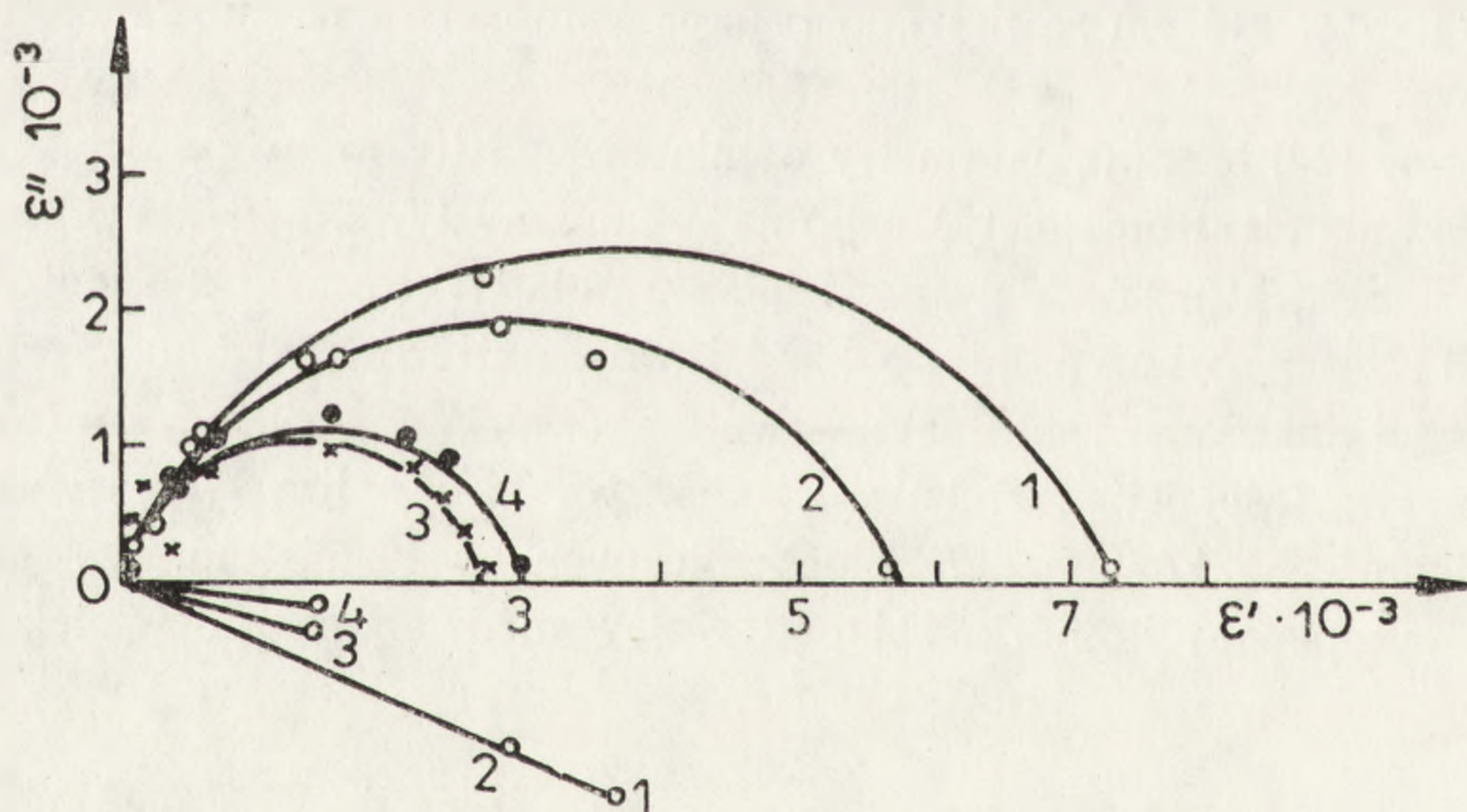
Interesujące dane o zmianach widm dielektrycznych krwi wywołanych starzeniem się erytrocytów zawiera praca [5]. Stwierdzono, że np. z upływem czasu przenikalność elektryczna ε_0 maleje kilkakrotnie oraz zmieniają się wyraźnie średnia częstotliwość relaksacyjna i współczynnik rozkładu czasów relaksacji. Zmiany widm

dielektrycznych, o których mowa, są dobrze widoczne z wykresów Cole'a-Cole'a na ryc. 10.



Ryc. 9. Zależności czasowe $(\kappa_{\infty} - \kappa_0)/\kappa_0$ dla tkanki wątrobowej i dla zawiesiny komórek izolowanych

Obserwowane zmiany są wynikiem stopniowego rozpadu starszych komórek; jak wiadomo, w tego rodzaju populacji znajdują się erythrocyty o różnym wieku.



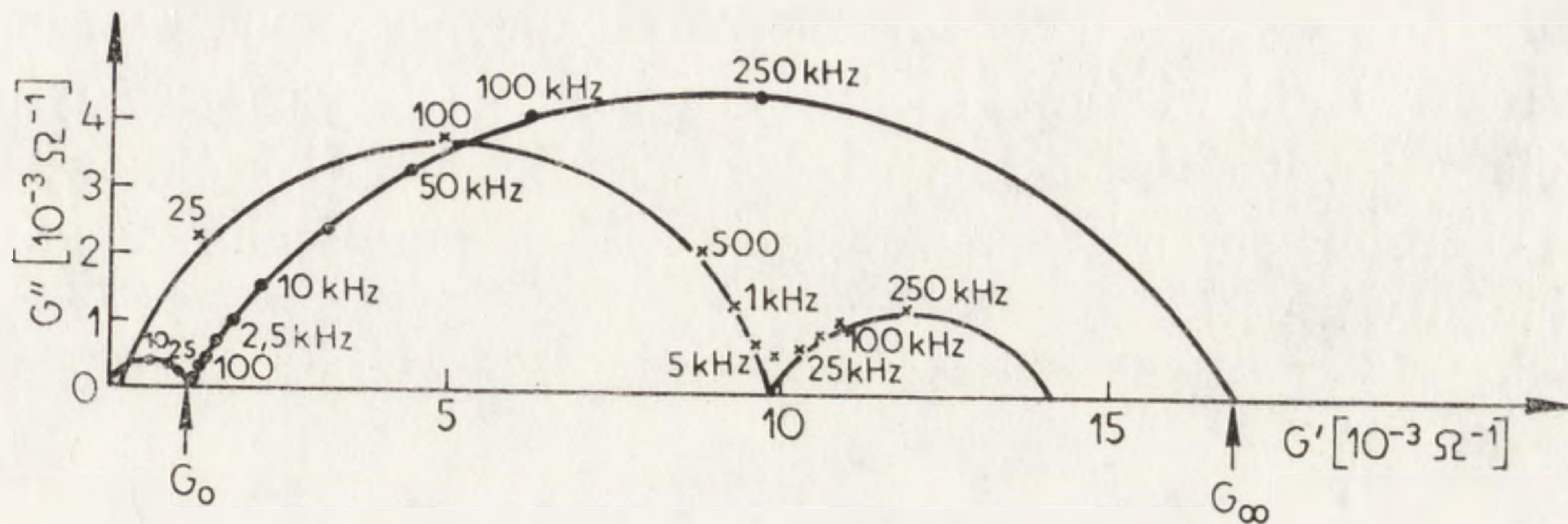
Ryc. 10. Zespolona przenikalność elektryczna dla β -dyspersji krwi w zależności od czasu przeżycia [5]

1-1-2 godz.; 2-24 godz.; 3-96 godz.; 4-300 godz.

Przekonywającego argumentu o przydatności pomiarów dielektrycznych do oceny jakości materiału biologicznego dostarcza również publikacja [21], w której podano wyniki badań wpływu uszkodzenia błon komórkowych tkanki mięśniowej na jej charakterystyki dielektryczne.

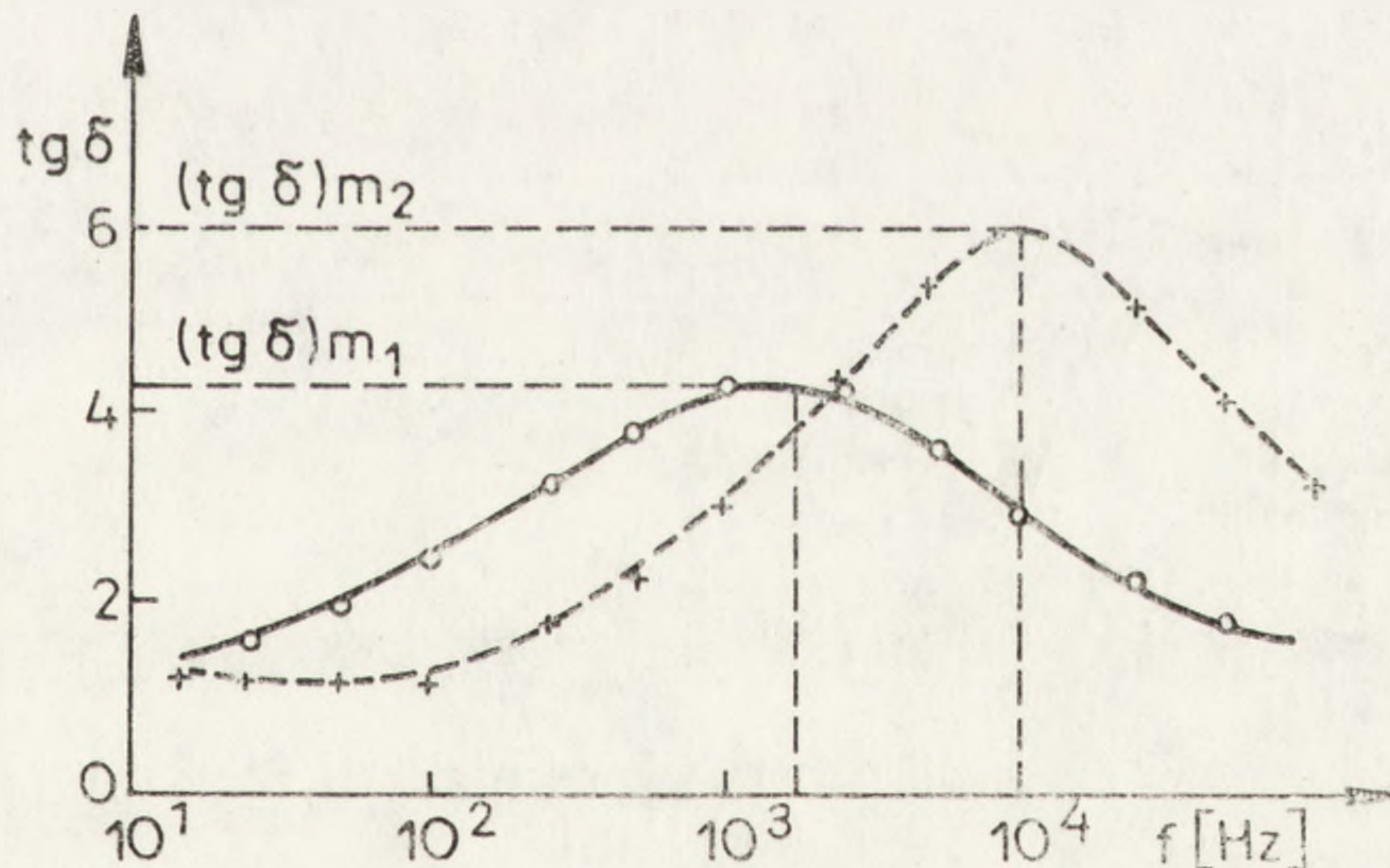
Ryc. 11 przedstawia na podstawie cytowanej pracy wykresy przewodności zespolonej dla tkanki normalnej i uszkodzonej, z których można wyznaczyć wartości liczbowe parametrów (f_0 , a , $G'_0 - G'_\infty$) charakteryzujących dyspersję przewodności. Okazuje się, że jeszcze bardziej czytelny jest wpływ uszkodzenia błon na współczynnik stratności ($\text{tg } \delta$). Jak widać z ryc. 12, która przedstawia zależności często-

tliwościowe $\text{tg } \delta$ dla tkanek z ryc. 11, zarówno wielkość $(\text{tg } \delta)_{\text{maks}}$, jak i jego przesunięcie częstotliwościowe są bardzo wyraźne i łatwo mierzalne.



Ryc. 11. Przewodność zespolona tkanki mięśniowej (... — tkanka normalna, ××× — tkanka z uszkodzonymi błonami [21])

Ostatnio zastosowano z powodzeniem spektroskopię dielektryczną w kriomedycynie (Pliquet — informacja prywatna). Mianowicie, za pomocą tej metody sprawdza się stopień uszkodzenia błon komórkowych w procesie zamrażania tkanek. Wykorzystanie spektroskopii dielektrycznej w tej dziedzinie sugerowały już wyniki pracy [5].

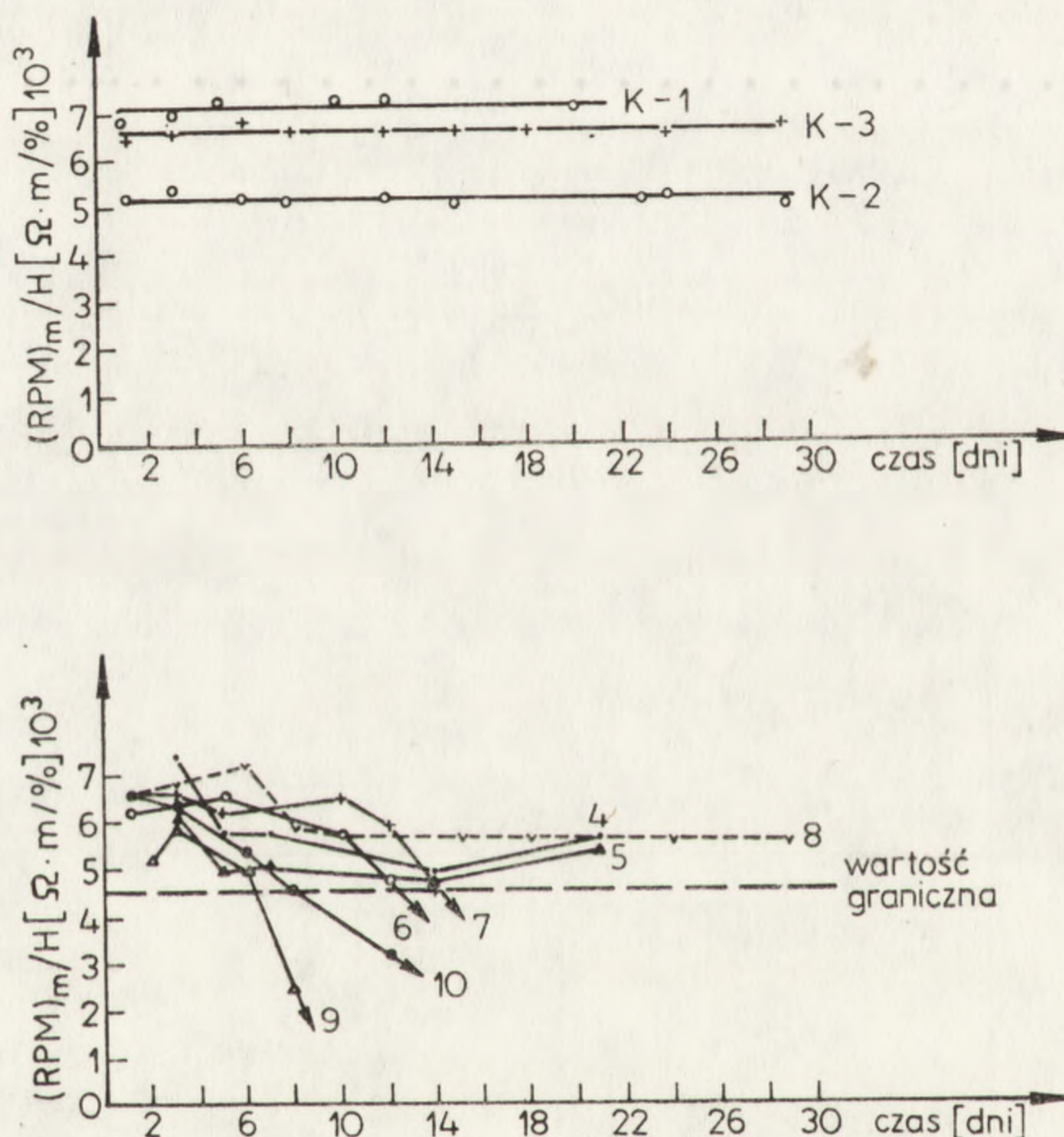


Ryc. 12. Zależność $\text{tg } \delta$ dla tkanek z ryc. 11

5.4. WPLYW PROMIENIOWANIA JONIZUJĄCEGO NA PROCES ERYTROPOEZY

Badania wpływu promieniowania jonizującego na proces erytropoezy drogą pomiarów zmian hematokrytu krwi obwodowej, oznaczaniem ważniejszych metabolitów, enzymów, poziomu hemoglobiny oraz poziomów stężeń jonów K^+ i Na^+ w erytrocytach nie dają jeszcze dostatecznych podstaw do wyciągania wniosków odnośnie do zaburzenia promieniowaniem mechanizmu erytropoezy. Wynika to stąd, że erytrocyty są odporne na promieniowanie. Wysoką wrażliwością odznaczają się ich prekursorzy, erytroblasty.

Praca [25] stanowi próbę zastosowania do oceny stopnia zakłócenia erytropoezy pomiarów reaktancji pojemnościowej maksymalnej (RPM) erytrocytów. Zmiany tego parametru odzwierciedlają głównie zmiany stanu fizycznego błon komórkowych. Jak wskazują na to wyniki przedstawione na ryc. 13, występują wyraźne zmiany czasowe wartości RPM właściwej (podzielonej przez wartość hematokrytu) po napromienieniu zwierząt doświadczalnych dawką półletalną. U królików, które nie przeżywają choroby popromiennej, reaktancje osiągają wartości niższe od zaznaczonej na rysunku wartości granicznej.



Ryc. 13. Zależności czasowe reaktancji pojemnościowej właściwej (odniesionej do hematokrytu) krwi [25]

K-1, K-2, K-3, — króliki kontrolne 4-10 — króliki napromienione

5.5. ZASTOSOWANIE SPEKTROSKOPII DIELEKTRYCZNEJ W DIAGNOSTYCE MEDYCZNEJ

Aktualnie prowadzone są badania (w kraju i za granicą) m. in. nad wykorzystaniem tej metody m. in. w diagnostyce nowotworów, w szczególności nowotworów szyjki macicy. W badaniach tych porównuje się przeważnie zależności czasowe impedancji tkanek zdrowych i nowotworowych przy odpowiednio dobranych częstotliwościach. Okazuje się, że spadki czasowe impedancji tkanek nowotworowych bardzo się różnią od spadku czasowego impedancji tkanki normalnej.

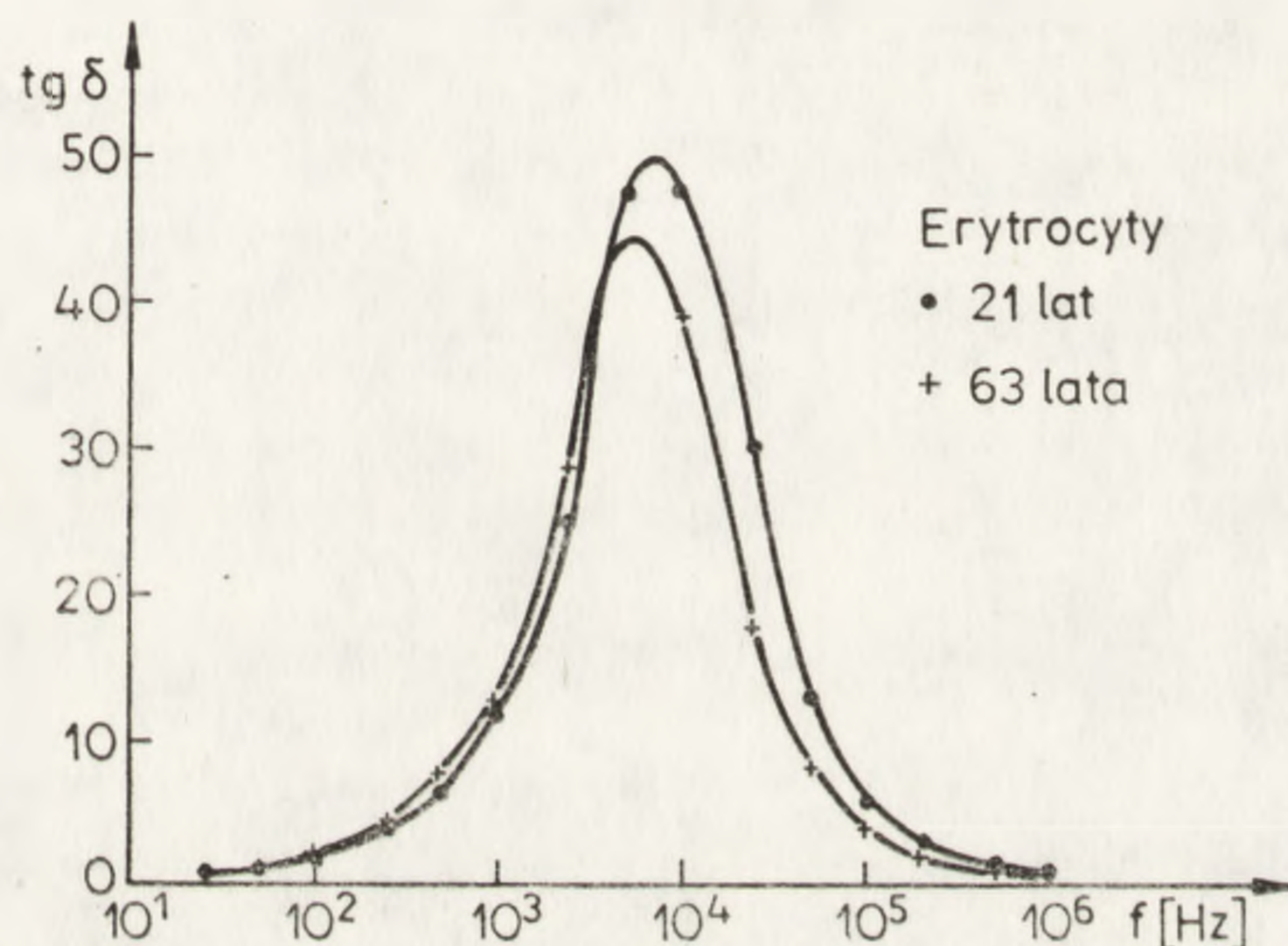
W pracy [6] wykazano, że występuje wyraźny wpływ na przebieg $\tan \delta$ w zakresie MHz w przypadku limfocytów (inkubowanych z różnymi preparatami antygenów nowotworowych) pacjentów nowotworowych.

Sygnalizowane w tym miejscu obserwacje mają na razie charakter czysto empiryczny.

Jaśkowski i wsp. [10] wykazali przydatność spektroskopii dielektrycznej w klinice chirurgicznej do kontroli procesu gojenia się ran operacyjnych.

5.6. BADANIA W DZIEDZINIE GERIATRII

Jednym z przykładów może być wykorzystanie metody $\text{tg } \delta$ w badaniach erytrocytów w zależności od wieku dawcy [26]. Okazuje się że wraz z wiekiem ulega przesunięciu maksimum $\text{tg } \delta$ i zmienia się jego wysokość (ryc. 14).



Rys. 14. Zależności częstotliwościowe $\text{tg } \delta$ krwi

W innej pracy [20] badano zmiany właściwości elektrycznych biernych skóry uwarunkowane wiekiem osób badanych.

LITERATURA

- [1] ASAMI K., HANAI T., KOIZUMI N., Dielectric properties of yeast cells, *J. Membrane Biol.*, **28**: 169–180, 1976.
- [2] BAUTEMBACH S., TERLECKI J., Electric permeability measurements of intracellular matter by means of undemaging method, *Postępy Fizyki Medycznej* (w druku).
- [3] BIELICZ E., TERLECKI J., FIUTAK J., KRUPA J., Electric admittance and dielectric constant of membrane coated ellipsoidal particle suspension, *Studia Biophysica*, **2**: 145–154, 1975.
- [4] BONE S., LEWIS T. J., PETHIG R., SZENT-GYÖRGYI A., Electronic properties of some protein – methylglyoxal complexes, *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, **1**: 315–318, 1978.
- [5] CZELIDZE T. Ł., KIKNADZE W. D., KIEWLISZWILI G. E., Dielektriczeskaja spektroskopija krowi, *Biofizika*, **19**: 479–483, 1974.
- [6] EMMERICH F., PLIQUETT F., WUNDERLICH S., IRMSCHER I., KOTZSCH M., Versuche zur Erkennung spezifischer Sensibilisierung gegenüber Tumorantigenen durch Messung passiv elektrischer Summeneffekte im Vergleich zum Elektrophorese-Mobilitättest, *Acta Biol. Med. Germ.*, **37**: 1267–1272, 1978.
- [7] HABERLAND E. J., Praca doktorska, Martin-Luther-Univ., Halle-Wittenberg 1978.

- [8] IRIMAJIRI A., HANAI T., INOUE A., Dielectric properties of synaptosomes isolated from rat brain cortex, *Biophys. Struct. Mechanism*, **1**: 273–283, 1975.
- [9] — A dielectric theory of “Multi-Stratified Shell” model with its application to a Lymphoma Cell, *J. Theor. Biol.*, **78**: 251–269, 1979.
- [10] JAŚKOWSKI J., JAROSZYŃSKI W., TERLECKI J., Śledzenie procesów gojenia się ran operacyjnych pomiarem impedancji elektrycznej, *Prob. Tech. Med.* **1**, 1980.
- [11] KOZŁOWSKA K., ŻURAWSKA-CZUPA B., KRUPA J., Non-enzymatical method of isolation of a single cell from a solid organ, *Ann. Acad. Med. Gedan.*, **6**: 77–84, 1976.
- [12] — Study of surface polysaccharides in non-enzymatically isolated cells, *Histochemistry*, **54**: 149–157, 1977.
- [13] KRUPA J., KWIATKOWSKI B., TERLECKI J., Methode zur Leitfähigkeitsbestimmung des Inneren der menschlichen Erythrozyten auf der Grundlage der Messung elektrischer Größen der Suspension, *Biophysik*, **8**: 227–236, 1972.
- [14] KRUPA J., KALINOWSKI M., über den Einfluss der Konservierungsdauer auf die elektrische Leitfähigkeit des Erythrozytenplasma, *Folia haemat.*, **99**: 273–278, 1973.
- [15] LEWIS T. J., Conduction in protein and methylglyoxalprotein complexes, *Int. J. of Quantum Chemistry: Quantum Biology Symposium*, **5**: 149–158, 1978.
- [16] — The mechanism of conduction in proteins, *Submolecular Biology and Cancer*, 65–82, 1979.
- [17] PAULY H., SCHWAN H. P., Über die Impedanz einer suspension von kugelförmigen Teilchen mit einer Schale, *Z. Naturforschg*, **14b**: 125–131, 1959.
- [18] PLIQUETT F., Ob opriedielenije passiwnych elektriceskich paramietrow biologiczeskich tkaniej, *Biofizika*, **6**: 1114–1117, 1973.
- [19] PLIQUETT F., KRUG R., COSSEL L., FÖRSTER W., Vergleichende passiv-elektrische und Licht-sowie elektronenmikroskopische Untersuchungen am Modell der Autolyse des Lebergewebes, *Acta histochem.*, **49**, 106–122, 1974.
- [20] PLIQUETT F., HAFERKORN M., WEISS A., Altersbedingte Veränderungen der passiv elektrischen und mechanischen Eigenschaften der menschlichen Haut, *Z. Alternforsch.*, **33/6**: 523–528, 1978.
- [21] PLIQUETT F., Passiv elektrische Untersuchungen biologischer Objekte, *Wiss. Z. Karl-Marx- Univ. Leipzig, Math. — Naturwiss.*, **2**: 118–127, 1979.
- [22] SCHWAN H. P., SCHWARZE H., MACZUK H., PAULY H., On the Low-frequency dielectric dispersion on colloidal particles in electrolyte solution, *Forschungsbericht National Institute of Health*, Grant H 1253.
- [23] SCHWARZ G., A theory of the low-frequency dielectric dispersion of colloidal particles in electrolytic solution, *J. Physic. Chem.*, **86**: 2636–2642, 1962.
- [24] SIEROŃ A., Działanie pola elektromagnetycznego o częstotliwości przemysłowej na niektóre składniki i wielkości charakteryzujące krew — Praca doktorska — Akademia Medyczna w Katowicach, 1979.
- [25] TERLECKI J., Wpływ zmian radiacyjnych erytrocytów na ich właściwości elektryczne bierne, *Ann. Acad. Med. Gedan.*, **8**: 69–75, 1978.
- [26] WIESE F., PLIQUETT F., WEGNER H., WUNDERLICH S., Passive elektrische Untersuchungen an Erythrozyten in Abhängigkeit vom Lebensalter der Spenders, *Z. Alternforsch.*, **32/2**: 127–132, 1977.

Otrzymano: 24 stycznia 1980.

Przyjęto: 8 marca 1980.

Adres autora: ul. Dębinki 1, 80-211 Gdańsk.

NEUROSEKRET I NEUROHORMONY

NEUROSECRETION AND NEUROHORMONES

Andrzej JASIŃSKI

Zakład Anatomii Porównawczej
Instytut Zoologii

Streszczenie. W artykule omówiono budowę i niektóre inne cechy klasycznego neurosekretu kręgowców oraz zawartych w nim neurohormonów. Po zwięzłym przedstawieniu histologicznych, histochemicznych i immunocytochemicznych metod barwienia wydzieliny komórek neurosekrecyjnych umożliwiającą prowadzenie obserwacji w mikroskopie świetlnym, scharakteryzowano ultrastrukturę neurosekretu, który uzyskuje w aparatach Golgiego morfologiczną postać obłonionych ziarenek. W kolejnej części opracowania przypomniano budowę dziewięciu znanych obecnie naturalnych neurohormonów podwzgórzowych, a mianowicie wazopresyny argininowej (AWP), wazopresyny lizynowej (LWP), wazotocyny argininowej (AWT), oksytocyny (OT), mezotocyny (MT), izotocyny (IT), glutitocyny (GT), aspartocyny (AT) i walitocyny (WT), zwracając szczególną uwagę na podobieństwa i różnice w budowie tych czynników. Znaczna część tekstu dotyczy filetycznego rozmieszczenia neurohormonów oraz ich aktywności biologicznej, antydiuretycznej i oksytocynowej, stwierdzonej u przedstawicieli głównych grup kręgowców. W końcowej części artykułu omówiono w dużym skrócie poglądy na ewolucję neurohormonów oraz scharakteryzowano pokrótce neurofizyny ssaków, będące białkami nośnikowymi peptydów systemu podwzgórzowo-przysadkowego.

Summary. The structure and some other features of the neurosecretory substance as well as neurohypophyseal hormones of vertebrates have been reviewed. The concise presentation of commonly used histological, histochemical and immunocytochemical methods for the light microscopical demonstration of the neurosecretory substance is followed by the description of the fine structure of neurosecretory material, which has the morphological form of membrane-bound elementary neurosecretory granules. The next section of this presentation recalls the structure of nine currently known natural neurohormones: arginine vasopressin (AVP), lysine vasopressin (LVP), arginine vasotocin (AVT), oxytocin (OT), mesotocin (MT), isotocin (IT), glutitocin (GT), aspartocin (AT) and valitocin (VT) with the main attention focused on the similarities and differences of their structure. Substantial part of the review concerns the phyletic distribution of neurohormones and their biological activities, both antidiuretic and oxytocin, in

some representatives of the main groups of vertebrates. Last two parts of the article summarize briefly the current views on the evolution of the vertebrate neurohypophyseal hormones and shortly characterize the structure of mammalian neurophysins, the transporting proteins which bind to vasopressin and oxytocin.

1. WSTĘP

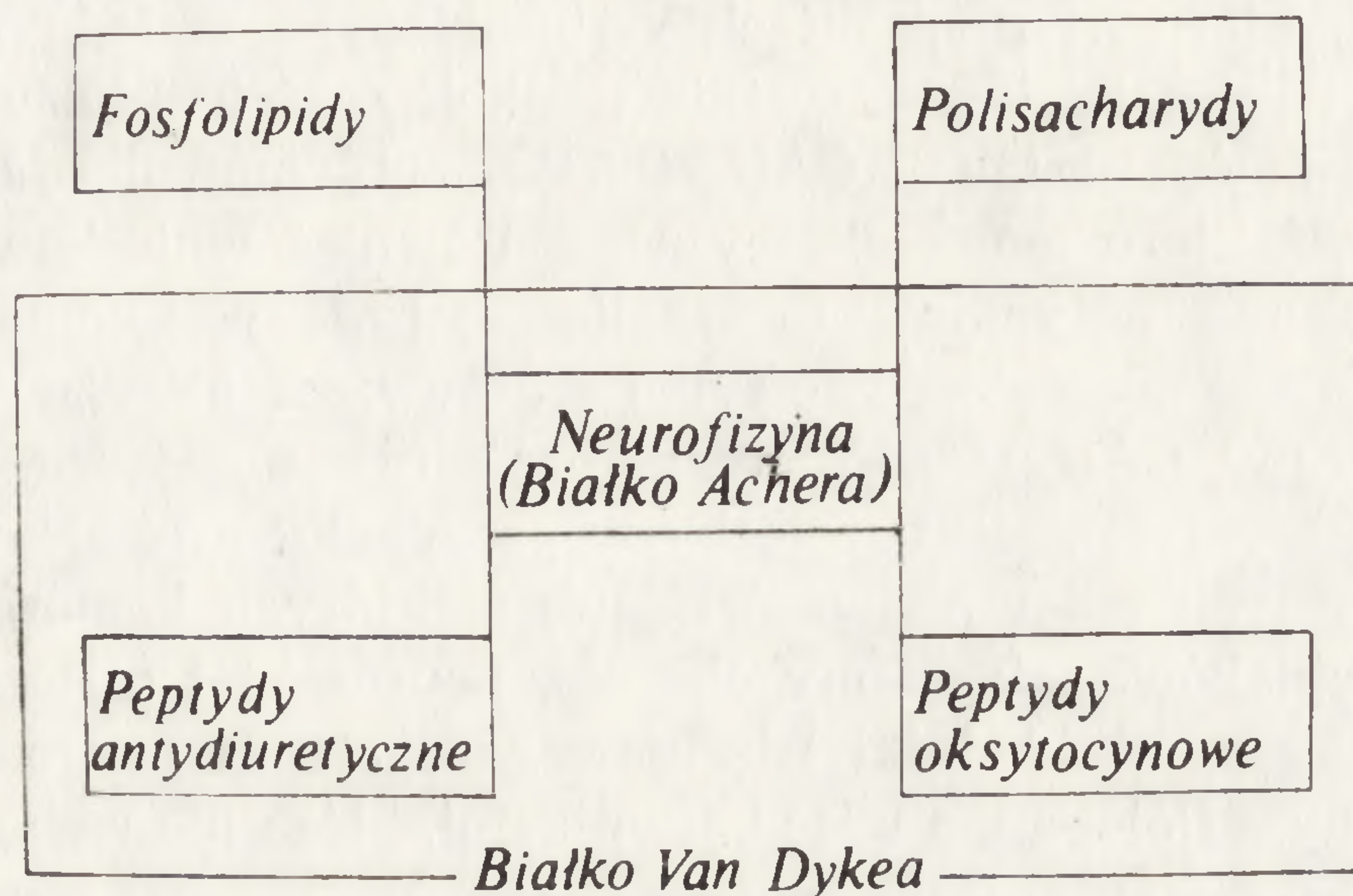
We wcześniej opublikowanym tekście [56] naszkicowano historię badań zjawiska neurosekrecji, akcentując przy tej sposobności stopniowe krystalizowanie się poglądów dotyczących jego istoty, co znajdowało odbicie w zmieniających się kryteriach i sposobach definiowania neurosekrecji oraz związanych z nią komórek. W tym miejscu tytułem przypomnienia należy powiedzieć, że zacytowane źródło dotyczyło przede wszystkim tzw. neurosekrecji klasycznej kręgowców, czyli — innymi słowy — neurosekrecji CAH- i AF-pozytywnej, związanej z jądrem przedwzrokowym (NPO) kręgowców, ryb i płazów oraz jądrami nadwzrokowym (NSO) i przykomorowym (NPV) gadów, ptaków i ssaków, której przeciwstawiamy neurosekrecję CAH- i AF-negatywną, związaną u kręgowców z hormonotwórczą aktywnością takich drobnokomórkowych jąder podwzgórza, jak jądro boczne guza kręgowców skrzelodysznych (NLT), niektóre obszary jądra przedwzrokowego i pars centralis tuberis cinerei płazów oraz nucleus infundibularis (NINF) lub nucleus arcuatus (NARC) wyższych kręgowców. Te same ograniczenia odnoszą się również do tego artykułu.

2. BUDOWA NEUROSEKRETU

Wiele źródeł określa neurosekret jako substancję lub materiał neurosekrecyjny (SNS, MNS). Poznanie składu i budowy neurosekretu było dziełem licznej grupy badaczy, przy czym szczególne zasługi ponieśli na tym polu Du Vigneaud [36, 37], Van Dyke [120] i Acher [1, 9]. Prowadzone przez nich badania pozwoliły ustalić, że neurosekret składa się (i) z cząsteczek prostego białka neurofizyny (białko Achera), które łącząc się z cząsteczkami (ii) wazopresyny lub oksytocyny tworzą nietrwały związek kompleksowy nazwany białkiem Van Dyke'a. Dalszymi składnikami neurosekretu są (iii) fosfolipidy i (iv) polisacharydy (ryc. 1). Pierwsze z nich występują w błonach otaczających ziarenka neurosekretu, toteż ich obecność w SNS jest powszechna, natomiast drugie są fakultatywną komponentą neurosekretu [85].

Wczesne przypuszczenia, że SNS jest glikolipoproteina [108], glikoproteina lub lipoproteina [65] zostały odrzucone. Część kręgowców, zwłaszcza płazy, ma neurosekret intensywnie PAS-pozytywny, natomiast inne

wykazują ubóstwo lub całkowity brak węglowodorów związanych z neurosekretem [44]. Odnośnie do natury neurosekretu wysunięto w przeszłości dwie przeciwstawne hipotezy, z których jedna upatrywała w barwiącej się SNS białko nośnikowe — wehikuł dla aktywnych neurohormonów [2] — lub białko macierzyste (*protéine mère*), które ulegając



Ryc. 1. Budowa neurosekretu (CAH- i AF-pozytywnego) kręgowców. Według A. L. Polenowa [85], zmienione

rozpadowi miało by tworzyć aktywne hormony o niższym ciężarze cząsteczkowym [44]. Wart przypomnienia jest również postulat, wedle którego komórki neurosekrecyjne mogą wytwarzać cząsteczki integrujące w swym szkielecie różne aktywne substancje, jak mediatory synaptyczne lub neurohormony [23]. Obecnie hipotezy te mają jedynie wartość historyczną.

3. BARWIENIE NEUROSEKRETU

Podstawowymi metodami, które umożliwiają histologiczne demonstrowanie neurosekretu, są metody opracowane przez Gomoriego dla barwienia wysepek Langerhansa, wykorzystujące hematoksylinę chromowo-glinową (metoda CAH) i fuksynę aldehydową (metoda AF), oraz metoda wykrywania białek zawierających cystynę [17], w której znajdują zastosowanie kwas nadmanganowy i błękit alcianowy. Niestety, wszystkie te metody są niespecyficzne, gdyż stosowane w nich „barwniki neurosekretu” wiążą się również z ziarnami pigmentów [22], lizosomami [58, 59], lipochondriami, z chrząstką szklistą, włóknami elastycznymi, komórkami tucznymi i komórkami ependymy [47], a niekiedy barwią również glikogen [109] lub inne składniki komórek [48]. Ograniczone znacze-

nie metody CAH wpływa również z powinowactwa stosowanych w niej barwników do substancji Nissla i chromatyny [111], a w przypadku metody AF — z wybarwiania depozytów wewnątrzkomórkowych powstających wskutek utleniania nienasyconych kwasów tłuszczowych [110]. W neuronach starych ryb gromadzą się różne ilości fuksynofilnych substancji [112], które na preparatach wybarwionych metodą AF upodabniają się do neurosekretu. Wszystkie te okoliczności wskazują, że obecność w neuronach substancji CAH- i AF-pozytywnej nie daje pewności co do ich charakteru neurosekrecyjnego. Również wnioskowanie na tej samej podstawie o aktywności metabolicznej badanych komórek jest zawodne, toteż można je stosować tylko z najwyższą ostrożnością. Jednak z drugiej strony CAH- i AF-negatywność nie przesądza bynajmniej o braku neurosekrecji, jak chociażby w przypadku drobnokomórkowych hormonotwórczych jąder podwzgórza lub niektórych komórek w narządzie X skorupiaków. Jak wiemy obecnie, neurosekret mięczaków barwi się azokarminem, a składniki rdzeniowego systemu neurosekrecyjnego ryb — kwaśnym fioletem, a więc barwnikami, które nie wchodzą w skład odczynników Gomoriego [22].

Oryginalną i czułą metodę wykrywania klasycznego neurosekretu barwnikiem fluorescencyjnym pseudoizocyjaniną opracował G. Sterba [113, 114]. Wszelako jedyną rzeczywiście specyficzną metodą identyfikacji klasycznego neurosekretu, a właściwie związanych z nim neurohormonów, jest metoda immunocytochemiczna posługująca się kompleksem antygen—przeciwciało: peroksydaza—antyperoksydaza (metoda PAP), opracowana przez Sternbergera i wsp. [115].

4. ULTRASTRUKTURA ZIARENEK NEUROSEKRETU

Badania submikroskopowej budowy gruczołów dokrewnych pokazały, że substancje aktywne, powstające w komórkach tych narządów, mają postać obłonionych ziarenek o stosunkowo stałych rozmiarach. Obecność elektronowo gęstych ziarnistości o średnicy w granicach 150-200 nm wykryto również w neuronach wydzielniczych podwzgórza kręgowców [73]. Zawartość ziarenek neurosekretu (ZN) ma różną gęstość elektronową, która w pewnych warunkach może całkiem zanikać, tak że ziarenka mają wówczas postać „pustych” pęcherzyków. Między zewnętrzną błoną i częścią rdzenną ziarenek leży wąska, lecz wyraźnie zarysowana przestrzeń jasna. Jak wykazali Sano i Knoop [93] oraz inni badacze [24, 74], ziarenka neurosekretu powstają w perykarionach neurocytów wydzielniczych przez oddzielanie się od cystern aparatów Golgiego. Nie-dojrzałe ziarenka neurosekretu odpowiadają pierwotnym lizosomom,

gdyż w przeciwieństwie do ziarenek dojrzałych zawierają kwaśną fosfatę [59]. Jeden z pierwszych opisów formowania się ziarenek neurosekretu dotyczy neurocytów wydzielniczych dżdżownicy [107].

Ziarenka neurosekretu obserwowane w mikroskopie elektronowym poczęto identyfikować z neurosekretem wybarwianym na preparatach histologicznych, przy równoczesnym założeniu, iż są w nich zdeponowane neurohormony. Obecność neurohormonów w ZN wykazało następnie wielu autorów [20, 51, 54, 63, 84, 126].

Na przykładzie płazów bezogonowych stwierdzono, że ziarenka neurosekretu mają najmniejszą średnicę w cytoplazmie perykarionów (ca 62 nm), natomiast średnica ziarenek leżących w proksymalnych i dystalnych odcinkach aksonów wynosi odpowiednio 135 i 150 nm, przy czym w samych zakończeniach aksonów ziarenka te są znowu nieco mniejsze, a ich średnica wynosi około 115 nm [45]. Przytoczone dane wykorzystywano jako argument popierający hipotezę mówiącą o stopniowym dojrzewaniu ziarenek neurosekretu podczas przesuwania się ich ku buławkowato rozszerzonym zakończeniom aksonów, tworzących główny element strukturalny płata nerwowego przysadki.

Materiał rdzenia ziarenek ma *in vivo* postać stałą, a u niektórych gatunków — być może nawet krystaliczną [21, 34]. Jednakże obecność form przejściowych między ZN o ziarnistej i krystalicznej części rdzeniowej uniemożliwia wyróżnienie za pomocą mikroskopu elektronowego dwóch typów ziarenek neurosekretu, które można by wiązać z kompleksowymi cząsteczkami wazopresyny i neurofizyny oraz oksytocyny i neurofizyny. Już wczesne badania wykazały możliwość częściowej utraty przez ZN gęstości elektronowej, co interpretowano jako progresywną dyfuzję hormonu do aksoplazmy [19, 75].

Liczba gęstych ziarenek w jednostce powierzchni przekroju przez płat nerwowy przysadki jest skorelowana z całkowitą zawartością hormonów w tej części gruczołu [57, 68]. Poszczególne neurohormony występują w oddzielnych ziarenkach neurosekretu, za czym przemawia fakt, iż wazopresyna i oksytocyna, występujące w przysadce nerwowej w tej samej ilości, mogą być uwalniane w różnej proporcji, np. 1 : 100. Podobną wymowę miały również badania, w których frakcję homogenatu płata nerwowego zawierającą ZN wirowano w gradiencie gęstości.

Stosunkowo stałe rozmiary ziarenek neurosekretu nasunęły przypuszczenie, że poszczególne ziarenka zawierają jednakową liczbę cząstek aktywnej substancji, a zatem pewne jej kwantum [33]. Dużą wartość miało stwierdzenie, że ziarenka neurosekretu uwalniają równocześnie neurohormony i neurofizynę [38]. Natomiast wykazana korelacja między obniżaniem się zawartości hormonów magazynowanych w płacie

nerwowym przysadki i spadkiem ilości ZN w tej części gruczołu pozwoliło skonstatować, że z uwalnianiem neurohormonów wiąże się usuwanie całej zawartości ZN. Spostrzeżenie to przemawia również za tym, iż w neuronach wydzielniczych neurohormony są magazynowane jedynie w ziarenkach neurosekretu, a nie wprost w cytoplazmie tych komórek. Mając to na uwadze, wyliczono średnią liczbę cząsteczek neurohormonu w pojedynczym ziarenku neurosekrecyjnym [69]. W płacie nerwowym przysadki szczura występuje około 2×10^{10} ZN, co przy ogólnej zawartości hormonu u badanego szczepu, wynoszącej 2 μg , daje przeciętnie 10^{-10} μg albo 6×10^4 cząsteczek hormonu w pojedynczym ziarenku. Badając *in vivo* tempo inkorporacji ^{35}S -cysteiny przez hormony i neurofizyny podwzgórza psa i świnki morskiej wysunięto postulat, że oba te związki powstają ze wspólnego białka prekursorowego [92]. A zatem skoro hormony i neurofizyny mają wspólne pochodzenie i występują w ziarenkach neurosekretu w równomolarnej koncentracji, przeto każde ziarenko powinno zawierać również około 6×10^4 cząsteczek neurofizyny [32]. Oznacza to, że każde ZN mieści około 60000 kompleksowych cząsteczek: hormon-neurofizyny, z których każda ma ciężar molekularny $1,1 \times 10^4$. Oprócz wymienionych cząsteczek kompleksowych, część rdzenna ZN zawiera również cząsteczki ATP [84] i jony wapnia [118].

Kompleksowe cząsteczki neurohormonów z neurofizyną wykazują największą trwałość przy kwaśnym pH. Oba związki są uwalniane z zawiesiny ZN jeśli pH środowiska przekracza wartość 6,0 [46]. Morris i Canata [68] wykazali, że po dwóch godzinach utrwalania płata nerwowego w aldehydzie glutarowym o pH wynoszącym 5,0 lub 6,0 aż 90-95% ZN zachowuje elektronowo gęsty rdzeń, natomiast przy pH równym 7,0 tylko 45%, a przy pH wynoszącym 8,0 zaledwie w 1% ziarenek część rdzeniowa nie ulega rozjaśnieniu. Przesunięcie pH w kierunku alkalicznym prawdopodobnie wywołuje dysocjację zespolonych cząsteczek hormonu i neurofizyny. Towarzyszy temu wzrost ciśnienia osmotycznego wewnątrz ziarenek neurosekretu, wnikanie do ich wnętrza wody, nabrzmiwanie ziarenek i mechaniczne uszkodzanie błony, przy równoczesnym zaniku gęstości elektronowej części rdzeniowej [35].

Aksolema i błona otaczająca ziarenka neurosekretu mają podobną budowę, co umożliwia zespalanie się tych elementów podczas uwalniania zawartości ziarenek w procesie egzocytozy. Jak wiadomo, zewnętrzną powierzchnię plazmolemy większości komórek powlekają glikoproteiny, tworzące tzw. glikokaliks. Obecność warstewki o podobnej budowie wykazano na obu powierzchniach błony otaczającej ZN [117]. Podawane szczurom radioaktywne cukry są wbudowywane w glikoproteiny związane z ziarenkami neurosekretu (zob. [35]).

5. BUDOWA NEUROHORMONÓW

Neurohormony podwzgórzowe kręgowców są oktapeptydami. Z ośmiu budujących je aminokwasów dwie cząsteczki cysteiny są połączone mostkiem siarkowym, tworząc w ten sposób pojedynczą cząsteczkę cystyny. Mostek siarkowy nadaje cząsteczkom neurohormonów budowę pierścienia utworzonego z pięciu cząsteczek aminokwasów (pierścień pentapeptydowy), związanego z krótkim łańcuchem bocznym zawierającym pozostałe trzy cząsteczki aminokwasów.

W płacie nerwowym przysadki mózgowej kręgowców stwierdzono istnienie 9 aktywnych peptydów, z których trzy, a mianowicie wazopresyna argininowa (AWP), wazopresyna lizynowa (LWP) i wazotocyna argininowa (AWT), są czynnikami o działaniu presyjnym i antydiuretycznym, natomiast pozostałe, tj. oksytocyna (OT), mezotocyna (MT), izotocyna (IT), glumitocyna (GT), aspartocyna (AT) i walitocyna (WT), tworzą grupę peptydów o działaniu oksytocynowym (tab. 1). Wszystkie wymienione neurohormony powstają w neuronach wydzielniczych wielkokomórkowych jąder podwzgórza (NPO, NSO i NPV), skąd — po uzyskaniu morfologicznej postaci ziarenek neurosekretu — przesuwiają się w aksonach drogi podwzgórzowo-przysadkowej do płata nerwowego przysadki, stanowiącego narząd neurohemalny.

We wszystkich poznanych dotąd dziewięciu naturalnych neurohormonach kręgowców w pozycjach 1, 2, 5, 6, 7 i 9 występują niezmiennie

TABELA 1

Pierwszorzędowa budowa neurohormonów kręgowców

| Pozycje aminokwasów: | 1 | 2 | (3) | (4) | 5 | 6 | 7 | (8) | 9 |
|---------------------------|-----|-----|------|-----|-----|-----|-----|------|-----------------------|
| 1. Wazopresyna argininowa | CYS | TYR | PHE | GLN | ASN | CYS | PRO | ARG | GLY(NH ₂) |
| 2. Wazopresyna lizynowa | CYS | TYR | PHE | GLN | ASN | CYS | PRO | LIZ | GLY(NH ₂) |
| 3. Wazotocyna argininowa | CYS | TYR | ILEU | GLN | ASN | CYS | PRO | ARG | GLY(NH ₂) |
| 4. Oksytocyna | CYS | TYR | ILEU | GLN | ASN | CYS | PRO | LEU | GLY(NH ₂) |
| 5. Mezotocyna | CYS | TYR | ILEU | GLN | ASN | CYS | PRO | ILEU | GLY(NH ₂) |
| 6. Izotocyna | CYS | TYR | ILEU | SER | ASN | CYS | PRO | ILEU | GLY(NH ₂) |
| 7. Glumitocyna | CYS | TYR | ILEU | SER | ASN | CYS | PRO | GLN | GLY(NH ₂) |
| 8. Aspartocyna | CYS | TYR | ILEU | ASN | ASN | CYS | PRO | LEU | GLY(NH ₂) |
| 9. Walitocyna | CYS | TYR | ILEU | GLN | ASN | CYS | PRO | WAL | GLY(NH ₂) |

te same aminokwasy, a mianowicie: cysteina, tyrozyna, asparagina, cysteina, prolina i glicyna. Pozycje 3, 4 i 8 są zajmowane przez cząsteczki różnych aminokwasów, przy czym w pozycji 3 pojawiają się fenyloalana lub izoleucyna, w pozycji 4 — glutamina, seryna lub asparagina, wreszcie w pozycji 8 mogą występować arginina, lizyna, leucyna, izoleucyna, glutamina lub walina (tab. 2).

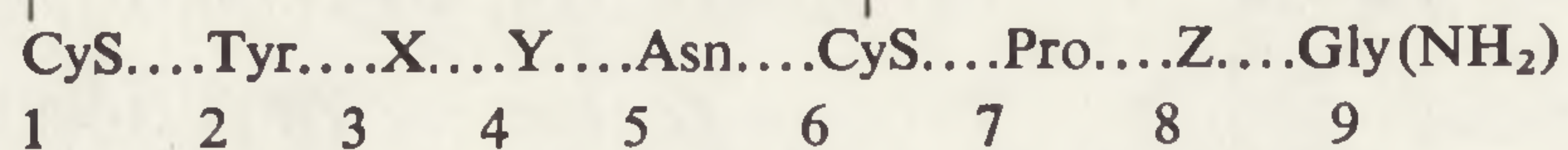
6. FILETYCZNE ROZMIESZCZENIE NEUROHORMONÓW

W filetycznym rozmieszczeniu neurohormonów (tab. 3, ryc. 2) najbardziej uderzającą cechą jest powszechność występowania wazotocyny argininowej (AWT), której obecność wykazano u przedstawicieli wszystkich ważniejszych grup kręgowców, jedynie z wyjątkiem ssaków. Wystę-

TABELA 2

Różnice strukturalne neurohormonów kręgowców

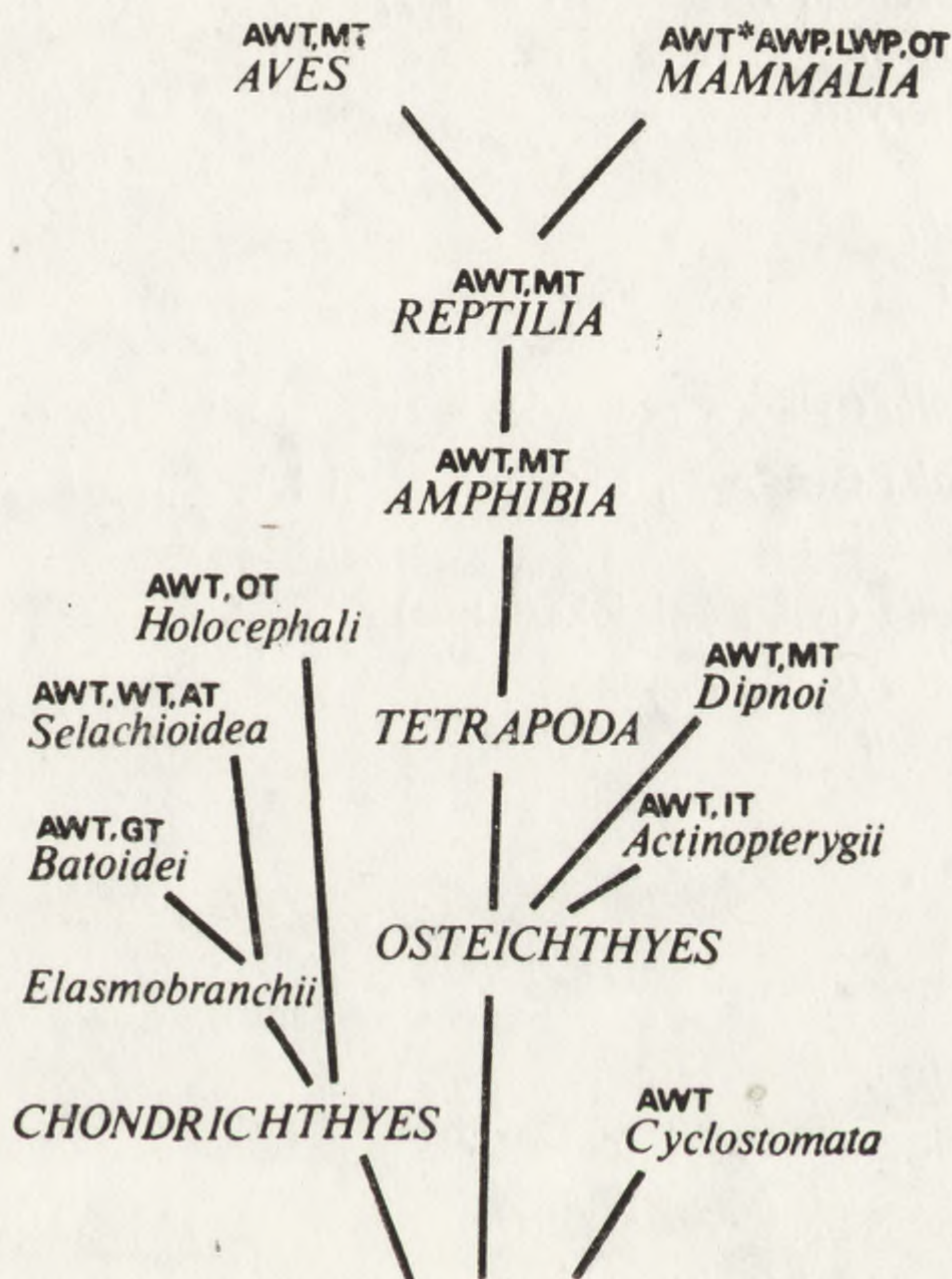
| Nazwy peptydów | Skrót nazwy | Aminokwasy w pozycji: | | |
|---|-------------|-----------------------|--------|--------|
| | | 3 X | 4 Y | 8 Z |
| Peptydy antydiuretyczne (wazopresyjne) | | | | |
| 1. Wazopresyna argininowa | AWP | Phe | Gln | Arg |
| 2. Wazopresyna lizynowa | LWP | Phe | Gln | Liz |
| 3. Wazotocyna argininowa | AWT | Ileu | Gln | Arg |
| Peptydy oksytocynowe | | | | |
| 4. Oksytocyna | OT | Ileu | Gln | Leu |
| 5. Mezotocyna | MT | Ileu | Gln | Ileu |
| 6. Izotocyna | IT | Ileu | Ser | Ileu |
| 7. Glumitocyna | GT | Ileu | Ser | Gln |
| 8. Aspartocyna | AT | Ileu | Asn | Leu |
| 9. Walitocyna | WT | Ileu | Gln | Wal |



U dołu tabeli przedstawiono ogólną formułę neurohormonów.

powanie AWT w przysadce nerwowej ryb kostnopromienistych (*Actinopterygii*) [10, 13, 42, 52, 87, 98], płazów [15, 43], gadów [3] i ptaków [5, 28, 72] stwierdzono w tym samym czasie w kilku różnych pracowniach. Jak się okazało, peptyd ten ma pośrednią budowę w stosunku do oksytocyny i wazopresyny argininowej. Wkrótce zdołano wykazać, że AWT występuje u pozostałych kręgowców z wyjątkiem ssaków, przy czym wy-

jąwszy *Agnatha*, u których jest jedynym neurohormonem [90, 91 96], u pozostałych kręgowców zawsze towarzyszy mu obecność co najmniej jednego innego peptydu. Obecność AWT wykryto również w przysadce nerwowej ryb dwudysznych [43, 98], małe ilości tego hormonu występują u ryb spodoustych [96, 97, 83], a co jest szczególnie interesujące, jego przejściową obecność wykazano także u zarodków ssaków [78, 112] oraz w szyszynce tych kręgowców [66].



Ryc. 2. Schemat filetycznego rozmieszczenia dziewięciu znanych neurohormonów kręgowców. Według W. H. Sawyera [101], zmienione. (* Tylko u zarodków)

Wazopresyny są neurohormonami charakterystycznymi dla ssaków. Uzyskanie chemicznie czystych wazopresyn bydłowej i świni pozwoliło ustalić, że różnią się one budową. W przysadce nerwowej bydła występuje wazopresyna argininowa (AWP), natomiast u świń — wazopresyna lizynowa (LWP). Pod względem chemicznym oba peptydy różnią się tym, iż w przypadku AWP w pozycji 8 występuje arginina, natomiast w LWP — lizyna.

AWP występuje również u stekowców (*Tachyglossus aculeatus*) [104], torbaczy [40, 104] i niemal wszystkich ssaków łożyskowych, z wyjątkiem większości świniokształtnych. Obecność tego peptydu wykazano u bydła [37], człowieka [64], konia [7], owcy [8], wieloryba [27], psa, kota, królika, wielbłąda i makaka [121], a także u przedstawicieli owadożernych, nietoperzy, szczerbaków, słoni, jeleniowatych, żyrafowatych

i krętorogich [40]. Obecność AWP stwierdzono również u hipopotamów i pekari *Tayassu angulatus* [95], co jest sytuacją wyjątkową.

TABELA 3

Rozmieszczenie neurohormonów u kręgowców

| | |
|-----|--|
| AWT | <i>Cyclostomata</i> <i>Elasmobranchii</i> (płaszczki i rekiny) <i>Holocephali</i> <i>Actinopterygii</i> <i>Dipnoi</i> <i>Amphibia</i> <i>Reptilia</i> <i>Aves</i> <i>Mammalia</i> (tylko w przysadce nerwowej zarodków oraz w szyszynce) |
| AWP | <i>Mammalia</i> (stekowce, torbacze, ssaki łożyskowe i niektóre świniokształtne) |
| LWP | <i>Mammalia</i> (tylko świniokształtne) |
| OT | <i>Mammalia</i> (tylko łożyskowe) <i>Holocephali</i> |
| MT | <i>Dipnoi</i> <i>Amphibia</i> <i>Reptilia</i> <i>Aves</i> |
| IT | <i>Actinopterygii</i> |
| GT | <i>Elasmobranchii</i> (tylko płaszczki) |
| AT | <i>Elasmobranchii</i> (tylko rekiny) |
| WT | <i>Elasmobranchii</i> (tylko rekiny) |

Wazopresyna lizynowa (LWP) występuje tylko u ssaków świniokształtnych, przy czym u szeregu gatunków, oprócz LWP, występuje również AWP [39, 40]. Jednakże nigdy nie stwierdzono, aby AWP występowała u świni domowej. W fakcie tym niektórzy autorzy widzą następstwo domestykacji. Obecność LWP wykryto u kilku gatunków świńniowatych i dwóch gatunków pekari [40], u hipopotamów [39, 41, 50] oraz u świni domowej.

Znamienną cechą świniokształtnych jest ich polimorfizm w odniesieniu do wazopresyn. Jak sądzi Pickering [82], poszczególne osobniki świńniokształtnych mogą być homozygotyczne dla LWP albo dla AWP lub heterozygotyczne, a więc zawierające oba geny warunkujące syntezę AWP i LWP. Prawdopodobnie żaden z tych trzech genotypów nie ma selekcyjnej przewagi nad pozostałymi. Ten polimorfizm świniokształtnych sygnalizuje potrzebę uważnego traktowania pojawiających się w piśmiennictwie doniesień o występowaniu oksytocyny u niektórych płazów,

gadów i ptaków, ponieważ nasuwa to przypuszczenie o możliwym polimorfizmie mezotocyny i oksytocyny u tych kręgowców.

Oksytocyna (OT) występuje u wszystkich zbadanych gatunków ssaków. Jej obecność potwierdzono m. in. u świniokształtnych i przeżuwających [40]. Drugą grupą kręgowców, u której występowanie OT stwierdzono metodami chemicznymi, są zrosłogłowe należące do ryb spodoustych [83, 103]. Doniesienia mówiące o występowaniu w płacie nerwowym płazów (*Rana pipiens*) oksytocyny, a nie mezotocyny (70), nie potwierdzają się w świetle badań prowadzonych w różnych ośrodkach [4].

Wkrótce po odkryciu AWT, z przysadki nerwowej niższych kręgowców wyizolowano peptyd 8-izoleucynę-oksytocynę, nazwany mezotocyną (MT). Najpierw odkryto ją u płazów [4, 12, 15], a następnie u gadów [3, 80], ptaków [5] i ryb dwudysznych [43, 98]. Od oksytocyny różni się mezotocyna tym, że w pozycji 8 w miejsce leucyny występuje izoleucyna (tab. 2). Według sugestii Achera, mezotocyna jest peptydem oksytocynowym kręgowców czworonożnych poniżej poziomu ssaków.

Izotocyna (IT) jest neurohormonem charakterystycznym dla ryb kostnopromienistych (*Actinopterygii*) i tylko u nich występującym. Jej obecność stwierdzono u wszystkich badanych ryb kostnoszkieletowych [11, 13, 16] i ramieniopłetwych [42, 98, 102]. Izotocyna jest 4-seryną-8-izoleucyną-oksytocyną. Proponowana dla niej nazwa „ichtiotocyna” nie przyjęła się.

U ryb spodoustych (*Elasmobranchii*) występują trzy dalsze odmiany oksytocyny, a mianowicie glumitocyna (GT), aspartocyna (AT) i walitocyna (WT). Glumitocyna występuje wyłącznie u płaszczyk (*Batoidei*). Perks i Sawyer [78] wyizolowali z *Raia ocellata* peptyd o budowie analogicznej do oksytocyny, w którym brakowało jednak leucyny, natomiast występowała seryna. W tym samym czasie inna grupa badaczy ustaliła [14] szczegółową budowę tego peptydu, który okazał się 4-seryną, 8-glutaminą-oksytocyną, czyli glumitocyną. Obecność GT w przysadce nerwowej *Raia clavata* potwierdziły następnie również inne zespoły badaczy [29, 106].

Aspartocyna i walitocyna występują tylko u rekinów (*Selachioidea*). Obecność aspartocyny wykazano u *Squalus acanthias* [6]. Od oksytocyny różni się ona tylko jednym aminokwasem w pozycji 4, w której glutamina jest zastąpiona asparaginą. AT jest zatem 4-asparaginą-oksytocyną.

Walitocynę zidentyfikowano u *Squalus acanthias* równocześnie z aspartocyną [6]. Również i ona różni się od OT tylko jednym aminokwasem, mianowicie w pozycji 8 występuje walina w miejsce leucyny, jest więc 8-walinalą-oksytocyną. Ponieważ w przysadce ryb spodoustych wymienione peptydy występują w bardzo małych ilościach, przeto nie zdołano ustalić, czy AT i WT występują u tych samych osobników, czy też

w przyrodzie istnieją odmiany rekinów, z których jedna wytwarza AT, a druga — WT.

7. DZIAŁANIE NEUROHORMONÓW

W płacie nerwowym większości kręgowców występują dwa różne neurohormony. Jeden z nich należy do grupy peptydów antydiuretycznych, dla których narządami efektorowymi są nerki, ściślej kanaliki nerek i naczynia kłębuszkowe, a ponadto u płazów bezogonowych — pęcherz moczowy i przepuszczalna dla wody skóra. Drugi należy do peptydów oksytocynowych, które u ssaków oddziałują na mięśnie gładkie macicy oraz komórki mioepitelialne gruczołów mlecznych, natomiast u niższych kręgowców wywierają wpływ na mięśniówkę jajowodów. Neurohormony pierwszej grupy wykazują działanie zapobiegające nadmiernej dehydracji, co osiągane jest poprzez wzrost reabsorpcji wody w kanalikach nerkowych i zmniejszanie filtracji kłębuszkowej. Wywołując skurcz warstwy mięśniowej naczyń, te same hormony wykazują działanie wazopresyjne. Druga grupa omawianych czynników odgrywa rolę w rozrodzie, co u ssaków przejawia się pobudzaniem gruczołów mlecznych do oddawania mleka w czasie laktacji oraz skurczami macicy podczas porodu, lub nasilaniem się motoryki jajowodów w trakcie składania jaj lub rodzenia potomstwa u niższych kręgowców. Następstwem zbliżonej budowy wszystkich neurohormonów podwzgórzowych kręgowców jest nakładanie się na siebie aktywności biologicznej różnych czynników antydiuretycznych i oksytocynowych.

DZIAŁANIE ANTYDIURETYCZNE

Wazopresyny arginowa (AWP) i lizynowa (LWP) są hormonami antydiuretycznymi ssaków pobudzającymi nabłonek kanalików nerkowych do reabsorpcji wody (antydiureza kanalikowa). U niższych kręgowców lądowych, płazów, gadów i ptaków, analogiczną rolę spełnia wazotocyna argininowa (AWT). Zmniejsza ona produkcję moczu przez ograniczanie filtracji kłębuszkowej (antydiureza kłębuszkowa), przy czym efekt ten jest uzyskiwany przez regulowanie liczby czynnych kłębuszków. Oprócz nerek również pęcherz moczowy płazów i gadów oraz kloaka płazów i kręgowców gadokształtnych są narządami, w których zachodzi zwrotne wchłanianie wody. Ponadto skóra płazów niemal swobodnie przepuszcza wodę w obu kierunkach i podobnie jak pęcherz moczowy jest wrażliwa na działanie neurohormonów [76].

W przeciwieństwie do kręgowców lądowych, u słodkowodnych ryb kostnoszkieletowych [76] oraz u ryb dwudysznych [99, 105] iniekcja

AWT i IT wywołuje diurezę kłębuszkową, co u kręgowców zasiedlających środowisko hiposmotyczne jest zjawiskiem korzystnym, umożliwia bowiem usuwanie z organizmu nadmiaru wody.

Przeciwnie efekty wywoływane przez AWT u ryb i płazów sugerują, że hormon ten zmienił swe działanie fizjologiczne, prawdopodobnie w okresie przystosowywania się do życia na lądzie dewońskich przodków płazów. We współczesnej faunie brakuje przedstawicieli tej grupy ryb trzonopłetwych (*Rhipidistii*), które w prostej linii są przodkami płazów. Występująca współcześnie latimeria (*Latimeria chalumnae*, *Coelacanthi*) jest zwierzęciem rzadkim, trudno dostępnym i znacznie zmienionym w stosunku do form dewońskich; po opuszczeniu wód śródłądowych ryby te znalazły schronienie na małym obszarze przydennym Oceanu Indyjskiego. Jednakże najbliższą płazom grupą ryb słodkowodnych są ryby dwudyszne (*Dipnoi*). Wykazują one szereg cech wspólnych z płazami, aczkolwiek nie należą do głównej linii ewolucyjnej kręgowców lądowych, nie są też blisko spokrewnione z protoplastami płazów. Jednym ze wspomnianych podobieństw jest strukturalna identyczność neurohormonów ryb dwudysznych i płazów (AWT i MT). Odnotowując ten fakt Sawyer [100] zwrócił jednocześnie uwagę, że jeden z nich (AWT) wywiera z gruntu przeciwne działanie na pracę nerek u obu tych grup kręgowców. Otóż u ryb dwudysznych i innych słodkowodnych AWT wywołuje diurezę kłębuszkową, natomiast u płazów jest hormonem antydiuretycznym. Zdaniem Sawyera sytuacja taka jest prawdopodobnie następstwem przesunięcia receptorów AWT z eferentnych naczyń kłębuszkowych ryb do aferentnych odcinków tych naczyń u płazów i pozostałych kręgowców lądowych. Ryby prawdopodobnie uwalniają AWT w następstwie uwadniania płynów tkankowych i wzrostu ich objętości, natomiast u kręgowców lądowych bodźcem do uwalniania AWT jest odwadnianie organizmu i zmniejszanie się objętości osocza krwi.

Przed niewielu laty uzyskano na drodze eksperymentalnej argumenty przemawiające za tym, że AWT w ilości 1-10 pg/kg ciała wywołuje u węgorzy efekty antydiuretyczne, podczas gdy zwiększone dawki tego hormonu (10-100 ng/kg) powodują diurezę [18, 30].

Oprócz antydiurezy kłębuszkowej, AWT wywołuje u płazów wzrost przepuszczalności skóry dla wody oraz wzmaga wchłanianie wody z pęcherza moczowego. Efekt antydiuretyczny pod wpływem AWT można interpretować w ten sposób, że tętniczki doprowadzające mają więcej receptorów lub wykazują one większe powinowactwo do AWT niż w innych naczyniach płazów. Zdaniem Sawyera [101] skurcz naczyń kłębuszkowych pod wpływem AWT jest najbardziej prymitywną reakcją antydiuretyczną. Ten sam autor wysunął przypuszczenie, że receptory AWT pojawiły się w układzie krążenia kręgowców we wczesnej fazie ewo-

lucji. Szerokie rozprzestrzenienie tych receptorów i AWT u współczesnych kręgowców przemawia za tym, że pierwotną funkcją AWT była regulacja układu krążenia.

Ilość informacji na temat fizjologicznego działania mezotocyny jest nader skąpa. Jard i Morel [55] donieśli, że MT wywołuje u żaby diurezę, a więc działa przeciwnie niż AWT. Jednak wstrzykiwanie rybom dwudysznym MT nie potwierdziło tych wyników. Zdołano jednak ustalić, że w wysokim stężeniu MT działa tak samo, jak AWT. Badając wpływ MT na *Rana catesbeiana*, Pang [76] stwierdził, że w niższych stężeniach hormon ten rzeczywiście wywołuje diurezę kłębuszkową, jest przeto hormonem diuretycznym płazów. Ta właściwość mezotocyny może mieć istotne znaczenie dla płazów przebywających w zanurzeniu, czemu towarzyszy osmotyczne uwadnianie ich płynów tkankowych. W tym świetle prawdopodobne jest przypuszczenie, że mezotocyna jest czynnikiem umożliwiającym płazom ziemnowodny tryb życia.

DZIAŁANIE OKSYTOCYNOWE

Oksytocyna powoduje u ssaków skurcze macicy podczas porodu oraz oddawanie mleka w okresie laktacji. Riddle [89] po raz pierwszy wykazał, że iniekcje z przysadek ssaków lub ekstraktów z płata nerwowego prowokują u kur przedwczesne składanie jaj. Ważnymi obserwacjami dla poznania biologicznej aktywności neurohormonów było również stwierdzenie, że oczyszczona wazopresyna jest bardziej aktywna od oksytocyny w pobudzeniu macicznego odcinka jajowodu kur i wywoływaniu przedwczesnego składania jaj [26, 67]. Podczas naturalnego składania jaj w przysadce kur maleje ilość AWT, natomiast wzrasta jej poziom w osoczu krwi. Potwierdza to przypuszczenie, że AWT odgrywa podobną rolę w składaniu jaj przez ptaki, jaką pełni oksytocyna w czasie porodu u ssaków. Dalsze przykłady wpływu neurohormonów na jajowód ptaków zamieszcza w swym artykule La Pointe [62].

Z kolei odkryto, że AWT działa na jajowód kury i jajowody pozostałych niższych kręgowców lądowych efektywniej niż AWP. Świadczy to o tym, że u płazów [53], gadów [61, 72] i ptaków peptydy antydiuretyczne mają silniejsze działanie oksytocynowe aniżeli własne peptydy oksytocynopodobne (mezotocyna) występujące u tych kręgowców. Badania prowadzone na różnych przedstawicielach płazów pozwoliły stwierdzić, że wazotocyna argininowa wywołuje skurcz izolowanego jajowodu *R. catesbeiana* [71]. Podobnie reagują jajowody *B. bufo*, *B. marinus*, *X. laevis*, *Necturus maculosus*, *Triturus cristatus*, *S. salamandra* i *S. atra* na syntetyczną AWT, na WT, OT, IT, MT, LWP i oczyszczoną AWP. Niemal we wszystkich przypadkach najwyższą aktywność wykazała AWP [53]. U większości badanych gatunków stwierdzono równocześnie

różnice sezonowe we wrażliwości jajowodów na działanie neurohormonów, przy czym z reguły były one najwyższe w okresie rozrodu.

Składanie jaj można wywołać u gadów iniekcją w odpowiednim czasie peptydów występujących w przysadce nerwowej. Podobnie ciężarne węże żyworodne rodzą przedwcześnie młode pod wpływem wyciągów płata nerwowego gadów lub ssaków [31]. Ciężarne jajożyworodne jaszczurki reagują porodem na podanie im oksytocyny [77], natomiast u jajorodnego legwana ten sam hormon prowokuje składanie jaj [60]. Jednakże syntetyczna AWT jest dziesięciokrotnie aktywniejsza od syntetycznej OT i szesnastokrotnie aktywniejsza od syntetycznej MT w oddziaływaniu na jajowody żyworodnej jaszczurki *Klauberina riversiana* [61].

Rola neurohormonów w składaniu jaj przez ryby, zwłaszcza chrzęstnoszkieletowe (*Chondrichthyes*), jest niejasna. Tym niemniej La Pointe [62], badając wpływ syntetycznej AWT, OT, WT, AT i GT na izolowane jajowody rekina *Triakis semifasciata*, doszedł do wniosku, że w jajowodach ryb chrzęstnych występują receptory tych neurohormonów.

Jeśli idzie o ryby kościste (*Osteichthyes*), to iniekcje wyciągów z przysadki nerwowej różnych kręgowców wywołują składanie jaj u szeregu gatunków ryb kostnoszkieletowych, a także skurcze izolowanych jajników i jajowodów u różnych przedstawicieli *Poeciliidae* pod wpływem neurohormonów [49]. Równocześnie przekonano się, że jajniki jajorodnych okoniowatych i karpowatych nie reagują na wysokie dawki AWT, co może mieć związek z występowaniem w tych narządach mniejszej ilości włókien mięśni gładkich niż w jajnikach ryb jajożyworodnych i żyworodnych.

Jak wynika ze zreferowanych informacji, AWT jest czynnikiem antydiuretycznym u niższych kręgowców czworonożnych, a równocześnie ułatwia składanie jaj lub poród. Jak się wydaje, w niskiej koncentracji AWT działa jako hormon antydiuretyczny, natomiast w wyższym stężeniu wywołuje skurcze jajowodów. Według interpretacji Sawyera [101], zastąpienie u ssaków izoleucyny, występującej w AWT w pozycji 3, fenyloalaniną stłumiło aktywność oksytocynową AWP i LWP, przydając obu tym hormonom ssaków działanie antydiuretyczne. Pojawienie się u ssaków wazopresyn we wczesnym okresie ewolucji oddzieliło funkcję antydiuretyczną od oksytocynowej, umożliwiając niezależną regulację usuwania z organizmu wody i skurczów macicy.

8. EWOLUCJA NEUROHORMONÓW

Występowanie u kręgowców szeregu biologicznie czynnych peptydów o zbliżonej budowie chemicznej zachęciło wielu autorów do podej-

mowania prób odtworzenia ewolucji tych czynników na podstawie zasad kodu genetycznego [40, 83, 101, 123 i in.]. Wszelako uzyskane na tej drodze rezultaty nie są w pełni zadowalające.

Wykrycie AWP u stekowców i torbaczy świadczy o tym, że peptyd ten pojawił się bardzo wcześnie w ewolucji ssaków. Jednak najpowszechniej występującym peptydem, a równocześnie prawdopodobnie najbardziej archaicznym, jest neurohormon wazotocyna argininowa (AWT). Jak wiemy, występuje ona u kręgowców i pozostałych grup kręgowców oprócz ssaków. U tych ostatnich pojawia się jednak u zarodków. Wszystko to świadczy, że hormon ten powstał zanim przodkowie współczesnych kręgowców rozdzielili się na linie prowadzące do *Agnatha* i *Gnathostomata*. Jednakże poszukiwania aktywnych peptydów w narządach neurosekrecyjnych prymitywnych strunowców okazały się bezowocne [94].

Podobieństwo budowy pierwszorzędowej wskazuje, że AWP ssaków mogła powstać z AWT w następstwie pojedynczej mutacji punktowej, która spowodowała zamianę izoleucyny w pozycji 3 przez fenyloalaninę. Na tej samej zasadzie z AWP mogła powstać u ssaków świniokształtnych LWP, przy czym 8-arginina została zastąpiona przez lizynę.

Hipotezą mutacji punktowej można również wytłumaczyć powstanie z AWT oksytocyny przez zastąpienie 8-argininy leucyną. Występowanie OT u zrosłogłowych sugeruje, że jej powstanie wyprzedziło rozdzielenie się linii ewolucyjnych prowadzących do chimer i ryb kościstych. Założenie to napotyka jednak na trudność, którą jest brak oksytocyny zarówno u prymitywnych ryb kościstych, jak również u kręgowców czworonożnych poniżej poziomu ssaków. Skoro jednak OT może powstawać z AWT na drodze pojedynczej mutacji, przeto można postulować [101], że w ewolucji kręgowców powstała ona dwukrotnie.

Zdaniem Sawyera [101], występowanie w AWT, OT i MT 4-glutamininy można uznać za sytuację prymitywną. Ponieważ seryna pojawia się u *Elasmobranchii* w glumitocynie oraz u *Actinopterygii* w izotocynie, stąd peptydy te mogły powstać jeszcze przed wydzieleniem linii ewolucyjnych prowadzących do obu tych grup kręgowców wodnych. Ponieważ mutacja glutaminy w serynę wymaga co najmniej dwóch mutacji punktowych w kodonie glutaminy (CAA/CAG), przeto — zdaniem wspomnianego autora — jest rzeczą możliwą, że w ewolucji ryb miała ona miejsce dwukrotnie. Natomiast mutacja seryny do asparaginy mogła być zjawiskiem izolowanym, które miało miejsce jedynie w ewolucji rekinów.

Sawyer [101] postuluje również istnienie w ewolucji ryb chrzęstnoszkieletowych związków pośrednich między peptydami oksytocynowymi, u których w pozycji 4 występuje glutamina (WT), seryna (IT i GT) i asparagina (AT). Jak wskazują pewne poszlaki, takimi rodowymi analogami dla 4-glutamininy (walitocyny), 4-seryny (izotocyny i glumitocyny)

oraz 4-asparaginy (aspartocyny) mogły być peptydy posiadające w pozycji 4 prolinę lub argininę.

9. NEUROFIZYNY

Na temat neurofizyn dysponujemy obecnie bardzo obfitym i szybko powiększającym się piśmiennictwem. W zakończeniu tego artykułu podaję jedynie kilka najbardziej istotnych informacji dotyczących tego składnika neurosekretu, traktując je jako niezbędne uzupełnienie głównego tematu niniejszego opracowania.

Neurofizyna (NF) jest prostym białkiem o ciężarze cząsteczkowym około 10 000 daltonów, złożonym z niespełna 100 aminokwasów. Biosynteza neurofizyny zachodzi u ssaków w tych samych komórkach neurosekrecyjnych podwzgórza, w których powstają oksytocyna i wazopresyna. Jak wspomniano na wstępie tej publikacji, neurofizyna jest białkiem nośnikowym dla wymienionych neurohormonów, z którymi tworzy nietrwały związek kompleksowy, zwany też białkiem Van Dyke'a. Na razie jedynym niższym kręgowcem, u którego wyizolowano neurofizynę z przysadki nerwowej, jest dorsz, *Gadus morrhua* [81]. Można jednak oczekiwać, że białka o cechach neurofizyny występują również w systemie podwzgórzowo-przysadkowym wszystkich kręgowców, a ich wyizolowanie jest zaledwie kwestią czasu.

Neurofizyna ssaków przyjmuje trzy postacie [82, 127]. Neurofizyny I, II i III szczura występują w stosunku ilościowym 1 : 9 : 3 [125], u owcy — w stosunku 1 : 1 : 5 [124], natomiast u bydła stosunek ten kształtuje się jak 2 : 1 : 3 [88], a u świni — jak 5 : 5 : 1 [119]. Obecnie nie wiemy jeszcze, czy rola neurofizyn ogranicza się do przenoszenia (transport) i magazynowania neurohormonów, czy też białka te działają również jako odrębne hormony.

Według sugestii jednych autorów [25], u szczura NF-I wiąże się z wazopresyną, NF-II — z oksytocyną, natomiast NF-III miałyby być produktem rozpadu NF-II. Jednak badania innego zespołu wskazują, że NF-I wiąże się z wazopresyną, a NF-II i NF-III — z oksytocyną [116]. Ostatnio przytoczona publikacja zawiera informację mówiącą, że NF-II i NF-III występują we wszystkich warunkach doświadczalnych, przecząc jakoby NF-III była kategorią neurofizyny występującą w mniejszości.

Ponieważ w podwzgórzu ssaków wazopresyna powstaje głównie w jądrze nadwzrokowym, jądro przykomorowe zaś jest głównym ośrodkiem syntezy oksytocyny, przeto należy oczekiwać, że w pierwszym z tych jąder ilościową przewagę ma NF-I, natomiast w drugim jądrze przeważają NF-II i NF-III.

Sunde i Sokol [116] w następujący sposób charakteryzują neurofizyny: (i) Jedna neurofizyna i jeden neurohormon są syntetyzowane wspólnie w skoordynowany sposób, (ii) neurohormony i odpowiadające im neurofizyny są razem deponowane w ziarenkach neurosekretu i transportowane z tą samą prędkością, (iii) tempo wewnątrzkomórkowego rozpadu lub inaktywacji obu komponent neurosekretu jest takie samo, wreszcie (iv) neurohormony i neurofizyny są uwalniane razem w równomolarnych ilościach, prawdopodobnie w procesie egzocytozy.

LITERATURA

- [1] ACHER R., Sur l'existence éventuelle d'une hormone unique neurohypophysaire. II. Variations des teneurs en activités ocytocique et vasopressique de la neurohypophyse du rat au cours de la croissance et de la reproduction, *Biochim. Biophys. Acta*, **22**: 428-433, 1956.
- [2] ACHER R., FROMAGEOT C., The relationship of oxitocin and vasopressin to active proteins of posterior pituitary origin. Studies concerning the existence or non-existence of a single neurohypophysial hormone, [in] *The Neurohypophysis* (Heller, H., ed.) pp. 39-50, London and Washington, Butterworth 1957.
- [3] ACHER R., CHAUVET J., CHAUVET M. T., Les hormones neurohypophysaires des reptiles: Isolement de la mésotocine et de la vasotocine de la vipère *Vipera aspis*, *Biochim. Biophys. Acta*, **154**: 255-260, 1968.
- [4] — Evolution of the neurohypophysial hormones, with references to amphibians, *Nature*, **221**: 759-760, 1969.
- [5] — Phylogeny of the neurohypophysial hormones: the avian active peptides, *Eur. J. Biochem.*, **17**: 509-513, 1970.
- [6] — Phylogeny of the neurohypophysial hormones. Two new active peptides isolated from a cartilaginous fish, *Squalus acanthias*, *Eur. J. Biochem.*, **29**: 12-19, 1972.
- [7] ACHER R., CHAUVET J., LENCI M. T., Purification et structure de l'ocytocine et de la vasopressine du cheval, *Biochim. biophys. Acta*, **31**: 545-548, 1959.
- [8] — Purification et structure de l'ocytocine et de la vasopressine du mouton, *C. R. Acad. Sci., Paris*, **1**: 1435-1438, 1959.
- [9] ACHER R., CHAUVET J., OLIVRY G., Sur l'existence éventuelle d'une hormone unique neurohypophysaire. I. Relations entre l'ocytocine, la vasopressine et la proteine de Van Dyke extraites de la neurohypophyse du boeuf, *Biochem. biophys. Acta*, **22**: 421 - 427, 1956.
- [10] ACHER R., CHAUVET J., CHAUVET M. T., CREPY D., Les hormones neurohypophysaires des poissons: isolement d'une vasotocine du tacaud (*Gadus luscus* L.), *Biochem. Biophys. Acta*, **51**: 419-420, 1961.
- [11] — Isolement d'une nouvelle hormone neurohypophysaire, l'isotocine, présente chez les poissons osseux, *Biochem. Biophys. Acta*, **58**: 624-625, 1962.
- [12] — Phylogénie des peptides neurohypophysaires: isolement de la mésotocine (Ileu₈-ocytocine) de la grenouille, intermédiaire entre la Ser₄-Ileu₈-ocytocine des poissons osseux et l'ocytocine des mammiferes, *Biochim. Biophys. Acta*, **90**: 613-615, 1964.
- [13] — Caractérisation des hormones neurohypophysaires d'un poisson osseux d'eau douce, la carpe (*Cypronus carpio*). Comparaison avec les hormones des poissons osseux marins, *Comp. Biochem. Physiol.*, **14**: 245-254, 1965.

- [14] — Phylogénie des peptides neurohypophysaires: Isolement d'une nouvelle hormone, la glumitocine (Ser⁴-Gln⁸-oxytocine) présente chez un poisson cartilagineux, la raie (*Raia clavata*), Biochim. Biophys. Acta, **107**: 393–396, 1965.
- [15] — Les hormones neurohypophysaires des amphibiens: Isolement et caractérisation de la mésotocine et de la vasotocine chez le crapaud (*Bufo bufo*), Gen. comp. Endocrinol., **8**: 337–343, 1967.
- [16] — Molecular evolution of neurohypophysial hormones: Comparison of the active peptides of three bony fishes, Gen. comp. Endocrinol., **11**: 535–538, 1968.
- [17] ADAMS, C. W. M., SLOPER J. C., The hypothalamic elaboration of posterior pituitary principles in man, rat and dog. Histochemical evidence derived from a performic acid-alcian blue reaction for cystine, J. Endocrinol., **31**: 221–228, 1956.
- [18] BABIKER M. M., RANKIN J. C., Effects of neurohypophysial hormones on renal function in the freshwater and seawater adapted eel *Anguilla anguilla* L.), J. Endocrinol., **57**: 11–12, 1973.
- [19] BARER R., LEDERIS K., Ultrastructure of the rabbit neurohypophysis with special reference to the release of hormones, Z. Zellforsch., **75**: 201–139, 1966.
- [20] BARER R., HELLER H., LEDERIS K., The isolation, identification and properties of the hormonal granules of the neurohypophysis, Proc. Roy. Soc. B, **158**: 388–416, 1963.
- [21] BARGMANN W., GAUDECKER B. von, Ueber die Ultrastruktur neurosekretorischer Elementargranula, Z. Zellforsch., **96**: 495–504, 1969.
- [22] BERN H. A., The properties of neurosecretory cells, [in] Progress in Comparative Endocrinology, Gen. comp. Endocrinol., Suppl. **1**: 117–132, 1962.
- [23] BERN H. A., KNOWLES F., Neurosecretion, [in] Neuroendocrinology (Martini L., Ganong W. F., eds.) Vol. **I**: 139–186, New York and London, Academic Press 1966.
- [24] BERN H. A., NISHIOKA R. S., HAGADORN I. R., Association of elementary neurosecretory granules with the Golgi complex, J. Ultrastr. Res., **5**: 311–320, 1961.
- [25] BURFORD G. D., PICKERING B. T., Intra-axonal transport and turnover of neurophysins in the rat. A proposal for a possible origin of the minor neurophysin component, Biochem. J., **136**: 1047–1052, 1973.
- [26] BURROWS W. H., FRAPS R. M., Action of vasopressin and oxytocin in causing premature oviposition by domestic fowl, Endocrinology, **30**: 702–710, 1942.
- [27] CHAUVET J., CHAUVET M. T., ACHER R., Les hormones neurohypophysaires des mammifères: Isolement et caractérisation de l'ocytocine et de la vasopressine de la baleine (*Balaenoptera physalus* L.), Bull. Soc. Chim. biol., Paris, **45**: 1369–1378, 1963.
- [28] CHAUVET J., LENCI M. T., ACHER R., Présence de deux vasopressines dans la neurohypophyse du poulet, Biochim. Biophys. Acta, **38**: 571–573, 1960.
- [29] CHAUVET J., CHAUVET M. T., BEAUPAIN D., ACHER R., Les hormones neurohypophysaires des Raies: Comparaison des hormones du Pocheteau blanc (*Raia batis*) et de la Raie bouctée (*Raia clavata*), C. R. Acad. Sci. Paris, **261**: 4234–4236, 1965.
- [30] CHESTER JONES I., HENDERSON I. W., WALES N. A. M., GARLAND H. O., Effects of arginine vasotocin in fish and amphibia, [in] Neurohypophysial Hormones (Wolstenholme G. E. W., Birch J., eds.) pp. 29–44, London, Churchill Livingstone 1971.
- [31] CLAUSEN H. J., Studies on the effect of ovariectomy and hypophysectomy on gestation in snakes, Endocrinology, **27**: 700–704, 1940.

- [32] DEAN C. R., HOPE D. B., KAZIĆ T., Evidence for the storage of oxytocin with neurophysin-I and of vasopressin with neurophysin-II in separate neurosecretory granules, *Brit. J. Pharmacol.*, **34**: 192P-193P, 1968.
- [33] De ROBERTIS E., Subcellular distribution of neurohumors and chemical receptors in the central nervous system, [in] *Neurohormones and Neurohumors*, *J. Neuro.-Visc. Rel.*, Suppl. **IX**: 261-276, 1969.
- [34] DONEV S., Ultrastructure des granules neurosécrétoires du cobaye, [in] *Aspects of Neuroendocrinology* (Bargmann W., Scharrer B., eds.) pp. 366-373, Berlin, Springer 1970.
- [35] DREIFUSS J. J., A review on neurosecretory granules: their contents and mechanisms of release, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **248**: 184-201, 1975.
- [36] Du VIGNEAUD V., GISH D., KATSOVANNIS P., A synthetic preparation possessing biological properties associated with arginine-vasopressin, *J. Amer. Chem. Soc.*, **76**: 4751-4752, 1954.
- [37] Du VIGNEAUD V., RESSLER C., TRIPPET S., The sequence of amino acid in oxytocin with a proposal for the structure of oxytocin, *J. Biol. Chem.*, **205**: 949-957, 1953.
- [38] FAWCETT C. P., POWELL A. E., SACHS H., Biosynthesis and release of neurophysin, *Endocrinology*, **83**: 1299-1310, 1968.
- [39] FERGUSON D. R., The genetic distribution of vasopressins in the peccary (*Tayassu angulatus*) and warthog (*Phacochoerus aethiopicus*), *Gen. comp. Endocrinol.*, **12**: 609-613, 1969.
- [40] FERGUSON D. R., HELLER H., Distribution of neurohypophysial hormones in mammals, *J. Physiol. (London)*, **180**: 846-863, 1965.
- [41] FERGUSON D. R., PICKERING B. T., Arginine and lysine vasopressins in the hippopotamus neurohypophysis, *Gen. comp. Endocrinol.*, **13**: 425-429, 1969.
- [42] FOLLETT B. K., HELLER H., The neurohypophysial hormones of bony fishes and cyclostomes, *J. Physiol. (London)*, **172**: 74-91, 1964.
- [43] — The neurohypophysial hormones of lung-fishes and amphibians, *J. Physiol. (London)*, **172**: 92-106, 1964.
- [44] GABE M., Présence de composés décelables par la réaction à l'acide periodique-Schiff dans le produit de neurosécrétion hypothalamique chez quelques Vertébrés, *C. R. Acad. Sci.*, **250**: 937-939, 1960.
- [45] GERSCHENFELD H. M., TRAMEZZANI J., De ROBERTIS E., Ultrastructure and function in neurohypophysis of the toad, *Endocrinology*, **66**: 741-762, 1960.
- [46] GINSBURG M., IRELAND M., The role of neurophysin in the transport and release of neurohypophysial hormones, *J. Endocrinol.*, **35**: 289-298, 1966.
- [47] GREEN J. D., Microanatomical aspects of the formation of neurohypophysial hormones and neurosecretion, [in] *The Pituitary Gland* (Harris G. W., Donovan B. T., eds.), Vol. **III**: 240-268, London, Butterworths 1966.
- [48] HAGADORN I. R., BERN H. A., NISHIOKA R. S., The fine structure of the supraoesophageal ganglion of the rhynchobdellid leech, *Theromyzon rude*, with special reference to neurosecretion, *Z. Zellforsch.*, **58**: 714-758, 1963.
- [49] HELLER H., The effect of neurohypophysial hormones on the female reproductive tract of lower vertebrates, *Gen. comp. Endocrinol.*, Suppl. **3**: 703-714, 1972.
- [50] HELLER H., LEDERIS K., Posterior pituitary hormones of the hippopotamus, *J. Physiol. (London)*, **151**: 47-49P, 1960.
- [51] HELLER H., LEDERIS K., Characteristics of isolated neurosecretory vesicles

- from mammalian neural lobes, [in] Neurosecretion, Heller H., Clark R. B., eds., pp. 35-46, London Academic Press 1962.
- [52] HELLER H., PICKERING B. T., Neurohypophysial hormones of nonmammalian vertebrates, *J. Physiol. (London)*, **155**: 98-114, 1961.
- [53] HELLER H., FERRERI E., LEATHERS D. H. G., The effect of neurohypophysial hormones on the amphibian oviduct in vitro with some remarks on the histology of this organ, *J. Endocrinol.*, **47**: 495-509, 1970.
- [54] ISHII S., HIRANO T., KOBAYASHI H., Preliminary report on the neurohypophysial hormone activity in the avian median eminence, *Zool. Mag. (Tokyo)*, **71**: 206-211, 1962.
- [55] JARD S., MOREL F., Action of vasotocin and some of its analogues on salt and water excretion by the frog, *Am. J. Physiol.*, **204**: 222-226, 1963.
- [56] JASIŃSKI A., Ewolucja pojęcia neurosekrecja, *Postępy Biologii Komórki* (w druku).
- [57] JONES C. W., PICKERING B. T., Comparison of the effects of water deprivation and sodium chloride imbibition on the hormone content of the neurophysis of the rat, *J. Physiol. (London)*, **203**: 449-458, 1969.
- [58] LANE N. J., Elementary neurosecretory granules in the neurones of the snail, *Helix aspersa*, *Quart. J. Micr. Sci.*, **105**: 31-34, 1964.
- [59] — The fine-structural localization of phosphatases in neurosecretory cells within the ganglia of certain gastropod snails, *Am. Zool.*, **6**: 130-157, 1966.
- [60] La POINTE J. L., Induction of oviposition in lizards with the hormone oxytocin, *Copeia*, **3**: 451-452, 1964.
- [61] — Effect of ovarian steroid and neurohypophyseal hormones on the oviduct of the viviparous lizard, *Klauberina riversiana*, *J. Endocrinol.*, **43**: 197-205, 1969.
- [62] — Comparative physiology of neurohypophysial hormone action on the vertebrate oviduct-uterus, *Am. Zool.*, **17**: 763-773, 1977.
- [63] LEDERIS K., HELLER H., Intracellular storage of vasopressin and oxytocin in the posterior pituitary lobe, *Acta Endocrinol. (Copenhagen)*, Suppl. **51**: 115-116, 1960.
- [64] LIGHT A., Du VIGNEAUD V., On the nature of oxytocin and vasopressin from human pituitary, *Proc. Soc. exp. Biol. N. Y.*, **98**: 692-696, 1958.
- [65] MAZZI V., Aspetti istochimici e ultrastrutturali della neurosecrezione nei Vertebrati, *Riv. Istochim. Norm. Patol.*, **1**: 413-464, 1961.
- [66] MILCU S. M., PAVEL S., NEACSU C., Biological and chromatographic characterization of a polypeptide with pressor and oxytocic activities isolated from bovine pineal gland, *Endocrinology*, **72**: 563-566, 1963.
- [67] MORASH R., GIBBS O. S., The effect of pituitary on the bird, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **37**: 475-480, 1929.
- [68] MORRIS J. F., CANATA M. A., Ultrastructural preservation of the dense core of the posterior pituitary granules and its implications for hormone release, *J. Endocrinol.*, **57**: 517-529, 1973.
- [69] MORRIS J. F., TILLY G. N., HAMILTON G., A quantitative approach to the ultrastructure of the posterior pituitary of the rat, *Proc. III Eur. Anat. Congr.*, Manchester, England 1973.
- [70] MUNSICK R. A., Chromatographic and pharmacological characterization of the neurohypophysial hormones of an amphibian and a reptile, *Endocrinology*, **78**: 591-599, 1966.
- [71] — The effect of neurohypophysial hormones and similar polypeptides on the

- uterus and other extravascular smooth muscle tissue, [in] Handbook of Experimental Pharmacology, vol. 23, pp. 443–474, Berlin, Springer 1968.
- [72] MUNSICK R. A., SAWYER W. H., van DYKE H. B., Avian neurohypophysial hormones: pharmacological properties and tentative identification, *Endocrinology*, **66**: 860–871, 1960.
- [73] PALAY S. L., An electron microscope study of the neurohypophysis in normal, hydrated and dehydrated rats, *Anat. Rec.*, **121**: 348, 1955.
- [74] — The fine structure of secretory neurone in the preoptic nucleus of the goldfish, *Anat. Rec.*, **138**: 417–444, 1960.
- [75] — Classification of vesicles according to size and stored chemical, *Neurosciences Res. Prog. Bull.*, **5**: 9–10, 1967.
- [76] PANG P. K. T., Osmoregulatory functions of neurohypophysial hormones in fishes and amphibians, *Am. Zool.*, **17**: 739–749, 1977.
- [77] PANIGEL M., Contribution à l'étude de la ovoviviparité chez les reptiles; gestation et parturition chez le lézard vivipare, *Zootoca vivipara*, *Ann. Soc. Nat. (Zool.) Paris*, **18**: 569–668, 1965.
- [78] PERKS A. M., SAWYER W. H., A new neurohypophysial principle in the elasmobranch pituitary, *Nature*, **205**: 154–156, 1965.
- [79] PERKS A. M., VIZSOLYI E., Studies of the neurohypophysis in foetal mammals, [in] *Foetal and Neonatal Physiology* (Comline K. S., Cross K. W., Dawes G. S., Natanielsz P. W., eds.), pp. 430–438, Cambridge, Cambridge University Press 1973.
- [80] PICKERING B. T., The neurohypophysial hormones of a reptile species, the cobra (*Naja naja*), *J. Endocrinol.*, **39**: 285–294, 1967.
- [81] — A neurophysin from cod (*Gadus morrhua*) pituitary glands: isolation and properties, *J. Endocrinol.*, **42**: 143–152, 1968.
- [82] — Neurohypophysial hormones-Comparative aspects, [in] *The Endocrine Hypothalamus* (Jeffcoate S. L., Hutchinson J. S. M., eds.) pp. 213–227, London, New York, San Francisco, Academic Press 1978.
- [83] PICKERING B. T., HELLER H., Oxytocin as a neurohypophysial hormone in the holocephalian elasmobranch fish, *Hydrolagus collei*, *J. Endocrinol.*, **45**: 597–606, 1969.
- [84] POISNER A. M., DOUGLAS W. W., Adenosine triphosphate and adenosine triphosphatase in hormone-containing granules of posterior pituitary gland, *Science*, **160**: 203–204, 1968.
- [85] POLENOW A. L., *Gipotalamiczeskaja niejrosekrecja*, Leningrad, Nauka 1968.
- [86] POPENOE E. A., LAWLER H. C., Du VIGNEAUD V., Partial purification and amino acid content of vasopressin from hog posterior pituitary glands, *J. Am. chem. Soc.*, **74**: 3713, 1952.
- [87] RASMUSSEN H., CRAIG L., The isolation of arginine vasotocin from fish pituitary glands, *Endocrinology*, **68**: 1051–1055, 1961.
- [88] RAUCH R., HOLLENBERG M. D., HOPE D. B., Isolation of a third bovine neurophysin, *Biochem. J.*, **115**: 473–479, 1969.
- [89] RIDDLE O., A simple method of obtaining premature eggs from birds, *Science*, **54**: 664–666, 1921.
- [90] RURAK D. W., PERKS A. M., The pharmacological characterization of arginine vasotocin in the pituitary of the Pacific hagfish (*Polistotrema stoutii*), *Gen. comp. Endocrinol.*, **22**: 480–488, 1974.
- [91] — The neurohypophysial principles of the western brook lamprey, *Lampetra richardsoni*. Studies in the adult, *Gen. comp. Endocrinol.*, **29**: 301–312, 1976.

- [92] SACHS H., TAKABATAKE Y., Evidence for a precursor in vasopressin synthesis, *Endocrinology*, **75**: 943–948, 1964.
- [93] SANO Y., KNOOP A., Elektronenmikroskopische Untersuchungen am kaudalen neurosekretorischen System von *Tinca vulgaris*, *Z. Zellforsch.*, **49**: 464–492, 1959.
- [94] SAWYER W. H., Oxytocic activity in the neural complex of two ascidians, *Chelyosoma productum* and *Pyura haustor*, *Endocrinology*, **65**: 520–523, 1959.
- [95] — Comparative physiology and pharmacology of the neurohypophysis, *Recent Progr. Hormone Res.*, **17**: 437–467, 1961.
- [96] — Active neurohypophysial principles from a cyclostome (*Petromyzon marinus*) and two cartilaginous fishes (*Squalus acanthias* and *Hydrolagus collei*), *Gen. comp. Endocrinol.*, **5**: 427–439, 1965.
- [97] — Chromatographic and pharmacological characteristics of the active neurohypophysial principles in the spiny dogfish, *Squalus acanthias*, *Gen. comp. Endocrinol.*, **9**: 303–311, 1967.
- [98] — The active neurohypophysial principles of two primitive bony fishes, the bichir (*Polypterus senegalis*) and the African lungfish (*Protopterus aethiopicus*), *J. Endocrinol.*, **44**: 421–435, 1969.
- [99] — Vasopressor, diuretic and natriuretic responses by the lungfish to arginine vasotocin, *Am. J. Physiol.*, **218**: 1789–1794, 1970.
- [100] — Lungfishes and amphibians; endocrine adaptation and the transition from aquatic to terrestrial life, *Feder. Proc.*, **31**: 1609–1614, 1972.
- [101] — Evolution of neurohypophysial hormones and their receptors, *Feder. Proc.*, **36**: 1842–1847, 1977.
- [102] SAWYER W. H., PICKFORD G. E., Neurohypophysial principles of *Fundulus heteroclitus*: characteristics and seasonal changes, *Gen. comp. Endocrinol.*, **3**: 439–445, 1963.
- [103] SAWYER W. H., FREER R. J., TSENG T.-C., Characterization of a principle resembling oxytocin in the pituitary of the holocephalian ratfish (*Hydrolagus collei*) by partition chromatography on Sephadex columns, *Gen. comp. Endocrinol.* **9**: 31–37, 1967.
- [104] SAWYER W. H., MUNSICK R. A., Van DYKE H. B., Pharmacological characteristic of neurohypophysial hormones from a marsupial (*Didelphis virginiana*) and monotreme (*Tachyglossus (Echidna) aculeatus*), *Endocrinology* **67**: 137–138, 1960.
- [105] SAWYER W. H., BLAIR-WEST J. R., SIMPSON P. A., SAWYER M. K., Renal responses of Australian lungfish to vasotocin, angiotensin II and NaCl infusion, *Am. J. Physiol.*, **231**: 593–602, 1976.
- [106] SAWYER W. H., MANNING M., HEINICKE E., PERKS A. M., Elasmobranch oxytocin-like principles: comparison with synthetic glumitocin, *Gen. comp. Endocrinol.*, **12**: 387–390, 1969.
- [107] SCHARRER E., BROWN S., Neurosecretion. XII. The formation of neurosecretory granules in the earthworm, *Lumbricus terrestris* L., *Z. Zellforsch.*, **54**: 530–540, 1961.
- [108] SCHIEBLER T. H., Zur Histochemie des neurosekretorischen hypothalamisch-neurohypophysären Systems, *Acta anat.*, **15**: 393–416, 1952.
- [109] SIMPSON L., BERN H. A., NISHIOKA R. S., Survey of evidence for neurosecretion in gastropod molluscs, *Am. Zool.*, **6**: 123–138, 1966.
- [110] SLOPER J. C., Hypothalamic neurosecretion in the dog and cat, with particular reference to the identification of neurosecretory material with posterior lobe hormone, *J. Anat.*, **89**: 301–316, 1955.

- [111] — The experimental and cytopathological investigation of neurosecretion in the hypothalamus and pituitary, [in] *The Pituitary Gland*, Vol. 3, pp. 131–239, (Harris G. W., Donovan B. T., eds.), London, Butterworths 1966.
- [112] STAHL A., Recherches sur les élaborations cellulaires et la neurosécrétion dans l'encéphale des poissons téléostéens, *Acta anat., Suppl.* **28**: 1–158, 1957.
- [113] STERBA G., Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen über die Neurosekretion beim Bachneunage (*Lampetra planeri*), *Z. Zellforsch.*, **55**: 763–789, 1961.
- [114] STERBA G., WELLNER K. P., Grundlagen des histochemischen und biochemischen Nachweises von Neurosekret (Trägerprotein der Oxytozine) mit Pseudoisozyaninen, *Acta histochem.*, **17**: 268–292, 1964.
- [115] STERNBERGER L. A., HARDY P. H. Jr., CUCULIS J. J., MEYER H. G., The unlabeled antibody enzyme method of immunocytochemistry. Preparation and properties of soluble antigen-antibody complex (horseradish peroxidase-anti-horseradish peroxidase) and its use in identification of spirochetes, *J. Histochem. Cytochem.*, **18**: 315–333, 1970.
- [116] SUNDE D. A., SOKOL H. W., Quantification of rat neurophysins by polyacrylamide gel electrophoresis: Application to the rat with hereditary hypothalamic diabetes insipidus, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **248**: 345–364, 1975.
- [117] TASSO F., Localisation cytochimique ultrastructurale de glucoprotéines dans les granules neurosécrétoires de la posthypophyse du rat, *J. Microscopie*, **18**: 115–118, 1973.
- [118] THORN N. A., RUSSELL J. T., VILHARDT H., Hexosamine, calcium and neurophysin in secretory granules and the role of calcium in hormone release, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **248**: 202–27, 1975.
- [119] UTTENTAL L. O., HOPE D. B., The isolation of three neurophysins from porcine posterior pituitary lobes, *Biochem. J.*, **116**: 899–909, 1970.
- [120] Van DYKE H., ADAMSON F., ENGEL S., Aspects of the biochemistry and physiology of the neurohypophysial hormones, *Rec. Progr. Hormone Res.*, **11**: 1–41, 1955.
- [121] — The storage and liberation of neurohypophysial hormones, [in] *Neurohypophysis*, Heller H., ed., pp. 65–73, London, Butterworths 1958.
- [122] VIZSOLYI E., PERKS A. M., New neurohypophysial principle in foetal mammals, *Nature*, **223**: 1169–1171, 1969.
- [123] Vliegenthart J. F. G., Versteeg D. H. G., The evolution of the vertebrate neurohypophysial hormones in relation to the genetic code, *J. Endocrinol.*, **38**: 3–12, 1967.
- [124] WATKINS W. B., Neurophysins of the sheep, *Biochem. J.*, **126**: 159–160, 1972.
- [125] — Tentative identification of three neurophysins from the rat posterior pituitary gland, *J. Endocrinol.*, **55**: 577–589, 1972.
- [126] WEINSTEIN H., MALAMED S., SACHS H., Isolation of vasopressin-containing granules from the neurohypophysis of the dog, *Biochim. biophys. Acta*, **50**: 386–389, 1961.
- [127] WUU T. C., CRUMM S., SAFFRAN M., Amino acid sequence of porcine neurophysin I, *J. Biol. Chem.*, **246**: 6043–6063, 1971.

Otrzymano: grudzień 1979.

Przyjęto: 8 kwiecień 1980.

Adres autora: ul. Karasia 6, 30-060 Kraków.

MIKROŚRODOWISKO GRANULOPOEZY IN VITRO

MICROENVIRONMENT OF GRANULOPOIESIS IN VITRO

Danuta ROŻYŃKOWA

Samodzielna Pracownia Genetyki Człowieka Instytutu Patologii Klinicznej
AM w Lublinie

Streszczenie. Omówiono podstawowe elementy systemu klonalnego w półpłynnym podłożu, a mianowicie: 1. komórki macierzyste szeregu granulocytowego, zdolne do tworzenia kolonii, 2. czynnik pobudzający wzrost kolonii, 3. składniki pożywki o znaczeniu wspomagającym i 4. czynnik granulocyt pochodny o wpływie hamującym. Zwrócono uwagę na konieczność posługiwania się takim układem hodowli klonalnej, który uwzględnia efekt dawki czynnika pobudzającego i wskazuje na próg wrażliwości komórek na ten czynnik. Jest to szczególnie istotne dla porównań hodowli komórek białaczkowych. W regulacji ustrojowej hematopoezy podkreślono udział limfocytu T.

Summary. The main components participating in clonal proliferation on semi solid medium were presented, i.e. 1. the granulopoietic colony forming cells, 2. the colony stimulating factor, 3. the medium conditioning nutritional and permissive factors, 4. the granulocyte-derived inhibitory factors. Of particular interest is the development of a way suitable of studying the dose effect of colony stimulating factor and of investigating the relative cell sensitivity coefficient. This is particularly important to apply to the comparison of leukemic conditions. The regulatory role of T lymphocyte for hemopoiesis was stressed.

Stosowane skróty

CFC (colony forming cell) — komórka, z której in vitro powstaje kolonia, nazywana też CFU (colony forming unit)

CFC-G, M lub CFU-G, M — komórka, z której powstaje mieszana kolonia złożona z granulocytów i makrofagów

CFU-S (colony forming unit-spleen) — chodzi o wieloważną komórkę pnia

* Praca wykonana w problemie PAN 09.7.4.1.4.

K562 — symbol linii komórkowej wyprowadzonej z wysięku opłucnej od chorego z przewlekłą białaczką szpikową w przełomie blastycznym
LAA (leukemia associated antigen) — antygen komórki białaczkowej
PGE (prostaglandin E) — prostaglandyny, frakcja E
PHA (phytohemagglutinin) — fitohemaglutynina
CM (conditioned medium) — pożywka „uwarunkowana” produktami hodowanych komórek

Glikoproteidowe substancje pobudzające wzrost kolonii z CFC

CF (colony factor) — czynnik wzrostu kolonii, zwany także CSF
CSF (colony stimulating factor) albo ogólniej CSA (colony stimulating activity).
CSF-G — czynnik stymulujący wzrost kolonii granulocytowych
CSF-G, M — czynnik stymulujący wzrost kolonii mieszanych złożonych z granulocytów i makrofagów
CSF-E — czynnik stymulujący wzrost kolonii erytrocytowych (erytropoetyna)
GF (growth factor) — czynnik wzrostu komórki, identyfikowany z TIA (thymidine incorporation activity) — aktywność wbudowywania tymidyny.

Hodowle szpiku, jakie stosowano dawniej po zawieszeniu komórek w płynnych pożywkach, nie odtwarzają żadnego ze swoistych procesów krwiotworzenia. W tym zawiesinowym układzie hodowli można czasem zaobserwować wzrost komórek na dnie butelek, określane mianem transformacji do komórek fibroblastopodobnych (ryc. 1.). Przypuszcza się, że te komórki reprezentują populację wczesnych prekursorów komórek mielopoetycznych bądź komórek zrębu. Sposób ich wzrostu na powierzchni szkła zależy od materiału, z którego zostały wyprowadzone [40]. Mianowicie, komórki linii białaczkowej ludzkiej K562, nacechowane antygenem LAA (leukemia associated antigen) i markerem chromosomowym Ph', po przeobrażeniu in vitro do morfologicznej postaci fibroblastów, łatwiej niż komórki wyprowadzone z prawidłowego szpiku odrywają się od powierzchni szkła i przechodzą do zawiesiny, podczas gdy ich miejsce na szkle zostaje zajęte przez prawidłowe komórki, których wzrost zależy od „zakotwiczenia”. Wspomniana linia K562 została wyprowadzona z komórek białaczkowych w okresie przełomu blastycznego od chorego na przewlekłą białaczkę szpikową.

Swoiste procesy granulopoezy udaje się odtworzyć tylko w specjalnych układach doświadczalnych, których zasadniczym składnikiem są z jednej strony komórki rzędu granulopoetycznego, nazwane przez Bradleya CFC (colony forming cells) oraz z drugiej strony, źródło aktywności klonotwórczej, nazwane przez Metcalfa CSA (colony stimulating activity) w postaci komórek lub w postaci substancji przez nie wytworzonej. Te metody zostały wprowadzone w latach sześćdziesiątych jako metody klonowania w półpłynnych żelach *in vitro* [8, 33, 50] oraz hodowle w komorach dyfuzyjnych, wszczepianych w jamę otrzewną myszy [7, 25]. Pewną odmianę hodowli klonalnej *in vitro* stanowi system Golde i Cline, złożony z dwóch naczyń przedzielonych błoną dializacyjną [22].

Korzyść klonowania *in vitro* polega na możliwości rozpoznania w danym materiale badawczym obecności komórek prekursorowych po ich zdolności do utworzenia kolonii w odpowiedzi na właściwy bodziec, tzn. że można badać także ustanie tej zdolności np. po wstępnej preinkubacji komórek z lekiem lub innym testowanym czynnikiem. Tylko tą metodą udaje się bowiem określić, czy narzucona przez lek *in vitro* blokada proliferacji istotnie utrzymuje się. W odróżnieniu od klonowania, jednorazowo oznaczane indeksy, mitotyczny i wyznakowania trytowaną tymidyną, wskazują tylko przejściową odpowiedź komórek na lek. Badania mikrośrodowiska granulopoezy włączyły się szybko do naświetlenia autonomii ekspansywnego rozrostu komórek białaczkowych, a także do oceny zwiększonej zapadalności na białaczkę w niektórych zespołach chorobowych genetycznie uwarunkowanych, np. w zespole Downa [61].

KOMÓRKI UKIERUNKOWANE DO GRANULOPOEZY

Półpłynna konsystencja pożywki zestalonej agarom 0,3% lub metylocellulozą 1% zapewnia komórkom granulopoetycznym unieruchomienie, a przez to i dowód dla obserwatora, że komórki tworzące ostateczne jednostki kolonijne (CFU-C), w przebiegu czasu nie tylko aktywnie proliferowały [13], ale także różnicowały i dojrzewały do form ostatecznych [16]. Badaniem cytologicznym i cytochemicznym, uwzględniając odczyn na mieloperoksydazę, można przekonać się, że w ciągu tygodnia rozwijają się niewielkie kolonie, złożone ostatecznie z granulocytów i makrofagów (ryc. 2. i 3.). Proces musi być poprzedzony reprodukcją komórek prekursorowych, jako komórek docelowych na działanie czynników pobudzających wzrost. Czynniki hamujące działają prawdopodobnie na różnych etapach dojrzewania.

Różne sposoby rozdzielania komórek szpiku na frakcje komórkowe [44] rzutują na kontrolną wydajność klonowania. W próbce szpiku zdrowego człowieka, nie poddanej żadnym manipulacjom rozdziału, znajduje

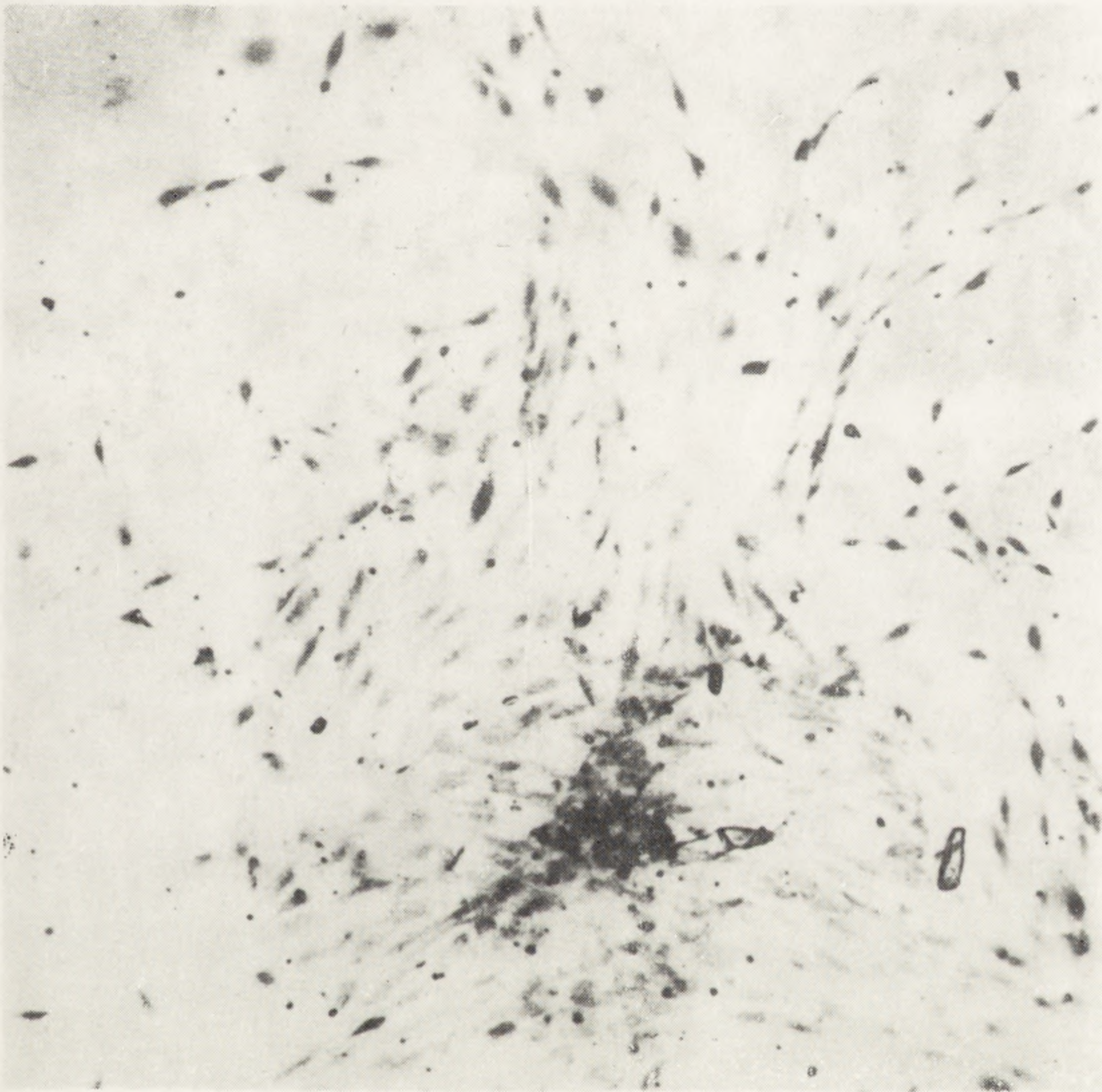
się około 8% niedojrzałych komórek mieloidalnych, a których liczbę można zwiększyć do 30% przez wirowanie na roztworach fikołu i uropoliny, pozwalające jednocześnie na pozbycie się granulocytów. Rozdział komórek na podstawie szybkości sedymentacji przy 1 g w gradiencie sacharozowym pozwala uzyskać około 60% niedojrzałych komórek mieloidalnych, z których 25% jest w fazie S [34]. Jednakże ani rozdziały według gęstości komórek za pomocą gradientu gęstości albuminy czy fikołu z izopaque, ani rozdziały według średnicy komórek metodami szybkości sedymentacji nie pozwalają na uzyskanie populacji komórek homogennych pod względem aktywności tworzenia kolonii, a uwolnionych od komórek pobudzających tę aktywność, jak monocyty, i od komórek o wpływach hamujących, jak granulocyty [29]. Richman i wsp. [54] proponują obejść tę heterogenność przez oddzielenie populacji komórkowych za pomocą markerów powierzchni. Uzyskują przez to frakcję komórek jednojądrzastych „nie T i nie przylegających do szkła”. W tej masie komórkowej mogą być jeszcze komórki potencjalnie wieloważne o nieograniczonej zdolności różnicowania [3].

Do rozważań nad wydajnością klonowania, zależną od liczby CFC, dołącza się jeszcze miejsce anatomiczne pobierania próbki szpiku [26] oraz indywidualne wahania cykliczne granulopoezy i różnice zależne od płci dawcy [4]. Znamienną, choć niewielkiego stopnia różnicę opisano dla wydajności klonowania CFC z krwi obwodowej między kobietami a mężczyznami. U tych ostatnich liczba CFC była wyższa.

Właściwa interpretacja kontrolnej (ślepej próby) proliferacji w systemie agarowym może być utrudniona przez brak orientacji we ważności wpływów nieswoistych. Należy do nich przede wszystkim właściwa surowica heterologiczna [2, 9] i dodatek hemolizatu do około 3% objętości pożywki [30, 56, 65]. Niezależnie od roli odżywczej hemolizatu, dalszym ważnym uzupełnieniem standardowej pożywki McCoy 5A lub α -medium są witaminy i aminokwasy, szczególnie seryna, glutamina i asparagina. Dostateczna zawartość pirogronianu w warstwie wzrostu kolonii ma, zdaniem Pike i Robinsona [50], zabezpieczać integralność struktur błonistych komórek zespolonych w jednostkach kolonijnych. Warunki wilgotności otoczenia i nawietrzanie 20% O₂ oraz 10% CO₂ są spełniane przez odpowiedni inkubator. Moore i Metcalf [45] stwierdzili, że do badań granulopoezy wystarcza nawet system ekcykatora opisany przez Firke-ta [20].

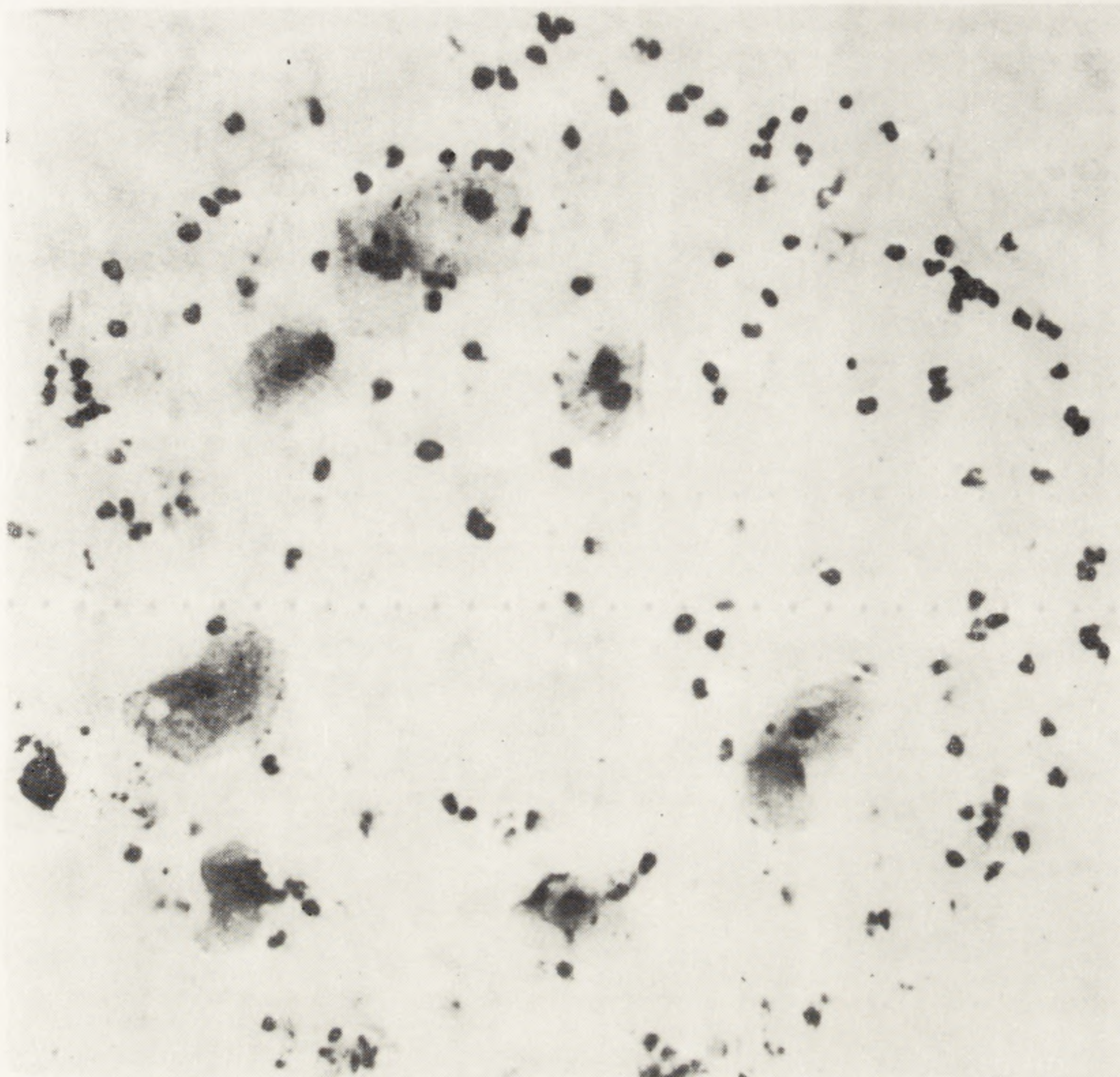
GRANULOPOETYCZNY CZYNNIK KLONOTWÓRCZY

Rozruch wzrostu klonalnego jest uzależniony od swoistego stymulatora. Dla szeregu granulocytowego jest nim granulopoetyczny czynnik klonotwórczy — CSF-G. W trakcie opisywania różnych układów



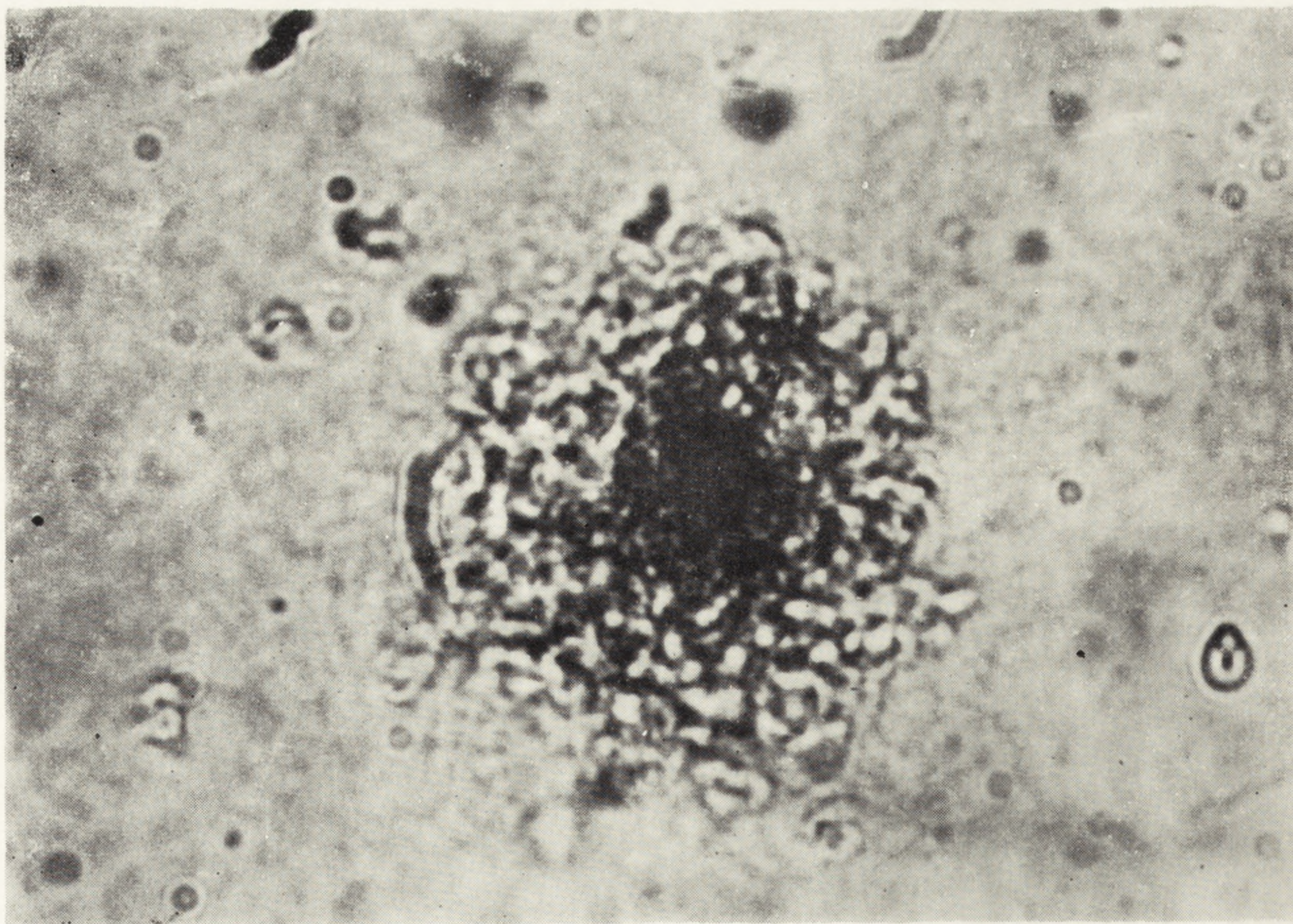
Ryc. 1. Obraz mikroskopowy kolonii komórek fibroblastopodobnych wyrosłej na szkle na dnie naczynia z hodowlą typu zawiesinowego prawidłowych komórek szpiku z kości udowej

Pożywka McCoy 5A zmodyfikowana. Badania własne: Hodowla 45B/1979. Powiększenie około 200×



Ryc. 2. Obraz mikroskopowy kolonii granulocytowej wyrosłej w półpłynnym podłożu z metylocellulozą i pożywką McCoy 5A zmodyfikowaną

Stymulacja wzrostu kolonii przez warstwę odżywczą składającą się z krwinek białych krwi obwodowej. Badania własne hodowli prawidłowego szpiku: 56 - 27/1979. Powiększenie około 400 \times . Widać także kilka makrofagów.



Ryc. 3. Kolonia granulocytowa widziana przyżyciowo w metylocellulozie w małym powiększeniu mikroskopu kontrastowo-fazowego (około 200 \times). Obserwacje własne

badawczych *in vitro* zdawało się, że efekt dawki komórek pobudzających czy dawki czynnika klonotwórczego najlepiej będzie badać w takich warunkach, w których do minimum wyeliminowano domieszkę endogenego źródła CSA. Źródłem takiej endogennej aktywności jest w hodowli klonalnej heterogenna populacja komórek stymulujących, najczęściej monocytów, obecnych wraz z komórkami CFC w warstwie wzrostu [19]. Jednak obecność tych komórek tylko do pewnego stopnia komplikuje sprawę i nawet w badaniach stopnia wrażliwości CFC na egzogeny CSF można je uwzględnić w obliczeniach [21]. Natomiast egzogeny, dawkowany przez eksperymentatora stymulator klonalnego wzrostu pochodzi z komórek umieszczanych w dodatkowej dolnej warstwie półpłynnego podłoża. Dolna warstwa odżywcza płytki Petriego ma wyższe stężenie agaru (0,5%), przez co umożliwiona jest dyfuzja CSF, uwalnianego głównie z monocytów krwi obwodowej do strefy wzrostu. Dyfundujący czynnik klonotwórczy CSF okazał się glikoproteidem [52, 62]. W doświadczeniach ilościowych, w których należy obliczyć efekt dawki CSF, używa się warstwy odżywczej od stałych dawców albo CSF wyizolowanego i oczyszczonego ze stałego źródła i — dzięki odpowiedniemu przechowywaniu — o stałej mocy.

Na podstawie obserwacji *in vitro* jak też na podstawie zwiększonej aktywności CSF w surowicy zwierząt i ludzi z neutropenią uważa się, że CSF mógłby reprezentować granulopoetynę, układowo-swoisty hormon ustroju [41, 55]. Przez analogię możemy wtedy nazywać erytropoetynę roboczo CSF-E lub E-CSA. W tabeli 1 zawarto ogólną charakterystykę CSF. Warto zaznaczyć, że od erytropoetyny, która też jest glikoproteidem, udało się oddzielić CSF-G dzięki zatrzymaniu tego ostatniego na agarozowej kolumnie z Concanawaliną A [36]. Prawdopodobnie przyczyniła się do tego większa dostępność reszt glukozylowych i mannozowych hipotetycznej granulopoetyny. Mikroheterogenność czynnika klonotwórczego jest przedmiotem odrębnych badań [6, 66].

Efekt *in vitro* mysiego CSF można zobojętnić surowicą skierowaną przeciwko niemu [59]. Podobne działanie wywierają przeciwciała anty-CSF w systemie komór dyfuzyjnych [60].

Źródłem CSF, najczęściej używanym do klonowania komórek granulopoetycznych, jest pożywka uwarunkowana (CM = conditioned medium), przygotowana z płynu pochodzącego z krwinek białych krwi obwodowej, pobudzonych przez PHA (fitohemaglutyninę) do transformacji blastycznej. Płyn 8-dniowej hodowli po odwirowaniu komórek pozabawia się na drodze dializy niskocząsteczkowego inhibitora i zagęszczony przechowuje się do 3 miesięcy w 0°C [35]. Innymi źródłami CSF po oczyszczeniu jest ludzki mocz, pożywka uwarunkowana hodowlą mysich komórek linii L, utkanie płucne, nerka embrionalna [19, 64]. Na mięsz

TABELA 1

Niektóre właściwości ludzkiego CSF zebrane wg Wu i wsp. [67]

| | | |
|----|----------------------------|---|
| 1 | chemicznie: | glikoproteid |
| 2 | c. cząst. | 160000-5000 |
| 3 | migracja w elektroforezie: | zasięg globuliny, za albuminą |
| 4 | dializa: | nie dializujący |
| 5 | temperatura inaktywacji: | stosunkowo ciepło-stały: 56°C — 30 min. 4°C — 4 mies. |
| 6 | inaktywacja: | trypsyna, α -chymotrypsyna, nadjodan |
| | częściowa inaktywacja: | pronaza |
| 7 | oporność: | wobec DNA-zy, RNA-zy i neuraminidazy |
| 8 | swoistość działania: | komórki szpiku Naczelnych |
| 9 | wrażliwość: | na wysokie stężenia soli (0,5 M NaCl), efekt odwracalny w wyniku intensywnej dializy, co sugeruje możliwość interakcji podjednostek |
| 10 | zależność: | wyduje się, że nie wymaga kofaktora |

nerki jako źródło CSF w życiu płodowym wskazują badania Szmitkowskiego i Prokopowicza [64]. Miejscem biosyntezy CSF w życiu pozapłodowym są prawdopodobnie komórki mononuklearne układu białokrwinkowego.

Czynniki regulacyjne granulopoezy, uzyskane w hodowli leukocytów, można podzielić na dwie kategorie w zależności od stosowanego systemu sprawdzania ich aktywności: na tzw. CF (colony factor) i tzw. GF (growth factor), określane też jako CSA i TIA (colony stimulating activity i thymidine incorporation activity) [39]. Pierwszą aktywność wykrywa się w półpłynnym żelu jako liczbę kolonii, drugą — w hodowli zawiesinowej z dodatkiem trytowanej tymidyny. Od strony analitycznej okazało się, że do pewnego punktu oczyszczania substancje o tych właściwościach uzyskiwane są łącznie, po czym rozchodzą się dając wyniki aktywności bądź TIA, bądź CSA [67].

Burgess i Metcalf [12] usiłowali wyjaśnić w hodowli mysich komórek szpiku, który z trzech procesów biosyntezy — DNA, RNA bądź białka — zostaje uruchomiony pod wpływem dodanego CSF z utkania płucnego. Wykazali oni, że w pierwszym rzędzie zwiększa się biosynteza RNA w mieloblastach, mielocytach i metamielocytach, a także nawet w granulocytach z jądrem podzielonym, podczas gdy w komórkach erytroidalnych oraz limfoidalnych nie odnotowano żadnych oznak wbudowywania znakowanego prekursora syntezy RNA. Ten fakt wskazywał dodatkowo na pewną rolę biosyntetyczną dojrzałych i zróżnicowanych nieodwracalnie komórek szeregu granulocytowego [12]. Ta obserwacja znajduje poparcie, a może nawet wyjaśnienie w spostrzeżeniach Górskiego [28], że w ludzkim układzie granulopoetycznym *in vitro* obecność granulocytów

była wręcz warunkiem wytwarzania CSF przez małe limfocyty T przy współdziałaniu monocytów.

INHIBITORY GRANULOPOEZY IN VITRO

Wkrótce po odkryciu CSA odkryto inhibitory odtwarzanego in vitro procesu granulopoezy. Inhibicyjny efekt granulocytów i makrofagów, uniemożliwiający powstawanie kolonii, ma miejsce najprawdopodobniej na szczeblu komórek dojrzewających, a nie proliferujących. Według Brucha i wsp. [11] efekt hamowania zależy w pierwszym rzędzie od bezwzględnej liczby żywych granulocytów w warstwie odżywczej. Próg hamowania został oceniony przez tych autorów na $2,5 \times 10^6$ granulocytów w 1 ml podłoża warstwy dolnej, czyli na płytkę Petriego o średnicy 3,5 cm, ponad którą w warstwie górnej znajduje się 2×10^5 komórek szpiku. Heit [30] wykazał inhibicję granulocytami przy jeszcze niższej ich liczbie, wynoszącej $0,6 \times 10^6$ w takiej samej płytce. Różnica tych ocen pochodzi prawdopodobnie stąd, że leukocyty dolnej warstwy, izolowane na roztworze fikolu, mogą być pobudzone metabolicznie przez ten wielocukier, co uaktywnia wytwarzanie produktów komórkowych. Tylko żywe granulocyty wywierają działanie hamujące wzrost klonalny. Unieczynnione mrożeniem lub martwe granulocyty, lub produkty ich rozpadu nie wykazują tego działania.

Dane te sugerują, że ciżba komórek w warstwie górnej, czyli wzrostu klonalnego, przyczyniająca się ewentualnie do niedostatku odżywienia, ma mniejsze znaczenie dla niepowodzenia hodowli niż obecność nadmiernej liczby granulocytów w ogóle [10]. Wobec tego powstało pytanie, czy rola granulocytów jest tu narządowo-swoista, innymi słowy, czy obserwuje się w układzie kolonii in vitro efekt chalonu granulocytowego według określenia Rytöma [57] oraz Paukovitsa [49]. Prawdopodobnie istnieją dwie substancje, jedna o typie chalonu i działająca na etapie proliferacji CFC, druga o typie czynnika regulacyjnego i hamująca dojrzewanie komórek różnicujących.

Substancje inhibitorowe, po oddzieleniu przez sączenie na żelu sephadex G-150, wykazały dwa pola aktywności, z których jedno okazało się lipoproteidem, a jego aktywność inhibicji skierowana wyłącznie na komórki ukierunkowane do granulopoezy. Za drugi zakres aktywności była odpowiedzialna substancja polipeptydowa [5]. W związku z tym chalon granulocytowy stał się drugim — obok CSF — „kandydatem” do regulacji granulopoezy przez mechanizm tzw. ujemnego sprzężenia zwrotnego [5].

MECHANIZMY REGULACJI

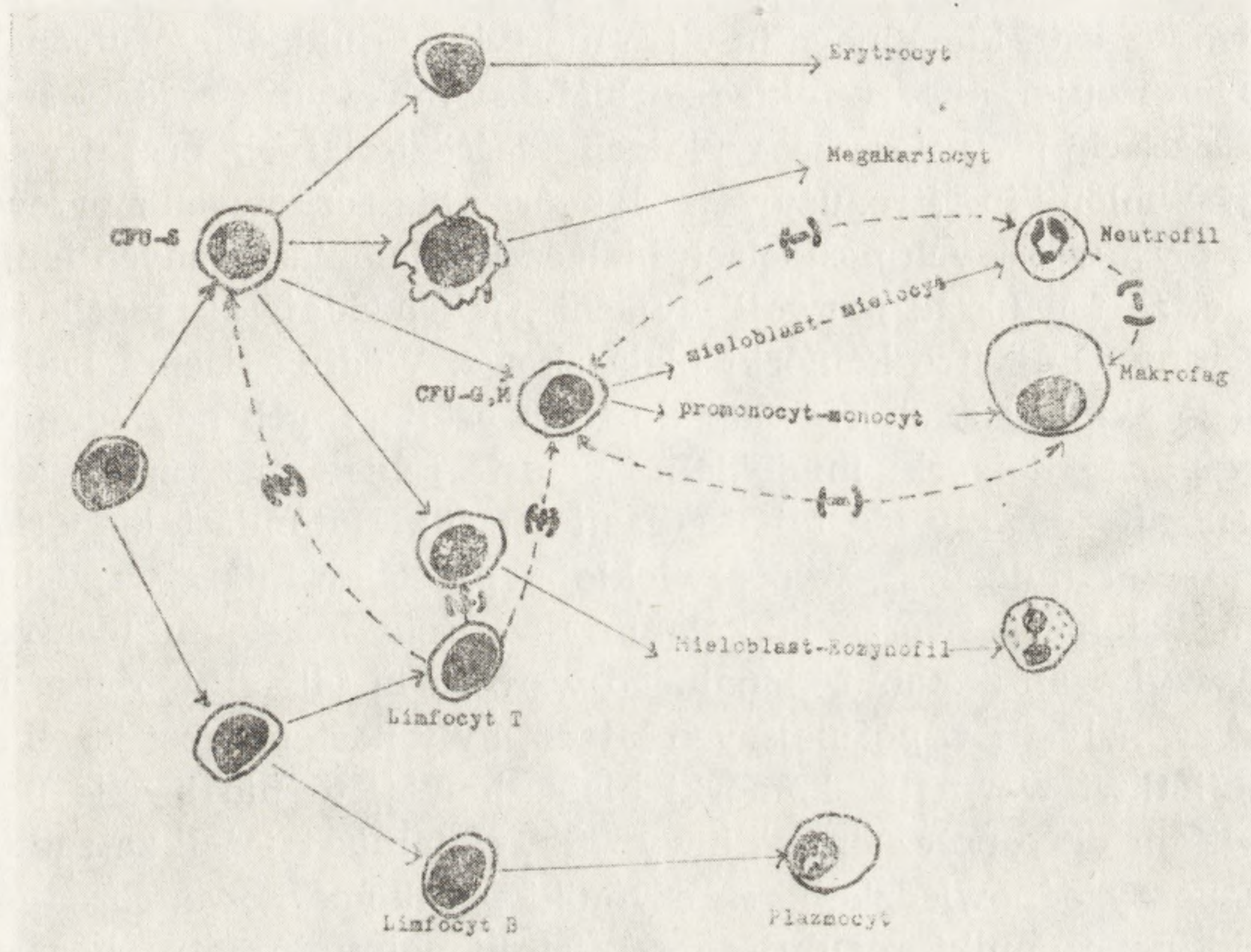
Czynnik klonotwórczy CSF należy umownie do grupy antychalonów (por. [63]), chociaż nie wszyscy autorzy są przekonani o istnieniu swoistego chalonu [31]. Ponadto Kurland i Moore [38] uważają, że np. produktem pośredniczącym między hamowaniem granulopoezy przez makrofagi a komórką docelową są prostaglandyny, frakcja E. Używając linii komórkowych ciągłych, m. in. wspomnianej już w tym artykule linii białaczkowej Lozzio K562, autorzy ci udowadniają, że w miarę zwiększania liczby makrofagów z wysięku otrzewnowego, dodanych do warstwy odżywczej hodowli, dochodziło do coraz intensywniejszego bloku w fazie G_1 cyklu życiowego tych komórek. Indometacyna, inhibitor syntezy prostaglandyn, znosiła efekt inhibicyjny makrofragów w stosunku do linii ciągłych o stałym tempie przyrostu. W związku z tym przypisano prostaglandynom regulację (hamowanie) hemopoezy zależnej i niezależnej od czynnika klonogenego CSF [38]. Sposób, w jaki miałyby się to hamowanie odbywać, dotyczy odpowiedzi komórki CFC na CSF. Mianowicie, w obecności prostaglandyn (PGE) komórka ukierunkowana na granulopoezę potrzebuje kilka razy większego stężenia CSF niż w środowisku bez PGE. Innymi słowy częsteczka prostaglandyn ma obniżać zdolność odpowiedzi CFC na CSF. Obecne zaś w mikrośrodowisku wzrostu klonalnego makrofagi miałyby wytwarzać zarówno CSF, jak i PGE [38].

Ta propozycja jeszcze nie rozwiązuje skomplikowanych mechanizmów granulopoezy. W interakcji międzykomórkowej mechanizmy granulopoezy posługują się prawdopodobnie białkami rozpoznawczymi [51, 53]. Ohno [47] zaproponował pierwszy rolę białek rozpoznawczych — mediatorów dla antygenów zgodności tkankowej.

Pewne fakty z dziedziny patologii wskazują na małe limfocyty grasiczopochodne jako na komórki o właściwościach regulacyjnych erytropoezy. Pierwszy przykład dotyczy wrodzonej niedokrwistości hipoplastycznej u dzieci (zespół Diamonda-Blackfana). Obecność autologicznych limfocytów chorych dzieci nie dopuszcza do utworzenia kolonii erytropoetycznych w odpowiedzi na erytropoetynę [32]. W drugim przykładzie, opisanym przez Jędrzejczaka i wsp. [37], a mianowicie genetycznie uwarunkowanej niedokrwistości makrocytowej myszy, u zwierząt o genotypie W/W^r dodanie tymocytów zdrowych myszy wznawia proliferację, różnicowanie i dojrzewanie szeregu erytrocytowego. Ostatnia jednostka chorobowa stanowi zwierzęcy model niedokrwistości hipoplastycznej ludzi.

Także eozynofilia, rozwijająca się *in vivo* w odpowiedzi na antygen pasożyta np. *Trichinella spiralis*, podlega regulacji przez limfocyty grasiczo-zależne [15]. Kolonie eozynofilowe są *in vitro* niezależne od kolonii

granulocytów obojętnochłonnych, a swoisty dla nich CFU-eos jest przedmiotem aktualnych badań biochemicznych.



Ryc. 4. Schemat kooperacji krwinek białych w procesie granulopoezy zaproponowany przez Cline i Golde [15]

Regulacja granulopoezy ma odbywać się przy udziale hormonu glikoproteidowego z aktywnością CSF, a wytwarzanego przez monocyty, makrofagi oraz limfocyty T, te ostatnie zwłaszcza po stymulacji antygenowej. CSF oddziałuje na proliferującą komórkę szeregu granulocytarnego (CFU - G,M), a nie na komórkę pnia (CFU - S). Komórka CFU - G,M uważana jest za prekursora linii granulocyta obojętnochłonnego i linii mononuklearnych fagocytów. Nowsze wyniki sugerują, że produkty dojrzałych granulocytów mogą wpływać zarówno na produkcję CSA, jak i na inhibicję wywieraną przez makrofagi na aktywność wzrostu klonalnego komórek CFU - G. Pobudzenie zaznaczone znakiem (+), hamowanie znakiem (-)

Aktywność limfocytów w procesie granulopoezy nie jest jeszcze dostatecznie poznana. Cline i Golde [15] wytyczyli kierunki wzajemnych powiązań między komórkami uwalniającymi czynniki o aktywności klonotwórczej, a komórkami zdolnymi do zapoczątkowania jednostki kolonijnej i jej klonalnego wzrostu. Z ryc. 4, wzorowanej na schemacie zaproponowanym przez tych autorów [15], wynika jasno, że badania granulopoezy *in vitro*, jeśli będą ograniczone tylko do komórek szeregu granulocytowego, nie będą mogły zadowalająco wyjaśnić w przyszłości interakcji molekularnych. Na podstawie wyników badań Górskiego [28] można dodać do tego schematu, że rola stymulująca małego limfocyta, wzmożona w okresie jego blastogenezy, znajduje się pod wpływem sterydów nadnerczowych.

BIAŁACZKI SZPIKOWE W PROCESACH GRANULOPOEZY IN VITRO

Zakłócenie współpracy międzykomórkowej może zaciążyć na nie-domodze wzrostu klonalnego in vitro nie tylko w układzie erytropoetycznym. Obserwuje się je w układzie białokrwinkowym przede wszystkim w białaczkach [67]. Jeszcze w latach sześćdziesiątych podjęto szeroko tematykę kolonii in vitro, używając komórek białaczkowych z przewlekłej szpikowicy i w ostrych postaciach białaczek mieloblastycznych [42]. Zda- wało się, że ten układ pozwoli wyjaśnić, jak poddają się mechanizmom regulacyjnym in vitro komórki białaczkowe. Według Sachsa [58] blasty linii białaczki mysiej dojrzewały do form ostatecznych po dodaniu CSF. Jednak młode komórki mieloidalne w ostrej białaczce szpikowej czło- wieka nie poddawały się tej regulacji [1, 46]. Natomiast komórki pre- kursorowe granulopoezy w przewlekłej szpikowicy miały względnie za- chowaną zdolność tworzenia kolonii. Nadejściu przełomu blastycznego towarzyszyło zaprzestanie klonalnego wzrostu in vitro. Założenia badań, jakie rozwinęły się w późniejszych latach, były następujące: jeżeli defekt regulacji tkwi wewnątrz komórki białaczkowej, to nie będzie podlegał naprawie in vitro przez prawidłowy CSF. Natomiast jeżeli za zaburzenie granulopoezy odpowiedzialne są czynniki pozakomórkowe, to odpowiedź komórki na czynniki regulujące wzrost klonalny in vitro będzie pra- widłowa. Należy zastrzec, że te założenia nie uwzględniają wszystkich możliwości ustroju, a mianowicie np. supresji komórek prawidłowych przez ewentualny inhibitor, wytwarzany przez komórki białaczkowe, a działający na poziomie produkcji CSF komórek prawidłowych. Poza tym jest też oczywiste, że układ granulopoetyczny w półpłynnej pe- żywce agarowej nie pozwoli rozwiązać tych pytań, które związane są z regulacją ruchu komórkowego przez barierę szpik—krew.

Przeprowadzone doświadczenia z komórkami prawidłowymi i białacz- kowymi zdają się potwierdzać proliferację autonomiczną, tzn. niezależną od CSF, w ostrej białaczce mieloblastycznej oraz w okresie przełomu blastycznego przewlekłej szpikowicy [45, 48]. Tabela 2 podsumowuje wy- niki naszej Pracowni z okresu 3-letniego. Nie odbiegają one od wyników przedstawionych przez innych autorów.

Wydaje się, że część niepowodzeń hodowli, jakie mieliśmy z pra- widłowym szpikiem pochodzącym z kości udowej, można odnieść do nar- kozy towarzyszącej operacji w osteotomii. Bardzo szeroka rozpiętość wy- ników uzyskanych w przewlekłej szpikowicy jest zależna od zmiennej liczby CFC we krwi obwodowej opływającej szpik. Prawidłowy wzrost klonalny, zachowany w tej jednostce chorobowej w fazie przewlekłej, był wielokrotnie sprawdzany obecnością w koloniach agarowych chromoso- mu Ph'. Odnotowywanie w żmudnych analizach cytogenetycznych kolonii

TABELA 2

Wydajność klonowania komórek prawidłowych i białaczkowych

| Materiał komórkowy | Liczba przypadków | Utworzonych kolonii na hodowanych 1×10^5 komórek | | Brak efektu klonowania | | Uwagi |
|---|-------------------|---|---------|------------------------|-----------|-------------------------------------|
| | | średnio | zakres | liczba przypadków | proporcja | |
| Szpik z mostka, bez zaburzeń proliferacji | 5 | 36,6 \pm 34,3 | 3,0-75 | 0 | 0/5 | nakłucia diagnostyczne |
| Szpik z kości udowej, bez zaburzeń proliferacji, j.w. | 17 | 35,6 \pm 36,6 | 2,5-120 | 4 | 1/4 | zabiegi chirurgii kostnej: nar-koza |
| Przewlekła białaczka szpikowa | 23 | 72,4 \pm 188 | 1,0-740 | 6 | 1/4 | krew obwodowa i szpik z mostka |
| Przewlekła białaczka szpikowa w przełomie blastycznym | 6 | 7,5 \pm 3,45 | 5,0-10 | 4 | 2/3 | krew obwodowa |
| Ostre białaczki mielo- i monomieloblastyczne | 11 | 6,6 \pm 8,02 | 1,0-18 | 7 | 2/3 | krew obwodowa i szpik z mostka |
| Razem | 62 | | | | | |

Wyniki porównawczych badań wykonanych w Samodzielnej Pracowni Genetyki Człowieka AM w Lublinie w latach 1977-1979.

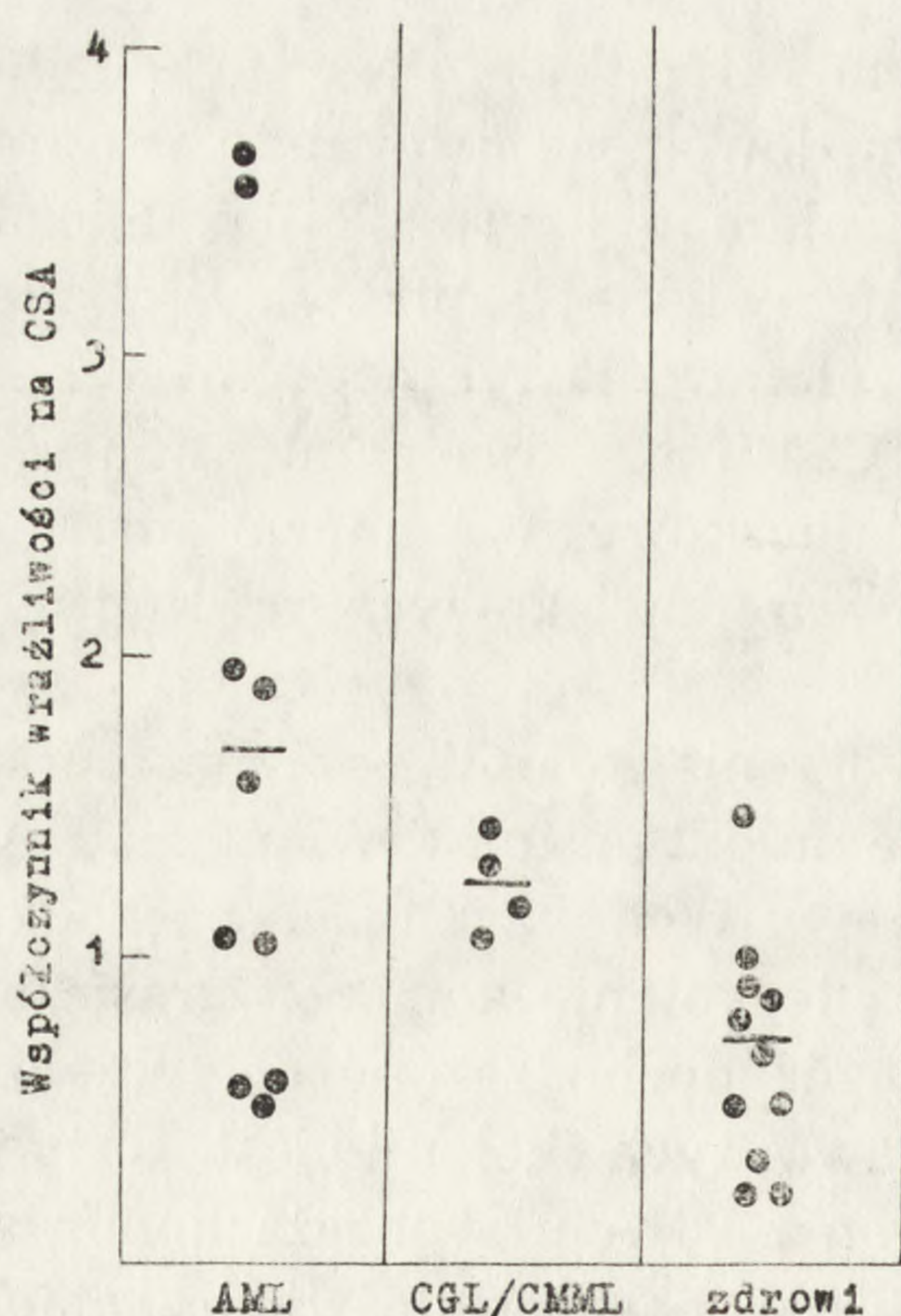
obecności komórek albo z tym markerem, albo bez niego posłużyło Chervenickowi i wsp. [14] za jeszcze jeden dowód, że osiągnięto istotny wzrost klonalny pojedynczych komórek. Goldman i wsp. [24] podnieśli możliwość defektu wytwarzania CSF w przewlekłej szpikowicy. Golde i wsp. [23] ograniczyli ten defekt do przełomu blastycznego. Jest bowiem możliwe, że komórka wytwarzająca CSF może ulec zaburzeniu nie tylko pod wpływem samego procesu białaczkowego komórki macierzystej, ale nawet pod wpływem czynników środowiskowych, do których można zaliczyć chemioterapię.

Ostatnio Dicke i wsp. [18] opisali tworzenie kolonii przez komórki z ostrej białaczki szpikowej, jeżeli były one przedtem inkubowane z PHA. Nie wiadomo, czy komórki tworzące kolonie w tych warunkach pochodzą z puli komórek patologicznych [67], czy są to kolonie komórek grasiczo-zależnych [27]. W naszych obserwacjach nie dochodzą one do szczybla komórek peroksydazo-pozytywnych. Sprawa tych kolonii jest o tyle intrygująca, że nie wiadomo czy to mitogen z PHA przeobraża komórkę białaczkową w komórkę reagującą na CSF. W naszych doświadczeniach

zdołaliśmy na razie przekonać się, że wydajność klonowania komórek z ostrej białaczki szpikowej po preinkubacji z PHA zależy od dawki CSF.

Wraz z różnymi schematami hipotetycznych mechanizmów defektu klonowania i jego wyrównania w białaczkach podjęto próby ustalenia progu wrażliwości komórki białaczkowej na fizjologiczny CSF. Wyniki opublikował niedawno Francis i wsp. [21]. Współczynnik wrażliwości komórek na CSF został obliczony podobnie, jak ustala się połowiczną dawkę efektywną leku. W dodatku, celem ujednoczenia wyników, autorzy przedstawili przekształconą odpowiedź komórek na wzrastającą dawkę egzogenego CSF w postaci $L_n(\text{odpowiedź: dawka})^{-1}$, jako funkcję dawki komórek warstwy odżywczej. Uwzględniono aktywność endogenego CSA i zrezygnowano z izolacji całkowicie czystej populacji CFC, ponieważ te manipulacje, zdaniem autorów, wnoszą niebezpieczeństwo uszkodzenia zdolności klonowania komórek. Po tych obliczeniach okazało się, że wrażliwość na CSA, wyrażona tworzeniem kolonii, jest prawidłowa w przewlekłej białaczce szpikowej i przewlekłej białaczce mielomonocytovej, natomiast zmniejszona jest w ostrej białaczce (ryc. 5). Na przedstawionej ryc. 5 (wg Francis i wsp.) widać, że współczynnik wrażliwości komórek z ostrej białaczki mieloblastycznej jest mniejszy od 1, co oznacza, że komórki te reagują dopiero przy większej jego dawce.

Obecnie prowadzone badania zajmują się względną niedomogą CSA u chorych na białaczkę. Chodzi o uchwycenie zaburzeń ilościowych biosyntezy lub o uchwycenie niedoczynności cząsteczki białka. Z drugiej



Ryc. 5. Współczynnik wrażliwości na CSF wyrażający względną wydajność klonowania komórek prawidłowych i białaczkowych szpiku (wg Francis i wsp. [21])

Tzw. współczynnik wrażliwości na CSF został obliczony jako stosunek liczby komórek w warstwie odżywczej potrzebnej do stymulacji połowy populacji testowej (np. danego przypadku białaczki) do liczby komórek potrzebnej do stymulacji połowy populacji kontrolnej (zdrowego szpiku)

CGL — białaczka szpikowa przewlekła, CMML — białaczka mielomonocytovej przewlekła, AML — białaczka szpikowa ostra, CSA — aktywność pobudzania wzrostu klonalnego

strony, trwają badania interakcji komórkowej zwłaszcza w nawiązaniu do znanej od dawna obserwacji Dextera i Lajthy [17], że w hodowlach szpiku, do których dodano komórek grasiczych, następuje wytwarzanie znacznych ilości CSA. Od przyszłych badań należy oczekiwać rozwiązania, jak komórki grasicze i grasiczo-zależne zabezpieczają odpowiednie mikrośrodowisko rozwoju szeregu granulocytowego.

Dziękujemy za współpracę Kolegom z Kliniki Hematologicznej i Kliniki Ortopedycznej PSK-4 AM w Lublinie.

LITERATURA

- [1] AYE M. T., TIHO Y., TILL J. E., McCULLOCH E. A., Studies of leukemic cell populations in culture, *Blood*, **44**: 205–219, 1974.
- [2] BAKER L. F., GALBRAITH P. R., Nutritional and regulatory roles of human serum in cultures of human granulopoietic cells, *Blood*, **52**: 241–248, 1978.
- [3] BARR R. D., WHANG-PENG J., PERRY S., Hemopoietic stem cells in human peripheral blood, *Science*, **190**: 284–285, 1975.
- [4] BARRETT A. J., FAILLE A., KETELS F., Variations in granulocyte colony forming cell numbers in adult blood, *Brit. J. Haematol.*, **42**: 337–344, 1979.
- [5] BAUM S. J., Negative and positive feedback control of the committed granulocytic stem cell compartment, [w] *Experimental Hematology Today*, red. S. J. Baum i G. D. Ledney, Springer, 1977, str. 127–134.
- [6] BENESZ M., Badania substancji stymulujących wzrost klonalny komórek granulopoetycznych in vitro. I. Charakterystyka czynnika wzrostu (TIA) (przygotowane do druku).
- [7] BÖYUM A., BOECKER Z., CARSTEN A. L., CRONKITE E. P., Proliferation of human bone marrow cells in diffusion chambers implanted into normal or irradiated mice, *Blood*, **40**: 163–173, 1972.
- [8] BRADLEY T. R., METCALF D., The growth of mouse bone marrow cells in vitro, *Aust. J. Exp. Med. Sci.*, **44**: 287–300, 1966.
- [9] BRADLEY T. R., FRY P., SUMNER M. A., McIVERNEY E., Factors determining colony forming efficiency in agar suspension cultures, *Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci.*, **50**: 813–818, 1972.
- [10] BRUCH C., KOVACS P., RÜBER E., The role of phagocytic cells in human blood leukocyte suspensions for in vitro colony forming cells, *Exp. Hemat.*, **6**: 346–354, 1978.
- [11] BRUCH C., KOVACS P., RÜBER S., FLIEDNER T., Studies on the inhibitory effect of granulocytes on human granulocytopoiesis in agar cultures, *Exp. Hemat.*, **6**: 337–345, 1978.
- [12] BURGESS A. W., METCALF D., Colony stimulating factor and the differentiation of granulocytes and macrophages, [w] *Experimental Hematology Today*, red. S. J. Baum, G. D. Ledney, Springer, New York 1977, str. 135–146.
- [13] CHERVENICK P. A., BOGGS D. R., In vitro growth of granulocytic and mononuclear colonies from blood of normal individuals, *Blood*, **37**: 131–136, 1971.
- [14] CHERVENICK P. A., ELLIS L. D., PAN S. F., LAWSON A. L., Human leukemic

- cells. In vitro growth of colonies containing the Philadelphia chromosome, *Science*, **174**: 1134-1135, 1971.
- [15] CLINE M. J., GOLDE D. W., Cellular interactions in haematopoiesis, *Nature*, **277**: 177-181, 1979.
- [16] DAO C., METCALF D., ZITTOUN R., BILSKI-PASQUIER G., Normal human bone marrow cultures in vitro: cellular composition and maturation of the granulocytic colonies, *Brit. J. Haematol.*, **37**: 127-132, 1977.
- [17] DEXTER T. M., LAJTHA L. G., Proliferation of haemopoietic stem cells in vitro, *Brit. J. Haematol.*, **28**: 525-530, 1974.
- [18] DICKE K. A., SPOTZER G., AHEARN M. J., Colony formation in vitro by leukaemic cells in acute myelogenous leukaemia with phytohaemagglutynin as stimulating factor, *Nature*, **259**: 129-131, 1976.
- [19] DOUGLAS D. C., PICKERING B. M. J., The effect of various sources of colony stimulating activity on normal human marrow in agar culture, *Expl. Cell Res.*, **104**: 95-99, 1977.
- [20] FIRKET H., A very simple trick to produce controlled CO₂ concentration in the gas phase overlying cell cultures, *Experientia*, **6**: 671-672, 1969.
- [21] FRANCIS G. E., BERNEY J. J., CHIPPING P. M., HOFFBRAND A. V., Stimulation of human haemopoietic cells by colony stimulating factors: Sensitivity of leukaemic cells, *Brit. J. Haematol.*, **41**: 545-562, 1979.
- [22] GOLDE D. W., CLINE M. J., Growth of human bone marrow in liquid culture, *Blood*, **51**: 45-58, 1973.
- [23] GOLDE D. W., ROTHMAN B., CLINE M. J., Production of colony stimulating factors by malignant leukocytes, *Blood*, **43**: 749-756, 1974.
- [24] GOLDMAN J. M., TH'NG K. H., LOWENTHAL R. M., In vitro colony forming cells and colony stimulating factors in chronic granulocytic leukemia, *Brit. J. Cancer*, **30**: 1-12, 1974.
- [25] GORDON M. J., BLACKETT M. N., DOUGLAS J. D. C., Colony formation by human haemopoietic precursor cells cultured in semi solid agar in diffusion chambers, *Brit. J. Haematol.*, **31**: 103-113, 1975.
- [26] GORDON M. Y., DOUGLAS I. D. C., CLINK H. M., PICKERING B. M. J., Distribution of granulopoietic activity in the human skeleton studied by colony growth in agar diffusion chambers, *Brit. J. Haematol.*, **32**: 537-542, 1976.
- [27] GOUBE de LAFOREST P., LASMAYOUS RIOU N., ALCALAY D., TANZER J., Growth characteristics of PHA-induced colonies in primary and secondary agar culture, *Immunol.*, **35**: 917-922, 1979.
- [28] GÓRSKI A., Mechanizmy regulacyjne mielopoezy, *Pol. Arch. Med. Wewn.*, **61**: 415-418, 1979.
- [29] HASKILL J. S., McKNITH R. D., GALBRAITH D. R., Cell-cell interaction in vitro studied by density separation of colony forming, stimulating and inhibiting cells from human bone marrow, *Blood*, **40**: 393-404, 1972.
- [30] HEIT W., KERN P., KUBANEK B., HEIMPEL H., Some factors influencing granulocytic colony formation in vitro by human white blood cells, *Blood*, **44**: 511-515, 1974.
- [31] HERMAN S. P., GOLDE D. W., CLINE M. J., Neutrophil product that inhibit cell proliferation: relation to granulocytic „chalone”, *Blood*, **51**: 207-219, 1978.
- [32] HOFFMAN R., ZANJANI E. D., VILA J., ZALUSKY R., LUTTON J. D., WASSERMAN L. R., Diamond-Blackfan Syndrome: Lymphocyte mediated supression of erythropoiesis, *Science*, **193**: 899-900, 1976.
- [33] IMAMURA T., MOORE G. E., Ability of human haemopoietic cell lines to form colonies in soft agar, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **128**: 1179-1181, 1968.

- [34] INOUE S., OTTENBREIT M. J., Heterogeneity of human colony-forming cells, *Blood*, 51: 195-206, 1978.
- [35] ISCOVE N. N., SENN J. S., TILL J. E., McCULLOCH E. A., Colony formation by normal and leukemic human marrow cells in culture; effect of conditioned medium from human leukocytes, *Blood*, 37: 1-5, 1971.
- [36] ISCOVE N. N., SIEBER F., WINTERHALTER K. H., Erythroid colony formation in cultures of mouse and human bone marrow: analysis of the requirement for erythropoietin by gel filtration and affinity chromatography on agarose-concanavalin A, *J. Cell Physiol.*, 83: 309-320, 1974.
- [37] JĘDRZEJCZAK W. W., SHARKIS S., AHMED A., SELL K. W., Theta-sensitive cell and erythropoietin: Identification of a defect in W/W^r anaemic mice, *Science*, 196: 313-315, 1977.
- [38] KURLAND J., MOORE M. A. S., The regulatory role of the macrophage in normal and neoplastic hemopoiesis, [w] *Experimental Hematology Today*, red. S. J. Baum, G. D. Ledney, Springer, New York 1977, str. 51-62.
- [39] LAU L., McCULLOCH E. A., TILL J. E., PRICE G. B., The production of hemopoietic growth factors by PHA-stimulated leukocytes, *Exp. Hemat.*, 6: 114-121, 1978.
- [40] LOZZIO B. B., LOZZIO P. B., WUST C. J., KIM J., Correlation of leukaemia associated antigens and Ph¹ chromosome in fibroblast like cells derived from bone marrow, *Blood*, 52: 673-680, 1978.
- [41] MANGALIK A., ROBINSON W. A., Cyclic neutropenia: the relationship between urine granulocyte colony stimulating activity and neutrophil count, *Blood*, 41: 79-84, 1973.
- [42] MESSNER H. A., TILL J. E., McCULLOCH E. A., Interacting cell populations affecting granulopoietic colony-formation by normal and leukemic human marrow cells, *Blood*, 42: 701-710, 1973.
- [43] METCALF D., The colony stimulating factor (CSF), *Austr. J. Exp. Biol. Med. Sci.*, 50: 547-557, 1972.
- [44] MINGUELL J. J., BOLTON L., HELMER R. E. III, GARDNER F. H., Preparative separation of nucleated cells from human bone marrow, *Experientia*, 35: 548-549, 1979.
- [45] MOORE M. A. S., METCALF D., Cytogenetic analysis of human acute and chronic myeloid leukaemic cells cloned in agar culture, *Int. J. Canc.*, 11: 143-152, 1973.
- [46] MORLEY A., HIGGS D., Lack of increased differentiation of leukaemic cells in response to colony stimulating factor, *Cancer Res.*, 34: 2307-2310, 1974.
- [47] OHNO S., The original function of MHC antigens as the general plasma membrane anchorage site of organogenesis-directing proteins, *Immunol. Rev.*, 33: 59-69, 1977.
- [48] OLAFSSON T., OLSSON I., Granulopoiesis in chronic myeloid leukaemia. II. Serial cloning of blood and bone marrow in agar culture, *Blood*, 48: 351-360, 1976.
- [49] PAUKOVITS W. R., Granulopoiesis inhibiting factor (GIF). Demonstration and preliminary chemical and biological characterization of a specific polypeptide (chalone), [w] *Proceedings of the First International Chalone Conference*, red. B. K. Firscher, J. C. Houck, Nat. Canc. Inst. Monograph., 38: 147-155.
- [50] PIKE B. L., ROBINSON W. A., Human bone marrow colony growth in agar gel, *J. Cell Physiol.*, 76: 77-84, 1970.

- [51] PRICE G. B., McCULLOCH E. A., Cell surfaces and the regulation of haemopoiesis, *Seminars in Hematology*, 15: 283-300, 1978.
- [52] PRICE G. B., SENN J. S., McCULLOCH E. A., TILL J. E., The isolation and properties of granulocytic colony stimulating activities from human peripheral leukocyte conditioned medium, *Biochem. J.*, 148: 209-217, 1975.
- [53] PRICE G. B., McCULLOCH E. A., TILL J. E., Cell membranes as sources of granulocyte colony stimulating activities, *Exp. Hematol.*, 3: 227-233, 1975.
- [54] RICHMAN C. M., CHESS L., YANKEE R. A., Purification and characterization of granulocytic progenitor cells (CFU-C) from human peripheral blood using immunologic surface markers, *Blood*, 51: 1-8, 1978.
- [55] RICKARD K. A., MORLEY A., HOWARD D., STOHLMAN F. Jr., The in vitro colony forming cell and the response to neutropenia, *Blood*, 37: 6-13, 1971.
- [56] ROTHMANN J., AERTAGS C. F., PLUZNICK D. H., Replacement of serum by hemolysate as growth promoter for murine leukaemic and normal haemopoietic progenitor cells in culture, *Exp. Hematol.*, 5: 117-124, 1977.
- [57] RYTÖMAA T., Role of chalone in granulopoiesis, *Brit. J. Haematol.*, 24: 141-146, 1974.
- [58] SACHS L., Control of normal cell differentiation and the phenotype reversion of malignancy in myeloid leukaemia, *Nature*, 274: 535-539, 1978.
- [59] SHADDUCK R. K., METCALF D. J., Preparation and neutralization characteristics of an anti-CSF antibody, *Cell Physiol.*, 86: 247-252, 1975.
- [60] SHADDUCK R. K., CARSTEN A. L., CHIKAPPA G., CRONKITE E. P., GERARD E., Inhibition of diffusion chamber (DC) granulopoiesis by anti-CSF serum, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 158: 542-549, 1978.
- [61] STANDEN G., PHILIP M. A., FLETCHER J., Reduced number of peripheral blood granulocytic progenitor cells in patients with Down syndrome, *Brit. J. Haematol.*, 42: 417-423, 1979.
- [62] STANLEY E. R., METCALF D., Partial purification and some properties of the factor in normal and leukemic human urine stimulating mouse bone marrow colony growth in vitro *Austr. J. Exp. Med. Sci.*, 47: 467-483, 1969.
- [63] SUDÓŁ M., Peptydy jako regulatory komórkowego wzrostu, *Post. Biol. Kom.*, 5: 325-340, 1978.
- [64] SZMITKOWSKI M., PROKOPOWICZ J., Distribution of CSF (colony stimulating factor) in kidney of the mouse, *Experientia*, 34: 1365, 1978.
- [65] TSUNEOKA K., TAKAGI Y., HIRASHIMA K., SHIKITTA M., Enhancement of the action of colony stimulating factor (CSF) by soluble components of erythrocytes in mouse bone marrow cell cultures, *Exp. Hematol.*, 6: 445-450, 1978.
- [66] WU A. M., PRIVAL J. T., PARAN M., GALLO R. C., On the heterogeneity of colony stimulating factors prepared from human peripheral blood in culture in the presence of mitogen, *Blood*, 44: 938-948, 1974.
- [67] WU A. M., RUSCETTI F. W., GALLO R. C., Cell-factor interaction in populations of normal and leukemic blood cells, [w] *Experimental Hematology Today*, red. S. J. Baum, G. D. Ledney, Springer, New York 1977, str. 165-176.

Otrzymano: 18 stycznia 1980.

Przyjęto: 16 kwietnia 1980.

Adres autora: Dr Jaczewskiego 8, 20-610 Lublin

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 ze 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

| | |
|---|-----|
| H. HÜBNER i Z. POJDA, Wymiany siostrzanych chromatyd — mechanizmy i zastosowanie | 149 |
| J. TERLECKI, Możliwości zastosowań spektroskopii dielektrycznej w badaniach biologicznych | 177 |
| A. JASIŃSKI, Neurosekret i neurohormony | 193 |
| D. ROŻYŃKOWA, Mikrośrodowisko granulopoezy in vitro | 217 |