

PL ISSN 0324-833X

**POLSKIE
TOWARZYSTWO
ANATOMICZNE**

TOM 11 - NR 1
1984 (1-136)

Postępy Biologii Komórki

PWN - WARSZAWA

<http://rcin.org.pl>

Kwartalnik

Polskiego Towarzystwa Anatomicznego
wydawany z pomocą finansową
Polskiej Akademii Nauk

Redaguje Kolegium:

Jerzy KAWIAK, Wincenty KILARSKI, Jan MICHEJDA, Maria OLSZEWSKA

Komitet Redakcyjny

Jadwiga ACKERMAN, Leszek CIECIURA, Antoni HORST, Jerzy KAWIAK,
Wincenty KILARSKI, Jan MICHEJDA, Maria OLSZEWSKA,
Stanisław ZAWISTOWSKI

Adres Redakcji

Centrum Medyczne Kształcenia Podyplomowego,
ul. Marymoncka 99, 01-813 Warszawa

Państwowe Wydawnictwo Naukowe — Oddział we Wrocławiu

Nakład 563 + 97 egz. Ark. wyd. 12,75. Ark. druk. 0,5 + 3/8 wkl. Papier druk. sat. kl. III, 80 g,
70 × 100 cm. Oddano do składania 15 XII 1983 r. Podpisano do druku w kwietniu 1984. Druk
ukończono w kwietniu 1984 r. Zam. 2492/83. Cena zł 80,—

Wrocławska Drukarnia Naukowa, Wrocław, ul. Lelewela 4

REGULACJA METABOLIZMU WĘGLOWODANOWEGO
W HEPATOCYTACH PRZY UDZIALE
FRUKTOZO-2,6-BISFOSFORANU, NOWO ODKRYTEGO
METABOLITU

THE ROLE OF FRUCTOSE-2,6-BISPHOSPHATE, A NEWLY DISCOVERED
METABOLITE, IN THE REGULATION OF CARBOHYDRATE METABOLISM
IN HEPATOCYTES

Andrzej LESICKI, Anna KASPRZYK

Zakład Fizjologii Zwierząt, Instytut Biologii, Uniwersytet im. A. Mickiewicza,
Poznań

Streszczenie. W artykule przedyskutowano udział fruktozo-2,6-bisfosforanu w synchronicznej aktywacji glukoneogenezy i inhibicji glikolizy w wyniku działania glukagonu i adrenaliny na hepatocyty. Opisano mechanizm regulacji syntezy i degradacji tego nowo odkrytego metabolitu w wątrobie. Zasygnalizowano potencjalną rolę fruktozo-2,6-bisfosforanu w regulacji metabolizmu węglowodanowego w innych tkankach zwierzęcych i roślinnych.

Summary. The role of fructose-2,6-bisphosphate in synchronic activation of gluconeogenesis and inhibition of glycolysis, as the effect of glucagon and epinephrine action on hepatocytes is discussed. The mechanism of the regulation of its synthesis and degradation in the liver is described. The possible role of fructose-2,6-bisphosphate in the regulation of carbohydrate metabolism in different animal and plant tissues is also signallized.

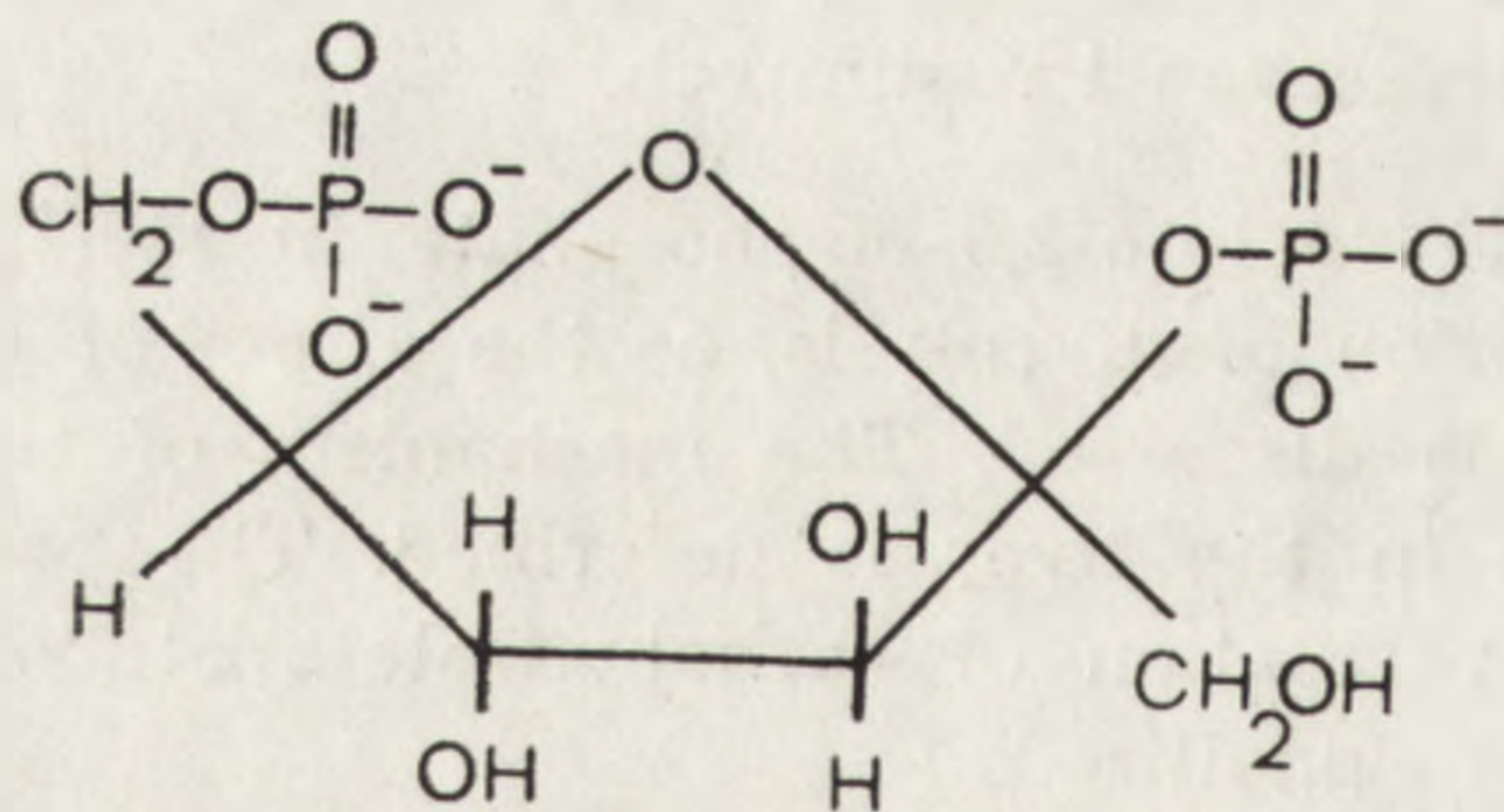
WSTĘP

Wątroba jest tkanką zawierającą enzymy katalizujące przeciwstawne szlaki przemian węglowodanów w zależności od stanu metabolicznego organizmu. W warunkach obfitej podaży glukozy we krwi, w okresie trawienia pokarmu hepatocyty magazynują ten monocukier w postaci gli-

kogenu lub katabolizują drogą glikolityczną. Natomiast pojawiające się w okresie potrawiennym niedobory glukozy we krwi wątroba uzupełnia uruchamiając glikogenowe zapasy w procesie glikogenolizy lub syntetyzując jej nowe cząsteczki z niecukrowych prekursorów w procesie glukoneogenezy. Zmiany metabolizmu glukozy są kontrolowane hormonalnie, a realizowane są przez zmianę aktywności odpowiednich enzymów kluczowych [5]. Gdy np. w hepatocytach zachodzi glukoneogeneza, aktywne powinny być karboksylazy pirogronianowa (EC. 6.4.1.1) i fosfoenolpirogronianowa (EC. 4.1.1.32) oraz fruktozo-1,6-bisfosfataza (EC. 3.1.3.11), natomiast nieaktywne kluczowe enzymy glikolityczne (fosfofruktokinaza, EC. 2.7.1.11 i kinaza pirogronianowa, EC. 2.7.1.40); i na odwrót. Wyjaśnienie mechanizmu tej synchronicznej zmiany aktywności enzymów metabolizmu węglowodanowego w wątrobie w odpowiedzi na sygnały hormonalne stało się istotnym problemem rozwiązywanym w ostatnich latach.

1. FRUKTOZO-2,6-BISFOSFORAN, NOWO ODKRYTY MODULATOR AKTYWNOŚCI FOSFOFRUKTOKINAZY I FRUKTO-1,6-BISFOSFATAZY

Efektom działania glukagonu na komórki wątrobowe jest m. in. modyfikacja właściwości kinetycznych fosfofruktokinazy, prowadząca do zahamowania aktywności enzymu [7, 38, 49, 57, 74]. Próby wyjaśnienia mechanizmu tych zmian doprowadziły trzy niezależne zespoły [31, 32, 55, 69] do odkrycia fruktozo-2,6-bisfosforanu (ryc. 1), silnego aktywatora badanego enzymu. Historię odkrycia i identyfikacji tego nieznanego dotąd metabolitu, a także pierwsze doniesienia o jego roli w metabolizmie glukozy opisano już w polskim piśmiennictwie [41].



Ryc. 1. Wzór fruktozo-2,6-bisfosforanu

Aktywujące działanie fruktozo-2,6-bisfosforanu na fosfofruktokinazę wątroby przejawia się w allosterycznym zwiększeniu powinowactwa enzymu do substratu, fruktozo-6-fosforanu, przy jednoczesnym obniżeniu jego wrażliwości na hamujące oddziaływania ATP i cytrynianu [32, 68, 69, 75]. Odkrycie, że fruktozo-2,6-bisfosforan aktywuje fosfo-

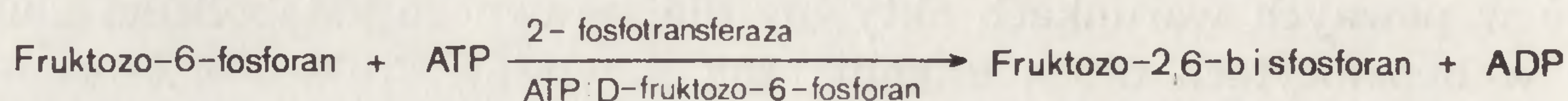
fruktokinazę w warunkach fizjologicznych stanowi istotny krok w wyjaśnianiu mechanizmu regulacji aktywności fosfofruktokinazy wątrobowej. Badania nad aktywnością tego enzymu, w których *in vitro* dobierano stężenia substratów, pozytywnych i negatywnych efektorów, a także kationów i jonów wodorowych (pH) tak, by odzwierciedlały warunki fizjologiczne, doprowadziły do stwierdzenia, że fosfofruktokinaza jest prawie całkowicie nieaktywna w wątrobie [59]. Co więcej, w warunkach *in vivo* nie stwierdzono po podaniu glukagonu takich zmian stężeń substratów i dotąd znanych modulatorów, które pozwoliłyby na aktywację fosfofruktokinazy (cyt. według [54, 69]). A przecież enzym ten musi być w pewnych warunkach aktywny dla sprawnego katabolizmu glukozy w hepatocytach drogą glikolityczną. I właśnie fruktozo-2,6-bisfosforan jest sygnałem uruchamiającym fosfofruktokinazę, gdyż — po pierwsze — jego fizjologiczne (mikromolarne) stężenia aktywują zahamowaną fosfofruktokinazę i — po drugie — jego poziom w hepatocytach ulega znacznym wahaniom w różnych stanach metabolicznych organu [32, 55, 69]. Należy zaznaczyć, że fruktozo-2,6-bisfosforan działa w sposób wysoce synergistyczny z AMP [68, 75], znanym aktywatorem fosfofruktokinazy.

Obok stymulującego fosfofruktokinazę działania fruktozo-2,6-bisfosforanu, wykazano, że metabolit ten hamuje aktywność fruktozo-1,6-bisfosfatazy [29, 30, 53, 73]. I w tym przypadku fruktozo-2,6-bisfosforan współdziała z AMP [53, 73]. Mechanizm inhibicji fruktozo-1,6-bisfosfatazy przez nowo odkryty ester nie jest w pełni wyjaśniony. Wbrew pierwszym doniesieniom, sugerującym jej allosteryczny charakter [53, 73], wydaje się, iż fruktozo-2,6-bisfosforan współzawodniczy z substratem, fruktozo-1,6-bisfosforanem, o centrum aktywne enzymu [29, 30]. Nie jest też wykluczone, iż mają miejsce oba mechanizmy interakcji fruktozo-2,6-bisfosforanu i fruktozo-1,6-bisfosfatazy [29]. Jednak, niezależnie od ostatecznego rozstrzygnięcia tej kontrowersji, istotne wydaje się to, że aktywujący fosfofruktokinazę wpływ fruktozo-2,6-bisfosforanu zostaje wzmocniony przez jego jednoczesne hamujące działanie na fruktozo-1,6-bisfosfatazę, enzym prowadzący reakcję odwrotną do katalizowanej przez fosfofruktokinazę.

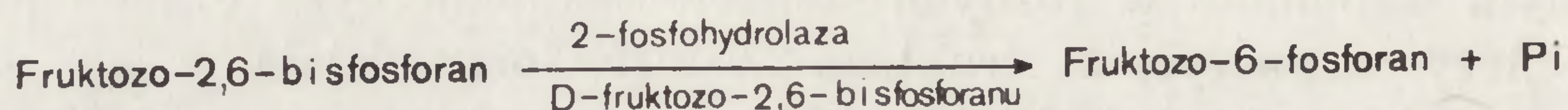
Ponieważ fruktozo-2,6-bisfosforan reguluje aktywność dwóch kluczowych enzymów metabolizmu glukozy, sprawdzano czy i inne enzymy nie są podatne na działanie tego czynnika. Jak dotąd nie znaleziono takiego enzymu. Wykluczono bezpośredni udział fruktozo-2,6-bisfosforanu w regulacji fosforylasy glikogenowej, fosfatazy fosforylasy, fosfatazy syntetazy glikogenowej, glukokinazy, glukozo-6-fosfatazy, karboksylazy fosfoenolopirogronianowej, karboksylazy acetylo-CoA [32] oraz kinazy pirogronianowej [32, 66].

2. REGULACJA SYNTEZY I DEGRADACJI FRUKTOZO-2,6-BISFOSFORANU

Logiczną konsekwencją odkrycia fruktozo-2,6-bisfosforanu było poszukiwanie enzymów metabolizujących ten ester. Szybko wykryto specyficzną kinazę, nazwaną potocznie 6-fosfofrukto-2-kinazą, przenoszącą resztę fosforanową z ATP na anomeryczny atom węgla (C-2) fruktozo-6-fosforanu (ryc. 2) [18, 26, 72]. Nieco później stwierdzono w wątrobie obecność enzymu hydrolizującego fruktozo-2,6-bisfosforan (ryc. 3) i nazwano go potocznie fruktozo-2,6-bisfosfatazą [17, 27, 71].



Ryc. 2. Reakcja syntezy fruktozo-2,6-bisfosforanu, katalizowana przez 6-fosfofrukto-2-kinazę



Ryc. 3. Reakcja hydrolizy fruktozo-2,6-bisfosforanu, katalizowana przez fruktozo-2,6-bisfosfatazę

W trakcie oczyszczania tych enzymów okazało się, że obie aktywności — kinazy i fosfatazy — oczyszczane są wspólnie [17, 20, 70, 71]. Stosując elektroforezę dyskową, wykazano jednorodność oczyszczonego preparatu białkowego [17, 20]. Pozwoliło to wysunąć przypuszczenie [17, 20, 71], zgodnie z którym fruktozo-2,6-bisfosforan jest syntetyzowany oraz hydrolizowany przez dwufunkcyjny enzym 6-fosfofrukto-2-kinazę/fruktozo-2,6-bisfosfatazę. Względna masa cząsteczkowa enzymu wynosi około 90–100 tys. [17, 20, 28]. Zbudowany jest z dwóch podjednostek [19, 28], prawdopodobnie identycznych, gdyż tylko jedno pasmo białkowe uzyskuje się w wyniku elektroforezy dyskowej w obecności siarczanu dodecyłu [17, 20]. Względna masa cząsteczkowa podjednostki wynosi 49–50 tys. [18, 20], a punkt izoelektryczny przypada w pH 6,6 [20]. Określono również skład aminokwasowy oczyszczonego enzymu [20].

Katalityczna podjednostka kinazy białkowej zależnej od cyklicznego AMP (cAMP) katalizuje fosforylację 6-fosfofrukto-2-kinazy/fruktozo-2,6-bisfosfatazy [17, 20]. Fosforylacji ulega jedna z 73 reszt serynowych w każdej z podjednostek, toteż dwa mole fosforanu przypadają na mol dimeru [20]. Szybkość fosforylacji hamuje obecność wyższych stężeń fruktozo-2,6-bisfosforanu [20]. Sugerowano, że 6-fosfofrukto-2-kinaza jest również fosforylowana przez kinazę fosforylasy w obecności jonów Ca^{2+} i kalmoduliny [28, 69], choć ostatnio zakwestionowano tę możliwość [58].

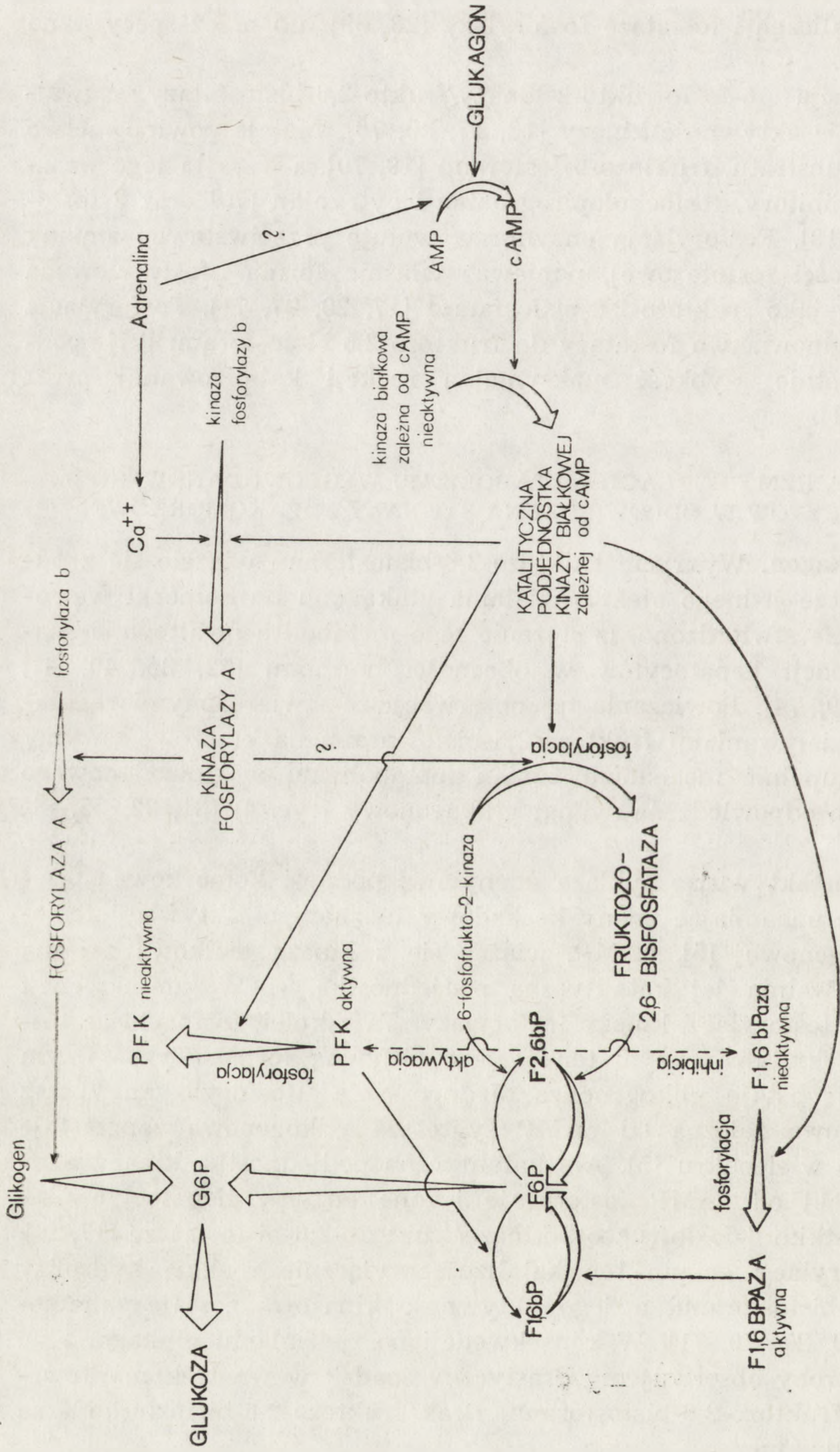
Ufosforylowana forma 6-fosfofrukto-2-kinazy jest defosforylowana przez fosfatazę alkaliczną i fosfatazę fosforylasy [28, 69] lub przez specyficzną fosfatazę [58].

Fosforylacja 6-fosfofrukto-2-kinazy/frukto-2,6-bisfosfatazy gwałtownie hamuje aktywność kinazy [13, 17, 20, 70]. Maleje powinowactwo enzymu do substratu, fruktozo-6-fosforanu [19, 70], a wzrasta jego wrażliwość na inhibitory, fosfoenolopirogronian i cytrynian [70] oraz 3-fosfoglicerynian [13]. Fosforylacja enzymu wywołuje przeciwstawne zmiany jego aktywności fosfotazowej, ponieważ właśnie forma ufosforylowana jest aktywna jako fruktozo-2,6-bisfosfataza [17, 20, 27, 71]. Fosforylacja zwiększa powinowactwo fosfatazy do fruktozo-2,6-bisfosforanu [27] i podnosi kilkakrotnie szybkość maksymalną reakcji katalizowanej przez enzym [17, 71].

3. MECHANIZM REGULACJI METABOLIZMU WĘGLOWODANOWEGO HEPATOCYTÓW W ODPOWIEDZI NA SYGNAŁY POZAKOMÓRKOWE

3.1. Glukagon. Wykrycie fruktozo-2,6-bisfosforanu wiązało się z odkryciem jeszcze jednego efektu działania glukagonu na komórki wątroby. Mianowicie stwierdzono, iż stężenie tego metabolitu gwałtownie spada po inkubacji hepatocytów w obecności hormonu [32, 35, 40, 41, 55, 61, 63, 69, 74]. Powiązanie tej obserwacji ze stwierdzonymi regulacyjnymi oddziaływaniami fruktozo-2,6-bisfosforanu na kluczowe enzymy pozwoliło uzupełnić mechanizm zmian metabolizmu węglowodanowego w wątrobie o odpowiedź na sygnał glukagonowy (ryc. 4) [31, 32, 55, 61, 69].

Glukagon aktywując cyklazę adenylową podnosi komórkowe stężenie cAMP, uruchamiając znany kaskadowy mechanizm aktywacji fosforylasy glikogenowej [5]. cAMP, wiążąc się z kinazą białkową zależną od cAMP, uwalnia jej katalityczną podjednostkę, co w konsekwencji prowadzi do fosforylacji kinazy fosforylasy. Ta z kolei, fosforylując fosforylase, przekształca enzym ten w jego aktywną formę. Tym samym uruchomiona zostaje glikogenoliza. Jednocześnie ufosforylowana przez kinazę białkową zależną od cAMP syntetaza glikogenowa zaprzestaje syntezy tego wielocukru [5]. Ale katalityczna podjednostka kinazy białkowej zależnej od cAMP fosforyluje i inne enzymy hepatocytów — przede wszystkim 6-fosfofrukto-2-kinazę/fruktozo-2,6-bisfosfatazę [17, 20]. Dzięki fosforylacji enzym ten katalizuje wyłącznie reakcję hydrolizy fruktozo-2,6-bisfosforanu, a jego aktywność kinazowa zostaje zahamowana [17, 20, 27, 70, 71]. W konsekwencji po zadziałaniu glukagonu na komórki wątroby obserwujemy drastyczny spadek wewnątrzkomórkowego stężenia fruktozo-2,6-bisfosforanu. Brak fruktozo-2,6-bisfosforanu ma znaczenie podwójne.



Ryc. 4. Rola fruktozo-2,6-bisforanu w mechanizmie działania glukagonu i adrenaliny na układy enzymatyczne komórek wątroby (na podstawie [32, 58, 61, 69])

Skróty: F2,6bP — fruktozo-2,6-bisfosforan, F1,6bP — fruktozo-1,6-bisfosforan, F6P — fruktozo-6-fosforan, G6P — glukozo-6-fosforan, AMP — adenozylo-5'-monofosforan, cAMP — cykliczny adenozylo-3',5'-monofosforan, PFK — fosfofrukto-1,6-bisfosforan-3-kinaza, F1,6bPaza — fruktozo-1,6-bisfosforan-1,6-bisfosforanaza. Reakcje aktywowane w wyniku działania hormonów wyróżniono szerokimi strzałkami. Aktywne formy enzymów oznaczono dużymi czcionkami i literą A. Formy nieaktywne — literą b

Po pierwsze w komórce brakuje najważniejszego aktywatora fosfofruktokinazy. Co więcej, katalityczna podjednostka kinazy białkowej zależnej od cAMP fosforyluje fosfofruktokinazę [7, 13, 32, 38, 69], a to prawdopodobnie prowadzi do zmniejszenia jej wrażliwości na fruktozo-2,6-bisfosforan i ułatwia jej inhibicję przez ATP i cytrynian [25]. Wynikiem tych zmian jest zahamowanie aktywności fosfofruktokinazy. W wątrobie kinaza białkowa zależna od cAMP katalizuje także fosforylację, a przez to i inhibicję, kinazy pirogronianowej [16, 21, 52, 54]. Inhibicja dwóch kluczowych enzymów, fosfofruktokinazy i kinazy pirogronianowej, hamuje aktywność całej drogi glikolitycznej w odpowiedzi na sygnał glukagonowy docierający do hepatocytu.

Obniżenie poziomu fruktozo-2,6-bisfosforanu ma i drugie znaczenie, gdyż jest on ważnym inhibitorem fruktozo-1,6-bisfosfatazy [29, 53, 73]. I ten enzym jest fosforylowany przez katalityczną podjednostkę kinazy białkowej zależnej od cAMP [15, 52, 64] w efekcie działania glukagonu na hepatocyty [12]. Fosforylacja fruktozo-1,6-bisfosfatazy prawdopodobnie obniża jej wrażliwość na hamujące działanie fruktozo-2,6-bisfosforanu [46]. Ten spadek wrażliwości enzymu, jak i obniżenie poziomu fruktozo-2,6-bisfosforanu w komórce, są odpowiedzialne za aktywację wątrobowej fruktozo-1,6-bisfosfatazy pod wpływem glukagonu [9, 32, 46]. Aktywacja tego enzymu umożliwia syntezę glukozy drogą glukoneogeną, choć dla pełnego wyjaśnienia stymulacji glukoneogenezy w wątrobie pod wpływem glukagonu potrzebne jest jeszcze opisanie mechanizmu regulacji aktywności karboksylaz pirogronianowej i fosfoenolpirogronianowej.

3.2. Adrenalina. Obok glukagonu także adrenalina stymuluje uwalnianie glukozy z hepatocytów do krwi [37] i wątrobową glukoneogenezę [22, 23, 56]. Istotnym elementem tej stymulacji jest prawdopodobnie fosforylacja 6-fosfofrukto-2-kinazy/fruktozo-2,6-bisfosfatazy [58, 61, 69]. Prowadzi ona do obniżenia poziomu fruktozo-2,6-bisfosforanu, obserwowanego po inkubacji hepatocytów w obecności adrenaliny [58, 60]. Konsekwencją tego jest inhibicja fosfofruktokinazy (i glikolizy) oraz aktywacja fruktozo-1,6-bisfosfatazy (a więc glukoneogenezy). Mechanizm fosforylacji 6-fosfofrukto-2-kinazy/fruktozo-2,6-bisfosfatazy jest w tym przypadku (ryc. 4) przedmiotem kontrowersji. Z jednej strony sugerowano, iż fosforylacja ta przebiega drogą niezależną od cAMP, związaną z aktywacją mechanizmu α -receptorowego, prowadzącą do podniesienia komórkowego poziomu jonów Ca^{2+} [61, 69]. Wzrost stężenia jonów Ca^{2+} aktywuje kinazę fosforylasy, która katalizuje fosforylację fosforylasy glikogenowej, co aktywuje ten enzym i uruchamia glikogenolizę. Kinaza fosforylasy miałoby jednocześnie fosforylować 6-fosfofrukto-2-kinazę [28,

61, 69]. Ostatnio jednak zaprzeczono tej hipotezie [58]. Sugerowano jednocześnie, że adrenalina obniża poziom fruktozo-2,6-bisfosforanu drogą pobudzanej przez β -receptory, zależnej od cAMP, fosforylacji 6-fosfofrukto-2-kinazy/fruktozo-2,6-bisfosfatazy [58].

3.3. Insulina i wysoki poziom glukozy. Wysokie stężenie glukozy we krwi powoduje zmianę metabolizmu węglowodanowego wątroby. Wzrost ilości glukozy w środowisku hepatocytów znajduje swe odbicie w znaczącym wzroście wewnątrzkomórkowego poziomu fruktozo-2,6-bisfosforanu [32, 35, 36, 55, 60, 61, 69, 74]. W warunkach fizjologicznych wysokiemu poziomowi glukozy we krwi towarzyszy wzrost stężenia insuliny. Hormon ten przywraca w wątrobie wysokie stężenie fruktozo-2,6-bisfosforanu, obniżone u zwierząt z cukrzycą [48] lub po potraktowaniu hepatocytów glukagonem [58, 62]. Również hiperinsulinemii u myszy genetycznie otluszczonych towarzyszy wysoki poziom tego metabolitu w wątrobie [11, 36]. Wszystkie przytoczone obserwacje wskazują, że w warunkach obfitości glukozy i/lub wzrostu stężenia insuliny we krwi fruktozo-2,6-bisfosforan może pełnić funkcje sygnału przełączającego kierunek biegu reakcji glukoneogennych w glikolityczny. Mechanizm tego procesu nie jest w pełni wyjaśniony [58, 69], lecz można przypuszczać, że w warunkach tych cyklaza adenylowa przestaje być aktywowana. Fosfodiesteraza nukleotydów cyklicznych hydrolizuje cAMP, a jego brak inaktywuje kinazy białkowe. Aktywność przejawiają odpowiednie fosfatazy, które, hydrolizując ufosforylowane formy enzymów, zmieniają ich aktywność. Hydroliza ufosforylowanej formy 6-fosfofrukto-2-kinazy/fruktozo-2,6-bisfosfatazy przez fosfatazy niespecyficzne [28, 69] lub specyficzne [58] przekształca enzym w aktywną kinazę [17, 20, 28, 70]. Z drugiej strony wysoki poziom glukozy powoduje wzrost komórkowego stężenia heksozomonofosforanów [62]. Aktywna 6-fosfofrukto-2-kinaza i wysoki poziom jej substratu zapewniają sprawną syntezę fruktozo-2,6-bisfosforanu. Metabolit ten hamuje aktywność fruktozo-1,6-bisfosfatazy, a jednocześnie stymuluje fosfofruktokinazę. Aktywacja tego enzymu podnosi stężenie produktu reakcji przezeń katalizowanej, fruktozo-1,6-bisfosforanu, który allosterycznie aktywuje defosforylowaną kinazę pirogronianową [16, 21, 54]. Mamy więc do czynienia z synchroniczną aktywacją kluczowych enzymów glikolitycznych, toteż cały szlak metaboliczny wzmaga swą wydajność.

3.4. Niedotlenienie. Wydaje się jednak, iż fruktozo-2,6-bisfosforan pełni rolę stymulatora fosfofruktokinazy (i całej glikolizy) wątrobowej tylko wtedy, gdy glikoliza w wątrobie ma na celu dostarczenie elementów trójwęglowych do komórkowych biosyntezy (np. lipogenezy) i przebiega w warunkach obfitości zapasów energetycznych [34]. Natomiast,

jeśli glikoliza ma uzupełnić niedobory energetyczne powstałe w wyniku niedokrwienia i niedotlenienia organu, jej stymulacja odbywa się prawdopodobnie bez udziału fruktozo-2,6-bisfosforanu. Stwierdzono bowiem, że warunki beztlenowe powodują obniżenie poziomu tego metabolitu w hepatocytach [34, 35]. W warunkach beztlenowych fosfofruktokinaza wątroby aktywowana jest prawdopodobnie przez wzrost stężenia AMP i obniżenie stężenia inhibitorów (ATP i cytrynianu), występujące w czasie anoksji [34]. Natomiast nie jest jasny mechanizm i znaczenie obniżenia poziomu fruktozo-2,6-bisfosforanu w warunkach beztlenowych [34]. W czasie anoksji nie stwierdzono istotnych zmian aktywności 6-fosfofrukto-2-kinazy [34]. Możliwe, że przyczyną spadku stężenia fruktozo-2,6-bisfosforanu jest wzrost stężenia 3-fosfoglicerynianiu [34], aktywatora fruktozo-2,6-bisfosfatazy [71].

4. UDZIAŁ FRUKTOZO-2,6-BISFOSFORANU W REGULACJI METABOLIZMU WĘGLOWODANOWEGO INNYCH TKANEK

4.1. Tkanki zwierzęce. Obok wątroby tkankami bogatymi we fruktozo-2,6-bisfosforan są mózg i mięsień sercowy [35, 40]. Wykryto go również w mięśniach szkieletowych, nerkach, tkance tłuszczowej [35, 40], płucach [35], jądrach [40] i wysepkach trzustki [43]. Nie wykryto jedynie w erytrocytach [33, 35]. To powszechne występowanie fruktozo-2,6-bisfosforanu w tkankach ssaków, jak również fakt, że syntetyzowany jest w nich [32, 40, 42] i oddziałuje na ich kluczowe enzymy [4, 30, 32, 33, 47, 68] w sposób podobny jak w wątrobie, nasuwa przypuszczenie, że i w tych tkankach nowo odkryty ester spełnia zasadniczą rolę w regulacji glikolizy. Pozostaje jednak do wyjaśnienia, w jakim stopniu mechanizmy z udziałem fruktozo-2,6-bisfosforanu przypominają procesy wątrobowe, a w jakim się różnią. Na przykład adrenalina, odmiennie niż w wątrobie, stymuluje glikolizę [35] i aktywuje fosfofruktokinazę [8, 10, 51] w mięśniach, zwłaszcza sercowym. W mięśni kończyny obserwowano 4-krotny wzrost zawartości fruktozo-2,6-bisfosforanu po perfuzji adrenaliną, natomiast w mięśni sercowym nie stwierdzono wzrostu jego zawartości po stymulacji glikolizy tym hormonem [35]. Aktywacji glikolizy w mięśni przez insulinę towarzyszy wzrost stężenia fruktozo-2,6-bisfosforanu, ale w czasie oddziaływania impulsami elektrycznymi, także wzmagającymi glikolizę w podrażnionym mięśni, obserwuje się obniżenie poziomu tego estru [35].

W komórkach wysepek trzustki glukoza i glukagon współdziałają w pobudzeniu wydzielania insuliny, przy czym w stymulacji tej pośredniczy wzrost aktywności glikolitycznej. Temu odmiennemu niż w wątrobie, aktywującemu glikolizę, działaniu glukagonu towarzyszy brak inhi-

biej 6-fosfofrukto-2-kinazy przez kinazę białkową zależną od cAMP (cyt. według [32]).

Powyższe przykłady specyficzności metabolizmu poszczególnych tkanek i jego odmienności od przemian wątrobowych wskazują, że wyjaśnienie regulacyjnej roli fruktozo-2,6-bisfosforanu w tychże tkankach wymaga dalszych badań [31, 35].

4.2. Tkanki roślinne. Wykrycie fruktozo-2,6-bisfosforanu także w tkankach roślinnych [32, 65, 67, 77] może sugerować jego uniwersalność jako regulatora metabolizmu węglowodanowego. Przedstawione poniżej doniesienia sygnalizują charakterystyczne dla roślin różnice w regulacyjnej roli tego estru w porównaniu z mechanizmami wątrobowymi.

Hodując drożdże w warunkach beztlenowych stwierdzono kilkakrotny wzrost aktywności 6-fosfofrukto-2-kinazy, a w konsekwencji i znacznie wyższe stężenie fruktozo-2,6-bisfosforanu [24], aktywatora fosfofruktokinazy tego organizmu [1, 2, 39, 50]. Tak więc w komórkach drożdży efekt Pasteura można tłumaczyć wzrostem stężenia fruktozo-2,6-bisfosforanu [24].

W tkankach roślin wyższych odkrycie fruktozo-2,6-bisfosforanu uwypukliło różnice w regulacji cytoplazmatycznego i plastydowego metabolizmu węglowodanowego. W cytoplazmie metabolit ten inaktywuje fruktozo-1,6-bisfosfatazę [32, 67, 77]. Natomiast bez wpływu pozostaje na cytoplazmatyczny izoenzym fosfofruktokinazy [44, 45]. W cytoplazmie licznych tkanek roślinnych fruktozo-1,6-bisfosforan jest syntetyzowany nie tylko przez klasyczną fosfofruktokinazę, lecz również przez fosfotransferazę nieorganiczny pirofosforan: D-fruktozo-6-fosforan [6, 76]. I właśnie ta transferaza jest bardzo silnie aktywowana przez fruktozo-2,6-bisfosforan [14, 65, 67, 76]. Plastydowy izoenzym fosfofruktokinazy jest aktywowany typowo przez fruktozo-2,6-bisfosforan [44, 45]. Z kolei sprzeczne wyniki uzyskano dotąd w odniesieniu do izoenzymu fruktozo-1,6-bisfosfatazy z chloroplastów. Z jednej strony stwierdzano hamowanie jego aktywności przez fruktozo-2,6-bisfosforan [30, 67], a z drugiej zaprzeczano temu [32, 44, 77].

UWAGI KOŃCOWE

Odkrycie fruktozo-2,6-bisfosforanu w tkankach roślinnych i zwierzęcych pobudziło do nowych badań nad regulacją metabolizmu węglowodanów. Z jednej strony dostarczają one danych na temat roli tego metabolitu w mechanizmach regulacji. Pojawiły się pytania dotyczące możliwości spełniania przez fruktozo-2,6-bisfosforan roli donora grup fosforylowych lub 6-fosfofruktozylowych [1, 31]. Z drugiej strony fakt,

że w ponad 50 lat po odkryciu i ustaleniu struktury fruktozo-1,6-bisfosforanu wykryto nowy dwufosforanowy ester fruktozy, pobudził do poszukiwań nowych metabolitów, potencjalnych regulatorów metabolizmu, jak np. sedoheptulozo-2,7-bisfosforanu [3].

LITERATURA

- [1] AVIGAD G., Stimulation of yeast phosphofructokinase activity by fructose 2,6-bisphosphate, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **102**: 985–991, 1981.
- [2] BARTRONS R., VAN SCHAFTINGEN E., VISSERS S., HERS H. G., The stimulation of yeast phosphofructokinase by fructose 2,6-bisphosphate, *FEBS Lett.*, **143**: 137–140, 1982.
- [3] BLACKMORE P., SHUMAN E. A., Regulation of hepatic altro heptulose 1,7-bisphosphate levels and control of flux through the pentose pathway by fructose 2,6-bisphosphate, *FEBS Lett.*, **142**: 255–259, 1982.
- [4] BOSCÁ L., ARAGÓN J., SOLS A., Specific activation by fructose 2,6-bisphosphate and inhibition by P-enolpyruvate of Ascites tumor phosphofructokinase, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **106**: 486–491, 1982.
- [5] BRYŁA J., Regulacja metabolizmu komórki, PWN, Warszawa 1981, 337–485.
- [6] CARNAL W. N., BLACK C. G., Pyrophosphate — dependent 6-phosphofructokinase a new glycolytic enzyme in pineapple leaves, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **86**: 20–26, 1979.
- [7] CASTANO, J. G., NIETO A., FELIU J. E., Inactivation of phosphofructokinase by glukagon in rat hepatocytes, *J. Biol. Chem.*, **245**: 5576–5579, 1979.
- [8] CLARK M. G., FILSELL O. H., PATTEN G. S., Epinephrine activation of phosphofructokinase in perfused rat heart, *J. Biol. Chem.*, **257**: 271–276, 1982.
- [9] CLARK M. G., KNEER N. M., BOSCH A. L., LARDY H. A., The fructose 1,6-diphosphatase — phosphofructokinase substrate cycle a site of regulation of hepatic gluconeogenesis by glucagon, *J. Biol. Chem.*, **249**: 5695–5703, 1974.
- [10] CLARK M. G., PATTEN G. S., Adrenaline activation of phosphofructokinase in rat heart mediated by α -receptor mechanism independent of cyclic AMP, *Nature (Lond.)*, **292**: 461–463, 1981.
- [11] CLAUST H., PILKIS S. J., Fructose 2,6-bisphosphate levels are elevated in livers of genetically obese mice, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **109**: 664–668, 1982.
- [12] CLAUS T. H., SCHLUMPF J., EL-MAGHRABI M. R., MCGRANE M., PILKIS S. J., Glukagon stimulation of fructose 1,6-bisphosphatase phosphorylation in rat hepatocytes, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **100**: 716–723, 1981.
- [13] CLAUS T. H., SCHLUMPF J. R., EL-MAGHRABI M. R., PILKIS S. J., Regulation of the phosphorylation and activity of 6-phosphofructo-1-kinase in isolated hepatocytes by alfa-glycerolphosphate and fructose 2,6-bisphosphate, *J. Biol. Chem.*, **257**: 7541–7548, 1982.
- [14] CSEKE C., WEEDEN N. F., BUCHANAN B. B., UYEDA K., Role of fructose 2,6-bisphosphate and NADPH in the regulation of leaf cytosolic and chloroplast glycolysis, *Plant. Physiol.*, **69**: Supplement: 61, 1982.
- [15] DAHLQVIST-EDBERG U., WRETBNORN M., EKMAN P., The demonstration in rat liver cell sap of protein kinase and phosphoprotein phosphatase active on fructose-bisphosphatase, *Biochim. Biophys. Acta*, **706**: 239–244, 1982.

- [16] EL-MAGHRABI M. R., CLAUS T. N., MCGRANE M., PILKIS S. J., Influence of phosphorylation on the interaction of effectors with rat liver pyruvate kinase, *J. Biol. Chem.*, **257**: 233-240, 1982.
- [17] EL-MAGHRABI M. R., CLAUS T. H., PILKIS J., FOX E., PILKIS S. J., Regulation of rat liver fructose 2,6-bisphosphatase, *J. Biol. Chem.*, **257**: 7603-7607, 1982.
- [18] EL-MAGHRABI M. R., CLAUS T. H., PILKIS S. J., Partial purification of a rat liver enzyme that catalyzes the formation of fructose 2,6-bisphosphate, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **101**: 1071-1077, 1981.
- [19] EL-MAGHRABI M. R., CLAUS T. H., PILKIS J., PILKIS S. J., Regulation of 6-phosphofructo-2-kinase activity by cyclic AMP-dependent phosphorylation, *Proc. Natl. Sci. USA*, **79**: 315-319, 1982.
- [20] EL-MAGHRABI M. R., FOX E., PILKIS J., PILKIS S. J., Cyclic AMP-dependent phosphorylation of rat liver 6-phosphofructo-2-kinase/fructose 2,6-bisphosphatase, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **106**: 794-802, 1982.
- [21] ENGSTROM L., Regulation of pyruvate kinase, *Curr. Top. Cell. Regul.*, **13**: 29-51, 1978.
- [22] EXTON J. H., Mechanism involved in effects of catecholamines on liver carbohydrate metabolism, *Biochem. Pharmacol.*, **28**: 2237-2240, 1979.
- [23] FELIU J. E., HUE L., HERS H. G., Hormonal control of pyruvate kinase activity and of gluconeogenesis in isolated hepatocytes, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **73**: 2762-2766, 1976.
- [24] FURUYA E., KOTANIGUCHI H., HAGIHARA B., The effect of oxygen on fructose 2,6-bisphosphate concentration and fructose 6-phosphate 2-kinase activity in yeast cells, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **105**: 1519-1523, 1982.
- [25] FURUYA E., UYEDA K., Regulation of phosphofructokinase activity by a new mechanism: An activation factor binding to phosphorylated enzyme, *J. Biol. Chem.*, **255**: 11656-11659, 1980.
- [26] FURUYA E., UYEDA K., Anovel enzyme catalyzes the synthesis of activation factor from ATP and D-fructose-6-P, *J. Biol. Chem.*, **256**: 7109-7112, 1981.
- [27] FURUYA E., YOKOYAMA M., UYEDA K., An enzyme that catalyzes hydrolysis of fructose 2,6-bisphosphate, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **105**: 264-270, 1982.
- [28] FURUYA E., YOKOYAMA M., UYEDA K., Regulation of fructose 6-phosphate 2-kinase by phosphorylation and dephosphorylation. Possible mechanism for coordinated control of glycolysis and glycogenolysis, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**: 325-329, 1982.
- [29] GANSON N. J., FROMM H. J., The effect of fructose 2,6-bisphosphate on the reverse reaction kinetics of fructose 1,6-bisphosphatase from bovine liver, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **108**: 233-239, 1982.
- [30] GOTTSCHALK M. E., CHATTERJEE T., EDELSTEIN I., MARCUS F., Studies on the mechanism of interaction of fructose 2,6-bisphosphate with fructose 1,6-bisphosphatase, *J. Biol. Chem.*, **257**: 8016-8020, 1982.
- [31] HERS H. G., HUE L., VAN SCHAFLINGEN E., Fructose 2,6-bisphosphate, *Trends Biochem. Sci.* **7**: 329-331, 1982.
- [32] HERS H. G., VAN SCHAFTINGEN E., Fructose 2,6-bisphosphate: 2 years after its discovery, *Biochem. J.*, **206**: 1-12, 1982.
- [33] HEYLEN A., VAN SCHAFTINGEN E., HERS H. G., The stimulation of phosphofructokinase from human erythrocytes by fructose 2,6-bisphosphate, *FEBS Lett.*, **143**: 141-143, 1982.
- [34] HUE L., Role of fructose 2,6-bisphosphate in the stimulation of glycolysis by anoxia in isolated hepatocytes, *Biochem. J.*, **206**: 359-365, 1982.

- [35] HUE L., BLACKMORE P. F., SHIKAMA H., ROBINSON-STEINER A., EXTON J. H., Regulation of fructose 2,6-bisphosphate content in rat hepatocytes, perfused hearts and perfused hindlimbs, *J. Biol. Chem.*, **257**: 4308-4313, 1982.
- [36] HUE L., VAN DE WERVE G., Increased concentration of fructose 2,6-bisphosphate in livers of genetically obese mice, *FEBS Lett.*, **145**: 236-266, 1982.
- [37] HUTSON N. J., BRUMBAY F. T., ASSIMACOPOULOS F. D., HARPER S. C., EXTON J. H., Studies on the adrenergic activation of hepatic glucose output: I. Studies on the α -adrenergic activation of phosphorylase and gluconeogenesis and inactivation of glycogen synthase in isolated rat liver parenchymal cells, *J. Biol. Chem.*, **251**: 5200-5208, 1976.
- [38] KAGIMOTO T., UYEDA K., Regulation of rat liver phosphofructokinase by glucagon-induced phosphorylation, *Arch. Biochem. Biophys.*, **203**: 792-799, 1980.
- [39] KESSLER R., NISSLER K., SCHELLENBERGER W., HOFMANN E., Fructose 2,6-bisphosphate increases the binding affinity of yeast phosphofructokinase to AMP, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **107**: 506-510, 1982.
- [40] KUWAJIMA M., UYEDA K., The tissue distribution of fructose-2,6-P₂ and fructose 6-P,2-kinase in rats and the effect of starvation, diabetes and hypoglycemia on hepatic fructose-2,6-P₂ and fructose 6-P,2-kinase, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **104**: 84-88, 1982.
- [41] KWIATKOWSKA J., Fruktozo 2,6-bisfosforan, nowy efektor przemian glukozy, *Post. Biochemii*, **28**: 401-412, 1982.
- [42] MALAISSE W. J., MALAISSE-LAGAE F., SENER A., Presence of fructose 6-phosphate,2-kinase in pancreatic islets, *FEBS Lett.*, **135**: 203-206, 1981.
- [43] MALAISSE W. J., MALAISSE-LAGAE F., SENER A., Glucose-induced accumulation of fructose 2,6-bisphosphate in pancreatic islets, *Diabetes*, **31**: 90-93, 1982.
- [44] MIERNYK J. A., DENNIS D. T., Control of plastid carbohydrate metabolism in developing castor oil seeds by fructose 2,6-bisphosphate, *Plant Physiol.*, **69** Supplement: 60, 1982.
- [45] MIERNYK J. A., DENNIS D. T., Activation of plastid isozyme of phosphofructokinase from developing endosperm of *Ricinus communis* by fructose 2,6-bisphosphate, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **105**: 793-798, 1982.
- [46] MÖRIKOFER-ZWEZ S., STOECKLIN F. B., WALTER P., Fructose 1,6-bisphosphatase in rat liver cytosol; activation after glucagon treatment in vivo and inhibition by fructose 2,6-bisphosphate in vitro, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **101**: 104-111, 1981.
- [47] MUNIYAPPA K., LEIBACH F. H., MENDICINO J., Reciprocal regulation of fructose 1,6-bisphosphatase and phosphofructokinase by fructose 2,6-bisphosphate in swine kidney, *Life Sci.*, **32**: 271-278, 1983.
- [48] NEELY P., EL-MAGHRABI M. R., PILKIS S. J., CLAUS T. H., Effect of diabetes, insulin, starvation and refeeding on the level of rat hepatic fructose 2,6-bisphosphate, *Diabetes*, **30**: 1062-1064, 1981.
- [49] NIETO A., CASTAÑO J. G., Control in vivo of rat liver phosphofructokinase by glucagon and nutritional changes, *Biochem. J.*, **186**: 953-957, 1980.
- [50] NISSLER K., OTTO A., SCHELLENBERGER W., HOFMANN E., Similarity of activation of yeast phosphofructokinase by AMP and fructose 2,6-bisphosphate, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **111**: 294-300, 1983.
- [51] PATTEN G. S., FILSELL O. H., CLARK M. G., Epinephrine activation of phosphofructokinase in perfused rat heart. Regulation via α -adrenergic receptor mechanism independent of phosphorylation, *FEBS Lett.*, **135**: 219-222, 1982.
- [52] PILKIS S. J., EL-MAGHRABI M. R., COVEN B., CLAUS T. H., TAGER

- H. S., STEINER D. F., KEIM P. S., HEINRIKSON R. L., Phosphorylation of rat liver hepatic fructose 1,6-bisphosphatase and pyruvate kinase, *J. Biol. Chem.*, **255**: 2770-2775, 1980.
- [53] PILKIS S. J., EL-MAGHRABI M. R., MCGRANE M. M., PILKIS J., CLAUS T. H., The role of fructose 2,6-bisphosphate in regulation of fructose 1,6-bisphosphatase, *J. Biol. Chem.*, **256**: 11489-11495, 1981.
- [54] PILKIS S. J., EL-MAGHRABI M. R., MCGRANE M., PILKIS J., CLAUS T. H., Regulation by glucagon of hepatic pyruvate kinase, 6-phosphofructo-1-kinase and fructose 1,6-bisphosphatase, *Fed. Proc.*, **41**: 2623-2628, 1982.
- [55] PILKIS S. J., EL-MAGHRABI M. R., MCGRANE M., PILKIS J., FOX E., CLAUS T. H., Fructose 2,6-bisphosphate: a mediator of hormone action of the fructose 6-phosphate/fructose-1,6-bisphosphate substrate cycle, *Mol. Cell. Endocr.*, **25**: 245-266, 1982.
- [56] PILKIS S. J., RIOU J. P., CLAUS T. H., Hormonal control of (¹⁴C)-glucose synthesis from (U-¹⁴C)-dihydroxyacetone and glycerol in isolated rat hepatocytes, *J. Biol. Chem.*, **251**: 7841-7852, 1976.
- [57] PILKIS S. J., SCHLUMPF J., PILKIS J., CLAUS T. H., Regulation of phosphofructokinase activity by glucagon in isolated rat hepatocytes, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **88**: 960-967, 1979.
- [58] PILKIS S. J., CHRISMAN T. D., EL-MAGHRABI M. R., COLOSIA A., FOX E., PILKIS J., CLAUS T. H., The action of insulin on hepatic fructose 2,6-bisphosphate metabolism, *J. Biol. Chem.*, **258**: 1495-1508, 1983.
- [59] REINHART G. D., LARDY H. A., Rat liver phosphofructokinase: kinetic activity under near-physiological conditions, *Biochemistry*, **19**: 1477-1484, 1980.
- [60] RICHARDS C. S., FURUYA E., UYEDA K., Regulation of fructose 2,6-P₂ concentration in isolated hepatocytes, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **100**: 1673-1679, 1981.
- [61] RICHARDS C. S., UYEDA K., Hormonal regulation of fructose-6-P₂-kinase and fructose-2,6-P₂ by two mechanisms, *J. Biol. Chem.*, **257**: 8854-8861, 1982.
- [62] RICHARDS C. S., UYEDA K., The effect of insulin and glucose on fructose-2,6-P₂ in hepatocytes, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **109**: 394-401, 1982.
- [63] RICHARDS C. S., YOKOYAMA M., FURUYA E., UYEDA K., Reciprocal changes in fructose 6-phosphate, 2-kinase and fructose 2,6-bisphosphatase activity in response to glucagon and epinephrine, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **104**: 1073-1079, 1982.
- [64] RIOU J. P., CLAUS T. H., FLOCKHART D. A., CORBIN J. D., PILKIS S. J., In vivo and in vitro phosphorylation of rat liver fructose 1,6-bisphosphatase, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **74**: 4615-4619, 1977.
- [65] SABULARSE D. C., ANDERSON R. L., D-fructose 2,6-bisphosphate: a naturally occurring activator for inorganic pyrophosphate: D-fructose-6-phosphate 1-phosphotransferase in plants, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **103**: 843-855, 1981.
- [66] SÖLING H. D., KUDUS J., BRAND I. A., Inactivation of liver phosphofructokinase by phosphofructokinase phosphatase or by low pH is inhibited by fructose 2,6-bisphosphate, *FEBS Lett.*, **130**: 309-313, 1981.
- [67] STITT M., MIESKES G., SOLING H.-D., HELDT H. W., On a possible role of fructose 2,6-bisphosphate in regulating photosynthetic metabolism in leaves, *FEBS Lett.*, **145**: 217-222, 1982.
- [68] UYEDA K., FURUYA E., LUBY L. J., The effect of natural and synthetic D-fructose 2,6-bisphosphate on the regulatory kinetic properties of liver and muscle phosphofructokinase, *J. Biol. Chem.*, **256**: 8394-8399, 1981.

- [69] UYEDA K., FURUYA E., RICHARDS C. S., YOKOYAMA M., Fructose-2,6-P₂ chemistry and biological function, *Mol. Cell. Biochem.*, **48**: 97-120, 1982.
- [70] VAN SCHAFTINGEN E., DAVIES D. R., HERS H. G., Inactivation of phosphofructokinase 2 by cyclic AMP-dependent protein kinase, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **103**: 362-368, 1981.
- [71] VAN SCHAFTINGEN E., DAVIES D. R., HERS H. G., Fructose 2,6-bisphosphatase from rat liver, *Eur. J. Biochem.*, **124**: 143-149, 1982.
- [72] VAN SCHAFTINGEN E., HERS H. G., Phosphofructokinase 2: the enzyme that forms fructose 2,6-bisphosphate from fructose 6-phosphate and ATP, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **101**: 1078-1084, 1981.
- [73] VAN SCHAFTINGEN E., HERS H. G., Inhibition of fructose 1,6-bisphosphatase by fructose 2,6-bisphosphate, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**: 2861-2863, 1981.
- [74] VAN SCHAFTINGEN E., HUE L., HERS H. G., Control of the fructose 6-phosphate/fructose 1, 6-bisphosphate cycle in isolated hepatocytes by glucose and glucagon, *Biochem. J.*, **192**: 887-895, 1980.
- [75] VAN SCHAFTINGEN E., JETT M. F., HUE L., HERS H.G., Control of liver 6-phosphofructokinase by fructose 2,6-bisphosphate and other effectors, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**: 3483-3486, 1981.
- [76] VAN SCHAFTINGEN E., LEDERER B., BARTRONS R., HERS H. G., A kinetic study of pyrophosphate: fructose-6-phosphate phosphotransferase from potato tubers, Application to a microassay of fructose 2,6-bisphosphate, *Eur. J. Biochem.*, **129**: 191-195, 1982.
- [77] WEEDEN N. F., CSEKE C., BUCHANAN F. B., UYEDA K., Inhibition of leaf cytosolic fructose bisphosphatase by fructose 2,6-bisphosphate, *Plant Physiol.*, **69** Supplement: 60, 1982.

Otrzymano: 11 lipca 1983.

Przyjęto: 1 września 1983.

Adres autorów: ul. Fredry 10, 61-701 Poznań.

ZALEŻNOŚĆ MIĘŚNIA PRAŻKOWANEGO OD UKŁADU NERWOWEGO. I. NEURON RUCHOWY

DEPENDENCE OF THE STRIATED MUSCLE FROM THE NERVOUS SYSTEM. I. MOTONEURON

Anna JAKUBIEC-PUKA

Pracownia Metabolizmu Białek, Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego,
PAN, Warszawa

Streszczenie. W artykule przedstawiono aktualne poglądy na temat oddziaływań neuronu ruchowego na budowę i funkcję włókna mięśniowego. Scharakteryzowano typy metaboliczne włókien mięśniowych oraz omówiono współzależność między właściwościami włókna mięśniowego a dwoma głównymi czynnikami, które je kształtują, a mianowicie szybkością skurczu i długotrwałością pracy. Zaakcentowano problem plastyczności włókna mięśniowego związanej ze zmianą jego czynności.

Omówiono, lub tylko zasygnalizowano, istnienie oddziaływań na motoneuron z ośrodków różnych pięter układu nerwowego, jak też z obwodu (przez systemy afferentne). Oddziaływania te determinują typ motoneuronu, a tym samym typ całej jednostki motorycznej.

Przedstawiono aktualny stan wiedzy na temat plastyczności połączenia nerwu z mięśniem, „troficznych oddziaływań” nerwu na mięsień oraz przepływu akso-plazmy, jak też zasygnalizowano przypuszczalne znaczenie tych procesów dla funkcji i adaptacji mięśnia.

Summary. Latest concepts concerning the influence of the motoneuron on the structure and function of the muscle fiber are presented. Muscle fibre types are characterized and their dependence on two main factors modelling them i.e. speed of contraction and duration of activity are described. The plasticity of muscle fibers following changes of muscle function is pronounced.

The effect of several parts of the central nervous system and of the afferent systems on the motoneuron function is discussed. These systems determine the type of motoneuron i.e. type of motor unit.

Several problems concerning plasticity of the nerve-muscle contact, of “the trophic influence” of the nerve on muscle, and of axonal transport are presented, as well as, their possible meaning for muscle function and muscle adaptation.

Mięsień prążkowany zwierząt wyższych tradycyjnie uważany był za tkankę bardzo wyspecjalizowaną, której komórki po wykształceniu się mogą ulegać już tylko bardzo nieznacznym zmianom. Tymczasem prowadzone w ciągu ostatnich 20 lat badania mięśni poddanych treningowi, jak też różnym warunkom eksperymentalnym, wskazują na plastyczność i znaczne możliwości adaptacyjne tkanki mięśniowej. Ponieważ czynność włókna mięśniowego jest zależna od unerwiającego je neuronu ruchowego, procesy adaptacyjne mięśnia należy rozpatrywać łącznie z funkcją motoneuronów.

WSPÓLZALEŻNOŚĆ WŁAŚCIWOŚCI WŁÓKNA MIĘŚNIOWEGO I JEGO FUNKCJI

Mięśnie wykonywać muszą bardzo różnorodną pracę, by sprostać wielorakim potrzebom organizmu. Zwykle też ten sam mięsień ma udział w wielu czynnościach. W związku z tym poszczególne włókna jednego mięśnia, a także to samo włókno, uczestnicząc w różnych czynnościach, kurczą się z odmienną szybkością oraz wykonują pracę różnorodną pod względem czasu trwania i intensywności. Dlatego włókna tego samego mięśnia wykazują odmienne właściwości biochemiczne, histochemiczne i strukturalne [181].

Zgodnie z obecnie panującymi poglądami, na kształtowanie się cech włókna mięśniowego wpływają dwa czynniki, a mianowicie: szybkość jego skurczu oraz stopień długotrwałości i intensywności pracy [186]. Tak więc włókna mięśniowe kurczące się szybko mają, w porównaniu z włóknami tego samego mięśnia kurczącymi się wolniej, większą średnicę, regularniejszą budowę aparatu kurczliwego, miofibryle o większej średnicy [52, 65, 154] i inaczej zbudowaną linię M [65, 67, 112, 190]. Z szybkością skurczu włókna mięśniowego związane są różnice form izometrycznych białek aparatu kurczliwego: ciężkich i lekkich podjednostek miozyny [9, 42, 130, 160, 196, 203, 209, 219], a także ufosforylowanie lekkich podjednostek, które jak się przypuszcza, wpływa na wydajność energetyczną skurczu i pełni inną rolę w mięśniu szybkim i wolnym [37, 113, 135, 202]. Szybkie i wolne włókna posiadają też odmienne izomery białek regulujących cienkiego filamentu — tropomiozyny [24, 83] i trzech podjednostek troponiny [48] oraz białek i lipidów siateczki sarkoplazmatycznej [11, 183, 227]. Mięsień szybki ma znacznie bardziej od wolnego rozbudowaną i o odmiennych właściwościach siateczkę sarkoplazmatyczną oraz sprawniej działający system transportu wapnia [183, 186, 215, 227]. Mięsień szybki różni się też od wolnego zawartością kationów wewnątrzkomórkowych i właściwościami elektrofizjologicznymi błony, np. wyższym spoczynkowym potencjałem membranowym [33].

Inne z kolei cechy włókna mięśniowego rozwijają się w związku z przystosowaniem do pracy o różnej intensywności. Należy do nich budowa linii Z, która we włóknach pracujących nieustannie jest szersza (do około 125 nm) i mało regularna, podczas gdy we włóknach pracujących krótkotrwale jest wąska (około 45–60 nm) i regularniejsza [65, 67, 175, 215]. Z intensywnością pracy związane są też przypuszczalnie ilościowe i jakościowe różnice w białkach C, H oraz X, stabilizujących filament miozynowy [152, 164].

Zależnie od funkcji włókna mięśniowego energia dla resyntezy ATP jest dostarczana z różnych źródeł. We włóknach szybko kurczących się, pracujących krótko i intensywnie, źródłem energii jest głównie glikogen. Włókna te posiadają bogate zapasy glikogenu oraz aktywne systemy glikolizy i resyntezy glikogenu; tradycyjnie nazywane są one „białymi”. Włókna mięśniowe pracujące nieustannie, zarówno wolno jak i szybko kurczące się, wymagają stałego dopływu energii. W związku z tym są one bogate w mitochondria i mioglobinę oraz wykazują wysoką aktywność enzymów oddechowych i enzymów przemiany tłuszczowej, oplata je też obfita sieć naczyń krwionośnych; są to tzw. włókna „czerwone” [123, 165, 173, 186]. Mięsień wolny „czerwony” posiada, w porównaniu do mięśnia „białego”, szybszy metabolizm (zarówno większą syntezę jak i degradację białka), więcej jąder we włóknach mięśniowych oraz więcej komórek satelitarnych [87, 102, 114, 127]. Koszt energetyczny pracy mięśnia wolnego jest mniejszy niż szybkiego [12, 38, 185].

Szybkość skurczu i intensywność pracy różnych włókien tego samego mięśnia jest zwykle odmienna, z tego względu występuje znaczna różnorodność kombinacji ich właściwości. Znaczne różnice mogą też istnieć pomiędzy włóknami poszczególnych mięśni tego samego organizmu oraz tym samym mięśniem różnych osobników w obrębie gatunku [44, 45, 224], a zwłaszcza pomiędzy homologicznymi mięśniami różnych gatunków [208]. W przeszłości, zależnie od przyjętych kryteriów, dzielono włókna mięśniowe na dwa [51], trzy [65, 73, 201], a nawet osiem typów [172]. Już same tylko różnice pomiędzy białkami miofibryli pozwalałyby wyodrębnić 6 typów włókien [224]. Szczegóły dotyczące tych zagadnień znaleźć można w pracach przeglądowych [35, 52, 110]. Obecnie najpowszechniej przyjęła się klasyfikacja włókien mięśniowych uwzględniająca zarówno szybkość ich skurczu, jak i rodzaj metabolizmu. Jest to klasyfikacja na trzy typy: włókna wolno kurczące się, odporne na zmęczenie, o metabolizmie oksydacyjnym; szybko kurczące się wrażliwe na zmęczenie, o metabolizmie glikolitycznym; szybko kurczące się odporne na zmęczenie, posiadające aktywny metabolizm zarówno oksydacyjny, jak i glikolityczny. Te trzy typy nazwane zostały różnie przez różnych autorów: SO, FG i FOG [158], I, II b, i II a [52]

lub S, FF, FR [30]. Wyróżniany jest dodatkowy czwarty typ włókien mięśniowych, pośredni pomiędzy szybkimi typami (nazwany II c lub „F Int”) [52, 182]. Istnieją też liczne formy przejściowe, tak że obecnie przyjmuje się, iż typy włókien mięśniowych tworzą kontinuum [169, 194]. Ponadto szybkość skurczu każdego włókna i jego metabolizm ulegają permanentnej modyfikacji pod wpływem czynności [74, 145, 153, 200] oraz różnych czynników, np. hormonalnych [79, 177, 222]. Jedno włókno mięśniowe często też syntetyzuje jednocześnie odmienne izomery tego samego białka, reprezentując formę przejściową lub pośrednią typów metabolicznych [42, 124, 144, 182, 224].

Zmianą częstotliwości stymulacji, unerwieniem innym nerwem (tzw. „unerwienie krzyżowe”) lub odpowiednim treningiem, można w krótkim czasie (kilka dni do kilku tygodni) uzyskać wyraźną zmianę czynności mięśnia i odpowiednią do nowej czynności zmianę właściwości elektrofizjologicznych i biochemicznych, a nawet pełną transformację typów włókien mięśniowych [10, 27, 74, 81, 90, 93, 97, 116, 123, 128, 129, 135, 159, 181, 184, 195, 196, 197, 200]. Może się przy tym zmieniać ilość włókien w mięśniu i ich średnica [90, 159] i liczba kapilarów między włóknami [96]. Zgodnie ze zmianą typu ulega przebudowie struktura włókien mięśniowych łącznie z ich aparatem skurczu [58, 97, 109, 111, 180, 181], co szerzej zostało omówione w drugiej części pracy [105]. Pojawiają się też nowe formy izomeryczne białek aparatu kurczliwego [74, 83, 96, 97, 135, 176, 195, 196, 198], zmienia się budowa, skład molekularny i czynność siateczki sarkoplazmatycznej [58, 116, 184, 196, 197, 212]. Odpowiednio do charakteru zmienionej czynności mięśnia, zmienia się w nim aktywność enzymów przemiany oksydatywnej, tłuszczowej [93, 145, 153, 159, 216] i glikolitycznej oraz zawartość glikogenu [58, 159, 216]. Zmiany przystosowawcze są odwracalne [62, 80, 118, 216].

Jak się okazało, poszczególne typy włókien mięśniowych różnie reagują na zmienione warunki. Na przykład włókna wolno kurczące się, pracujące nieustannie, są na ogół wrażliwsze niż włókna szybkie na zmiany czynności i unerwienia [43, 71, 72, 76, 101–104, 214], chociaż stwierdzano i przeciwną reakcję [66, 78]. Natomiast prawidłowy stan włókien szybkich jest bardziej zależny od działania niektórych hormonów, jak np. insuliny [151, 177] lub hormonu tarczycy [149, 222], a także od żywienia [127].

Mechanizmy przystosowawcze powodują zmiany ilościowe w białkach i organellach włókien mięśniowych, a także syntezę innych, nieobecnych uprzednio białek, wymagającą zmiany ekspresji genów [84, 181]. O regulacji tych procesów ciągle jeszcze niewiele wiemy. Niewątpliwie najbardziej istotnym czynnikiem jest rodzaj pracy włókna mięśniowego, wynikający z częstotliwości pobudzeń wysyłanych przez

neuron ruchowy [26, 30, 77, 81, 129, 216, 217]. Nie można lekceważyć wszakże i innych poza częstotliwością impulsów, wpływów, jak np. „troficznego” niezależnego od impulsów oddziaływania motoneuronu [72, 78], działania hormonów [177, 222] lub układu nerwowego sympatycznego [14], a także wpływu żywienia [127, 143], o których mało na razie wiadomo.

REGULACJA CZYNNOSCI MOTONEURONU

Jak wiadomo, czynność mięśni prążkowanych zależy od α -motoneuronów — komórek nerwowych zgrupowanych w rogach przednich rdzenia kręgowego i w jądrach pnia mózgu. Wypustka osiowa α -motoneuronu — akson jest końcową drogą, poprzez którą włókno mięśniowe otrzymuje „polecenia” z układu nerwowego [189]. „Polecenia” przychodzą jako impulsy nerwowe, powodujące depolaryzację błony i skurcz włókna mięśniowego. Ilość i częstotliwość tych impulsów determinuje charakter czynności włókna mięśniowego [26, 30, 77, 129, 217].

Ilość i częstotliwość impulsów wysyłanych przez poszczególne motoneurony jest różna, co wynika zarówno z właściwości samego motoneuronu, jak i z aktywujących oraz hamujących oddziaływań innych neuronów, których synapsy pokrywają ciało motoneuronu i jego dendryty. Pochodzenie tych synaps, ich rozmieszczenie na powierzchni motoneuronu oraz intensywność oddziaływań wiąże się z różnorodnością funkcjonalną neuronów ruchowych. Czynność α -motoneuronów jest regulowana wielopoziomowo: 1. przez korę mózgową i ponadrdzeniowe ośrodki, 2. przez afferentne pobudzenia z obwodu, 3. wewnątrzrdzeniowo, na poziomie segmentowym, 4. przez wzajemne bezpośrednie oddziaływania motoneuronów, dzięki wewnątrzrdzeniowym odgałęzieniom ich aksonów — tzw. oddziaływanie zwrotne, 5. oddziaływania ze strony włókien mięśniowych unerwianych przez motoneuron [29, 31, 47, 99, 199, 207].

Włókna mięśniowe unerwiane przez odgałęzienie końcowe aksonu jednego motoneuronu tworzą wraz z nim zespół funkcjonalny nazwany jednostką motoryczną [189]. Wszystkie włókna mięśniowe jednostki motorycznej, których liczba w zależności od mięśnia waha się od kilku do kilku tysięcy [16], kurczą się równocześnie i z taką samą szybkością oraz mają taki sam profil histochemiczny [30, 52, 57, 123]. Wszystkie one oddziałują też jednakowo na zmiany czynności motoneuronu [123]. Pojedyncze włókno normalnego mięśnia ssaków nigdy nie kurczy się indywidualnie [15]. Poszczególne włókna mięśniowe jednostki motorycznej nie leżą obok siebie, lecz są rozmieszczone pojedynczo, obejmując zwykle znaczną część mięśnia [57, 123]. Sąsiadujące włókna są często różnych

typów, co daje znany obraz „mozaiki” w profilu histochemicznym mięśnia.

α -motoneurony jednego mięśnia szkieletowego (tzw. pula α -motoneuronów) zgrupowane są w rogach przednich rdzenia w postaci kolumn, obejmujących jeden lub więcej segmentów rdzeniowych [53, 171]. Przeplatają się one z α -motoneuronami innych mięśni oraz z innymi komórkami nerwowymi, jak np. γ -motoneurony czy komórki wstawkowe [53, 122, 166].

Każdy α -motoneuron otrzymuje bezpośrednio (monosynaptycznie) pobudzenia z ruchowej części kory mózgowej, z okolicy reprezentacji dla ruchu zasadniczego jego mięśnia oraz często z okolic reprezentacji innych ruchów, w których mięsień działa jako synergista [108]. α -motoneurony mają ponadto monosynaptyczne połączenia, o nie wyjaśnionej jeszcze roli, z innymi niż ruchowe polami kory mózgowej [100, 108]. Równoległe z bezpośrednimi połączeniami α -motoneurony mają połączenia wielosynaptyczne z korą mózgową, jak również z jądrami podkorowymi i mózdzkiem [100]. Najważniejsze są drogi z jądra czerwonego, z jądra przedśionkowego i z tworu siateczkowatego [29, 98, 146]. Znaczenie tych dróg nie jest jeszcze w pełni znane. Z obserwacji skutków patologicznego czy też eksperymentalnego uszkodzenia tych szlaków wiadomo, że ich prawidłowość jest konieczna dla utrzymania właściwego napięcia mięśni, dla koordynacji ruchów i przeciwdziałania sile grawitacji oraz inercji [91, 100]. Jak wiadomo, mięśnie zachowują pewien stały stan napięcia. W czasie ruchu napięcie to ulega zmianie, a właściwy jego rozkład jest warunkiem, by ruch został wykonany prawidłowo [100]. Pobudzając różne części centralnego układu nerwowego, a przede wszystkim poszczególne ośrodki mózdkowe [2, 121], można uzyskać odmienne zmiany napięcia różnych grup mięśni lub przeciwnie tego samego mięśnia [54, 98, 146, 192]. Efekt ten utrzymuje się jeszcze przez pewien czas po zaprzestaniu działania bodźca centralnego [146].

Znaczna część impulsów pochodzenia centralnego i obwodowego dociera do α -motoneuronów za pośrednictwem znajdujących się w ich sąsiedztwie komórek wstawkowych [54, 192]: komórek wstawkowych hamujących i aktywujących systemu afferentnego [98, 107] oraz hamujących komórek wstawkowych Renshawa [178]. Komórki Renshawa, których jest co najmniej dwa rodzaje [41], hamują motoneurony, komórki wstawkowe systemu afferentnego oraz inne komórki Renshawa. Czynność komórek Renshawa uzależniona jest od ośrodków ponadrdzeniowych, w szczególności od istoty siatkowatej, oraz od neuronów systemu afferentnego i od wewnątrzrdzeniowych odgałęzień aksonów α -motoneuronów [99, 166, 178, 179, 192].

Napięcie mięśniowe jest zjawiskiem bardzo złożonym i nie w pełni

jeszcze poznany [89]; zależy ono od odruchów rozciągowych (proprio-receptywnych) z tego samego mięśnia i z innych grup mięśni oraz od odruchów skórnych [18, 95, 117, 192]. Odruchy te z mięśnia uruchamiane są przez pobudzenie wrażliwych na rozciąganie receptorów umiejscowionych we wrzecionach mięśniowych (podłużnego kształtu strukturach, znajdujących się pomiędzy włóknami mięśniowymi [133]). Pobudzenie receptorów wrzecion powoduje aktywację α -motoneuronów drogą monosynaptycznego odruchu, jak też hamowanie lub aktywację innych α -motoneuronów za pośrednictwem interneuronów rdzenia [29, 98, 117, 187]. Pobudliwość receptorów wrzecion regulowana jest przez wewnątrzwrzecionowe włókna mięśniowe utrzymujące odpowiedni stopień naciągnięcia wrzecion. Włókna wewnątrzwrzecionowe unerwiane są przez małe komórki ruchowe rogów przednich rdzenia — γ -motoneurony, otrzymujące pobudzenie z kory i pnia mózgu równocześnie z α -motoneuronami [98]. Wyróżnia się 2 typy γ -motoneuronów: „dynamiczne” i „statyczne”. Unerwiają one odpowiednio, zróżnicowane włókna wewnątrzwrzecionowe „dynamiczne” oraz 2 typy „statycznych” [2, 6, 17, 22, 106, 121, 133, 193]. Pobudzenie γ -motoneuronów „dynamicznych” powoduje wzmożenie, a pobudzenie γ -motoneuronów „statycznych” hamowanie impulsacji z receptorów wrzecion, oddziałuje więc odpowiednio pobudzająco bądź hamująco na czynność α -motoneuronów [39]. γ -motoneurony „dynamiczne” i „statyczne” posiadają odrębne centra dyspozycyjne i odrębne drogi doprowadzające z mózdzku do rdzenia [2, 32, 121]. Znaczny procent włókien wewnątrzwrzecionowych (głównie „dynamicznych”) jest unerwiony ruchowo przez odgałęzienia aksonów motoneuronów unerwiających normalne włókna mięśniowe. Są to tzw. β -motoneurony, które, jak ostatnio wykazano, występują powszechnie również w mięśniach ssaków, w tym i naczelnych [22, 32, 106, 122, 148]. System afferentny wrzecion tworzy z motoneuronami własnego segmentu rdzenia samoregulujący się układ [29, 98, 107, 117, 178, 187, 188, 192].

Włókna afferentne mają różną średnicę (od dziesiątych części do kilkunastu mikrometrów) i odpowiednio różną szybkość przewodzenia (od około 0,5 do 125 m/s), jak też bardzo różny jest próg pobudliwości ich receptorów [100, 134, 168, 206, 207]. Zależnie od właściwości podzielone zostały umownie na cztery grupy. Do pierwszej zalicza się włókna najgrubsze, najszybciej przewodzące i o receptorach najbardziej pobudliwych. Unerwienie czuciowe wrzecion należy do najbardziej reaktywnej grupy (Ia) oraz do grupy II. Obie grupy stanowią morfologiczne i czynnościowe continuum. Receptory obu grup znajdują się we wszystkich trzech rodzajach włókien wewnątrzwrzecionowych, z pewną preferencją receptorów grupy Ia do włókien typu „dynamicznego”, a grupy II do typu „statycznego” [8, 32, 206]. Włókna afferentne grupy Ia dają

więcej niż włókna grupy II rozgałęzień wewnątrzrdzeniowych i mają większy zakres oddziaływań [117, 134, 141, 147].

Inną częścią obwodowego systemu regulującego napięcie mięśni są receptory znajdujące się w organach Golgiego ścięgien, zaliczane do grupy Ib [95, 205]. Pobudzenie tych receptorów, następujące w wyniku ich naciągania, powoduje hamowanie α -motoneuronów własnego mięśnia na drodze dwusynaptycznego odruchu [18, 95]. Organy Golgiego występują często w morfologicznym połączeniu z wrzecionami [133]. Liczba i rozmieszczenie przestrzenne w mięśniu receptorów grupy Ia i Ib są zwykle podobne [69, 133, 205]; dostarczają one informacji o położeniu oraz ruchach mięśni i stawów [5]. Ilość, rozmieszczenie oraz właściwości tych receptorów są bardzo różne w poszczególnych mięśniach, a ich czynność, będąca ciągle jeszcze w sferze hipotez, jest ściśle współzależna z umiejscowieniem w mięśniu, oraz z aktualnym stanem rozciągnięcia mięśnia [1, 6, 17, 69, 133, 142, 178]. Zmiana impulsacji afferentnej może prawdopodobnie spowodować transformację typu włókien mięśniowych, jak to obserwowano w mięśniu po tenotomii [87].

Oprócz szybko przewodzących, zmielinizowanych włókien afferentnych grupy I i II, z mięśnia do rdzenia podążają liczne zmielinizowane i niezmielinizowane włókna, odpowiednio wolniej przewodzące i o mniejszej średnicy [207]. Należą do nich włókna o receptorach wrażliwych na bodźce mechaniczne, chemiczne i cieplne [125] oraz włókna grupy III i IV, o receptorach umiejscowionych w naczyniach, wrażliwych na bodźce chemiczne. Pobudzenie tych ostatnich zwiększa efektywność innych bodźców afferentnych [119, 120]. Oddziaływanie na α -motoneuron wszystkich przedstawionych dróg afferentnych, jak też odruchów z receptorów skórnych, jest zgodne i zachodzi poprzez wspólne interneurony [119, 120, 206]. W ostatnich latach udowodniono również obecność unerwienia autonomicznego włókien mięśniowych i wrzecion. Wpływa ono na impulsację afferentną z wrzecion oraz przypuszczalnie reguluje odporność na zmęczenie włókien mięśniowych [7, 14, 156].

Dzięki skoordynowanym działaniom wielopoziomowego systemu kontroli ruchu, następują odpowiednie zmiany napięcia mięśni działających synergistycznie i antagonistycznie, co umożliwia skuteczność i płynność ruchów [29, 45, 49]. Koordynacja ruchów częściowo zachodzi już na poziomie rdzenia. Jak wykazały prace eksperymentalne, komórki Renshawa i interneurony systemu afferentnego tworzą wspólny hamująco-aktywujący układ, którego ośrodki dyspozycyjne umiejscowione są w rdzeniu kręgowym [188]. W czasie wykonywania rytmicznych ruchów, np. w czasie chodzenia, ma miejsce cykliczna fluktuacja obniżonej i wzmożonej pobudliwości całych grup interneuronów, oddziałujących odpowiednio na α -motoneurony, co powoduje naprzemienne zmiany napięcia

synergistycznie i antagonistycznie działających mięśni. Impulsy pochodzenia ponadrdzeniowego [98, 188] oraz afferentne, a także z innych części rdzenia (ipsi- i kontralateralne) [49, 119, 120, 188, 206] docierają do motoneuronu przez ten sam układ interneuronów, ulegają w nim podobnej korekcji. Pobudzenia różnego pochodzenia powodują zatem podobną reakcję α -motoneuronu (a raczej puli motoneuronów). Z drugiej strony, bodźce z tego samego źródła oddziałują odmiennie na tę samą pulę neuronów, w zależności od tego czy trafią na fazę jej pobudzenia, czy też zahamowania [187, 188]. Różnie też oddziałują bodźce z tego samego źródła na neurony wstawkowe należące do puli zginaczy i prostowników [54, 98, 99]. Stopień pobudzenia czy hamowania całego tego układu jest przypuszczalnie pod kontrolą tworów siatkowatego pnia mózgu [146].

Na stan motoneuronu wpływa też unerwiany przez ten motoneuron mięsień [19]. W motoneuronie pozbawionym kontaktu z mięśniem (np. po przecięciu aksonu) zmniejsza się perikarion, jak też ilość, wielkość i stopień rozgałęzienia dendrytów [199, 204] oraz rozwija się w nim szereg zmian, np. chromatoliza czy dezintegracja neurofibryli [20, 34]. Równocześnie zmieniają się właściwości fizjologiczne motoneuronu i wzrasta pobudliwość jego błony [55] oraz następuje wzrost syntezy białka i regeneracja aksonu [3, 20]. Po ponownym uzyskaniu kontaktu z mięśniem (po reinnerwacji) wraca do normy czynność i struktura motoneuronu oraz ilość i wielkość dendrytów [20, 70, 199]. Jak się uważa, dendryty podlegają fizjologicznemu cyklicznemu zmniejszeniu, a następnie regeneracji; odnerwienie jak i reinnerwacja włókien mięśniowych są sygnałem pobudzającym te procesy [204]. Fluktuacja wielkości i rozgałęzień dendrytów wiąże się przypuszczalnie z przekazywaniem informacji i z wytwarzaniem najkorzystniejszych funkcjonalnie połączeń z innymi neuronami, a także dowodzi plastyczności tych połączeń [199, 204].

System kontroli ruchu u wyższych kręgowców jest obecnie przedmiotem intensywnych badań w wielu pracowniach. Przedstawiany jego, bardzo jeszcze niekompletny, obraz ukazuje jak wiele różnych oddziaływań decyduje o funkcji α -motoneuronu.

TYPY JEDNOSTEK MOTORYCZNYCH

Przyczyną różnic pomiędzy α -motoneuronami jest odmiennosc przedstawionych w poprzednim rozdziale oddziaływań, jak też różnorodność cech morfologicznych samych motoneuronów [29, 64]. Wyróżnia się 3 lub 4 typy motoneuronów: S, FR, FF oraz F-Int, odpowiednio do znanych typów włókien mięśniowych, z którymi motoneurony te tworzą typy jednostek motorycznych [30, 31, 223].

Poszczególne morfologiczne oraz fizjologiczne właściwości α -motoneuronów zmieniają się ilościowo w zależności od typu jednostki motorycznej, tworząc continuum, od jednostek S poprzez FR do FF. Układają się one w zespoły charakterystyczne dla każdego z typów motoneuronów. Od jednostek wolnych ku szybkim wzrasta: siła i maksymalny zakres skurczu [28, 31, 53, 140, 223], liczba włókien mięśniowych w jednostce motorycznej [53, 140], wielkość ciała motoneuronu i średnica aksonu [40, 85, 86], liczba wewnątrzrdzeniowych rozgałęzień aksonu do komórek Renshawa oraz do sąsiadujących α -motoneuronów [40, 179], pobudliwość progowa motoneuronu [85, 86], częstotliwość wysyłanych impulsów [28, 140, 223], szybkość przewodzenia impulsów przez akson [28, 30, 31, 91, 140, 223] oraz zależność α -motoneuronu od układów torujących ponadrdzeniowych [29] (ryc. 1). W odwrotnym porządku, tzn. od szybkich jednostek ku wolnym, zwiększa się: odporność na zmęczenie

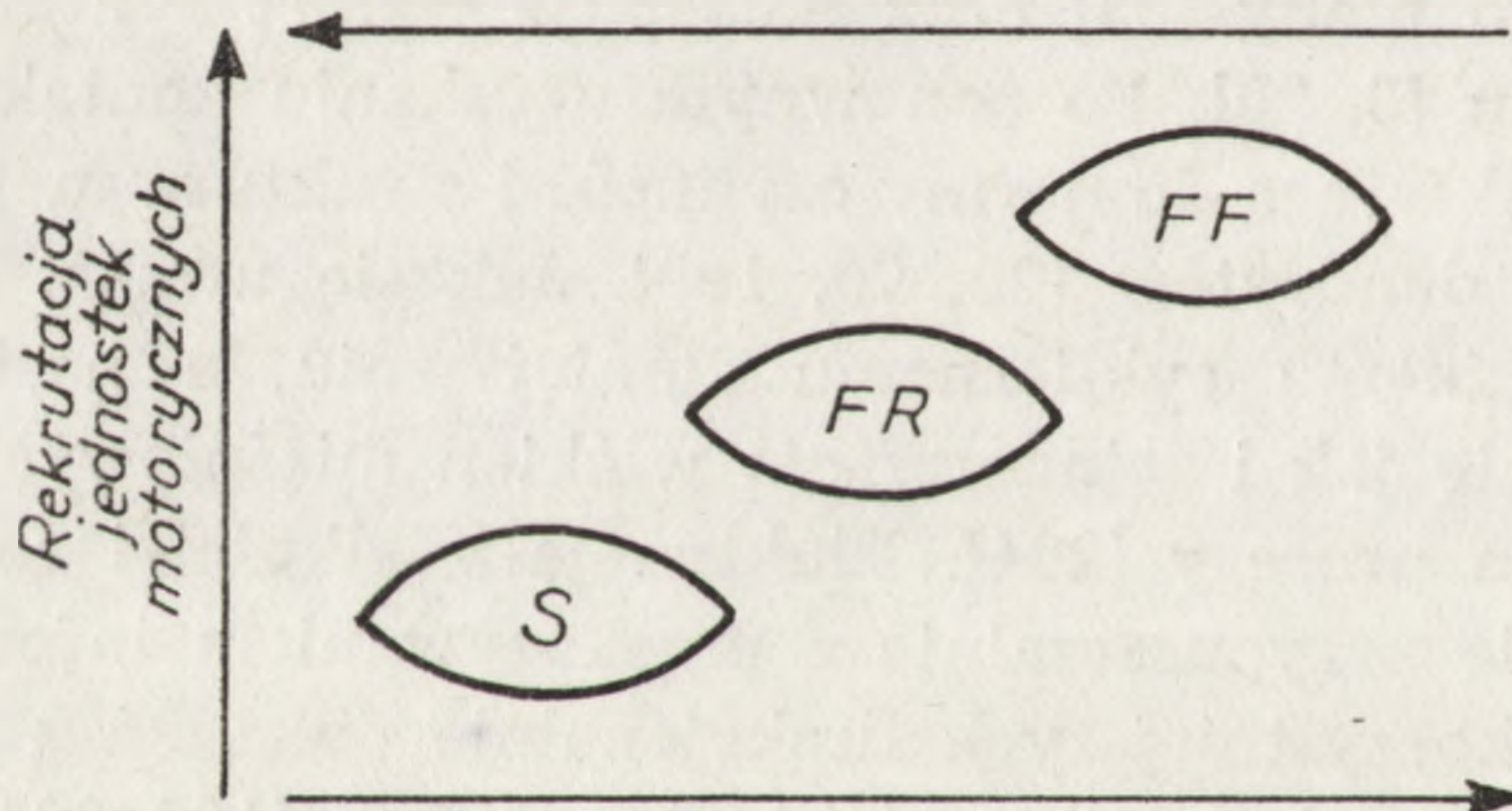
Odporność motoneuronu na zmęczenie. (Zmniejszenie częstotliwości impulsów po 60 s czynności o: 5% (S) i 50% (FF) [115]).

Odporność włókien mięśniowych na zmęczenie (pierwsze objawy zmęczenia po: 0,5 min. (FF) — 60 min. (S), [30]).

Zależność od systemu afferentnego (pobudzeniowy potencjał postsynaptyczny: 4,5-9,1 mV, [31]).

Zależność od hamującego systemu komórek Renshawa.

Zależność od układu hamującego ponadrdzeniowego jądra czerwonego.



Szybkość skurczu (20-100 msec, [28]).

Siła skurczu (0,6-3,5 kg/cm², [53]).

Zakres skurczu całego mięśnia w którym uczestniczą jednostki poszczególnych typów (S: 0-20%, FR: 0-50%, FF: 20-100% [31]).

Ilość włókien mięśniowych w jednostce motorycznej (180-328, [53]).

Wielkość ciała motoneuronu.

Średnica aksonu (9-20/μm, [85]).

Liczba odgałęzień aksonu wewnątrz rdzenia (28-98, [40]).

Pobudliwość progowa motoneuronu (reobaza: 5-20 nA, [207]).

Częstotliwość impulsacji (25-85 s [28]).

Szybkość przewodzenia aksonu (57-108 m/s [223]).

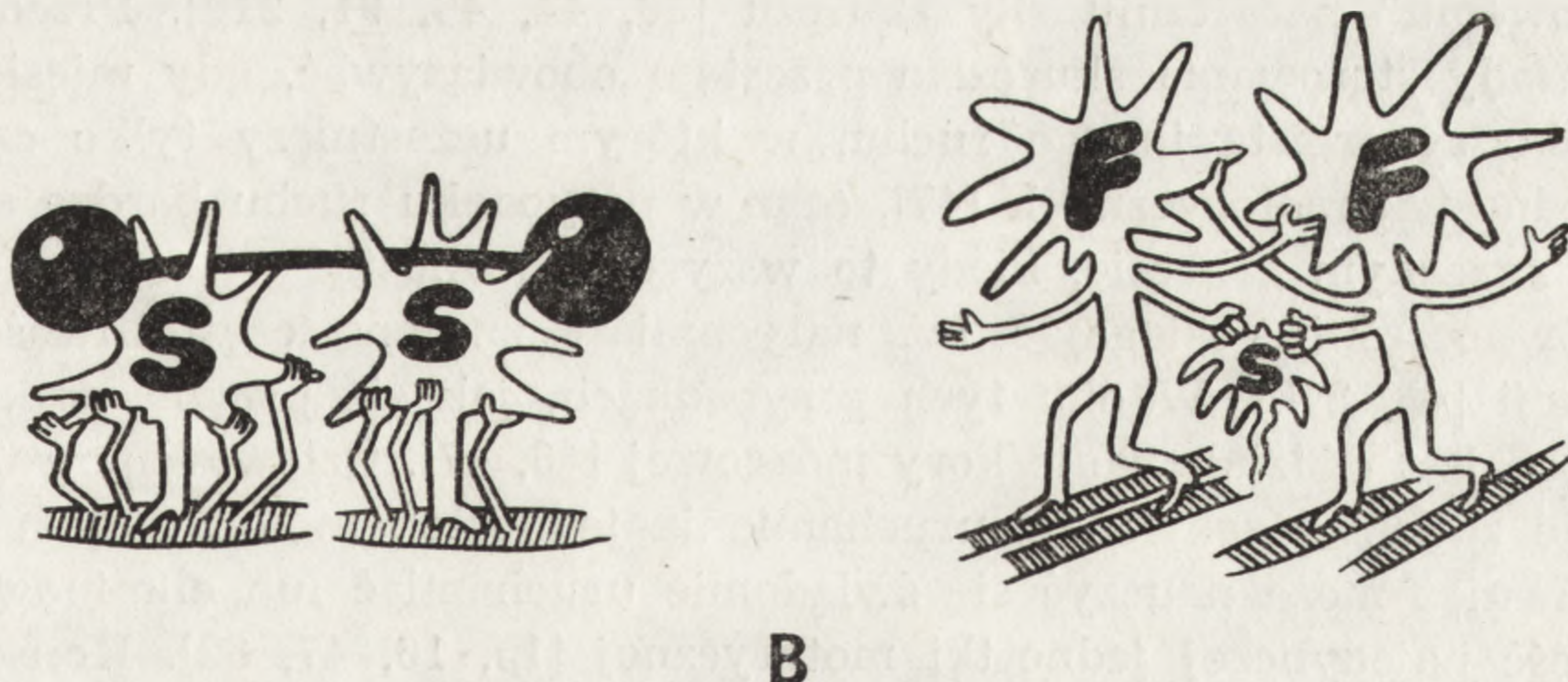
Zależność od układu aktywującego ponadrdzeniowego (jądra czerwonego).

Ryc. 1. Zmienność poszczególnych cech motoneuronu w zależności od typu jednostki motorycznej

Strzałki oznaczają kierunek zwiększania się wartości bezwzględnych. Jednostki motoryczne: S — wolne, FR — szybkie, odporne na zmęczenie, FF — szybkie, podatne na zmęczenie. W nawiasach przykładowe wartości dla jednostek typu S i FF oraz praca, z której są cytowane

motoneuronu [115] i włókien mięśniowych [30, 57], zależność motoneuronu od układów zwrotnych i afferentnych, zarówno pobudzających jak i hamujących [29, 31, 53, 179], i od układu komórek Renshawa [29, 31, 179] (ryc. 1).

Funkcja jednostek motorycznych poszczególnych typów jest ściśle współzależna z ich właściwościami. Jednostki motoryczne szybkie, typu FF, używane są najrzadziej i tylko w czasie wykonywania ruchów o znacznym zakresie i dużej sile (np. skok) [31, 218]. Podlegają one w znacznym stopniu ponadrdzeniowemu systemowi aktywacji, a o wiele mniej aktywacji i hamowaniu przez system afferentny [29]. Synergistycznie działające α -motoneurony szybkie pobudzają się wzajemnie poprzez wewnątrzrdzeniowe rozgałęzienia aksonów [40], równocześnie hamują za pośrednictwem interneuronów, wolne, działające tonicznie α -motoneurony oraz γ -motoneurony [60], same nie podlegają temu hamowaniu [40, 179]. Analogicznie, aktywująco na motoneurony szybkie, a hamująco na wolne działają impulsy ponadrdzeniowe (z jądra czerwonego) [29], oraz pobudzenia korowe do neuronów szybkich, którym towarzyszy, a nawet je wyprzedza, obniżenie napięcia mięśniowego [46]. Wszystkie te mechanizmy wzmagają czynność fazową i powodują, że w czasie szybkiego ruchu hamowane jest napięcie toniczne mogące utrudniać ten ruch [40, 179]. W przeciwieństwie do jednostek motorycznych szybkich, jednostki wolne, odporne na zmęczenie typu S, są używane najczęściej; pracują one tonicznie [85, 218]. Jednostki te pełnią funkcję posturalną oraz uczestniczą w ruchach o małym zakresie i małej sile (np. stanie czy chodzenie [31, 218]). Będąc same pod silną kontrolą odruchów afferentnych [29, 179], równocześnie pobudzają te odruchy [106, 148]. Motoneurony wolne podlegają układom zwrotnym, same wykazując nieznaczne jedynie oddziaływanie zwrotne [40]. Jednostki szybkie typu FR i F-Int posiadają



Ryc. 2. Schematycznie przedstawione różnice działania motoneuronów; wolnych (S) — A i szybkich (F) — B

właściwości i pełnią funkcje pośrednie [29, 31, 218]. Schemat różnic działania jednostek motorycznych szybkich i wolnych przedstawia ryc. 2.

Przedstawione zasady działania motoneuronów nie zawsze obowiązują. W szczególnych przypadkach, np. przy potrzebie ruchu o znacznym zakresie i dużej sile, jednostki wszystkich typów kurczą się fazowo, z podobną szybkością, a siła tej samej jednostki w czasie skurczu fazowego jest większa niż w czasie skurczu tonicznego [36, 46, 218], wzrasta równocześnie koszt energetyczny jej pracy [12]. Obecnie uważa się, że w mięśniach prążkowanych wyższych kręgowców nie można wyróżniać włókien mięśniowych fazowych i tonicznych, ponieważ każde włókno jest zdolne do różnorodnej pracy [36, 44, 53, 85]. Ustrój do wykonania określonej czynności uruchamia takie i tyle włókien mięśniowych, jak również „poleca” im taki rodzaj pracy, jaki jest potrzebny [16]. O charakterze czynności poszczególnych α -motoneuronu decydują ośrodki ponadrdzeniowe [64, 91].

Narastanie siły i szybkości skurczu zależy od ilości i szybkości włączania się kolejnych jednostek motorycznych (zwanej rekrutacją) oraz od częstotliwości impulsów wysyłanych przez każdy α -motoneuron do włókien mięśniowych [36, 44, 45, 91, 207]. Rekrutacja przebiega według stałej dla danego mięśnia sekwencji: od najwolniejszych (małych) jednostek motorycznych do najszybszych (największych) [85, 86]. Gdy czynność mięśnia ustaje, sekwencja ta odwraca się, tzn. najpierw zaprzestają działania te jednostki, które najpóźniej zaczęły [44, 85, 91]. Częstotliwość impulsacji motoneuronu narasta zwykle stopniowo po rozpoczęciu jego czynności [36]. Regulacja siły i płynności ruchu następuje poprzez sterowanie zarówno rekrutacją, jak i impulsacją motoneuronów. Druga droga służy do osiągnięcia maksymalnej siły skurczu oraz jest bardzo użyteczna w mięśniach małych wykonujących precyzyjne ruchy, a posiadających małą liczbę jednostek motorycznych, zapobiega bowiem „skokowemu” narastaniu siły skurczu [36, 44, 46, 91, 210]. Przedstawione zasady sterowania skurczem przestają obowiązywać, gdy mięsień działa jako synergista innego ruchu, w którym uczestniczy tylko część jego jednostek motorycznych [47], oraz w przypadku ruchu bardzo szybkiego o znacznym zakresie, kiedy to wszystkie jednostki włączają się prawie równocześnie, osiągając też natychmiast znaczną częstotliwość impulsacji [46, 210]. W obu tych przypadkach, jak się przypuszcza, decydujące jest oddziaływanie kory mózgowej [46, 47]. Człowiek potrafi dowolnie zmieniać sekwencję uruchamiania jednostek motorycznych [47], jak również może nauczyć się świadomie uruchamiać lub eliminować czynność pojedynczej jednostki motorycznej [15, 16, 47, 82]. Konsekwencją tego jest zmiana uprzedniej działalności motoneuronu, co musi pociągać za sobą odpowiednie zmiany przystosowawcze motoneuronu i całej jed-

nostki motorycznej. Toteż w zależności od rodzaju czynności występują dość znaczne różnice pomiędzy motoneuronami tego samego mięśnia u poszczególnych osób [44, 45]. Do jakiego stopnia możliwa jest zmiana funkcji i struktury dojrzałego motoneuronu pozostaje na razie sprawą otwartą. Wiadomo, że w czasie rozwoju osobniczego jednostka motoryczna może zmieniać typ [124]. Trudno jednak orzec, gdzie jest granica między uwarunkowaniami genetycznymi czy wpływami hormonów a skutkami zmiany czynności.

POŁĄCZENIE NERWU Z MIĘŚNIEM

Motoneuron oddziałuje na włókno mięśniowe w dwojaki sposób: poprzez przesyłanie impulsów, powodujących depolaryzację błony włókna i jego skurczu (omówione uprzednio), oraz za pośrednictwem substancji przenikających z aksonu [59, 72, 75, 78, 138, 164, 185, 225]. W obu przypadkach zasadnicze znaczenie ma synapsa nerwowo-mięśniowa. Synapsa ma odmienną budowę w zależności od typu jednostki motorycznej, zgodnie z przystosowaniem do specyfiki pracy tej jednostki [170]. W jednostkach motorycznych szybkich wykształcają się większe synapsy niż w wolnych. Posiadają one też większe i liczniejsze fałdy synaptyczne, większą ilość pęcherzyków synaptycznych [155] oraz inne rozmieszczenie i inne formy i izomeryczne esterazy acetylocholinowej [4]. Różnicom synaps towarzyszą inne właściwości elektrofizjologiczne i biochemiczne błony komórkowej włókien różnych typów [28, 33, 81].

Połączenie motoneuronu z włóknem mięśniowym jest strukturą dynamiczną. Zakończenie aksonu w mięśniu kręgowców ulega permanentnej cyklicznej regresji i regeneracji oraz ciągłemu modelowaniu, a wytwarzanie odgałęzień końcowych przez akson jest jego fizjologiczną reakcją na różnorodne bodźce. Sama synapsa również ulega ciągłemu remodelowaniu [13, 21, 157, 163, 170, 191, 220, 221]. W trakcie tych procesów włókno mięśniowe może zostać odnerwione. Ulega ono wówczas, w ciągu paru dni do paru tygodni, reinnerwacji przez zakończeniu własnego lub innego aksonu [56, 92]. Bywa też, że unerwione włókno mięśniowe przyjmuje zakończenie obcego aksonu, stając się okresowo unerwione przez dwa motoneurony. Jedno z tych zakończeń ulega zwykle supresji i z czasem zanika [21]. W dojrzałym mięśniu ssaków najwyżej kilka procent włókien może mieć podwójne unerwienie [72]. Jak się przypuszcza, motoneurony intensywnie działające wykazują większą zdolność do unerwienia włókien mięśniowych niż motoneurony pracujące mniej. Ma więc miejsce niejako konkurencja motoneuronów o włókno mięśniowe [21, 191]. Z drugiej strony, nie pracujące lub odnerwione włókno mięśniowe posiada zdolność wytwarzania nowej synapsy poza

odrębem istniejącej i bardzo długo jest zdolne do przyjęcia nerwu [13, 61, 76, 157], wydziela ono także czynnik stymulujący akson do tworzenia nowych końcowych odgałęzień [25, 94, 161, 191]. „Sygnały” dla tworzenia końcowych odgałęzień aksonu pochodzą też z motoneuronu, a także mogą być przekazywane pomiędzy neuronami, np. do mięśnia kontralateralnego [174]. Wszystkie wymienione mechanizmy bardzo silnie oddziałują w kierunku ochrony włókna mięśniowego przed brakiem unerwienia [163] oraz sprzyjają powiększaniu się jednych jednostek motorycznych kosztem innych. Jak wskazują wyniki prac eksperymentalnych oraz obserwacje pacjentów cierpiących na przewlekłe odnerwienne schorzenia mięśni, motoneurony mogą zwiększać ilość unerwianych przez siebie włókien mięśniowych 10-krotnie, a w wyjątkowych przypadkach nawet 30-krotnie [56, 139, 163, 211]. Taka plastyczność motoneuronów umożliwia kompensację uszkodzeń patologicznych [139] oraz przypuszczalnie ułatwia adaptację funkcjonalną tak fizjologiczną, jak i wymuszoną treningiem. Włókno mięśniowe, w przypadku podwójnego unerwienia lub przejścia do innej jednostki motorycznej, musi ulec odpowiednim zmianom dla przystosowania się do nowych warunków czynności.

Jak wiadomo, wzdłuż aksonu odbywa się stały przepływ aksoplazmy powodujący transport molekuł i organelli. Jest to proces bardzo dynamiczny, mający zasadnicze znaczenie dla funkcji motoneuronu. Transport od ciała motoneuronu ku zakończeniu aksonu zachodzi z szybkością jeden do kilkunastu milimetrów na dobę, tzw. transport wolny, lub z szybkością 100 do kilkuset milimetrów na dobę, tzw. transport szybki [88, 131, 213]. Niektóre substancje oraz niektóre rodzaje organelli mogą być transportowane z różną szybkością, inne podlegają tylko jednemu rodzajowi transportu. Do tych ostatnich należą białka szkieletowe: aktyna, tubulina oraz białka neurofilamentów, które są transportowane wolno [63]. Mechanizmy transportu aksonalnego nie są jeszcze jasne. Wiadomo, że zasadnicze znaczenie dla tego transportu mają mikrotubule [23] oraz że jest to proces zależny od obecności jonów wapnia i kalmoduliny, a także od dopływu energii [150]. Szybki transport uzależniony jest też przypuszczalnie od obecności aktyny [68]. Znaczna część (50–70%) transportowanych substancji, po osiągnięciu końca aksonu, ulega transportowi z powrotem do ciała motoneuronu. Jest to tzw. powrotny transport aksonalny [19]. Dzięki transportowi aksonalnemu wzdłuż aksonu przenoszone są w obu kierunkach substancje czynne, utrzymujące prawidłowy stan aksonu oraz warunkujące jego regenerację w razie uszkodzenia [41, 132, 162, 167]. Drogą transportu zwrotnego motoneuron otrzymuje „informacje” z obwodu, a także przypuszczalnie włókno mięśniowe może oddziaływać na motoneuron [19].

Substancje znajdujące się w zakończeniu aksonu, syntetyzowane na

miejscu lub dzięki transportowi aksonalnemu przenoszone z ciała motoneuronu, mogą przedostawać się do włókna mięśniowego [126, 136, 137, 138]. Zjawisko to znane jest od dawna jako „troficzne oddziaływanie nerwu” [72, 78]. Substancje przedostające się przez zakończenie aksonu do mięśnia wpływają na jego metabolizm oraz na szereg właściwości elektrofizjologicznych i biochemicznych błon włókien mięśniowych [75, 138, 225, 226]. Już samo wydzielanie acetylocholinę częściowo reprezentuje „troficzny wpływ nerwu”, regulując spoczynkowy potencjał membranowy i rozmieszczenie pozasynaptyczne receptora acetylocholinowego [50]. Niektóre z wydzielanych przez zakończenie aksonu mediatorów zostały już zidentyfikowane, jak np. alkaliczne białko o ciężarze 34 000 daltonów, zwiększające aktywność podjednostki 16 S esterazy acetylocholinowej [126], czy też sciatyna — glikoproteid znaleziony w nerwach ptasich, regulujący różnicowanie się i dojrzewanie włókien mięśniowych [137, 138].

Bogaty wachlarz możliwości czynnościowych motoneuronów, oraz znaczna plastyczność połączenia motoneuronu z mięśniem ukazują przyczyny wielkiej różnorodności i zmienności włókien mięśniowych, jak też częstego braku wyraźnej granicy pomiędzy poszczególnymi ich typami. Z drugiej strony uzasadniają fizjologiczną konieczność plastyczności tkanki mięśniowej.

PODZIĘKOWANIE

Składam serdeczne podziękowanie docentowi Romanowi Duszkowi za wykonanie ilustracji oraz pani Hannie Chomontowskiej za pomoc w przygotowaniu tego artykułu do druku.

LITERATURA

- [1] ABRAHAM V. C., Comment: Unresolved questions concerning muscle afferents, *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, **59**: 656–659, 1981.
- [2] APPELBERG B., EMONET-DENAND F., Central control of static and dynamic sensitivities of muscle spindle primary endings, *Acta. Physiol. Scand.*, **63**: 487–494, 1965.
- [3] AUSTIN L., LANGFORD C. J., Nerve regeneration: a biochemical view, *Trends Neurosci.*, **3**: 130–132, 1980.
- [4] BACOU F., VIGNERON P., MASSOULIÉ J., Acetylcholinesterase forms in fast and slow rabbit muscle, *Nature*, **296**: 661–664, 1982.
- [5] BAKKER D. A., RICHMOND F. J. R., Distribution of receptors around neck vertebrae in the cat, *J. Physiol.*, **298**: 40P–41P, 1980.
- [6] BAKKER G. J., RICHMOND F. J. R., Two types of muscle spindles in cat neck muscle: a histochemical study of intrafusal fiber composition, *J. Neurophysiol.*, **45**: 973–986, 1981.

- [7] BALLARD K. J., Typical sympathetic noradrenergic endings in a muscle spindle of the cat, *J. Physiol.*, **285**: 61P, 1978.
- [8] BANKS R. W., BARKER D., STACEY M. J., Form and distribution of sensory terminals in cat hindlimb muscle spindles, *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B.*, **299**: 329-364, 1982.
- [9] BÁRÁNY M., ATPase activity of myosin correlated with speed of muscle shortening, *J. Gen. Physiol.*, **50**: 197-218, 1967.
- [10] BÁRÁNY M., CLOSE R. I., The transformation of myosin in cross-innervated rat muscles, *J. Physiol.*, **213**: 455-474, 1971.
- [11] BARCHMAN D., SIMON R., BICKNELL-BROWN E., Variation in the lipid composition of rabbit muscle sarcoplasmic reticulum membrane with muscle type, *J. Biol. Chem.*, **257**: 14136-14139, 1982.
- [12] BARCLAY J. K., Energetics of mammalian fast and slow twitch muscles, *Fed. Proc.*, **41**: 189-191, 1982.
- [13] BARKER D., IP. M. C., Sprouting and degeneration of mammalian motor axons in normal and de-afferentated skeletal muscle, *Proc. Roy. Soc. Lond. B.*, **993**: 538-554, 1966.
- [14] BARKER D., SAITO M., Autonomic innervation of receptors and muscle fibers in cat skeletal muscle, *Proc. Roy. Soc. Lond. B.*, **212**: 317-332, 1981.
- [15] BASMAJIAN J. V., Control and training of individual motor units, *Science*, **141**: 440-441, 1963.
- [16] BASMAJIAN J. V., Electromyography comes of age, *Science*, **176**: 603-609, 1972.
- [17] BINDER M. D., STUART D. G., Responses of Ia and spindle group II afferents to single motor-unit contractions *J. Neurophysiol.*, **43**: 621-629, 1980.
- [18] BINDER M. D., Further evidence that the Golgi tendon organ monitors the activity of a discrete set of motor units within a muscle, *Exp. Brain Res.*, **43**: 186-192, 1981.
- [19] BISBY M. A., Functions of retrograde axonal transport, *Fed. Proc.*, **41**: 2307-2311, 1982.
- [20] BISBY M. A., Changes in fast-transported protein in regenerating axons: essential or incidental?, [w] *Axoplasmic transport in physiology and pathology*, red. Weiss D. G., Gorio A., Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg, 1982, 70-76.
- [21] BIXBY J. L., VAN ESSEN D. C., Competition between foreing and original nerves in adult mammalian skeletal muscle, *Nature*, **282**: 726-728, 1979.
- [22] BOYD I. A., GLADDEN M. H., McWILLIAM P. N., WARD J., Control of dynamic and static nuclear bag fibres and nuclear chain fibres by gamma and beta axons in isolated cat muscle spindles, *J. Physiol.*, **265**: 133-162, 1977.
- [23] BRIMIJOIN S., Microtubules and the capacity of the system for rapid axonal transport, *Fed. Proc.*, **41**: 2312-2316, 1982.
- [24] BRONSON D. D., SCHACHAT F. H., Heterogeneity of contractile proteins. Differences in tropomyosin in fast, mixed and slow skeletal muscles of the rabbit, *J. Biol. Chem.*, **257**: 3937-3944, 1982.
- [25] BROWN M. C., HOLLAND R. L., A central role for denervated tissues in causing nerve sprouting, *Nature*, **282**: 724-726, 1979.
- [26] BULLER A. J., ECCLES J. C., ECCLES R. M., Differentiation of fast and slow muscles in the cat hind limb, *J. Physiol.*, **150**: 399-416, 1960.
- [27] BULLER A. J., MOMMAERTS W. F. H. M., SERAYDARIAN K., Enzymic

- properties of myosin in fast and slow twitch muscles of the cat following cross-innervation, *J. Physiol.*, **205**: 581-597, 1969.
- [28] BURKE R. E., Motor unit types of cat triceps surae muscle, *J. Physiol.*, **193**: 141-160, 1967.
- [29] BURKE R. E., JANKOWSKA E., BRUGGENCATE G., A comparison of peripheral and rubrospinal synaptic input to slow and fast twitch motor units of triceps surae, *J. Physiol.*, **207**: 709-732, 1970.
- [30] BURKE R. E., LEVINE D. N., TSAIRIS P., ZAJAC F. E., Physiological types and histochemical profiles in motor units of the cat gastrocnemius, *J. Physiol.*, **234**: 723-748, 1973.
- [31] BURKE R. E., RYMER W. Z., WALSH J. V., Relative strength of synaptic input from short-latency pathways to motor units of defined type in cat medial gastrocnemius, *J. Neurophysiol.*, **39**: 447-458, 1976.
- [32] CABELGUEN J. M., Static and dynamic fusimotor controls in various hindlimb muscles during locomotor activity in the decorticate cat, *Brain Res.*, **213**: 83-97, 1981.
- [33] CAMPION D. S., Resting membrane potential and ionic distribution in fast- and slow-twitch mammalian muscle, *J. Chin. Invest.*, **54**: 514-518, 1974.
- [34] CERF J. A., CHACKO L. W., Retrograde reaction in motoneuron dendrites following ventral root section in the frog, *J. Comp. Neurol.*, **109**: 205-219, 1958.
- [35] CLOSE R. I., Dynamic properties of mammalian skeletal muscles, *Physiol. Rev.*, **52**: 129-197, 1972.
- [36] CORDO P. J., RYMER W. Z., Motor-unit activation patterns in lengthening and isometric contractions of hindlimb extensor muscles in decerebrate cat, *J. Neurophysiol.*, **47**: 782-796, 1982.
- [37] CROW M. T., KUSHMERICK M. J., Phosphorylation of myosin light chains in mouse fast-twitch muscle associated with reduced actomyosin turnover rate, *Science*, **217**: 835-837, 1982.
- [38] CROW M. T., KUSHMERICK M. J., Chemical energetics of slow- and fast-twitch muscles of the mouse, *J. Gen. Physiol.*, **79**: 147-166, 1982.
- [39] CROWE A., MATTHEWS P. B. C., The effects of stimulation of static and dynamic fusimotor fibres on the response to stretching of the primary endings of muscle spindles, *J. Physiol.*, **174**: 109-131, 1964.
- [40] CULLHEIM S., KELLERTH J.-O., A morphological study of the axons and recurrent axon collaterals of cat α -motoneurons supplying different functional types of muscle unit, *J. Physiol.*, **281**: 301-313, 1978.
- [41] CULLHEIM S., KELLERTH J.-O., Two kinds of recurrent inhibition of cat spinal α -motoneurons as differentiated pharmacologically, *J. Physiol.*, **312**: 209-224, 1981.
- [42] D'ALBIS A., PANTALONI C., BECHET J.-J., An electrophoretic study of native myosin isozymes and of their subunit content, *Eur. J. Biochem.*, **99**: 261-272, 1979.
- [43] DAVEY D. F., DUNLOP C., HOH J. F. Y., WONG S. Y. P., Contractile properties and ultrastructure of extensor digitorum longus and soleus muscles in spinal cord transected rats, *Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci.*, **59** (Pt. 4): 393-404, 1981.
- [44] De LUCA C. J., LeFEVER R. S., McCUE M. P., XENAKIS A. P., Behaviour of human motor units in different muscles during linearly varying contractions, *J. Physiol.*, **329**: 113-128, 1982.

- [45] De LUCA C. J., LeFEVER R. S., McCUE M. P., XENAKIS A. P., Control scheme governing concurrently active human motor units during voluntary contractions, *J. Physiol.*, **329**: 129-142, 1982.
- [46] DESMEDT J. E., GODAUX E., Ballistic contractions in man: characteristic recruitment pattern of single motor units of the tibialis anterior muscle, *J. Physiol.*, **264**: 673-693, 1977.
- [47] DESMEDT J. E., GODAUX E., Spinal motoneuron recruitment in man: rank deordering with direction but not with speed of voluntary movement, *Science*, **214**: 933-936, 1981.
- [48] DHOOT G. K., PERRY S. V., Distribution of polymorphic forms of troponin components and tropomyosin in skeletal muscle, *Nature*, **278**: 714-718, 1979.
- [49] DIETZ V., BERGER W., Spinal coordination of bilateral leg muscle activity during balancing, *Exp. Brain Res.*, **47**: 172-176, 1982.
- [50] DRACHMAN D. B., STANLEY E. F., PESTRONK A., GRIFFIN J. W., PRICE D. L., Neurotrophic regulation of two properties of skeletal muscle by impulse-dependent and spontaneous acetylcholine transmission, *J. Neurosci.*, **2**: 232-243, 1982.
- [51] DUBOWITZ V., PEARSE A. G. E., A comparative histochemical study of oxidative enzyme and phosphorylase activity in skeletal muscle, *Histochemie*, **2**: 105-117, 1960.
- [52] DUBOWITZ V., BROOKE M. H., *Muscle biopsy: a modern approach*, W. B. Saunders Company Ltd, London, Philadelphia, Toronto 1973.
- [53] DUM R. P., BURKE R. E., O'DONOVAN M. J., TOOP J., HODGSON J. A., Motor-unit organization in flexor digitorum longus muscle of the cat, *J. Neurophysiol.*, **47**: 1108-1125, 1982.
- [54] EBNER T. J., BLOEDEL J. R., VITEK J. L., SCHWARTZ A. B., The effects of cerebellar stimulation on the stretch reflex in the spastic monkey, *Brain*, **105**: 425-442, 1982.
- [55] ECCLES J. C., LIBET B., YOUNG R. R., The behaviour of chromatolysed motoneurons studied by intracellular recording, *J. Physiol.*, **143**: 11-40, 1958.
- [56] EDDS M. V., Collateral regeneration of residual motor axons in partially denervated muscles, *J. Exp. Zool.*, **113**: 517-551, 1950.
- [57] EDSTRÖM L., KUGELBERG E., Histochemical composition, distribution of fibers and fatiguability of single motor units, *J. Neurol. Neurosurg. Psychiat.*, **31**: 424-433, 1968.
- [58] EISENBERG B. R., SALMONS S., The reorganization of subcellular structure in muscle undergoing fast-to-slow type transformation, *Cell Tiss. Res.*, **220**: 449-471, 1981.
- [59] ELDRIGE L., LEIBHOLD M., STEINBACH J. H., Alterations in cat skeletal neuromuscular junctions following prolonged inactivity, *J. Physiol.*, **313**: 529-545, 1981.
- [60] ELLAWAY P. H., Recurrent inhibition of fusimotor neurones exhibiting background discharges in the decerebrate and the spinal cat, *J. Physiol.*, **216**: 419-439, 1971.
- [61] FAGG G. E., SCHEFF S. W., COTMAN C. W., Axonal sprouting at the neuromuscular junction of adult and aged rats, *Exp. Neurol.*, **74**: 847-854, 1981.
- [62] FAULKNER J. A., MAXWELL L. C., LIEBERMAN D. A., Histochemical characteristics of muscle fibers from trained and detrained guinea pigs, *Am. J. Physiol.*, **222**: 836-840, 1972.
- [63] FILLIATREAU G., Di GIAMBERARDINO L., Quantitative analysis of axonal

- transport of cytoskeletal proteins in chicken oculomotor nerve, *J. Neurochem.*, **39**: 1033–1037, 1982.
- [64] GAGE P. W., DULHUNTY A. F., Upper motor neurone modulation of charge movement and mechanical activation in rat skeletal muscle fibers. *Neurosci. Lett.*, **27**: 271–276, 1981.
- [65] GAUTHIER G. F., On the relationship of ultrastructural and cytochemical features to color in mammalian skeletal muscle, *Z. Zellforsch.*, **95**: 462–482, 1969.
- [66] GAUTHIER G. F., DUNN R. A., Ultrastructural and cytochemical features of mammalian skeletal muscle fibres following denervation, *J. Cell Sci.*, **12**: 525–547, 1973.
- [67] GAUTHIER G. F., Ultrastructural identification of muscle fiber types by immunocytochemistry, *J. Cell Biol.*, **82**: 391–400, 1979.
- [68] GOLDBERG D. J., HARRIS D. A., LUBIT B. W., SCHWARTZ J. H., Analysis of the mechanism of fast axonal transport by intracellular injection of potentially inhibitory macromolecules: evidence for a possible role of actin filaments, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**: 7448–7452, 1980.
- [69] GOLDFINGER M. D., FUKAMI Y., Distribution, density and size of muscle receptors in cat tail dorsolateral muscles, *J. Anat.*, **135**: 371–384, 1982.
- [70] GORDON T., STEIN R. B., Reorganization of motor-unit properties in reinnervated muscles of the cat, *J. Neurophysiol.*, **48**: 1175–1190, 1982.
- [71] GUBA F., TAKÁCS Ö., KISS Z., SZÖÖR Á., SZILÁGYI T., The effect of disuse on protein patterns in fast and slow twitch muscles, [w] *Plasticity of Muscle*, red. Pette D., Walter de Gruyter and Co., Berlin, New York 1980, 507–523.
- [72] GUTH L., „Trophic” influences of nerve on muscle, *Physiol. Rev.*, **48**: 645–687, 1968.
- [73] GUTH L., SAMAHA F. J., Qualitative differences between actomyosin ATPase of slow and fast mammalian muscle, *Exp. Neurol.*, **25**: 138–152, 1969.
- [74] GUTH L., YELLIN H., The dynamic nature of the so-called „fiber types” of mammalian skeletal muscle, *Exp. Neurol.*, **31**: 277–300, 1971.
- [75] GUTH L., KEMERER V. F., SAMARAS T. A., WARNICK J. E., ALBUQUERQUE E. X., The roles of disuse and loss of neurotrophic function in denervation atrophy of skeletal muscle, *Exp. Neurol.*, **73**: 20–36, 1981.
- [76] GUTMANN E., ZELENÁ J., Morphological changes in the denervated muscle, [w] *The denervated muscle*, red. Gutmann E., Publishing House of the Czechoslovak Acad Sci., 1962, 57–102.
- [77] GUTMANN E., CARLSON B. M., Contractile and histochemical properties of regenerating cross-transplanted fast and slow muscle in the rat, *Pflüg. Arch.*, **353**: 227–239, 1975.
- [78] GUTMANN E., Neurotrophic relations, *Ann. Rev. Physiol.*, **38**: 177–216, 1976.
- [79] GUTMANN E., CARLSON B. M., The regeneration of a hormonesensitive muscle (*Levator Ani*) in the rat, *Exp. Neurol.*, **58**: 535–548, 1978.
- [80] GUY P. S., SNOW D. H., The effect of training and detraining on muscle composition in the horse, *J. Physiol.*, **269**: 33–51, 1977.
- [81] HANSON J., The effects of repetitive stimulation on the action potential and the twitch of rat muscle, *Acta Physiol. Scand.*, **90**: 387–400, 1974.
- [82] HARRISON V. F., MORTENSEN O. A., Identification and voluntary control of single motor unit activity in the *tibialis anterior* muscle, *Anat. Rec.*, **144**: 109–116, 1962.

- [83] HEELEY D. H., DHOOT G. K., PERRY S. V., VRBOVA G., Cross innervation of rabbit skeletal muscle and the composition of tropomyosin in different cell types, 11th European Congress on Muscle and Motility, Leicester, 14-17 wrzesień, 1982, Abstract, 8-26, *J. Muscle Res. Cell. Motil.*, **3**: 510, 1982.
- [84] HEILIG A., PETTE D., Changes in transcriptional activity of chronically stimulated fast twitch muscle, *FEBS Letters*, **151**: 211-214, 1983.
- [85] HENNEMAN E., SOMJEN G., CARPENTER D. O., Functional significance of cell size in spinal motoneurons, *J. Neurophysiol.*, **28**: 560-580, 1965.
- [86] HENNEMAN E., SOMJEN G., CARPENTER D. O., Excitability and inhibibility of motoneurons of different size, *J. Neurophysiol.*, **28**: 599-620, 1965.
- [87] HIKIDA R. S., Tenotomy of the avian anterior latissimus dorsi muscle, II. Can regeneration from the stump occur in the pigeon?, *Am. J. Anat.*, **160**: 409-418, 1981.
- [88] HINES J. F., GARWOOD M. M., Release of protein from axons during rapid axonal transport: an in vitro preparation, *Brain. Res.*, **125**: 141-148, 1977.
- [89] HNIK P., What is muscle tone?, *Physiol. Bohemoslov.*, **30**: 389-395, 1981.
- [90] HO K. W., ROY R. R., TWEEDLE C. D., HEUSNER W. W., Van HUSS W. D., CARROW R. E., Skeletal muscle fiber splitting with weight-lifting exercise in rats, *Am. J. Anat.*, **157**: 433-440, 1980.
- [91] HOFFER J. A., O'DONOVAN M. J., PRATT C. A., LOEB G. E., Discharge patterns of hindlimb motoneurons during normal cat locomotion, *Science*, **213**: 466-468, 1981.
- [92] HOFFMAN H., Local reinnervation in partially denervated muscle: a histophysiological study, *Austr. J. Exp. Biol. Med. Sci.*, **XXVIII**: 383-397, 1950.
- [93] HOLLOSZY J. O., Biochemical adaptations in muscle. Effects of exercise on mitochondrial oxygen uptake and respiratory enzyme activity in skeletal muscle, *J. Biol. Chem.*, **242**: 2278-2282, 1967.
- [94] HOPKINS W. G., BROWN M. C., The distribution of nodal sprouts in a paralysed or partly denervated mouse muscle, *Neuroscience*, **7**: 37-44, 1982.
- [95] HOUK J., HENNEMAN E., Responses of Golgi tendon organs to active contractions of the soleus muscle of the cat, *J. Neurophysiol.*, **30**: 466-481, 1967.
- [96] HOUSTON M. E., GREEN H. J., Skeletal muscle and physiologic characteristics of a world champion masters distance runner: a case study, *Int. J. Sports Med.*, **1**: 47-49, 1981.
- [97] HUDLICKA O., TYLER K. R., SRIHARI T., HEILIG A., PETTE D., The effect of different patterns of long-term stimulation on contractile properties and myosin light chains in rabbit fast muscles, *Pflügers Arch.*, **393**: 164-170, 1982.
- [98] HULTBORN H., ILLERT M., SANTINI M., Convergence on interneurons mediating the reciprocal Ia inhibition of motoneurons. III. Effects from supraspinal pathways, *Acta physiol. Scand.*, **96**: 368-391, 1976.
- [99] HULTBORN H., PIERROT-DESEILLIGNY E., Input-output relations in the pathway of recurrent inhibition to motoneurons in the cat, *J. Physiol.*, **297**: 267-287, 1979.
- [100] JAKIMOWICZ W., *Neurologia kliniczna w zarysie. Podręcznik dla studentów medycyny*, PZWL, Warszawa 1981.
- [101] JAKUBIEC-PUKA A., LASKOWSKA-BOŻEK H., Morphological changes of fast and slow skeletal rat muscle following denervation, *Folia Histochem. Cytochem.*, **12**: 301-314, 1974.
- [102] JAKUBIEC-PUKA A., DRABIKOWSKI W., Influence of denervation and reinnervation on autolytic activity and on protein composition of skeletal muscle in rat, *Enzyme*, **23**: 10-21, 1978.

- [103] JAKUBIEC-PUKA A., KULESZA-LIPKA D., KRAJEWSKI K., The contractile apparatus of striated muscle in the course of atrophy and regeneration. I. Myosin and actin filaments in the denervated rat soleus, *Cell Tiss. Res.*, **220**: 651-663, 1981.
- [104] JAKUBIEC-PUKA A., KRAJEWSKI K., KULESZA-LIPKA D., Myosin and actin filaments in denervated rat fast muscle, *J. Muscle Res. Cell. Motil.*, **3**: 483, 1982.
- [105] JAKUBIEC-PUKA A., Zależność mięśnia prążkowanego od układu nerwowego. II. Wpływ unerwienia na aparat kurczliwy, *Post. Biol. Kom.*, **11**: 45-69, 1984.
- [106] JAMI L., MURTHY K. S. K., PETIT J., A quantitative study of skeletofusimotor innervation in the cat peroneus tertius muscle, *J. Physiol.*, **325**: 125-144, 1982.
- [107] JANKOWSKA E., ROBERTS W. J., An electrophysiological demonstration of the axonal projections of single spinal interneurons in the cat, *J. Physiol.*, **222**: 597-622, 1972.
- [108] JANKOWSKA E., PADEL Y., TANAKA R., Projections of pyramidal tract cells to α -motoneurons innervating hind-limb muscles in the monkey, *J. Physiol.*, **249**: 637-667, 1975.
- [109] JIRMANOVÁ I., ZELENÁ J., Ultrastructural transformation of fast chicken muscle fibres induced by nerve cross-union, *Z. Zellforsch.*, **146**: 103-121, 1973.
- [110] KACZMARSKI F., Zróźnicowanie włókien mięśniowych w mięśniach szkieletowych kręgowców, *Post. Biol. Kom.*, **4**: 65-85, 1977.
- [111] KARPATI G., ENGEL W. K., „Type grouping” in skeletal muscles after experimental reinnervation, *Neurology*, **18**: 447-455, 1968.
- [112] KASMAN K. W., Struktura, skład białkowy i funkcja linii M mięśni szkieletowych kręgowców, *Post. Bioch.*, **27**: 295-308, 1981.
- [113] KAŁOL I., KASMAN K., MICHNICKA M., The phosphorylation-dephosphorylation process as a myosin-linked regulation of superprecipitation of fast skeletal muscle actomyosin, *Biochim. Biophys. Acta*, **704**: 437-443, 1982.
- [114] KELLY A. M., Satellite cells and myofiber growth in the rat soleus and extensor digitorum longus muscles, *Developm. Biol.*, **65**: 1-10, 1978.
- [115] KERNELL D., MONSTER A. W., Motoneurone properties and motor fatigue. An intracellular study of gastrocnemius motoneurons of the cat, *Exp. Brain Res.*, **46**: 197-204, 1982.
- [116] KIM D. H., WIBLE G. S., WITZMANN F. A., FITTS R. H., The effect of exercise-training on sarcoplasmic reticulum function in fast and slow skeletal muscle, *Life Sci.*, **28**: 2671-2677, 1981.
- [117] KIRKWOOD P. A., SEARS T. A., The effects of single afferent impulses on the probability of firing of external intercostal motoneurons in the cat, *J. Physiol.*, **322**: 315-336, 1982.
- [118] KLAUSEN K., ANDERSEN L. B., PELLE I., Adaptive changes in work capacity, skeletal muscle capillarization and enzyme levels during training and detraining, *Acta Physiol. Scand.*, **113**: 9-16, 1981.
- [119] KNIFFKI K.-D., SCHOMBURG E. D., STEFFENS H., Effects from fine muscle and cutaneous afferents on spinal locomotion in cats, *J. Physiol.*, **319**: 543-554, 1981.
- [120] KNIFFKI K.-D., SCHOMBURG E. D., STEFFENS H., Convergence in segmental reflex pathways from fine muscle afferents and cutaneous or group II muscle afferents to α -motoneurons, *Brain Res.*, **218**: 342-346, 1981.

- [121] KORNHAUSER D., BROMBERG M. B., GILMAN S., Effects of lesions of fastigial nucleus on static and dynamic responses of muscle spindle primary afferents in the cat, *J. Neurophysiol.*, **47**: 977-986, 1982.
- [122] KUFFLER S. W., HUNT C. C., QUILLIAM J. P., Function of medullated small-nerve fibers in mammalian ventral roots: efferent muscle spindle innervation, *J. Neurophysiol.*, **14**: 29-54, 1951.
- [123] KUGELBERG E., EDSTRÖM L., Differential histochemical effects of muscle contractions on phosphorylase and glycogen in various types of fibres: relation to fatigue, *J. Neurol. Neurosurg. Psychiat.*, **31**: 415-423, 1968.
- [124] KUGELBERG E., Adaptive fibre and motor unit transformation in rat soleus during growth, [w] *Plasticity of muscle*, red. Pette D., Walter de Gruyter and Co., Berlin, New York 1980, 111-117.
- [125] KUMAZAWA T., MIZUMURA K., Thin-fibre receptors responding to mechanical, chemical, and thermal stimulation in the skeletal muscle of the dog, *J. Physiol.*, **273**: 179-194, 1977.
- [126] LENTZ T. L., ADDIS J. S., CHESTER J., Partial purification and characterization of nerve trophic factor regulating muscle acetylcholinesterase activity, *Exp. Neurol.*, **73**: 542-557, 1981.
- [127] LI J. B., GOLDBERG A. L., Effects of food deprivation on protein synthesis and degradation in rats skeletal muscle, *Am. J. Physiol.*, **231**: 441-448, 1976.
- [128] LØMO T., WESTGAARD R. H., DAHL H. A., Contractile properties of muscle: control by pattern of muscle activity in the rat, *Proc. Roy. Soc. Lond. B.*, **187**: 99-103, 1974.
- [129] LØMO T., WESTGAARD R. H., ENGBRETSSEN L., Different stimulation patterns affect contractile properties of denervated rat soleus muscles, [w] *Plasticity of muscle*, red. Pette D., Walter de Gruyter and Co., Berlin, New York 1980, 297-309.
- [130] LOWEY S., RISBY D., Light chains from fast and slow muscle myosins, *Nature*, **234**: 81-85, 1971.
- [131] LUBIŃSKA L., On axoplasmic flow, *Int. Rev. Neurobiol.*, **17**: 241-296, 1975.
- [132] LUBIŃSKA L., Patterns of Wallerian degeneration of myelinated fibres in short and long peripheral stumps and in isolated segments of rat phrenic nerve. Interpretation of the role of axoplasmic flow of the trophic factor, *Brain Res.*, **233**: 227-240, 1982.
- [133] LUND J. P., RICHMOND F. J. R., TOULOU MIS C., PATRY Y., LAMARRE Y., The distribution of Golgi tendon organs and muscle spindles in masseter and temporalis muscles of the cat, *Neuroscience*, **3**: 259-270, 1978.
- [134] LÜSCHER H.-R., RUENZEL P., FETZ E., HENNEMAN E., Postsynaptic population potentials recorded from ventral roots perfused with isotonic sucrose: connections of group Ia and II spindle afferent fibers with large populations of motoneurons, *J. Neurophysiol.*, **42**: 1146-1164, 1979.
- [135] MABUCHI K., SZVETKO D., PINTÉR K., SRÉTER F. A., Type IIB to IIA fiber transformation in intermittently stimulated rabbit muscles, *Am. J. Physiol.*, **242**: C373-381, 1982.
- [136] MALTHE-SØRENSSEN D., ØKTEDALEN O., Substance P-like immunoreactivity in the phrenic nerve and diaphragm: axonal transport of substance P in the phrenic nerve, *Neurosci. Lett.*, **28**: 269-274, 1982.
- [137] MARKELONIS G. J., KEMERER V. E., OH T. H., Sciatin: purification and characterization of a myotrophic protein from chicken sciatic nerves, *J. Biol. Chem.*, **255**: 8967-8970, 1980.

- [138] MARKELONIS G. J., OH T. H., ELDEFRAWI M. E., GUTH L., Sciatin: a myotrophic protein increases the number of acetylcholine receptors and receptor clusters in cultured skeletal muscle, *Dev. Biol.*, **89**: 353–361, 1982.
- [139] McCOMAS A. J., SICA R. E. P., CAMPBELL M. J., UPTON A. R. M., Functional compensation in partially denervated muscles, *J. Neurol. Neurosurg. Psychiat.*, **34**: 453–460, 1971.
- [140] McPHEDRAN A. M., WUERKER R. B., HENNEMAN E., Properties of motor units in a homogeneous red muscle (soleus) of the cat, *J. Neurophysiol.*, **28**: 71–84, 1965.
- [141] MENDELL L. M., HENNEMAN E., Terminals of single Ia fibers: location, density and distribution within a pool of 300 homonymous motoneurons, *J. Neurophysiol.*, **34**: 171–187, 1971.
- [142] MEYER-LOHMANN J., RIEBOLD W., ROBRECHT D., Mechanical influence of the extrafusal muscle on the static behaviour of deafferented primary muscle spindle endings in cat, *Pflügers Arch.*, **352**: 267–278, 1974.
- [143] MILLWARD D. J., BATES P. C., LAURENT G. J., LO C. C., Factors affecting protein breakdown in skeletal muscle, [w] Protein turnover and lysosome function, red. Segal H. L., Doyle D. J., Academic Press, New York, San Francisco, London 1978, 619–644.
- [144] MIZUSAWA H., TAKAGI A., SUGITA H., TOYOKURA Y., Coexistence of fast and slow types of myosin light chains in a single fiber of rat soleus muscle, *J. Biochem.*, **91**: 423–425, 1982.
- [145] MOLÉ P. A., OSCAI L. B., HOLLOSZY J. O., Adaptation of muscle to exercise. Increase in levels of palmitoyl CoA synthetase, carnitine palmitoyltransferase, and palmitoyl CoA dehydrogenase and in the capacity to oxidize fatty acids, *J. Chin. Invest.*, **50**: 2323–2330, 1971.
- [146] MORI S., KAWAHARA K., SAKAMOTO T., AOKI M., TOMIYAMA T., Setting and resetting of level of postural muscle tone in decerebrate cat by stimulation of brain stem, *J. Neurophysiol.*, **48**: 737–748, 1982.
- [147] MUNSON J. B., SYPERT G. W., Properties of single central Ia afferent fibers projecting to motoneurons, *J. Physiol.*, **296**: 315–327, 1979.
- [148] MURTHY K. S. K., LETBETTER W. D., EIDELBERG E., CAMERON W. E., PETIT J., Histochemical evidence for the existence of skelectofusimotor (β) innervation in the primate, *Exp. Brain Res.*, **46**: 186–190, 1982.
- [149] NICOL C. J. M., BRUCE D. S., Effect of hyperthyroidism on the contractile and histochemical properties of fast and slow twitch skeletal muscle in the rat, *Pflügers Arch.*, **390**: 73–79, 1981.
- [150] OCHS S., Calcium and the mechanism of axoplasmic transport, *Fed. Proc.*, **41**: 2301–2306, 1982.
- [151] ODEDRA B. R., DALAL S. S., MILLWARD D. J., Muscle protein synthesis in the streptozotocin-diabetic rat. A possible role for corticosterone in the insensitivity to insulin infusion in vivo, *Biochem. J.*, **202**: 363–368, 1982.
- [152] OFFER G., New proteins of the skeletal muscle thick filament, 11th European Congress on Muscle and Motility, Leicester, 14–17 wrzesień, 1982.
- [153] OSCAI L. B., HOLLOSZY J. O., Biochemical adaptations in muscle. II. Response of mitochondrial adenosine triphosphatase, creatine phosphokinase and adenylate kinase activities in skeletal muscle to exercise, *J. Biol. Chem.*, **246**: 6968–6972, 1971.
- [154] PADYKULA H. A., GAUTHIER G. F., Morphological and cytochemical characteristics of fiber types in normal mammalian skeletal muscle, [w] *Explo-*

- ratory Concepts in Muscular Dystrophy and Related Disorders, red. A. T. Milhorat, (Proceedings of the International Conference Convented by the Muscular Dystrophy Associations of America), New York, October, 1966. International Congress Series, No. 147. Excerpta Medica 1967, 117-128.
- [155] PADYKULA H. A., GAUTHIER G. F., The ultrastructure of the neuromuscular junctions of mammalian red, white, and intermediate skeletal muscle fibers, *J. Cell Biol.*, **46**: 27-41, 1970.
- [156] PASSATORE M., FILIPPI G. M., On whether there is a direct sympathetic influence on jaw muscle spindles, *Brain Res.*, **219**: 162-165, 1981.
- [157] PETER J. B., SAWAKI S., BARNARD R. J., EDGERTON V. R., GILLESPIE C. A., Lactate dehydrogenase isoenzymes: distribution in fast-twitch red, fast-twitch white, and slow-twitch intermediate fibers of guinea pig skeletal muscle, *Arch. Biochem. Biophys.*, **144**: 304-307, 1971.
- [158] PETER J. B., BARNARD R. J., EDGERTON V. R., GILLESPIE C. A., STEMPEL K. E., Metabolic profiles of three fiber types of skeletal muscle in guinea pigs and rabbits, *Biochemistry*, **11**: 2627-2633, 1972.
- [159] PETTE D., RAMIREZ B. U., MÜLLER W., SIMON R., EXNER G. U., HILDEBRAND R., Influence of intermittent long-term stimulation on contractile, histochemical and metabolic properties of fibre populations in fast and slow rabbit muscles, *Pflüg. Arch.*, **361**: 1-7, 1975.
- [160] PLISZKA B., STRZELECKA-GOŁASZEWSKA H., Comparison of myosin isoenzymes from slow-tonic and fast-twitch fibers of frog muscle, *Eur. J. Cell Biol.*, **25**: 144-149, 1981.
- [161] POCKETT S., SLACK J. R., Source of the stimulus for nerve terminal sprouting in partially denervated muscle, *Neurosci.*, **7**: 3173-3176, 1982.
- [162] POLITIS M. J., EDERLE K., SPENCER P. S., Tropism in nerve regeneration in vivo. Attraction of regenerating axons by diffusible factors derived from cells in distal nerve stumps of transected peripheral nerves, *Brain. Res.*, **253**: 1-12, 1982.
- [163] POLLOCK M., HARRIS A. J., Accuracy in peripheral nerve regeneration, *Trends. Neurosci.*, **4**: 18-20, 1981.
- [164] REINACH F. C., MASAKI T., SHAFIQ S., OBINATA T., FISCHMAN D. A., Isoforms of C-protein in adult chicken skeletal muscle: detection with monoclonal antibodies, *J. Cell Biol.*, **95**: 78-84, 1982.
- [165] REIS D. J., WOOTEN G. F., The relationship of blood flow to myoglobin, capillary density, and twitch characteristics in red and white skeletal muscle in cat, *J. Physiol.*, **210**: 121-135, 1970.
- [166] RENSHAW B., Central effects of centripetal impulses in axons of spinal ventral roots, *J. Neurophysiol.*, **9**: 191-204, 1946.
- [167] RICHARDSON P. M., EBENDAL T., Nerve growth activities in rat peripheral nerve, *Brain Res.*, **246**: 57-64, 1982.
- [168] RICHMOND F. J. R., ANSTEE G. C. B., SHERWIN E. A., ABRAHAMS V. C., Motor and sensory fibres of neck muscle nerves in the cat, *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, **54**: 294-304, 1976.
- [169] RINGQVIST M., RINGQUIST I., ERIKSSON P. O., THORNELL L.-E., Histochemical fiber-type profile in the human masseter muscle, *J. Neurol. Sci.*, **53**: 273-282, 1982.
- [170] ROBBINS N., Plasticity at the mature neuromuscular junction, *Trends Neurosci.*, **3**: 120-122, 1980.
- [171] ROMANES G. J., The motor cell columns of the lumbo-sacral spinal cord of the cat, *J. Comp. Neurol.*, **94**: 313-363, 1951.

- [172] ROMANUL F. C. A., Enzyme in muscle. I. Histochemical studies of enzymes in individual muscle fibers, *Arch. Neurol.*, **11**: 355-368, 1964.
- [173] ROMANUL F. C. A., Van der MEULEN J. P., Slow and fast muscles after cross-innervation: enzymatic and physiological changes, *Arch. Neurol.*, **17**: 387-402, 1967.
- [174] ROTSHENKER S., Transneuronal and peripheral mechanism for the induction of motor neuron sprouting, *J. Neurosci.*, **2**: 1359-1368, 1982.
- [175] ROWE R. W. D., The ultrastructure of Z disks from white, intermediate, and red fibers of mammalian striated muscles, *J. Cell Biol.*, **57**: 261-277, 1973.
- [176] ROY R. K., MABUCHI K., SARKAR S., MIS C., SRÉTER F. A., Changes in tropomyosin subunit pattern in chronic electrically stimulated rabbit fast muscles, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **89**: 181-187, 1979.
- [177] RUTSCHMANN M., DAHLMANN B., KUEHN L., REINAUER H., Loss of myosin isoenzymes in skeletal muscle of diabetic rats, 11th European Congress on Muscle and Motility, Leicester, 14-17 wrzesień, 1982, *J. Muscle Res. Cell. Motil.*, **3**: 501, 1982.
- [178] RYALL R. W., PIERCEY M. F., POLOSA C., Intersegmental and intrasegmental distribution of mutual inhibition of Renshaw cells, *J. Neurophysiol.*, **34**: 700-707, 1971.
- [179] RYALL R. W., PIERCEY M. F., POLOSA C., GOLDFARB J., Excitation of Renshaw cells in relation to orthodromic and antidromic excitation of motoneurons, *J. Neurophysiol.*, **35**: 137-148, 1972.
- [180] SALMONS S., GALE D. R., SRÉTER F. A., Ultrastructural aspects of the transformation of muscle fibre type by long term stimulation: changes in Z discs and mitochondria, *J. Anat.*, **127**: 17-31, 1978.
- [181] SALMONS S., The response of skeletal muscle to different patterns of use-some new developments and concepts, [w] *Plasticity of muscle*, red. Pette D., Walter de Gruyter and Co., Berlin, New York 1980, 387-399.
- [182] SALVIATI G., BETTO R., DANIELI BETTO D., Polymorphism of myofibrillar proteins of rabbit skeletal-muscle fibres, An electrophoretic study of single fibres, *Biochem. J.*, **207**: 261-272, 1982.
- [183] SALVIATI G., VOLPE P., SALVATORI S., BETTO R., DAMIANI E., MARGRETH A., PASQUALI-RONCHETTI I., Biochemical heterogeneity of skeletal-muscle microsomal membranes. Membrane origin, membrane specificity and fibre types, *Biochem. J.*, **202**: 289-301, 1982.
- [184] SARZAŁA M. G., SZYMAŃSKA G., WIEHRER W., PETTE D., Effects of chronic stimulation at low frequency on the lipid phase of sarcoplasmic reticulum in rabbit fast-twitch muscle, *Eur. J. Biochem.*, **123**: 241-245, 1982.
- [185] SAWKA M. N., PETROFSKY S. J., PHILLIPS C. A., Energy cost of sub-maximal isometric contractions in cat fast and slow twitch muscles., *Pflüg. Arch.*, **390**: 164-168, 1981.
- [168] SCHIAFFINO S., HANZLIKOVÁ V., PIEROBON S., Relations between structure and function in rat skeletal muscle fibers, *J. Cell Biol.*, **47**: 107-119, 1970.
- [187] SCHOMBURG E. D., BEHREND S. H.-B., The possibility of phase-dependent monosynaptic and polysynaptic Ia excitation to homonymous motoneurons during fictive locomotion, *Brain Res.*, **143**: 533-537, 1978.
- [188] SCHOMBURG E. D., BEHREND S. H.-B., STEFFENS H., Changes in segmental and propriospinal reflex pathways during spinal locomotion, [w] "Muscle Receptors and Movement" red. A. Taylor and A. Prochazka, Macmillan, London 1981, 413-425.

- [189] SHERRINGTON C., Some functional problems attaching to convergence, *Proc. Roy. Soc.*, 105, B, 737: 332-362, 1929.
- [190] SJÖSTRÖM M., KIDMAN S., LARSEN K. H. ÄNGQUIST K-A., Z- and M-band appearance in different histochemically defined types of human skeletal muscle fibers, *J. Histochem. Cytochem.*, 30: 1-11, 1982.
- [191] SLATER C. R., Reinnervation of adult muscle, *Nature*, 282: 672-673, 1979.
- [192] SMITH A. M., The coactivation of antagonist muscles, *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, 59: 733-747, 1981.
- [193] SOUKUP T., Intrafusal fibre types in rat limb muscle spindles. Morphological and histochemical characteristics, *Histochemistry*, 47: 43-57, 1976.
- [194] SPAMER C., PETTE D., Metabolic subpopulations of rabbit skeletal muscle fibers, [w] *Plasticity of muscle*, red. Pette D., Walter de Gruyter and Co., Berlin, New York 1980, 19-30.
- [195] SRÉTER F. A., GERGELY J., SALMONS S., ROMANUL F., Synthesis by fast muscle of myosin light chains characteristic of slow muscle in response to long-term stimulation, *Nature New Biol. (London)*, 241: 17-19, 1973.
- [196] SRÉTER F. A., LUFF A. R., GERGELY J., Effect of cross-reinnervation of physiological parameters and on properties of myosin and sarcoplasmic reticulum of fast and slow muscles of the rabbit, *J. Gen. Physiol.*, 66: 811-821, 1975.
- [197] SRÉTER F. A., MABUCHI K., KÖVER A., GESZTELYI I., NAGY Z., FURKA I., Effect of chronic stimulation on cation distribution and membrane potential in fast-twitch muscles of rabbit, [w] *Plasticity of muscle*, red. Pette D., Walter de Gruyter and Co., Berlin, New York 1980, 441-451.
- [198] SRÉTER F. A., PINTER K., JOLESZ F., MABUCHI K., Fast to slow transformation of fast muscles in response to long-term phasic stimulation, *Exp. Neurol.*, 75: 95-102, 1982.
- [199] STANDLER N. A., BERNSTEIN J. J., Degeneration and regeneration in motoneuron dendrites after ventral root crush: computer reconstruction of dendritic fields, *Exp. Neurol.*, 75: 600-615, 1982.
- [200] STAUDTE H. W., EXNER G. U., PETTE D., Effects of short-term, high intensity (sprint) training on some contractile and metabolic characteristics of fast and slow muscle of the rat, *Pflüg. Arch.*, 344: 159-168, 1973.
- [201] STEIN J. M., PADYKULA H. A., Histochemical classification of individual skeletal muscle fibres of the rat, *Am. J. Anat.*, 110: 103-123, 1962.
- [202] STĘPKOWSKI D., MICHNICKA M., KĄKOL I., Phosphorylation of fast skeletal muscle myosin as a factor decreasing its actin-activated Mg^{2+} -ATPase (praca w druku).
- [203] STRZELECKA-GOŁASZEWSKA H., PIWOWAR U., Polimorficzne formy miozyny w komórkach mięśniowych i niemięśniowych, *Post. Biochem.*, 26: 517-558, 1980.
- [204] SUMNER B. E. H., WATSON W. E., Retraction and expansion of the dendritic tree of motoneurons of adult rats induced in vivo, *Nature*, 233: 273-275, 1971.
- [205] SWETT J. E., ELDRED E., Distribution and numbers of stretch receptors in medial gastrocnemius and soleus muscles of the cat, *Anat. Rec.*, 137: 453-460, 1960.
- [206] SYPERT G. W., FLESHMAN J. W., MUNSON J. B., Comparison of the monosynaptic actions of medial gastrocnemius group Ia and II muscle spindle afferents on triceps surae motoneurons, *J. Neurophysiol.*, 44: 726-738, 1980.

- [207] SYPERT G. W., MUNSON J. B., Basis of segmental motor control: motoneuron size or motor unit type?, *Neurosurgery*, **8**: 608–621, 1981.
- [208] SYROVÝ I., GUTMANN E., Myosin from fast and slow skeletal and cardiac muscles of mammals of different size, *Physiol. Biochemoslov.*, **24**: 325–334, 1975.
- [209] SYROVÝ I., Polymorphism and specificity of myosin, *Int. J. Biochem.*, **10**: 383–389, 1979
- [210] TANJI J., KATO M., Recruitment of motor units in voluntary contraction of a finger muscle in man, *Exp. Neurol.*, **40**: 759–770, 1973.
- [211] THOMPSON W., JANSEN J. K. S., The extent of sprouting of remaining motor units in partly denervated immature and adult rat soleus muscle, *Neuroscience*, **2**: 523–535, 1977.
- [212] TIBBITS G. F., NAGATOMO T., SASAKI M., BARNARD R. J., Cardiac sarcolemma: compositional adaptation to exercise, *Science*, **213**: 1271–1273, 1981.
- [213] TOEWS A. D., SAUNDERS B. F., BLAKER W. D., MORELL P., Differences in the kinetics of axonal transport for individual lipid classes in rat sciatic nerve, *J. Neurochem.*, **40**: 555–562, 1983.
- [214] TOMANEK R. J., COOPER R. R., Ultrastructural changes in tenotomized fast- and slow-twitch muscle fibres, *J. Anat.*, **113**: 409–424, 1972.
- [215] Van WINKLE W. B., SCHWARTZ A., Morphological and biochemical correlates of skeletal muscle contractility in the cat. I. Histochemical and electron microscopic studies, *J. Cell. Physiol.*, **97**: 99–120, 1978.
- [216] VIHKO V., SALMINEN A., RANTAMÄKI J., Exhaustive exercise, endurance training, and acid hydrolase activity in skeletal muscle, *J. Appl. Physiol.*, **47**: 43–50, 1979.
- [217] VRBOVÁ G., The effect of motoneurone activity on the speed of contraction of striated muscle, *J. Physiol.*, **169**: 513–526, 1963.
- [218] WALMSLEY B., HODGSON J. A., BURKE R. E., Forces produced by medial gastrocnemius and soleus muscles during locomotion in freely moving cats, *J. Neurophysiol.*, **41**: 1203–1216, 1978.
- [219] WEEDS A., Myosin light chains, polymorphism and fibre types in skeletal muscles, [w] *Plasticity of muscle*, red. Pette D., Walter de Gruyter and Co., Berlin, New York 1980, 55–68.
- [220] WERNIG A., PÉCOT-DECHAVASSINE M., STÖVER H., Sprouting and regression of the nerve at the frog neuromuscular junction in normal conditions and after prolonged paralysis with curare, *J. Neurocytol.*, **9**: 277–303, 1980.
- [221] WERNIG A., ANZIL A. P., BIESER A., Formation and regression of synaptic contacts in the adult muscle, [w] *Lesion-induced Neuronal Plasticity in Sensimotor Systems*, red., Flohr H. and Precht W., Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York 1981, 38–50.
- [222] WINDER W., FITTS R., HOLLOSZY J., KAISER K., BROOKE M., Effects of thyroid hormones on different types of skeletal muscle, [w] *Plasticity of muscle*, red. Pette D., Walter de Gruyter and Co., Berlin, New York 1980, 581–591.
- [223] WUERKER R. B., McPHERAN A. M., HENNEMAN E., Properties of motor units in a heterogeneous pale muscle (m. gastrocnemius) of the cat, *J. Neurophysiol.*, **28**: 85–99, 1965.
- [224] YOUNG O. A., DAVEY C. L., Electrophoretic analysis of proteins from single bovine muscle fibers, *Biochem. J.*, **195**: 317–327, 1981.
- [225] YOUNKIN S. G., BETT R. S., DAVEY B., YOUNKIN L. H., Substances moved

- by axonal transport and released by nerve stimulation have an innervationlike effect on muscle, *Science*, **200**: 1292–1295, 1978.
- [226] ZISKIND-CONHAIM L., BENNETT J. I., The effect of electrical inactivity and denervation on the distribution of acetylcholine receptors in developing rat muscle, *Dev. Biol.*, **90**: 185–197, 1982.
- [227] ZUBRZYCKA-GAARN E., KORCZAK B., OSIŃSKA H., SARZAŁA M. G., Studies on sarcoplasmic reticulum from slow-twitch muscle, *J. Muscle Res. Cell Motil.*, **3**: 191–212, 1982.

Otrzymano: 26 maja 1983.

Przyjęto: 1 września 1983.

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

ZALEŻNOŚĆ MIĘŚNIA PRAŻKOWANEGO OD UKŁADU NERWOWEGO. II. WPŁYW UNERWIENIA NA APARAT KURCZLIWY

DEPENDENCE OF THE STRIATED MUSCLE FROM THE NERVOUS SYSTEM.
II. INFLUENCE OF INNERVATION ON THE CONTRACTILE APPARATUS

Anna JAKUBIEC-PUKA

Pracownia Metabolizmu Białek, Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego,
PAN, Warszawa

Streszczenie. Wymieniono różnego rodzaju zmiany w odnerwionym włóknie mięśniowym, wynikłe z braku impulsów nerwowych oraz (lub) z przerywania „troficznych oddziaływań” nerwu na mięsień. Omówiono spowodowaną odnerwieniem „atrofię prostą” struktury kurczliwej, polegającą na znikaniu filamentów i zmniejszaniu się miofibryli, oraz różnice w jej przebiegu zależne od typu włókna mięśniowego. Przedstawiono też różnego rodzaju zmiany ogniskowe, pojawiające się w strukturze kurczliwej odnerwionego włókna mięśniowego.

Omówiono procesy zachodzące we włóknie mięśniowym i w strukturze kurczliwej po ponownym unerwieniu odnerwionego atroficznego mięśnia. Najważniejsze z nich to cofanie się symptomów „atrofii prostej”, naprawa uszkodzeń włókien mięśniowych oraz produkcja nowej struktury kurczliwej.

Omówiono zdolność włókna mięśniowego i struktury kurczliwej do szybkiej przebudowy następującej w razie zmiany czynności lub długości mięśnia. Przedstawiono fragmentaryczne jeszcze wiadomości na temat dróg jakimi procesy te zachodzą.

Summary. Changes occurring in denervated muscle are presented. Lack of neural impulses and (or) lack of the “trophic influence” of the nerve on muscle are discussed as the reason of particular symptoms of denervation. “Simple atrophy” was characterized in the denervated muscle fibers of different types; focal changes appearing in the contractile structure are also shown.

Processes, which develop in the muscle fibers and in the contractile apparatus following reinnervation of denervated atrophying muscle, are discussed. Main attention was devoted to recovery from “atrophy simplex”, to reparation of fiber damage and to de novo production of contractile structure.

The ability of muscle fibers and of the contractile structure to reconstruct itself following changes of muscle function or of muscle length is shown. Very incomplete at the moment information on the mechanisms of these processes supplied.

Przystosowanie do zmienionych potrzeb funkcjonalnych jest podstawową cechą włókna mięśniowego. Odnerwienie, reinnerwacja oraz unerwienie „krzyżowe” pojedynczych włókien mięśniowych, a także zmiana czynności całych jednostek motorycznych, następuje w każdym normalnym mięśniu, szczególnie w okresach przystosowywania się mięśnia do zmienionych warunków. Może to doprowadzać do transformacji typów włókien mięśniowych. Zagadnienia te omówione zostały uprzednio [89]. W niniejszej pracy zaprezentowano, co wiadomo obecnie o zmianach w aparacie skurczu zachodzących w wyniku tych procesów.

ZMIANY WE WŁÓKNIE MIĘŚNIOWYM WYWOŁANE BRAKIEM UNERWIENIA

Pozbawienie włókna mięśniowego kontaktu z nerwem (odnerwienie) staje się przyczyną licznych zmian w jego budowie. Główne z nich to zanik (atrofia) włókna, pofałdowania sarkolemmy, przemieszczenia jąder z obwodowych regionów włókna ku środkowi, „pobudzenie” jąder [62, 79, 166, 169], zmiana orientacji przestrzennej, poszerzenie i proliferacja retikulum sarkoplazmatycznego [51, 117, 127], zmiana wymiarów i ilości (zwykle zmniejszenie) oraz lokalizacji mitochondriów [84, 88, 117, 127]. Odnerwienie wywołuje też we włóknie mięśniowym szereg zmian prowadzących do nadwrażliwości błony komórkowej na bodźce chemiczne i elektryczne [63, 166] oraz do zmniejszenia się zapasów związków wysokoenergetycznych i glikogenu [94]. Bardzo charakterystyczną dla odnerwionego mięśnia jest tzw. „dedyferancjacja” typów włókien, tzn. upodobnienie się ich właściwości fizjologicznych, strukturalnych i biochemicznych. Zmieniają się zwłaszcza cechy związane z przystosowaniem do szczególnego rodzaju czynności; najbardziej na przykład obniża się aktywność enzymów przemiany oksydatywnej bądź glikolitycznej, tam gdzie była ona szczególnie wysoka [52, 127, 137].

Odnerwienie pozbawia włókno mięśniowe zarówno dopływu impulsów z motoneuronu, jak i „troficznych oddziaływań” substancji przedstawiających się z nerwu do mięśnia [59, 63]. Czynniki te w różnym stopniu rzutują na pojawienie się poszczególnych symptomów odnerwienia. Wiele z tych zależności zostało już poznanych. Na przykład atrofia mięśnia, a także zmiana charakteru skurczu mięśnia oraz pojawienie się nowych izomerów białek kurczliwych są skutkiem braku impulsów z motoneu-

ronu i nieczynności mięśnia [18, 52, 77, 90, 106, 107, 171]. Udowodniono to stosując odpowiednią stymulację, dzięki której można zapobiec wystąpieniu wymienionych objawów w mięśni odnerwionym, jak też spowodować zmianę właściwości skurczu i zmianę izomerów białek kurczliwych mięśnia unerwionego [106, 107, 158]. Brakowi natomiast „troficznych oddziaływań” przypisuje się zmianę różnych właściwości błony włókna mięśniowego i synapsy nerwowo-mięśniowej. Należy do nich obniżenie aktywności esterazy acetylocholinowej i zmiana proporcji jej podjednostek (zwłaszcza zmniejszenie się ilości podjednostki 16 S) [25, 60, 143], pojawienie się receptora acetylocholinowego [26] i wrażliwości na acetylocholinę poza obrębem synapsy [2, 180], zanik miniaturowych potencjałów spoczynkowych [2], obniżenie spoczynkowego potencjału membranowego [2, 60, 136, 165], zwiększenie przepuszczalności błony dla jonów [136, 166] oraz wystąpienie spontanicznej aktywności, tzw. „fibrilacji” [6, 62, 133, 165]. Brak oddziaływań „troficznych” zaburza też metabolizm włókna mięśniowego, np. zmienia przemianę cyklicznych nukleotydów [115]. Brak w odnerwionym włóknie mięśniowym zarówno „troficznych oddziaływań”, jak i impulsów z motoneuronu uważany jest za przyczynę zwiększania autolizy białek i wzrostu aktywności kwaśnych hydrolaz [11, 134], a także za przyczynę zmiany właściwości retikulum sarkoplazmatycznego [109, 157] i wzrostu stężenia jonów Ca^{2+} wewnątrzkomórkowego [98].

Jak się przypuszcza, u podstaw większości zjawisk wywołanych odnerwieniem, podobnie jak i zmianą unerwienia włókna mięśniowego, leży zmiana ekspresji genów i synteza innych białek [36, 56, 166]. Szczegóły regulacji tych procesów są jeszcze mało znane.

Odnerwienie włókna mięśniowego staje się przyczyną wydzielania przez nie czynnika(ów) neurotropowego stymulującego akson do tworzenia końcowych odgałęzień [89, 152]. Odnerwione włókno mięśniowe wydziela też substancje stymulujące podziały mitotyczne [121], czego efektem jest zwiększenie się w odnerwionym mięśni ilości komórek tkanki łącznej i komórek satelitarnych oraz pojawienie się mioblastów i miotub (omówione szerzej w dalszej części pracy) [125, 142]. Z drugiej strony, w motoneuronie, po przerwaniu połączenia z mięśniem, rozwijają się zmiany czynnościowe i strukturalne. Przecięcie aksonu powoduje jego degenerację (tzw. degeneracja Walleriana) [20, 39, 159].

ZANIK STRUKTURY KURCZLIWEJ W ATROFICZNYM WŁÓKNIE MIĘŚNIOWYM

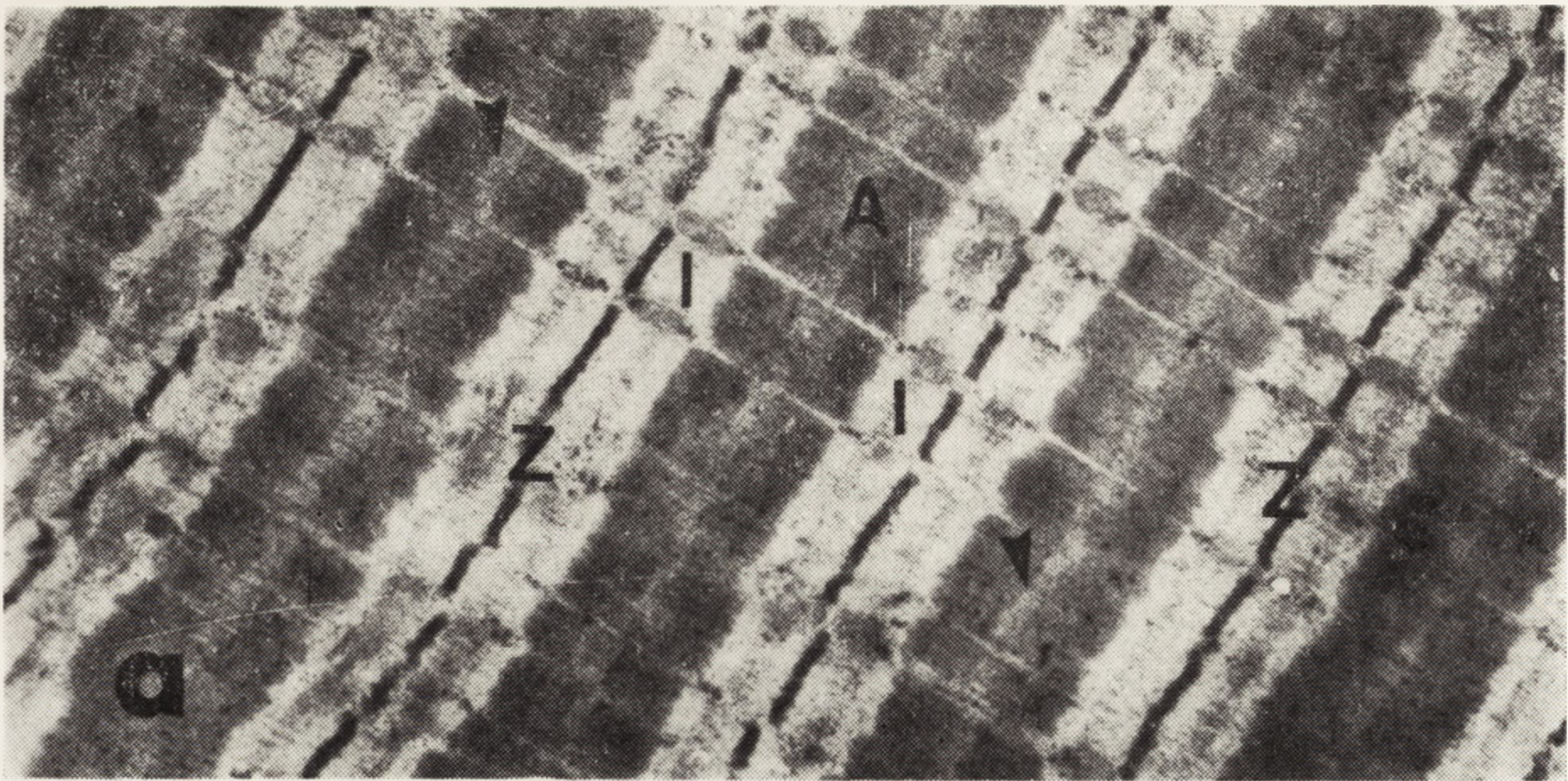
Atrofia mięśniowa wynika z przesunięcia równowagi metabolizmu białek w kierunku katabolizmu [118]. Po odnerwieniu wzmagają się w mięśni procesy kataboliczne; podwyższeniu ulega aktywność we-

wnątrzkomórkowych enzymów proteolitycznych, zarówno katepsyn — kwaśnych proteaz lizosomalnych, jak i innych proteaz, o optimum aktywności w neutralnym zakresie pH. Zwiększa się też autoliza białek mięśniowych [53, 82, 100, 130, 162, 175], zwłaszcza miofibrylarnych [82]. Procesy te mają decydujące znaczenie dla postępu atrofii mięśniowej. Zastosowanie *in vivo* inhibitorów wnątrzkomórkowych proteaz w znacznym stopniu zapobiega atrofii [73, 161]. Równocześnie ze wzmożeniem katabolizmu, w odnerwionym mięśniu ulegają zahamowaniu procesy anaboliczne: zwalnia się synteza białek [53] w wyniku zmniejszenia się ilości aktywnych rybosomów i niektórych frakcji mRNA oraz czynnika(ów) inicjacji [80, 116].

W mięśniu ulegającym atrofii zmniejsza się masa i średnica włókien, możliwe jest także zmniejszenie się ilości włókien [1, 62, 79, 82, 127, 160, 169]. W zanikających włóknach mięśniowych zmniejsza się ilość struktury kurczliwej. Zanik struktury kurczliwej może być wynikiem całkowitego wyeliminowania jej fragmentu, podczas gdy reszta pozostaje mało zmieniona [49, 99, 117, 127, 170], albo też stosunkowo równomiernego zanikania całej struktury kurczliwej przez zmniejszanie się ilości i średnicy miofibryli. W tym drugim przypadku zachowana zostaje charakterystyczna budowa struktury kurczliwej, występują w niej jedynie pewne nieregularności [84, 85, 114, 117, 127, 160, 169]. Ta droga zaniku w dobie mikroskopii świetlnej nazwana została „atrofią prostą”, podczas gdy ogniskowe nieregularności zaliczono do tzw. „zmian degeneracyjnych” („miopatycznych”) [1, 62]. „Atrofia prosta” dominuje w większości opisanych przypadków atrofii odnerwiennej, chociaż w odnerwionych włóknach rozwijają się też i zmiany ogniskowe (ryc. 1–3).

Pojawiające się w przebiegu atrofii odnerwiennej zmiany struktury kurczliwej prześlędzono dokładnie w różnych mięśniach podudzia szczura, zanikających w wyniku przecięcia nerwu kulszowego [47, 79, 82, 84, 85, 86, 88]: w mięśniu soleus posiadającym głównie włókna wolne, odporne na zmęczenie, oraz w mięśniach extensor digitorum longus (EDL) i tibialis anterior, posiadających włókna szybkie o różnych typach metabolizmu [24, 30, 40, 160]. W odnerwionych mięśniach podudzia szczura stopień zaniku włókien różnego typu, jak i poszczególnych mięśni w całości, jest zbliżony [62, 79, 82, 127, 160]. Zanik struktury kurczliwej następuje głównie drogą „atrofii prostej”, doprowadzającej w ciągu 15 dni do zmniejszenia się masy mięśni o około 50% [79, 82, 84].

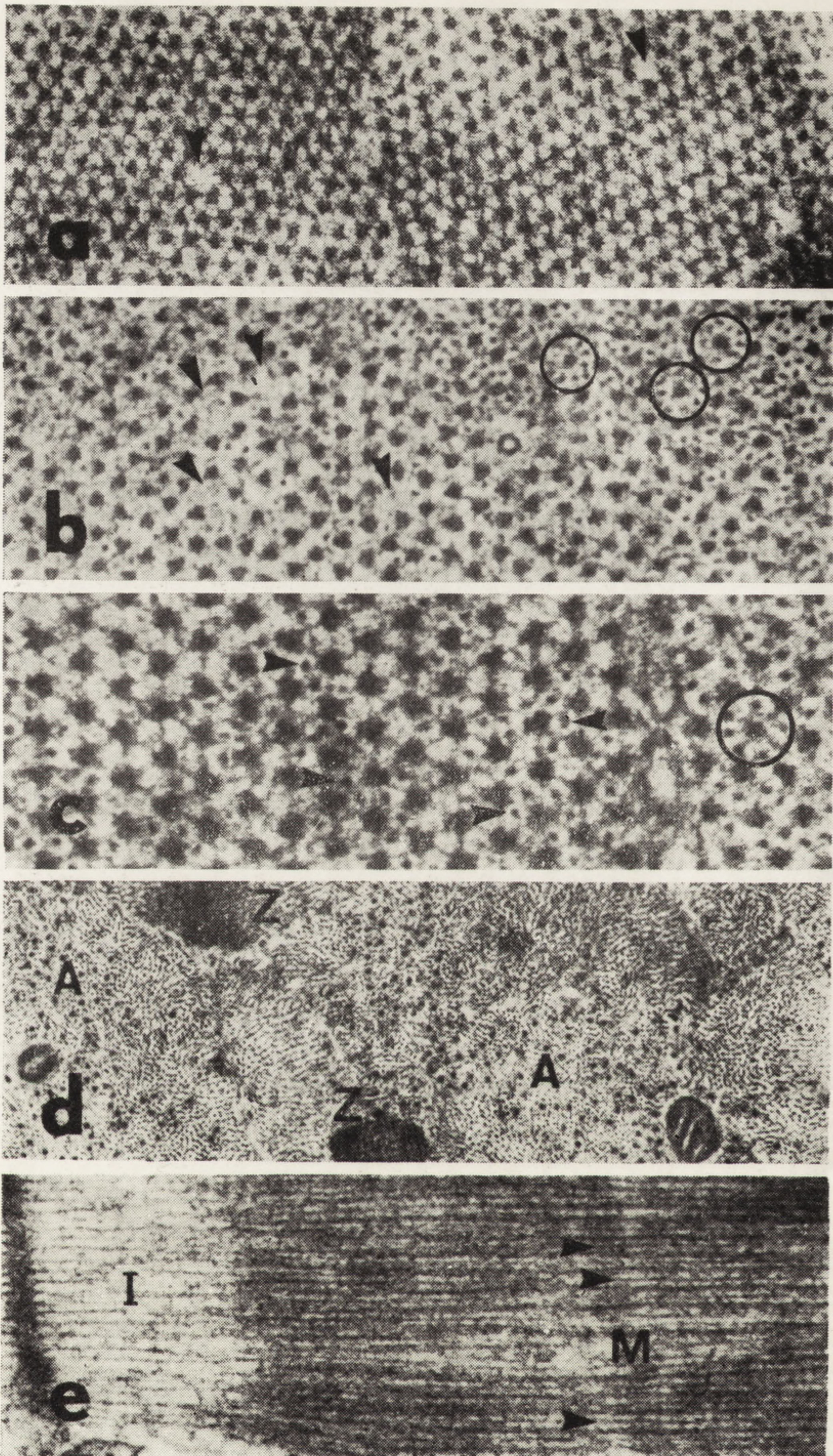
Od pierwszych dni po odnerwieniu we włóknach różnych typów wybiórczo zanikają filamenty miozynowe (ryc. 1 b, 2 a). Zanik ten ma miejsce zarówno w obwodowych, jak i centralnych regionach miofibryli (ryc. 2 a, b). Dalszy przebieg atrofii jest jednak odmienny w zależności od typu włókna mięśniowego [47, 79, 81, 86]. We włóknach przystoso-



Ryc. 1. Mięsień kontrolny i odnerwiony, przekroje podłużne

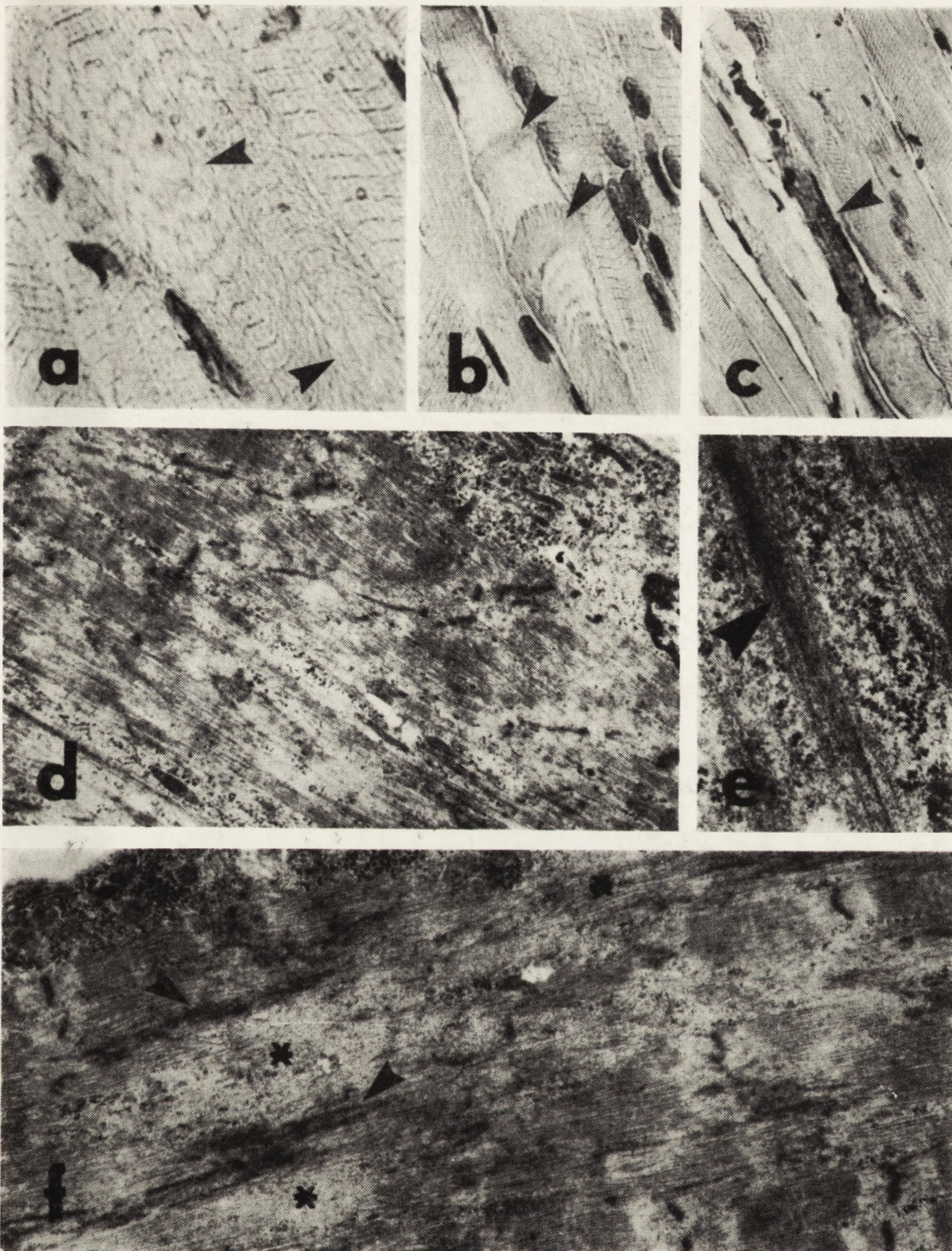
a — Mięsień kontrolny. Regularne prążki A (A), I (I) oraz linia Z (Z). Widoczna linia M (strzałki), $\times 9000$; *b* — „Atrofia prosta” włókna wolnego. Wyraźne zmniejszenie ilości filamentów miozynowych w prążku A, linia Z regularna, destrukcja linii M. Mitochondria nieliczne, przemieszczone do prążka A, $\times 13\ 000$; *c* — Dezorganizacja struktury kurczliwej we włóknie szybkim: skłębione miofibryle oraz fragmentacja i zanikanie linii Z, $\times 18\ 000$

[84, 86]



Ryc. 2. „Atrofia prosta” odnerwionego mięśnia, *a-d* przekroje poprzeczne, *e* przekrój podłużny

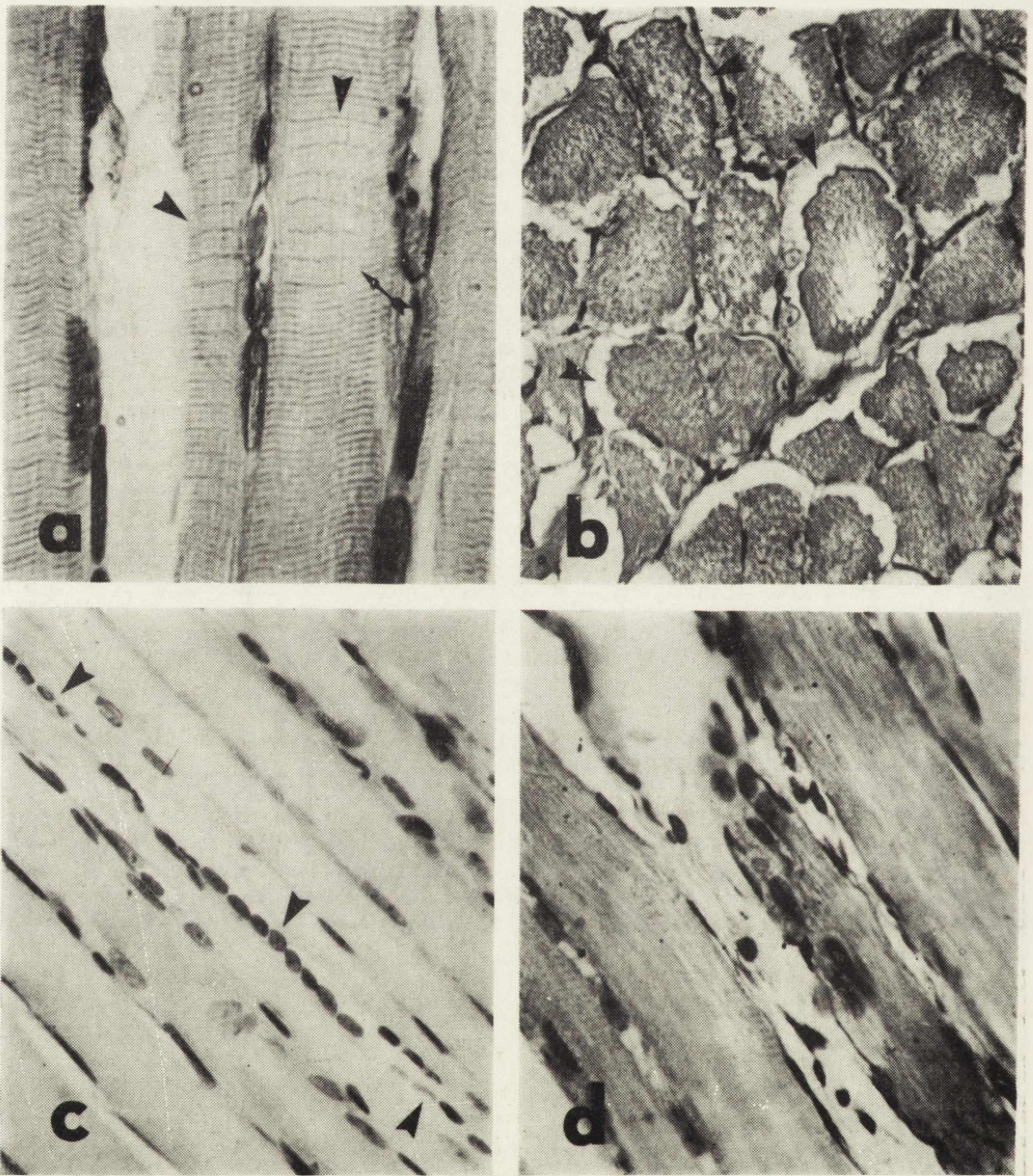
a — Włókno szybkie 7 dni po odnerwieniu. Struktura linii M regularna, w centralnych regionach miofibryli widoczne miejsca, w których brak filamentów miozynowych (strzałki), $\times 80\,000$; *b* — Włókno szybkie, odporne na zmęczenie, 27 dni po odnerwieniu. Podwyższona proporcja filamentów aktynowych do miozynowych w prążku A (zaznaczone kółkami). W obrębie linii M i strefy H widoczne braki filamentów miozynowych (strzałki), $\times 96\,000$; *c* — Włókno szybkie, odporne na zmęczenie, 20 dni po odnerwieniu. W obrębie dość regularnej linii M widoczne filamente aktynowe (strzałki). Dla porównania filamente aktynowe w obrębie prążka A (prawy brzeg); nadmiar filamentów aktynowych zaznaczony kółkiem, $\times 150\,000$; *d* — Włókno wolne 14 dni po odnerwieniu. W prążku A (A) nieliczne filamente



Ryc. 3. Zmiany ogniskowe w odnerwionym mięśni, przekroje podłużne

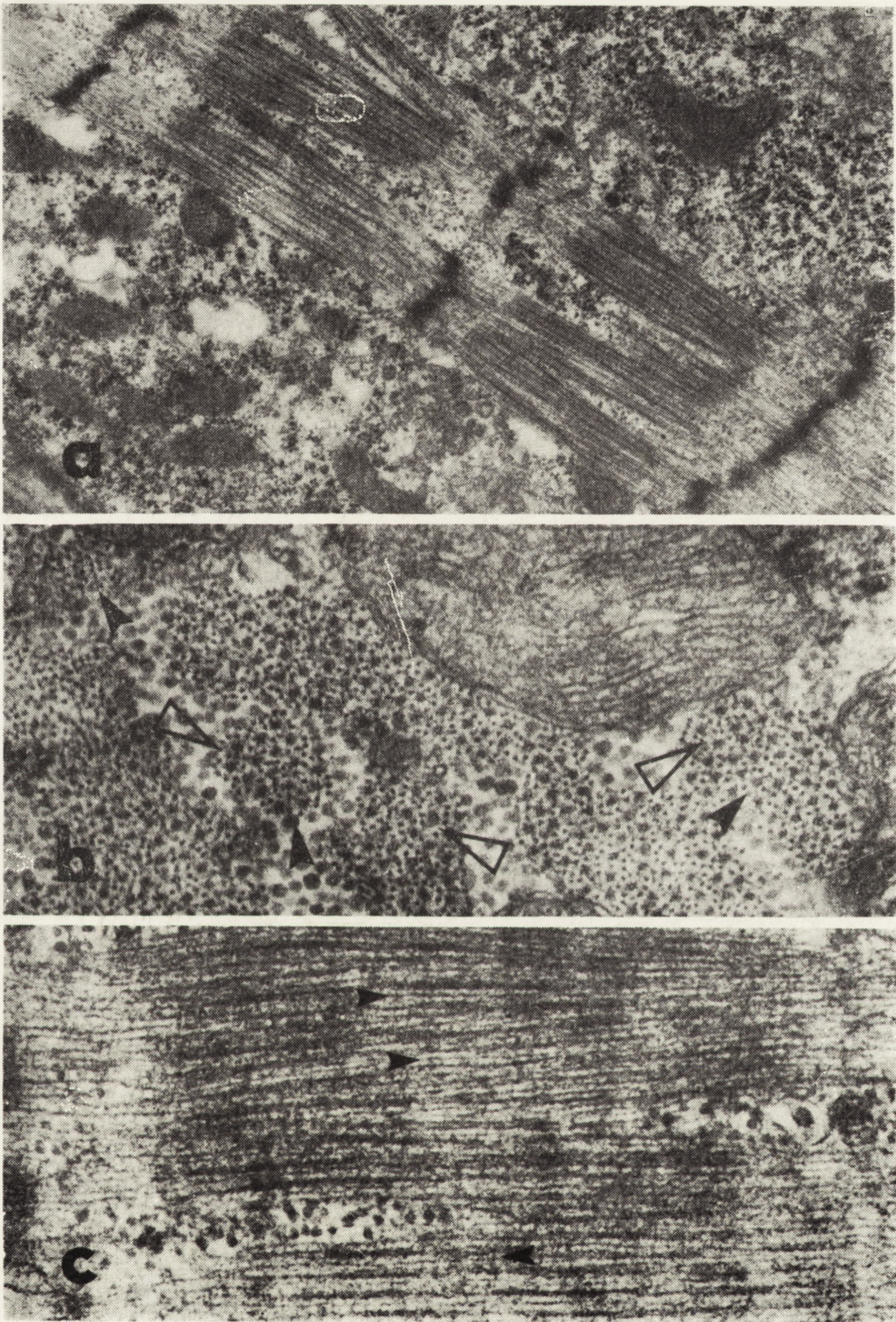
a — Dezorganizacja struktury kurczliwej (strzałki), $\times 1200$; b — Węzły skurczu (strzałki), sąsiadujące regiony włókna nadmiernie rozciągnięte, $\times 400$; c — Włókno nekrotyczne, o przerwanej ciągłości, nacieczone fagocytami (strzałka), $\times 200$; d — Dezorganizacja struktury kurczliwej, $\times 8000$; e — Powiększony fragment d. Widoczne „płynięcie” linii Z (strzałka) otoczone pólkami, $\times 32\,000$; f — Ogniska destrukcji i zaniku struktury kurczliwej (gwiazdki), w obrębie i w sąsiedztwie których widoczna „płynąca” linia Z (strzałki). W bezpośrednim sąsiedztwie struktura kurczliwa o normalnym wyglądzie, $\times 10\,000$ [81, 85 oraz praca w przygotowaniu do druku]

miozynowe otoczone licznymi filamentami aktynowymi. Brak układu heksagonalnego filamentów. Linia Z (Z) dobrze zachowana. Nieliczne małe mitochondria przemieszczone do prążka A, $\times 36\,000$; e — Włókno szybkie, wrażliwe na zmęczenie, 7 dni po odnerwieniu. W obrębie linii M (M) widoczne filamente aktynowe (strzałki); brak strefy H mimo szerokiego prążka I (I), $\times 60\,000$ [84, 86]



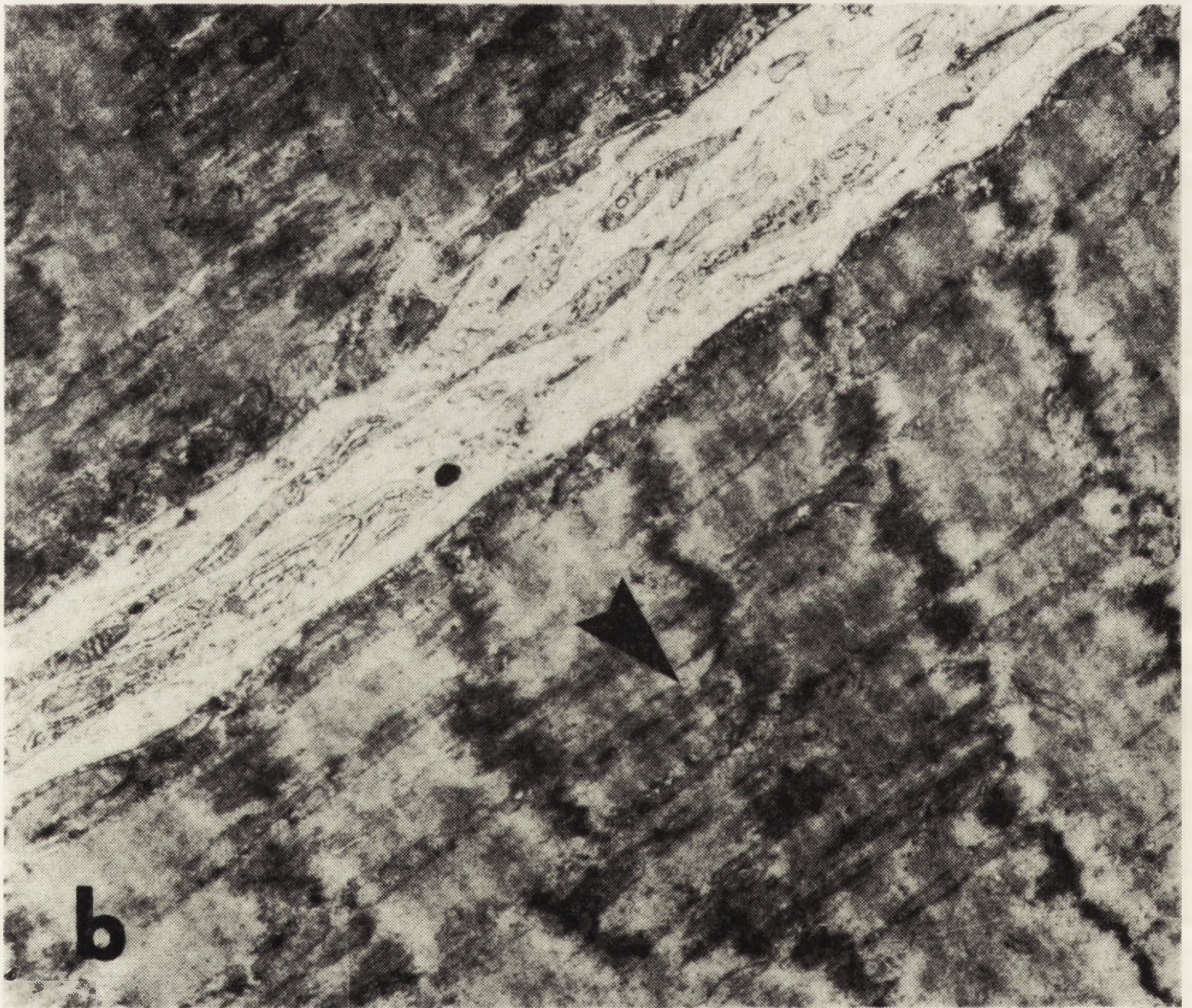
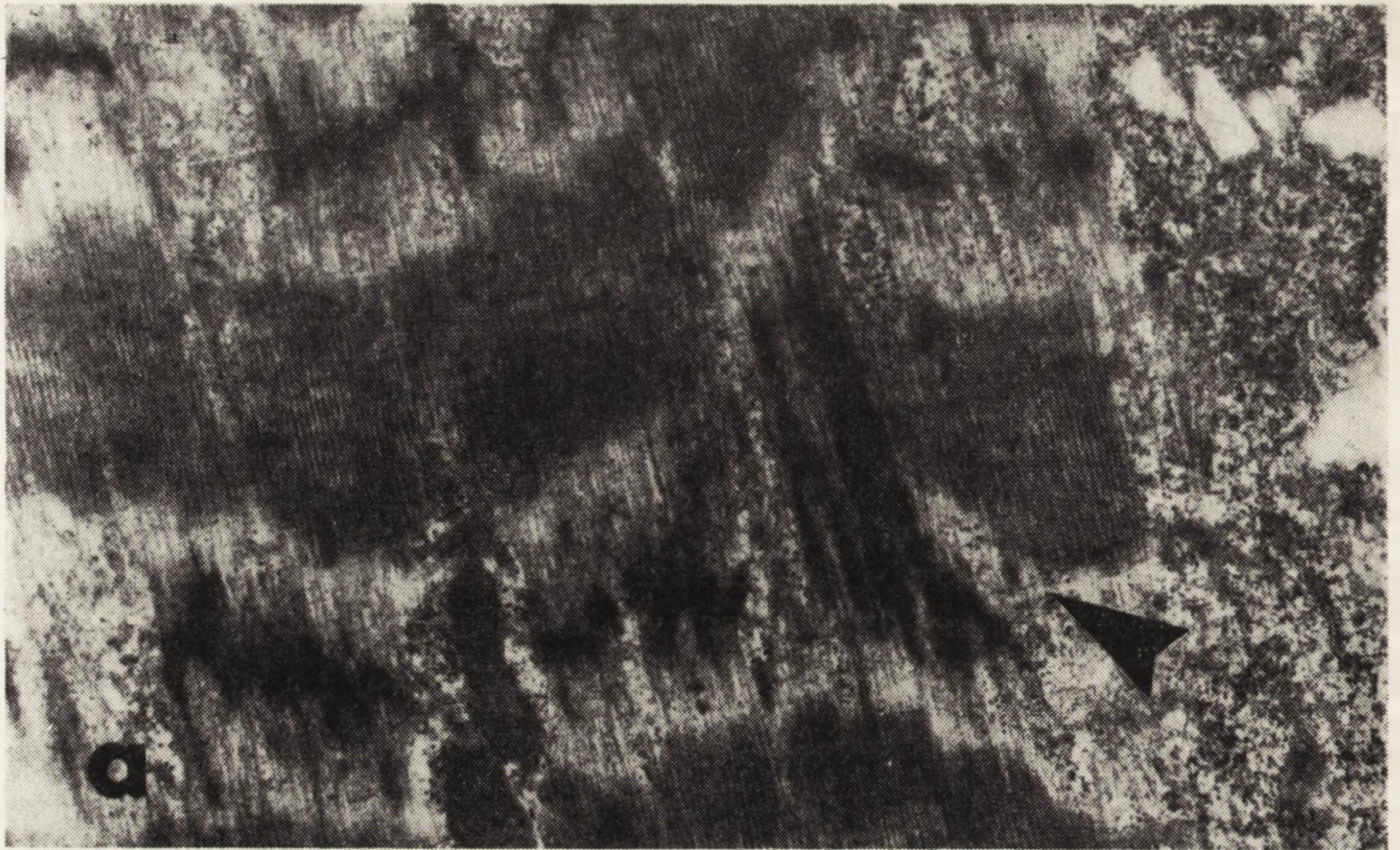
Ryc. 4. Mięsień regenerujący po innerwacji, *a, c, d* przekroje podłużne, *b* przekrój poprzeczny

a — Miejsce przypuszczalnej naprawy dezorganizacji struktury kurczliwej (strzałki): poszerzona linia Z oraz słabo wybarwiony prążek A, widoczny „dodatkowy” sarkomer (mała strzałka), $\times 1200$; *b* — Przypuszczalna produkcja nowej struktury kurczliwej w obrębie silnie zasadochłonnych pierścieni w okolicy podsarkolemalnej (strzałki), zawierających „pobudzone” jądra, $\times 400$; *c* — Regeneracja „embrionalna”. Obecne łańcuszki jąder należących prawdopodobnie do miotub (strzałki), $\times 400$; *d* — Regeneracja „przez ciągłość” zniszczonego fragmentu włókna mięśniowego. Widoczna nasuwająca się zasadochłonna cytoplazma z jądrami w kierunku pustej przestrzeni w obrębie sarkolemy, $\times 400$ [81]



Ryc. 5. Włókna mięśniowe regenerujące po reinnerwacji. Miofibrylogeneza w okolicy podsarkolemalnej. *a*, *c* przekroje podłużne, *b* przekrój poprzeczny

a — Otoczona polisomami wiązka nieregularnych, rozgałęziających się miofibryli, o mało regularnej, poszerzonej linii Z, $\times 20\,500$; *b* — Widoczne małe miofibryle (pełne strzałki); miejsca o podwyższonej proporcji filamentów aktynowych do miozynowych wskazane pustymi strzałkami, $\times 85\,000$; *c* — Brak linii M i strefy H w prążku A. Filamenty aktynowe widoczne wzdłuż całego sarkomeru (strzałki), $\times 60\,000$ [88]



Ryc. 6. Przewidywalna produkcja sarkomerów, przekroje podłużne
 a — Mięsień wolny we wczesnym okresie po reinnerwacji. Widoczny „dodatkowy” sarkomer (strzałka) oraz „płynięcie” linii Z, $\times 17\,000$; b — Mięsień utrzymywany w nadmiernym rozciągnięciu. „Płynięcie” linii Z obejmujące liczne płaszczyzny Z; „dodatkowy” sarkomer (strzałka). Różny stopień (czy też stadium) zmian w linii Z w sąsiadujących płaszczyznach Z, oraz w sąsiadujących włóknach mięśniowych, $\times 9000$ [85, 87]

wanych do długotrwałej pracy (wolnych i szybkich) zanik filamentów miozynowych prowadzi do zaburzenia heksagonalnego układu filamentów, charakterystycznego dla mięśnia prążkowanego zwierząt wyższych [33, 75], oraz do obniżenia proporcji filamentów miozynowych do aktynowych (ryc. 2 b-d). Często też jest destrukcja linii M [84, 86, 88] (ryc. 1 b). Filamenty aktynowe zanikają również, ale w mniejszym stopniu, co daje wrażenie ich nadmiaru. Jak wnioskować można z zawartości odpowiednich białek w mięśniu, ilość filamentów miozynowych odnerwionego mięśnia soleus zmniejsza się w ciągu 2 tygodni około 5-krotnie, podczas gdy aktynowych tylko dwukrotnie [88]. Często jest też zmiana lokalizacji filamentów aktynowych: ma miejsce ich przemieszczenie wzdłuż całego sarkomeru, łącznie z linią M [84, 86, 88] (ryc. 2 c, e). Temu to przypuszczalnie, a nie wyłącznie obecności filamentów konektynowych [110, 111], należy zawdzięczać zachowanie ciągłości miofibryli i sarkomerów, mimo znacznego deficytu filamentów miozynowych w atroficznym włóknie [79, 84, 88, 137]. Natomiast we włóknach „białych” mięśnia szybkiego proporcja filamentów miozynowych do aktynowych nie zmienia się, poza nieznacznym zmniejszeniem w pierwszych dniach po odnerwieniu, wynikającym z wybiórczego zaniku filamentów miozynowych (ryc. 2 a). W tym czasie obserwuje się też przemieszczenia filamentów aktynowych wzdłuż całego sarkomeru (ryc. 2 e) [86]. Dopiero w późniejszej fazie atrofii, gdy włókna poszczególnych typów upodabniają się, następuje zmniejszenie proporcji filamentów miozynowych do aktynowych we wszystkich włóknach mięśnia szybkiego. Odpowiednio do zmian ilości filamentów zmienia się też zawartość miozyny i aktyny w mięśniu [86]. Po miesiącach, a nawet latach trwania atrofii odnerwionej struktura kurczliwa jest obecna we włóknach mięśniowych mimo wielokrotnego zmniejszania się ich średnicy [62, 79, 137, 169].

Wybiórczy zanik filamentów miozynowych oraz rozmieszczenie filamentów aktynowych w całym sarkomerze należą przypuszczalnie do generalnych reakcji aparatu skurczu mięśnia prążkowanego. Obserwowane były nie tylko w atrofii odnerwiennej, ale i w innego pochodzenia atrofiach mięśniowych ssaków [16, 58, 92, 135, 150, 151, 181], a także w czasie fizjologicznej metamorfozy mięśni owadzych, kiedy to zanik filamentów miozynowych (trwający do kilkunastu godzin) poprzedza destrukcję innych elementów aparatu skurczu [9, 28]. W świecie zwierząt niższych zdarza się też odwrotna sekwencja znikania filamentów, na przykład w czasie fizjologicznej atrofii mięśnia prążkowanego kraba [122 A].

W odnerwionym mięśniu nie tylko zmniejsza się ilość filamentów miozynowych i miozyny, ale następuje również zmiana właściwości cząsteczki miozyny i zmiana aktywności ATPazy aktomiozynowej [17,

90, 163]. Spowodowane jest to syntezą innych typów (izomerów) podjednostek miozyny [18, 52, 77], na skutek zmian transkrypcji i przesunięć w odpowiednich frakcjach mRNA [68]. Synteza miozyny „wolnej” jest przy tym bardziej uzależniona od unerwienia niż „szybkiej” [18, 52, 77]. Po odnerwieniu mięśnia synteza miozyny „wolnej” ulega zahamowaniu, a włókna wolne zaczynają syntetyzować izomery „szybkie” zarówno lekkich, jak i ciężkich podjednostek miozyny [17, 18]. W mięśniu szybkim natomiast, we wczesnym okresie po odnerwieniu, zmiana typu izomerów podjednostek miozyny jest bardzo nieznaczna. Mimo to już od pierwszych dni obserwowano zaburzenia struktury miozyny mięśnia szybkiego. W późniejszym okresie po odnerwieniu włókna szybkie syntetyzować mogą równocześnie „szybkie” i „wolne” formy podjednostek miozyny [18, 52, 90]. Analogicznie do zmian izomerów podjednostek miozyny, w odnerwionym mięśniu zmieniają się izomery białek regulujących cienkiego filamentu: tropomiozyny i troponiny [19, 36]. Obserwowano też zmiany strukturalne F-aktyny, pojawiające się przypuszczalnie w miejscach interakcji z miozyną oraz pomiędzy cząsteczkami aktyny [12].

W początkowej fazie atrofii odnerwiennej linia Z w miofibrylach jest na ogół dobrze zachowana (ryc. 1 b) i posiada szerokość odpowiednią do typu włókna mięśniowego [51, 84, 85, 92, 158, 169]. W późniejszej fazie, w miarę jak włókna mięśniowe tracą specyfikę typów, linia Z również traci cechy charakterystyczne dla poszczególnych typów włókien [86].

W odnerwionych włóknach mięśniowych następuje często przemieszczenie względem siebie sąsiadujących miofibryli i całych ich wiązek [58, 84, 169], świadczące o dezintegracji płaszczyzn Z [84]. Układ filamentów pośrednich [83, 101] odnerwionego mięśnia ulega przypuszczalnie zaburzeniu, na co wskazuje oprócz przemieszczenia miofibryli, także nieprawidłowe ułożenie i innych organelli, jak jądra czy mitochondria (ryc. 1 b, 2 d) [51, 62, 79, 84, 169]. Za dezintegracją układu filamentów pośrednich przemawia też obniżenie w atroficznym mięśniu zawartości desminy [85, 168] — głównego białka filamentów pośrednich [83, 101]. Być może, że w zaburzeniu tego właśnie układu tkwi przyczyna i początek niektórych przynajmniej zmian destrukcyjnych aparatu skurczu.

ZMIANY OGNISKOWE STRUKTURY KURCZLIWEJ ODNERWIONEGO WŁÓKNA MIĘŚNIOWEGO

W strukturze kurczliwej odnerwionego włókna mięśniowego rozwijają się różnego typu ogniskowe nieregularności (ryc. 1 c, 3 a-f), których pochodzenie ani znaczenie nie jest jeszcze w pełni jasne. Niektóre z nich,

jak się zdaje, wiodą do destrukcji i zaniku struktury kurczliwej, a nawet zaniku całego lub części włókna (ryc. 3 c), inne mają przypuszczalnie związek z przebudową lub naprawą struktury kurczliwej. Zmiany o różnym charakterze często znajdują się obok siebie [29, 49, 50, 144], co sugeruje, że reprezentują stadia tego samego procesu lub że różne procesy zachodzą równocześnie w tym samym regionie. Pojawienie się rozmaitych zmian ogniskowych aparatu skurczu obserwowano, zależnie od modelu doświadczalnego, w różnych typach włókien, jak też w różnym czasie po odnerwieniu.

W mięśni odnerwionym następuje często ogniskowa dezorganizacja aparatu skurczu (ryc. 3 a), polegająca na skłębieniu miofibryli i utracie regularnego układu filamentów oraz „fragmentacji” linii Z (ryc. 1 c). Zmiany takie pojawiają się najczęściej w okolicy podsarkolemalnej i prawdopodobnie szybko prowadzą do całkowitego zaniku struktury kurczliwej. Sąsiadujące regiony włókna mięśniowego zachowują przy tym zwykle regularną budowę (ryc. 3 a, f) [47, 58, 79, 92, 99, 117, 127, 170]. Tego typu ogniska destrukcyjne nie są cechą wyłącznie atrofii odnerwiennej, lecz raczej właściwością mięśnia niepracującego, niezależnie od przyczyny nieczynności [27, 58, 99, 170]. Stanowią one drogę pozbywania się przez włókno mięśniowe nadmiaru nieużytecznej struktury kurczliwej [99].

W odnerwionych włóknach mięśniowych obserwuje się tzw. „węzły skurczu” (regiony nadmiernego skurczu) [79, 81]. Towarzyszy im zwykle znaczne rozciągnięcie sąsiadujących sarkomerów [29] (ryc. 3 b). Spotkać też można w mięśni po odnerwieniu zmiany, przypominające swym charakterem autolizę pośmiertną [127, 169 oraz obserwacje własne]. W trakcie autolizy pośmiertnej, jak wiadomo, w pierwszej kolejności znika linia Z, a następnie filamenty aktynowe; filamenty miozynowe i prążek A utrzymują się najdłużej [31, 108]. Ogniska o charakterze zbliżonym do autolizy pośmiertnej występują również w mięśni unieruchomionym [27], niedokrwionym [93], w atrofii starczej [49], po mechanicznym uszkodzeniu tkanki mięśniowej [112] oraz w schorzeniach mięśniowych i intoksykacjach [104]. Zmiany przypominające autolizę pośmiertną rozwijają się też w mięśni po wyczerpującym wysiłku [172], co sugeruje, że należą one do zespołu szeroko rozumianych reakcji adaptacyjnych tkanki mięśniowej.

Wymienione zmiany włókna mięśniowego prowadzić mogą do jego martwicy z następującą fagocytozą [29, 49], stwierdzaną sporadycznie w mięśni odnerwionym (ryc. 3 c) [62, 79, 81, 117, 175]. W przypadku mniej intensywnych procesów powodują one przypuszczalnie tylko ubytek w strukturze kurczliwej (ryc. 3 f) i zwięźlenie średnicy włókna mięśniowego, bądź też kończą się naprawą uszkodzenia [99].

Pojawienie się w żywej komórce zmian o charakterze martwicy pośmiertnej jest, jak to udowodniono w ostatnich latach, wywołane wtargnięciem do komórki jonów Ca^{2+} zewnątrzkomórkowego [38, 45, 66, 104]. Przypuszczalnie sama już obecność jonów Ca^{2+} w dużym stężeniu (około 10^{-3} M) [66, 140], a przede wszystkim uczynnienie wewnątrzkomórkowych proteaz aktywowanych tymi jonami [14, 32, 76, 105], staje się przyczyną niszczenia i śmierci komórki. Wywołane odnerwieniem zaburzenie czynności błony włókna mięśniowego [2, 38, 165, 166] może ułatwić, podobnie jak ma to miejsce przy uszkodzeniach błony komórkowej z innych przyczyn [105, 140], przedostawanie się do wewnątrz włókna nadmiernych ilości jonów Ca^{2+} zewnątrzkomórkowego. Tak można tłumaczyć powstawanie w odnerwionym włóknie mięśniowym zarówno węzłów skurczu, jak i ognisk nekrotycznych [45, 104, 105]. Do pojawienia się ognisk autolizy we włóknie mięśniowym przyczyniają się też z pewnością uwalniane z lizosomów katepsyny [34, 138, 177].

W odnerwionych włóknach spotykane są poszerzenia i nieregularności linii Z, znane pod nazwą jej „płynięcia” lub „rozmarywania” („Z-line streaming”) [42, 43, 47, 79, 81, 127, 144, 169] (ryc. 3 d-f). Zmiany te występują głównie we włóknach oksydatywnych. Intensywność ich oraz czas od momentu odnerwienia, w którym się pojawiają, różnią się znacznie w opisach różnych autorów. Włókna mięśniowe posiadające tego typu ognisko, nazywane są „tarczowatymi” („target fibers”) [42]. Spotyka się je też często w mięśniach poddanych różnym warunkom eksperymentalnym, w intoksykacjach oraz w mięśniach patologicznie zmienionych [7, 50, 92, 135, 144, 146]. Wiele faktów wskazuje, iż zmiany w linii Z o takim charakterze są raczej symptomem naprawy lub przebudowy niż destrukcji aparatu skurczu [7, 37, 49, 50, 69, 70, 79, 85, 87, 92, 93]. Pojawiają się one powszechnie we wczesnym okresie po reinnerwacji, we włóknach o ewidentnych cechach regeneracji, równocześnie ze wzrostem masy mięśnia. Wskazuje to na niewątpliwy związek tych struktur z naprawą albo przebudową aparatu kurczliwego [81, 85, oraz dane niepublikowane], tym bardziej iż poszerzenia linii Z o takim samym charakterze występują w aparacie skurczu ulegającym przebudowie [41, 70, 87].

REGENERACJA PO REINNERWACJI ATROFICZNEGO WŁÓKNA MIĘŚNIOWEGO

Ponowne unerwienie (reinnerwacja) odnerwionego mięśnia powoduje cofnięcie się atrofii oraz innych wywołanych odnerwieniem zmian i po jakimś czasie powrót do stanu normalnego zarówno włókien mięśniowych [61, 81, 131, 174], jak i unerwiających je motoneuronów [56, 159]. Przydatnym modelem do badania tych procesów okazał się doj-

rzały mięsień ulegający przejściowej atrofii w wyniku uszkodzenia nerwu, bez przerywania jego ciągłości. Nerw regenerując unerwia ponownie ten sam mięsień [6, 61]. W początkowym okresie reinnerwacji mięśnia część jego włókien otrzymuje unerwienie od więcej niż jednego aksonu. To nadmierne unerwienie zostaje wyeliminowane w ciągu paru tygodni [91, 114].

Regeneracja mięśnia atroficznego po reinnerwacji została przebadana różnymi metodami w mięśniach podudzia szczura po zmiżdżeniu nerwu kulszowego. Stwierdzono, że atrofia odnerwienna postępuje identycznie po zmiżdżeniu nerwu, jak po jego przecięciu, aż do chwili, gdy po 14–20 dniach regenerujący nerw osiąga mięśnie podudzia i powoduje ich reinnerwację [6, 10, 61, 81, 82, 88, 143]. Następuje wówczas wzrost masy mięśni i średnicy włókien mięśniowych, zwiększa się też gwałtownie ilość mitochondriów, ziarnistości glikogenu i polisomów we włóknach [81, 82, 85, 88, 174]. W około miesiąc po reinnerwacji stwierdzono zbliżoną do normalnej strukturę i czynność mięśnia [81, 88, 143, 174] oraz czynności motoneuronów [10]. Powrót do stanu w pełni normalnego zarówno motoneuronów, jak i struktury, funkcji i ilości włókien mięśniowych trwał jednak kilka miesięcy [6, 61, 81, 84, 88, 91, 114, 131, 142, 159, 174]. Po przebytych procesie pozostawały w mięśniu jedynie nieznaczne ślady w postaci złogów kolagenu między włóknami i zwiększonej ilości komórek satelitarnych [81].

Po reinnerwacji włókna mięśniowego następuje rekonstrukcja uszkodzonego w okresie atrofii aparatu skurczu (ryc. 4, 5). Cofają się lub ulegają naprawie ogniskowe uszkodzenia, ustępują objawy „atrofii prostej” oraz uzupełniony zostaje deficyt struktury kurczliwej, poprzez jej produkcję *de novo*. Następuje też naprawa uszkodzonych włókien mięśniowych drogą regeneracji „przez ciągłość”, jak też dzięki elementom regeneracji typu „embrionalnego” [81, 85, 88], znanych z badań regeneracji zniszczonego mięśnia. Procesy te zostaną kolejno omówione.

Od pierwszych dni po reinnerwacji nie spotyka się już ogniskowych nieprawidłowości, występujących w aparacie skurczu mięśnia atroficznego, takich jak węzły skurczu czy ogniska destrukcyjne [81]. Naprawa ogniskowych uszkodzeń i ubytków aparatu skurczu zaczyna się przypuszczalnie od rekonstrukcji płaszczyzn Z i formowania filamentów aktynowych. W następnym etapie dochodzi do uzupełnienia filamentów miozynowych i formowania prążka A [81 oraz dane nieopublikowane] (ryc. 4 a).

W pierwszych dniach po reinnerwacji cofają się objawy „atrofii prostej”. Zmniejsza się deficyt filamentów miozynowych, dzięki gwałtownemu wzrostowi ich ilości. Równocześnie ułożenie filamentów staje się regularniejsze niż w mięśniu atroficznym, a w ciągu kilku kolej-

nych dni wraca prawidłowy heksagonalny ich układ oraz ulega zwiększeniu średnica miofibryli. Ilość filamentów aktynowych wzrasta w tym wczesnym okresie po reinnerwacji tylko bardzo nieznacznie [88]. Dynamika zmian ilości filamentów miozynowych i aktynowych w mięśniu zarówno atroficznym, jak i regenerującym, wskazuje na znaczną labilność filamentów miozynowych i miozyny, a stabilność filamentów aktynowych i aktyny. Sugeruje ona również, że zarówno degradacja, jak i synteza aktyny i miozyny są regulowane niezależnie [84, 88], podobnie jak to stwierdzono w mięśniu embrionalnym [35].

W pierwszych dniach po reinnerwacji, równoległe z ustępowaniem symptomów „atrofii prostej”, pojawiają się w strukturze kurczliwej sarkomery „dodatkowe” (ryc. 4 a, 6 a), a także poszerzenia i nieregularności linii Z oraz jej „płynięcie” (ryc. 6 a). Równocześnie, w pierwszych dniach po reinnerwacji, obserwuje się znaczną ilość filamentów pośrednich pomiędzy liniami Z sąsiadujących miofibryli i w okolicy podsarkolemalnej [83, 85]. Szybko też wzrasta zawartość desminy w mięśniu [85]. Wskazywałoby to na integrowanie się płaszczyzn Z, a tym samym całej struktury kurczliwej. W ciągu kilku następnych dni linia Z staje się na ogół regularna [81, 85].

Od początku regeneracji po reinnerwacji, ale najintensywniej w drugim i trzecim jej tygodniu, mięsień uzupełnia powstały w czasie atrofik deficyt struktury kurczliwej, poprzez formowanie nowych miofibryli. Ma ono miejsce głównie w okolicy podsarkolemalnej [81, 88] (ryc. 5 a). Nowo powstające miofibryle charakteryzują się częstymi rozgałęzieniami, zmienną średnicą i długością sarkomerów, szeroką i nieregularną linią Z, brakiem linii M (ryc. 5 a), oraz nadmiarem filamentów aktynowych (ryc. 5 b). Filamenty aktynowe często też rozlokowane są wzdłuż całego sarkomeru (ryc. 5 c) [88], podobnie jak to obserwowano w czasie miofibrylogenezy w mięśniu rozwijającym się [48, 95, 103, 122, 124, 128, 145, 148] oraz przerastającym [122]. Wydaje się, że w analogiczny sposób jak po reinnerwacji, formowana jest nowa struktura kurczliwa w mięśniu przeciążonym pracą [122], a także regenerującym po zwolnieniu unieruchomienia [27]. Cały proces formowania miofibryli w dojrzałym mięśni prążkowanym jest bardzo zbliżony lub identyczny z miofibrylogenezą w mięśniu rozwijającym się [3, 48, 95, 97, 128].

REGENERACJA ZNISZCZONEGO WŁÓKNA MIĘŚNIOWEGO

Uszkodzona lub zniszczona tkanka mięśniowa wykazuje znaczną zdolność regeneracji. Przebieg regeneracji jest mało zależny od przyczyny uszkodzenia mięśnia, a o wiele bardziej od stopnia tego uszkodzenia oraz od warunków w jakich regeneracja zachodzi. Szczególnie istotne są obecność unerwienia oraz dobre ukrwienie i zachowanie ciągłości

sarkolemy [4]. Najczęściej, regeneracja zniszczonego mięśnia przebiega drogą „embrionalną”, tzn. analogicznie jak w mięśni rozwijającym się. W procesie regeneracji „embrionalnej” włókna mięśniowe powstają z jednojądrzastych komórek miogennych, zwanych satelitarnymi [3, 5, 113, 125, 141, 147, 182]. Komórki te leżą pomiędzy sarkolemą a błoną podstawną; jądra ich stanowią kilka procent obecnych w mięśni jąder [154]. W przeciwieństwie do jąder włókien mięśniowych, zachowały one zdolność do podziałów mitotycznych i do syntezy DNA [113, 120, 132, 154]. W przypadku uszkodzenia lub odnerwienia włókna mięśniowego, komórki satelitarne zostają uaktywnione i ulegając podziałom mitotycznym stają się źródłem mioblastów [15, 23, 125, 126, 132, 142]. Mioblasty ulegają fuzji tworząc podłużnego kształtu komórczaki — miotuby. Miotuby drogą dalszej fuzji z innymi miotubami oraz z mioblastami powiększają się i, dojrzewając czynnościowo i morfologicznie, przekształcają się we włókna mięśniowe [23]. Zarówno proces fuzji, jak i wzrost miotub oraz ich podłużne ukształtowanie regulowane są przez białko fibronektynę [4, 129]. Dla regulacji tej niezbędna jest obecność kolagenu [21, 64] oraz innych białek i mukopolisacharydów [4]. Regeneracja „embrionalna” w sprzyjających warunkach doprowadza do całkowitej naprawy zniszczonego lub uszkodzonego włókna mięśniowego, zwłaszcza jeśli jego sarkolema była zachowana [4]. Formowanie struktury kurczliwej w czasie regeneracji „embrionalnej” przebiega najprawdopodobniej analogicznie jak w mięśni rozwijającym się [4, 15].

W odnerwionym mięśni pojawiają się symptomy regeneracji „embrionalnej” w postaci zwiększenia się ilości komórek satelitarnych oraz powstawania mioblastów i miotub [79, 132, 142]. Procesy te przybierają na intensywności po reinnerwacji mięśnia [81] (ryc. 4 c). W jakim stopniu wpływają one na naprawę atroficznych włókien mięśniowych nie wiadomo. Niewątpliwie komórki satelitarne są źródłem jąder dla włókien mięśniowych [22, 120]. Nie bez znaczenia dla regenerującego mięśnia musi być też fakt, iż miotuby produkują czynnik(i) stymulujący motoneuron i pobudzający akson do wytwarzania końcowych odgałęzień [123]. Miotuby powstałe w odnerwionym mięśni ulegają regresji i zanikają [142]. Taki sam los spotyka mioblasty i miotuby rozwijające się w dalszych tygodniach po reinnerwacji, gdy proces regeneracji traci dynamikę [81]. Część tych miotub przekształca się jednak we włókna mięśniowe; wskazuje na to obecność „młodych włókien” w mięśni parę miesięcy po reinnerwacji [81].

Powstałe w odnerwionym mięśni zniszczenia fragmentów włókien naprawiane mogą być drogą regeneracji „przez ciągłość” [81]. Proces określany jako regeneracja „przez ciągłość” („per continuum”) [4, 57, 65, 96, 147] polega na tworzeniu się w ocalałej części włókna mięśni-

wego wypustek, przypominających budową miotuby. Wypustki te wysuwają się w kierunku zniszczonej okolicy, gdzie następnie przekształcają się i dojrzewają, uzupełniając ubytek włókna mięśniowego [57, 65]. Regeneracja „przez ciągłość” rzadko prowadzi do pełnej naprawy uszkodzenia. Jej prawidłowy przebieg zależy bowiem od zbyt wielu czynników, z których najważniejsze to obecność (często też rekonstrukcja) unerwienia, unaczynienia, ścięgien i powięzi, a także optymalnych ilości wielu białek, w tym fibronektyny i kolagenu. Konieczne dla prawidłowej regeneracji jest też odpowiednie naciągnięcie tkanek [4]. Inny wariant regeneracji „przez ciągłość” zachodzi w przypadku martwicy części włókna mięśniowego, przy zachowanej ciągłości sarkolemy. Wówczas zniszczony odcinek, łącznie z aparatem kurczliwym zostaje odbudowany przez nasuwającą się z ocalałej części włókna sarkoplazmę z organelami [96, 147] (ryc. 4 d).

Źródłem jąder dla regenerującego mięśnia prócz komórek satelitarnych mogą stawać się też niektóre komórki tkanki łącznej pochodzące z układu naczyniowego [4, 96, 153] oraz komórki niektórych części układu nerwowego [176]. Podczas regeneracji „embrionalnej”, syntetyzowana jest miozyna „szybka” zamiast „wolnej” lub równoległe z nią. Podobnie dzieje się w regenerujących „przez ciągłość” fragmentach włókien. Obecność unerwienia ma jedynie nieznaczny wpływ na to zjawisko [96].

PRZEBUDOWA STRUKTURY KURCZLIWEJ

Zmiana charakteru czynności mięśnia może powodować zmianę właściwości włókien mięśniowych, łącznie z całkowitą transformacją ich typów [89]. Zmieniona czynność mięśnia staje się też często przyczyną zmiany średnicy i ilości włókien oraz masy mięśnia [69, 71].

Zwiększenie się liczby włókien w dojrzałym mięśniu może następować dzięki ich podłużnemu dzieleniu się [71] lub drogą tworzenia nowych włókien, przypuszczalnie analogicznie jak w przebiegu miogenezy [155]. W mięśniu, z kolei, którego czynność stała się mniej intensywna, ilość włókien może ulegać redukcji [46]; w jaki sposób do tego dochodzi nie wiadomo.

Zgodnie z transformacją typów włókien, następuje przebudowa struktury kurczliwej, która może ulec znacznym zmianom w ciągu niewielu dni [8, 41, 155]. Przebudowa struktury kurczliwej może polegać na zwiększeniu bądź zmniejszeniu średnicy i ilości miofibryli we włóknie mięśniowym, na zmianie ilości sarkomerów w miofibrylach, a także na przebudowie poszczególnych elementów miofibryli, np. linii Z [41, 139]. Liczba miofibryli we włóknie mięśniowym zwiększa się dzięki produkcji nowych miofibryli [22, 88, 97] lub też na skutek podziałów mio-

fibryli już istniejących [54]. Podział taki zapoczątkowany zostaje pęknięciem linii Z i powstaniem szczeliny pomiędzy filamentami, która obejmuje następne sarkomery. W szczelinie formują się kanaliki retikulum sarkoplazmatycznego, prowadząc do powstania oddzielnych mniejszych od macierzystego miofibryli [149]. Czy zachodzi może proces odwrotny, tzn. łączenie się uformowanych miofibryli w większe, nie wiadomo; możliwość taką sugeruje obecność rozgałęzionych miofibryli w miejscach tworzenia się struktury kurczliwej [88] (ryc. 5 a, c). Średnica uformowanych miofibryli może też zmieniać się przez przyłączanie bądź utratę filamentów [3, 97, 119, 127], odbywającą się głównie w obwodowych regionach miofibryli [44, 117, 119]. W przypadku jednak dużej intensywności tych procesów, mogą one obejmować również centralne części miofibryli w mięśni ulegającym atrofii (ryc. 2 a, b) lub regenerującym po reinnerwacji, a także w niektórych stanach patologicznych [84, 88, 117, 144].

Wiadomo, że skurcz włókna mięśniowego jest najbardziej efektywny tylko przy pewnym określonym zakresie długości rozkurczowej sarkomerów (zwykle 2,1-2,4 μm) [13, 24, 173, 179]. Długość ta jest nieco większa dla mięśnia wolnego niż dla szybkiego [67] i różna dla skurczu izomerycznego i izotonicznego tego samego włókna [173]. Dla osiągnięcia więc optymalnej długości sarkomerów może zmieniać się ich ilość w miofibrylach. Staje się to w przypadku zmiany charakteru czynności włókna mięśniowego [41, 164, 179], jak też w razie zmiany długości mięśnia (wówczas następuje niezależnie od obecności unerwienia i od czynności). Liczba sarkomerów może w ciągu niewielu dni zwiększyć się bądź zmniejszyć nawet o 40% liczby wyjściowej [8, 55, 74, 178, 179]. Przyrostowi ilości sarkomerów towarzyszy wzrost masy mięśnia oraz zwiększenie się długości i średnicy włókien, jak też wzmożona synteza białka [8, 55]. Rozciąganie mięśnia jest zatem czynnikiem indukującym jego wzrost [8] lub hipertrofię [44]; biernym rozciąganiem tłumaczy się przerost niektórych mięśni po odnerwieniu [8, 69]. I odwrotnie, redukcji ilości sarkomerów towarzyszy zmniejszenie długości i średnicy włókien mięśniowych, oraz spadek masy mięśnia, czyli atrofia [156, 179].

Mechanizmy, poprzez które następuje zmiana ilości sarkomerów w miofibrylach, są mało zbadane. W jaki sposób dochodzi do redukcji ilości sarkomerów na razie nie wiadomo. Poznane są natomiast częściowo drogi tworzenia się nowych sarkomerów. Miejscem powstawania nowych sarkomerów w mięśni rozwijającym się jest głównie okolica dystalnego przyczepu ścięgna [178]. Struktury zwane sarkomerami „dodatkowymi” lub „podzielonymi” „extra” lub „splitting” (ryc. 4 a, 6 a, b) uważane są za formy przejściowe w procesie przebudowy aparatu skur-

czu [102, 103, 167]. Opisano kilka przypuszczalnych mechanizmów tworzenia się nowych sarkomerów; w każdym z nich kluczową rolę odgrywa linia Z, a raczej płaszczyzna Z. Na przykład, we włóknach mięśnia sercowego linia Z ulega poszerzeniu aż do wielkości sarkomeru. Na miejscu tej szerokiej linii Z są następnie formowane filamenty aktynowe i miozynowe, tworzące nowy sarkomer [102, 167]. Odmienną drogę tworzenia się sarkomerów zaobserwowano w komórkach Purkiniego serca ssaków [167] oraz w mięśniach owadów [72]: linia Z „rozdwaja się” i obie, położone początkowo blisko siebie, linie Z połączone są filamentami o średnicy mniejszej od filamentów aktynowych. Przestrzeń pomiędzy tymi liniami Z ulega powiększeniu i formowane są w niej filamenty aktynowe i miozynowe. Według innego jeszcze mechanizmu przybiera sarkomerów w mięśniach kraba [78]. Stwierdzono mianowicie pękanie filamentów miozynowych w środkowej części prążka A i formowanie się w miejscu pęknięcia linii Z i filamentów aktynowych. Równocześnie podzielone filamenty miozynowe ulegają dobudowaniu do normalnej długości i wchodzi w skład prążków A nowo powstałych sarkomerów.

W mięśni szkieletowym ssaków obserwowano struktury mogące odpowiadać wszystkim z opisanych mechanizmów podziału sarkomerów [85, 87, 122, oraz dane nieopublikowane]. W mięśni wolnym szczura przyrost ilości sarkomerów następuje, jak się wydaje, głównie poprzez poszerzenie linii Z [87], podobnie jak w mięśni sercowym [102, 167]. Proces ten przypomina bardzo „płynięcie” linii Z. Może on obejmować wiele sąsiadujących płaszczyzn Z równocześnie (ryc. 6 b), zarówno w przyścięgowych, jak i w środkowej części włókna mięśniowego [87]. Przedstawiony obraz zmian budowy aparatu skurczu, wynikłych ze zmian unerwienia i czynności bądź ze zmian długości mięśnia, ukazuje ogromną zdolność do adaptacji i plastyczność struktury kurczliwej. Szczególnie labilne są filamenty miozynowe i miozyna. Następujące w krótkim czasie zmiany ilości miozyny, jak też zmiana izomerów jej podjednostek, pozwalają na szybkie przystosowanie się mięśnia do potrzebnego rodzaju czynności. Plastyczność struktury kurczliwej należałoby zatem traktować jako końcowy element w wielopoziomym systemie regulacji i kontroli ruchu, warunkujący uczenie się nowych czynności.

PODZIĘKOWANIE

Pragnę podziękować doc. dr. hab. Irenie Kąkol i prof. dr. hab. Witoldowi Drabikowskiemu za krytyczne uwagi w czasie pisania tej pracy oraz pani Hannie Chomontowskiej i mgr Dorocie Kulesza-Lipce za pomoc w przygotowaniu pracy do druku. Dziękuję również Wydawnictwu Springer-Verlag za uprzejme wyrażenie zgody na przedrukowanie zdjęć z czasopisma „Cell and Tissue Research”.

LITERATURA

- [1] ADAMS R. D., DENNY-BROWN D., PEARSON C. M., Diseases of muscle. A study in pathology, A Hoeber Medical Book, Harper and Row, New York 1967.
- [2] ALBUQUERQUE E. X., McISAAC R. J., Fast and slow mammalian muscles after denervation, *Exp. Neurol.*, **26**: 183-202, 1970.
- [3] ALLBROOK D., An electron microscopic study of regenerating skeletal muscle, *J. Anat.*, **96**: 137-152, 1962.
- [4] ALLBROOK D., Skeletal muscle regeneration, *Muscle Nerve*, **4**: 234-245, 1981.
- [5] ALOISI M., Patterns of muscle regeneration, [w] *Regeneration of striated muscle, and myogenesis*, red. Mauro A., Shafiq S. A., Milhorat A. T., Excerpta Medica, Amsterdam 1970, 180-193.
- [6] ASKMARK H., AQUILONIUS S-M., FAWCETT P., NORDBERG A., ECKER-NÄS S-A., Acetylcholine synthesizing activity and nicotinic binding sites in rat hind limb muscles during reinnervation, *Acta Physiol. Scand.*, **116**: 429-435, 1982.
- [7] BAKER J. H., KAUFMAN M. W., HALL-CRAGGS E. C. B., Effects of tenotomy on muscles reinnervated by a foreign nerve, *Exp. Neurol.*, **73**: 118-126, 1981.
- [8] BARNETT J. G., HOLLY R. G., ASHMORE C. R., Stretch-induced growth in chicken wing muscles: biochemical and morphological characterization, *Am. J. Physiol.*, **239**: C39-C46, 1980.
- [9] BEAULATON J., LOCKSHIN R. A., Ultrastructural study of the normal degeneration of the intersegmental muscles of *Antheraea polyphemus* and *Manduca sexta* (Insecta, Lepidoptera) with particular reference to cellular autophagy, *J. Morphol.*, **154**: 39-58, 1977.
- [10] BISBY M. A., Changes in fast-transported protein in regenerating axons: essential or incidental? [w] *Axoplasmic Transport in Physiology and Pathology*, red. Weiss D. G., Gorio A., Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg 1982, 70-76.
- [11] BOEGMAN R. J., SCARTH B., Neural influence on muscle autolytic enzyme activity, *Exp. Neurol.*, **73**: 37-42, 1981.
- [12] BOROVIKOV Yu. S., MOSKALENKO I. E., KIRILLINA V. P., STRANK-FELD I. G., Study of the state of F-actin in denervated muscle fibre by polarised UV fluorescence microscopy, *Gen. Physiol. Biophys.*, **2**: 1-11, 1983.
- [13] BULLER A. J., ECCLES J. C., ECCLES R. M., Differentiation of fast and slow muscles in the cat hind limb, *J. Physiol.*, **150**: 399-416, 1960.
- [14] BUSCH W. A., STROMER M. H., GOLL D. E., SUZUKI A., Ca²⁺-specific removal of Z lines from rabbit skeletal muscle, *J. Cell Biol.*, **52**: 367-381, 1972.
- [15] CARLSON B. M., The regeneration of skeletal muscle-A review, *Am. J. Anat.*, **137**: 119-150, 1973.
- [16] CARPENTER S., KARPATI G., ROTHMAN S., WATTERS G., The childhood type of dermatomyositis, *Neurology*, **10**: 952-962, 1976.
- [17] CARRARO U., CATANI C., BIRAL D., Selective maintenance of neurotrophically regulated proteins in denervated rat diaphragm, *Exp. Neurol.*, **63**: 468-475, 1979.
- [18] CARRARO U., CATANI C., DELLA LIBERA L., Myosin light and heavy chains in rat gastrocnemius and diaphragm muscles after chronic denervation or reinnervation, *Exp. Neurol.*, **72**: 401-412, 1981.

- [19] CARRARO U., CATANI C., DELLA LIBERA L., VASCON M., ZANELLA G., Differential distribution of tropomyosin subunits in fast and slow rat muscles and its changes in long-term denervated hemidiaphragm, *FEBS Lett.*, **128**: 233-236, 1981.
- [20] CERF J. A., CHACKO L. W., Retrograde reaction in motoneuron dendrites following ventral root section in the frog, *J. Comp. Neurol.*, **109**: 205-219, 1958.
- [21] CHIQUET M., EPPENBERGER H. M., TURNER D. C., Muscle morphogenesis: evidence for an organizing function of exogenous fibronectin, *Dev. Biol.*, **88**: 220-235, 1981.
- [22] CHURCH J. C. T., Satellite cells and myogenesis; a study in the fruit-bat web, *J. Anat.*, **105**: 419-438, 1969.
- [23] CHURCH J. C. T., Cell quantitation in regenerating bat web muscle, [w] Regeneration of striated muscle, and myogenesis, *rad. Mauro A., Shafiq S. A., Milhorat A. T., Excerpta Medica, Amsterdam 1970*, 101-117.
- [24] CLOSE R., Properties of motor units in fast and slow skeletal muscles of the rat, *J. Physiol.*, **193**: 45-55, 1967.
- [25] COLLINS P. L., YOUNKIN S. G., Effect of denervation on the molecular forms of acetylcholinesterase in rat diaphragm, *J. Biol. Chem.*, **257**: 13638-13644, 1982.
- [26] CONTI-TRONCONI B. M., GOTTI C. M., HUNKAPILLER M. W., RAFTERY M. A., Mammalian muscle acetylcholine receptor: A supramolecular structure formed by four related proteins, *Science*, **218**: 1227-1229, 1982.
- [27] COOPER R. R., Alterations during immobilization and regeneration of skeletal muscle in cats, *J. Bone Jt. Surg.*, **54-A**: 919-953, 1972.
- [28] CROSSLEY A. C., Ultrastructural changes during transition of larval to adult intersegmental muscle at metamorphosis in the blowfly *Calliphora erythrocephala*. I. Dedifferentiation and myoblast fusion, *J. Embryol. Exp. Morphol.*, **27**: 43-74, 1972.
- [29] CULLEN M. J., FULTHORPE J. J., Stages in fibre breakdown in Duchenne muscular dystrophy. An electron-microscopic study, *J. Neurol. Sci.*, **24**: 179-200, 1975.
- [30] DAVEY D. F., WONG S. Y. P., Morphometric analysis of rat extensor digitorum longus and soleus muscles, *Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci.*, **58**: 213-230, 1980.
- [31] DAVID H., DAVID S., Submicroscopical structural changes of the skeleton musculature during postmortal autolysis, *Acta Biol. Med. Ger.*, **14**: 423-435, 1965.
- [32] DAYTON W. R., REVILLE W. J., GOLL D. E., STROMER M. H., A Ca^{2+} -activated protease possibly involved in myofibrillar protein turnover. Partial characterization of the purified enzyme, *Biochemistry*, **15**: 2159-2167, 1976.
- [33] DĄBROWSKA R., DRABIKOWSKI W., Molekularne podstawy skurczu mięśni, *Post. Bioch.*, **19**: 343-359, 1973.
- [34] DECKER R. S., POOLE A. R., DINGLE J. T., WILDENTHAL K., Lysosomal alterations in autolysing rabbit heart, *J. Mol. Cell. Cardiol.*, **11**: 189-196, 1979.
- [35] DEVLIN R. B., EMERSON C. P., Coordinate regulation of contractile protein synthesis during myoblast differentiation, *Cell*, **13**: 599-611, 1978.
- [36] DHOOT G. K., PERRY S. V., The effect of denervation on the distribution of the polymorphic forms of troponin components in fast and slow muscles of the adult rat, *Cell Tiss. Res.*, **225**: 201-215, 1982.
- [37] DUBOWITZ V., Discussion, [w] *Exploratory Concepts in Muscular Dystrophy and Related Disorders*, red. Milhorat A. T., (Proceedings of the International

- Conference Convened by Muscular Dystrophy Associations of America, New York 1966). International Congress Series No 147, 1967, 266-267.
- [38] DUNCAN C. J., Parallels between spontaneous release of transmitter at the neuromuscular junction and subcellular damage of muscle. Evidence for the underlying common involvement of intracellular Ca^{2+} ?, *Comp. Biochem. Physiol.*, **73 A**: 147-149, 1982.
- [39] ECCLES J. C., LIBET B., YOUNG R. R., The behaviour of chromatolysed motoneurons studied by intracellular recording, *J. Physiol.*, **143**: 11-40, 1958.
- [40] EDSTRÖM L., KUGELBERG B., Histochemical composition, distribution of fibers and fatiguability of single motor units, *J. Neurol. Neurosurg. Psychiat.*, **31**: 424-433, 1968.
- [41] EISENBERG B. R., SALMONS S., The organization of subcellular structure in muscle undergoing fast-to-slow type transformation, *Cell Tiss. Res.*, **220**: 449-471, 1981.
- [42] ENGEL W. K., Muscle target fibres, a newly recognized sign of denervation, *Nature*, **191**: 389-390, 1961.
- [43] ENGEL A. G., Pathological reactions of the Z disk, [w] *Exploratory Concepts in Muscular Dystrophy and Related Disorders*, red. Milhorat A. T., (Proceedings of the International Conference Convened by Muscular Dystrophy Associations of America, New York, 1966), International Congress Series No 147, 1967, 398-411.
- [44] ETLINGER J. D., KAMEYAMA T., TONER K., Van der WESTHUYZEN D., MATSUMOTO K., Calcium and stretch-dependent regulation of protein turnover and myofibrillar disassembly in muscle, [w] *Plasticity of muscle*, red. Pette D., Walter de Gruyter, Berlin, New York 1980, 541-557.
- [45] FARBER J. L., The role of calcium in cell death, *Life Sci.*, **29**: 1289-1295, 1981.
- [46] FAULKNER J. A., MAXWELL L. C., LIBERMAN D. A., Histochemical characteristics of muscle fibers from trained and detrained guinea pigs, *Am. J. Physiol.*, **222**: 836-849, 1972.
- [47] FIDZIAŃSKA A., Ultrastructural changes in white and red muscle after denervation, *Acta Med. Pol.*, **XII**: 181-186, 1971.
- [48] FISCHMAN D. A., On electron microscope study of myofibril formation in embryonic chick skeletal muscle, *J. Cell Biol.*, **32**: 557-575, 1967.
- [49] FUJISAWA K., Some observations on the skeletal musculature of aged rats. Part 2. Fine morphology of diseased muscle fibres, *J. Neurol. Sci.*, **24**: 447-469, 1975.
- [50] FUKUHARA N., HOSHI M., MORI S., Core/targetoid fibres and multiple cytoplasmic bodies in organophosphate neuropathy, *Acta Neuropathol.*, **40**: 137-144, 1977.
- [51] GAUTHIER G. F., DUNN R. A., Ultrastructural and cytochemical features of mammalian skeletal muscle fibres following denervation, *J. Cell Sci.*, **12**: 525-547, 1973.
- [52] GAUTHIER G. F., HOBBS A. W., Effects of denervation on the distribution of myosin isozymes in skeletal muscle fibers, *Exp. Neurol.*, **76**: 331-346, 1982.
- [53] GOLDBERG A. L., Protein turnover in skeletal muscle. II. Effects of denervation and cortisone on protein catabolism in skeletal muscle, *J. Biol. Chem.*, **244**: 3223-3229, 1969.
- [54] GOLDSPINK G., The proliferation of myofibrils during muscle fibre growth, *J. Cell Sci.*, **6**: 593-603, 1970.

- [55] GOLDSPIK G., TABARY C., TABARY J. C., TARDIEU C., TARDIEU G., Effect of denervation on the adaptation of sarcomere number and muscle extensibility to the functional length of the muscle, *J. Physiol.*, **236**: 733-742, 1974.
- [56] GORDON T., STEIN R. B., Reorganization of motor-unit properties in reinnervated muscles of the cat, *J. Neurophysiol.*, **48**: 1175-1190, 1982.
- [57] Le GROS CLARK W. E., An experimental study of the regeneration of mammalian striped muscle, *J. Anat.*, **80**: 24-36, 1946.
- [58] GUBA F., MÉSZÁROS M. G., TAKÁCS Ö., Degradation of myones as a consequence disuse and denervation, *Acta Biol. Med. Germ.*, **36**: 1605-1619, 1977.
- [59] GUTH L., "Trophic" influences of nerve on muscle, *Physiol. Rev.*, **48**: 645-687, 1968.
- [60] GUTH L., KEMERER V. F., SAMARAS T. A., WARNICK J. E., ALBUQUERQUE E. X., The roles of disuse and loss of neurotrophic function in denervation atrophy of skeletal muscle, *Exp. Neurol.*, **73**: 20-36, 1981.
- [61] GUTMANN E., YOUNG J. Z., The reinnervation of muscle after various periods of atrophy, *J. Anat.*, **78**: 15-43, 1944.
- [62] GUTMANN E., ZELENÁ J., Morphological changes in the denervated muscle, [w] *The denervated muscle*, red. Gutmann E., Publishing House of the Czechoslovak Academy of Sciences, Prague 1962, 57-102.
- [63] GUTMANN E., Neurotrophic relations, *Ann. Rev. Physiol.*, **38**: 177-216, 1976.
- [64] De la HABA G., BRICKER J. V., Formation of striated muscle from myoblasts in vitro: Inhibition of myotube formation by cis-4-hydroxy-L-proline and its reversal by native or denaturated collagen (gelatin), *Mol. Cell. Biochem.*, **40**: 61-63, 1981.
- [65] HALL-CRAGGS E. C. B., The regeneration of skeletal muscle fibers per continuum, *J. Anat.*, **117**: 171-178, 1974.
- [66] HATTORI A., TAKAHASHI K., Calcium-induced weakening of skeletal muscle Z-disks, *J. Biochem.*, **92**: 381-390, 1982.
- [67] HEGARTY P. V. J., HOOPER A. C., Sarcomere length and fibre diameter distributions in four different mouse skeletal muscles, *J. Anat.*, **110**: 249-257, 1971.
- [68] HEILIG A., PETTE D., Changes in transcriptional activity of chronically stimulated fast twitch muscle, *FEBS Lett.*, **151**: 211-214, 1983.
- [69] HIKIDA R. S., BOCK W. J., Effect of denervation on pigeon slow skeletal muscle, *Z. Zellforsch.*, **128**: 1-18, 1972.
- [70] HIKIDA R. S., Regeneration of a tonic avian muscle: transformation to a twitch morphology, *Dev. Biol.*, **48**: 67-79, 1976.
- [71] HO K. W., ROY R. R., TWEEDLE C. D., HEUSNER W. W., Van HUSS W. D., CARROW R. E., Skeletal muscle fiber splitting with weight-lifting exercise in rats, *Am. J. Anat.*, **157**: 433-440, 1980.
- [72] HOULIHAN D. F., NEWTON J. R. L., Sarcomere formation and longitudinal growth in the developing flight muscles of *Calliphora*, *J. Insect Physiol.*, **25**: 879-893, 1979.
- [73] HUDECKI M. S., POLLINA C. M., HEFFNER R. R., In vivo effects of protease inhibitors on chickens with hereditary muscular dystrophy, *J. Clin. Invest.*, **67**: 969-974, 1981.
- [74] HUET de la TOUR E., TABARY J. C., TABARY C., TARDIEU C., The respective roles of muscle length and muscle tension in sarcomere number adaptation of guinea-pig soleus muscle, *J. Physiol. (Paris)*, **75**: 589-592, 1979.

- [75] HUXLEY H. E., The Croonian Lecture, 1970. The structural basis of muscular contraction, *Proc. Roy. Soc. London, B*, **178**: 131-149, 1971.
- [76] ISHIURA S., Calcium — dependent proteolysis in living cells, *Life Sci.*, **29**: 1079-1087, 1981.
- [77] ISHIURA S., NONAKA I., SUGITA H., MIKAWA T., Effect of denervation of neonatal rat sciatic nerve on the differentiation of myosin in a single muscle fiber, *Exp. Neurol.*, **73**: 487-495, 1981.
- [78] JAHROMI S. S., CHARLTON M. P., Transverse sarcome splitting. A possible means of longitudinal growth in crab muscles, *J. Cell Biol.*, **80**: 736-742, 1979.
- [79] JAKUBIEC-PUKA A., LASKOWSKA-BOŻEK H., Morphological changes of fast and slow skeletal rat muscle following denervation, *Folia Histochem. Cytochem.*, **12**: 301-314, 1974.
- [80] JAKUBIEC-PUKA A., MARGRETH A., Synteza białka w odnerwionym mięśniu, XIII Zjazd P. T. Bioch., Toruń 4-6 IX 1975. Streszczenia str. 76-77, 1975.
- [81] JAKUBIEC-PUKA A., LASKOWSKA-BOŻEK H., Morphological changes in rat skeletal muscle following reinnervation, *Folia Histochem. Cytochem.*, **15**: 333-342, 1977.
- [82] JAKUBIEC-PUKA A., DRABIKOWSKI W., Influence of denervation and reinnervation on autolytic activity and on protein composition of skeletal muscle in rat, *Enzyme*, **23**: 10-21, 1978.
- [83] JAKUBIEC-PUKA A., Filamenty pośrednie (10 nm) włókien mięśniowych, *Post. Biochem.*, **27**: 319-325, 1981.
- [84] JAKUBIEC-PUKA A., KULESZA-LIPKA D., KRAJEWSKI K., The contractile apparatus of striated muscle in the course of atrophy and regeneration. I. Myosin and actin filaments in the denervated rat soleus, *Cell Tiss. Res.*, **220**: 651-663, 1981.
- [85] JAKUBIEC-PUKA A., KULESZA-LIPKA D., KRAJEWSKI K., Z-line in atrophying and regenerating skeletal muscle, *Adv. Physiol. Sci.*, **24**: 333-339, 1981.
- [86] JAKUBIEC-PUKA A., KRAJEWSKI K., KULESZA-LIPKA D., Myosin and actin filaments in denervated rat fast muscle, *J. Muscle Res. Cell Motil.*, **3**: 483, 1982.
- [87] JAKUBIEC-PUKA A., KORDOWSKA J., CHOTOMOWSKA H., Z-line changes in the rat muscle maintained in lengthened position, *J. Muscle Res. Cell Motil.*, **3**: 482-483, 1982.
- [88] JAKUBIEC-PUKA A., KULESZA-LIPKA D., KORDOWSKA J., The contractile apparatus of striated muscle in the course of atrophy and regeneration. II. Myosin and actin filaments in mature rat soleus regenerating after reinnervation, *Cell Tiss. Res.*, **227**: 641-650, 1982.
- [89] JAKUBIEC-PUKA A., Zależność mięśnia prążkowanego od układu nerwowego. I. Neuron ruchowy, *Post. Biol. Kom.*, **11**: 17-44, 1984.
- [90] KAŁAMKAROVA M. B., MOSKALENKO I. E., PODŁUBNAYA Z. A., STRANKFELD I. G., The effect of denervation upon the functional properties of myosin and its fragments, *Physiol. Biochemoslov.*, **25**: 543-550, 1976.
- [91] KARPATI G., ENGEL W. K., "Type grouping" in skeletal muscles after experimental reinnervation, *Neurology*, **18**: 447-455, 1968.
- [92] KARPATI G., CARPENTER S., EISEN A. A., Experimental core-like lesions and nemaline rods, *Arch. Neurol.*, **27**: 237-251, 1972.
- [93] KARPATI G., CARPENTER S., MELMED C., EISEN A. A., Experimental ischemic myopathy, *J. Neurol. Sci.*, **23**: 129-161, 1974.

- [94] KAUFFMAN F. C., ALBUQUERQUE E. X., Effect of ischemia and denervation on metabolism of fast and slow mammalian skeletal muscle, *Exp. Neurol.*, **28**: 46-63, 1970.
- [95] KELLY D. E., Myofibrillogenesis and Z-band differentiation, *Anat. Rec.*, **163**: 403-426, 1969.
- [96] KELLY A. M., RUBINSTEIN N. A., Patterns of myosin synthesis in regenerating normal and denervated muscles of the rat, [w] *Plasticity of muscle*, red. Pette D., Walter de Gruyter, Berlin, New York 1980, 161-175.
- [97] KILARSKI W., JAKUBOWSKA M., An electron microscope study of myofibril formation in embryonic rabbit skeletal muscle, *Z. Mikrosk. Anat. Forsch. Leipz.*, **93**: 1159-1181, 1979.
- [98] KIRBY A. C., LINDLEY B. D., Calcium content of rat fast and slow muscle after denervation, *Comp. Biochem. Physiol.*, **70**, A: 583-586, 1981.
- [99] KLINKERFUSS G. H., HAUGH M. J., Disuse atrophy of muscle. Histochemistry and electron microscopy, *Arch. Neurol.*, **22**: 309-320, 1970.
- [100] KOHN R. R., A proteolytic system involving myofibrils and a soluble factor from normal and atrophying muscle, *Lab. Invest.*, **20**: 202-206, 1969.
- [101] LAZARIDES E., GRANGER B. L., GARD D. L., O'CONNOR C. M., BRECKLER J., PRICE M., DANTO S. I., Desmin- and Vimentin-containing filaments and their role in the assembly of the Z disk in muscle cells, *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*. Vol. XLVI, Cold Spring Harbor Laboratory, 1982, 351-378.
- [102] LEGATO M., Sarcomerogenesis in human myocardium. *J. Mol. Cell Cardiol.*, **1**: 425-437, 1970.
- [103] LEGATO M. J., Ultrastructural characteristics of the rat ventricular cell grown in tissue culture with special reference to sarcomerogenesis, *J. Mol. Cell Cardiol.*, **4**: 299-317, 1972.
- [104] LEONARD J. P., SALPETER M. M., Agonist-induced myopathy at the neuromuscular junction is mediated by calcium, *J. Cell Biol.*, **82**: 811-819, 1979.
- [105] LEONARD J. P., SALPETER M. M., Calcium-mediated myopathy at neuromuscular junctions of normal and dystrophic muscle, *Exp. Neurol.*, **76**: 121-138, 1982.
- [106] LØMO T., WESTGAARD R. H., DAHL A. H., Contractile properties of muscle: control by pattern of muscle activity in the rat, *Proc. Roy. Soc. (London) B*, **187**: 99-103, 1974.
- [107] LØMO T., WESTGAARD R. H., ENGBRETTSEN L., Different stimulation patterns affect contractile properties of denervated rat soleus muscle, [w] *Plasticity of muscle*, red. Pette D., Walter de Gruyter, Berlin. New York 1980, 297-309.
- [108] MacNAUGHTAN A. F., A histological study of post mortem changes in the skeletal muscle of the fowl (*Gallus domesticus*). II. The Cytoarchitecture, *J. Anat.*, **126**: 7-20, 1978.
- [109] MARGRETH A., SALVIATI G., Di MOURO S., TURATI G., Early biochemical consequences of denervation in fast and slow skeletal muscles and their relationship to neural control over muscle differentiation, *Biochem. J.*, **126**: 1099-1110, 1972.
- [110] MARUYAMA K., MATSUBARA S., NATORI R., NONOMURA Y., KIMURA S., OHASHI K., MURAKAMI F., HANDA S., EGUCHI G., Connectin, an elastic protein of muscle, *J. Biochem.*, **82**: 317-337, 1977.
- [111] MARUYAMA K., Elastic structure of connectin in muscle, [w] *Muscle Con-*

- traction: Its Regulatory Mechanisms, red. Ebashi S. i wsp. (Japan Sci. Soc. Press, Tokyo) Springer-Verlag, Berlin 1980, 485-496.
- [112] MASTAGLIA F. L., DAWKINS R. L., PAPADIMITRIOU J. M., Morphological changes in skeletal muscle after transplantation. A light- and electron-microscopic study of the initial phases of degeneration and regeneration, *J. Neurol. Sci.*, **25**: 227-247, 1975.
- [113] MAURO A., Satellite cell of skeletal muscle fibers, *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, **9**: 493-495, 1961.
- [114] McARDLE J. J., Complex end-plate potentials at the regenerating neuromuscular junction of the rat, *Exp. Neurol.*, **49**: 629-638, 1975.
- [115] McLANE J. A., HELD I. R., Effect of denervation on cyclic nucleotide metabolism in different types of skeletal muscle of the rat, *J. Neurosci Res.*, **6**: 327-336, 1981.
- [116] METAFORA S., FELSANI A., COTRUFO R., TAJANA G. F., IORIO G. Di., Del RIO A., De PRISCO P. P., ESPOSITO V., Neural control of gene expression in the skeletal muscle fibre: the nature of the lesion in the muscular proteinsynthesizing machinery following denervation, *Proc. Roy. Soc. (London) B*, **209**: 239-255, 1980.
- [117] MILEDI R., SLATER C. R., Electron-microscopic structure of denervated skeletal muscle, *Proc. Roy. Soc. (London) B*, **174**: 253-269, 1969.
- [118] MILLWARD D. J., BATES P. C., BROWN J. G., ROSOCHACKI S. R., RENNIE M. J., Protein degradation and the regulation of protein balance in muscle, [w] Protein degradation in health and disease, red. Ciba Foundation Symposium 75 (new series), Excerpta Medica, Amsterdam-Oxford-New York 1980, 307-329.
- [119] MORRIS E., Postnatal muscle fiber assembly: localization of newly synthesized myofibrillar proteins, *Science*, **167**: 1499-1501, 1970.
- [120] MOSS F. P., LEBLOND C. P., Nature of dividing nuclei in skeletal muscle of growing rats, [w] Regeneration of striated muscle, and myogenesis, red. Mauro A., Shafiq S. A., Milhorat A. T., Excerpta Medica, Amsterdam 1970, 165-166.
- [121] MURRAY M. A., ROBBINS N., Cell proliferation in denervated muscle: time course, distribution and relation to disuse, *Neuroscience*, **7**: 1817-1822, 1982.
- [122] MYKLEBUST R., SOETERSDAL T. S., ENGEDAL H., ULSTEIN M., ØDEGÅRDEN S., Ultrastructural studies on the formation of myofilaments and myofibrils in the human embryonic and adult hypertrophied heart, *Anat. Embryol.*, **152**: 127-140, 1978.
- [122A] MYKLES D. L., SKINNER D. M., Preferential loss of thin filaments during molt-induced atrophy in crab claw muscle, *J. Ultrastruct. Res.*, **75**: 314-325, 1981.
- [123] NURCOMBE V., BENNETT M. R., Evidence for neuron-survival and neurite-promoting factors from skeletal muscle: their effects on embryonic spinal cord, *Neurosci. Lett.*, **34**: 89-93, 1982.
- [124] OBINATA T., YAMAMOTO M., MARUYAMA K., The identification of randomly formed thin filaments in differentiating muscle cells of the chick embryo, *Dev. Biol.*, **14**: 192-213, 1966.
- [125] ONTELL M., Muscle satellite cells: a validated technique for light microscopic identification and a quantitative study of changes in their population following denervation, *Anat. Rec.*, **178**: 211-228, 1974.

- [126] ONTELL M., Evidence for myoblastic potential of satellite cells in denervated muscle, *Cell Tiss. Res.*, **160**: 345-353, 1975.
- [127] PELLEGRINO C., FRANZINI C., An electron microscope study of denervation atrophy in red and white skeletal muscle fibers, *J. Cell Biol.*, **17**: 327-349, 1963.
- [128] PENG H. B., WOLOSEWICK J. J., CHENG P-C., The development of myofibrils in cultured muscle cells: a whole-mount and thin-section electron microscopic study, *Dev. Biol.*, **88**: 121-136, 1981.
- [129] PODLESKI T. R., GREENBERG I., SCHLESSINGER J., YAMADA K. M., Fibronectin delays the fusion of L₆ myoblasts, *Exp. Cell Res.*, **122**: 317-326, 1979.
- [130] POLLACK M. S., BIRD J. W. C., Distribution and particle properties of acid hydrolase in denervated muscle, *Am. J. Physiol.*, **215**: 716-722, 1968.
- [131] POLLOCK M., HARRIS A. J., Accuracy in peripheral nerve regeneration, *Trends Neurosci.*, **4**: 18-20, 1981.
- [132] PULLMAN W. E., YEOH G. C. T., The role of myonuclei in muscle regeneration: an in vitro study, *J. Cell Physiol.*, **96**: 245-251, 1978.
- [133] PURVES D., SAKMANN B., Membrane properties underlying spontaneous activity of denervated muscle fibers, *J. Physiol.*, **239**: 125-153, 1974.
- [134] RAMÍREZ B. U., Neurotrophic regulation of muscle autolytic activity, *Exp. Neurol.*, **67**: 257-264, 1980.
- [135] RESNICK J. S., ENGEL W. K., Target fibers-structural and cytochemical characteristics and their relationship to neurogenic muscle disease and fiber types, [w] *Exploratory Concepts in Muscular Dystrophy and Related Disorders*, red. Milhorat A. T., (Proceedings of the International Conference Convened by Muscular Dystrophy Association of America, New York, 1966), International Congress Series No 147, 1967, 255-265.
- [136] ROBBINS N., Cation movements in normal and short-term denervated rat fast twitch muscle, *J. Physiol.*, **271**: 605-624, 1977.
- [137] ROMANUL F. C. A., HOGAN E. L., Enzymatic changes in denervated muscle. I. Histochemical studies, *Arch. Neurol.*, **13**: 263-273, 1965.
- [138] SALMINEN A., VIHKO V., Acid hydrolase activities in mouse cardiac and skeletal muscle following exhaustive exercise, *Eur. J. Appl. Physiol.*, **47**: 57-64, 1981.
- [139] SALMONS S., GALE D. R., SRÉTER F. A., Ultrastructural aspects of the transformation of muscle fibre type by long term stimulation: changes in Z discs and mitochondria, *J. Anat.*, **127**: 17-31, 1978.
- [140] SCHANNE F. A. X., KANE A. B., YOUNG E. E., FARBER J. L., Calcium dependence on toxic cell death: a final common pathway, *Science*, **206**: 700-702, 1979.
- [141] SCHMALBRUCH H., Regeneration of soleus muscles of rat autografted in toto as studied by electron microscopy, *Cell Tiss. Res.*, **177**: 159-180, 1977.
- [142] SCHULTZ E., Changes in the satellite cells of growing muscle following denervation, *Anat. Rec.*, **190**: 299-312, 1978.
- [143] SENNI M. I., BIAGONI S., MARINI P., SCARSELLA G., Acetylcholinesterase activity and molecular forms during denervation and reinnervation in extensor digitorum longus muscle of the rat, *Neurochem. Res.*, **6**: 1291-1298, 1981.
- [144] SCHAFIQ S. A., MILHORAT A. T., GORYCKI M. A., Fine structure of human muscle in neurogenic atrophy, *Neurology*, **17**: 934-948, 1967.

- [145] SHAFIQ S. A., GORYCKI M. A., MILHORAT A. T., An electron microscopic study of regeneration and satellite cells in human muscle, *Neurology*, **17**: 567-574, 1967.
- [146] SHAFIQ S. A., GORYCKI M. A., ASIYEDU S. A., MILHORAT A. T., Tenotomy. Effect on the fine structure of the soleus of the rat, *Arch. Neurol.*, **20**: 625-633, 1969.
- [147] SHAFIQ S. A., Satellite cells and fiber nuclei in muscle regeneration, [w] *Regeneration of striated muscle, and myogenesis*, red.: Mauro A., Shafiq S. A., Milhorat A. T., *Excerpta Medica*, Amsterdam 1970, 122-132.
- [148] SHANI M., ZEVIN-SONKIN D., SAXEL O., CARMON Y., KATCOFF D., NUDEL U., YAFFE D., The correlation between the synthesis of skeletal muscle actin, myosin heavy chain, and myosin light chain and the accumulation of coresponding mRNA sequences during myogenesis, *Dev. Biol.*, **86**: 483-492, 1981.
- [149] SHEAR Ch. R., Cross-sectional myofibre and myofibril growth in immobilized developing skeletal muscle, *J. Cell Sci.*, **29**: 297-312, 1978.
- [150] SHER J. H., SHAFIQ S. A., SCHUTTA H. S., Acute myopathy with selective lysis of myosin filaments, *Neurology*, **29**: 100-106, 1979.
- [151] SILVERMAN H., HIKIDA R. S., STARON R. S., Loss of thick filaments from fast-twitch glycolytic muscle fibres of the pigeon pectoralis after chronic administration of dantrolene sodium, *Am. J. Anat.*, **155**: 69-81, 1971.
- [152] SLACK J. R., POCKETT S., Motor neurotrophic factor in denervated adult skeletal muscle, *Brain Res.*, **247**: 138-140, 1982.
- [153] SLOPER J. C., BATESON R. B., HINDLE D., WARREN J., Muscle regeneration in man and the mouse; evidence derived from tissue culture and from the evolution of experimental and surgical injuries in the irradiated and non-irradiated subject, [w] *Regeneration of striated muscle, and myogenesis*, red.: Mauro A., Shafiq A. S., Milhorat A. T., *Excerpta Medica*, Amsterdam 1970, 157-164.
- [154] SNOW M. H., An autoradiographic study of satellite cell differentiation into regenerating myotubes following transplantation of muscles in young rats, *Cell Tiss. Res.*, **186**: 535-540, 1978.
- [155] SOLA O. M., CHRISTENSEN D. L., MARTIN A. W., Hypertrophy and hyperplasia of adult chicken anterior latissimus dorsi muscles following stretch with and without denervation, *Exp. Neurol.*, **41**: 76-100, 1973.
- [156] SPECTOR S. A., SIMARD C. P., FOURNIER M., STERNLICHT E., EDGERTON V. R., Architectural alterations of rat hind-limb skeletal muscles immobilized at different lengths, *Exp. Neurol.*, **76**: 94-110, 1982.
- [157] SRÉTER F. A., Effect of denervation on fragmented sarcoplasmic reticulum of white and red muscle, *Exp. Neurol.*, **29**: 52-64, 1970.
- [158] SRÉTER F. A., PINTER K., JOLESZ F., MABUCHI K., Fast to slow transformation of fast muscles in response to long-term phasic stimulation, *Exp. Neurol.*, **75**: 95-102, 1982.
- [159] STANDLER N. A., BERNSTEIN J. J., Degeneration and regeneration of motoneuron dendrites after ventral root crush: computer reconstruction of dendritic fields, *Exp. Neurol.*, **75**: 600-615, 1982.
- [160] STONNINGTON H. H., ENGEL A. G., Normal and denervated muscle. A morphometric study of fine structure, *Neurology*, **23**: 714-724, 1973.
- [161] STRACHER A., MCGOWAN E. B., HEDRYCH A., SHAFIQ S. A., In vivo

- effect of protease inhibitors in denervation atrophy, *Exp. Neurol.*, **66**: 611–618, 1979.
- [162] SYROVÝ I., HÁJEK I., GUTMANN E., Factors affecting the proteolytic activity in denervated muscle, *Physiol. Bohemoslov.*, **15**: 7–13, 1966.
- [163] SYROVÝ I., GUTMANN E., MELICHNA J., The effect of denervation on contraction and myosin properties of fast and slow rabbit and cat muscles, *Physiol. Bohemoslov.*, **21**: 353–359, 1972.
- [164] TABARY J. C., TABARY C., TARDIEU C., TARDIEU G., GOLDSPIK G., Physiological and structural changes in the cat's soleus muscle due to immobilization at different lengths by plaster casts, *J. Physiol.*, **224**: 231–244, 1972.
- [165] THESLEFF S., WARD M. R., Studies on the mechanism of fibrillation potentials in denervated muscle, *J. Physiol.*, **244**: 313–323, 1975.
- [166] THESLEFF S., SELLIN L. C., Denervation supersensitivity, *Trends Neurosci.*, **3**: 122–126, 1980.
- [167] THORNELL L.-E., Ultrastructural variations of Z bands in cow Purkinje fibres, *J. Mol. Cell Cardiol.*, **5**: 409–417, 1973.
- [168] THORNELL L.-E., EDSTRÖM L., ERIKSSON A., HENRIKSSON K.-G., ÄNGQVIST K.-A., The distribution of intermediate filament protein (skeletin) in normal and diseased human skeletal muscle. An immunohistochemical and electron-microscopic study, *J. Neurol. Sci.*, **47**: 153–170, 1980.
- [169] TOMANEK R. J., LUND D. D., Degeneration of different types of skeletal muscle fibers. I. Denervation, *J. Anat.*, **116**: 395–407, 1973.
- [170] TOMANEK R. J., LUND D. D., Degeneration of different types of skeletal muscle fibres. II. Immobilization, *J. Anat.*, **118**: 531–541, 1974.
- [171] UNSWORTH B. R., WITZMANN F. A., FITTS R. H., A comparison of rat myosin from fast and slow skeletal muscle and the effect of disuse, *J. Biol. Chem.*, **257**: 15129–15136, 1982.
- [172] VIHKO V., RANTAMÄKI J., SALMINEN A., Exhaustive physical exercise and acid hydrolase activity in mouse skeletal muscle. A histochemical study, *Histochemistry*, **57**: 237–249, 1978.
- [173] WALLINGA-de JONGE W., BOOM H. B. K., BOON K. L., GRIEP P. A. M., LAMMERÉE G. C., Force development of fast and slow skeletal muscle at different muscle lengths, *Am. J. Physiol.*, **239**: C98–C104, 1980.
- [174] WARSZAWSKI M., TELERMAN-TOPPET N., DURDU J., GRAFF G. L. A., COËRS C., The early stages of neuromuscular regeneration after crushing the sciatic nerve in the rat. Electrophysiological and histological study, *J. Neurol. Sci.*, **27**: 21–32, 1975.
- [175] WEINSTOCK I. M., IODICE A. A., Acid hydrolase activity in muscular dystrophy and denervation atrophy, [w] *Lysosomes in Biology and Pathology* Tom 1, red. Dingle J. T., Fell H. B., North-Holland Publ. Comp., Amsterdam, London 1969, 450–468.
- [176] WIER M. L., LENNON V. A., Differentiation of skeletal muscle from dissociated optic nerve cells. Immunocytochemical observations, *J. Neuroimmunol.*, **1**: 61–68, 1981.
- [177] WILDENTHAL K., Lysosomal alterations in ischemic myocardium: result or cause of myocellular damage?, *J. Mol. Cell Cardiol.*, **10**: 595–603, 1978.
- [178] WILLIAMS P. E., GOLDSPIK G., The effect of immobilization on the longitudinal growth of striated muscle fibers, *J. Anat.*, **116**: 45–55, 1973.
- [179] WILLIAMS P. E., GOLDSPIK G., Changes in sarcomere length and physiological properties in immobilized muscle, *J. Anat.*, **127**: 459–468, 1978.

- [180] WUERKER R. B., McPHEDRAN A. M., HENNEMAN E., Properties of motor units in a heterogeneous pale muscle (m. gastrocnemius) of the cat, *J. Neurophysiol.*, **28**: 85-99, 1965.
- [181] YAROM R., RECHES A., Thick filament degeneration in a case of acute quadriplegia, *J. Neurol. Sci.*, **45**: 13-22, 1980.
- [182] ZUBRZYCKA E., Wybrane zagadnienia miogenezy, *Post. Biol. Kom.*, **6**: 187-208, 1979.

Otrzymano: 26 maja 1983.

Przyjęto: 1 września 1983.

Adres autorki: ul. Pasteura 3, 02-039 Warszawa.

PLASTYDOWY DNA

THE PLASTID DNA

Adam WOŹNY

Zakład Botaniki Ogólnej, Instytut Biologii UAM

Streszczenie. W pracy przedstawiono charakterystykę obszarów nukleoidopodobnych, a także wyniki doświadczeń zmierzających do określenia fizycznej i genetycznej struktury chloroplastowego DNA (ct DNA).

Summary. In this review I have discussed experiments which attempted to elucidate the physical and genetic structure of ct DNA. The combined results of the experiments on the physical structure of ct DNA support the idea that in most higher plants and algae the entire chloroplast genome is represented by the sequence of a single circular ct DNA molecule. The number, size, shape and distribution of the DNA — containing area (ct N) change during chloroplast ontogenesis. In most of the land plants and algae, examined by Kuroiwa et al. [67], the number of ct N in mature chloroplasts ranged between 8 and 40. Chloroplasts in Zygnematales, Ulotrichales and Ulvales contained larger numbers of the ct N (40–300). Most plants could be classified into five types according to differences in the shape, size and distribution of the ct N in their mature chloroplasts [67]. The replication of ct DNA [63, 64] has been shown to initiate with the formation of two displacement loops (D-loops) similar to the displacement loops that initiate animal mitochondrial DNA replication. The two displacing strands expand towards each other and from a structure that looks like a Cairns replicative intermediate. Rolling circle replicative intermediates of higher plant ct DNA [39], which appear to result from a continuation of the Cairns round of replication were also observed [63]. The mapping experiments have demonstrated that the structural genes for several chloroplast components are located on the circular ct DNA molecules. A transcriptionally active DNA — protein complex isolated by Briat et al. [16] from spinach plastids is also described.

) WSTĘP

Już obserwacje dokonane przez Bauera [2] i Corrensa [25] wskazywały na obecność genetycznego materiału w chloroplastach. Dopiero

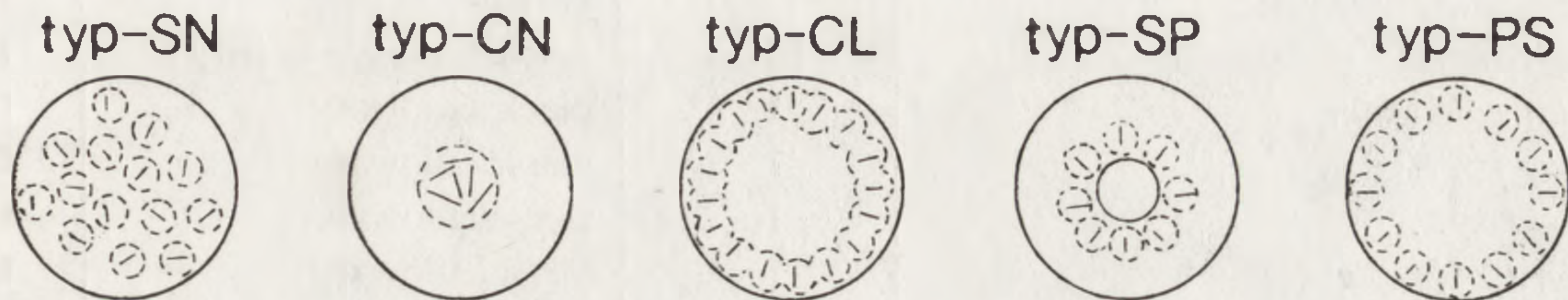
jednak wyniki badań cytochemicznych [57, 90, 92] i biochemicznych [13, 88, 93, 106] wykazały, że chloroplasty mają własny DNA i to odmienny od DNA jądrowego. Obecnie wiadomo, że chloroplastowy DNA (ct DNA) koduje niektóre chloroplastowe polipeptydy [4, 5, 21, 31, 61, 107], rybosomalne RNA [5, 12] i przenośnikowe RNA [30, 103]. Stosunkowo niedawno skonstruowano genetyczną mapę, najpierw dla ct DNA *Chlamydomonas reinhardtii* [91], a później dla ct DNA wielu innych roślin. W ostatnich latach uwaga badaczy koncentrowała się na poznaniu fizycznej struktury ct DNA (patrz praca przeglądowa: Bedbrook i Kolodner [4]).

OBSZARY NUKLEOIDOPODOBNE

Obszary plastydów zawierające DNA są bardzo podobne do nukleoidów bakterii [48], stąd nazwa: obszary nukleoidopodobne. Na ich określenie stosuje się też wiele innych terminów (np. chloroplastowy nukleoid, chloroplastowy genofor, chloroplastowa nukleoplazma, chloroplastowe jądro itp.).

Fakt istnienia obszarów nukleoidopodobnych rodzi kilka kwestii: jaka jest ich liczba w pojedynczym chloroplaście? Czy istnieje gatunkowa specyfika w liczbie, wymiarach i kształcie obszarów nukleoidopodobnych? Jaki jest ich rozwój? itp. W literaturze znanych jest kilka prac wykonanych przy użyciu transmisyjnego mikroskopu elektronowego na temat liczby, wymiarów i kształtów obszarów nukleoidopodobnych wyższych roślin [66], zielenic [90], brunatnic [7, 8, 37, 38] i okrzemek [17]. Korzystniejsza od metody elektronowo-mikroskopowej jest jednak metoda świetlnego mikroskopu, szczególnie po wprowadzeniu przez Colemana [23, 24] oraz Jamesa i Jope [53] nowego i bardzo czułego fluorochromu dla DNA, a mianowicie: 4'-6-dwuamidino-2-fenylindolu (DAPI). Posługując się tym barwnikiem, Kuroiwa i wsp. [67] oraz Nishibayashi i Kuroiwa [81] przebadali za pomocą mikroskopu fluorescencyjnego obszary nukleoidopodobne (ct N) w plastydach 69 gatunków roślin należących do różnych gromad. Stwierdzili, że liczba, wielkość, kształt i rozmieszczenie ct N zmieniały się w czasie ontogenezy plastydów. Na przykład proplastidy komórek niedojrzałego zarodka *Brassica juncea*, które były bardzo małe, miały tylko jeden mały kolisty ct N o średnicy około 0,2 μm . Natomiast średnica ct N proplastydów komórek dojrzałego, spoczynkowego zarodka była większa (0,5–1,0 μm), zmienił się również kształt z kolistego na owalny. Gdy takie proplastidy przekształciły się w etioplasty, wielkość ct N (zwykle 1–2 na jedną organelę) wzrosła 2–4 razy. Po oświetleniu etioplastów ich ct N dzieliły się, tworząc małe, koliste w zarysie ct N, których liczba sięgała 20 w całkowicie dojrze-

łych chloroplastach. U *Vicia faba* autorzy ci oprócz normalnych, spotykali niekiedy także olbrzymie chloroplasty o średnicy większej niż $9\ \mu\text{m}$. Miały one bardzo liczne (40–50) ct N, natomiast w małych, zdegenerowanych chloroplastach starszych liści tego gatunku liczba ct N zmniejszała się do 3–4.



Ryc. 1. Różne kształty, wymiary i rozmieszczenie obszarów nukleidopodobnych (ct N) w dojrzałych chloroplastach. Do typu SN zalicza się rośliny mające chloroplasty z małymi, równomiernie rozmieszczonymi ct N. Typ CN ma chloroplasty z jednym lub niekiedy kilkoma ct N, zlokalizowanymi w centralnym obszarze chloroplastu. Chloroplasty roślin zaliczonych do typu CL charakteryzują się dużym ct N w kształcie pierścienia. Typ SP ma liczne, małe ct N tworzące w chloroplastach jakby osłonkę dookoła pirenoidu. Typ PS ma ct N rozmieszczone w peryferycznej części chloroplastów. Według [67]

Kuroiwa i wsp. [67] podali, że ct N znaleźli w plastydach wszystkich badanych gatunków roślin. Liczba ct N była względnie stała, kiedy określano ją w dojrzałych i zbliżonych do siebie wielkością chloroplastach tego samego gatunku (tabela 1). Analiza tabeli pokazuje, że zielenice miały chloroplasty o niewielkiej liczbie ct N, *Zygnemataceae*, *Desmidiaceae* i *Bryopsidaceae* — duże chloroplasty z licznymi ct N, *Gymnospermae* — stosunkowo nieliczne ct N, *Angiospermae* zaś umiarkowaną liczbę ct N.

Większość roślin można podzielić na pięć typów ze względu na kształt, wymiary i rozmieszczenie obszarów nukleoidopodobnych w ich dojrzałych chloroplastach (ryc. 1 [67]). Pierwszy, oznaczony przez Kuroiwę i wsp. [67] jako typ SN (small nucleus), charakteryzuje się chloroplastami o małych równomiernie rozmieszczonych ct N. Średnica tych małych, kolistych ct N wynosiła $0,2\text{--}0,4\ \mu\text{m}$. Spośród lądowych roślin do tego typu należy np. *Brassica juncea*, *Vicia faba*, a z zielenic — *Nitella axilliformis* i *Chlamydomonas reinhardii*. Drugi, tzw. typ CN (central nucleus), ma chloroplasty z jednym lub niekiedy kilkoma ct N, zlokalizowanymi w centralnym obszarze chloroplastu. Średnica takich ct N mieściła się w granicach $0,5\text{--}1,2\ \mu\text{m}$. Do tego typu należy np. *Acetabularia calyculus*. Trzeci, typ CL (circular), ma chloroplasty z dużym ct N w kształcie pierścienia. Kształt pierścienia zmieniał się wraz ze zmianą kształtu chloroplastów. U okrzemek i brunatnic, które mają dyskowate

TABELA 1

Liczba, kształt i typ obszaru nukleoidopodobnego w chloroplastach różnych gatunków roślin według [67]

Gatunek	Liczba	Kształt	Typ
<i>Gelidium Amansii</i>	5-15	pałeczkowaty, owalny	PS
<i>Symphyocladia latiuscula</i>	20-50	kolisty	PS
<i>Porphyra tenera</i>	15-26	pałeczkowaty, kolisty	PS
<i>Cyanidium caldarium</i>	1	pierścieniowaty	CL
<i>Ectocarpus</i> sp.	1	pierścieniowaty	CL
<i>Sphacelaria</i> sp.	1	pierścieniowaty	CL
<i>Licmophora abbreviata</i>	1	pierścieniowaty	CL
<i>Melosira granulata</i>	1	pierścieniowaty	CL
<i>Biddulphia obtusa</i>	1	pierścieniowaty	CL
<i>Fragilaria</i> sp.	1	pierścieniowaty	CL
<i>Nitzschia</i> sp.	1	pierścieniowaty	CL
<i>Rizosolenia alata</i>	1	pierścieniowaty	CL
<i>Glaucocystis nostochinerum</i>	1	pałeczkowaty	CN
<i>Cryptomanas</i> sp.	22-50	owalny, kolisty	SN
<i>Platymonans subcordiformis</i>	20-30	kolisty	SN
<i>Euglena gracilis</i>	20-34	kolisty	SN
<i>Coccomyxa dispar</i>	5-15	kolisty	SN
<i>Chlamydomonas reinhardii</i>	10-40	owalny, kolisty	SN
<i>Chlorella ellipsoidea</i>	2-8	kolisty	SN
<i>Ulothrix zonata</i>	52-60	kolisty	SN
<i>Stigeoclonium lubricum</i>	30-45	kolisty, pałeczkowaty	SN
<i>Ulva pertusa</i>	30-55	pałeczkowaty, owalny	SN
<i>Ankistrodesmus falcatus</i>	8-16	kolisty	SN
<i>Pediastrum kawraiskyi</i>	12-18	kolisty	SN
<i>Scenedesmus ecornis</i>	2-4	kolisty	SN
<i>Scenedesmus acutus</i>	3-5	kolisty	SN
<i>Scandesmus arcuatus</i>	2-4	kolisty	SN
<i>Scandesmus</i> sp.	8-16	kolisty	SN
<i>Staurostrum paradoxum</i>	8-16	kolisty	SN
<i>Coelastrum sphaericum</i>	6-8	kolisty	SN
<i>Sphaerocystis schroeteri</i>	10-40	kolisty	SN
<i>Sargassum fulvellum</i>	8-16	kolisty, owalny	SN
<i>Spirogyra chungkingensis</i>	150-300	kolisty, owalny	SN
<i>Closterium parvulum</i>	26-28	kolisty, pałeczkowaty	SN
<i>Closterium diana</i>	30-58	pałeczkowaty, kolisty	SN
<i>Mougeotia genuflexa</i>	50-80	kolisty, owalny	SN
<i>Cosmarium intermedium</i>	30-64	pałeczkowaty, kolisty	SN
<i>Cosmarium</i> sp.	130-200	kolisty, pałeczkowaty	SN
<i>Bryopsis plumosa</i>	66-156	kolisty, owalny	SP
<i>Acetabularia calyculus</i>	1-4	owalny	CN
<i>Cladophora glomerata</i>	—	siateczkowaty	SP
<i>Chara australis</i>	12-24	kolisty, pałeczkowaty	SN
<i>Nitella axilliformis</i>	10-24	kolisty, pałeczkowaty	SN
<i>Polystrichum juniperinum</i>	15-32	kolisty	SN

cd. tab. 1

Gatunek	Liczba	Kształt	Typ
<i>Equisetum arvense</i>	6-12	kolisty	SN
<i>Gleichenia dichotoma</i>	10-20	kolisty, owalny	SN
<i>Asplenium inscisum</i>	10-23	kolisty	SN
<i>Cycas revoluta</i>	8-16	pałeczkowaty, owalny	SN
<i>Ginkgo biloba</i>	8-13	pałeczkowaty, kolisty	SN
<i>Pinus Thunbergii</i>	8-15	pałeczkowaty, kolisty	SN
<i>Aristolochia debilis</i>	12-19	kolisty	SN
<i>Cleyera ochracea</i>	11-23	kolisty	SN
<i>Robinia pseudo-Acacia</i>	12-20	owalny, pałeczkowaty	SN
<i>Eriobotrya japonica</i>	10-15	kolisty	SN
<i>Oxalis corniculata</i>	19-43	kolisty	SN
<i>Polygonum minutulum</i>	12-21	pałeczkowaty, kolisty	SN
<i>Lochnera rosea</i>	11-24	kolisty	SN
<i>Cirsium Hilgendorfi</i>	12-24	kolisty, pałeczkowaty	SN
<i>Artemisia vulgaris</i>	12-20	owalny, pałeczkowaty	SN
<i>Luffa cylindrica</i>	5-13	pałeczkowaty, owalny	SN
<i>Rhododendron indicum</i>	11-20	pałeczkowaty, owalny	SN
<i>Commelina communis</i>	9-20	kolisty, pałeczkowaty	SN
<i>Pleioblastus variegatus</i>	12-23	kolisty	SN
<i>Agave americana</i>	15-23	kolisty	SN
<i>Trachycarpus excelsa</i>	12-20	kolisty	SN

a Dokładniejsza charakterystyka typów podana jest w tekście.

chloroplasty, ct N jest kolisty, u innych natomiast okrzemek i krasnorostów z chloroplastami nieregularnego kształtu, ct N mają postać nieregularnego pierścienia leżącego w peryferycznej części chloroplastu. Czwarty, typ SP (shell around a pyrenoid), ma liczne, małe ct N tworzące w chloroplaście jakby osłonkę dookoła pirenoidu. Należy tu np. *Bryopsis plumosa* (*Bryopsidaceae*). Ostatni, tzw. typ PS (peripheral scattered), ma ct N rozmieszczone w peryferycznej części chloroplastów. Do tego należą np. krasnorosty: *Gelidium Amansii*, *Symphyocladia latiuscula*.

KOLISTOŚĆ CHLOROPLASTOWEGO DNA

W roku 1971 Manning i wsp. [75] dokonali pierwszej obserwacji nieuszkodzonych cząsteczek ct DNA *Euglena gracilis* w mikroskopie elektronowym. Wykazali oni kolistość cząsteczek ct DNA i określili ich obwód na 40 μm . Duże koliste cząsteczki ct DNA obserwowano później w chloroplastach wielu gatunków wyższych roślin, glonu *Chlamydomonas reinhardii* i wątrobowca *Sphaerocarpos castellanii*. Duże, koliste cząsteczki stanowiły z reguły większość w obrębie całkowitego ct DNA. I tak, np. u *Pisum sativum* stanowiły one aż 90% całkowitego ct DNA

[62, 64]. Proporcjonalnie dużo ct DNA w układzie kolistym obserwowano także u *Antirrhinum majus* — 80% [50] oraz u *Spinacia oleracea*, *Lactuca sativa*, *Zea mays* i *Avena sativa* — około 70% [64]. Mniej kolistych cząsteczek ct DNA (10–50%) obserwowano u *Beta vulgaris* i *Oenothera hookeri* [50], *Sphaerocarpos castellanii*, *Chlamydomonas reinhardii* [6] i u *Euglena gracilis* [75]. Wynika stąd, że duże koliste cząsteczki ct DNA tworzą główny, jeżeli nie jedyny, składnik ct DNA. Znanym w literaturze wyjątkiem jest *Acetabularia*, której ct DNA występuje w układzie linearnym o długości ponad 200 μm [44, 45].

WYMIARY PLASTYDOWEGO DNA

Wielkość różnych ct DNA, wyrażona względną masą cząsteczkową, mieści się w granicach: $79,8 \cdot 10^6$ (*Vicia faba* [60]) – $143 \cdot 10^6$ (*Chlamydomonas reinhardii* [51]). W chloroplastach roślin dwuliściennych przebadanych do końca roku 1981 wielkość kolistego ct DNA wahała się z reguły w pobliżu $100 \cdot 10^6$ (wyjątek stanowi tu *Vicia faba*).

Gęstość DNA wypreparowanego z chloroplastów *Sinapis alba* w obojętnym CsCl wynosiła: $1,697 \text{ g} \cdot \text{cm}^{-3}$ [73]. Taka gęstość jest zbliżona dla większości ct DNA [56]. Wielkość cząsteczki ct DNA można także określać podając liczbę par zasad. I tak, uwzględniając dla jednej pary zasad masę cząsteczkową 660, określono ct DNA, np. *Sinapis alba*, na $158\,200 \pm 6400$ par zasad [73].

RYBONUKLEOTYDY W ct DNA

Jedną z bardziej fascynujących obserwacji dokonanych podczas fizycznych badań nad strukturą kowalencyjnie zamkniętych, kolistych ct DNA było odkrycie labilności ct DNA w alkalicznym środowisku [65]. Kiedy kowalencyjnie zamknięte, koliste ct DNA osadzano w alkalicznym CsCl, wtedy przekształcały się one stopniowo z szybko sedymentujących, zamkniętych i kolistych form (240 S–264 S zależnie od ct DNA) w wolniej sedymentujące, pocięte i zdenaturowane pojedyncze nici ct DNA (55 S–58 S). Inkubacja z mieszaniną RNazy z trzustki i RNazy T I także powodowała przekształcanie się konwalencyjnie zamkniętych, kolistych ct DNA w otwarte, koliste cząsteczki wskazując, że alkalicznie labilne miejsca w ct DNA mogły być wynikiem obecności rybonukleotydów kowalencyjnie wbudowanych w ct DNA. Przeprowadzone kinetyczne badania tempa cięcia ct DNA w obecności NaOH sugerują, że ct DNA *Pisum sativum* i *Spinacia oleracea* miały po 18 ± 2 rybonukleotydów, podczas gdy ct DNA *Lactuca sativa* 12 ± 2 rybonukleotydów.

Jaka jest funkcja owych rybonukleotydów dokładnie nie wiadomo, przypuszcza się, że mogą one pełnić jakąś funkcję przy replikacji ct DNA.

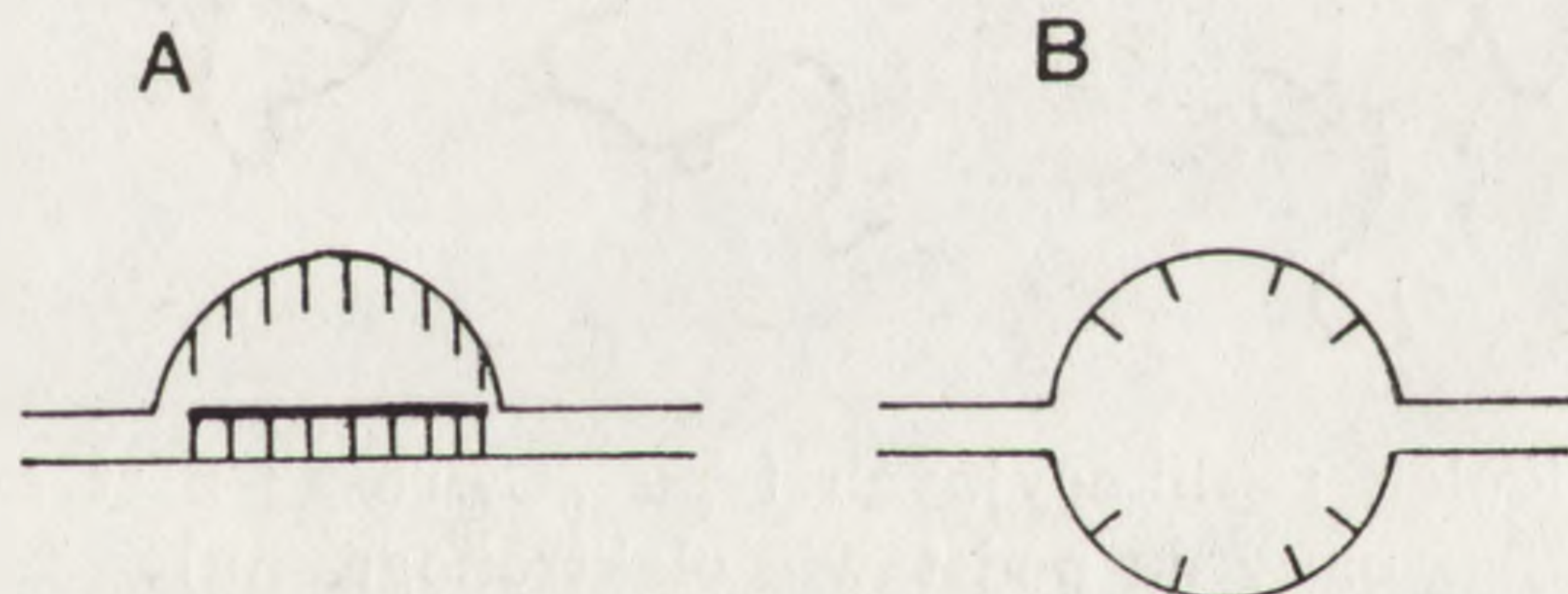
KOLISTE OLIGOMERY ct DNA

Koliste oligomery wydają się stanowić jedynie małą frakcję całkowitego kolistego ct DNA. Koliste oligomery obserwowano np. w ct DNA *Pisum sativum*, *Spinacia oleracea*, *Lactuca sativa*, *Zea mays* i innych, przy czym stanowiły one około 10% ct DNA [4].

REPLIKACJA ct DNA

Najwcześniejsze doświadczenia nad replikacją ct DNA przeprowadzili Chiang i Sueoka [19]. Wykazali oni, że tak chloroplastowy, jak i jądrowy DNA *Chlamydomonas* replikują się semikonserwatywnie, w określonym, ale odmiennym okresie cyklu komórkowego.

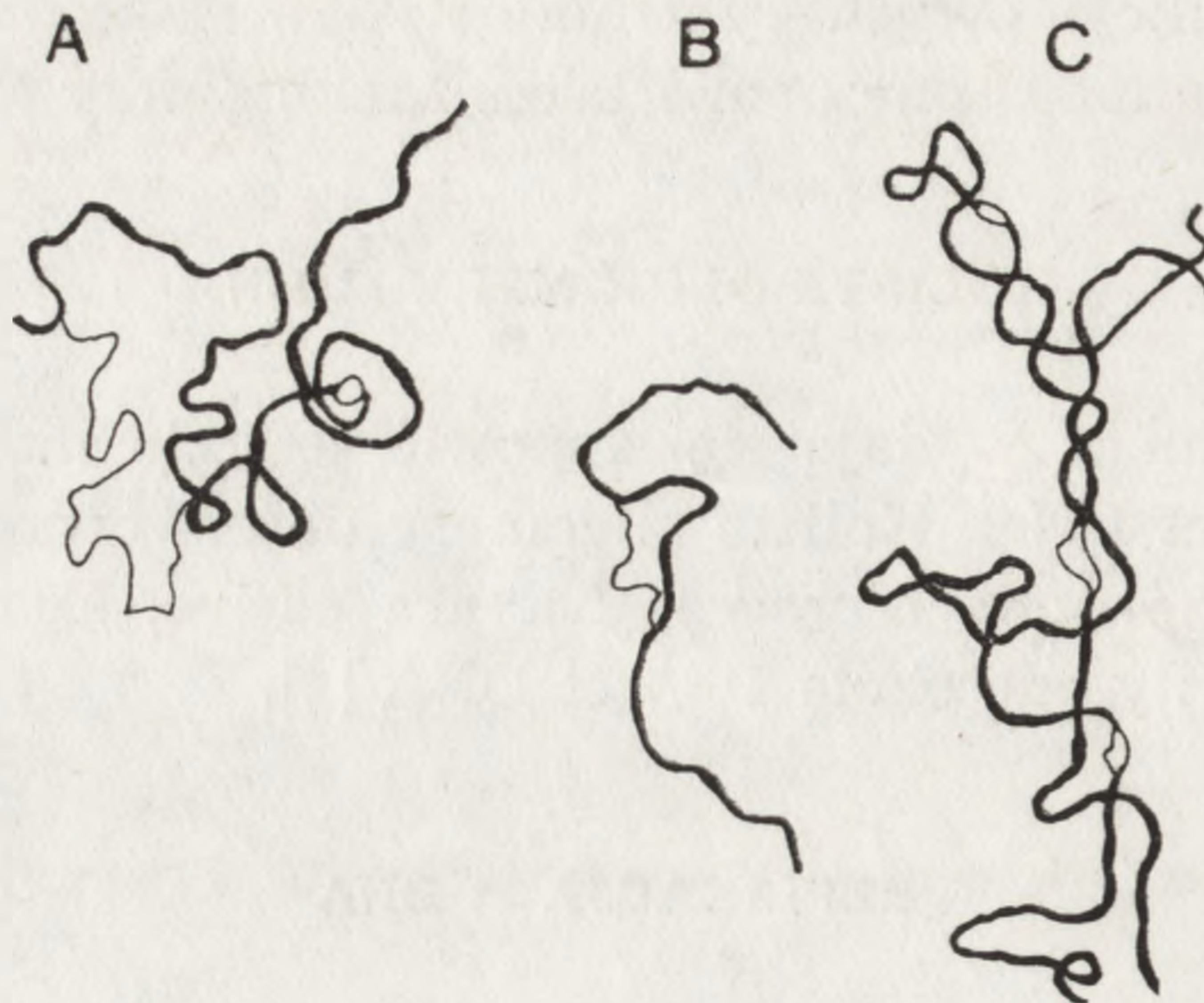
Kolodner i Tewari [63], na podstawie badań w mikroskopie elektronowym ct DNA *Pisum sativum* i *Zea mays*, stwierdzili, że replikacja ct DNA rozpoczyna się od formowania dwóch przemieszczających się pętli (Displacement loops = D-loops) (ryc. 2 i 3). Pętle te były zawsze



Ryc. 2. Schematyczny rysunek obrazujący cząsteczki chloroplastowego DNA

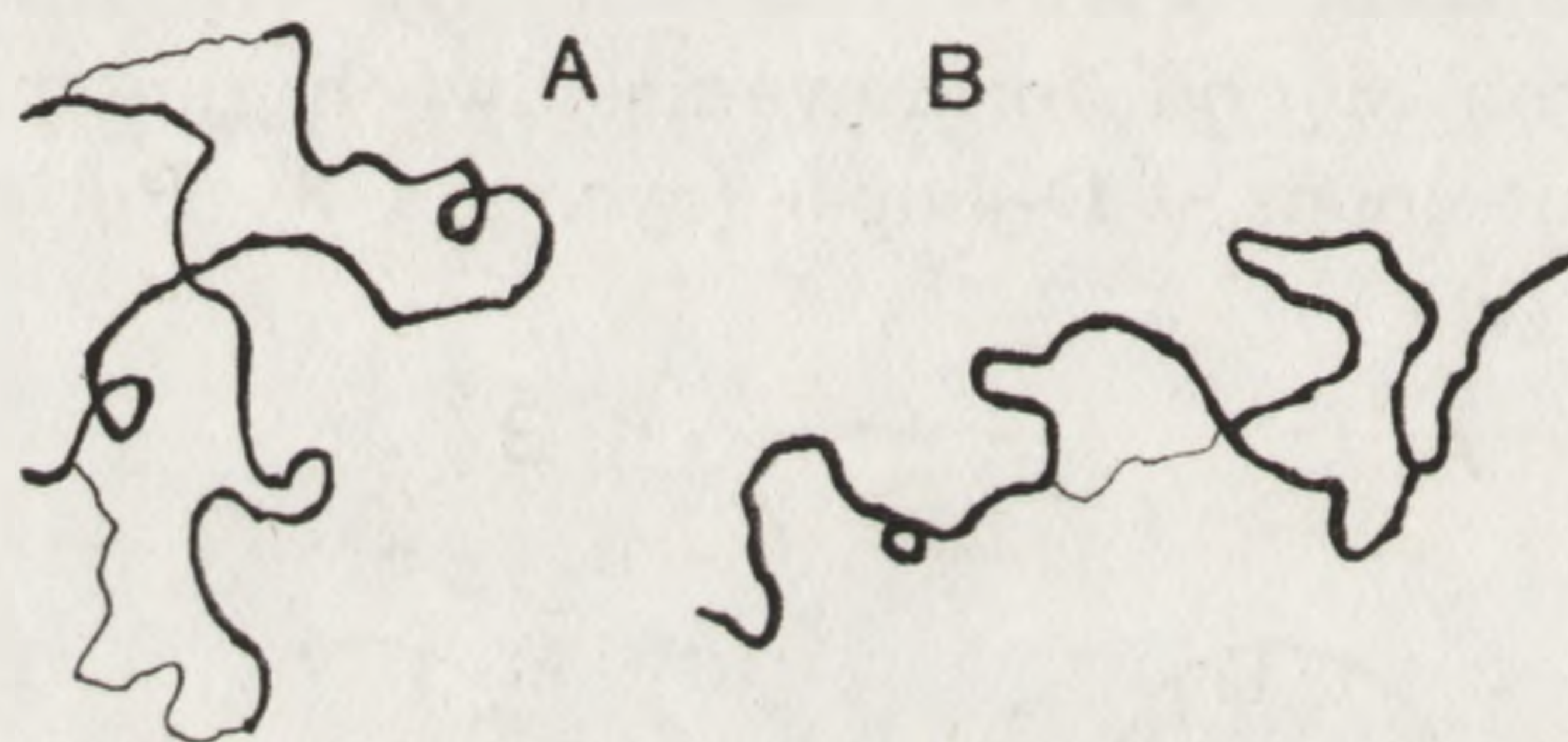
A — z przemieszczającą się pętlą (D-loop) i B — ze zdenaturowaną pętlą (Den-loop). Przemieszczająca się nić reprezentowana jest przez grubszą linię, natomiast jednoniciowe regiony reprezentowane są przez zakrzywione linie z kreskami. Według [64]

umieszczone w określonych miejscach na dwóch przeciwnych niciach rodzicielskiego ct DNA. Długość D-pętli wynosiła 820 (± 125) par zasad w ct DNA grochu i 860 (± 125) par zasad w ct DNA kukurydzy. D-pętle były oddalone od siebie o 7100 (± 240) par zasad. Ci sami autorzy stwierdzili również, że poza obszarami mającymi D-pętle, w rodzicielskim ct DNA obecne były także regiony zdenaturowanego DNA (Den-loop), ryc. 2. Te ostatnie obserwowano jednak w innych miejscach niż D-pętle, a mianowicie w obszarach bogatych w pary A—T. D-pętle różniły się od Den-pętli również wyglądem; w przypadku pierwszych jedna



Ryc. 3. Rysunek fragmentu cząsteczki ct DNA (wykonany na podstawie silnie powiększonego elektronogramu)

A — ct DNA grochu mający jedną D-pętlę i jedną Den-pętlę, B — ct DNA kukurydzy z D-pętlą, C — ct DNA grochu z trzema Den-pętlami. Cienkie i grube linie na rysunkach reprezentują odpowiednio jednoniciowe i dwuniciowe regiony. Według [64]

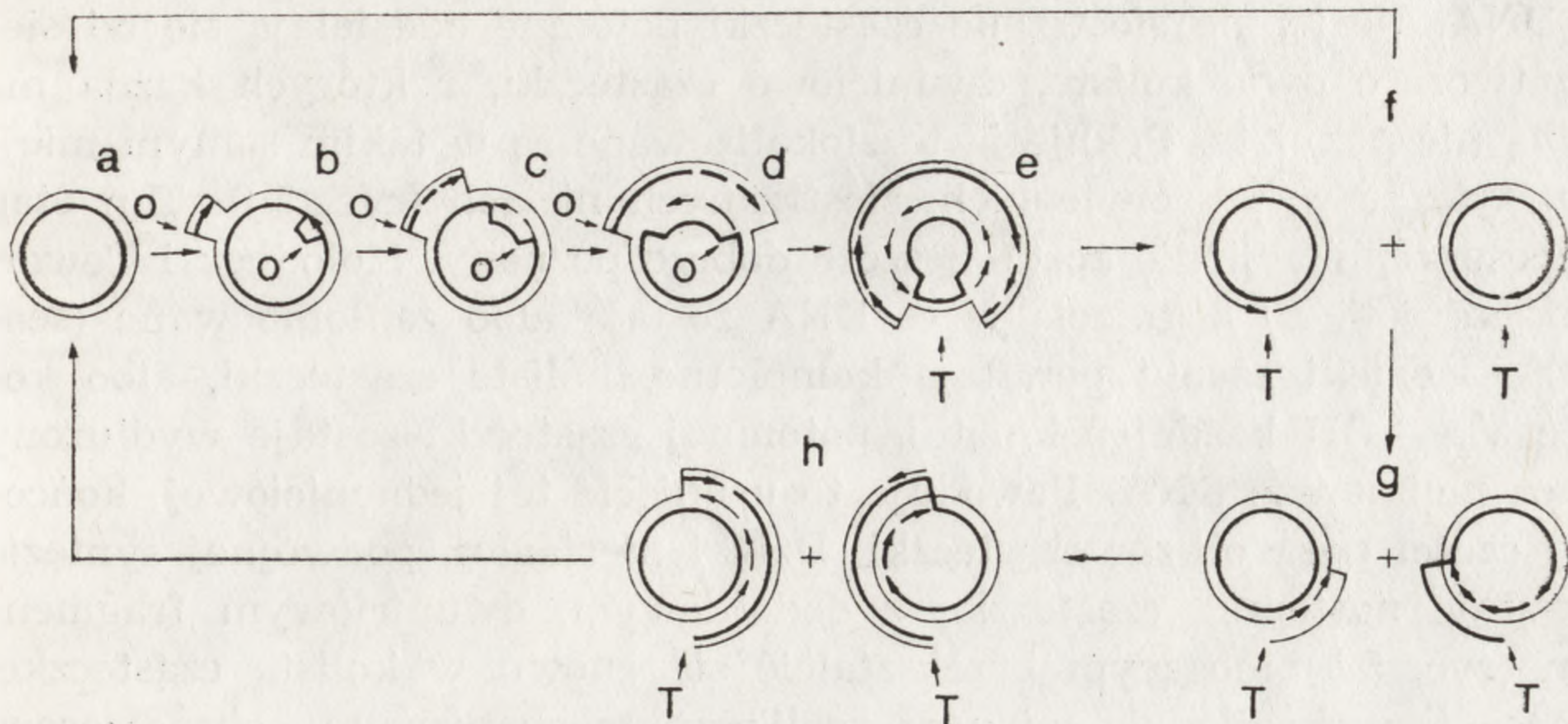


Ryc. 4. Rysunek widełek replikacyjnych typu „Cairnsa” z ct DNA grochu (wykonany na podstawie elektronogramu)

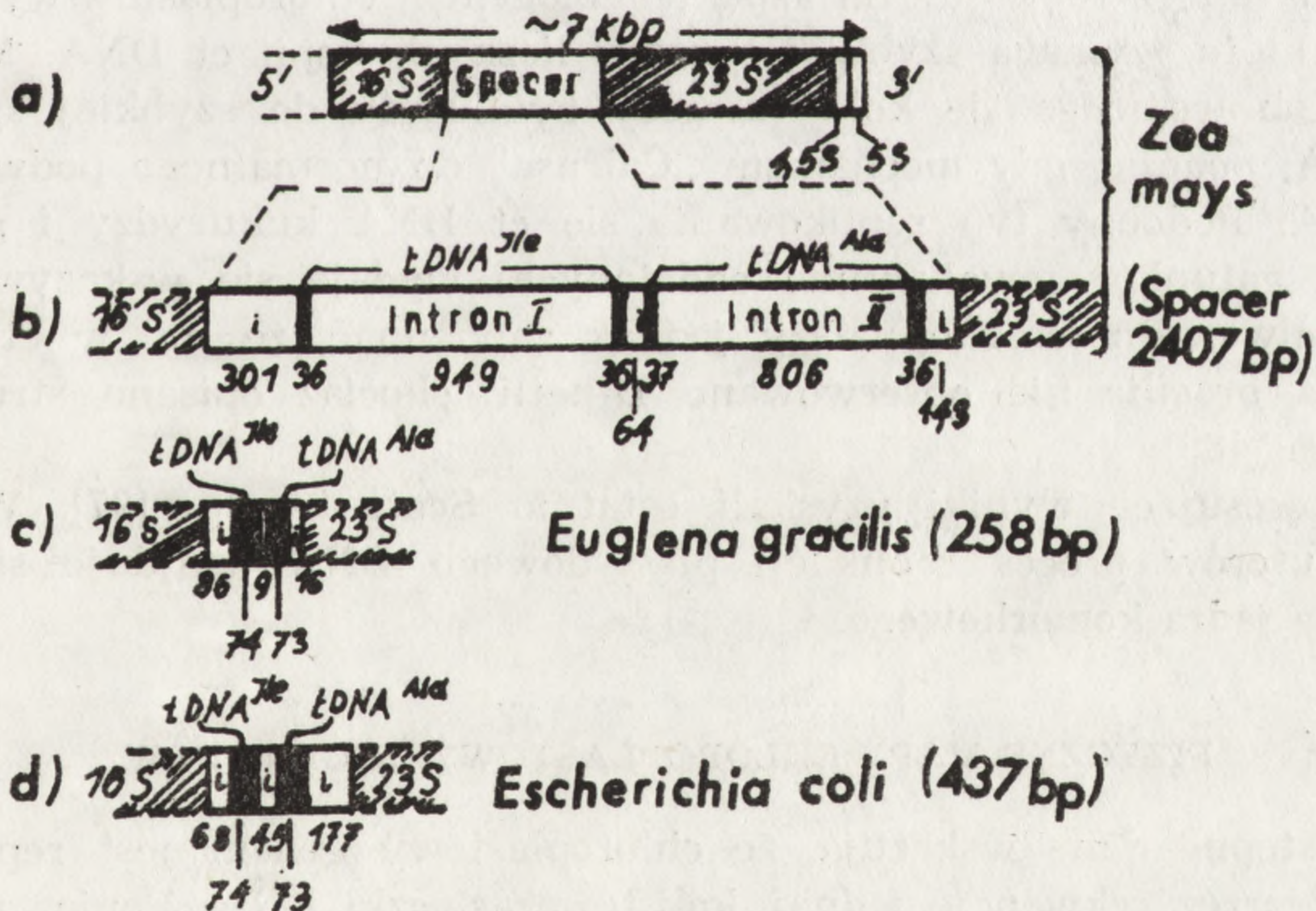
A — fragment cząsteczki mającej jednoniciowy region (cienka linia) w obu rosnących widełkach replikacyjnych, B — fragment cząsteczki zreplikowanej w 5,2% i mającej jednoniciowy region (cienka linia) tylko w jednym rosnącym widełku replikacyjnych. Według [64]

strona utworzona była z podwójnej nici, podczas gdy druga strona była jednoniciowa. Przy Den-pętlach natomiast obie strony były zawsze cienkie (jednoniciowe).

Przemieszczająca się (rosnąca) nić D-pętli jest niewielkim fragmentem DNA przymocowanym do rodzicielskiej nici wiązaniami wodorowymi (mogą być one odłączone np. po potraktowaniu alkaliami). Każda z rosnących nici D-pętli rozszerza się tylko w jednym kierunku (tzn. do siebie), ryc. 5. W efekcie powstaje po pewnym czasie nowa struktura określana mianem struktury (formy) „Cairns'a” [18] (ryc. 4 i 5), która kontynuując syntezę DNA daje ostatecznie kompletnie zreplikowany



Ryc. 5. Zaproponowany przez Kolodnera i Tewari [63] model replikacji ct DNA
 a — zamknięta kolistą rodzicielska cząsteczka, b — cząsteczka z D-pętlami, c — cząsteczka z rozszerzającymi się D-pętlami, d i e — „struktury Cairnsa”, f — dwie potomne cząsteczki, z których każda ma jedną nić pękniętą, g i h — „obracające się koła”. Grube i cienkie linie oznaczają przeciwne nici cząsteczki. Linie zakończone strzałkami obrazują potomne nici. O — obrazuje pozycję powstania dwóch D-pętli, T — oznacza miejsca zakończenia replikacji za pomocą „struktury Cairnsa”



Ryc. 6. Porównanie przerywnikowych sekwencji rDNA (spacer sequences) plasto-
 mów *Zea mays* i *Euglena gracilis* oraz genomu *Escherichia coli* pod względem
 organizacji genów dla tRNA^{Ile} i tRNA^{Ala}. Według [58]

i — region międzygenowy, intron I i II — sekwencje wtrętowe, bp — pary zasad

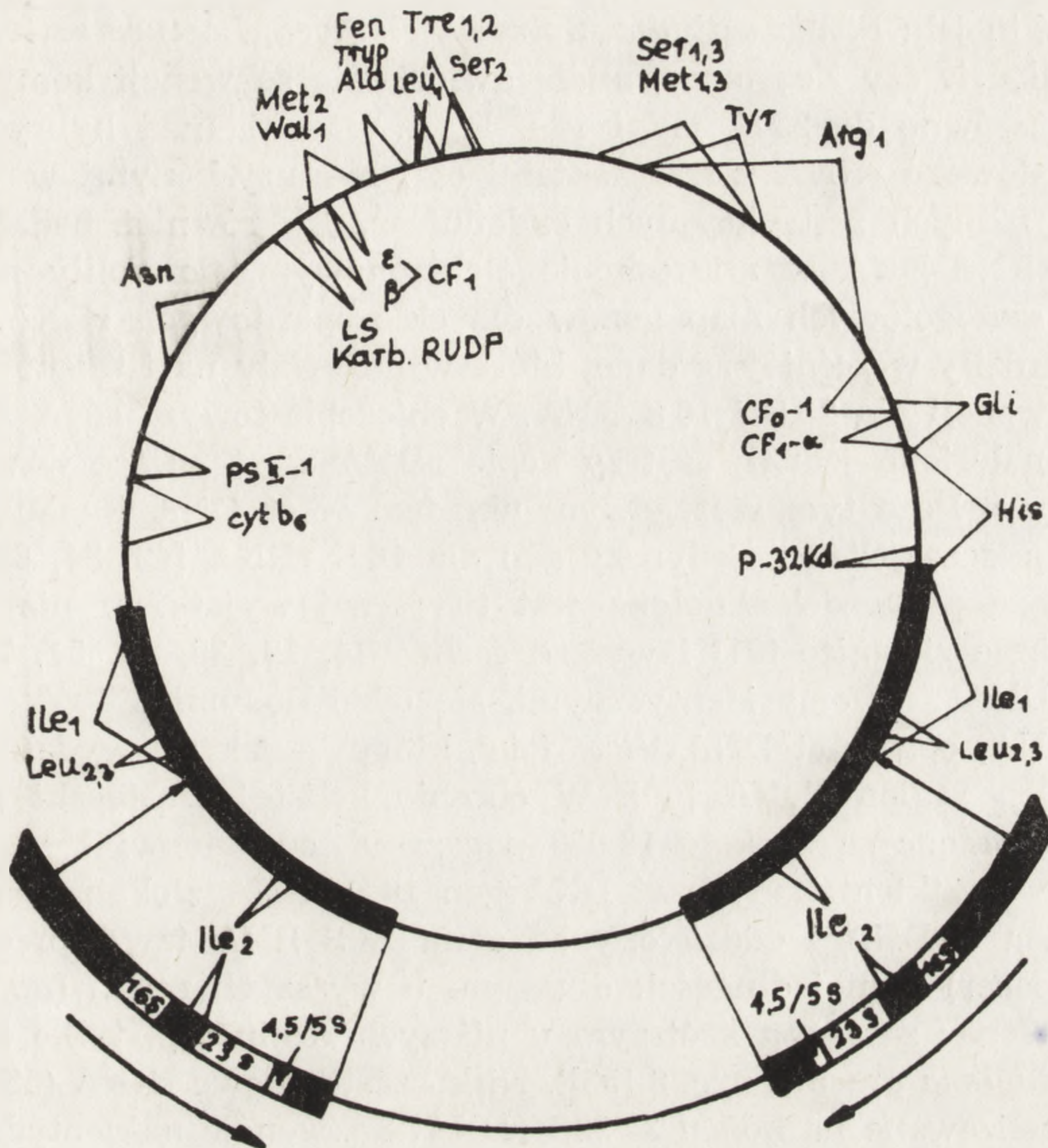
ct DNA. Następnie siostrzane cząsteczki potomne oddzielają się od siebie tworząc dwie koliste, dwuniciowe cząsteczki, z których każda ma jedną nić pękniętą. Pęknięcia te zlokalizowane są w takim samym miejscu, tyle że w przeciwległych, siostrzanych niciach (ryc. 5 f). Ten etap procesu replikacji nie został jeszcze dobrze poznany. Kolodner i Tewari [64] przyjęli, że pęknięcia w ct DNA zostają albo zaplombowane (sealed) — dzięki czemu powstają kompletne, koliste cząsteczki, albo koniec 3' — OH każdej pękniętej, potomnej cząsteczki zostaje wydłużony przez polimerazę DNA. Powoduje to usunięcie tej jednoniciowej, końcowej części poza obszar cząsteczki. Dzięki nieciągłej, podwójnej syntezie powstaje następnie cząsteczka z dodatkowym, dwuniciowym fragmentem (ryc. 5 h) mogącym przekształcić się znowu w kolistą cząsteczkę. Proces ten określa się mianem replikacji mechanizmem „obracającego się koła” (rolling circle round of replication, [39]). Ponieważ inicjacja tego typu replikacji miała miejsce w lub tuż przy miejscu zakończenia się replikacji poprzez strukturę „Cairnsa”, Kolodner i Tewari [64] sugerują, że replikacja mechanizmem „obracającego się koła” jest inicjowana przez replikację „Cairnsa”.

Dlaczego ct DNA wyższych roślin wymagają dwóch sposobów replikacji: jednego opartego na mechanizmie duplikacji, a drugiego na mechanizmie amplifikacji; Zdaniem Kolodnera i Tewari [64], może to być związane z rozwojowym aspektem biogenezy chloroplastów wyższych roślin, która wymaga szybkiej syntezy licznych kopii ct DNA. Mechanizm „obracającego się koła” mógłby być użyty do szybkiej syntezy ct DNA, podczas gdy mechanizm „Cairnsa” do normalnego podwojenia ct DNA. Podobny typ replikowania się ct DNA kukurydzy i grochu (dwóch gatunków ewolucyjnie oddalonych) wydaje się wskazywać na jego uniwersalność. Nie należy jednak zapominać, że np. w ct DNA *Euglena gracilis* nie obserwowano D-pętli, chociaż opisano struktury „Cairnsa” [89].

Interesujące wyniki uzyskali ostatnio Scott i wsp. [97]. Według tych autorów proces replikacji plastydowego DNA znajduje się pod kontrolą jądra komórkowego.

FIZYCZNE MAPY CHLOROPLASTOWYCH GENOMÓW

Dostępne dane wskazują, że chloroplastowy genom jest reprezentowany przez sekwencję jednej, kolistej cząsteczki DNA. Ponieważ jednak chloroplasty mają więcej DNA (np. chloroplasty komórki zielonego liścia lub *Euglena gracilis* mają około 10^{-11} mg DNA, co stanowi 5–10% całkowitego, komórkowego DNA) niż zawartość jednej cząsteczki, stąd wniosek, że chloroplasty muszą być poliploidami.



Ryc. 7. Genetyczna mapa plastomu *Spinacia oleracea* ze znanymi loci genów rRNA, tRNA i plastydowych polipeptydów

Grube linie odpowiadają dwóm powtórzonym sekwencjom cząsteczki DNA. PSII — fotosystem II, cyt. — cytochrom, P-32 kd — białko o masie cząsteczkowej 32 000; skróty nazw aminokwasów reprezentują odpowiednie geny tRNA. Według [51] i [107]

Konstruowanie map genów za pomocą różnych restrykcyjnych endonukleaz (przecinających dwuniciową cząsteczkę DNA w specyficznych miejscach, w wyniku czego powstają różnej długości fragmenty) wykazało, że ct DNA wszystkich przebadanych dotąd gatunków mają cztery części: dwie unikalne (nie powtarzające się) sekwencje i dwie najprawdopodobniej identyczne, powtarzające się sekwencje (ryc. 7). Ocenia się, że powtarzające się sekwencje stanowią 20–30% plastomu i zawsze zawierają geny chloroplastowych rRNA.

GENY DLA CHLOROPLASTOWYCH tRNA

Badania nad hybrydyzacją DNA-RNA ujawniły, że ct DNA ma sekwencje komplementarne do rybosomalnych RNA [101]. W kilka lat później Thomas i Tewari [102] wykazali, że każda cząsteczka ct DNA,

takich roślin jak: *Pisum sativum*, *Spinacia oleracea*, *Lactuca sativa*, *Phaseolus vulgaris* czy *Zea mays*, miała dwie kopie sekwencji komplementarnych zarówno do 23 S, jak i 16 S RNA. Badania nad hybrydyzacją chloroplastowego rRNA z fragmentami ct DNA uzyskanymi w wyniku działania różnych restrykcyjnych endonuleaz, jak również badania hybrydów rRNA-DNA w mikroskopie elektronowym, pozwoliły na konstrukcję szczegółowych map genów dla chloroplastowych rRNA. Mapy te potwierdziły wcześniejsze dane, które wskazywały na istnienie dwóch kopii sekwencji dla 23 S i 16 S RNA. W chloroplastowym DNA *Euglena gracilis* znaleziono jednak aż trzy kopie rDNA występujące w układzie szeregowym. Poza tym szeregowym układem w ct DNA *Euglena* znajduje się jeszcze jeden pojedynczy gen dla 16 S rRNA [42, 54, 87]. Wydaje się, że przypadek *Euglena* jest tu raczej wyjątkiem niż regułą, bowiem inne zielenice [91] i wyższe rośliny [4, 12, 35, 40, 51, 73, 108] mają ct DNA z dwoma identycznymi, ale odwróconymi o 180° sekwencjami rDNA, oprócz ct DNA *Vicia faba*, który — jak się wydaje — ma tylko jeden region rDNA [60]. W obrębie kolistej cząsteczki regiony rDNA utworzone są z około 18 000 par zasad, co stanowi 15% plastomu. We wszystkich znanych ct DNA gen 16 S rRNA zlokalizowany był przy końcu 5' rDNA i oddzielony od genu 23 S RNA tzw. „przerywnikiem” (spacer) różnej długości: dłuższym u wyższych roślin (np. u *Zea mays* 2407 par zasad), a krótszym u niższych roślin (np. tylko 258 par zasad u *Euglena gracilis*, ryc. 6 [58]). Niskocząsteczkowe rRNA (5S i 4,5S) były zlokalizowane na końcu 3' 23S rDNA. Sekwencje nukleotydów, zarówno 16S rDNA [95], jak i 23S rDNA [33] były w znacznej mierze (75%) homologiczne do odpowiadających im sekwencji DNA *E. coli*.

Sekwencje oddzielające (przerywniki) geny dwóch dużych rRNA mają po dwa geny dla tRNA^{Ala} i tRNA^{Ile} [41, 55, 83, 84]. Obecność w przerywniku między 16S i 23S genów dla tRNA^{Ala} i tRNA^{Ile} znana jest także w DNA *E. coli* i stanowi jeden z frapujących przykładów ewolucyjnej konserwatywności w organizacji prokaryotycznego genomu. W chloroplastowym DNA *Zea mays* dwa geny dla tRNA znajdujące się w przerywniku są rozdzielone przez duże sekwencje wtrętowe (introny) złożone z kilkuset par zasad [58] (ryc. 6). Pozostaje jednak otwarta kwestia, czy takie wtrętowe sekwencje, jakie obserwowano w genach dla tRNA ct DNA kukurydzy, istnieją także w odpowiednich genach dla tRNA innych plastomów wyższych roślin. W ct DNA *Chlamydomonas*, Rochaix i Malnoë [91] znaleźli intronową sekwencję obejmującą 970 par zasad wewnątrz genu dla 23S rRNA.

GENY DLA CHLOROPLASTOWYCH tRNA

Znanych jest 23–30 genów dla chloroplastowych tRNA. Są one nieregularnie rozmieszczone w obrębie kolistej cząsteczki ct DNA (ryc. 7).

Przyjmuje się, że w sumie zajmują około 2000 par zasad długości plastomu. Lokalizację genów dla chloroplastowych tRNA wyznaczono opierając się na wynikach uzyskanych z hybrydyzacji wyizolowanych, znakowanych izoakceptorowych tRNA z restrykcyjnymi fragmentami DNA [30, 104]. Otrzymane wyniki stwarzają wystarczającą podstawę do tego by sądzić, że ct DNA najprawdopodobniej koduje wszystkie izoakceptorowe tRNA potrzebne do syntezy polipeptydów na plastydowych polirybosomach. Import tRNA z przedziału jądrowo-cytoplazmatycznego jest bardzo mało prawdopodobny, chociaż postulowany dla pewnych rodzajów tRNA [77]. Schwartzbach i wsp. [94] natomiast wykluczyli taką możliwość. Interesujące dane w tym zakresie pochodzą od Martina i wsp. [76]. Autorzy ci podali, że u drożdży tRNA^{Liz} kodowany w jądrze może być co prawda importowany przez mitochondria, ale nie bierze on udziału w mitochondrialnej syntezie białka, lecz pełni w nich rolę regulatorową.

W roku 1978 Steinmetz i wsp. [99] zidentyfikowali w ct DNA *Spinacia oleracea* 23 geny tRNA dla 15 różnych aminokwasów. Geny te były rozmieszczone zarówno w obrębie nie powtarzających się, jak i powtarzających się sekwencji kolistej cząsteczki ct DNA.

GENY DLA PLASTYDOWYCH BIAŁEK

Nie powtarzające się sekwencje ct DNA zawierają strukturalne geny dla niektórych plastydowych białek (tab. 2). Najlepiej został poznany gen dla większej podjednostki (LS) karboksylazy RuDP. Zlokalizowano go na ct DNA *Chlamydomonas* [74], *Zea* [3, 21], *Sinapis* [70] i *Triticum* [12, 61]. Określono także sekwencję tego genu w ct DNA *Zea* [78], *Spinacia* [111] i *Triticum* (Dyer, cyt. za 86)). Wiadomo już, że podlegający transkrypcji region genu dla LS ma 1690 par zasad długości, z czego na kodujący region przypada 1425 par zasad. Przy końcu 5' znajduje się sekwencja o długości 178 par zasad, która nie ulega translacji, a przy końcu 3' sekwencja taka utworzona jest z 87 par zasad [111]. Gen dla LS zlokalizowany jest daleko od powtórzonych sekwencji (ryc. 7), podczas gdy drugi zidentyfikowany gen (indukowany światłem poprzez układ fitochromu [72]) — fotogen, umieszczony jest w bezpośrednim sąsiedztwie jednego powtózonego regionu (ryc. 7) [31]. Niedawno zlokalizowano na ct DNA szpinaku trzy z pięciu podjednostek zewnętrznego oligomeru czynnika sprzęgającego (CF₁), ATPazy [107]. Podjednostki beta i epsilon przylegają do genu dla LS, podjednostka alfa jest odległa od tego miejsca o 40 000 par zasad i sąsiaduje z I podjednostką wewnątrzblonowego oligomeru (CF₀) czynnika sprzęgającego (ryc. 7). Na ct DNA zlokalizowano także geny dla cytochromu b₆ i białek PS II. Wszystkie te geny istnieją w postaci jednej kopii na cząstecz-

TABELA 2

Polipeptydy kodowane przez ct DNA, identyfikowane metodą syntezy w izolowanych chloroplastach (in organello) według Parthiera [86] — zmienione

Polipeptyd	Literatura
Większa podjednostka karboksylazy RuDP	Bottomley i wsp. [10] Vasconcelos [103] Bottomley i Whitfeld [11] Silverthorne i Ellis [98] Langridge [68]
Tylakoidowe białko P-32 kd	Eaglesham i Ellis [32] Vasconcelos [103] Grebanier i wsp. [43] Weinbaum i wsp. [105] Silverthorne i Ellis [98] Leto i wsp. [69]
CF ₁ podjednostki α , β , ϵ	Mendiola-Morgenthaler i wsp. [79] Nelson i wsp. [80]
CF ₀ podjednostka I	Nelson i wsp. [80]
podjednostka III (proteolipid)	Doherty i Gray [29]
Cytochrom b ₅₅₉	Zielinski i Price [110]
Cytochrom b ₆ -f	Doherty i Gray [28]
Białka wchodzące w skład PS I	Zielinski i Price [110] Ortiz i Stutz [82] Geatha i Gnanam [36]
Białka wchodzące w skład PS II	Ortiz i Stutz [82]
Czynniki elongacyjne T i G	Ciferri i wsp. [20]
Rybosomalne białka (11 rodzajów)	Eneas-Filho i wsp. [34]

kę ct DNA. Ponieważ pewne z nich (np. LS, β , ϵ) są zebrane w grupy także w ct DNA innych wyższych roślin [107], nie można więc wykluczyć istnienia policistronowych transkrypcyjnych jednostek (ct DNA operonów). Takie jednostki są już znane z transkrypcji regionów rDNA w obrębie plastomu.

TRANSKRYPCYJNIE AKTYWNY ct DNA

Odbiałczone plastydowe chromosomy, pokazane np. przez Hermanna i wsp. [49] czy przez Yoshidę i wsp. [109], miały postać silnie pofałdowanych nici, uorganizowanych dookoła tzw. „centralnego ciała” (central body) utworzonego z białek, które nie ulegały ekstrakcji przy zastosowaniu zwykłej procedury. Funkcja centralnego ciała nie jest dokładnie znana. Przypuszcza się, że za jego pomocą nukleoid łączy się z błonami. Nie reprezentuje ono jednak fragmentu błony, ponieważ nie wykryto w nim obecności kwasu α -linolenowego [16]. Prokaryotyczny, transkryp-

cyjnie aktywny kompleks DNA—białko został najpierw wyizolowany [100] i sfotografowany [27] u *Escherichia coli*. W roku 1976 Griffith [46] wykazał, że prokaryotyczny DNA może mieć postać skondensowanych chromatynopodobnych włókien, których substrukturę stanowią powtarzające się 13 nm koralikowate utwory.

Trankrypcyjnie aktywny plastydowy kompleks DNA—białko sfotografowali po raz pierwszy Briat i wsp. [16]. Analiza wcześniej wyizolowanych kompleksów [14, 15] ujawniła, że zawierały one ct DNA, polimerazę RNA i inne białka. Po utrwaleniu w aldehydzie glutarowym plastydowy, transkrypcyjnie aktywny kompleks DNA—białko był silnie skondensowany i miał koralikowatą strukturę [16]. Kiedy pominięto utrwalanie aldehydem, ct DNA był znacznie mniej skondensowany.

Posługując się metodą wirowania w CsCl autorzy stwierdzili, że kompleksy DNA—białko pochodzenia plastydowego można rozdzielić na dwie populacje: jedną o gęstości $1,570 \text{ g} \cdot \text{cm}^{-3}$ i drugą o gęstości $1,610 \text{ g} \cdot \text{cm}^{-3}$. Po przebadaniu tych populacji, autorzy podali w konkluzji, że białko może być: albo mocno przyłączone do DNA w centralnym ciele, albo znacznie słabiej, wzdłuż nici DNA. W tym drugim przypadku białka, zdaniem Briata i wsp. [16], mogą pełnić funkcje enzymatyczne (transkrypcja), a także przyczyniać się do silniejszej spiralizacji DNA. Dotychczas w kompleksie DNA—białko wykryto 36 polipeptydów o masie cząsteczkowej 12 000–180 000. Siedem z nich (o masach cząsteczkowych 14 000–46 000) było wysoce rozpuszczalnych w 0,4 N H_2SO_4 [16].

REGULACJA EKSPRESJI GENÓW CHLOROPLASTOWYCH

Jednym z powszechniej akceptowanych czynników regulujących ekspresję chloroplastowych genów jest światło. Czynniki ten może działać poprzez układ fitochromu lub poprzez niektóre związki pośrednie szlaku biosyntezy chlorofilu (np. poprzez protochlorofilid). Na przykład Link [71, 72] doniósł, że światło działające poprzez układ fitochromu zwiększa poziom plastydowego mRNA dla polipeptydu o masie 35 000 będącego prekursorowym polipeptydem tylakoidowego białka o masie 32 000 (białko związane z PS II). Cohen i Schiff [22] uzyskali dane wskazujące, że protochlorofil (lid) jest pośrednikiem w fotokontroli procesu transkrypcji: ct DNA \rightarrow chloroplastowe rRNA.

Czynniki kontrolującymi mogą być również endogenne regulatory wzrostu i rozwoju takie jak cytokininy, o których od dawna wiadomo, że bezpośrednio lub pośrednio zaangażowane są w wiele szlaków biogenetycznych związanych z chloroplastogenezą (patrz przeglądowa praca Parthiera [85]). Brak do chwili obecnej doniesienia na temat roli

tzw. „wtórnego messenger”, tzn. cyklicznego AMP w procesie regulacji chloroplastowych genów. Istnieją natomiast liczne prace, w których wykazano, że podlegające metabolizmowi źródła węgla (takie jak np. glukoza, octany i inne) wyraźnie hamują formowanie chloroplastów [1, 9, 26, 52, 59, 96]. Prace te powinny zachęcić do badań nad metaboliczną kontrolą chloroplastogenezy.

Nie bez znaczenia są także ultrastrukturalne czy biochemiczne zmiany, na przykład w przepuszczalności otoczki plastydowej [47] dla jonów i innych niskocząsteczkowych substancji („ligandów”), które mogą także, chociaż raczej w niespecyficzny sposób, wpływać na regulację ekspresji genów.

LITERATURA

- [1] APP A. A., JAGENDORF A. T., Repression of chloroplast development in *Euglena gracilis* by substrates, *J. Protozool.*, **10**: 340–343, 1963.
- [2] BAUER E., Das wesen und die erblichkeitsverhältnisse der „Varietates albomarginatae nort” von *Pelargonium zonale*, *Z. Vererbungsl.*, **1**: 333–351, 1909.
- [3] BEDBROOK J. R., COEN D. M., BEATON A. R., BOGORAD L., RICH A., Location of the single gene for the large subunit of ribulose 1,5-bisphosphate on the maize chloroplast chromosome, *J. Biol. Chem.*, **254**: 905–910, 1979.
- [4] BEDBROOK J. R., KOLODNER R., The structure of chloroplast DNA, *Ann. Rev. Plant Physiol.*, **30**: 593–620, 1979.
- [5] BEDBROOK J. R., LINK G., COEN D. M., BOGORAD L., RICH A., Maize plastid gene expressed during photoregulated development, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **75**: 3060–3064, 1978.
- [6] BEHN W., HERRMANN R. G., Circular molecules in the β satellite DNA of *Chlamydomonas reinhardtii*, *Mol. Gen. Genet.*, **157**: 25–30, 1977.
- [7] BISALPUTRA T., BISALPUTRA A. A., The ultrastructure of chloroplast genophore of a brown alga *Sphacelaria* sp. I Plastid DNA configuration — the chloroplast genophore, *J. Ultrastruct. Res.*, **29**: 151–170, 1969.
- [8] BISALPUTRA T., BISALPUTRA A. A., The ultrastructure of chloroplast of brown alga *Sphacelaria* sp. III The replication and segregation of chloroplast genophore, *J. Ultrastruct. Res.*, **32**: 417–429, 1970.
- [9] BOEGE F., WESTHOFF D., ZIMMERMANN K., ZETSCHKE K., Regulation of the synthesis of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase and its subunits in the flagellate *Chlorogonium elongatum*. I Effect of light and acetate on the synthesis and degradation of the enzyme, *Eur. J. Biochem.*, **113**: 581–586, 1981.
- [10] BOTTOMLEY W., SPENCER D., WHITFIELD P. R., Protein synthesis in isolated chloroplasts. Comparison of light driven and ATP-driven synthesis, *Arch. Biochem. Biophys.*, **164**: 106–117, 1974.
- [11] BOTTOMLEY W., WHITFIELD P. R., Cell-free transcription and translation of total spinach chloroplast DNA, *Eur. J. Biochem.*, **93**: 31–39, 1979.
- [12] BOWMAN C. M., KOLLER B., DELNIS H., DYER T. A., A physical map of wheat chloroplast DNA showing the location of the structural genes for the ribosomal RNAs and the large subunit of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase, *Mol. Gen. Genet.*, **183**: 93–101, 1981.

- [13] BRAWERMAN G., EISENSTADT J. M., Deoxyribonucleic acid from chloroplasts of *Euglena gracilis*, *Biochem. Biophys. Acta*, **91**: 477 1964.
- [14] BRIAT J. F., LAULHERE J. P., MACHE R., Transcription activity of a DNA — protein complex isolated from spinach plastids, *Eur. J. Biochem.*, **98**: 285–292, 1979.
- [15] BRIAT J. F., MACHE R., Properties and characterization of a spinach chloroplast RNA polymerase isolated from a transcriptionally active DNA-protein complex, *Eur. J. Biochem.*, **111**: 503–509, 1980.
- [16] BRIAT J. F., GIGOT C., LAULHERE J. P., MACHE R., Visualization of a spinach plastid transcriptionally active DNA-protein complex in a highly condensed structure, *Plant Physiol.*, **69**: 1205–1211, 1982.
- [17] BUBBY B. T., DODGE J. D., The fine structure of the chloroplast nucleoid in *Scrippsiella sweeneyae* (*Dinophyceae*), *J. Ultrastruct. Res.*, **48**: 153–161, 1974.
- [18] CAIRNS J., The chromosome of *Escherichia coli*, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, **28**: 43–46, 1963.
- [19] CHIANG K. S., SUEOKA N., Replication of chloroplast DNA in *Chlamydomonas reinhardtii* during the vegetative cell cycle: Its mode and regulation, *Proc. Nat. Acad. Sci., U.S.A.*, **57**: 1506–1513, 1967.
- [20] CIFERRI O., Di PASQUALE G., TIBONI O., Chloroplast elongation factors are synthesized in the chloroplasts, *Eur. J. Biochem.*, **102**: 331–335, 1979.
- [21] COEN D. M., BEDBROOK J. R., BOGORAD L., RICH A., Maize chloroplast DNA fragment encoding the large subunit of ribulosebisphosphate carboxylase, *Proc. Nat. Acad. Sci., U.S.A.*, **74**: 5487–5491, 1977.
- [22] COHEN C., SCHIFF J. A., Event surrounding the early development of *Euglena* chloroplasts. 10. Photoregulation of the transcription of chloroplastic and cytoplasmic ribosomal RNAs, *Arch. Biochem. Biophys.*, **177**: 201–216, 1976.
- [23] COLEMAN A. W., Visualization of chloroplast DNA with the fluorochromes, *Exp. Cell Res.*, **114**: 95–100, 1978.
- [24] COLEMAN A. W., Use of the fluorochrome 4'-6-diamidino-2-phenylindole in genetic and developmental studies of chloroplast DNA, *J. Cell Biol.*, **82**: 299–305, 1979.
- [25] CORRENS C., Vererbungsversuche mit blass (gelb) grünen und blatttrigen Sippen bei *Mirabilis*, *Urtica* und *Lunaria*, *Z. Vererbungsl.*, **1**: 291–329, 1909.
- [26] DALTON C., The effect of carbohydrates on the greening of plant cultures, *Biochem. Soc. Transact.*, **8**: 475–479, 1980.
- [27] DELIUS H., WORCEL A., Electron microscopic visualization of the folded chromosome of *Escherichia coli*, *J. Mol. Biol.*, **82**: 107–109, 1974.
- [28] DOHERTY A., GRAY J. C., Synthesis of cytochrome f by isolated pea chloroplasts, *Eur. J. Biochem.*, **98**: 87–92, 1979.
- [29] DOHERTY A., GRAY J. C., Synthesis of a dicyclohexyl-carbodiimide — binding proteolipid by isolated pea chloroplasts, *Eur. J. Biochem.*, **108**: 131–136, 1980.
- [30] DRIESEL A. J., CROUSE E. J., GORDON K., BOHNERT H. J., HERRMANN R. G., STEINMETZ A., MUBUMBILA M., KELLER M., BURKARA G., WEIL J. H., Fractionation and identification of spinach chloroplast transfer RNAs and mapping of their genes on the restriction map of chloroplast DNA, *Gene*, **6**: 285–306, 1979.
- [31] DRIESEL A., SPEIRS J., BOHNERT H. J., Spinach chloroplast mRNA for

- a 32 000 dalton polypeptide. Size and localization on the physical map of the chloroplast DNA, *Biochim. Biophys. Acta*, **610**: 297-310, 1980.
- [32] EAGLESHAM A. R. J., ELLIS R. J., Protein synthesis in chloroplasts II. Light-driven synthesis of membrane proteins by isolated pea chloroplasts, *Biochim. Biophys. Acta*, **235**: 396-407, 1974.
- [33] EDWARDS K., KÖSSEL H., The r RNA operon from *Zea mays* chloroplasts: Nucleotide sequence of 23S r DNA and its homology with *E. coli* 23 S rDNA, *Nucleic Acids Res.*, **9**: 2853-2863, 1981.
- [34] ENEAS-FILHO J., HARTLEY M. R., MACHE R., Pea chloroplast ribosomal proteins: Characterization and site of synthesis, *Mol. Gen. Genet.*, **181**: 484-488, 1981.
- [35] FLUHR R., EDELMAN M., Physical mapping of *Nicotiana tabacum* chloroplast DNA, *Mol. Gen. Genet.*, **181**: 484-490, 1981.
- [36] GEETHA V., GNANAM A., Identification of P 700 chlorophyll a-protein complex as a product of chloroplast protein synthesis, *FEBS Lett*, **111**: 272-276, 1980.
- [37] GIBBS S. P., CHANG D., SLANKIS T., The chloroplast nucleoid in *Ochromonas danica* I. Three-dimensional morphology in light-and dark grown cells, *J. Cell Sci.*, **16**: 557-577, 1974.
- [38] GIBBS S. P., MAK R. N., SLANKIS T., The chloroplast nucleoid in *Ochromonas danica* II. Evidence for an increase in plastid DNA during greening, *J. Cell Sci.*, **16**: 579-591, 1974.
- [39] GILBERT W., DRESSLER D., DNA replication: the rolling circle model, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, **33**: 473-484, 1968.
- [40] GRODON K. H. J., CROUSE E. J., BOHNERT H. J., HERRMANN R. G., Restriction endonuclease cleavage DNA from *Oenothera parviflora*, *Theor. Appl. Genet.*, **59**: 281-296, 1981.
- [41] GRAF L., KÖSSEL H., STUTZ E., Sequencing of 16S-23S spacer in a ribosomal RNA operon of *Euglena gracilis* chloroplast reveals two tRNA genes, *Nature*, **186**: 908-910, 1980.
- [42] GRAY P. W., HALLICK R. B., Physical mapping of the *Euglena gracilis* chloroplast DNA and ribosomal RNA gene region, *Biochemistry*, **17**: 284-289, 1978.
- [43] GREBANIER A. E., STEINBACK K. E., BOGORAD L., Comparison of the molecular weights of protein synthesized by isolated chloroplasts with those which appear during greening in *Zea mays*, *Plant Physiol.*, **63**: 436-439, 1979.
- [44] GREEN B. R., Covalently closed minicircular DNA associated with *Acetabularia* chloroplasts, *Biochim. Biophys. Acta*, **447**: 157-166, 1976.
- [45] GREEN B. R., BURTON H., *Acetabularia* chloroplast DNA: electron microscope visualization, *Science*, **168**: 981-982, 1970.
- [46] GRIFFITH J. D., Visualization of procaryotic DNA in a regularly condensed chromatin-like fiber, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **73**: 563-567, 1976.
- [47] HAMPP R., WELLBURN A. R., Early changes in the envelope permeability of developing chloroplasts, *J. Exp. Bot.*, **27**: 778-784, 1976.
- [48] HERRMANN R. G., KOWALIK K. V., Selective preservation of DNA-regions and membranes in chloroplasts and mitochondria, *J. Cell Biol.*, **45**: 198-201, 1970.
- [49] HERRMANN R. G., KOWALIK K. V., BOHNERT H. J., Structural and functional aspects of plastome. I. The organization of the plastome, *Port. Acta Biol. Ser. A.*, **14**: 91-110, 1974.

- [50] HERRMANN R. G., BOHNERT H. J., KOWALIK K. V., SCHMITT J. M., Size, conformation and purity of chloroplast DNA from some higher plants, *Biochim. Biophys. Acta*, **378**: 305–317, 1975.
- [51] HERRMANN R. G., POSSINGHAM J. V., Plastid DNA — The plastome. [w] Chloroplasts (Results and problems in Cell Differentiation, ed. Reinert J., Vol. 10) str. 45–96, Springer, Berlin Heidelberg — New York 1980.
- [52] HERRMANN R. G., SCHWARTZBACH S. D., Nutritional regulation of organelle biogenesis in *Euglena*. Repression of chlorophyll and NADP-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase synthesis, *Plant Physiol.*, **65**: 382–386, 1980.
- [53] JAMES T. W., JOPE C., Visualization by fluorescence of chloroplast DNA in higher plants by means of the DNA-specific probe 4'6-diamidino-2-phenylindole, *J. Cell Biol.*, **79**: 623–630, 1978.
- [54] JENNI B., STUTZ E., Analysis of *Euglena gracilis* chloroplast DNA. Mapping of a DNA sequence complementary to 16S rRNA outside of the three rRNA gene sets, *FEBS Lett.*, **102**: 95–99, 1979.
- [55] KELLER M., BURKARD G., BOHNERT H. J., MUBUMBILA M., GORDON K., STEINMETZ A., HEISER D., CROUSE E. J., WEIL J. H., Transfer RNA genes associated with the 16S and 23S rRNA genes *Euglena* chloroplast DNA, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **95**: 47–54, 1980.
- [56] KIRK J. T. O., Chloroplast nucleic acids. [w] Fasman GD (ed). Handbook of Biochemistry and Molecular Biology, vol. II (nucleic acids) CRC press, New York, pp. 356–362, 1976.
- [57] KISLEV N., SWIFT H., BOGORAD L., Nucleic acids of chloroplasts and mitochondria in Swiss chard, *J. Cell Biol.*, **25**: 327, 1965.
- [58] KOCH W., EDWARDS K., KÖSSEL H., Sequencing of the 16S-23S spacer in a ribosomal RNA operon of *Zea mays* chloroplast DNA reveals two split tRNA genes, *Cell*, **25**: 203–213, 1981.
- [59] KOLL M., BRANDT P., WIESSNER W., Hemmung der lichtabhängigen Chloroplastenentwicklung etiolierter *Euglena gracilis* durch Glucose. *Protoplasma*, **105**: 121–128, 1980.
- [60] KOLLER B., DELIUS H., *Vicia faba* chloroplast DNA has only one set of ribosomal RNA genes as shown by partial denaturation mapping and R — loop analysis, *Mol. Gen. Genet.*, **178**: 261–270, 1980.
- [61] KOLLER B., DELIUS H., DYER T. A., The organization of the chloroplast DNA in wheat and maize in the region containing the LS gene, *Eur. J. Biochem.*, **122**: 17–23, 1982.
- [62] KOLODNER R., TEWARI K. K., Molecular size and conformation of chloroplast deoxyribonucleic acid from pea leaves, *J. Biol. Chem.*, **247**: 6355–6364, 1972.
- [63] KOLODNER R. D., TEWARI K. K., Chloroplast DNA from higher plants replicates by both the Cairns and the rolling circle mechanism, *Nature*, **256**: 708–711, 1975.
- [64] KOLODNER R., TEWARI K. K., Presence of displacement loops in the covalently closed circular chloroplast deoxyribonucleic acid from higher plants, *J. Biol. Chem.*, **250**: 8840–8847, 1975.
- [65] KOLODNER R., WARNER R. C., TEWARI K. K., The presence of covalently linked ribonucleotides in the closed circular deoxyribonucleic acid from higher plants, *J. Biol. Chem.*, **250**: 7020–7026, 1975.
- [66] KOWALIK K. V., HERRMANN, R. G., Variable amounts of DNA related to the size of chloroplasts IV. Three dimensional arrangement of DNA in

- fully differentiated chloroplasts of *Beta vulgaris* L., *J. Cell. Sci.*, **11**: 357-377, 1972.
- [67] KUROIWA T., SUZUKI T., OGAWA K., KAWANO S., The chloroplast nucleus: distribution, number, size, and shape, and a model for the multiplication of the chloroplast genome during chloroplast development, *Plant Cell Physiol.*, **22**: 381-396, 1981.
- [68] LANGRIDGE P., Synthesis of the large subunit of the spinach ribulose biphosphate carboxylase may involve a precursor polypeptide, *FEBS Lett.*, **123**: 85-89, 1981.
- [69] LETO K. J., KERESZTES A., ARNTZEN Ch. J., Nuclear involvement in the appearance of a chloroplast-encoded 32 000 dalton thylakoid membrane polypeptide integral to the photosystem II complex, *Plant Physiol.*, **69**: 1450-1458, 1982.
- [70] LINK G., Cloning and mapping of the chloroplast DNA sequences for two messenger RNAs from mustard (*Sinapis alba* L.). *Nucleic Acids Res.*, **9**: 3681-3706, 1981.
- [71] LINK G., Enhanced expression of a distinct plastid DNA region in mustard seedlings by continuous far-red light, *Planta*, **152**: 379-380, 1980.
- [72] LINK G., Phytochrome control of plastid mRNA in mustard (*Sinapis alba* L.), *Planta*, **154**: 81-86, 1982.
- [73] LINK G., CHAMBERS S. E., THOMPSON J. A., FALK H., Size and physical organization of chloroplast DNA from mustard seedlings, *Mol. Gen. Genet.*, **181**: 454-457, 1981.
- [74] MALNOË R., ROCHAIX J. D., CHUA N. H., SPAHR P. F., Characterization of the gene and messenger RNA of the large subunit of ribulose-1,5-diphosphate carboxylase in *Chlamydomonas reinhardtii*, *J. Mol. Biol.*, **133**: 417-434, 1979.
- [75] MANNING J. E., WOLSTENHOLME D. R., RYAN R. S., HUNTER J. A., RICHARDS O. C., Circular chloroplast DNA from *Euglena gracilis*, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **68**: 1169, 1971.
- [76] MARTIN R. P., SCHNELLER J. M., STHAL A. J. C., DIRHEIMER G., Import of nuclear DNA coded lysine-accepting transfer ribonucleic acid (anticodon CUU) into yeast mitochondria, *Biochemistry*, **18**: 4600-4605, 1979.
- [77] Mc CREA J. M., HERSHBERGER C. L., Chloroplast DNA codes for t RNA from cytoplasmic polyribosomes, *Nature*, **274**: 717-719, 1978.
- [78] Mc INTOSH L., POULSON C., BOGORAD L., Chloroplast gene sequence for the large subunit ribulose-bisphosphate carboxylase of maize, *Nature*, **288**: 556-560, 1980.
- [79] MENDIOLA-MORGENTHALER L. R., MORGENTHALER J. J., PRICE C. A., Synthesis of coupling factor CF₁ protein by isolated spinach chloroplasts, *FEBS Lett.*, **62**: 96-100, 1976.
- [80] NELSON N., NELSON H., SCHATZ G., Biosynthesis and assembly of the proton-translocating adenosine triphosphatase complex from chloroplasts, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **77**: 1361-1364, 1980.
- [81] NISHIBAYSHI S., KUROIWA T., Behavior of leucoplast nucleoids in the epidermal cell of onion (*Allium cepa*) bulb, *Protoplasma*, **110**: 177-184, 1982.
- [82] ORITZ W., STUTZ E., Synthesis of polypeptides of the chlorophyll-protein complexes in isolated chloroplasts of *Euglena gracilis*, *FEBS Lett.*, **116**: 298-302, 1980.
- [83] OROZCO E. M., GRAY P. W., HALLICK R. B., *Euglena gracilis* chloroplast

- ribosomal RNA transcription units. I. The location of transfer RNA, 5 S, 16 S and 23 S ribosomal RNA genes, *J. Biol. Chem.*, **255**: 10 991–10 996, 1980 a.
- [84] OROZCO E. M., RUSHLOW K. E., DODD J. R., HALLICK R. B., *Euglena gracilis* chloroplast ribosomal RNA transcription units. II. Nucleotide sequence homology between the 16 S-23 S ribosomal RNA leader regions, *J. Biol. Chem.*, **255**: 10 997–11 002, 1980 b.
- [85] PARTHIER B., The role of phytohormones (cytokinins) in chloroplast development, *Biochem. Physiol. Pflanzen*, **174**: 173–214, 1979.
- [86] PARTHIER B., The cooperation of nuclear and plastid genomes in plastid biogenesis and differentiation, *Biochem. Physiol. Pflanzen*, **177**: 283–317, 1982.
- [87] RAWSON J. R. Y., KUSHNER S. R., VAPNEK D., ALTON N. K., BOERMA C. L., Chloroplast ribosomal RNA genes in *Euglena gracilis* exist as three clustered tandem repeats, *Gene*, **3**: 191–209, 1978.
- [88] RAY D. S., HANAWALT P., Properties of the satellite DNA associated with chloroplasts of *Euglena gracilis*, *J. Mol. Biol.*, **9**: 812, 1964.
- [89] RICHARDS O. C., MANNING J. E., Replication of chloroplast DNA in *Euglena gracilis*, *Le Cycles Cellulaires et Leur Blocage*, str. 213–224, 1975, C.N.R.S.
- [90] RIS H., PLAUT W., Ultrastructure of DNA-containing areas in chloroplasts of *Chlamydomonas*, *J. Cell Biol.*, **13**: 383–391, 1962.
- [91] ROCHAIX J. O., MALNOË P., Anatomy of the chloroplast ribosomal DNA of *Chlamydomonas reinhardtii*, *Cell*, **15**: 661–670, 1978.
- [92] SAGAN L., SCHER S., Evidence for cytoplasmic DNA in *Euglena gracilis*, *J. Protozool.*, **8** (Suppl.): 8, 1961.
- [93] SAGER R., ISHIDA M. R., Chloroplast DNA of *Chlamydomonas*, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **50**: 725–730, 1963.
- [94] SCHWARTZBACH S. D., BARNETT W. E., HECKER L. I., Evidence that *Euglena* chloroplasts do not export tRNAs, *Nature*, **280**: 86–87, 1979.
- [95] SCHWARZ Z., KÖSSEL H., The primary structure of 16 S rDNA from *Zea mays* chloroplast is homologous to *E. coli* 16 S rRNA, *Nature*, **283**: 739–749, 1980.
- [96] SCHWELITZ F. D., CISNEROS P. L., JAGIALO J. A., The effect of glucose on the biochemical and ultrastructural characteristics of developing *Euglena* chloroplasts, *J. Protozool.*, **25**: 398–403, 1978.
- [97] SCOTT N. S., CAIN P., POSSINGHAM J. V., Plastid DNA levels in albino and green leaves of the "albostrians" mutant of *Hordeum vulgare*, *Z. Pflanzenphysiol.*, **108**: 187–191, 1982.
- [98] SILVERTHORNE J., ELLIS R. J., Protein synthesis in chloroplasts. VIII. Differential synthesis of chloroplast proteins during spinach leaf development, *Biochim. Biophys. Acta*, **607**: 319–330, 1980.
- [99] STEINMETZ A., MUBUMBILA V., KELLER M., BURKARD G., WEIL J. H., DRIESEL A. J., CROUSE E. J., GORGON K., BOHNERT H. J., HERRMANN R. G., Mapping of the tRNA genes on the circular DNA molecule of *Spinacia oleracea*, [w] *Chloroplast Development*, ed. G. Akoyunoglou Amsterdam: Elsevier 1978.
- [100] STONINGTON O., PETTIJOHN D. E., The folded genome of *Escherichia coli* isolated in a protein-DNA-RNA complex, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **68**: 6–9, 1971.
- [101] TEWARI K. K., WILDMAN S. G., Function of chloroplast DNA. I. Hybridization studies involving nuclear and chloroplast DNA with RNA from cyto-

- plasmic (80 S) and chloroplast (70 S) ribosomes, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., 59: 569-576, 1968.
- [102] THOMAS J. R., TEWARI K. K., Conservation of 70 S ribosomal RNA genes in the chloroplast DNAs of higher plants, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., 71: 147-151, 1974.
- [103] VASCONCELOS A., Synthesis of proteins by isolated *Euglena gracilis* chloroplasts, Plant Physiol., 58: 719-721, 1976.
- [104] WEIL J. H., PARTHIER B., Transfer RNA and aminoacyl-tRNA synthetases in plants, [w] Encyclopedia of Plant Physiol., New Series 14 A (eds. Boulter D., and Parthier B.) str. 65-112, Springer, Berlin—Heidelberg—New York 1982.
- [105] WEINBAUM S. A., GRESSEL J., REISFELD A., EDELMAN M., Characterization of the 32 000 dalton chloroplast membrane proteins. III. Probing its biological function in *Spirodela*, Plant Physiol., 64: 828-832, 1979.
- [106] WELLS R., BIRNSTIEL M., Kinetic complexity of chloroplastal deoxyribonucleic acid and mitochondrial deoxyribonucleic acid from higher plants, Biochem. J., 112: 777, 1969.
- [107] WESTHOFF P., NELSON N., BÜNEMANN H., HERRMANN R. G., Localization of genes for coupling factor subunits on the spinach plastid chromosome, Current Genet., 4: 109-120, 1981.
- [108] WHITFELD P. R., HERRMANN R. G., BOTTOMLEY W., Mapping of the ribosomal genes on spinach chloroplast DNA, Nucleic Acids Res., 5: 1741-1752, 1978.
- [109] YOSHIDA Y., LAULHERE J. P., ROZIER C., MACHE R., Visualization of folded chloroplast DNA from spinach, Biol. Cell, 32: 187-190, 1978.
- [110] ZIELINSKI R. E., PRICE C. A., Synthesis of thylakoid membrane proteins by chloroplasts isolated from spinach, J. Cell Biol., 85: 435-445, 1980.
- [111] ZURAWSKI G., PERROT B., BOTTOMLEY W., WHITFELD P. R., The structure of the gene for the large subunit of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase from spinach chloroplast DNA, Nucleic Acids Res., 9: 3251-3270, 1981.

Otrzymano: 1 września 1983 r.

Przyjęto: 18 września 1983 r.

Adres autora: ul. Stalingradzka 14, 61-713 Poznań.

GENETYCZNE ASPEKTY RÓŻNICOWANIA I ODNAWIANIA SIĘ KOMÓREK MACIERZYSTYCH

GENETIC ASPECTS OF DIFFERENTIATION AND SELF-RENEWAL OF STEM CELLS

Zofia M. RUPNIEWSKA, Danuta ROŻYŃKOWA

Klinika Hematologii Instytutu Chorób Wewnętrznych oraz Samodzielna Pracownia
Genetyki Człowieka Instytutu Patologii AM w Lublinie

Streszczenie. Utrzymanie stałej puli dojrzałych komórek w którejkolwiek z bezustannie odnawiających się tkanek, takich jak np. krew, nie jest możliwe bez wieloważnych komórek macierzystych, które charakteryzuje zarówno zdolność do różnicowania się w linii komórek potomnych, jak i zdolność do odnawiania się. Szczególnie ważnym okresem w procesie regulacji różnicowania komórkowego jest tzw. „ukierunkowanie”, na które składają się zarówno utrata unikalnej zdolności wieloważnej komórki macierzystej do odnawiania się, jak i zawężenie jej zdolności do wielokierunkowego różnicowania. Nasuwa się pytanie, jakie są genetyczne podstawy regulacji ukierunkowania. Till proponuje prosty model genetycznego ukierunkowania, który opiera się na założeniu, że transpozycja materiału genetycznego, prowadząca do utraty zdolności do odnawiania się komórki macierzystej, zapoczątkowuje program różnicowania w ukierunkowaną linię komórkową. Taka transpozycja ma np. miejsce przy rekombinacji genów immunoglobulinowych.

Summary. The maintenance of mature cells in any cell renewal system such as e.g. blood, requires ultimately the presence of pluripotent stem cells whose unique characteristics are their abilities both to make differentiated progeny and to self-renew. A particularly important stage in the regulation of cellular differentiation is “commitment”, involving both the loss of the unique capacity of stem cells for self-renewal and the restriction of their potentiality for further differentiation. The question is raised, what is the genetic basis for regulation of the commitment. The simple model for commitment has been proposed by Till. This model is based on the view that transposition of genetic material results in loss of potential for stem cell renewal, followed by initiation of a particular differentiation program. Such a transposition occurs e.g. during the rearrangement of immunoglobulin genes.

KOMÓRKI MACIERZYSTY I KOMÓRKI UKIERUNKOWANE

Utrzymanie stałej puli dojrzałych, zwykle krótko żyjących komórek, w którejkolwiek z bezustannie odnawiających się tkanek, takich jak: skóra, nabłonek jelit, jądra i krew, nie jest możliwe bez wieloważnych komórek macierzystych (pluripotent stem cells). Komórki macierzyste (KM) charakteryzują dwie kardynalne właściwości, a mianowicie: wieloważność, tj. zdolność do wielorakiego różnicowania się w linie komórek potomnych o określonych czynnościach, oraz zdolność do odnawiania się („self-maintenance”, „self-renewal”, „self-reproduction”), która to właściwość warunkuje ich niezmienną liczbę. Dzięki zdolności do różnicowania się jedna hemopoetyczna KM (mówiąc o pełnym „wachlarzu” komórek potomnych) może dawać dziennie ok. 4000 komórek z „prześciowego dojrzewania” i ok. 1000 granulocytów lub ok. 200 000 erytrocytów z krwi obwodowej [73]. Przy dziennym obrocie wynoszącym u myszy ok. 10% [1] (co oznacza, że ok. 10% KM ulega różnicowaniu w ciągu dnia) cała populacja KM powinna wynosić ok. 0,25% komórek szpiku [73]. Stanowi to wprawdzie bardzo mały odsetek, ale jest on stały dzięki zdolności hemopoetycznej KM do odnawiania się. Mianowicie komórki te mogą się dzielić ok. 200 razy w ciągu życia myszy (podczas życia człowieka prawdopodobnie dzielą się ok. 2000 razy) [86], przy czym przeszczepione ze starego zwierzęcia na młode uzupełniają niespełnione cykle mitotyczne. Obliczono, że czas potrzebny dla realizacji wszystkich cykli mitotycznych KM przekraczałaby 3–4-krotnie czas życia myszy. Można więc założyć, że KM z ich wielkim potencjałem podziałowym są praktycznie nieśmiertelne. Potten i Lajtha [73], a także Metcalf [66] przyjmują liczbę 100 cykli mitotycznych (i wyżej aż do 500), za kryterium zdolności odnawiania się.

W układzie krwiotwórczym koncepcja wieloważnej limfo-hemopoetycznej KM jest dobrze ugruntowana. Pierwsze argumenty potwierdzające istnienie wieloważnej KM pochodzą z badań chimer popromiennych z przeszczepionym szpikiem [30]. Myszom z popromienną niedokrwistością aplastyczną przeszczepiano szpik, którego komórki zawierały marker chromosomowy T6. Następnie marker ten znajdowano nie tylko we wszystkich komórkach będących w stadium mitozy w narządach hemopoetycznych (szpik, śledziona), ale również w tkankach czysto limfoidalnych (węzły chłonne, grasica). Znacznie później wykazano, że u ludzi chorych na przewlekłą białaczkę szpikową charakterystyczny chromosom Ph¹ występuje nie tylko w komórkach linii erytroblastów, granulocytów-monocytów i megakariocytów [14, 99, 105], ale także w limfocytach B i liniach limfoblastoidalnych B komórkowych pochodzących od tych

chorych [3, 28]. Dane te wskazują, że w najwcześniejszym okresie rozwojowym istnieje wspólna wieloważna limfopoetyczna KM.

W historycznym przeglądzie badań nad wieloważną hemopoetyczną KM można wyróżnić dwa etapy: okres pierwszy, badań morfologicznych opartych na technice mikroskopowej i okres drugi — badań czynnościowych. Identyfikacja morfologiczna hemopoetycznej KM jest trudna z uwagi na jej rzadkie występowanie w tkankach hemopoetycznych. Z wyglądu przypomina ona, jak się wydaje, mały limfocyt [101]. W pierwszym morfologicznym okresie badań najbardziej kontrowersyjny problem stanowiło pytanie, czy KM mają, czy nie mają potencjalnych zdolności do wielokierunkowego różnicowania się. Potwierdzającą odpowiedź uzyskano dopiero w okresie badań czynnościowych, gdy w 1961 r. Till i McCulloch [96] udowodnili, że komórki syngenicznego szpiku (względnie komórki śledziony lub płodowej wątroby) przeszczepione letalnie napromienionej myszy, po upływie 7–14 dni tworzą w śledzionie biorcy makroskopowe guzki złożone z komórek hemopoetycznych (najczęściej z komórki linii erytrocytów, granulocytów lub mieszane, a rzadziej z megakariocytów lub z komórek niezróżnicowanych). Guzki te nazwano „koloniami śledzionowymi”, komórkę zaś — która je zapoczątkowywała — mielopoetyczną KM (colony forming unit-spleen; w skrócie CFU-S). Nasuwało się jednak pytanie czy każda kolonia śledzionowa pochodzi od KM. Niedawne badania Magli i wsp. [58] wykazały, że początkowe kolonie pojawiające się między 7–9 dniem mają w większości charakter kolonii erytropoetycznych oraz są pozbawione zdolności do odnawiania się i giną po 72 godz. Prawdopodobnie pochodzą one z bardziej zróżnicowanych komórek ukierunkowanych (burst-forming unit; w skrócie BFU).

Natomiast kolonie występujące później między 11–14 dniem są stałe i pochodzą z młodszej rozwojowo KM (CFU-S) zdolnej do różnicowania się w więcej niż jedną linię hemopoetyczną, jak również zdolnej do retransplantacji do ponownego zapoczątkowywania podobnych wieloważnych kolonii śledzionowych. Tak więc nie każda kolonia śledzionowa pochodzi z CFU-S. Z drugiej strony chociaż CFU-S jest niewątpliwie wieloważną KM, to jeszcze nie jest wykluczone, że istnieją inne rodzaje KM nie dające kolonii śledzionowych. Możliwość tę potwierdziły obserwacje Harrisona [42] oraz Loutita i wsp. [57]. Autorzy ci wykazali, że szpik myszy W/W^v (myszy z niedokrwistością wywołaną mutacją w obu lokusach W) i prawie pozbawiony CFU-S [61] jest jednak zdolny do skorygowania aplazji u letalnie napromienionych biorców. A zatem mutanty te muszą mieć inną niż CFU-S wieloważną hemopoetyczną KM. Przemawia za tym jeszcze występowanie w ich krwi obwodowej licznych

krwinek białych i płytek, jak również obecność erytrocytów, chociaż w obniżonej ilości. Istnieją więc KM, które nie tworzą kolonii śledzionowych. Innymi słowy u myszy CFU-S jest KM, ale nie wszystkie KM są CFU-S. Burton i wsp. [12] podają, że początkowa wieloważna KM (stem cell for stem cells) jest oddalona aż o 17–19 pokoleń od pierwotnych komórek klonogennych (colony-forming cells, w skrócie CFC). Wyliczenia te opierają się na obserwacji klonów krwinek czerwonych występujących podczas życia zdrowej myszy.

Odtworzenie drzewa genealogicznego począwszy od wieloważnej KM do licznych dojrzałych komórek w krwi obwodowej, zostało znacznie ułatwione dzięki badaniom „in vitro”. Bradley i Metcalf [7] i Ichikawa i wsp. [48] niezależnie od siebie opracowali metodę hodowli granulocytów i makrofagów z prekursorowych komórek szpiku. Okazało się, że granulocyty i makrofagi pochodzą od wspólnej komórki prekursorowej (colony forming unit-granulocytes, macrophages; w skrócie CFU-G, M). Zespół kierowany przez Axelrada [41, 64] przedstawił metodę hodowli, w której obserwowano rozwój kolonii erytrocytów, megakariocytów i mieszanych. Kolonie te pochodziły od rozwojowo wczesnej komórki ukierunkowanej, wspólnej dla linii erytrocytów i megakariocytów (BFU). Ustalono również późniejsze rozwojowo komórki ukierunkowane wyłącznie w linię erytrocytów (colony forming unit-erythrocytes; w skrócie CFU-E) i ich zależność od erytropoetyny. Uzyskano dane o niezależnych komórkach klonotwórczych dla eozynofili i limfocytów [41]. Jak dotąd nie ustalono prekursorów bazofili. Klon komórek pochodzących z hodowli śledziony myszy, morfologicznie przypominających bazofile i komórki tuczne wykazywał czynność naturalnych komórek cytotoksycznych (natural killer cells; w skrócie NK cells) [34], które są zaliczane do limfocytów. Opracowano także takie warunki hodowli, w których powstające kolonie zawierały komórki hemopoetyczne z linii erytrocytów, neutrofilii, monocytów-makrofagów i megakariocytów. Komórkę prekursorową, dającą początek tym wszystkim liniom, nazwano komórką tworzącą kolonie granulocytów, erytrocytów, makrofagów, megakariocytów (colony forming unit-granulocyte, erythrocyte, macrophage, megakaryocyte; w skrócie CFU-G,E,M,M) [27]. Nakahata i Ogawa [71] w kolonii wyprowadzonej z komórek szpiku lub śledziony myszy, a złożonej z nieodróżnicowanych komórek blastycznych zidentyfikowali KM, która jak się wydaje w hierarchii KM jest wcześniejsza od komórki zapoczątkowującej CFU-G,E,M,M. Autorzy nazwali taką kolonię — kolonią KM (stem cell colony). Komórki tworzące te kolonie cechuje szeroka zdolność do odnawiania się oraz zdolność zapoczątkowywania wtórnych wieloważnych kolonii hemopoetycznych (CFU-G,E,M,M). Autorzy sugerują, że tworzenie kolonii KM jest procesem „narodzin” (birth),

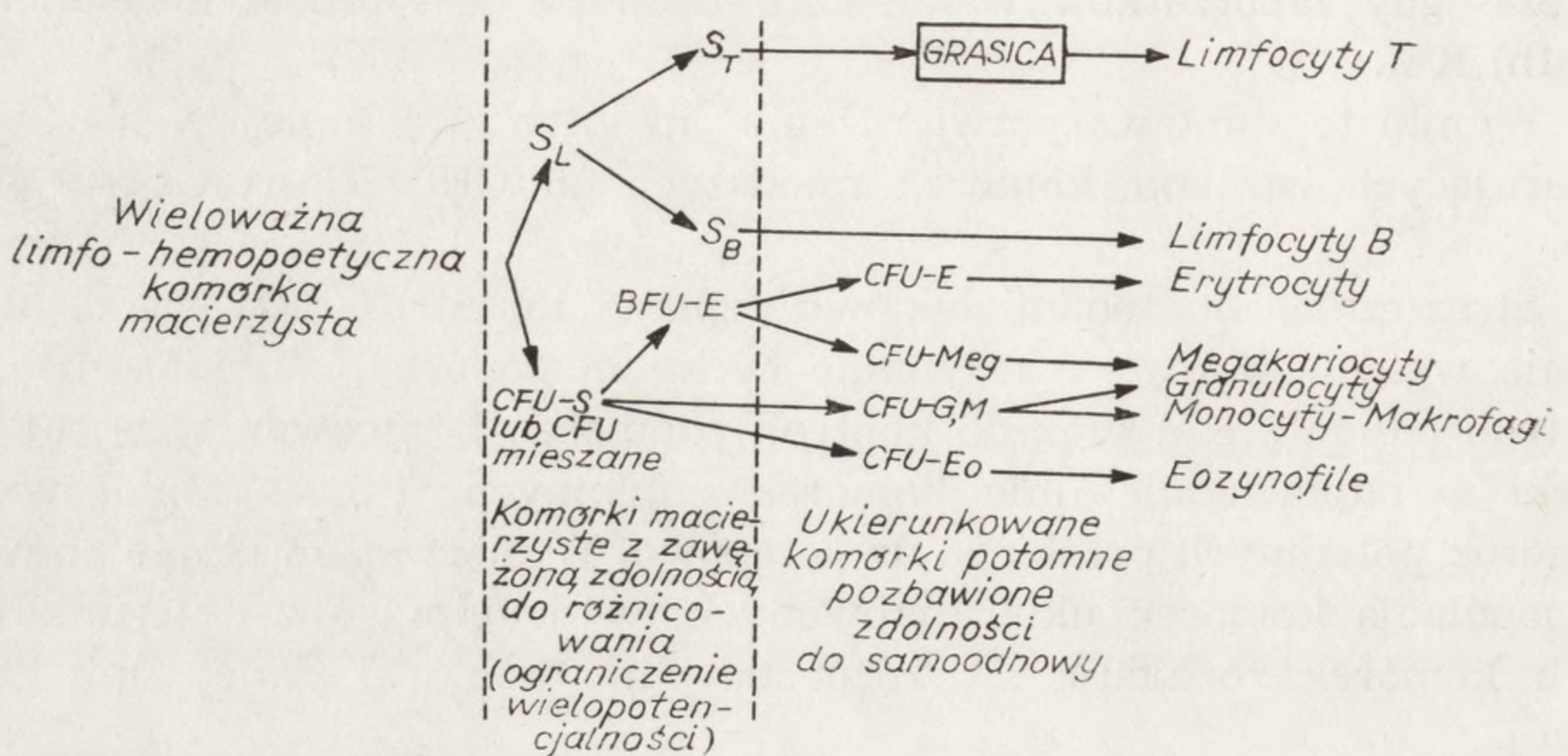
podczas gdy zapoczątkowywanie CFU-G,E,M,M jest procesem „śmierci” (death) KM.

Wyniki te stanowią potwierdzenie „in vitro” wcześniejszych danych sugerujących istnienie komórek młodszych od CFU-S (pre-CFU-S cell) [45].

Streszczając: metodami hodowli szpiku „in vitro” dąży się do uzyskania wglądu w dwie kardynalne cechy hemopoezy, a mianowicie do kontroli odnowy KM oraz do kontroli zdolności różnicowania się tej komórki w odpowiednie linie komórek potomnych. Proces różnicowania komórek potomnych przebiega dwuetapowo. W pierwszym etapie powstaje populacja komórek ukierunkowanych, w drugim — z ukierunkowanych komórek różnicują się rozpoznawalne komórki danej linii szpikowej.

Długotrwała hodowla szpiku prowadzona metodą Dextera i wsp. [22] pozwala na rozwój adherentnych komórek zrębu szpikowego, które dostarczają właściwych warunków środowiskowych komórkom hemopoetycznym. Do komórek zrębowych zalicza się komórki nabłonkowate, tłuszczowe i makrofagi. W tych warunkach możliwe jest utrzymywanie w ciągu kilku miesięcy hemopoezy „in vitro” z odnawiającymi się CFU-S i ciągłym powstawaniem prekursorów poszczególnych linii np. CFU-G,M. Niedawno doniesiono [53], że hodowla metodą Dextera szpiku pacjentów z przeszczepem pochodzącym od rodzeństwa zgodnego w układzie HLA, przeciwnej płci (chromosom Y był chromosomem markerowym), wykazuje cechy szpiku dawcy i to nie tylko w odniesieniu do komórek hemopoetycznych, ale także w stosunku do komórek zrębowych. Wiadomo, że makrofagi wywodzą się z CFU-G,E,M,M, a więc ich pochodzenie z komórek dawcy nie jest zaskoczeniem. Pochodzenie komórek nabłonkowatych od dawcy szpiku można wyjaśnić danymi [52] uzyskanymi z badań okresu embrionalnego, kiedy to erytrogenеза jest ściśle związana z śródbłonkiem. Natomiast pochodzenie komórek tłuszczowych od dawcy szpiku jak dotychczas nie znalazło wyjaśnienia.

Na ryc. 1 przedstawiono uproszczony model różnicowania wieloważnej limfo-hemopoetycznej KM w różne typy ukierunkowanych komórek. Jak wynika z tej ryciny, zasadnicza różnica między poszczególnymi przedziałami KM dotyczy ich zdolności do odnawiania się i różnicowania. Utrata zdolności do odnawiania się powoduje nieodwracalne ukierunkowanie komórki pnia w którąś z linii hemopoetycznych lub limfoidalnych i zawężenie zdolności do różnicowania (ograniczenie wielopotencjalności). Cały ten układ zdaje się podlegać precyzyjnym mechanizmom regulacyjnym, jednakże dotychczas mało wiemy na temat specyficznych czynników, które zawiadują procesami odnawiania się i różnicowania. Jedną z głównych kontrowersji w hemopoezie dotyczy



Ryc. 1. Proponowany przez Kellera i Philipsa [54] diagram różnicowania się wieloważnej limfo-hemopoetycznej KM

S_L (Lymphoid committed stem cell) — KM ukierunkowana w linię limfoidalną, S_T (Stem cell restricted to T cell differentiation) — KM z zawężoną zdolnością do różnicowania się w linię komórek T, S_B (Stem cell restricted to B cell differentiation) — KM z zawężoną zdolnością do różnicowania się w linię komórek B, CFU-S (Colony forming unit-spleen) — wielopoetyczna KM, BFU (Burst forming unit) — wczesna rozwojowo komórka ukierunkowana w linię erytrocytów i megakariocytów, CFU-E (Colony forming unit-erythrocytes) — późniejsza rozwojowo komórka ukierunkowana w linię erytrocytów, CFU-Meg (Colony forming unit-megakaryocytes) — komórka ukierunkowana w linię megakariocytów, CFU-G,M (Colony forming unit-granulocytes, macrophages) — komórka ukierunkowana w linię granulocytów i monocytów-makrofażów, CFU-Eo (Colony forming unit-eosinophils) — komórka ukierunkowana w linię eozynofili

pytania, czy różnicowanie jest regulowane przez sygnały zewnętrzne lub hemopoetyczne mikrośrodowisko [16], czy raczej jest zaprogramowane w komórce, a określają je pojedyncze procesy stochastyczne (procesy, w których kolejno zachodzące przesunięcia są w swym kierunku przypadkowe) [98]. Zdaniem Tilla [95] zasadnicza różnica między KM a bardziej ukierunkowanymi komórkami potomnymi leży na poziomie informacji genetycznej. A zatem należałoby szukać odpowiedzi na pytanie, czy utrata zdolności KM do samoodnowy wiąże się z jakimikolwiek zmianami w jej genomie. Będzie to prowadziło, jak sądzi Till [95], do rozwoju trzeciej fazy badań nad koncepcją KM, którą autor nazywa fazą genetyczną.

HIPOTEZA NIEZMIENNOŚCI (THE CONSTANCY HYPOTHESIS)

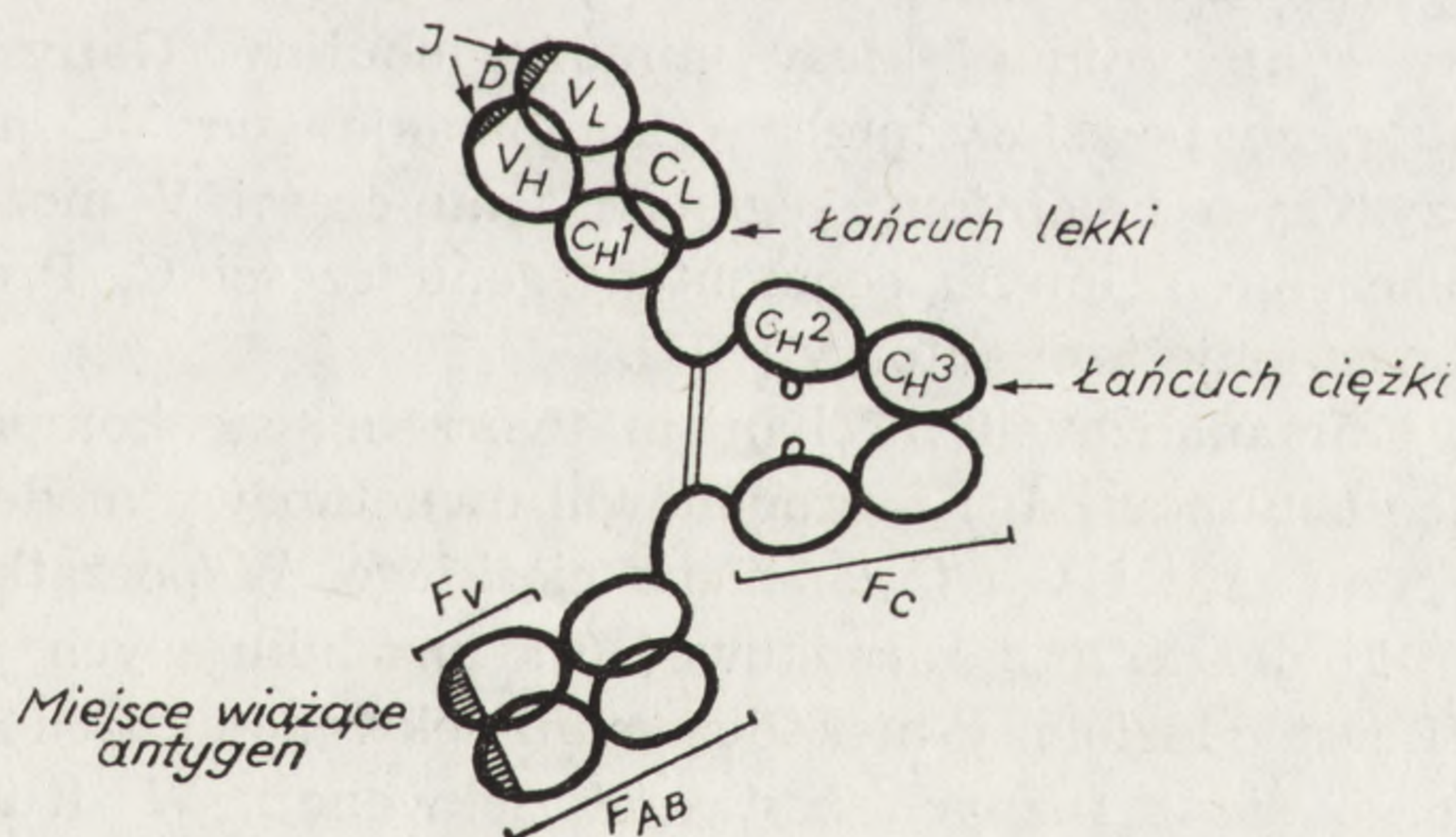
W 1968 r. Davidson [19], wychodząc z założenia identyczności materiału genetycznego w różnych komórkach somatycznych, zaproponował „hipotezę niezmienności”. W świetle tej hipotezy, w przeciwieństwie do późniejszej propozycji Tilla [95], różnice między KM a komórką ukie-

runkowaną dotyczyłyby w zasadzie zmian w ekspresji określonych genów, które w istocie byłyby genami w swym składzie niezmiennymi.

Interesujący zatem będzie przegląd danych doświadczalnych przemawiających za i przeciw hipotezie niezmienności. Najbardziej znane obserwacje przemawiające za tą hipotezą pochodzą z doświadczeń nad przeszczepianiem jądra komórkowego [49, 55], które interpretowano jako wskazówkę, że utrata wielopotencjalności komórki, przynajmniej dla jąder niektórych komórek somatycznych, nie odbywa się na poziomie genomu. Wyniki tych doświadczeń były jednak krytykowane nie tylko z uwagi na możliwe błędy techniczne [63], ale również ze względu na niezadowalające wnioski, które nie tłumaczą, dlaczego komórki somatyczne odmiennych tkanek różnią się pomiędzy sobą, jeśli nie zachodzą w nich zmiany genetyczne [13].

ARGUMENTY PRZEMAWIAJĄCE PRZECIWIW HIPOTEZIE NIEZMIENNOŚCI

Przeciw hipotezie niezmienności, a raczej za labilnością materiału genetycznego, przemawiają dane pochodzące z obserwacji ruchomych elementów genetycznych w komórkach bakterii [91] i drożdży [44]. Najbardziej jednak przekonujące argumenty uzyskano z badań nad mechanizmami genetycznymi, które uczestniczą w kodowaniu immunoglobuliny.



Ryc. 2. Schemat budowy podstawowej monomerycznej cząsteczki immunoglobulin (według [76]). Pod wpływem działania enzymów proteolitycznych cząsteczka immunoglobuliny rozpada się na trzy fragmenty (Fv, Fab i Fc). Zarówno łańcuchy lekkie L (od "light"), jak i ciężkie H (od "heavy") mają część zmienną V (od "variable") i część stałą C (od "constant"). Podwójną linią zaznaczono wiązania dwusiarczkowe w zawiasie. Zaznaczono także wiązania węglowodorowe między łańcuchami ciężkimi. Każda z podjednostek o owalnym kształcie (domena) jest kodowana przynajmniej przez jeden odrębny segment genu. Miejsce wiążące antygen jest kodowane przez segmenty genów D i J

bulin. Schemat budowy immunoglobulin przedstawia ryc. 2. Dotychczas nie jest jeszcze znana precyzyjna liczba specyficznych przeciwciał, które są niezbędne dla życia osobniczego, ale u ssaków przypuszczalnie mieści się ona w granicach 10^6 – 10^7 [37]. Fakt ten wiązał się z pytaniem, czy w genomie znajduje się dostateczna ilość genów strukturalnych dla kodowania tak wielkiej ilości przeciwciał. Zaproponowana w 1965 r. teoria Dreyera i Bennetta [23] kwestionuje starą zasadę „jeden gen, jeden łańcuch polipeptydowy”, a zakłada, że cząsteczka immunoglobuliny jest kodowana przez większą od jednego liczbę genów. Autorzy ci proponują, że jeden segment genu koduje część stałą C (od „constant”) łańcucha lekkiego immunoglobuliny, podczas gdy inne segmenty genu kodują część zmienną V (od „variable”). Każdy z wielkiej liczby segmentów genów części V może połączyć się z segmentem części C tworząc kompletny gen strukturalny całego łańcucha.

Gally i Edelman [36] dokonali przeglądu danych przemawiających za teorią somatycznej rekombinacji drobnych segmentów genowych, aż do utworzenia ostatecznego funkcjonalnego genu „mozaikowego”. Zakładając istnienie ok. 10 różnych segmentów genu części V, autorzy obliczyli, że wyłącznie za pomocą tego mechanizmu może powstać przynajmniej 10^6 łańcuchów lekkich. Jeśli podobny proces ma miejsce przy formowaniu genów łańcuchów ciężkich, istnieje możliwość powstania bogatego repertuaru idiotypów. Inną atrakcyjną cechą tej teorii jest wyjaśnienie mechanizmu „przełączania” (switching) łańcucha ciężkiego w przypadku syntezy innej klasy immunoglobuliny. Gally i Edelman [36] proponują, że powstały przez rekombinację gen VC może zostać rozcięty, przy czym uwolniony segment genu części V może wchodzić w nowe połączenie z innym segmentem genu części C. Propozycję tę potwierdzili następnie inni autorzy [104].

Rabbits [75] analizował mechanizm tworzenia się kompletnych genów immunoglobulinowych i zaproponował dwuetapowy model integracji segmentów genu części V i C łańcucha ciężkiego. W początkowym etapie, w DNA komórek linii zarodkowej (nie produkujących przeciwciał) gen części V jest oddzielony niekodującymi sekwencjami od genu części C, składającego się z różnych zestawów sekwencji. W drugim etapie, gdy komórka produkuje przeciwciała, dochodzi do rekombinacyjnego podstawienia zestawów sekwencji części V i zachodzi transkrypcja z utworzeniem prekursora mRNA (pre-mRNA). W procesie dojrzewania pre-mRNA do mRNA jeden z zestawów sekwencji genu części V zostaje przemieszczony w bezpośrednie sąsiedztwo sekwencji kodującej jedną z domen części C, przy czym eliminowane jest RNA skopiowane z wtrąconych sekwencji DNA. Segment genu części V może ulec dalszej retranspozycji w kierunku 3' i sąsiadować z innym segmentem genu części C, z czym wiąże się przełączanie klasy łańcucha ciężkiego.

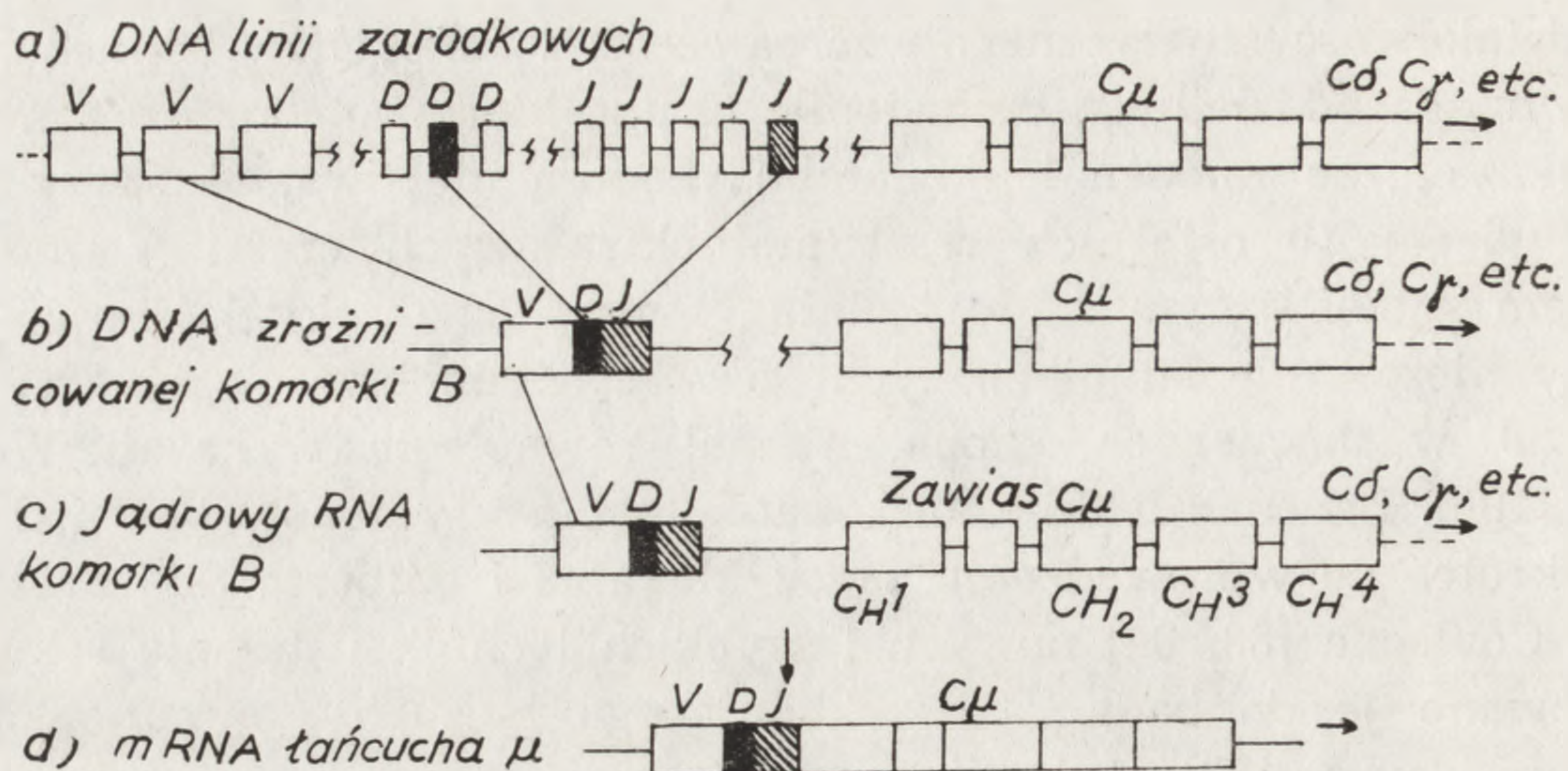
Odcinkowość genetycznego wzorca części V łańcuchów lekkich i ciężkich wymaga oddzielnego omówienia. Grupa kierowana przez Tonegawę [6] wykazała, że łańcuch lekki lambda kodują nie dwa, lecz trzy geny. Mniej więcej 10 ostatnich reszt aminokwasowych części V nazwano miejscem sprzęgającym J (do „joining”), przy czym skład jego jest kodowany niezależnie od pierwszych 95 reszt aminokwasowych. Istnienie miejsc J w łańcuchach kappa, niemal równolegle wykazali Weigert i wsp. [106]. Łańcuch lekki kodują zatem segmenty genów V, J i C.

Wkrótce po wprowadzeniu przez Maxama i Gilberta [60] oraz Sanger i Coulsona [83, 84] nowych i szybkich technik ustalania sekwencji zastosowano je do badań DNA kodującego łańcuchy immunoglobulin. Seidman i wsp. [88] wykryli szereg genów części V łańcucha kappa w ciągłej sekwencji DNA linii zarodkowej, przy czym każdy gen koduje 1–97 reszt aminokwasowych łańcucha lekkiego. W dalszych badaniach okazało się, że istnieje, przynajmniej w układzie łańcucha kappa, szereg genów miejsca J, jak również liczne geny części V. Tak więc Seidman i wsp. [89] implikują, że różnorodność przeciwciał jest następstwem somatycznej rekombinacji między jednym z wielu setek genów części V z kilkoma genami miejsca J.

Sakano i wsp. [79] ustalili, że w linii zarodkowej myszy istnieje 5 segmentów genu miejsca J kappa, przy czym jeden z tych segmentów jest nieczynny. Połączenie V-J stanowi trzeci rejon nadzmienny (third hypervariable region) i reszty aminokwasowe tego połączenia, których u myszy w łańcuchu lekkim kappa jest 96, charakteryzuje znacznie większa zmienność niż jakiegokolwiek inne reszty aminokwasowe [107].

Jeśli idzie o łańcuch ciężki, to trzy odrębne geny kodują domenę C_{H1} , zawias, oraz domeny C_{H2} i C_{H3} [31, 81, 100]. Części V łańcucha ciężkiego są kodowane niezależnie od części C. Hood i wsp. [25, 85], porównując sekwencje aminokwasowe immunoglobulin o identycznej specyficzności wobec antygenów (zgodność idiotypów), wykazali, że obok segmentów genu V i J łańcucha ciężkiego występuje jeszcze trzeci komponent, tzw. segment D (od „diversity”). Badania DNA linii zarodkowej i sekwencji mRNA łańcucha ciężkiego potwierdziły przypuszczenie, że segment D koduje trzeci rejon nadzmienny od 102 do 106 reszty aminokwasowej łańcucha ciężkiego. A zatem bardzo wiele odmiennych części V łańcucha ciężkiego może być kodowanych przez włączenie jednego z szeregu segmentów genu D.

Kompletowanie genu łańcucha ciężkiego polega więc na rekombinacji genu części V (kodującego reszty aminokwasowe od 1 do 101) z jednym z szeregu segmentów genu D (kodującego reszty aminokwasowe od 102 do 106) i dalej za pomocą podobnego mechanizmu z segmentem genu J (kodującego reszty aminokwasowe od 107 do 115). Formowanie genu zostaje zakończone dzięki rekombinacji drugiego typu,



Ryc. 3. Kolejne etapy w serii rekombinacji, jakie mają miejsce przy formowaniu mRNA łańcucha ciężkiego mi z DNA linii zarodkowej (według [76])

jaka ma miejsce między genem VDJ a genem części C (ryc. 3). Dokładny punkt połączenia, zwany „miejszem przełączania” (switch site), jest zlokalizowany w każdym genie C_H w 5' [47]. Właściwości niekodujących sekwencji DNA w pobliżu miejsc łączących wskazują, że te dwa mechanizmy rekombinacji mają odmienny charakter [20, 30].

Streszczając należy powiedzieć, że tworzenie genu pełnego łańcucha immunoglobulinowego zachodzi przynajmniej w dwu etapach w następstwie działania odmiennych mechanizmów. Podczas różnicowania się komórki B zostaje ukierunkowana specyficzność syntezy immunoglobuliny poprzez odpowiednie rekombinacje między segmentami genów V, D i J. Jeśli komórka pod wpływem stymulacji antygenowej tworzy klon, całe jej potomstwo wykazuje taką samą specyficzność wobec antygeny. W dojrzałej komórce B kompletny gen części V może kolejno „przełączać” geny części C kodujące wytwarzanie różnych klas immunoglobulin. Np. po zsyntetyzowaniu IgM, która jest pierwszym przeciwciałem wytwarzanym w odpowiedzi na antygen, może zachodzić „przełączanie” na syntezę innych klas immunoglobulin, jak np. IgG. Jednakże przyczyny i mechanizmy tego zjawiska nie są jeszcze znane. Hurwitz i Cebra [47] wykazali, że podczas dojrzewania mysich śledzionowych komórek B zawierających IgM do sekrecyjnych plazmoblastów w hodowli stymulowanej bakteryjnym lipopolisacharydem występuje „przełączanie” izotypu, czemu towarzyszą rekombinacje między sekwencjami J_H i C_{mi} . Powstałe w hodowli plazmoblasty ujawniają „przełączanie” izotypu z IgM do IgG, co wiąże się z ewolucją do komórek sekrecyjnych. Autorzy sugerują, że takie rekombinacje genetyczne mogą odgrywać rolę w różnicowaniu prawidłowych komórek B.

Pewne sekwencje genów immunoglobulinowych powstają wskutek

punktowych mutacji somatycznych w rejonie nadzmiennym. Niemniej jednak w genach linii zarodkowej kręgowców jest zakodowany niezwykły mechanizm, niezależny od antygeny, a umożliwiający rekombinacje drobnych segmentów genowych i powstanie wielkiej różnorodności specyficznych przeciwciał.

Z badań onkogennych retrowirusów pochodzą dodatkowe dowody wskazujące, że informacja genetyczna komórek, z komórkami somatycznymi ssaków włącznie, jest bardziej labilna niż to początkowo zakładano. Badania te pozwoliły na wyróżnienie:

- grupy stosunkowo często spotykanych retrowirusów „przewlekłych” białaczek zwierzęcych, pozbawionych genu „onc” (tzw. „onkogenu” lub „genu transformującego”),
- grupy raczej rzadkich wirusów „ostrych” białaczek, chłoniaków i mięsaków, które posiadają gen „onc” [35].

Retrowirusy „przewlekłych” białaczek, dopiero po długim okresie utajenia, wywołują szerokie spektrum złośliwych proliferacji. W genomie komórek gospodarza znajduje się bardzo wiele miejsc, w których prowirus DNA może zostać zintegrowany. Aby jednak został wzbudzony proces transformacji, sekwencja kontrolująca transkrypcję (miejsce wiążące polimerazę RNA) w genomie prowirusa, musi się koniecznie znaleźć w sąsiedztwie szczególnych komórkowych genów. Są to tzw. komórkowe geny „onc”, w skrócie „c-onc” (cellular „onc”), przy czym same te geny nie wywołują transformacji. Zachowanie genów „onc” w procesie ewolucji [77] sugeruje, że odgrywają one ważną rolę w podstawowych czynnościach i/lub różnicowaniu komórkowym. Przypuszcza się, że gdy sekwencje kontrolujące transkrypcję w DNA prowirusa znajdują się w pobliżu komórkowego genu „onc”, dochodzi do ciągłego powielania tego genu (zmiana ilościowa), co z kolei powoduje gromadzenie się w komórce nadmiernej ilości produktów genu „onc” i transformację nowotworową [35]. Za przykład może służyć wirus ptasiej białaczki, który zintegrowany w pobliżu komórkowego genu „myc” wywołuje chłoniaki B komórkowe, w pobliżu zaś komórkowego genu „erb” powoduje (rzadziej) rozwój erythroblastozy [35]. Choć więc wirusy „przewlekłych” białaczek zwierzęcych nie posiadają genów „onc” jako stałej części swego genomu, to jednak mogą transformować komórki przez aktywację komórkowych genów „onc”. W pierwszym okresie po zakażeniu wirusy są integrowane w wielu miejscach genomu komórki gospodarza, a zatem właściwe ustawienie wirusowej sekwencji kontrolującej transkrypcję przy komórkowym genie „onc” może być sprawą przypadku. Jednakże gdy dojdzie już do właściwego układu, następuje aktywacja komórkowego genu, który koduje syntezę nadmiernych ilości produktów białkowych, z czym wiąże się proliferacja komórek, prowa-

dząca w końcu do rozwoju nowotworu [35]. Taki model onkogenezy tłumaczy konieczność długiego okresu latencji i szerokie spektrum proliferacji związanych z wirusami „przewlekłych” białaczek oraz monoklonalność nowotworów wywołanych przez te wirusy.

Retrowirusy, posiadające w swoim genomie gen „onc”, są nazywane także wirusami transformującymi. Retrowirusy te w przeciwieństwie do wirusów „przewlekłych” białaczek, które wywołują złośliwą proliferację dopiero po długim okresie utajenia, powodują szybki rozwój „ostrych” białaczek, chłoniaków i mięsaków, zaś „in vitro” transformują komórki [93]. Gen „onc” tych wirusów koduje część lub wszystkie białka niezbędne dla zainicjowania i utrzymania zmienionego nowotworowo fenotypu komórki [5, 24, 102]. Jednakże nabycie genu „onc” w większości przypadków wiąże się z utratą części genu lub genów replikacyjnych, co jest przyczyną ułomności tych wirusów (defective viruses). W konsekwencji dla zakończenia cyklu replikacyjnego ułomne wirusy wymagają pomocy nieułomnego wirusa (helper virus). Obecnie wiadomo, że wirusowe geny „onc” w skrócie „v-onc” (viral-„onc”) pochodzą z prawidłowych komórkowych genów „onc” [2, 26, 38, 78, 109] i jak się wydaje, zostają nabyte przez retrowirusy w następstwie rekombinacji. Udowodniono bowiem istnienie rekombinacji między genami wirusów o ułomnej replikacji a prawidłowymi genami komórkowymi [32, 87]. Klasycznym przykładem „v-onc” jest gen „src” wirusa mięsaka drobiu Rousa, który determinuje działania wirusa transformujące komórki gospodarza i jest genem komórkowym. Produktem genu „src” wirusa Rousa jest fosfoproteina tzw. pp 60 „v-src” [10, 74], analogiczna do prawidłowego białka komórkowego tzw. pp 60 „c-src” [15]. A zatem po zintegrowaniu w genomie wirusa ruchomych genów komórkowych ujawnia się ich działania transformujące. Jest bardzo prawdopodobne, że trzy prawidłowe geny komórkowe, biorące udział w różnicowaniu komórek hemopoetycznych, są odpowiedzialne za skłonność pewnych szczepów myszy, nosicieli wirusów o ułomnej replikacji, do nowotworowej transformacji odpowiednio: układu erytroblastów, mieloblastów i makrofagów [103].

Della Favera i wsp. [18] zlokalizowali w 22 chromosomie człowieka homolog zwierzęcego genu „onc” — gen „c-sis”, jednoznaczny z transformującym genem „v-sis” wirusa małpy (simian sarcoma virus). Gen ten leży w rejonie prążka q11 chromosomu 22 (od q11 do końca długiego ramienia). Wiadomo zaś, że w przewlekłej białaczce szpikowej materiał genetyczny z dystalnej części długich ramion chromosomu 22 (od q11 do końca) w ponad 90% przypadków zostaje przemieszczony na chromosom 9 — t(9q+; 22q-) [29]. Z drugiej strony, Heisterkamp i wsp. [43] zlokalizowali w chromosomie 9 inny gen „onc” — gen „c-abl” ho-

mologiczny z transformującym genem „v-abl” wirusa białaczki myszy Abelsona. De Klein i wsp. [21] wykazali, że w przewlekłej białaczce szpikowej gen „c-abl” ulega przemieszczeniu w przeciwnym kierunku od powszechnie znanego kierunku t(9q+; 22q-), a mianowicie z chromosomu 9 na 22. Tak więc w przewlekłej białaczce szpikowej udowodniono obustronną wymianę genów „onc” między dwoma chromosomami (genu „c-sis” z chromosomu 22 i genu „c-abl” z chromosomu 9), co sugeruje etiologiczny udział tych genów w proliferacji białaczkowej. W chłoniaku Burkitta gen „c-myc” homologiczny z transformującym genem „v-myc” wirusa mielocytomatozy ptaków ulega translokacji z chromosomu 8 na 14 [59], co prawdopodobnie wiąże się z onkogenezą komórek B. Interesujące jest, że Westin i wsp. [108] wykazali powszechną obecność produktów genów homologicznych z „c-abl” i „c-myc” (a także z genem „c-Ha-ras”, który odpowiada transformującego genu „v-Ha-ras” wirusa mięsaka myszy Harvey’a) w różnych komórkach hemopoetycznych i limfoidalnych człowieka, co sugeruje, że odgrywają one jakąś rolę w podstawowych czynnościach komórkowych. Ponadto zlokalizowano gen „c-fes” homologiczny z transformującym genem „v-fes” wirusa mięsaka kotów Snyder-Theilera na chromosomie 15 [43]. Udowodniono zaś, że w ostrej białaczce promielocytowej chromosom 15 jest odbiorcą materiału genetycznego z chromosomu 17 — t(15q+; 17q-) [39, 40].

Z przedstawionych danych wynika, że gen w genomie nie jest formacją jednolitą, może występować w wymienialnych odcinkach i że hipoteza niezmienności w procesie różnicowania komórek jest co najmniej kontrowersyjna. Till [95] sądzi nawet, że należałoby oczekiwać uchwytnych różnic w sekwencjach DNA między KM a ich bardziej zróżnicowanym potomstwem. Co więcej, sugeruje on, że w wybranym układzie doświadczalnym po przeniesieniu określonego genu w odpowiednie miejsce, może udałoby się wywołać konwersję zwrotną bardziej zróżnicowanej komórki w KM.

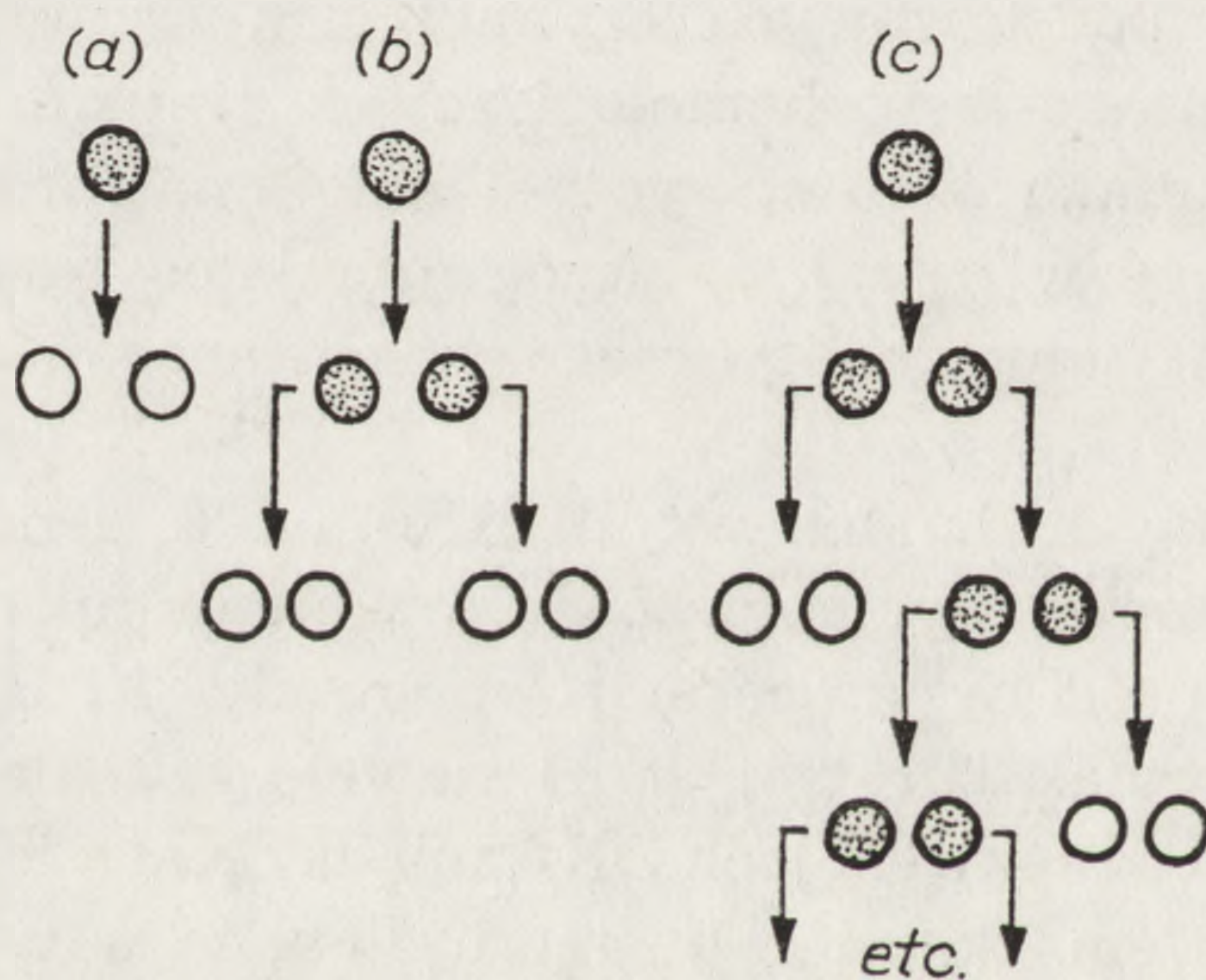
W pewnym stopniu analogiczny proces ma miejsce podczas transformacji nowotworowej, gdy sekwencja kontrolująca transkrypcję w genomie prowirusa wzbudzi stałe powielanie komórkowego genu „onc” (samoodnowa bez zdolności do różnicowania).

MODELE UKIERUNKOWANIA

Okresem szczególnie ważnym w procesie regulacji różnicowania komórkowego jest tzw. ukierunkowanie, które polega zarówno na utracie unikalnej zdolności wieloważnej KM do odnawiania się, jak i na zawężeniu jej zdolności do wielokierunkowego różnicowania się. Na

ryc. 1 okres ten w życiu KM jest przedstawiony jako przejście od wieloważnej np. hemopoetycznej KM (CFU-S) do ukierunkowanych komórek potomnych (np. CFU-E, CFU-Meg, CFU-G,M, CFU-Eo).

Obecnie propagowane są dwa zasadnicze modele dla wyjaśnienia procesów regulujących ukierunkowanie. Są to modele: stochastyczny i deterministyczny. Model stochastyczny przyjmuje, że w ukierunkowaniu różnicowania komórkowego odgrywa rolę szczególny rodzaj przypadkowości lub pseudoprzypadkowości [95]. Najbardziej znanym przykładem tego modelu ukierunkowania jest teoria selekcji klonalnej Burneta [11], która zakłada możliwość powstania ukierunkowanych klonów limfocytów gotowych do swoistej odpowiedzi immunologicznej na określony antygen jeszcze przed jego wtargnięciem do ustroju. Zdaniem Tilla [95] takie ukierunkowanie polegałoby na zmianie w sekwencji DNA, bądź wskutek rekombinacji materiału genetycznego (patrz ryc. 3), bądź wskutek klasycznej mutacji genu. Bodźce pochodzące ze środo-



Ryc. 4. Model stochastyczny wyjaśniający na poziomie komórkowym regulację odnawiania się i ukierunkowania KM (według [95])

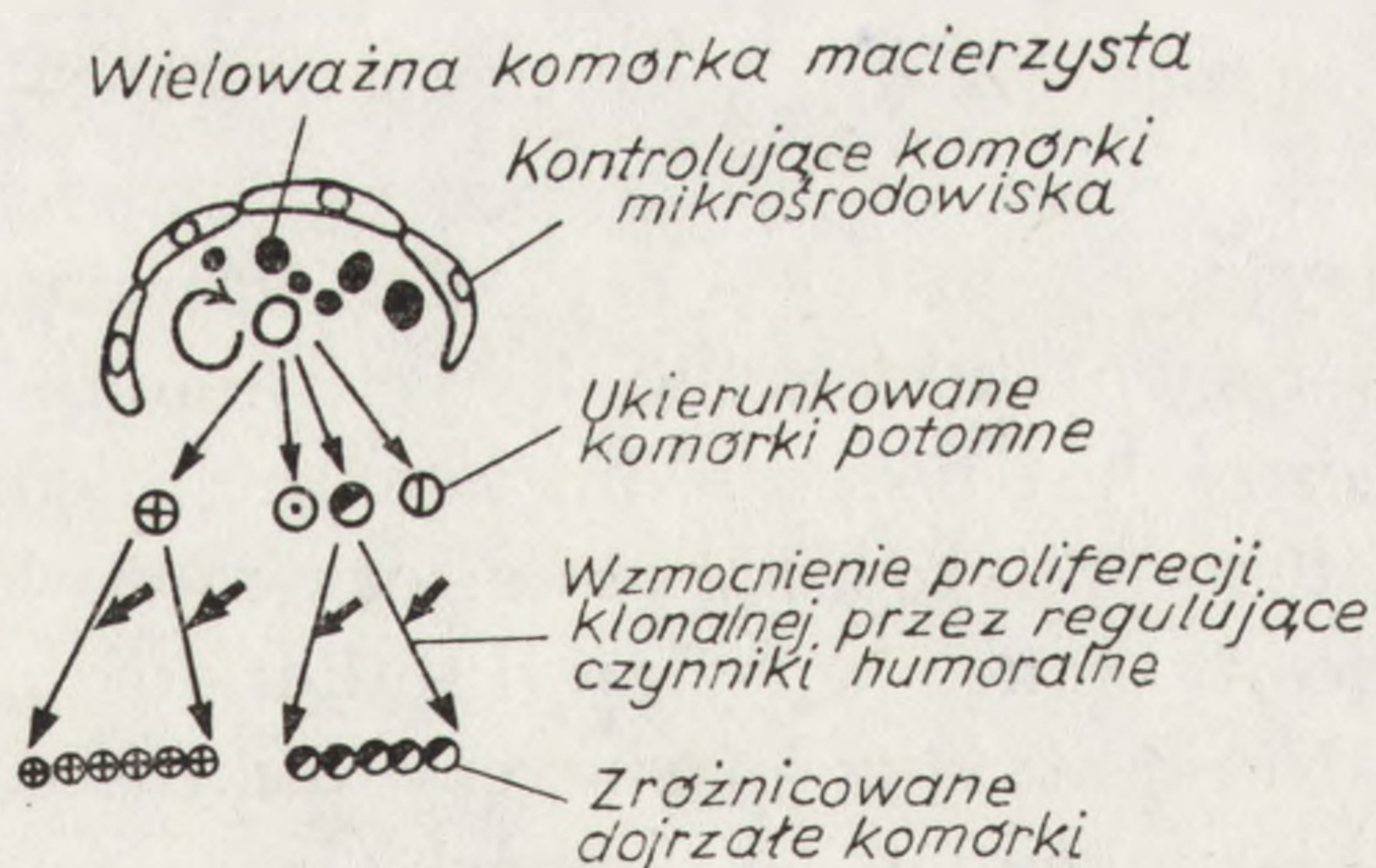
Ciemne komórki — KM zdolne do odnawiania się, jasne komórki — komórki potomne ukierunkowane w którąś z linii różnicowania. Model ten zakłada, że przypadkowo występujące zdarzenie powoduje zarówno utratę zdolności do odnawiania się KM, jak i jej ukierunkowanie. W (a) i (b) KM znikają odpowiednio już w pierwszej i drugiej generacji, ponieważ ma miejsce ukierunkowanie. W (c) KM zachowują zdolności do odnawiania się

wiska zewnętrznego (antygeny) działają na ukierunkowane komórki, które to komórki już wcześniej uległy zmianom genetycznym. Zadziałanie antygeny powoduje wyselekcjonowanie właściwej ukierunkowanej komórki B, jej proliferację i dalsze różnicowanie.

Innym przykładem modelu stochastycznego, który tłumaczy procesy regulujące odnawianie się i ukierunkowanie KM jest tzw. „model przypadkowej hemopoezy” (hemopoiesis engendered at random model)

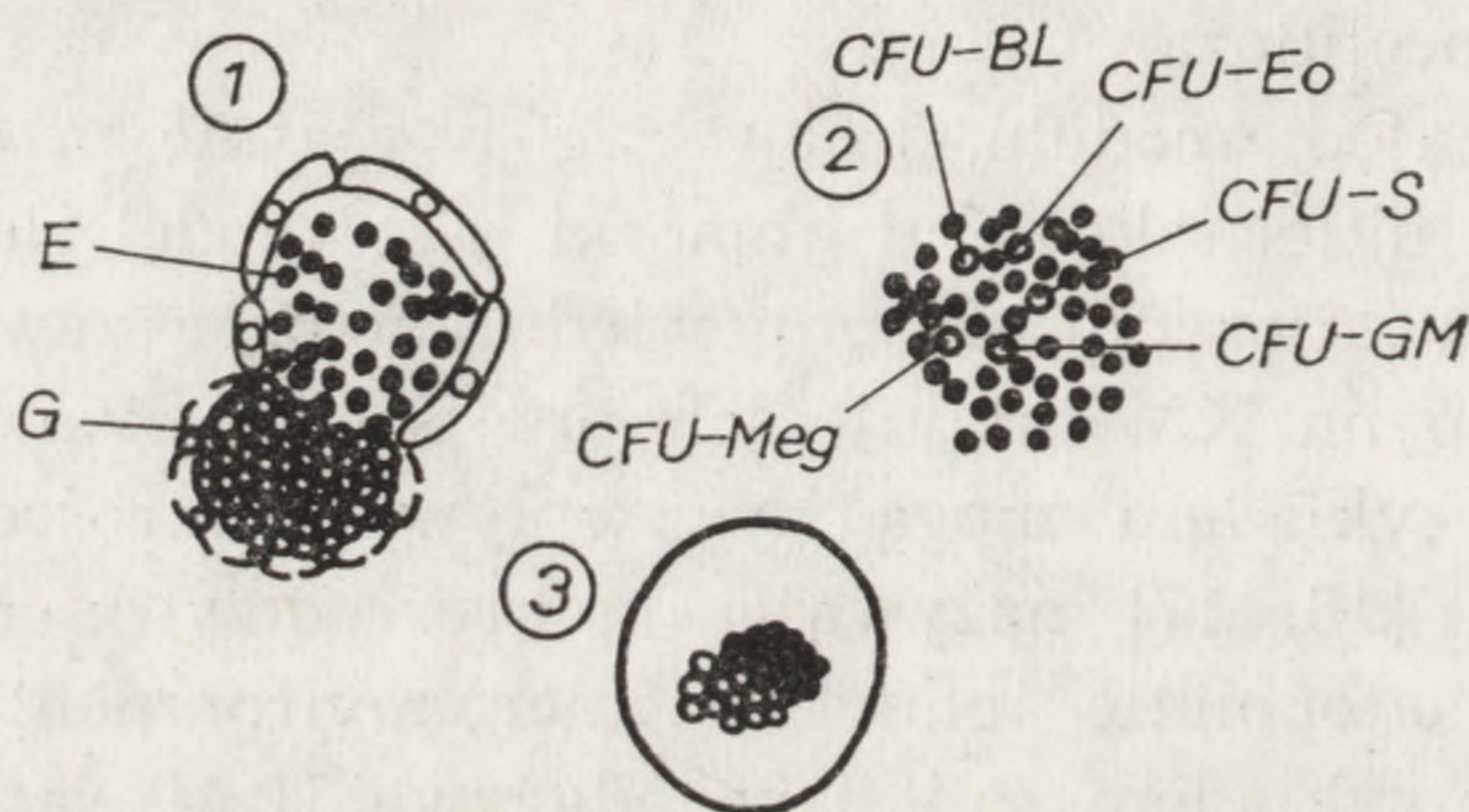
[56, 94, 97, 98]. W modelu tym (ryc. 4) zakłada się, że jakieś przypadkowe zdarzenie prowadzi do utraty przez KM zdolności do odnawiania się i ukierunkowuje ją w którąś z linii różnicowania hemopoetycznego. Charakter tego zdarzenia na poziomie molekularnym nie jest sprecyzowany, być może jest to albo przypadkowa zmiana sekwencji DNA (transpozycja lub mutacja), albo wystąpienie ekspresji już wcześniej istniejącej sekwencji DNA w przypadkowych KM. Stochastyczny model odnawiania się i ukierunkowanego różnicowania pierwotnej hemopoetycznej KM (CFU-S) potwierdzili Nakahata i wsp. [70] w warunkach „in vitro” we wtórnych hodowlach komórek śledzionowych myszy na płytkach i metylocelulozie.

Drugim rodzajem modelu próbującego wyjaśnić procesy regulujące przejście KM w ukierunkowane komórki jest model deterministyczny. Opiera się on na założeniu, że odpowiedni bodziec zewnętrzny działający bezpośrednio na KM inicjuje ich przejście w komórki ukierunkowane. Takim przykładem mogą być wpływy mikrośrodowiska, które Curry i Trentin [16, 17] nazywają „mikrośrodowiskiem indukującym hemopoezę” (hematopoietic inductive microenvironment”, a w skrócie HIM). Dobrym przykładem roli, jaką odgrywa HIM, są badania mysich mutantów Sl/Sl^d z niedokrwistością uwarunkowaną genetycznie. Myszy te mają prawidłowe KM, ale uszkodzoną zdolność zrębu szpikowego do indukowania hemopoezy. Przeszczepiając komórki myszy Sl/Sl^d letalnie napromienionemu zwierzęciu uzyskiwano powrót prawidłowej hemopoezy; z drugiej strony, gdy myszom Sl/Sl^d przeszczepiano elementy prawidłowego zrębu szpikowego, następowało wyleczenie niedokrwistości [4, 62].



Ryc. 5. Konwencjonalna ilustracja kontroli hemopoezy (według [66]), która zakłada, że odnawianie się wieloważnej KM, jak i jej ukierunkowanie w specyficzne komórki ukierunkowane jest kontrolowane przez szczególne wpływy niszy utworzonej z sąsiadujących komórek mikrośrodowiska. Z kolei klonalna proliferacja zróżnicowanych komórek pochodzących od komórek ukierunkowanych jest regulowana przez specyficzne stymulujące czynniki humoralne, których działanie moduluje szereg czynników hamujących

Działanie bodźców środowiskowych na poziomie KM przypuszczalnie sprowadza się albo do jej odnowy, albo do ukierunkowania w którąś z linii zróżnicowania hemopoetycznego [66]. Wyspecjalizowane komórki mikrośrodowiska sąsiadujące z KM tworzą tzw. niszę, w której te ostatnie zostają umieszczone (ryc. 5). Jeśli w takiej niszy znajduje się kilka KM, to zależnie od erytropoetycznego lub granulopoetycznego wpływu mikrośrodowiska rozwijają się ostro rozgraniczone między sobą wtórne populacje hemopoetyczne i tak np. na granicy kolonii erytropoetycznej rozwija się linia granulocytów-monocytów (ryc. 6(1)).



Ryc. 6. Linia ostro rozgraniczająca komórki linii erytrocytów, od komórek linii granulocytów w koloniach śledzionowych (1) jest na ogół uważana za potwierdzenie koncepcji wpływów specyficznej niszy utworzonej przez komórki mikrośrodowiska, chociaż podobne ostre rozgraniczenia spotyka się w koloniach mieszanych rosnących „in vitro” (3), gdzie nie ma komórek mikrośrodowiska. Także nie całkiem prawdziwa jest homogenność kolonii śledzionowych, ponieważ morfologicznie „czyste” kolonie erytrocytarne (2) zwykle zawierają komórki ukierunkowane w inne linie, jak np. w linię granulocytów i monocytów-makrofagów (CFU-G,M), eozynofili (CFU-Eo), megakariocytów (CFU-Meg) i limfocytów B (CFU-BL), obok wieloważnych hemopoetycznych komórek pnia (CFU-S) (według [66])

Sprawą dyskusyjną pozostaje, czy dla wpływu mikrośrodowiska ukierunkowującego rozwój takich lub innych kolonii hemopoetycznych w śledzionie, konieczny jest bezpośredni kontakt między KM a sąsiadującymi komórkami tegoż mikrośrodowiska, czy może komórki mikrośrodowiska rozproszone w tkance wysyłają krótkozakresowe sygnały regulujące hemopoezę. Nie jest także jasne czy mikrośrodowisko dostarcza substratów, czy ukierunkowuje komórki za pomocą specyficznych sygnałów do różnicowania się w odpowiednią linię. Wyczerpujące obserwacje prowadzone nad powstawaniem kolonii w warunkach „in vitro” wykazały, że odmienne, klonalnie czyste populacje kolonii hemopoetycznych mogą rozwijać się obok siebie w hodowlach zawierających mieszaninę czynników regulujących. Obserwacje te niewątpliwie wskazują, że raz ukierunkowana komórka w którąś z linii różnicowania tworzy

generacje komórek potomnych tej samej klasy niezależnie od wpływu innych molekuł regulujących, nie związanych z daną linią różnicowania. Z tych to przyczyn wzrost kolonii hemopoetycznych w śledzienie z pewnością nie wymaga ani ciągłego kontaktu z komórkami mikrośrodowiska, ani specjalnego stężenia czynników humoralnych wywołujących różnicowanie [66].

Niedawne badania sugerują, że postulowany obecnie dwustopniowy układ kontrolujący hemopoezę, a mianowicie:

- komórki mikrośrodowiska odpowiedzialne za powstawanie ukierunkowanych komórek potomnych i
- regulujące czynniki humoralne, które wpływają na ostateczne powstanie zróżnicowanych komórek końcowych (ryc. 5),

nie jest wystarczający z uwagi na zbytne uproszczenie [66]. Tak np. komórki ukierunkowane, podobnie jak i regulujące czynniki humoralne, występują we krwi obwodowej, ale różnicowanie komórek hemopoetycznych zachodzi tylko w pewnych tkankach, np. w szpiku lub w śledzienie. Obserwacje te co najmniej implikują, że procesy środowiskowe muszą odgrywać rolę ułatwiającą, a być może uczestniczą w regulowaniu końcowych zjawisk proliferacyjnych w różnych liniach hemopoetycznych. Wprawdzie udokumentowano już wytwarzanie humoralnych czynników regulujących przez komórki mikrośrodowiska, to jednak niektóre z nich, jak np. czynnik kontrolujący proliferację granulocytów-monocytów (colony stimulating factor-granulocyte, monocyte; w skrócie CSF-G,M), mogą być także wytwarzane przez inne nie hemopoetyczne tkanki, jak np. niektóre tkanki płodu [8] lub łożysko [9]. A zatem komórki mikrośrodowiska narządów hemopoetycznych przypuszczalnie wytwarzają jeszcze dodatkowe czynniki regulujące, które są niezbędne i warunkują umiejscowienie hemopoezy w tych tkankach.

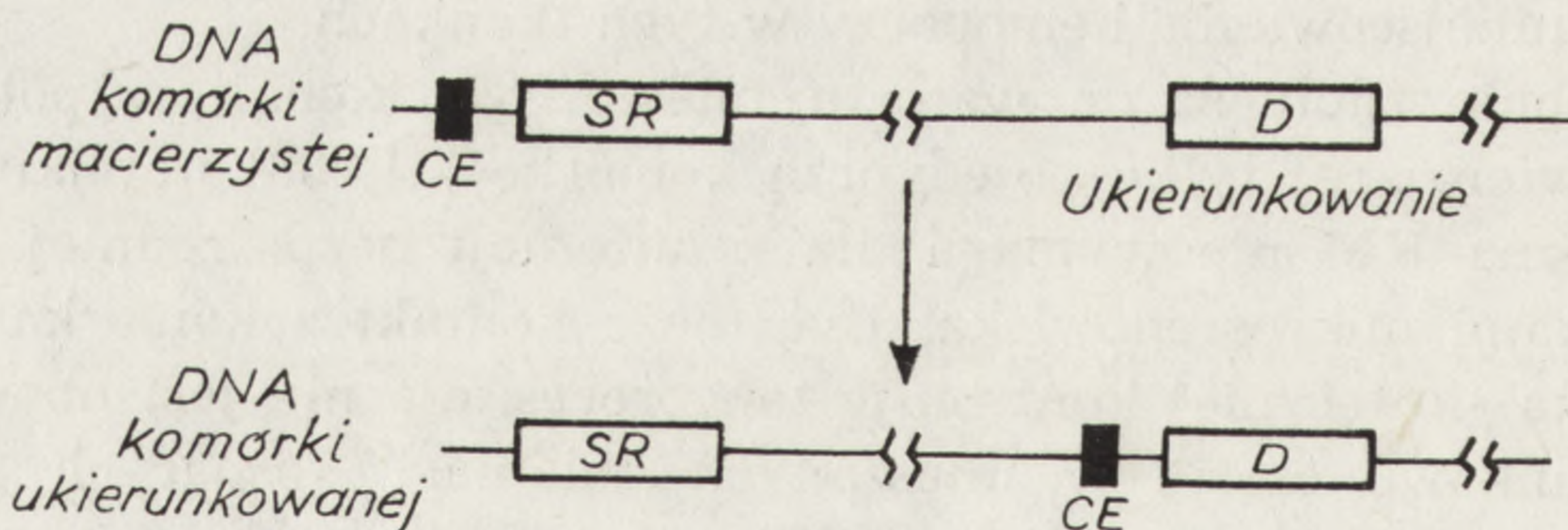
Podobnie zdolność do wzrostu mieszanych kolonii w półstałej hodowli zawierającej tylko pojedynczą komórkę [51, 68] implikuje, że hemopoetyczna KM nie wymaga dla proliferacji bezpośredniej interakcji z komórkami mikrośrodowiska. Być może kontakt z komórkami mikrośrodowiska skuteczniej kontroluje ten proces, ale nie jest obowiązujący.

Stosunkowo często w mieszanych koloniach rosnących „in vitro” obserwuje się odrębne strefy komórek erytrocytarnych i nieerytrocytarnych wyraźnie rozgraniczone, podobnie jak w rosnących „in vivo” koloniach śledzionowych [69] (ryc. 6 (3)). Obserwacja ta wskazuje, że rozgraniczenie nie jest wynikiem jakichś specjalnych wpływów komórek mikrośrodowiska tworzących nisze. Co więcej, klonowanie poszczególnych komórek z kolonii śledzionowych i analiza cytologiczna ujawniły, że kolonie które początkowo wydawały się złożone wyłącznie z komórek linii erytrocytarnej syntetyzujących hemoglobinę, zawierają nie

tylko wieloważne hemopoetyczne KM (CFU-S), ale również ukierunkowane KM dla linii granulocytów-monocytów (CFU-G,M), eozynofili (CFU-Eo), megakariocytów (CFU-Meg) i limfocytów B (CFU-LB) (ryc. 6-2) [65, 67], co nasuwa wątpliwości odnośnie do wyłączności determinujących wpływów mikrośrodowiska na proces ukierunkowania.

Poza omówionymi czynnikami, wielu badaczy przedstawiło dowody, że komórki grasiczopochodne odgrywają pewną rolę w regulowaniu hemopoezy. W okresie wczesnych badań nad przeszczepami, Goodman i wsp. [82] wykazali, że dodanie tymocytów do komórek szpiku może pobudzać wzrost komórek hemopoetycznych u niektórych szczepów myszy. Następnie Frindel i wsp. [33] udowodnili, że stymulowane przez różne antygeny i mitogeny limfocyty T mogą wzbudzać proliferację hemopoetycznych KM. Sharkis i wsp. [90] eliminowali komórki $T_{H}1$ ze szpiku za pomocą przeciwciał i komplementu, przez co znamienne zmniejszyli zdolność tego szpiku do wyrównywania niedokrwistości, jeśli z kolei przeszczepiano go myszom z wrodzoną niedokrwistością na skutek defektu KM. Z drugiej strony tak zubożonemu szpikowi można przywrócić jego właściwości przez dodanie tymocytów pochodzących od zdrowego, nie anemicznego dawcy [50]. Ostatnio wykazano [72], że gdy do komory dyfuzyjnej zawierającej ludzkie komórki szpikowe (którą wszczepia się do jamy otrzewnowej myszy) zostanie dodane płynne środowisko pochodzące z ustalonej linii ludzkich limfocytów T, dochodzi do zwiększonego tworzenia się kolonii szpikowych w tej komorze.

Jeśli przyjmiemy deterministyczny model ukierunkowania, to należałoby oczekiwać raczej jednolitej odpowiedzi ze strony KM na bo-



Ryc. 7. Proponowany przez Tilla [94] prosty model kontrolujący odnawianie się i ukierunkowanie KM na poziomie molekularnym

CE (controlling element) — ruchome kontrolujące elementy genetyczne odpowiedzialne za wystąpienie ekspresji przyległych genów, SR (stem cell renewal) — gen lub kompleks genów odpowiedzialnych za kontrolę odnawiania się KM, D (differentiation) — kompleks genów odpowiedzialnych za kontrolę zaprogramowanej ekspresji markerów fenotypowych biorących udział w różnicowaniu komórki ukierunkowanej. Model ten zakłada transpozycję elementów kontrolujących (CE), co z jednej strony uruchamia kompleks genów D, a z drugiej unieruchamia geny SR

dziec mikrośrodowiska (oczywiście pod warunkiem, że bodziec ten będzie kontrolowany). Badania komórek hemopoetycznych w hodowli, gdzie kontrolowane doświadczalnie bodźce mikrośrodowiska są znacznie silniejsze od występujących „in vivo” wykazały, że regulacja procesu odnowy KM jest znacznie słabsza „in vitro” [46] niż „in vivo” [92, 98]. Wyniki te zdaniem Tilla [95] sugerują raczej interpretację stochastyczną niż deterministyczną.

Jeśli przyjmiemy stochastyczny model ukierunkowania i że hipoteza niezmienności nie obowiązuje w procesie ukierunkowania oraz że ukierunkowanie i utrata zdolności do odnawiania się KM są konsekwencją tego samego zjawiska, wówczas pociągający wydaje się prosty model genetycznego ukierunkowania zaproponowany przez Tilla [94] (ryc. 7). Model ten opiera się na założeniu, że transpozycja materiału genetycznego prowadząca do utraty zdolności do odnawiania się komórki pnia, zapoczątkowuje program różnicowania w ukierunkowaną linię komórkową. W modelu przedstawionym na ryc. 7 naruszenie hipotezy niezmienności odnosi się raczej do transpozycji niż delecji materiału genetycznego. Taka transpozycja ma również miejsce przy rekombinacji genów immunoglobulinowych. Jednakże rozstrzygających informacji co do genetycznej regulacji ukierunkowania należy oczekiwać z danych doświadczalnych.

LITERATURA

- [1] BECKER A. J., McCULLOCH E. A., SIMINOVITCH L., TILL J. E., The effect of differing demands for blood cell production on DNA synthesis by hemopoietic colony-forming cells of mice, *Blood.*, **26**: 296–308, 1965.
- [2] BERGMAN D. G., SOUZA L. M., BALUDA M. A., Vertebrate DNA contains nucleotide sequence related to the putative transforming gene of avian myeloblastosis virus, *J. Virol.*, **40**: 450–455, 1981.
- [3] BERNHEIM A., BERGER R., PREUD'HOMME J. L., LABAUME S., BUSSEL A., BAROT-CIORABARU R., Philadelphia chromosome positive blood B lymphocytes in chronic myelocytic leukemia, *Leukaemia Res.*, **5**: 281–299, 1981.
- [4] BERNSTEIN S. E., Tissue transplantation as an analytic and therapeutic tool in hereditary anemias, *Am. J. Surg.*, **119**: 448–451, 1970.
- [5] BISHOP J. M., Retroviruses, *Ann. Rev. Biochem.*, **47**: 35–88, 1978.
- [6] BRACK C., HIRAMA M., LENHARD-SCHULLER R., TONEGAWA S., A complete immunoglobulin gene is created by somatic recombination, *Cell*, **15**: 1–14, 1978.
- [7] BRADLEY T. R., METCALF D., The growth of mouse bone marrow cells “in vitro”, *Aust. J. Exp. Biol. Med.*, **44**: 287–300, 1966.
- [8] BROWN C. H. III., CARBONE P. P., “In vitro” growth of normal and leukemic human bone marrow, *J. Natl. Cancer Inst.*, **46**: 989–1000, 1971.

- [9] BURGESS A. W., WILSON E. M. A., METCALF D., Stimulation by human placental conditioned medium of hemopoietic colony formation by human marrow cells, *Blood*, **49**: 573-583, 1977.
- [10] BRUGGE J. S., ERIKSON R. L., Identification of a transformation specific antigen induced by an avian sarcoma virus, *Nature*, **269**: 346-348, 1977.
- [11] BURNET F. M.: *The Clonal Selection Theory of Acquired Immunity*, Nashville: Vanderbilt University Press, str. 139-140, 1959.
- [12] BURTON D. I., ANSELL J. D., GRAY R. A., MICKLEM H. S., A stem cells in murine haematopoiesis, *Nature*, **298**: 562-563, 1982.
- [13] CAMPBELL A., Some general questions about movable elements and their implications, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, **45**: 1-9, 1981.
- [14] CHERVENICK P. A., ELLIS L. D., PAN S., LAVSON A. L., Human leukemic cells: In vitro growth of colonies containing the Philadelphia (Ph¹) chromosome, *Science*, **174**: 1134-1136, 1971.
- [15] COLLETT M. S., BRUGGE J. S., ERIKSON R. L., Characterization of a normal avian cell protein related to the avian sarcoma virus transforming gene product, *Cell*, **15**: 1363-1374, 1978.
- [16] CURRY J. L., TRENTIN J. J., Hemopoietic spleen colony studies. I. Growth and differentiation, *Dev. Biol.*, **15**: 395-413, 1967.
- [17] CURRY J. L., TRENTIN J. I., WOLF N., Hemopoietic spleen colony studies. II. Erythropoiesis, *J. Exp. Med.*, **125**: 703-719, 1967.
- [18] DALLA FAVERA R., GALLO R. C., GIALLONGO A., CROCE C. M., Chromosomal localization of the human homolog ("c-sis") of the simian sarcoma virus "onc" gene, *Science*, **218**: 686-688, 1982.
- [19] DAVIDSON E. H., *Gene Activity in Early Development*, New York, Acad. Press, str. 5-7, 1968.
- [20] DAVIS M. M., CALAME K., EARLY P. W., LIVANT D. L., JOHO R., WEISMAN I. L., HOOD L., An immunoglobulin heavy-chain gene is formed by at least two recombinational events, *Nature*, **283**: 733-739, 1980.
- [21] DeKLEIN A., GEURTS van KESSEL A., GROSVELD G., BARTRAM C. R., HAGEMEIJER A., BOOTSMA D., SPURR N. K., HEISTERKAMP N., GROFFEN J., STEPHENSON J. R., A cellular oncogene is translocated to the Philadelphia chromosome in chronic myelocytic leukaemia, *Nature*, **300**: 765-768, 1982.
- [22] DEXTER T. M., ALLEN T. D., LAJTHA L. G., Conditions controlling the proliferation of haemopoietic stem cells "in vitro", *J. Cell. Physiol.*, **91**: 335-344, 1977.
- [23] DREYER W. J., BENNETT J. C., The molecular basis of antibody formation: A paradox, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **54**: 864-869, 1965.
- [24] DUESBERG P. H., Transforming genes of retroviruses, [w] *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, **44**: 13-30, 1979.
- [25] EARLY P., HUANG H., DAVIS M., CALAME K., HOOD L., An immunoglobulin heavy chain variable region gene is generated from three segments of DNA: V_H, D and J_H, *Cell*, **19**: 981-992, 1980.
- [26] EVA A., ROBBINS K. C., ANDERSEN P. R., SRINIVASAN A., TRONICK S. R., REDDY E. P., ELLMORE N. W., GALEN A. T., LEUTENBERGER J. A., PAPAS T. S., WESTIN E. H., WONG-STAAAL F., GALLO R. C., AARONSON S. A., Cellular genes analogues to retroviral "onc" genes are transcribed in human tumor cells, *Nature*, **295**: 116-119, 1982.
- [27] FAUSER A. A., MESSNER H. A., Identification of megakaryocytes, macro-

- phages and eosinophils in colonies of human bone marrow containing neutrophilic granulocytes and erythroblasts, *Blood*, **53**: 1023-1027, 1979.
- [28] FIALKOW P. J., MARTIN P. J., NAJFELD V., PENFOLD G. K., JACOBSON R. J., HANSEN J. A., Evidence for a multistep pathogenesis of chronic myelogenous leukemia, *Blood*, **58**: 158-163, 1981.
- [29] First International Workshop on Chromosomes in Leukemia: Chromosomes in Ph¹-positive chronic granulocytic leukemia, *Brit. J. Haematol.*, **39**: 305-309, 1978.
- [30] FORD C. E., HAMERTON J. L., BARNES D. W. H., LOUITIT J. F., Cytological identification of radiation-chimaeras, *Nature*, **177**: 452-454, 1956.
- [31] FRANGIONE B., FRANKLIN E. C., Correlation between fragmented immunoglobulin genes and heavy chain deletion mutants, *Nature*, **281**: 600-602, 1979.
- [32] FRANKEL A. E., FISCHINGER P. J., Rate of divergence of cellular sequences homologous to segments of Moloney sarcoma virus, *J. Virol.*, **21**: 153-161, 1977.
- [33] FRINDEL E., LEUCHARS E., DAVIES A. J. S., Thymus dependency of bone marrow stem cell proliferation in response to certain antigens, *Exp. Hematol.*, **4**: 275-284, 1976.
- [34] GALLI S. J., DVORAK A. M., ISHIZAKA T., NABEL G., Der SIMONIAN H., CANTOR H., DVORAK H. F., A cloned cell with NK-function resembles basophils by ultrastructure and expresses IgE receptors, *Nature*, **298**: 288-290, 1982.
- [35] GALLO R. C., WONG-STAAAL F., Retroviruses as etiologic agents of some animal and human leukemias and lymphomas and as tools for elucidating the molecular mechanism of leukemogenesis, *Blood*, **60**: 545-557, 1982.
- [36] GALLY J. A., EDELMAN G. M., Somatic translocation of antibody genes, *Nature*, **227**: 341-348, 1970.
- [37] GODAL T., FUNDERUD S., Human B-cell neoplasms in relation to normal B-cell differentiation and maturation processes, *Adv. Cancer Res.*, **36**: 211-255, 1982.
- [38] GOFF S. P., GILBOA E., WITTE O. N., BALTIMORE D., Structure of the Abelson murine leukemia virus genome and the homologous cellular gene: Studies with cloned viral DNA, *Cell*, **22**: 777-785, 1980.
- [39] GOLOMB H. M., ROWLEY J. D., VARDIM J. W., TESTA J. R., BUTLER A., "Microgranular" acute promyelocytic leukemia: A distinct clinical, ultrastructural, and cytogenetic entity, *Blood*, **55**: 253-259, 1980.
- [40] GOLOMB H. M., TESTA J. R., VARDIMAN J. W., BUTLER A. E., ROWLEY J. D., Cytogenetic and ultrastructural features of "de novo" acute promyelocytic leukemia: The University of Chicago experience (1973-1978), *Cancer Genet. Cytogenet.*, **1**: 69-78, 1979.
- [41] HAM A. W., AXELRAD A. A., CORMACK D. H.: The hematopoietic tissues: Myeloid tissue, [w] *Histology 8th ed. Red.*: A. W. Ham. Philadelphia: J. B. Lippincott, str. 305-306, 1979.
- [42] HARRISON D. E., Life sparing ability (in lethally irradiated mice) of W/W^v mouse marrow with no macroscopic colonies., *Radiat. Res.*, **52**: 553-563, 1972.
- [43] HEISTERKAMP N., GROFFEN J., STEPHENSON J. R., SPURR N. K., GODFELLOW P. N., SOLOMON E., CARRITT B., BODMER W. F., Chromosomal localization of human cellular homologues of two viral oncogenes, *Nature*, **299**: 747-749, 1982.
- [44] HERSKOWITZ I., BLAIR L., FORBES D., HICKS J., KASSIR Y., KUSHNER

- P., RINE J., SPRAGUE G., Jr., STRATHERN J., Control of cell type in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* and a hypothesis for development in higher eukaryotes, [w] *The molecular Genetics of Development*. Red.: T. Leighton, W. F. Loomis, New York: Academic Press, str. 79–118, 1980.
- [45] HODGSON G. S., BRADLEY T. R., Properties of haemopoietic stem cells surviving 5-fluorouracil treatment: Evidence for a preCFU-S cell? *Nature*, **281**: 381–382, 1979.
- [46] HUMPHRIES R. K., EAVES A. C., EAVES C. J., Self-renewal of hemopoietic stem cells during mixed colony formation "in vitro", *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **78**: 3629–3633, 1981.
- [47] HURWITZ J. L., CEBRA J. J., Rearrangements between the immunoglobulin heavy chain gene J_H and C_{mi} regions accompany normal B lymphocyte differentiation "in vitro", *Nature*, **299**: 742–744, 1982.
- [48] ICHIKAWA Y., PLUZNİK D. H., SACHS L., "In vitro" control of the development of macrophage and granulocyte colonies, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **56**: 488–495, 1966.
- [49] ILLMENSEE K., HOPPE P. C., Nuclear transplantation in *Mus musculus*: Developmental potential of nuclei from preimplantation embryos, *Cell*, **23**: 9–18, 1981.
- [50] JĘDRZEJCZAK W., SHARKIS S. J., AHMED A., SELL K. W., SANTOS G. W., Theta-sensitive cell and erythropoiesis: Identification of a defect in W/W^v anemic mice, *Science*, **196**: 313–315, 1977.
- [51] JOHNSON G. R., METCALF D., Pure and mixed erythroid colony formation "in vitro" stimulated by spleen conditioned medium with no detectable erythropoietin, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **74**: 3879–3882, 1977.
- [52] KANEKO S., MOTOMURA S., IBAYASHI H., Differentiation of human bone marrow-derived fibroblastoid colony forming cells (CFU-F) and their roles in haemopoiesis "in vitro", *Br. J. Haematol.*, **51**: 217–225, 1982.
- [53] KEATING A., SINGER J. W., KILLEN P. D., STRIKER G. E., SALO A. C., SANDERS J., THOMAS E. D., THORNING D., FIALKOW P. J., Donor origin of the "in vitro" haematopoietic microenvironment after marrow transplantation in man, *Nature*, **298**: 280–283, 1982.
- [54] KELLER G. M., PHILIPS R. A., Detection in vitro of a unique, multipotent hemopoietic progenitor, *J. Cell. Physiol. Suppl.*, **1**: 31–36, 1982.
- [55] KING T. J., BRIGGS R., Serial transplantation of embryonic nuclei, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, **21**: 271–290, 1956.
- [56] KORN A. P., HENKELMAN F. P., OTTENSMEYER F. P., TILL J. E., Investigation of a stochastic model of haemopoiesis, *Exp. Hematol.*, **1**: 362–375, 1973.
- [56a] KRZYMOWSKI T., PSZAŁA T., Mechanizmy regulujące proliferację i różnicowanie komórek układu erytroblastycznego, [w] *Ultrastruktura i funkcja komórek*, red. J. Kawiak, Z. Osuchowska, A. Przełęcka, t. 2, 42–91, 1982.
- [57] LOUITIT J. F., PETERS J., MARSHALL M. J.: Colony-forming units and haematopoietic stem cells in osteoclastopoiesis, *Metabol. Bone Dis. Rel. Res.*, **3**: 131–133, 1981.
- [58] MAGLI M. C., ISCOVE N. N., ODARTCHENKO N., Transient nature of early haematopoietic spleen colonies, *Nature*, **295**: 527–529, 1982.
- [59] MARCU K. B., HARRIS L. J., STANTON L. W., ERIKSON J., WATT R., CROCE C. M., Transcriptionally active "c-myc" oncogene is contained within NIARD, a DNA sequence associated with chromosome translocations in B-cell neoplasia, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **80**: 519–523, 1983.

- [60] MAXAM A. M., GILBERT W., A new method for sequencing DNA, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **74**: 560-564, 1977.
- [61] McCULLOCH E. A., SIMINOVITCH L., TILL J. E., Spleen colony formation in anemic mice of the genotype W/WV, *Science*, **144**: 844-846, 1964.
- [62] McCULLOCH E. A., SIMINOVITCH L., TILL J. E., RUSSELL E. S., BERNSTEIN S. E., The cellular basis of the genetically determined hemopoietic defect in anemic mice of genotype SL/SL^d, *Blood*, **26**: 399-410, 1965.
- [63] McKINNEL R. G., *Cloning: Nuclear transplantation in Amphibia*, Minneapolis: University of Minnesota Press, 134-147, 1978.
- [64] McLEOD D. L., SHREEVE M. M., AXELRAD A. A., Induction of megakaryocyte colonies with platelet formation, "in vitro", *Nature*, **261**: 492-494, 1976.
- [65] METCALF D., [w] *Experimental Hematology 1978*, Red.: S. J. Baum, G. D. Ledney. New York: Springer, str. 35-46, 1978.
- [66] METCALF D., Control of hemopoietic cell proliferation and differentiation, *Control Cell. Div. Develop. Part A*: 473-486, 1981.
- [67] METCALF D., JOHNSON G. R., [w] *Immuno-Aspects of the Spleen*. Red.: J. R. Battisto, J. W. Streilein. Amsterdam: Elsevier (North-Holland), Biomedical Press, str. 27-34, 1976.
- [68] METCALF D., JOHNSON G. R., BURGESS A. W., Direct stimulation by purified GM-CSF of the proliferation of multipotential and erythroid precursor cells, *Blood*, **55**: 138-147, 1980.
- [69] METCALF D., JOHNSON G. R., MANDEL T. E., Colony formation in agar by multipotential hemopoietic cells, *J. Cell. Physiol.*, **98**: 401-420, 1979.
- [70] NAKAHATA T., GROSS A. J., OGAWA M., A stochastic model of selfrenewal and commitment to differentiation of the primitive hemopoietic stem cells in culture, *J. Cell. Physiol.*, **113**: 455-458, 1982.
- [71] NAKAHATA T., OGAWA M., Identification in culture of a class of hemopoietic colony-forming units with extensive capability to self-renew and generate multipotential colonies, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **79**: 3843-3847, 1982.
- [72] NISKANEN E., OKI A., CLINE M. J., GOLDE D. W., Human T-lymphocyte products stimulate human hemopoietic progenitor cell proliferation in diffusion chambers "in vivo", *Blood*, **60**: 368-372, 1982.
- [73] POTTEN C. S., LAJTHA L. G., Stem cells versus stem lines, *Annals New York Acad. Sci.*, **77**: 49-61, 1982.
- [74] PURCHIO A. F., ERIKSON E., BRUGGE J. S., ERIKSON R. L., Identification of a polypeptide encoded by the avian sarcoma virus "src" gene, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **75**: 1567-1571, 1978.
- [75] RABBITTS T. H., Organization of immunoglobulin genes, *Int. Rev. Biochem.*, **23**: 49-54, 1979.
- [76] ROSE D. R., The generation of antibody diversity, *Amer. J. Hematol.*, **13**: 91-99, 1982.
- [77] ROUSSEL M., SAULE S., LAGROU C., ROMMENS C., BEUG H., GRAF T., STEHELIN D., Three types of viral oncogene of cellular origin specific for hematopoietic transformation, *Nature*, **281**: 452-455, 1979.
- [78] RUSHLOW K. E., LAUTENBERGER J. A., PAPAS T. S., BALUDA M. A., PERBAL B., CHIRIKJIAN J. G., REDDY E. P., Nucleotide sequence of the transforming gene of avian myeloblastosis virus, *Science*, **216**: 1421-1423, 1982.
- [79] SAKANO H., HÜPPI K., HEINDRICH G., TONEGAWA S., Sequences at the somatic recombination sites of immunoglobulin light-chain genes, *Nature*, **280**: 288-294, 1979.

- [80] SAKANO H., MAKI R., KUROSAWA Y., ROEDER W., TONEGAWA S., Two types of somatic recombination are necessary for the generation of complete immunoglobulin heavy-chain genes, *Nature*, **286**: 676-683, 1980.
- [81] SAKANO H., ROGERS J. H., HÜPPI K., BRACK C., TRAUNECKER A., MAKI R., WALL R., TONEGAWA S., Domains and the hinge region of an immunoglobulin heavy chain are encoded in separate DNA segments, *Nature*, **277**: 627-633, 1979.
- [82] SALINAS F. A., GOODMAN J. W., Relative effect of thymocytes from irradiated donors on hemopoiesis in P→F₁ chimeras, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **140**: 439-443, 1972.
- [83] SANGER F., COULSON A. R., A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase, *J. Mol. Biol.*, **94**: 441-449, 1975.
- [84] SANGER F., COULSON A. R., The use of thin acrylamid gels for DNA sequencing, *FEBS Lett.*, **87**: 107-110, 1978.
- [85] SCHILLING J., CLEVINGER B., DAVIE J. M., HOOD L., Amino acid sequence of homogeneous antibodies to dextran and DNA rearrangements in heavy chain V-region gene segments, *Nature*, **283**: 35-40, 1980.
- [86] SCHOFIELD R., LAJTHA L. G., Cellular kinetics of erythropoiesis, [w] *Congenital Disorders of Erythropoiesis*, Ciba Foundation Symposium., **37**: 3-24, 1976.
- [87] SCOLNICK E. M., RANDS E., WILLIAMS D., PARKS W. P., Studies on the nucleic acid sequences of Kirsten sarcoma virus: A model for formation of a mammalian RNA-containing sarcoma virus, *J. Virol.*, **12**: 458-463, 1973.
- [88] SEIDMAN J. G., LEDER A., EDGELL M. H., POLSKY F., TILGHMAN S. M., TIEMEIER D. C., LEDER P., Multiple related immunoglobulin variable-region genes identified by cloning and sequence analysis, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **75**: 3881-3885, 1978.
- [89] SEIDMAN J. G., MAX E. E., LEDER P., A kappa-immunoglobulin gene is formed by site-specific recombination without further somatic mutation, *Nature*, **280**: 370-375, 1979.
- [90] SHARKIS S. J., JĘDRZEJCZAK W., AHMED A., SANTOS G. W., MCKEE A., SELL K. W., Anti-theta sensitive regulatory cell (TSRC) and hematopoiesis: Regulation of differentiation of transplanted stem cells in W/W^v anemic and normal mice, *Blood*., **42**: 802-817, 1978.
- [91] SILVERMAN M., ZIEG J., MANDEL G., SIMON M., Analysis of the functional components of the phase variation system, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, **45**: 17-26, 1981.
- [92] SIMINOVITCH L., McCULLOCH E. A., TILL J. E., The distribution of colony-forming cells among spleen colonies, *J. Cell. Comp. Physiol.*, **62**: 327-336, 1963.
- [93] STEPHENSON J. R., KHAN A. S., Van de VEN W. J. M., REYNOLDS F. H. Jr., Type C retroviruses as vectors for cloning cellular genes with probable transforming functions, *J. Natl. Cancer Inst.*, **63**: 1111-1121, 1979.
- [94] TILL J. E., Cellular diversity in the blood-forming system, *Am. Sci.*, **69**: 522-527, 1981.
- [95] TILL J. E., Stem cells in differentiation and neoplasia., *J. Cell. Physiol. Suppl.*, **1**: 3-11, 1982.
- [96] TILL J. E., McCULLOCH E. A., A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells, *Radiat. Res.*, **14**: 213-222, 1961.

- [97] TILL J. E., McCULLOCH E. A., Hemopoietic stem cell differentiation, *Biochim. Biophys. Acta.*, **605**: 431–459, 1980.
- [98] TILL J. E., McCULLOCH E. A., SIMINOVITCH L., A stochastic model of stem cell proliferation, based on the growth of spleen colony-forming cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **51**: 29–36, 1964.
- [99] TOUGH I. M., JACOB P. A., COURT-BROWN W. M., BAIKIE A. G., WILLIAMSON E. R. D., Cytogenetic studies on bone-marrow in chronic myeloid leukaemia, *Lancet*, **1**: 844–846, 1963.
- [100] TSUZUKIDA Y., WANG C., PUTNAM F. W., Structure of the A2m (1) allotype of human IgA — Recombinant molecule, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **76**: 1104–1109, 1979.
- [101] van BEKKUM D. W., van den ENGH G. J., WAGENHAKER G., BOL S. J. L., VISSER J. W. M., Structural identity of the pluripotential hemopoietic stem cell, *Blood Cells*, **5**: 143–159, 1979.
- [102] VOGT P. K., HU S. F., The genetic structure of RNA tumor viruses, *Ann. Rev. Genet.*, **11**: 203–238, 1977.
- [103] WANG L. H., HALPERN C. C., NADEL M., HANAFUSA H., Recombination between viral and cellular sequences generates transforming sarcoma virus, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **75**: 5812–5817, 1978.
- [104] WANG A. C., WILSON S. K., HOPPER J. E., FUDENBERG H. H., NISONOFF A., Evidence for control of synthesis of the variable regions of the heavy chains of immunoglobulins G and M by the same gene, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **66**: 377–382, 1970.
- [105] WHANG-PENG J., FREI E. III, TIJO J. H., CARBONE P. P., BRECHER G., The distribution of the Philadelphia chromosome in patients with chronic myelogenous leukemia, *Blood.*, **22**: 664–673, 1963.
- [106] WEIGERT M., GATMAITAN L., LOH E., SCHILLING J., HOOD L., Rearrangement of genetic information may produce immunoglobulin diversity, *Nature*, **276**: 785–790, 1978.
- [107] WEIGERT M., PERRY R., KELLEY D., HUNKAPILLER T., SCHILLING J., HOOD L., The joining of V and J gene segments creates antibody diversity, *Nature*, **283**: 497–499, 1980.
- [108] WESTIN E. H., WONG-STAAAL F., GELMANN E. P., DALLA-FAVERA R., PAPAS T. S., LAUTENBERGER J. A., EVA A., REDDY P., TRONICK S. R., AARONSON S. A., GALLO R. C., Expression of cellular homologs of retroviral “onc” genes in human hematopoietic cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **79**: 2490–2494, 1982.
- [109] WONG-STAAAL F., DALLA-FAVERA R., FRANCHINI G., GELMANN E. P., GALLO R. C., Three distinct genes in human DNA related to the transforming genes of mammalian sarcoma retroviruses, *Science*, **213**: 226–228, 1981.

Nadeszło: 24 czerwca 1983.

Przyjęto: 25 września 1983.

Adres autorek: ul. Jaczewskiego 8, Lublin 20–950.

KOMÓRKI NIELIMFOIDALNE GRASICY IN VITRO I ICH CZYNNOŚCIOWA ROLA

THYMUS NON-LYMPHOID CELLS IN VITRO AND THEIR FUNCTIONAL ROLE

Leszek KACZMAREK

Zakład Immunologii Radiacyjnej Wojskowego Instytutu Higieny i Epidemiologii,
Warszawa oraz Zakład Patomorfologii Centrum Zdrowia Dziecka, Warszawa

Streszczenie. Komórki nielimfoidalne grasicy (KNLG) umożliwiają wytworzenie wewnątrz tego narządu swoistego mikrośrodowiska warunkującego prawidłowy rozwój limfocytów T. Na KNLG in situ składają się przede wszystkim komórki nabłonkowe, a ponadto makrofagi (histiocyty), komórki śródbłonka naczyń krwionośnych i fibroblasty. Istnieje szereg metod hodowli komórek grasicy in vitro prowadzących do otrzymania KNLG pozbawionych limfocytów. W hodowlach tych dominują zwykle komórki nabłonkopodobne, makrofagopodobne i fibroblastoidalne. Komórki z tych hodowli zdolne są in vitro do wytwarzania czynników wpływających na przyspieszenie dojrzewania limfocytów T, a wszczepione in vivo umożliwiają wytworzenie struktur grasiczopodobnych i częściową normalizację układu odpornościowego w przypadku biorców, których niedobory immunologiczne spowodowane były brakiem czynnościowo sprawnej grasicy. Zastosowania metody hodowli KNLG in vitro umożliwiają pełniejsze zrozumienie funkcjonowania mikrośrodowiska limfopoezy T oraz mają wzrastające znaczenie lecznicze.

Summary. Thymic non-lymphoid cells (TNLCs) are engaged in the formation of thymus microenvironment which in turn is responsible for proper development of T lymphocytes. The TNLCs consist mainly of: epithelial cells, macrophages (histiocytes), endothelial cells and fibroblasts. Several methods of selective TNLCs growth in vitro have been described. The epithelioid, macrophage-like and fibroblastoid cells are recognized as a main components of TNLCs in vitro cultures. It was shown that TNLCs in vitro produce some factors stimulating development of T lymphocytes. Culture derived TNLCs can develop into thymus-like structures when grafted into T-immunodeficient animals and human beings. Such grafts can also reconstitute immunological system of recipients. Application of the in vitro TNLCs cultures may allow better understanding of thymus microenvironment and may have an increasing clinical importance.

WSTĘP

Grasica jest narządem kręgowców, którego podstawową funkcją jest umożliwienie prawidłowego rozwoju limfocytom T. Komórki te z kolei pełnią istotne funkcje w zjawiskach odpornościowych organizmu. Dla powstania w pełni dojrzałych limfocytów T z ich prekursorów niezbędna jest aktywność komórek nielimfoidalnych grasicy (KNLG). Stanowią one blisko 20% składu komórkowego narządu [50]. Znajdują się wśród nich: komórki nabłonkowe (przeważające ilościowo), komórki śródbłonna naczyń krwionośnych, histiocyty (należące do makrofagów), fibroblasty, a w mniejszej liczbie również komórki mięśniopodobne, komórki tuczne oraz granulocyty kwaso- i zasadochłonne [50, 54]. Zasadniczy składnik KNLG — komórki nabłonkowe powstają w rozwoju zarodkowym lokalnie (w odróżnieniu od składowej napływowej, jaką są m. in. limfocyty) na długo wcześniej zanim pierwsze tzw. dziewicze (ang. virgin) limfocyty T dostaną się do narządu [66].

W oddziaływaniach KNLG na rozwój limfocytów T można wyróżnić dwa rodzaje wpływów:

a. Wpływy humoralne, polegające na wytwarzaniu i wydzielaniu swoistych substancji chemicznych („hormonów”) pobudzających rozwój limfocytów T. Substancje te, dzięki przenoszeniu ich przez krew, zdolne są do wywierania swego wpływu nawet na duże odległości. Niektóre z czynników humoralnych grasicy zostały wysoce oczyszczone, chemicznie określone i otrzymane na drodze chemicznej syntezy. Należą do tej grupy takie peptydy jak np. tymozyna α_1 , uzyskana z wyciągu narządu i czynnik grasicy znajdujący w surowicy krwi — FTS (fr. facteur thymique serique) [1, 2].

b. Wpływy mikrośrodowiskowe, polegające na bezpośrednich oddziaływaniach pomiędzy rozwijającymi się limfocytami T a KNLG. Wpływy takie są ograniczone zasięgiem działania jedynie do grasicy i oddziałują zapewne na bardzo niewielkich odległościach. Są one znacznie gorzej poznane od oddziaływań humoralnych [34, 40, 80].

Dla powstania w pełni dojrzałych limfocytów T, czyli zdolnych do wypełniania swoistych funkcji biologicznych w reakcjach odpornościowych (np. wspomagania, tłumienia, cytotoksyczności), niezbędne jest zarówno humoralne, jak i mikrośrodowiskowe oddziaływanie grasicy na limfopoezę T. Przekonują o tym m. in. następujące fakty:

— u zwierząt z genetycznie uwarunkowanym brakiem czynnościowo sprawnego podścieliska grasicy (mutacja „nude” u myszy i szczurów) występuje niedorozwój limfocytów T [40, 77],

— trwałe zniszczenie KNLG (np. po lokalnym naświetleniu wysokimi dawkami promieni Roentgena) prowadzi do braku produkcji doj-

rzałych limfocytów T pomimo obecności w pełni sprawnych ich prekursorów [59],

— prawidłowy rozwój układu odpornościowego zwierząt, którym bezpośrednio po narodzeniu usunięto grasicę, wymaga przeszczepu narządu. Co więcej, przeszczep umieszczony w komorze dyfuzyjnej, zapewniającej przepływ substancji humoralnych, nie gwarantuje cwego prawidłowego rozwoju [37, 39, 62].

BUDOWA GRASICY I DOJRZEWANIE LIMFOCYTÓW T IN VIVO

Prawidłowa grasicca dojrzałego ssaka zbudowana jest z dwóch dużych płatów otoczonych pochewką łącznotkankową, która wnika do ich wnętrza, dzieląc je na mniejsze obszary — zraziki. W każdym ze zrazików można wyróżnić część korową i rdzenną. Blisko 90% komórek limfoidalnych grasiccy znajduje się w korze. W rdzeniu limfocytów T jest mniej (ok. 10%). Wymienione różnice w składzie komórek limfoidalnych kory i rdzenia powodują, że po zastosowaniu typowych barwień na preparatach histologicznych kora pod małym powiększeniem ostro odcina się od rdzenia. Limfocyty T umieszczone są w grasiccy, jakby w oczkach sieci tworzonej przez komórki nabłonkowe, a zwłaszcza ich wypustki. Możemy odróżnić komórki nabłonkowe części korowej zrazika, cechujące się długimi i delikatnymi wypustkami, od komórek nabłonkowych części rdzennej, mających wypustki krótsze i grubsze [50]. Niektóre z komórek nabłonkowych posiadają w cytoplazmie pęcherzyki, które mają morfologiczne wykładniki aktywności wydzielniczej [8, 67]. Ponadto wykazano, że w komórkach nabłonkowych grasiccy wytwarzane są takie czynniki humoralne narządu, jak wspomniane: tymozyna α_1 i FTS [10, 18, 53]. Można również w grasiccy wyróżnić komórki nabłonkowe zaangażowane w budowę tzw. ciałek Hassalla. Są to struktury widoczne na przekroju grasiccy w obrębie rdzenia zrazika, gdzie występują w liczbie kilku. Funkcja ich nie jest znana; być może stanowią miejsca degeneracji starych komórek [50]. Kolejnym rodzajem komórek nabłonkowych grasiccy o swoistych, wyróżniających je cechach, są tzw. komórki opiekuńcze (ang. nurse cells) [34, 71, 72]. Są to bardzo duże (o średnicy 15-75 μm) komórki zawierające w swej cytoplazmie zatopione komórki limfoidalne. Komórki opiekuńcze otrzymuje się z zawiesiny pojedynczych komórek grasiccy (dzięki dużemu ciężarowi właściwemu stosunkowo szybko opadają na dno naczynia z zawiesiną) i nie jest pewne czy również in vivo zawierają one limfocyty wewnątrz cytoplazmy, czy też np. otaczają je jedynie bardzo silnie swoimi wypustkami, które ulegałyby połączeniu w trakcie izolacji tych komórek.

Cechami pozwalającymi odróżnić komórki nabłonkowe od innych

rodzajów komórek występujących w grasicy jest obecność w cytoplazmie komórek nabłonkowych filamentów oraz desmosomów, jako połączeń pomiędzy tymi komórkami. W komórkach nabłonkowych można wykryć keratynę za pomocą swoistych przeciwciał [27, 64].

Spośród pozostałych, stosunko obficie występujących KNLG, komórki śródbłonkowe są zlokalizowane zarówno w korze, jak i rdzeniu, makrofagi (histiocyty) w większości leżą na granicy kory i rdzenia, zaś fibroblasty głównie w okrywającej korę otoczce łącznotkankowej. Należy tu podkreślić, że dane te odnoszą się do grasicy zdrowego osobnika.

Histiocyty są czasem trudne do odróżnienia od komórek nabłonkowych za pomocą jedynie prostej obserwacji w mikroskopie świetlnym. Natomiast w mikroskopie elektronowym odróżnia je brak filamentów i desmosomów, a obecność licznych lizosomów. Ponadto komórki te cechuje zdolność do intensywnej fagocytozy i dodatnia reakcja w barwieniach cytochemicznych wykrywających obecność pewnych hydrolaz, zwłaszcza kwaśnej fosfatazy i nieswoistej esterazy [52, 65].

Przebieg rozwoju limfocytów T można przedstawić w skrócie następująco [60, 61, 78]. W szpiku kostnym występują komórki macierzyste zdolne m. in. do wytwarzania prekursorów limfocytów T. Owe prekursory docierają wraz z krwią do grasicy i na tym etapie nazywa się je pretymocytami. Z kolei wewnątrz narządu pod wpływem KNLG przekształcają się w tzw. protymocyty, a następnie w tymocyty dojrzałe. Te ostatnie komórki opuszczają grasicę (zwane są wówczas komórkami T) i osiągają ostateczną dojrzałość (zdolność do wypełniania swoich funkcji w reakcjach odpornościowych, w tym rozpoznawanie antygenów) we krwi obwodowej i obwodowych narządach limfatycznych, przechodząc przez stadia zwane limfoblastami. Rozwój limfocytów T można opisać podając charakterystykę antygenów powierzchniowych tych komórek na każdym z etapów ich rozwoju. W przypadku mysich limfocytów T szczególne znaczenie mają antygeny oznaczane symbolami Lyt i kolejnymi numerami: 1, 2, 3. Wczesne tymocyty posiadają zestaw tych antygenów $Lyt\ 1^+$, 2^+ , 3^+ . Następnie w grasicy zachodzi różnicowanie komórek z takim zestawem antygenów Lyt na dwie podstawowe grupy $Lyt\ 1$ i $Lyt\ 2,3$. Te dwie grupy tymocytów prowadzą do różnych funkcjonalnie grup dojrzałych limfocytów T, jednych o funkcji wspomagającej (ang. helper) i drugich o funkcji tłumiącej (ang. suppressor). W przypadku człowieka podobne znaczenie mają antygeny oznaczane symbolem T i kolejnymi numerami. Na przykład wczesne tymocyty posiadają antygen T9 (oraz inne), następnie w toku rozwoju nabywają m. in. antygeny T4 i T8 tracąc T9, a w ciągu dalszego rozwoju w grasicy ulegają różnicowaniu na dwie grupy: jedną składającą się z tymocytów z antygenem T4 (prowadzącą do limfocytów wspomaga-

jących) i drugą z antygenem T8 (prowadzącą do limfocytów tłumiących). Należy zwrócić uwagę, że wskaźnikami postępującego, zależnego od grasicy rozwoju limfocytów T są również: zdolność do odpowiedzi na swoiste dla tych komórek mitogeny (zwłaszcza fitohemaglutyninę i konkanawalinę A), zdolność do dodatniej reakcji w mieszanych hodowlach limfocytów (MLR — ang. mixed lymphocyte reaction, występująca w warunkach MLC — ang. mixed lymphocyte culture). Ze zmian w charakterystyce antygenów powierzchniowych szczególnie istotne jest tracenie niektórych antygenów (np. TL) a nabywanie innych (np. w przypadku gryzoni antygeny theta). Wspomniane własności limfocytów T uważane są za swoście indukowane przez grasicę. W przypadku ludzkich limfocytów T do takich własności należy również zaliczyć zdolność do tworzenia tzw. rozetek E, czyli wiązania krwinek czerwonych barana.

METODY HODOWLI KNLG IN VITRO

Opracowano szereg metod hodowli grasicy in vitro, których cechą wspólną jest to, że w ich wyniku dochodzi do namnażania przede wszystkim komórek nielimfoidalnych (KNLG). Należy zwrócić w tym miejscu uwagę, że nazwa KNLG w hodowli, jako ogólna będzie stosowana w dalszej części pracy również w tych przypadkach, w których różni autorzy stosowali inne, bardziej szczegółowe określenia, np. komórki epitelialne (nabłonkowe) grasicy czy komórki retykuloepitelialne.

Metody hodowli można podzielić na dwie podstawowe grupy. W jednej hodowle rozpoczyna się z niewielkich (o powierzchni mniejszej niż 1 mm²) fragmentów narządu [22, 27–33, 43–49, 53, 55]. W drugiej materiałem wyjściowym do hodowli jest zawiesina pojedynczych komórek grasicy [5, 35, 58, 68–70, 74, 75].

W obu przypadkach narząd może być rozdrabniany mechanicznie, np. nożyczkami, przepuszczaniem przez igłę od strzykawki lub przez stalowe sito oraz enzymatycznie przez traktowanie trypsyną lub kolagenazą. Zastosowana procedura rozdrabniania grasicy ma istotny wpływ na otrzymany w wyniku hodowli skład komórek [25].

Oprócz wymienionych czynników duże znaczenie ma tu także wykonywanie lub niewykonywanie różnych czynności mających zubożyć otrzymany zestaw komórek w tymocyty przez np. częste przemywanie fragmentów grasicy pożywką [75] lub płukanie w płynie Waymoutha, który wybiórczo nie sprzyja tymocytom [70]. Ponadto istotne są warunki prowadzenia hodowli np. rodzaj pożywki, częstotliwość jej zmie-

niania, czas prowadzenia hodowli. Na uzyskane wyniki znaczący wpływ ma również gatunek organizmu, od którego pobiera się grasicę [9].

Wymienione czynniki są ważne dlatego, że w zależności od zastosowanej ich kombinacji różni badacze otrzymywali różny skład komórek w hodowli. Próba porównania wyników różnych autorów jest jeszcze trudniejsza jeśli weźmie się pod uwagę różnorodność kryteriów różnicowania hodowanych komórek. Często były to jedynie proste różnice w morfologii komórek obserwowane za pomocą mikroskopu świetlnego, co, jak wspomniano we wstępie, może być mylące.

Dlatego, biorąc pod uwagę trudności w identyfikacji komórek *in vitro*, wprowadzono następującą terminologię na oznaczenie komórek nielimfoidalnych grasicy pochodzących z hodowli: komórki nabłonkopodobne, makrofagopodobne i fibroblastoidalne.

Szczególną uwagę na wspomniane trudności w identyfikacji komórek zwrócili Jordan i Crouse [27]. Wykazali oni, że bez badań ultrastrukturalnych (obecność filamentów i desmosomów w nabłonku), cytochemicznych (obecność nieswoistej esterazy w makrofagach) i czynnościowych (zdolność do intensywnej fagocytozy cechująca makrofagi) bardzo trudno jest prawidłowo odróżnić komórki nabłonkopodobne od makrofagopodobnych. Należy zaś podkreślić, że te dwa rodzaje komórek oraz komórki fibroblastoidalne przeważają ilościowo w opisywanych hodowlach.

Dominacja wyżej wymienionych komórek (a także obecność innych np. mięśniopodobnych [73]) dowodzi, że skład jakościowy KNLG *in vitro* jest w dużej mierze zgodny ze składem podścieliska grasicy występującego w nienaruszonym narządzie. Niestety nie można tego samego powiedzieć o składzie ilościowym. Zasadniczym problemem wydaje się uzyskanie w hodowli dominacji komórek nabłonkopodobnych.

Wypełnienia zadania otrzymania hodowli z dominującymi komórkami nabłonkopodobnymi łatwiej dokonać drogą hodowli wyprowadzanych z fragmentów grasicy niż z zawiesiny pojedynczych komórek. Fragmenty te otrzymuje się po enzymatycznym lub mechanicznym rozdrobieniu narządu, po czym kilkakrotnie przemywa się je pożywką. Sprzyja to usunięciu nadmiaru limfocytów. Następnie fragmenty takie umieszcza się bezpośrednio w naczyniu hodowlanym [44, 46] bądź na sączku z octanu celulozy (np. firmy Nuleopore) pływającym na powierzchni pożywki w naczyniu [28], bądź na specjalnych stolikach przystosowanych do hodowli narządowej [22]. Jako pożywkę stosuje się płyny RPMI-1640 lub HAM, lub MEM, za każdym razem z dodatkiem płodowej surowicy cielecej, najlepiej 30%, gdyż mniejsze stężenie sprzyja nadmiernemu namnażaniu się komórek fibroblastoidalnych [48], 2 mM L-glutaminy i antybiotyków. Pożywkę zmienia się początkowo dość często (np. następn-

go i trzeciego dnia po założeniu hodowli), a następnie w odstępach 3–7 dni. Ułatwia to pozbycie się limfocytów, które w przeciwieństwie do KNLG nie przylegają ściśle do dna naczynia lub innej powierzchni, na której hoduje się komórki. Hodowle prowadzi się zwykle w temperaturze 37°C w obecności powietrza zawierającego 5% CO₂. W celu ograniczenia wzrostu makrofagów można przez pierwsze 7 dni prowadzić hodowlę w 24°C, przenosząc potem do 37°C [28]. Oprócz wysokiego stężenia surowicy w pożywce rozwojowi komórek fibroblastoidalnych wydaje się nie sprzyjać również potraktowanie kilkudniowej hodowli prowadzonej w nieobecności surowicy roztworem zawierającym 0,25% trypsyny w PBS pozbawionym wapnia i magnezu (następnie hodowle prowadzi się w warunkach opisanych jako standardowe) [14].

Już po kilku dniach wokół wysianych fragmentów grasicy tworzy się otoczka składająca się głównie z komórek nabłonkopodobnych, jeśli hodowana jest grasicca człowieka lub szczura, a makrofagopodobnych w przypadku hodowli grasicy mysiej [9, 27, 48]. Również wewnątrz „wysianego” fragmentu degenerują limfocyty, zaś przeżywają głównie komórki nabłonkopodobne [27]. Czas hodowli prowadzący do całkowitej utraty komórek limfoidalnych w otoczce wynosi od 3 do 4 tygodni, natomiast wewnątrz fragmentu 8–10 dni [56]. Komórek uzyskanych w hodowli nie należy pasażować, gdyż prowadzi to do przerastania hodowli komórkami fibroblastoidalnymi [24].

W przypadku zastosowania zawiesiny komórek jako materiału wyjściowego do hodowli znacznie trudniej jest uzyskać dominację komórek nabłonkopodobnych. Częściowo szansę powodzenia daje uprzednie rozdzielanie zawiesiny komórek narządu wirowaniem w gradiencie gęstości różnych substancji i wybranie frakcji o największej procentowej zawartości komórek nabłonkowych. [25, 35]. Warunki hodowli są następnie podobne do już opisanych.

CZYNNOŚCIOWA CHARAKTERYSTYKA PODŚCIELISKA GRASICY IN VITRO

Wykonano liczne badania [9, 11, 14–16, 27, 31–33, 35, 44, 46, 48, 51, 58, 68, 70], których celem było wykazanie, że otrzymane w sposób uprzednio opisany hodowle KNLG (podścieliska grasicy) mają in vitro wpływ na rozwój prekursorów limfocytów T. Jako znaczniki oceny stopnia tego rozwoju stosowano: nabywanie zdolności do odpowiedzi na swoiste mitogeny (konkanawalina A, fitohemaglutynina, mitogen szkarłatki — PWN), dodatnią reakcję w mieszanych hodowlach limfocytów oraz zmiany w składzie antygenów powierzchniowych, w przypadku gryzoni zwłaszcza antygeny theta. W przypadku komórek ludzkich bar-

dzo często stosowano w tym celu nabywanie zdolności do tworzenia rozetek typu E.

W badaniach tych stosowano dwie zasadnicze metody:

1. wspólne hodowle KNLG i prekursorów limfocytów T,
2. poddawanie prekursorów limfocytów T działaniu pożywki zebranej znad hodowli KNLG.

Rozróżnienie tych metod jest dość ważne, ponieważ można sądzić, że w pierwszej bada się zarówno oddziaływania mikrośrodowiskowe, w tym np. swoiste interakcje międzykomórkowe KNLG na limfocyty T, natomiast w drugiej metodzie przede wszystkim bada się wpływy humoralne KNLG.

W omawianych badaniach stwierdzono dodatni wpływ, w podobnej zresztą mierze, zarówno wspólnej hodowli, jak i zebranej znad KNLG pożywki na rozwój limfocytów T. Świadczyć to może o tym, że zastosowane w tych badaniach metody nie pozwalają wyróżnić swoistych oddziaływań mikrośrodowiskowych, które, jak wspomniano we wstępie, wydają się istotne w prawidłowo funkcjonującej grasicy *in vivo*. Zwracał uwagę również fakt, że wpływ ten (dodatni czyli pobudzający) był stosunkowo niewielki, a ponadto stwierdzono, że hodowle KNLG wywierają podobny wpływ na nabywanie przez prekursorów limfocytów B zdolności do odpowiedzi na swoisty dla tych limfocytów mitogen — lipopolisacharyd bakteryjny (LPS) (Harper C. M., Sharp J. G. — informacja własna). Należy również dodać, że pobudzający wpływ na rozwój limfocytów T wywierają także hodowane *in vitro* komórki śledziony, a nawet jamy otrzewnowej [4, 42]. Te dwa ostatnie przykłady sugerują, że do pobudzenia rozwoju limfocytów T (w pewnym zakresie) zdolne są komórki makrofagopodobne pochodzące spoza grasicy, a zatem trudno w tym przypadku mówić o swoistym pobudzeniu.

Przytoczone dane sugerują, że KNLG *in vitro* zdolne są jedynie do częściowego wypełniania funkcji realizowanych przez te komórki wewnątrz organizmu. Ich czynność *in vitro* być może polega na wytwarzaniu grasiczych czynników humoralnych z pominięciem oddziaływań mikrośrodowiskowych. Warto dodać, że wykazano, iż KNLG *in vitro* zdolne są do produkcji FTS (grasiczego „hormonu” otrzymywanego z surowicy krwi) [53].

Zasadniczym potwierdzeniem czynnościowej sprawności KNLG pochodzących z hodowli *in vitro* stały się wyniki prób przeszczepów tych komórek żywym organizmom. Przeszczepów takich dokonali na szczurach Willis i St. Pierre [76]. Wykazali oni, że zawiesina $5 \cdot 10^7$ KNLG z hodowli wszczepiona pod torebkę nerki zwierzętom pozbawionym grasicy tuż po narodzeniu, umożliwiała biorcom przeszczepu uzyskanie poprawy pewnych parametrów układu odpornościowego silnie zakłóconego

usunięciem grasicy. Obejmowało to podwyższenie w śledzionie i węzłach chłonnych liczby komórek dodatnio reagujących w mieszanych hodowlach limfocytów oraz komórek zdolnych do odpowiedzi na zastosowanie fitohemaglutyniny i konkanawaliny A. Nie towarzyszyło temu wytworzenie w miejscu przeszczepu struktur zbudowanych z KNLG i limfocytów.

Z kolei Jordan i wsp. [28, 30] wykazali, że hodowle KNLG myszy przeszczepione również myszom zdolne były do wytworzenia w miejscu przeszczepu struktur przypominających grasicę w wieku płodowym. Były one zbudowane z limfocytów i komórek nabłonkowych oraz cechowało je nierównomierne ułożenie tych dwóch podstawowych rodzajów komórek. Obrzeże było zbudowane głównie z limfocytów, wyraźnie dominujących ilościowo („kora”), natomiast w środku było stosunkowo więcej komórek nabłonkowych („rdzeń”). Szczególnie dobre wyniki opisywanych przeszczepów (100% przyjętych) autorzy ci uzyskali przeszczepiając komórki pochodzące z hodowli prowadzonej w warunkach sprzyjających namnażaniu się komórek nabłonkopodobnych, a niekorzystnych dla komórek makrofagopodobnych (wspomniana hodowla w 24°C).

Mannhardt i wsp. [36] przeszczepiali KNLG z hodowli myszom z genetycznie uwarunkowanym brakiem grasicy (mutacje „nude”). Wykazali oni, że obecność komórek makrofagopodobnych wydaje się jednak niezbędna dla zapewnienia powodzenia przeszczepu. Stwierdzili oni bowiem, że przeszczep KNLG z hodowli traktowanej karaginianem (carrageenan), który wybiórczo uniemożliwia wzrost makrofagów, nie dawał w efekcie wytworzenia w miejscu przeszczepu struktur zbudowanych z nabłonka penetrowanego przez limfocyty. Również nie zaobserwowano w tym przypadku znaczącego wzrostu liczby krążących we krwi limfocytów T zdolnych do pobudzenia swoistymi mitogenami.

Przeszczepów KNLG z hodowli szczurom z genetycznie uwarunkowanym brakiem grasicy dokonali Schuurman i wsp. [56]. Autorzy ci stwierdzili w okolicy przeszczepu powstawanie struktur przypominających grasicę *in situ* — z występującymi zrazikami i ciałkami Hassalla. Badania parametrów układu odpornościowego biorców wykazały, że zwierzęta te nabyły po przeszczepie zdolności do odpowiedzi na tzw. antygeny grasicozależne oraz zdolności do odrzucania przeszczepów skóry pochodzącej od zwierząt o innym genotypie.

Należy wspomnieć, że Hong i wsp. [22] wykazali, że dokonywany na myszach mutacji „nude” przeszczep dawał pozytywne wyniki, zarówno gdy KNLG pochodziły od osobników syngenicznych, jak i allogenicznych. Ponadto autorzy ci wspominali o udanych przeszczepach KNLG ludzkich podawanych królikom [21].

W tym miejscu należy zwrócić uwagę na wyniki badań Gorczyn-

skiego i wsp. [13, 14]. Stwierdzili oni, że przedgrasicze prekursorzy limfocytów T, w wyniku hodowli w obecności KNLG, nabywają zdolności do rozpoznawania jako własnych (ang. self) antygenów zgodności tkankowej, które cechowały KNLG nawet wtedy, gdy nie były one zgodne z antygenami zgodności tkankowej wyrażonymi na powierzchni tych limfocytów T. W przeciwieństwie zaś, pograsicze prekursorzy limfocytów T „nie uczyły się” od KNLG rozpoznawania antygenów zgodności tkankowej. Jest to w dużej mierze zgodne z danymi Bevana [6] oraz Zinkernagla i wsp. [79], świadczącymi, że własność rozpoznawania własnych antygenów zgodności tkankowej jest nabywana przez tymocyty od KNLG podczas przebywania tymocytów w grasicy.

HODOWLE GRASICY ZMIENIONEJ CHOROBOWO

Wykonano dotychczas niewiele badań KNLG in vitro pochodzących od osobników o zaburzonej in vivo funkcji tego narządu. U myszy NZB, cechujących się złożonymi i poważnymi defektami układu odpornościowego, Gershwin i wsp. [12] wykazali zaburzenia prawidłowego obrazu KNLG w hodowli. Polegały one na braku wzrostu komórek nabłonkopodobnych, a przeważającym wzroście komórek fibroblastoidalnych. Niestety próby wyleczenia tych zwierząt za pomocą przeszczepu komórek prawidłowych z hodowli KNLG, pochodzących od zdrowych zwierząt, nie powiodły się [41].

Badania KNLG pochodzących z hodowli in vitro grasicy myszy z genetycznie uwarunkowaną osteopetrozą stowarzyszoną z przedwczesnym zanikiem grasicy (mutacja „grey-lethal”) przeprowadzili Wiktor-Jędrzejczak i wsp. [74]. Celem badań było wykazanie, czy zanik ten może mieć pierwotną przyczynę w zaburzeniach podścieliska tego narządu. Nie stwierdzono jednakże jednoznacznie, że badany defekt ma charakter podścieliskowy. Natomiast wyniki opisywanych badań sugerują konieczność zwrócenia większej uwagi na komórki wielojądrowe w podścielisku grasicy. Mianowicie u mutantów grey-lethal wystąpiło w hodowli KNLG stosunkowo dużo komórek wielojądrowych o morfologii fibroblastoidalnej lub nabłonkopodobnej, czego nie obserwowano w hodowlach KNLG myszy kontrolnych. Należy tu wspomnieć, że podobne komórki występują również in situ i ich liczba wzrasta w okresie starzenia się grasicy [35], a ponadto podobne komórki spotykano również stosunkowo często wśród KNLG z hodowli wyprowadzonej z grasicy myszy z mutacją Steel, również cechującej się ograniczeniem ilościowym komórek tego narządu (Jędrzejczak W. W. i wsp. — dane niepublikowane). Z kolei u myszy grey-lethal w hodowli nie obserwowano wśród KNLG komórek wielojądrowych o morfologii makrofagopodobnej, które spotykano często

w hodowlach pościeliska grasicy zwierząt kontrolnych. Należy zwrócić uwagę, że za przyczynę osteopetrozy u badanych zwierząt uważa się brak osteoklastów, komórek, o których sądzi się, że powstają w wyniku łączenia się makrofagów [74].

W badaniach ludzkich KNLG w hodowli *in vitro* wykazano, że hodowle otrzymane z narządu pochodzącego od ludzi w wieku, w którym zachodzi fizjologiczna inwolucja grasicy, cechuje pojawianie się komórek tłuszczowych i względny spadek liczby komórek nabłonkowatych [25]. Hodowano również *in vitro* KNLG pochodzące od ludzi z patologią grasicy występującą np. w nowotworach tego narządu i myasthenia gravis. Badania takie były jednak nieliczne i nie pozwalają jeszcze na ich podsumowanie [43].

ROLA MAKROFAGÓW W PODŚCIELISKU GRASICY NA PODSTAWIE BADAŃ KNLG *IN VITRO*

W opisywanych poprzednio badaniach większość uwagi poświęcono komórkom nabłonkowym grasicy, mniej natomiast innym rodzajom komórek występujących w nienaruszonym narządzie. Jednakże szereg nowych danych zmusza do poświęcenia większej uwagi również nienabłonkowym KNLG. Szczególne znaczenie wydają się mieć wśród nich makrofagi. Wspomniano już, że hodowle składające się głównie z tych komórek były zdolne do pobudzania rozwoju limfocytów T [4, 42] oraz że hodowle KNLG nie zawierające makrofagopodobnych komórek nie były zdolne do zrekonstruowania podścieliska narządu *in vivo*, po przeszczepie [36]. Schulte-Wisserman i wsp. [54] wykazali ponadto, że hodowle KNLG *in vitro*, składające się głównie z komórek nabłonkowatych, cechowała własność chemotaktycznego przyciągania, w sposób wybiórczy, makrofagów i granulocytów zasadochłonnych. Z kolei Sharp i wsp. [57] oraz Jordan i wsp. [29] zwrócili uwagę na występowanie we wczesnych hodowlach (kilkudniowych) grasicy *in vitro* kompleksów pojedynczych makrofagów otoczonych wieńcem limfocytów. Obecność podobnych struktur można również stwierdzić w zawieszynie komórek powstałej po rozdrobieniu narządu [34]. Beller i Unanue [3, 4] opracowali metodę hodowli *in vitro* czystej frakcji komórek makrofagopodobnych. Współhodowane z nimi niedojrzałe tymocyty wykazywały cechy postępującego dojrzenia, np. nabycie zdolności do dodatniej reakcji w mieszanych hodowlach limfocytów [3, 4]. Na podstawie uzyskanych przez siebie wyników wymienieni autorzy sugerują kluczowe znaczenie makrofagów dla pewnych etapów dojrzenia tymocytów.

Również wyniki badań komórek fibroblastoidalnych grasicy, pochodzących z hodowli, sugeruje znaczenie tych komórek dla prawidłowego

funkcjonowania podścieliska grasicy *in situ*. Harper i Sharp (informacja własna) hodując komórki szpiku, zawierające prekursory limfocytów T, w obecności komórek fibroblastoidalnych stwierdzili, że warunki takiej mieszanej hodowli sprzyjają podziałom komórek limfoidalnych. Metodę otrzymywania czystych hodowli komórek fibroblastoidalnych należących do KNLG opracowali Ivanov-Smolensky i Friedenstein [24]. Za pomocą tej metody wykazali oni, że pożywka zebrana znad hodowli komórek fibroblastoidalnych grasicy, w przeciwieństwie do takiej pożywki zebranej znad komórek fibroblastoidalnych szpiku, pobudzała nabywanie przez komórki szpiku zawierające prekursory limfocytów T antygenu theta (badania wykonano na komórkach pobranych od gryzoni).

KLINICZNE ZASTOSOWANIA HODOWLI KNLG

Hodowle podścieliska grasicy *in vitro* wydają się stanowić bardzo dogodne źródło prawidłowych komórek narządu, mogących po przeszczepie u ludzi znosić zaburzenia układu odpornościowego, mające swą pierwotną przyczynę w nieprawidłowo funkcjonującym podścielisku grasicy. Zaletę tych komórek stanowić powinno bowiem znoszenie przyczyn zaburzenia przy jednoczesnym niepowodowaniu choroby „przeszczep przeciwko gospodarzowi” (ang. graft versus host), która często towarzyszy przeszczepom całej grasicy. Przesłanki te stały się podstawą do wszechstronnej analizy hodowli KNLG pochodzących z grasicy człowieka, a następnie do przeprowadzenia prób leczenia pacjentów cierpiących na niedobory odporności przeszczepami KNLG [7, 11, 15–17, 19–21, 23, 25, 26, 44, 45, 47, 48].

Najczęściej próby zastosowania takich przeszczepów wykonywano u chorych z ciężkim, skojarzonym niedoborem immunologicznym (ang. SCID — severe combined immunodeficiency). Hong i wsp. [20] już w 1976 r. przedstawili wyniki leczenia tą metodą. Uzyskali oni wyraźną poprawę stanu chorego cierpiącego na wspomnianą chorobę, jak też częściową normalizację wartości parametrów układu odpornościowego u tego pacjenta. Wymienieni autorzy jeszcze kilkakrotnie przedstawili wyniki leczenia tą metodą [19–21, 26, 38]. Podobne dane przedstawili również Gelfand i wsp. [11] oraz Herrod i wsp. [17]. Oprócz przypadków ciężkiego, skojarzonego niedoboru immunologicznego metodę tę zastosowano również w celu wyleczenia zespołu Wiskotta-Aldricha [23] oraz zespołu Di George’a [63].

Jednakże w części przypadków [7, 21, 38] przedstawiono następnie dane, że obserwowana normalizacja układu odpornościowego u chorych leczonych tą metodą miała charakter przejściowy. Po kilkunastu bowiem

miesiącach po przeszczepie następowało pogorszenie się stanu chorych prowadzące nawet do śmierci. Co więcej, w niektórych przypadkach ponowny przeszczep okazał się nieskuteczny [17, 38], a w około 10⁰% przypadków u biorców przeszczepów KNLG rozwinęły się B-immunoblastyczne chłoniaki [7].

LITERATURA

- [1] BACH J. F., CARNAUD C., Thymic factors, *Progr. Allergy.*, **21**: 342-408, 1976.
- [2] BACH J. F., GOLDSTEIN G., Newer concepts of thymic hormones, *Thymus*, **2**; 1-4, 1980.
- [3] BELLER D., UNANUE E. R., Thymic maturation in vitro by a secretory product from macrophages, *J. Immunol.*, **118**: 1780-1787, 1977.
- [4] BELLER D., UNANUE E. R., Thymic macrophages modulate one stage of T cell differentiation in vitro, *J. Immunol.*, **121**: 1861-1864, 1977.
- [5] BERRIDGE M. V., NARGAUD J., LOVERDE P., GOLUB E., The culture of mouse thymic reticulum cells. The effect of homologous serum on the establishment of primary cultures, *J. Immunol.*, **124**: 2738-2746, 1980.
- [6] BEVAN M., In a radiation chimera, host H-2 antigens determine immune responsiveness of donor cytotoxic cells, *Nature*, **269**: 417-418, 1977.
- [7] BORZY H. S., HONG R., HOROWITZ S. D., GILBERT E., KAUFMAN D., De MENDOCA W., OXELIUS V. A., DICTOR M., PACHMAN L. N., Fatal lymphoma after transplantation of cultured thymus in children with combined immunodeficiency disease, *N. Engl. J. Med.*, **301**: 565-568, 1979.
- [8] CLARK Jr. S. L., The thymus in mice of strain 129/J studied with the electron microscope, *Am. J. Anat.*, **112**: 1-33, 1963.
- [9] CROUSE D. A., JORDAN R. K., HOPPE L. B., The influence of xenogenic stromal cultures on the functional maturation of xenogenic stromal cultures on the functional maturation of mouse thymocytes, w: *Developmental and comparative immunology*, Solomon J. B., red., Pergamon Press, Oxford, 1981.
- [10] DARDENNE M., PAPIERNIK M., BACH J. F., STUTMAN O., Studies on thymus products. III. Epithelial origin of the serum thymic factor, *Immunology*, **27**: 299-304, 1974.
- [11] GELFAND E. W., DOSH H. M., SHORE A., The role of the thymus and thymus microenvironment in T-cell differentiation, [w] *Hematopoietic cell differentiation*, Golde D. W., Cline M. J., Metcalf D., Fox C. F., red., Academic Press, New York, San Francisco, London, str 277-293, 1978.
- [12] GERSHWIN M. E., IKEDA R. M., KRUSE W. L., WILSON F., SHIFRINE M., SPANGLER W., Age-dependent loss in New Zealand mice of morphological characteristics of thymic epithelial cells, *J. Immunol.*, **120**: 971-997, 1978.
- [13] GORCZYNSKI R. M., KHOMASURYA B., MacRAE S., MHC restriction of murine T lymphocyte reactivity analysed by growth of bone marrow cells in vitro on thymus epithelial monolayers, *Immunology*, **38**: 835-846, 1979.
- [14] GORCZYNSKI R. M., MacREA S., Differentiation of functionally active mouse T lymphocytes from functionally inactive precursors. III. Induction of T cell activities by growth of bone marrow on feeder layers prepared from mouse thymocytes, *Immunology*, **38**: 1-12, 1979.

- [15] GOUST J. M., VESOLE D. H., FUDENBERG H. H., Activation of human lymphocytes by supernatant from human thymic epithelium, *Clin. Exp. Immunol.*, **38**: 348-357, 1979.
- [16] HENSEN E. J., HOEFSSMIT E. C., Van den TWEEL J. G., Augmentation of mitogen responsiveness in human lymphocytes by a humoral factor obtained from thymic epithelial cultures, *Clin. Exp. Immunology*, **32**: 309-316, 1978.
- [17] HERROD H. G., WHEELER W. B., HANISSIAN A. S., OCHS H. D., WILLIS-CAR J., HANDORF C. R., Differentiation of lymphocyte function in vivo following transplantation of thymic epithelial monolayers, *Clin. Immunol. Immunopathol.*, **18**: 322-333, 1981.
- [18] HIROKAWA K., Mc CLURE J. E., GOLDSTEIN A. L., Age related changes in localization of thymosin in the human thymus, *Thymus*, **4**: 19-29, 1982.
- [19] HONG R., HOROWITZ S. D., BORCHERDING W., Diminished reactivity to alloantigen following transplantation of cultured thymic fragments, *Thymus*, **4**: 155-161, 1982.
- [20] HONG R., SANTOSHAM M., SCHULTE-WISSERMAN M., HOROWITZ S., HSU S. H., WINKELSTEIN J. A., Reconstitution of B and T lymphocyte function in severe combined immunodeficiency disease after transplantation with thymic epithelium, *Lancet*, **2**: 1270-1272, 1976.
- [21] HONG R., SCHULTE-WISSERMAN H., HOROWITZ S. D., Thymic transplantation for relief of immunodeficiency diseases, *Surg. Clin. N. Amer.*, **59**: 299-312, 1979.
- [22] HONG R., SCHULTE-WISSERMAN H., JARRETH-TOTH E., HOROWITZ S. D., MANNING D. D., Transplantation of cultured thymic fragments. II. Results in nude mice, *J. Exp. Med.*, **149**: 398-415, 1979.
- [23] HUTTER J. J., JONES J. F., Results of a thymic epithelial transplant in a child with Wiskott-Aldrich syndrome and central nervous system lymphoma, *Clin. Immunol. Immunopathol.*, **18**: 121-125, 1981.
- [24] IVANOV-SMOLENSKY A. A., FRIEDENSTEIN A. Y., Thymosin-like activity in the medium from thymic stromal fibroblast cultures, *Bull. Exp. Biol. Med.*, **92**: 487-489, 1981.
- [25] JONES J. F., MEYSKENS Jr F. L., NAGLE R. B., The human thymus. I. Partial characterization of nonlymphoid cells, *Thymus*, **2**: 147-163, 1980.
- [26] JONES J. F., SIEBER O. F., FULGINATI V. A., OCHS H., SCHULTE-WISSERMAN H., HONG R., Predominance of B lymphocyte function after cultured thymus therapy in severe combined immunodeficiency disease, *Clin. Immunol. Immunopathol.*, **17**: 439-450, 1980.
- [27] JORDAN R. K., CROUSE D. A., Studies on thymic microenvironment: morphologic and functional characterization of thymic nonlymphoid cells grown in tissue culture, *J. Reticuloendothel. Soc.*, **26**: 385-399, 1979.
- [28] JORDAN R. K., CROUSE D. A., Nonlymphoid cells and intrathymic T cell differentiation, [w] Development and differentiation of vertebrate lymphocytes, Horton J. D., (ed.) Elsevier North-Holland Biomedical Press, 47-61, 1980.
- [29] JORDAN R. K., CROUSE D. A., HARPER C. M., WATKINS E. B., SHARP J. G., The thymic microenvironment, [w] Experimental hematology today 1979, Baum S., Ledney G. D., (ed.), Springer-Verlag, New York, Heidelberg, Berlin, 139-153, 1979.
- [30] JORDAN R. K., CROUSE D. A., OWEN J. J. T., Studies on thymic microenvironment: nolympoid cells responsible for transferring the microenvironment, *J. Reticuloendothel. Soc.*, **26**: 373-383, 1979.

- [31] KRUISBEEK A. M., ASTALDI G. C. B., Distant effects of thymic epithelial cultures supernatants on T cell properties of mouse thymocytes separated by the use of peanut agglutynin, *J. Immunol.*, **123**: 984-991, 1979.
- [32] KRUISBEEK A. M., ASTALDI G. C. B., BLANKWATER M. J., ZIJLSTRA J., LEVERT L. A., The in vitro effect of a thymic epithelial culture supernatant on mixed lymphocyte reactivity and intracellular cAMP levels of thymocytes and on antibody production to SRBC by nu/nu spleen cells, *Cell. Immunol.*, **35**: 134-147, 1978.
- [33] KRUISBEEK A. M., KROSE T., ZIJSTRA J. J., Increase in T cell mitogen responsiveness in rat thymocytes by thymic epithelial culture supernatant, *Eur. J. Immunol.*, **7**: 375-381, 1977.
- [34] KYEWSKI B., ROUSE R. V., KAPLAN H. S., Cell-cells interactions in the mouse thymus, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **393-394**, 1982.
- [35] LOOR F., Mouse thymus reticulo-epithelial (RE) cells in vitro isolation, cultivation and preliminary characterization, *Immunology*, **37**: 157-177, 1979.
- [36] MANNHARDT W., SCHULTE-WISSERMAN H., GARDILEVE S., De LEON F., T-cell independent reconstitution of the immunoglobulin levels in nu/nu mice, *Thymus*, **4**: 209-220, 1982.
- [37] MARTINEZ C., KERSERY J., PAPERMASTER B. W., GOOD A. A., Skin homograft survival in thymectomized mice, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **109**: 1936-1943, 1962.
- [38] MILLAN J. C., SANTOSHAN M., KHANEJA S., WINKELSTEIN J. A., SCHULTE-WISSERMAN H., HOROWITZ S., HONG R., Long-term observations on a patients with severe combined immunodeficiency after transplantation with cultured thymic epithelium, *Clin. Immunol. Immunopathol.*, **17**: 382-388, 1982.
- [39] MILLER J. F. A. P., Effect of neonatal thymectomy on the immunological responsiveness of the mouse, *Proc. Roy. Soc. B.*, **156**: 415-422, 1962.
- [40] METCALF D., MOORE M. A. S., Haemopoietic cells, North-Holland Publishing Company, Amsterdam, London 1971.
- [41] MORROW W. J. W., NAYAK R. C., COOKE A., ROITT I. M., Apparent failure of thymic epithelium transplants to alter the course of autoimmune disease in NZB/W mice., *Thymus*, **4**: 315-321, 1982.
- [42] MOSIER D. E., PIERCE C. W., Functional maturation of thymic lymphocyte populations in vitro, *J. Exp. Med.*, **136**: 1484-1500, 1972.
- [43] OOSTEROM R., KATER L., The thymus in the ageing individual. II Thymic epithelial function in vitro in ageing and in thymus pathology, *Clin. Immunol. Immunopathol.*, **18**: 195-202, 1981.
- [44] OOSTEROM R., KATER L., OOSTEROM J., Effects of human thymic epithelial-conditioned medium on mitogen responsiveness of human and mouse lymphocytes, *Clin. Immunol. Immunopathol.*, **12**: 460-470, 1979.
- [45] PAHWA R. N., PAHWA S. G., GOOD R. A., T-lymphocyte differentiation in severe combined immunodeficiency: Defects of the thymus, *Clin. Immunol. Immunopathol.*, **11**: 437-444, 1978.
- [46] PAPIERNIK M., NABARRA B., Thymic reticulum in mice. I. Cellular ultrastructure in vitro and functional role, *Thymus*, **3**: 345-358, 1981.
- [47] PAPIERNIK M., NABARRA B., BACH J. F., In vitro culture of functional human thymic epithelium, *Clin. Exp. Immunol.*, **19**: 281-287, 1975.
- [48] PYKE K. W., GELFAND E. W., Morphology and functional maturation of human thymic epithelium in culture, *Nature*, **251**: 421-423, 1974.

- [49] RAEDLER A., ARNDT R., RAEDLER E., JABLONSKI D., THIELE H. G., Evidence of the presence of Thy-1 on cultured thymic epithelial cells of mice and rats, *Eur. J. Immunol.*, **8**: 728-730, 1978.
- [50] ROSAI J., LEVINE G. D., Tumours of the thymus, Armed Forces Institute of Pathology, Washington 1976.
- [51] SATO V. L., WAKSAL S. D., HERZENBERG L. A., Identification and separation of pre T-cells from nu/nu mice, differentiation by preculture with thymic reticuloepithelial cells, *Cell. Immunol.*, **24**: 173-185, 1976.
- [52] SCHMALZL F., BRAUNSTEINER H., The cytochemistry of monocytes and macrophages, *Ser. Hemat.*, **8**: 93-131, 1970.
- [53] SCHMITT D., MONIER J. C., DARDENNE M., PLEAU J. M., DESCHAUX P., BACH J. F., Cytoplasmic localization of FTS (facteur thymique serique) in thymic epithelial cells. An immunoelectromicroscopical study, *Thymus*, **2**: 177-186, 1980.
- [54] SCHULTE-WISSERMANN H., BORZY M. S., ALBRECHT R., HONG R., Functional relationship of macrophages and basophils to the thymus gland. *Scand. J. Immunol.*, **9**: 45-52, 1979.
- [55] SCHULTE-WISSERMANN H., MANNING D., HONG R., Transplantation of cultured thymic fragments. I. Morphologic and technical considerations, *Scand. J. Immunol.*, **8**: 387-395, 1978.
- [56] SCHUURMAN H. I., VOS I. G., Van de BRINK E., KATER L., Culture of thymic epithelium for transplantation purposes: morphological characterization and in vivo biological effect on thymus-dependent immunity in arthymic (nude) rats, *Clin. Immunol. Immunopathol.*, **24**: 418-431, 1982.
- [57] SHARP J. A., Adhesion of lymphocytes to large motile cells in cultures of rabbit thymus, *Nature*, **209**: 828, 1966.
- [58] SHARP J. G., BAUER T. W., HARPER C. M., The application of an in vitro culture system to study the role of the thymic microenvironment in lymphocyte differentiation, *Trans. Nebr. Acad. Sci.*, **5**: 35-44, 1978.
- [59] SHARP J. G., THOMAS D. B., Origin of the radiresistant precursor cells responsible for initial phase of thymus regeneration after X-irradiation, *J. Reticuloendothel. Soc.*, **22**: 169-179, 1977.
- [60] STEIN H., TOLKSDORF G., Development and differentiation of the T-cell and B-cell systems: a perspective, [w] Malignant lymphoproliferative diseases. Van den Tweel J. G., ed., Martinus Nijhoff Publishers, The Hague, Boston, London, 13-29, 1980.
- [61] STEIN H., TOLKSDORF G., LENNERT K., T-cell neoplasia in the perspective of normal T-cell differentiation, [w] Malignant lymphoproliferative diseases, Van den Twell J. G., ed., Martinus Nijhoff Publishers, The Hague, Boston, London, 315-329, 1980.
- [62] STUTMAN O., Intrathymic and extrathymic T-cell maturation, *Immunol. Rev.*, **42**: 138-184, 1978.
- [63] THONG Y. H., ROBERTSON E. F., RISCHBIETH H. G., SMITH G. J., BINNS G. F., CHENEY K., POLLARD A. C., Successful restoration of immunity in the Di George syndrome with fetal thymic epithelial transplant, *Arch. Dis. Child.*, **53**: 580-584, 1978.
- [64] VAKHARIA D. D., Demonstration of keratin filaments in thymic nurse cells (TNC) and alloreactivity of TNC- T-cell population, *Thymus*, **5**: 43-52, 1983.
- [65] Van FURTH R., RAEBURN J. A., Van ZWET T. L., Characteristics of human mononuclear phagocytes, *Blood*, **54**: 485-500, 1979.

- [66] Van GAUDCKER B., MULLER-HERMELINK H. K., Ontogeny and organization of the stationary non-lymphoid cells in the human thymus, *Cell Tissue Res.*, **207**: 287-306, 1980.
- [67] VETTERS J. M., MACADAM R. F., Fine structural evidence for hormone secretion by the human thymus, *J. Clin. Pathol.*, **26**: 194-197, 1973.
- [68] WAKSAL S. D., COHEN I. R., WAKSAL H. W., WEKERLE H., St PIERRE R. L., FELDMAN M., Induction of T-cell differentiation in vitro by thymus epithelial cells, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **249**: 492-498, 1975.
- [69] WATKINS E. B., SHARP J. G., Growth and of irradiated, cultured mouse thymic non-lyphoid cells, *J. Reticuloendothel. Soc.*, **26**: 209-219, 1979.
- [70] WEKERLE H., COHEN I. R., FELDMAN M., Thymus reticulum cell cultures confer T-cell properties on spleen cells from thymus deprived animals, *Eur. J. Immunol.*, **3**: 745-752, 1973.
- [71] WEKERLE H., KETELSEN U. P., Thymic nurse cells. Ia-bearing epithelium invoved in T-lymphocyte differentiation, *Nature*, **283**: 402-404, 1980.
- [72] WEKERLE H., KETELSEN U. P., ERNST M., Thymic nurse cells. Lymphoepithelial complexes in murine thymuses: morphological and serological characterization, *J. Exp. Med.*, **1951**: 925-944, 1980.
- [73] WEKERLE H., PATERSON B., KETELSEN U. P., FELDMAN M., Striated muscle fibers differentiate in monolayer cultures of adult thymus reticulum, *Nature*, **256**: 493-494, 1975.
- [74] WIKTOR-JEDRZEJCZAK W., GRZYBOWSKI J., AHMED A., KACZMAREK L., Osteopetrosis associated with premature thymic involution in grey-lethal mouse. In vitro studies of thymic microenvironment, *Clin. Exp. Immunol.*, **52**: 465-471, 1983.
- [75] WILLIS-CAR J. I., OCHS H. D., WEDGWOOD R. J., Induction of T-lymphocyte differentiation by thymic epithelial cells monolayers, *Clin. Immunol. Immunopathol.*, **10**: 315-324, 1978.
- [76] WILLIS J. I., St PIERRE R. L., Immunological reconstitution of neonatally thamectomized rats following implantation of thymic epithelial cells, *Adv. Exp. Med. Biol.*, **73**: 111-118, 1976.
- [77] WORTIS H. H., NEHLSSEN S., OWEN J. J., Abnormal development of the thymus in "nude" mouse, *J. Exp. Med.*, **134**: 681-692, 1971.
- [78] ZATZ M. M., LOW T. L. K., GOLDSTEIN A. L., Role of thymosin and other thymic hormones in T-cell differentiation, [w] *Biological responses in cancer*, Vol. 1, Mihich E. (ed.), Plenum Publishing Corporation, 219-247, 1982.
- [79] ZINKERNAGEL R. M., CALLAHAN G. N., KLEIN J., DENNERT G., Cytotoxic T cells learn specifity for self H-2 during differentiation in the thymus, *Nature*, **271**: 251-253, 1978.
- [80] ZOLLINGER L., POTWOROWSKI E. F., Thymic microenvironment; selective activities of soluble and insoluble components, *Scand. J. Immunol.*, **6**: 1369-1374, 1977.

Nadestano: 11 lipca 1983.

Przyjęto: 25 września 1983.

Adres autora: ul. Staffa 8, m. 20, 01-891 Warszawa.

K O M U N I K A T

Druga Ogólnopolska Konferencja Biologii Komórki odbędzie się w Warszawie w dniach 18-20 września 1985 r.

Program Konferencji będzie obejmował referaty plenaryjne, doniesienia plakatowe i dyskusje okrągłego stołu z wszystkich specjalności biologii komórki.

Organizatorami Konferencji są: Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego, prezydium problemu MR.II.1., i Komitet Cytobiologii PAN.

Osoby zainteresowane Konferencją proszone są o przesłanie wstępnego zgłoszenia pod adresem:

Leszek Kuźnicki
Instytut im. M. Nenckiego
02-093 Warszawa, ul. Pasteura 3

Zgłoszenie powinno zawierać:

1. Imię i nazwisko autora (autorów) plakatu,
2. Adres uczelni (placówki),
3. Tytuł (temat) plakatu.

Osoby, które prześlą wstępne zgłoszenie, otrzymają kolejne komunikaty drogą pocztową.

**Warunki prenumeraty kwartalnika
POSTĘPY BIOLOGII KOMÓRKI**

Cena prenumeraty krajowej:

rocznie 320 zł, półrocznie 160 zł

Prenumeratę na kraj przyjmuje się:

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

Instytucje i zakłady pracy zamawiają prenumeratę w miejscowych Oddziałach RSW „Prasa-Książka-Ruch”, w miejscowościach zaś, w których nie ma Oddziałów RSW — w urzędach pocztowych i u doręczycieli.

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 pocztą zwykłą jest droższa od prenumeraty krajowej o 50% dla zleceniodawców indywidualnych i o 100% dla zlecających instytucji i zakładów pracy.

Bieżące i archiwalne numery można nabyć lub zamówić ze Wzorcowni Ośrodka Rozpowszechniania Wydawnictw Naukowych PAN, Pałac Kultury i Nauki, 00-901 Warszawa oraz w księgarniach naukowych „Domu Książki”.

Subscription orders for all the magazines published in Poland available through the local press distributors or directly through the

Foreign Trade Enterprise
ARS POLONA

00-068 Warszawa, Krakowskie Przedmieście 7. Poland

Our bankers:

BANK HANDLOWY WARSZAWA S.A.

<http://rcin.org.pl>

SPIS TREŚCI

A. LESICKI, A. KASPRZYK, Regulacja metabolizmu węglowodanowego w hepatocytach przy udziale fruktozo-2,6-bisfosforanu, nowo odkrytego metabolitu	1
A. JAKUBIEC-PUKA, Zależność mięśnia prążkowanego od układu nerwowego. I. Neuron ruchowy	17
A. JAKUBIEC-PUKA, Zależność mięśnia prążkowanego od układu nerwowego. II. Wpływ unerwienia na aparat kurczliwy	45
A. WOŹNY, Plastydowy DNA	71
Z. M. RUPNIEWSKA, D. ROŻYMKOWA, Genetyczne aspekty różnicowania i odnawiania się komórek macierzystych	93
L. KACZMAREK, Komórki nielimfoidalne grasicy in vitro i ich czynnościowa rola	119