

PL ISSN 0324 - 833X

**POLSKIE
TOWARZYSTWO
ANATOMICZNE**

Postępy Biologii Komórki

TOM 13 - NR 3

1986 (279-410)

PWN WARSZAWA-WROCŁAW

<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,
Maciej KAWALEC — sekretarz

Rada Redakcyjna

Leszek CIECIURA, Antoni HORST, Aleksander KOJ, Włodzimierz KOROHODA,
Leszek KUŹNICKI, Zofia OSUCHOWSKA — przewodnicząca,
Aleksandra PRZEŁĘCKA, Stanisław ZAWISTOWSKI

Adres Redakcji

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

Państwowe Wydawnictwo Naukowe — Oddział Wrocławski

Nakład: 545+105 egz. Ark. wyd. 10. Ark. druk. 82,5. Papier druk. sat. kl. III, 80 g, 70×100. cm. Oddano do składania 30 IV 1986 r. Podpisano do druku w listopadzie 1986 r. Druk ukończono w listopadzie 1986 r. Zam. 1268/86 Cena 120 zł.

Wrocławska Drukarnia Naukowa, Wrocław, ul. Lelewela 4

WSPÓŁCZESNE KONCEPCJE ZALEŻNYCH OD IgE MECHANIZMÓW DEGRANULACJI KOMÓREK TUCZNYCH*

MECHANISMS INVOLVED IN IgE-MEDIATED MAST CELL AND BASOPHIL DEGRANULATION. PRESENT CONCEPTS

Grzegorz RYCHLIK, Krzysztof WŁODARSKI

Zakład Histologii i Embriologii Instytutu Biostruktury Akademii Medycznej w Warszawie

Streszczenie. Degranulacja komórek tucznych i bazofili zachodzi pod wpływem różnych czynników. Omówiono mechanizmy degranulacji tych komórek ze szczególnym uwzględnieniem budowy i roli receptorów dla IgE w wytwarzaniu sygnałów do degranulacji, procesów enzymatycznych związanych z aktywacją błony komórkowej oraz rolę jonów wapnia w tym procesie. Podano również przebieg regeneracji komórek tucznych oraz mechanizmy działania niektórych leków hamujących degranulację.

Summary: Degranulation of mast cells and basophils can be triggered off by a variety of agents. The mechanism of basophil/mast cell degranulation, specifically by the receptor-IgE complex formation, the enzyme alteration during mast cell membrane activation, the role of Ca^{2+} ions in mast cell secretion are discussed. In addition to that the processes of granules exocytosis and mast cell regeneration, as well as the modes of action of selected antisecretory drugs are presented.

1. WSTĘP

Komórki tuczne (mastocyty, ang. mast cells) według klasycznych definicji są komórkami tkanki łącznej, które występują szczególnie wokół małych naczyń krwionośnych i limfatycznych oraz zakończeń nerwowych. Obecnie uważa się, że komórki tuczne są heterogenną populacją, charakteryzującą się wspólnym pochodzeniem ze szpiku kostnego, podobieństwem morfologicznym, czynnościowym i obecnością receptorów dla immunoglobuliny E na powierzchni błony komórkowej. Granulocyty zasadochłonne (bazofile), będące komórkami linii mieloidalnej, wyka-

* Praca finansowana z funduszy PAN 10.5 i Programu PR-6.

zują znaczne podobieństwo morfologiczne i czynnościowe do komórek tucznych oraz również mają receptory dla przeciwciał IgE. Wydaje się więc słuszne traktowanie tych typów komórek jako jednej rodziny komórek o podobnych właściwościach [155, 236]. Charakterystyczną cechą komórek tucznych i granulocytów zasadochłonnych jest obecność w ich cytoplazmie ziarenek barwiących się metachromatycznie. Ziarenka te zawierają wiele biologicznie czynnych substancji, takich jak histamina, serotonina (u gryzoni), czynniki chemotaktyczne dla eozynofili i neutrofilii, wiele enzymów, heparynę i inne proteoglikany. Oprócz wymienionych mediatorów, pobudzone do degranulacji komórki tuczne i granulocyty zasadochłonne uwalniają prostaglandyny i leukotrieny [131]. Degranulacja komórek tucznych i bazofili towarzyszy wielu procesom immunologicznym, a uwolnione mediatory mogą regulować charakter i natężenie tych procesów [41, 128, 189, 190]. Dotychczas funkcję komórek tucznych i granulocytów zasadochłonnych wiązano głównie z ich udziałem w reakcjach nadwrażliwości typu natychmiastowego (anafilaktycznego). Obecnie wiadomo, że komórki te biorą również udział w reakcjach typu późnego (ang. delayed type hypersensitivity) [173]. W reakcjach tych liczba, dojrzałość i degranulacja komórek tucznych i bazofili mogą być regulowane czynnikami wydzielanymi przez pobudzone limfocyty T (interleukina 3, czynnik degranulujący komórki tuczne) [1, 2, 71, 187, 205, 206, 224, 228]. Szersze omówienie pochodzenia oraz heterogenności komórek tucznych i granulocytów zasadochłonnych, a także udziału tych komórek i ich mediatorów w procesach immunologicznych znajduje się w pracach poglądowych [42, 131, 155, 237].

Mechanizm degranulacji komórek tucznych, jak i granulocytów zasadochłonnych oparty jest na tych samych podstawowych procesach, a ewentualne różnice mają raczej charakter ilościowy, a nie jakościowy. Pozwala to na przedstawienie przebiegu degranulacji wspólnego dla obu typów komórek*.

2. CZYNNIKI WYWOŁUJĄCE DEGRANULACJĘ KOMÓREK TUCZNYCH

Czynniki wywołujące degranulację i uwalnianie mediatorów z komórek tucznych można podzielić następująco:

1. Czynniki fizyczne: zmiany ciśnienia osmotycznego, zamrażanie i rozmrażanie, wysoka temperatura, promieniowanie jonizujące [121].

2. Czynniki chemiczne:

(a) silne kwasy i zasady, detergenty i rozpuszczalniki organiczne [121];

(b) poliaminy — czynnik 48/80 [132], polipeptydy — polilizyna [10], polisacharydy — dekstran [11], lektyny — konkanawalina A [10], jonofory — A23187, X537A, jonomycyna [16, 61, 134], niektóre leki — polimyksyna B, morfina [121], zmiany stężenia jonów w środowisku zewnątrzkomórkowym [45];

* W dalszej części opracowania termin „komórki tuczne” będzie używany w znaczeniu „komórki tuczne i granulocyty zasadochłonne”.

(c) jad pszczoły, jad kobry, białko gronkowcowe A [60, 121, 145];

(d) mediatory synaps — acetylocholina, ATP [22, 47, 121], hormony — neurotensyna, somatostatyna, parathormon [121, 190], enzymy — chymotrypsyna, fosfolipaza A₂ [41, 121], opiaty [82].

3. Czynniki immunologiczne:

(a) immunoglobuliny klasy IgE [120, 121], podklasy IgG [120, 121], składniki dopełniacza C3a i C5a [72, 120, 121], czynniki produkowane przez limfocyty T [1, 2, 71, 187, 221, 225], czynniki uwalniane przez granulocyty [209];

(b) przeciwciała przeciwko receptorom dla IgE, anti-IgE, przeciw antygenom zgodności tkankowej H-2 i H-1, przeciwko fibronektynie powierzchniowej [54, 92, 96, 211].

Uwalnianie mediatorów procesów zapalnych z komórek tucznych może być selektywne, tzn. nie uszkadzające komórek, lub nieselektywne, tzn. niszczące komórki tuczne [121, 178]. Selektowne uwalnianie mediatorów na drodze degranulacji komórek tucznych zachodzi bez istotnej utraty cytoplazmy, jest zależne od jonów wapnia i wewnątrzkomórkowej energii, a komórki po zakończeniu degranulacji regenerują się. W przypadku nieselektywnego uwalniania mediatorów dochodzi do znacznej utraty cytoplazmy, a proces wydzielania nie jest uzależniony od jonów wapnia i energii. Nieselektywne uwalnianie mediatorów prowadzi do trwałego uszkodzenia komórki tucznej i jej obumarcia. Czynniki wymienione w punktach 1 i 2(a) powodują nieselektywne uwalnianie mediatorów, natomiast pozostałe czynniki uwalniają je selektywnie. Czynniki wymienione w punktach 2(b) i 3(b) mają znaczenie eksperymentalne, natomiast czynniki podane w punktach 2(c), 2(d) i 3(a) działają na komórki tuczne *in vivo*. Pobudzenie komórek tucznych do uwalniania mediatorów w mechanizmie selektywnym zachodzi głównie przy udziale powierzchniowych receptorów dla przeciwciał, neuromediatorów i hormonów. Receptory po związaniu odpowiedniego ligandu, tzn. cząsteczki wiążącej się z danym receptorem, przewodzą pobudzenie, aktywując wiele wewnątrzkomórkowych procesów enzymatycznych bezpośrednio odpowiedzialnych za egzocytozę ziarenek komórek tucznych i uwalnianie mediatorów [47, 57, 98, 111, 117, 166].

Dalsza dyskusja o mechanizmie degranulacji komórek tucznych będzie prowadzona w odniesieniu do pobudzenia przewodzonego przez receptory dla IgE, jednakże będą również przedyskutowane niektóre zjawiska zachodzące przy pobudzaniu do degranulacji innymi czynnikami. Pozwoli to na pełniejsze zrozumienie procesów prowadzących do uwalniania mediatorów z komórek tucznych.

Aktywność wydzielniczą komórek tucznych można podzielić na następujące etapy:

- aktywacja komórek*,
- egzocytoza ziarenek i uwalnianie mediatorów,
- regeneracja komórek.

* Proces degranulacji granulocytów zasadochłonnych trwa dłużej niż w komórkach tucznych i można dokładniej wyróżnić etap aktywacji (activation stage) egzocytozy ziarenek oraz uwalniania mediatorów (releasing stage).

3. AKTYWACJA PROCESU DEGRANULACJI KOMÓREK TUCZNYCH

W procesie aktywacji komórek tucznych można wyróżnić kilka faz:
reakcja ligand–receptor i przekazanie sygnału pobudzenia do błony i cytoplazmy komórek tucznych;

pobudzenie procesów enzymatycznych, głównie w błonie komórkowej, regulujących dostępność jonów Ca^{2+} w komórce;

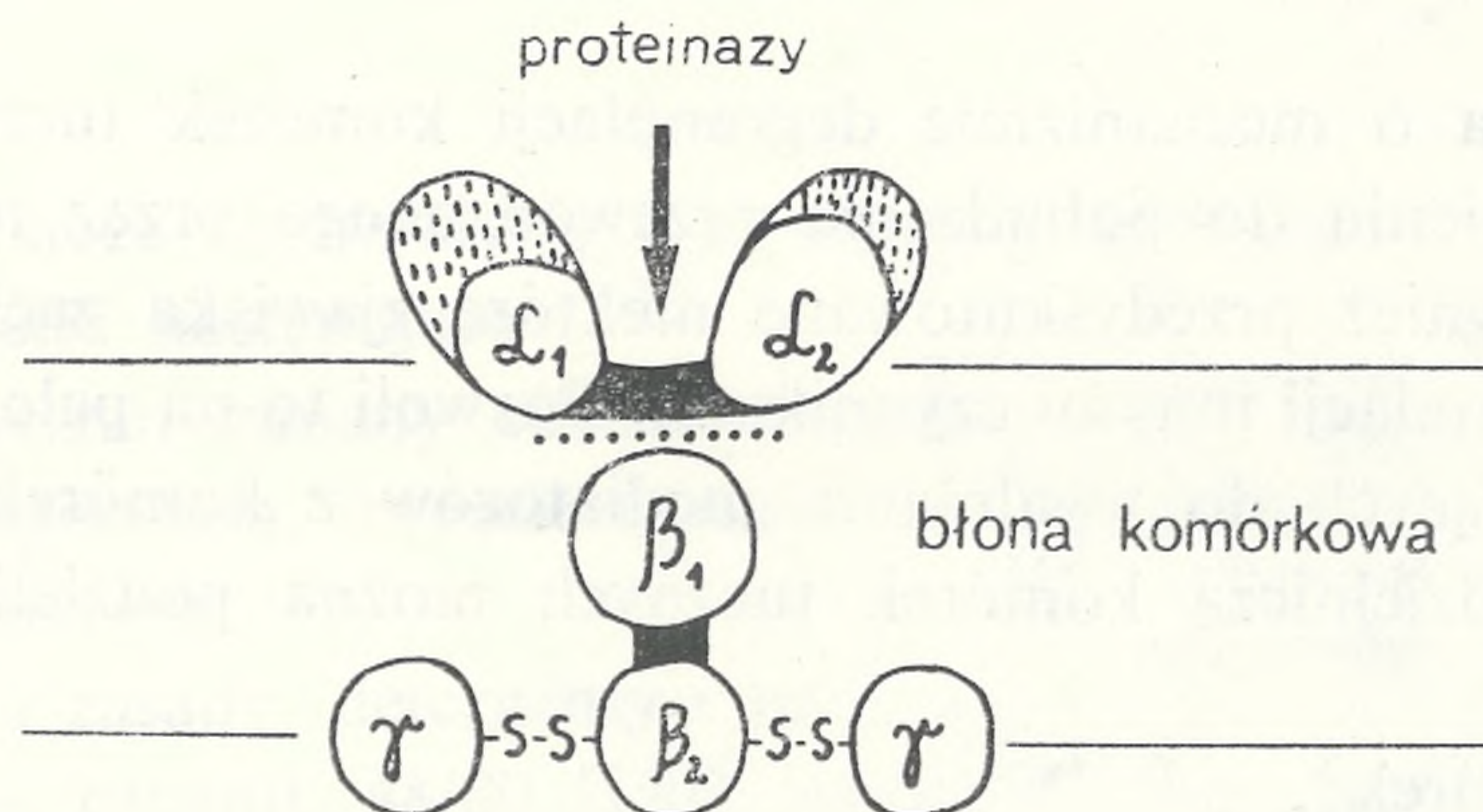
pobudzenie procesów enzymatycznych zależnych od jonów Ca^{2+} .

3.1. RECEPTORY BŁONOWE DLA PRZECIWCIAŁ IgE

Na powierzchni komórek tucznych znajdują się receptory mające zdolność wiązania przeciwciał klasy IgE poprzez ich fragment Fc [49–52, 99, 154, 156, 158]. Granulocyty zasadochłonne mają mniej takich receptorów, jednakże biorąc pod uwagę mniejszą powierzchnię tych komórek w stosunku do komórek tucznych, gęstość receptorów dla IgE w błonach komórkowych obu typów komórek jest zbliżona. Większą liczbę receptorów dla IgE wykazano na komórkach białaczkowych szczura, wywodzących się z granulocytów zasadochłonnych (Rat Basophilic Leukemia — RBL) [102, 103]. Liczba receptorów dla przeciwciał klasy IgE i liczba przeciwciał IgE związana na powierzchni komórek tucznych wykazują zależność od liczby przeciwciał IgE w środowisku zewnątrzkomórkowym [79, 120].

Na powierzchni komórek tucznych znajdują się także receptory dla przeciwciał klasy IgG [120, 199].

Receptory dla IgE mogą swobodnie dyfundować w błonie komórkowej komórki tucznej, nie wykazując w prawidłowych warunkach agregacji [154, 156, 158, 167]. Agregację receptorów dla IgE obserwuje się dopiero po związaniu przez połączone z receptorami przeciwciała klasy IgE co najmniej 2-wartościowego antygeny [96, 99, 120]. Ruchomość receptorów w błonie komórkowej jest kontrolo-



Ryc. 1. Budowa receptora komórek tucznych dla przeciwciał klasy IgE. Podjednostki α i β zawierają po dwa specyficzne składniki strukturalne (domeny) α_1 i α_2 oraz β_1 i β_2 . Domeny są połączone fragmentami białkowymi łatwo trawionymi proteazami. Obszar zakreskowany — węglowodany

wana przez układ mikrofilamentów cytoplazmy. Cytochalazyna B, która dezintegruje układ mikrofilamentów, hamuje agregację receptorów po związaniu antygeny przez przeciwciała IgE [3, 102].

Receptor komórek tucznych wiążący przeciwciała IgE jest glikoproteina o ciężarze cząsteczkowym $M_r = 80000-90000$, składającą się z podjednostek α i β oraz dwóch podjednostek γ [117, 118, 125, 127, 157, 158, 167, 184]. Podjednostki α i β połączone są w błonie komórkowej wiązaniami niekowalencyjnymi [90, 91, 158, 159]. Część hydrofobowa podjednostki α zanurzona jest w warstwie lipidowej błony komórkowej, natomiast część hydrofilowa podjednostki α , zawierająca węglowodany, znajduje się na zewnątrz (ryc. 1). Podjednostka α wiąże fragment Fc przeciwciała IgE. Podjednostka β receptora zanurzona jest w warstwie lipidowej błony komórkowej i jest dostępna wewnątrzkomórkowo [90, 117, 158]. Z podjednostką β połączone są mostkami dwusiarczkowymi dwa łańcuchy polipeptydowe określane mianem podjednostek γ [125, 157, 184].

Wykazano, że podjednostka α może występować w dwóch odmianach różniących się zdolnością wiązania obcogatunkowych przeciwciał IgE [76-78, 183, 210].

3.2. REAKCJA LIGAND-RECEPTOR I POWSTANIE SYGNAŁU DLA DEGRANULACJI

Sygnałem koniecznym do pobudzenia degranulacji komórek tucznych jest utworzenie w błonie komórkowej tzw. mostków między dwoma receptorami dla przeciwciał IgE [73, 95, 96, 101, 133, 159, 203]. Świadczy o tym uwalnianie mediatorów przez:

przeciwciała antyreceptorowe, a także przez ich dwuwalentne fragmenty $F(ab')_2$ (monowalentne fragmenty Fab' nie powodują degranulacji komórek tucznych [94]);

przeciwciała anty-IgE [17];

kowalencyjnie sprzężone dimery IgE [58, 114];

dwuwalentne antygeny (przy braku degranulacji antygenami monowalentnymi [115]);

konkanawalinę A, a przy braku efektu po jej rozbiciu na fragmenty monowalentne [205].

Nie jest to jedyna hipoteza dotycząca powstania sygnału inicjującego degranulację. Działając na zasadochłonne komórki białaczkowe (RBL) monowalentnymi haptenami znajdującymi się na powierzchni liposomów, uzyskiwano uwalnianie serotoniny z komórek RBL. W tym układzie eksperymentalnym nie dochodziło, po związaniu przez przeciwciała IgE monowalentnego haptenu, do tworzenia stabilnych mostków, ponieważ hapteny związane z fosfolipidami mogły swobodnie dyfundować w błonach liposomów [6, 7, 53]. W doświadczeniach tych nie można wykluczyć znaczenia fosfolipidów użytych do budowy liposomów i ich oddziaływania z błonami komórek RBL. Ponadto uwalnianie serotoniny nie musi być w prosty sposób skorelowane z degranulacją tych komórek [222, 223].

Do interpretacji podanych tu obserwacji założono istnienie stanu równowagi między kompleksami receptorów i receptorami monomerycznymi. Przy braku stymulacji immunologicznej liczba kompleksów receptorów w błonach komórek tucznych byłaby zbyt mała, aby doprowadzić do degranulacji, natomiast podczas reakcji przeciwciał IgE z haptenami na powierzchni liposomów dochodziłoby do zmiany szybkości przemieszczania się (dyfuzji) pojedynczych receptorów w błonie komórkowej, co sprzyjałoby powstawaniu kompleksów receptorów. Gdy liczba tych kompleksów przekroczy pewną wartość krytyczną, może dojść do pobudzenia procesu degranulacji. Agregacji receptorów towarzyszy także dysocjacja kompleksów receptorów, co uniemożliwia powstanie plamek (patching), a o powstaniu sygnału do uwalniania mediatorów decyduje chwilowy wzrost stężenia kompleksów receptorów w błonie komórkowej [6, 7, 53, 159].

Inną propozycję objaśnienia inicjacji pobudzenia komórek tucznych przedstawił Delisi, zakładając, że do powstania sygnału do degranulacji ważny jest czas trwania kompleksów receptorów [31, 56, 57]. W warunkach swobodnej dyfuzji w błonie komórkowej spotkania receptorów trwałyby zbyt krótko, aby pobudzić komórki tuczne do degranulacji, dając jedynie sygnały podprogowe. Stabilizacja receptorów, po związaniu na powierzchni komórki poliwalentnego antygeny, jest wystarczającym czynnikiem do przekroczenia czasu trwania kompleksów receptorów, wytworzenia sygnału ponadprogowego i powstania sygnału do degranulacji. Na agregację receptorów w błonie komórkowej mogą mieć wpływ następujące czynniki [56, 57]:

- liczba receptorów w błonie komórkowej;
- liczba receptorów ze związanymi przeciwciałami IgE;
- powinowactwo IgE do antygeny i walentność antygeny;
- płynność błony komórkowej.

Stanworth [207] uważa, że w wytworzeniu sygnału inicjującego degranulację mogą brać udział również same przeciwciała IgE. Zmiana konformacji cząsteczki immunoglobuliny E, po związaniu przez nią antygeny, powodowałaby odsłonięcie i zbliżenie do błony komórkowej fragmentu IgE o własnościach zasadowych i hydrofobowych. Wynikiem oddziaływania tego fragmentu IgE z błoną komórkową byłaby zmiana jej przepuszczalności i zainicjowanie procesu degranulacji. Za taką interpretacją zjawisk przebiegających na powierzchni komórek tucznych przemawia inicjowanie degranulacji przez polipeptydowe fragmenty IgE, jak i inne polipeptydy o określonych własnościach strukturalnych i biochemicznych [28, 64, 207].

Zagregowane receptory wraz z przeciwciałami i antygenem podlegają podobnym przemianom, jakie zachodzą na powierzchni innych komórek. Dochodzi do tworzenia plamek (patching) i czapeczki (capping), a następnie kompleksy receptor–przeciwciało–antygen podlegają endocytozie [92, 102, 154]. Po zainicjowaniu procesów biorących udział w degranulacji komórek tucznych dochodzi do fosforylacji receptorów dla IgE znajdujących się w błonie komórkowej, jednakże rola tego zjawiska jest jeszcze niewyjaśniona [84, 85].

3.3. PROCESY ENZYMATYCZNE W FAZIE AKTYWACJI

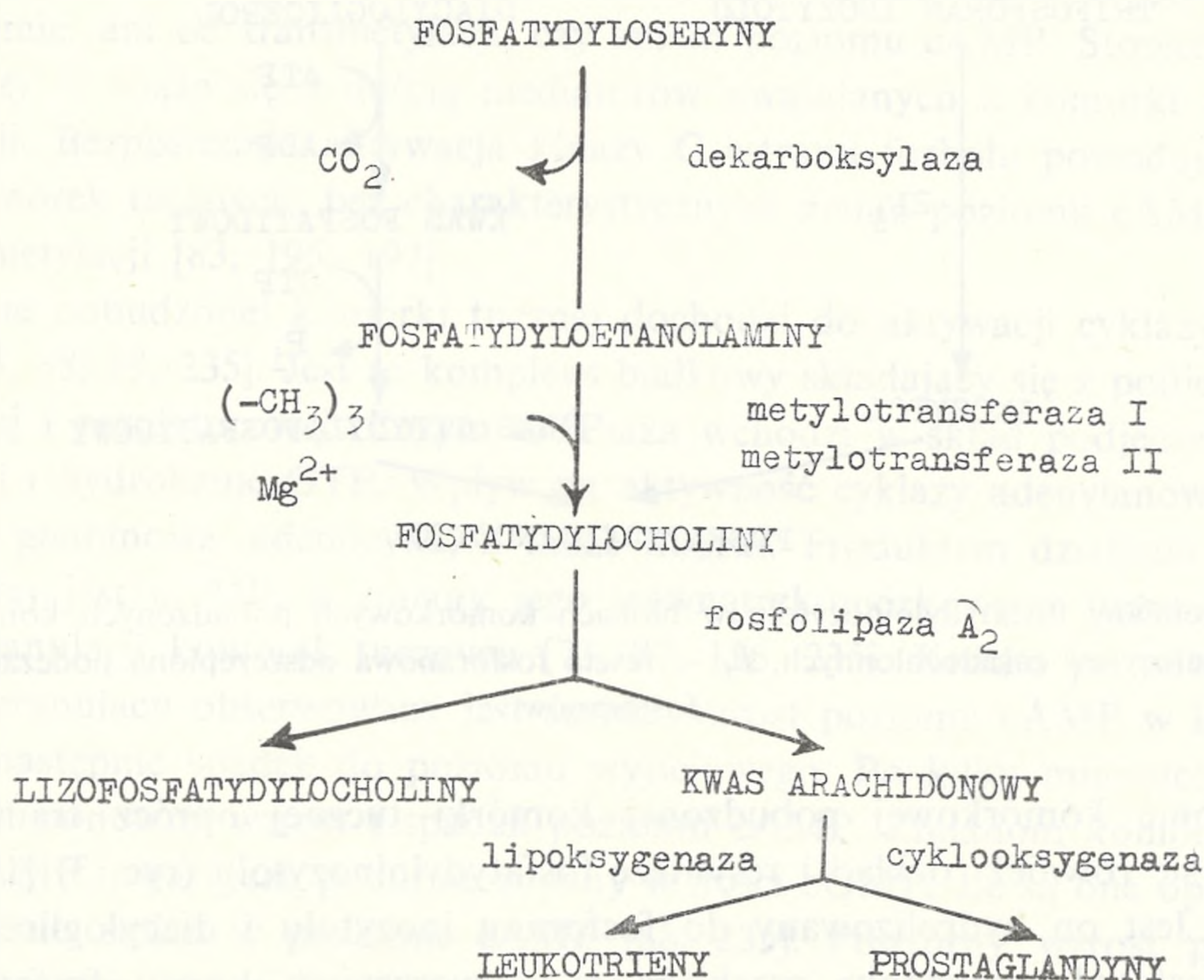
W wyniku agregacji receptorów dla IgE w błonie komórki tucznej dochodzi do aktywacji procesów enzymatycznych koniecznych do wystąpienia degranulacji. We wczesnej fazie tego procesu obserwuje się aktywację:

enzymu(-ów) proteolitycznego(-ych) [94, 98, 100, 126];

cyklazy adenylanowej i kinaz zależnych od cAMP [87–91, 235];

metabolizmu fosfolipidów błonowych i kinazy C [46, 86, 98, 100, 105, 123, 124].

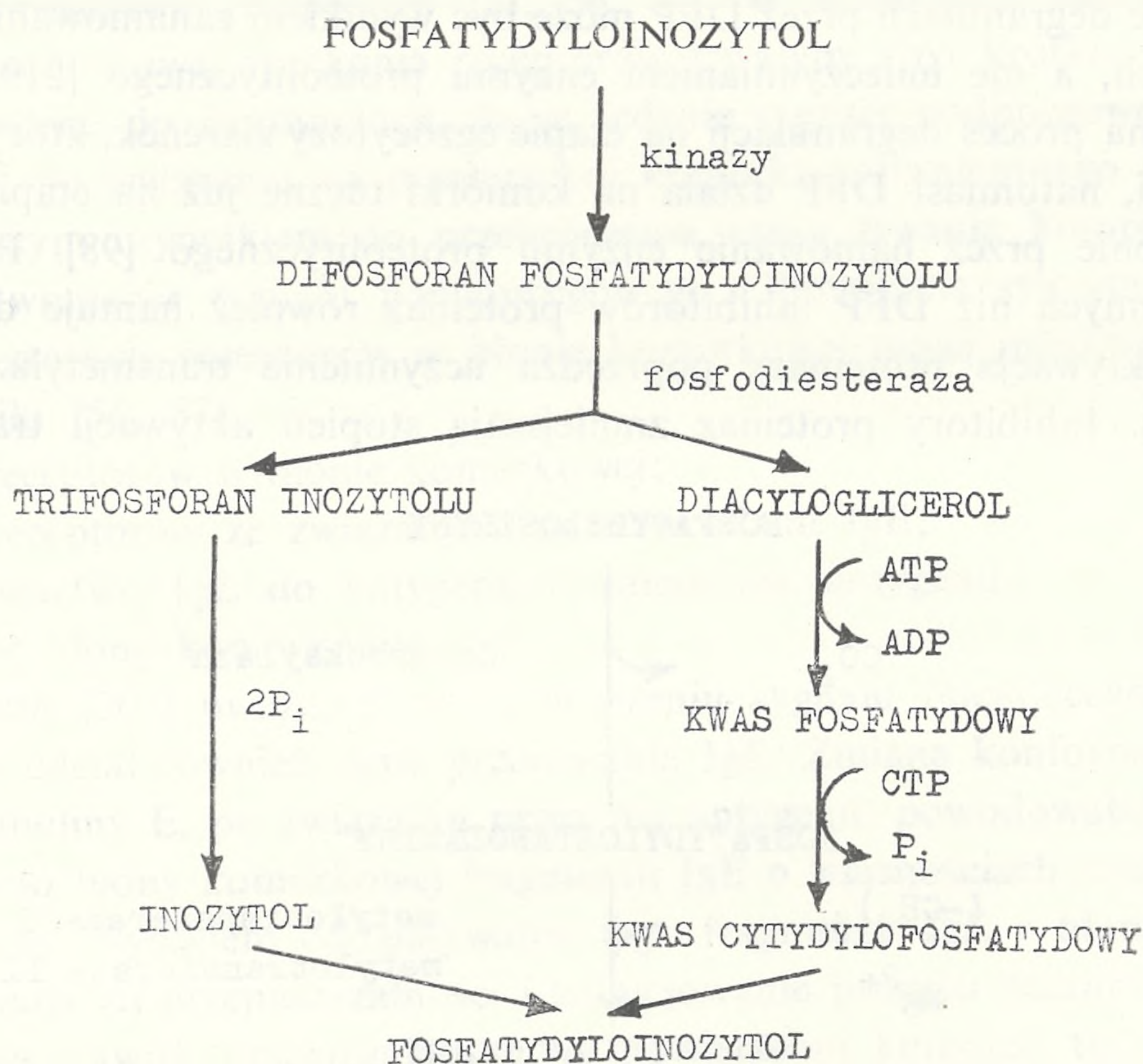
Udział i rola enzymu proteolitycznego w procesie degranulacji komórek tucznych jest nadal przedmiotem dyskusji. Wykazano, że diizopropylofluorofosforan (DFP) hamuje degranulację komórek tucznych. Ponieważ DFP jest inhibitorem esteraz serynowych, sugerowano więc udział tego enzymu, bądź proteinaz serynowych w inicjowaniu procesu degranulacji [98, 101, 104, 121, 128]. Diizopropylofosforan metylowy (DMP), pochodna DFP, która nie ma wpływu na esterazy serynowe, również hamuje degranulację komórek tucznych. Dlatego sugerowano, że hamowanie degranulacji przez DFP może być wynikiem zahamowania procesów energetycznych, a nie unieczynnianiem enzymu proteolitycznego [219]. Jednakże DMP działa na proces degranulacji na etapie egzocytozy ziarenek, który jest zależny od energii, natomiast DFP działa na komórki tuczne już na etapie aktywacji prawdopodobnie przez hamowanie enzymu proteolitycznego [98]. Ponadto zastosowanie innych niż DFP inhibitorów proteinaz również hamuje degranulację [98, 135]. Aktywacja proteinazy poprzedza uczynnienie transmetylaz i cyklazy adenylanowej. Inhibitory proteinaz zmniejszają stopień aktywacji transmetylacji



Ryc. 2. Przemiany fosfatydyloserynu (transmetylacja) w błonach komórkowych pobudzonych bazofilów i komórek tucznych

i ograniczają wzrost cAMP w komórce, stąd wydaje się, że proteinaza(y) może wpływać na te procesy [98].

W pobudzonej do degranulacji komórce tucznej obserwuje się nasilenie przemian fosfolipidów wchodzących w skład błony komórkowej. Dekarboksylaza fosfatydyloseryny poprzez dekarboksylację fosfatydyloseryn do fosfatydyloetanolamin dostarcza substratu dla układu transferaz, a te przy udziale S-adenozync-L-metioniny, jako dawcy grup metylowych, metylują fosfatydyloetanolaminy do fosfatydylocholin (ryc. 2) [80, 86, 96, 97]. Proces transmetylacji zwiększa jej płynność w błonie komórkowej. Końcowy produkt transmetylacji — fosfatydylocholina może brać udział w otwarciu kanałów wapniowych w błonie komórkowej. Ponadto wzrost płynności błony komórkowej może zwiększać kontakty białek błonowych. Fosfatydylocholina są substratem dla fosfolipazy A₂, która może uwalniać z niej kwas arachidonowy i lizofosfatydylocholinę (ryc. 2) [98, 152]. Zahamowanie transmetylacji blokuje degranulację komórek tucznych [16, 17, 162].



Ryc. 3. Przemiany fosfatydyloinozytoli w błonach komórkowych pobudzonych komórek tucznych i granulocytów zasadochłonnych. P_i — reszta fosforanowa odszczepiona podczas hydrolizy fosforanów

W błonie komórkowej pobudzonej komórki tucznej oprócz transmetylacji stwierdza się również rozkład i resyntezę fosfatydyloinozytoli (ryc. 3) [13, 14, 46, 105–107]. Jest on hydrolizowany do fosforanu inozytoli i diacyloglicerolu. Resynteza fosfatydyloinozytoli przebiega z wytworzeniem kwasu fosfatydowego, który w warunkach eksperymentalnych może spowodować degranulację komórek tucznych [180]. W regulacji przemian fosfatydyloinozytoli może brać udział białko

regulatorowe wiążące nukleotydy guaninowe. Pochodne GTP, niepodatne na hydrolizę, pobudzają przemiany fosfatydyloinozytolu i degranulację komórek tucznych. Pobudzenie zachodzi poprzez białko regulatorowe fosfodiesterazę fosfatydyloinozytolu, zwiększając rozpad fosfatydyloinozytolu. Aktywacja fosfodiesterazy fosfatydyloinozytolu nie jest zależna od wzrostu wewnątrzkomórkowego poziomu jonów Ca^{2+} [48, 81]. Uwolniona w czasie hydrolizy pochodna fosforanowa inozytolu może uwalniać jony Ca^{2+} z wewnątrzkomórkowych magazynów tego jonu, a także aktywować układ filamentów aktynowych komórki [21, 130]. Diacyloglicerol może działać [27, 124, 160, 171–173]:

- regulując przepływ jonów Ca^{2+} do wnętrza komórki poprzez wpływ na otwarcie kanałów wapniowych w błonie komórkowej lub działając jako nośnik jonoforowy dla jonów Ca^{2+} ;

- regulując aktywność kinazy C;

- wyznaczając miejsca wiązania filamentów aktynowych z błoną komórkową;
- dostarczając kwasu arachidonowego i lizofosfolipidów po zadziałaniu fosfolipazy A_2 ;

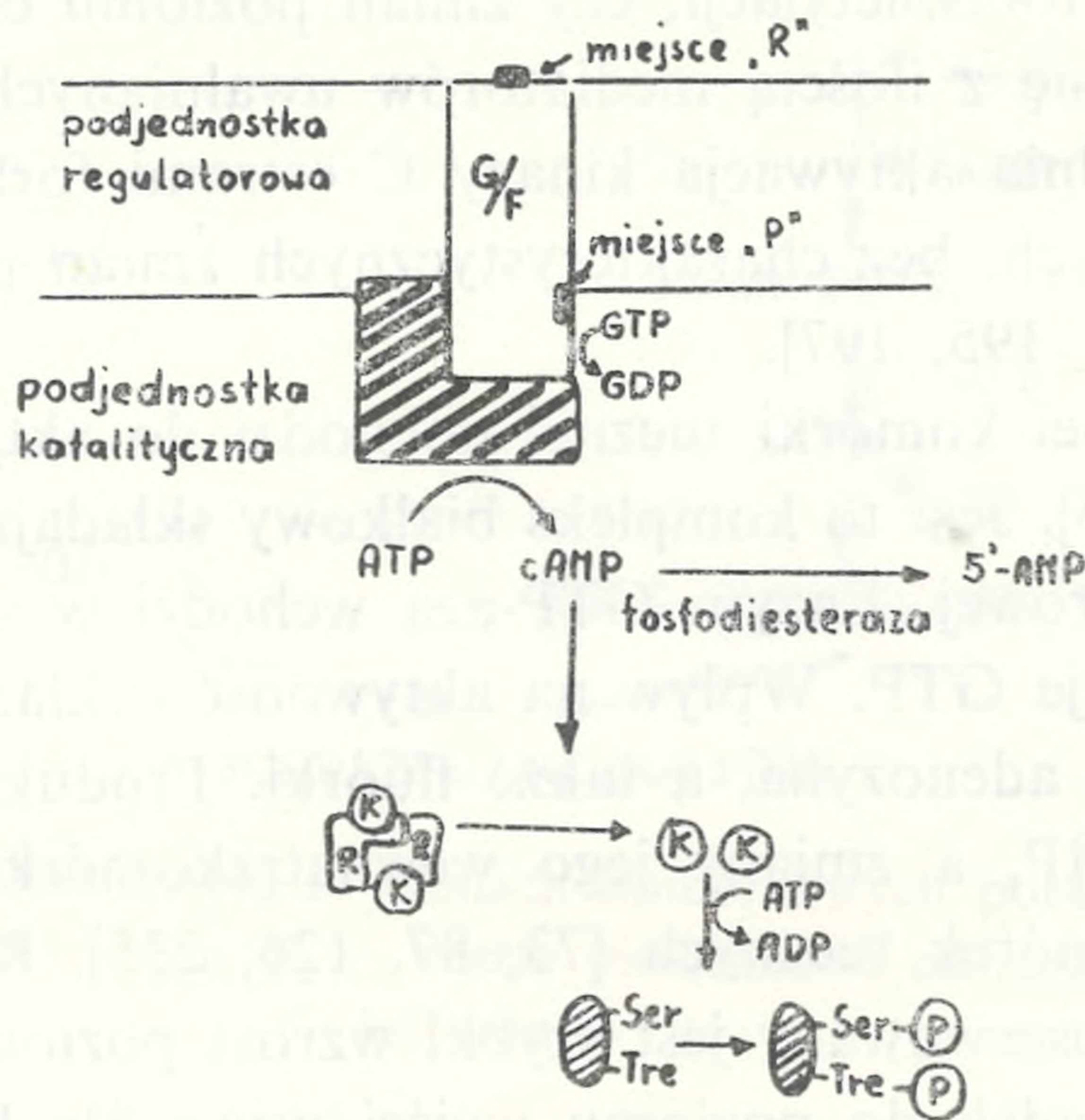
- zwiększając płynność błon.

Badania ostatnich lat wykazały istnienie specyficznej kinazy białkowej (kinazy C), zależnej od jonów wapnia, która wykazuje powinowactwo do błony komórkowej. Diacyloglicerol ułatwia wiązanie jonów Ca^{2+} przez tę kinazę, regulując tym samym jej aktywność. Na czynność tego enzymu mają również wpływ cAMP, cGMP i niektóre fosfolipidy [172]. Kinaza C jest aktywowana we wczesnej fazie procesu degranulacji. Jej aktywacja nie zależy od wzrostu stężenia jonów Ca^{2+} w cytoplazmie, ani od transmetylacji, czy zmian poziomu cAMP. Stopień aktywności kinazy C wiąże się z ilością mediatorów uwalnianych z komórki w czasie degranulacji. Bezpośrednia aktywacja kinazy C estrami forbolu powoduje degranulację komórek tucznych, bez charakterystycznych zmian poziomu cAMP i procesu transmetylacji [83, 195, 197].

W błonie pobudzonej komórki tucznej dochodzi do aktywacji cyklazy adenylanowej [73, 88, 89, 235]. Jest to kompleks białkowy składający się z podjednostek katalitycznej i regulatorowej. Enzym GTP-aza wchodzi w skład podjednostki regulatorowej i hydrolizuje GTP. Wpływ na aktywność cyklazy adenylanowej mają nukleotydy guaninowe, adenozyne, a także fluorki. Produktem działania cyklazy adenylanowej jest cAMP, a zmiany jego wewnątrzkomórkowego stężenia towarzyszą degranulacji komórek tucznych [73, 87, 126, 235]. Krótco po pobudzeniu procesu degranulacji obserwowany jest szybki wzrost poziomu cAMP w komórce tucznej, a następnie spadek do poziomu wyjściowego. Po kilku minutach obserwowany jest ponowny wzrost i spadek poziomu cAMP. Zmianom komórkowego poziomu cAMP towarzyszą podobne zmiany w ilości cGMP, ale są one opóźnione w stosunku do zmian w poziomie cAMP [88, 235]. Powtórny wzrost poziomu cAMP w komórce tucznej jest prawdopodobnie spowodowany syntezą prostaglandyn. Indometacyna, która jest inhibitorem cyklooksygenazy prostaglandynowej (ryc. 2), hamuje powtórny wzrost poziomu cAMP [235].

W komórkach eukariotycznych, po wzroście poziomu cAMP, można zaobserwować zjawiska, które są zależne od czynnika powodującego zmianę poziomu cAMP. Pobudzenie receptora β -adrenergicznego komórki tucznej, jak i zahamowanie fosfodiesterazy (enzymu rozkładającego cAMP) przez większość metylokasantyn prowadzi do wzrostu cAMP w komórce i zmniejszenia wydzielania mediatorów. Niektóre metylokasantyny i prostaglandyny powodują wzrost poziomu cAMP w komórce, jednakże nie zmniejszają wydzielania mediatorów, a nawet mogą zwiększać [5, 121, 235]. Obserwacje te sugerują specyfikę reakcji zależnych od cAMP, co jest prawdopodobnie wynikiem różnego rozmieszczenia cAMP w komórce [5, 69, 214, 235]. W komórkach eukariotycznych w stanie spoczynku cAMP jest związany z błonami śródplazmatycznymi, a zadziałanie odpowiedniego bodźca powoduje pojawienie się cAMP w cytoplazmie. Sekwestracja cAMP przez błony śródplazmatyczne i różna aktywacja cytoplazmatycznych kinaz białkowych, zależnych od cAMP, obserwowane po wzroście cAMP w komórce tucznej, potwierdzają specyficzną w reakcji na bodźce powodujące zmiany wewnątrzkomórkowego poziomu cAMP [89, 235]. Obiektami docelowymi działania cAMP są m. in. białka enzymatyczne — kinazy, które fosforylują inne białka [89, 235]. Kinazy te są tetramerami składającymi się z dwóch podjednostek regulatorowych i dwóch podjednostek katalitycznych (ryc. 4).

Kinazy białkowe zależne od cAMP występują w postaci dwóch izoenzymów oznaczanych jako typy I i II. Odmiany te różnią się podjednostkami regulatorowymi. Wydaje się, że stosunek aktywnych form izoenzymów I i II decyduje o koń-



Ryc. 4. Budowa cząsteczki cyklazy adenylnowej i aktywacja kinaz białkowych zależnych od cAMP. K — podjednostka katalityczna kinazy, R — podjednostka regulatorowa kinazy, — Ser, — Tre — aminokwasy: seryna, treonina, — Ser/Tre-P — aminokwasy ufosforylowane. Podjednostka regulatorowa cyklazy adenylnowej jest także nazywana białkiem G/F i jest enzymem GTP-azą oraz ma dwa miejsca wiążące adenozyne (R i P). R — hamuje, a P — zwiększa aktywność cyklazy adenylnowej

cowym efekcie działania cAMP na komórkę. Limfocyty T stymulowane konkanawaliną A wykazują wzrost wewnątrzkomórkowego stężenia cAMP oraz aktywację izoenzymu typu I, czemu towarzyszy proliferacja komórek. Dibutyrylo-cAMP, który nie jest rozkładany przez fosfodiesterazy, wprowadzony do komórki aktywuje obydwie typy kinaz, co powoduje zahamowanie proliferacji komórek. Wydaje się, że w komórkach tucznych istnieją podobne zależności aktywności wydzielniczej od poziomu cAMP i stosunku aktywności obydwu typów kinaz białkowych. W czasie degranulacji przeważa aktywacja izoenzymu typu I [235]. Kinazy białkowe, zależne od cAMP i cGMP, fosforylują prawdopodobnie białka regulujące przepuszczalność błony komórkowej dla jonów Ca^{2+} [81, 231].

3.4. ZALEŻNOŚĆ PROCESU DEGRANULACJI OD JONÓW WAPNIA

Aktywacja proteinazy, przemiany fosfolipidów w błonie komórkowej i aktywacja cyklazy adenylanowej poprzedzają i wydaje się, że wpływają na wzrost stężenia jonów Ca^{2+} w cytoplazmie komórki tucznej. Zaburzenie któregokolwiek z tych procesów lub ich genetyczny defekt upośledza wnikanie jonów Ca^{2+} do wnętrza komórki i uwalnianie z niej mediatorów [75, 99, 135, 147, 152, 204, 235]. Egzocytozę ziarenek komórek tucznych można wywołać bez aktywacji przemian fosfolipidów i zmian poziomu cAMP przy bezpośrednim podaniu jonów Ca^{2+} do wnętrza komórki. Efekt taki można osiągnąć przez:

wprowadzenie jonów Ca^{2+} do wnętrza komórki na drodze mikropipetowania [109];

zwiększenie przepuszczalności błony komórkowej dla jonów Ca^{2+} poprzez zastosowanie jonoforów [16, 121, 135, 161];

fuzję komórki z liposomami zawierającymi wewnątrz jony Ca^{2+} [178].

Degranulacja komórek tucznych jest zależna od obecności w środowisku zewnątrzkomórkowym jonów Ca^{2+} ; ich brak znacznie ogranicza, bądź uniemożliwia, degranulację. Wyjątek stanowi pobudzenie komórek tucznych przez czynnik 48/80, który pobudza egzocytozę ziarenek nawet przy całkowitym braku jonów Ca^{2+} w środowisku zewnątrzkomórkowym. Jednakże usunięcie wewnątrzkomórkowych zasobów tego jonu przez wiązanie go z EDTA hamuje degranulację po stymulacji czynnikiem 48/80, co potwierdza niezbędność jonów Ca^{2+} w procesie uwalniania mediatorów z komórek tucznych [33, 44, 110, 132, 176, 188, 202]. Wydaje się, że w większości przypadków degranulacja komórek tucznych przebiega przy udziale zewnątrz- i wewnątrzkomórkowych jonów Ca^{2+} , jednak mogą być one wykorzystywane w różnym stopniu [10, 110, 188, 213, 226]. Wewnątrzkomórkowe zasoby jonów wapnia, mobilizowane w procesie degranulacji, prawdopodobnie głównie są związane z błoną komórkową, a w mniejszym stopniu związane w mitochondriach i w siateczce śródplazmatycznej [14, 151, 178].

Rozważane są następujące mechanizmy wzrostu stężenia jonów Ca^{2+} w cytoplazmie komórek tucznych:

napływ jonów Ca^{2+} do wnętrza komórki w wyniku wzrostu przepuszczalności błony komórkowej lub otwarcia kanałów wapniowych;

uwalnianie jonów Ca^{2+} z wewnątrzkomórkowych zbiorników (błona komórkowa, mitochondria, siateczka śródplazmatyczna);

wzrost powinowactwa białek enzymatycznych do jonów Ca^{2+} (kinaza C).

Półokres otwarcia kanałów wapniowych (wzrostu przepuszczalności błony komórkowej dla jonów Ca^{2+}) po pobudzeniu komórki tucznej antygenem wynosi około 1–2 min. Przy stymulacji innymi czynnikami może być on dłuższy [43]. Leki blokujące kanały wapniowe hamują przepływ jonów Ca^{2+} do wnętrza komórki tucznej i jej degranulację [68, 108, 138, 213, 218]. Obecnie uważa się, że napływowi jonów Ca^{2+} do wnętrza komórki towarzyszy równoczesny wypływ jonów wapnia na zewnątrz, jak też ich sekwestracja w magazynach wewnątrzkomórkowych. O wzroście stężenia i utrzymaniu się go w cytoplazmie decyduje stan dynamicznej równowagi między napływem i wypływem jonów Ca^{2+} . W utrzymaniu takiej równowagi mogą brać udział: enzym ATP-aza zależna od jonów Ca^{2+} i Mg^{2+} oraz fosfolipidy, a także kinazy białkowe zależne od cAMP, cGMP i jonów wapnia (kalmoduliny) [178]. Wzrost stężenia jonów Ca^{2+} w cytoplazmie prowadzi do aktywacji następujących procesów enzymatycznych:

aktywacji kinaz białkowych zależnych od jonów Ca^{2+} i kalmoduliny [39, 40, 171];

zwiększenia agregacji włókien aktynowych [15];

aktywacji fosfolipazy A_2 [41].

W aktywacji procesów zależnych od jonów Ca^{2+} bierze udział białko wiążące jony Ca^{2+} —kalmodulina wchodząca w skład wielu kompleksów enzymatycznych, m. in. fosfodiesteraz rozkładających cykliczne nukleotydy oraz kinaz białkowych i fosfolipazy A_2 . Kalmodulina pełni również ważną rolę w uczynnianiu białek kurczliwych cytoplazmy [38, 39, 40, 142, 233]. Inhibitory kalmoduliny hamują proces degranulacji komórek tucznych [4, 39, 63, 212].

Po wniknięciu jonów wapnia do cytoplazmy komórek zachodzi fosforylacja kilku białek, które mogą regulować proces degranulacji. Jedno z tych białek o $M_r = 78000$ jest fosforylowane w końcowej fazie zwiększonej przepuszczalności błony komórkowej dla jonów Ca^{2+} . Białko to jest również fosforylowane przez leki z grupy kromolinów, które zapobiegają wnikaniu jonów Ca^{2+} do wnętrza komórki. Prawdopodobnie białko to bierze udział w regulacji otwarcia kanałów wapniowych [200, 201, 221, 231].

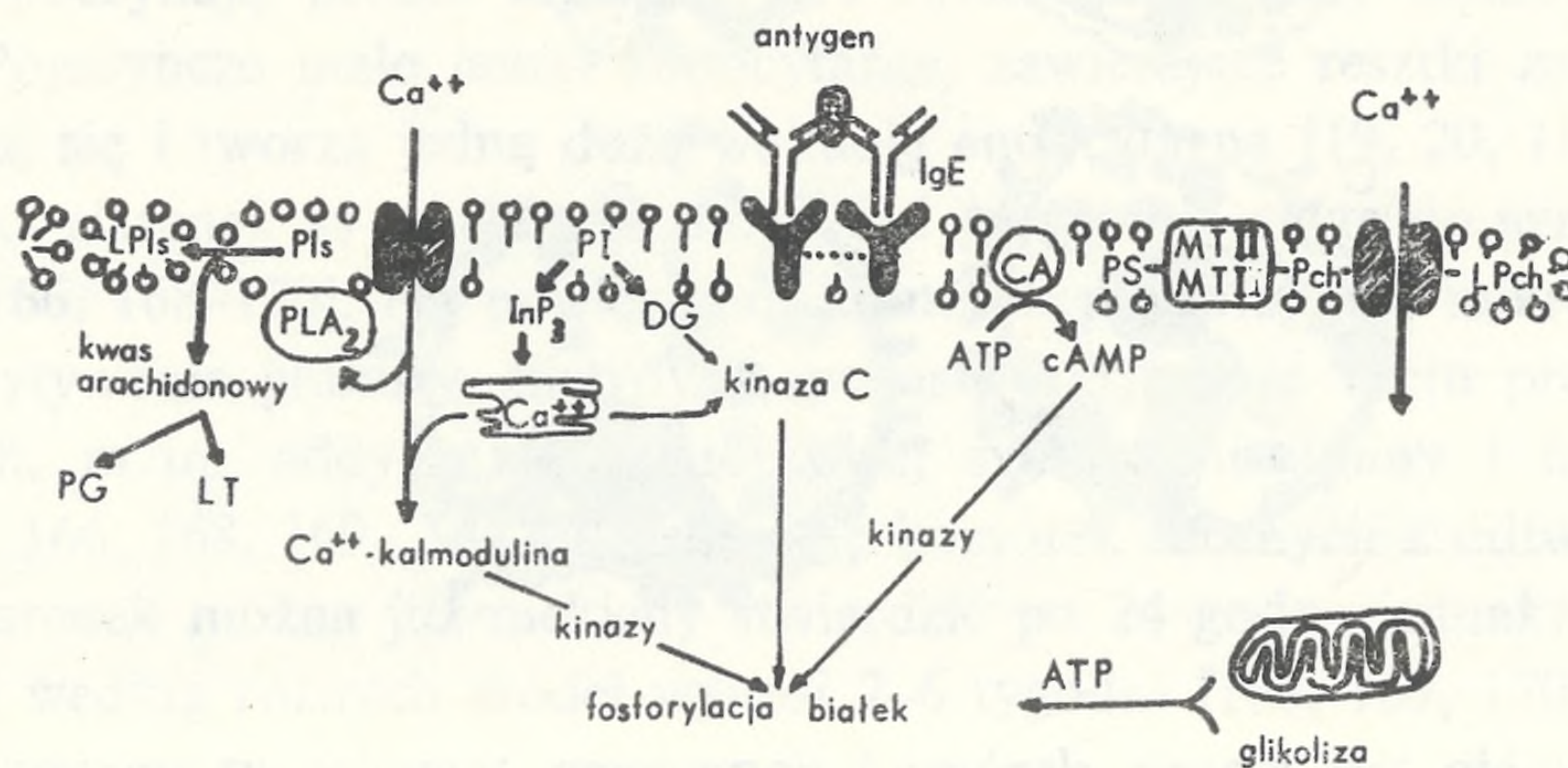
3.4.1. Fosfolipaza A_2 i przemiany kwasu arachidonowego

Dużą rolę w procesie degranulacji komórek tucznych pełni fosfolipaza A_2 , której aktywność w znacznym stopniu jest zależna od jonów wapnia [163, 164]. Enzym ten usuwa zestryfikowane kwasy tłuszczowe z pozycji 2 glicerolu fosfolipidów, dostarczając przede wszystkim kwasu arachidonowego. W wyniku działania fosfolipazy A_2 powstają również lizofosfolipidy, które zmieniają strukturę

błon z laminarnej na nieuporządkowaną, micellarną. Powoduje to wzrost przepuszczalności błon i wzrost ich zdolności do fuzji. Uważa się, że mogą one hamować przemiany fosfolipidów, które sprzyjają degranulacji i stanowią tym samym czynnik sprzężenia zwrotnego [163, 164].

Kwas arachidonowy jest metabolizowany do prostaglandyn i leukotrienów (ryc. 2). Enzym cyklooksygenaza katalizuje powstanie cyklicznych nadtlenuków kwasu arachidonowego, z których komórki tuczne syntetyzują głównie prostaglandynę D_2 , a w mniejszych ilościach prostacyklinę (PGI_2) i tromboksan (TX_2). Lipooksygenaza powoduje przekształcenie kwasu arachidonowego w pochodne, które określa się mianem leukotrienów (LTA_4 , LTB_4 , LTC_4 , LTD_4 , LTE_4) [131, 139, 164, 206, 208, 216]. Inhibitory fosfolipazy A_2 hamują przejście fosfolipidów w lizofosfolipidy i kwas arachidonowy. Zapobiega to uwalnianiu mediatorów przez komórki tuczne pobudzane do degranulacji antygenem, jak i nośnikiem jonoforowym A 23187, który wprowadza jony Ca^{2+} do wnętrza komórek z pominięciem wstępnych procesów degranulacji, tj. transmetylacji i aktywacji cyklazy adenyłowej [62, 143, 164]. Dodanie kwasu arachidonowego odwraca efekt działania inhibitorów fosfolipazy A_2 . Środki blokujące cyklooksygenazę nie hamują, a nawet wzmagają uwalnianie mediatorów z komórek tucznych, hamując produkcję prostaglandyn i zwiększając tym samym dostępność kwasu arachidonowego dla lipooksygenazy. Inhibitory lipooksygenazy hamują degranulację komórek tucznych wywołaną różnymi czynnikami, a efekt ich działania nie jest odwracany przez dodanie kwasu arachidonowego [143, 164, 165].

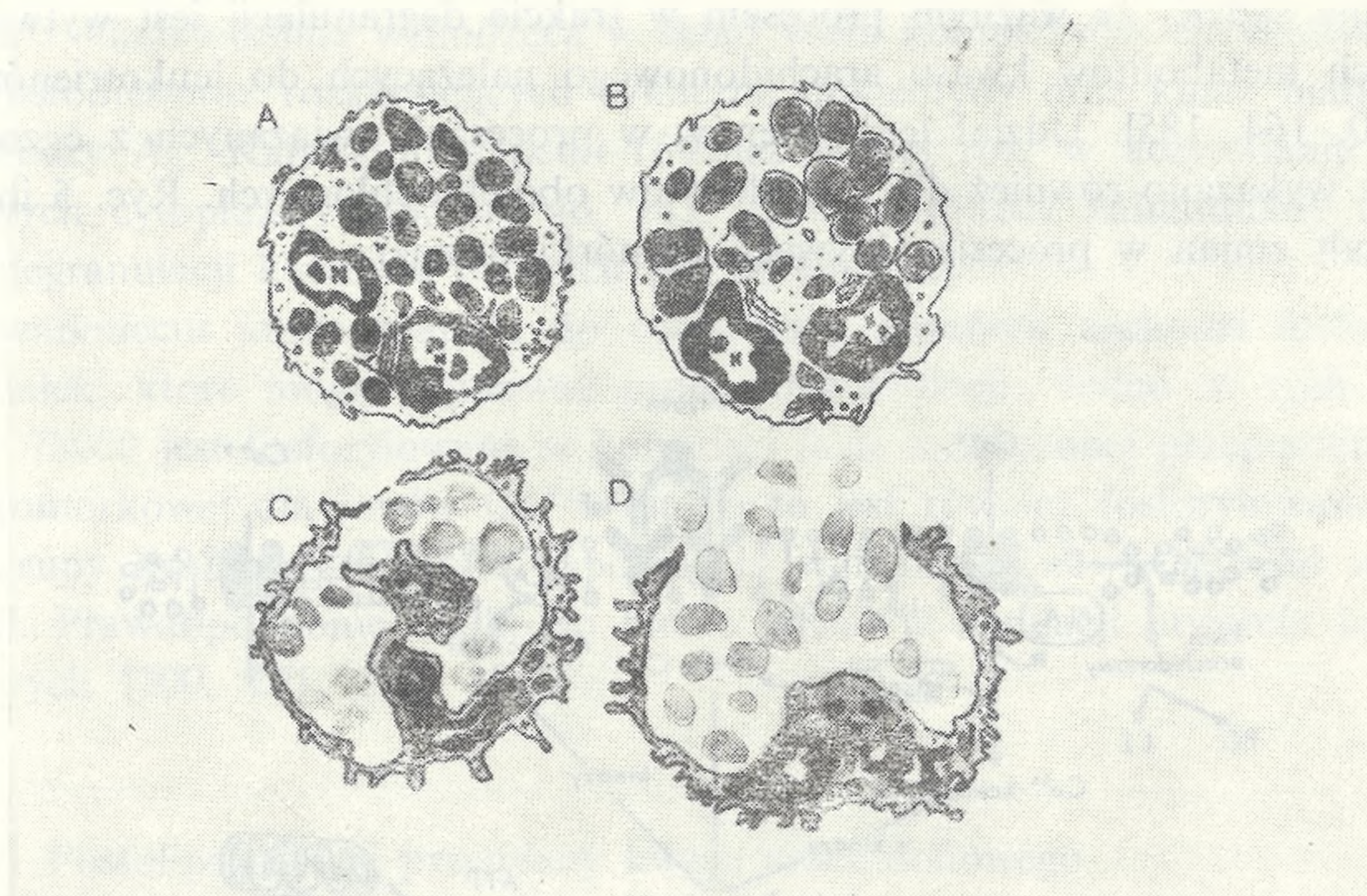
Można sądzić, że ważnym procesem w trakcie degranulacji jest wytworzenie polarnych metabolitów kwasu arachidonowego należących do leukotrienów [72, 134, 140, 164, 185]. Udział leukotrienów w procesach związanych z egzocytozą ziarenek wykazano również dla granulocytów obojętnochłonnych. Ryc. 5 ilustruje całokształt zmian w procesie aktywacji komórki tucznej.



Ryc. 5. Schemat procesów biorących udział w aktywacji komórek tucznych i bazofilów. LPIs — lizofosfolipidy, InP_3 — trifosforan inozytolu, Pls — fosfolipidy, DG — diacyloglicerol, PLA_2 — fosfolipaza A_2 , CA — cyklaza adenyłowa, MT I, MT II — metylotransferazy, PS — fosfatydyloseryna, Pch — fosfatydylocholina, LPch — lizofosfatydylocholina

4. EGZOCYTOZA ZIARENEK I UWALNIANIE MEDIATORÓW

Zmianom jakościowym i ilościowym w składzie lipidów błon komórek tucznych towarzyszy spadek potencjału elektrostatycznego błony komórkowej i wzrost jej przepuszczalności [182, 189]. Obok jonów Ca^{2+} , do wnętrza komórek napływają jony Na^+ i K^+ . Mają one większe powinowactwo do kompleksów heparynowo-białkowych, stanowiących macierz ziarenek, niż histamina obdarzona słabym ładunkiem dodatnim. W wyniku wzrostu ciśnienia osmotycznego wewnątrz ziarenek na skutek większej przepuszczalności błon i wzrostu stężenia wolnej histaminy dochodzi do napływu wody i pęcznienia ziarnistości. Temu zjawisku towarzyszy również zanik sieci krystalicznej ziarenek [19, 23, 30, 33, 35, 175]. Z okolicy, w której nastąpi fuzja ziarenek z błoną komórkową, usuwana jest większość białek. Niewielka ilość nie usuniętych z błony komórkowej białek jest określana jako „cząstki wewnątrz błonowe” (intramembrane particles). Białka te pełnią prawdopodobnie funkcje receptorowe, ułatwiając połączenie się błon ziarenek z błoną komórkową [32, 133]. Błony ziarenek przed połączeniem się z błoną komórkową mogą łączyć się między sobą i następnie ulegać egzocytozie. Taki sposób wydzielania jest szczególnie wyraźny w granulocytach zasadochłonnych, gdzie w wyniku połączenia się wielu ziarenek obserwuje się powstanie tzw. worka degranulacyjnego (ryc. 6) [19, 20, 23, 32, 65, 66, 129, 175]. Powierzchnia komórek tucznych w okresie wydzielania ziarenek wzrasta 2–3-krotnie [23]. Aparat kurczliwy komórki



Ryc. 6. Morfologiczny obraz zmian komórki tucznej/bazofila w procesie degranulacji. N — jądro komórki (dwupłatowe w bazofilach). A — komórka w stanie spoczynku, ziarenka oddzielone błoną; B — komórka pobudzona we wczesnym etapie degranulacji, pęcznienie oraz fuzja ziarenek; C — tworzenie worka degranulacyjnego, wszystkie ziarenka są przesuwane do jego wnętrza; D — końcowy etap degranulacji, otwarcie worka degranulacyjnego na zewnątrz i egzocytoza ziarenek

bierze udział w przesuwaniu ziarenek w cytoplazmie [143]. Po wzroście stężenia jonów Ca^{2+} w cytoplazmie, przy funkcjonujących procesach dostarczających energii, wokół ziarenek i pod błoną komórkową obserwuje się nagromadzenie mikrofilamentów aktynowych [30, 143, 191]. Przy braku ATP proces ten nie zachodzi. Działanie na komórki tuczne cytochalazyną B, która niszczy mikrofilamenty, hamuje degranulację. Podobny efekt można uzyskać po zastosowaniu kolchicyny, która dezintegruje mikrotubule. Natomiast ciężka woda (D_2O) sprzyja agregacji mikrotubul i ułatwia degranulację komórek tucznych [3, 12, 18, 135]. Jeżeli wcześniejsze etapy pobudzenia komórek tucznych zachodzą bez znacznego zużycia energii, to egzocytoza ziarenek uzależniona jest od energii [59, 75]. Zahamowanie oksydatywnej fosforylacji blokuje degranulację komórek po stymulacji różnymi czynnikami. Jedynie czynnik 48/80 może spowodować uwalnianie mediatorów, wykorzystując energię uzyskiwaną z glikolizy. Zahamowanie glikolizy przez 2-dezoksyglukozę całkowicie zapobiega degranulacji komórek tucznych, wywołanej tym czynnikiem po zahamowaniu fosforylacji oksydatywnej [18, 73, 110, 111, 135]. Procesowi egzocytozy ziarenek towarzyszy spadek poziomu ATP w cytoplazmie [109, 111, 112].

Na powierzchni błony komórkowej, jak i na powierzchni błon ziarenek komórek tucznych stwierdzono obecność enzymu ATP-azy, która może regulować przepływ jonów przez błonę komórkową. Może również dostarczać energii koniecznej dla ruchu i fuzji ziarenek z błoną komórkową [9, 33, 34, 37].

5. REGENERACJA KOMÓREK TUCZNYCH

Wkrótce po uwolnieniu mediatorów zgromadzonych w ziarenkach komórki tuczne rozpoczynają proces regeneracji. Powierzchnia błony komórkowej ulega redukcji. Pojedyncze małe jamki endocytarne, zawierające resztki zawartości ziarenek, łączą się i tworzą jedną dużą wakuolę endocytarną [19, 20, 166, 168, 169]. Pozostałości ziarenek są trawione i mogą być powtórnie użyte do syntezy nowych ziarenek [166, 168–170]. Na powierzchni komórek pojawiają się mikrofałdy, wzrasta wychwytywanie glukozy, histydyny, wzrasta aktywność wielu procesów enzymatycznych, m. in. oddychanie komórkowe, synteza histaminy i heparyny [29, 36, 65, 66, 166, 168, 169, 230]. Regenerację komórek tucznych z odtworzeniem typowych ziarenek można już niekiedy stwierdzić po 24 godz., jednakże czas pełnej regeneracji według różnych źródeł wynosi 2–6 tygodni [168, 169, 170, 230].

Przedstawiony tu schemat regeneracji komórek oparty jest głównie na wynikach uzyskanych w badaniach na mastocytach. Wobec znacznie krótszego okresu życia bazofili w porównaniu do komórek tucznych, trudno jest ustosunkować się do procesów regeneracyjnych przebiegających w granulocytach zasadochłonnych [155].

6. UWAGI KOŃCOWE O DEGRANULACJI KOMÓREK TUCZNYCH I GRANULOCYTÓW ZASADOCHŁONNYCH

Przedstawiony przebieg degranulacji komórek tucznych jest schematem uwzględniającym najczęściej spotykane zjawiska. Należy jednak pamiętać, że mogą istnieć rozbieżności w mechanizmie degranulacji, wynikające z różnic międzygatkowych i występowania subpopulacji komórek tucznych i bazofili. Różnice te mogą dotyczyć zmian w poziomie cAMP w fazie aktywacji, czasu trwania poszczególnych zjawisk oraz różnej reaktywności na czynniki pobudzające uwalnianie mediatorów [8, 60, 67, 136, 144, 179].

Coraz częściej zwraca się uwagę na możliwość uwalniania substancji zmagazynowanych w ziarenkach bez ich egzocytozy całych ziarenek. Wydaje się, że histamina czy serotonina mogą być transportowane na zewnątrz w małych pęcherzykach [65, 222, 223]. Możliwe, że taki sposób wydzielania towarzyszy również pełnej egzocytozie ziarnistości. Jest on szczególnie wyraźny przy pobudzeniu komórek do degranulacji przez czynniki uwalniane z limfocytów T.

Pobudzanie komórek tucznych przez składniki dopełniacza również wykazuje pewną odrębność. Degranulacja pod wpływem C3a i C5a przebiega na ogół szybciej, nie obserwuje się początkowego szybkiego wzrostu cAMP w komórce, a także degranulacja wykazuje cechy nioselektywności, gdyż dochodzi do utraty części cytoplazmy. Pozostałe procesy, tj. wnikanie jonów Ca^{2+} do wnętrza komórki i przemiany fosfolipidów w błonach śródplazmatycznych przebiegają podobnie jak na przedstawionym tu schemacie [121, 186].

Zainteresowanie może budzić degranulacja komórek tucznych pod wpływem czynnika wydzielanego przez limfocyty T, gdyż jest to punkt łączący funkcję komórek tucznych z reakcjami nadwrażliwości typu późnego. Jednak, jak dotąd, brak jest dokładniejszych danych dotyczących uwalniania mediatorów z komórek tucznych pod wpływem tego czynnika.

7. MECHANIZMY DZIAŁANIA LEKÓW NA PROCES DEGRANULACJI

Znanych jest wiele czynników wpływających na proces degranulacji komórek tucznych (tabela). Praktycznie można wyróżnić dwa główne kierunki działania tych czynników:

- na wewnątrzkomórkowy poziom cAMP i cGMP;
- na błony i procesy błonowe komórek tucznych.

Wzrost poziomu cAMP w komórce w większości przypadków hamuje uwalnianie mediatorów. Metyloksantyny hamują fosfodiesterazę i podnoszą poziom cAMP, a także współzawodniczą z adenozyzną o miejsce R na cyklicznej adenylowej (ryc. 4), czego wynikiem jest wzrost produkcji cAMP [215]. Katecholaminy działając

Tabela. Mechanizmy działania różnych czynników na procesy degranulacji komórek tucznych i granulocytów zasadochłonnych

Czynnik	Wpływ na degranulację	Mechanizm działania
adrenalina, izoproterenol, fenoterol	(-)	pobudzenie receptora β -adrenergicznego, cyklazy adenylationowej i \uparrow cAMP, transmetylacja (?)
histamina	(-)	pobudzenie cyklazy adenylationowej poprzez receptor H_2 i \uparrow cAMP, transmetylacja (?)
3-deza-SIBA	(-)	zahamowanie transmetylacji
werapamil, nifedypina, kromoliny	(-)	blokowanie kanału wapniowego
fenotiazyny, W-13,	(-)	hamowanie kalmoduliny
mepakryna, bromek p-bromofoenacylu	(-)	hamowanie fosfolipazy A_2
ETA, ETYA	(-)	hamowanie lipoksygenazy
cytochalazyna B, kolchicina	(-)	uszkodzenie układu włókien kurczliwych
oligomycyna, aktynomycyna	(-)	hamowanie fosforylacji oksydacyjnej
metyloksantyny	(-), 0, (+)	hamowanie fosfodiesterazy, \uparrow cAMP, współzawodnictwo z adenozyzną
noradrenalina (α), acetylocholina, $PGF_{2\alpha}$	(+)	pobudzanie cyklazy guanylationowej \uparrow cGMP
indometacyna	0, (+)	hamowanie cykloksygenazy
ciężka woda (D_2O)	(+)	wzmaga agregację mikrotubul

(-) hamowanie degranulacji, (+) ułatwianie degranulacji, 0 brak wpływu.

na receptor β -adrenergiczny, histamina działając na receptor H_2 oraz niektóre prostaglandyny podnoszą poziom cAMP i hamują degranulację komórek tucznych [12, 24-26, 69, 70, 113, 116, 135, 136, 141, 146, 177, 227]. Blokery receptora β -adrenergicznego oraz receptora histaminowego H_2 zwiększają uwalnianie mediatorów [116, 229, 232]. Histamina, oprócz podnoszenia poziomu cAMP, aktywuje procesy transmetylacji, jednakże rola tego zjawiska nie jest jeszcze znana [225]. Wydaje się, że czynniki zwiększające poziom cGMP w komórce tucznej sprzyjają degranulacji. Poziom cGMP zwiększają katecholaminy działając na receptor α -adrenergiczny, acetylocholina działając na receptor muskarynowy oraz prostaglandyny $F_{2\alpha}$.

Leki z grupy kromolinów (Intal) zapobiegają degranulacji komórek tucznych przy zetknięciu się z antygenem, jednak tylko wtedy, gdy były zastosowane przed ekspozycją na alergen. W wyjaśnieniu mechanizmu działania tych leków brano pod uwagę:

utrudnianie wiązania przeciwciał IgE przez receptory na powierzchni komórek tucznych [174];

hamowanie fosfodiesterazy i wzrost cAMP w komórce [174, 177];

stabilizację błony komórkowej i zmniejszenie jej przepuszczalności dla jonów Ca^{2+} [74, 150, 177, 181, 182, 218, 220, 234].

Obecnie wiadomo, że na powierzchni komórek tucznych znajdują się białka wiążące kromoliny. Białka te są równocześnie związane z regulacją przepływu

jonów Ca^{2+} przez błonę komórkową. Brak takiego białka u pewnych subpopulacji komórek RBL uniemożliwia ich degranulację po kontakcie z alergenem. Jednakże działanie na te komórki nośnikiem jonoforowym A 23187 w obecności jonów Ca^{2+} pobudza je do degranulacji [149, 151, 182]. Przeszczepienie wyizolowanych białek wiążących kromoliny komórkom RBL, które ich nie posiadają, przywraca im zdolność do degranulacji po kontakcie z alergenem [182]. Wykazano również, że pod wpływem kromolinów w komórkach tucznych dochodzi do fosforylacji białka o $M_r = 78000$, które reguluje przepuszczalność błony komórkowej dla jonów Ca^{2+} . W fosforylacji tego białka mogą brać udział kinazy zależne od cGMP [72, 140]. Efekt działania kromolinów jest w pełni odwracalny przez zastosowanie nośnika jonoforowego A 23187 [200, 201, 221, 231].

Sterydy, które są znanymi lekami przeciwalergicznymi, hamują uwalnianie mediatorów z komórek tucznych przez stabilizowanie błon, hamowanie fosfolipazy A_2 i przemian fosfolipidów. Działanie sterydów powoduje spadek przepuszczalności błony komórkowej dla jonów Ca^{2+} [55, 70, 196, 198].

LITERATURA

- [1] ALAM R., ROŻNIECKI J., SELMAJ K., A mononuclear cell-derived histamine releasing factor (HRF) in asthmatic patients. Histamine release from basophils in vitro., *Ann. Allergy*, **53**: 66–69, 1984.
- [2] ALAM R., ROŻNIECKI J., A mononuclear cell-derived histamine releasing factor (HRF) in asthmatic patients. II. Activity in vivo. *Allergy*, **40**: 124–129, 1985.
- [3] ALLISON A. C., DAVIES P., Interactions of membranes, microfilaments, and microtubuls in endocytosis and exocytosis, *Adv. Cytopharmacol.*, **2**: 237–247, 1974.
- [4] ALM P. E., Cyclic AMP levels during stimulation and inhibition of histamine release from rat mast cells by the calmodulin inhibitor-trifluoperazine, *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.*, **71**: 103–111, 1983.
- [5] ALM P. E., BLOOM G. P., Cyclic nucleotide involvement in histamine release from mast cells—a reevaluation, *Life Sci.*, **30**: 213–218, 1982.
- [6] BALAKRISHNAN K., MEHDI S. C., McCONNEL H. M., Availability of dinitrophenylated lipid haptens for antibody binding depends on the physical properties of host bilayer membranes, *J. Biol. Chem.*, **257**: 6434–639, 1982.
- [7] BALAKRISHNAN K., HSU F. J., COOPER A. D., McCONNEL H. M., Lipid hapten containing targets can trigger specific immunoglobulin E-dependent degranulation of RBL cells., *J. Biol. Chem.*, **257**: 6427–6433, 1982.
- [8] BARRET K. E., PEARCE F. L., A comparison of histamine secretion from isolated peritoneal mast cells of mouse and rat., *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.*, **72**: 234–238, 1983.
- [9] BATCHELOR K. W., COOPER P. H., STANWORTH D. R., The possible role of membrane located adenosine triphosphatase in mast cell triggering, *The Mast Cell.*, ed. Pepys J., Pittman Press, 47–72, 1979.
- [10] BAXTER J. H., ADAMIK R. A., Differences in requirements and actions of various histamine-releasing agents, *Biochem. Pharmacol.*, **27**: 497–503, 1978.
- [11] — Effects of calcium and phosphatidylserine in rat mast cell reaction to dextran., *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, **152**: 266–271, 1976.

- [12] BEAVEN M. A., Histamine, *N. Engl. J. Med.*, **294**: 30-36, 1976.
- [13] BEAVEN M. A., MOORE J. P., SMITH G. A., HESKATH T. R., METCALF J. C., The calcium signal and phosphatidylinositol breakdown in 2H3 cells. *J. Biol. Chem.*, **259**: 7129-7136, 1984.
- [14] BEAVEN M. A., ROGERS J. MOORE J. P., HESKATH T. R., METCALFE J. C., The mechanism of calcium signal and correlation with histamine release in 2H3 cells, *J. Biol. Chem.*, **259**: 7129-7139, 1984.
- [15] BEHRENDT H., ROSENKRANZ U., SCHMUTZLER W., Ultrastructure of isolated mast cells during histamine release induced by ionophore A 23187, *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.*, **56**: 188-192, 1980.
- [16] BENNET J., COCKROFT S., GOMPERS B. D., Ionomycin stimulates mast cell histamine secretion by forming lipid-soluble calcium complexes, *Nature*, **282**: 851-853, 1979.
- [17] BENYON R. C., CHURCH M. K., HOLGATE S. T., The effect of methyltransferase inhibitors on histamine release from human dispersed lung mast cells activated with anti-human IgE antibodies and calcium ionophore A 23187, *Biochem. Pharmacol.*, **33**: 2881-2886, 1984.
- [18] BERGSTRØM-PORTER B., SHELTON E., Effect of uncouplers of oxidative phosphorylation on microtubule location and surface structure of mouse mast cells, *Anat. Res.*, **195**: 375-386, 1979.
- [19] BERLIN G., The dynamics of mast cell secretion mediated by IgE or poliamines, *Agents Actions*, **15**: 482-487, 1984.
- [20] BERLIN G., ENERBACK L., Mast cell secretion. Rapid sealing of exocytotic cavities demonstrated by cytophluorometry, *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.*, **73**: 256-262, 1984.
- [21] BERRIDGE M. J., Inositol triphosphate and diacylglycerol as second messengers, *Biochem. J.*, **220**: 345-360, 1984.
- [22] BLANDINA P., FANTOZZI R., MUNAIONI P. F., MASINI E., Characteristics of histamine release evoked by acetylcholine in isolated rat mast cells, *J. Physiol.*, **301**: 291-293, 1980.
- [23] BLOOM G. P., FREDHOLM B., HAEGEMARK O., Studies on the time course of histamine release and morphological changes induced by histamine liberators in rat peritoneal mast cells, *Acta Physiol. Scand.*, **71**: 270-281, 1967.
- [24] BOURNE H. R., LICHTENSTEIN L. M., MELMON K. L., Pharmacologic control of allergic histamine release in vitro: evidence for an inhibitory role of 3', 5'-adenosine monophosphate in human leukocytes, *J. Immunol.*, **108**: 695-705, 1974.
- [25] BOURNE H. R., LICHTENSTEIN L. M., MELMON K. L., HENNEY C. S., WEINSTEIN M., SHEARER G. M., Modulation of inflammation and immunity by cyclic AMP, *Science*, **184**: 19-28, 1974.
- [26] BOURNE H. R., MELMON K. L., LICHTENSTEIN L. M., Histamine augments leukocyte adenosine 3',5'-monophosphate and blocks antigenic histamine release, *Science*, **173**: 743-745, 1971.
- [27] BURN P., ROTMAN A., MEYER R. K., BURGER M. H., Diacylglycerol in large alpha-actinin/actin complexes and in the cytoskeleton of activated platelets, *Nature*, **314**: 469-472, 1985.
- [28] BURT D. S., STANWORTH D. R., Changes in cellular level of cyclic AMP in rat mast cells during secretion of histamine induced by immunoglobulin E decapeptide and ACTH (1-24) peptide, *Biochem. Biophys. Acta*, **762**: 458-465, 1983.
- [29] BURVEN S. J., SATUR B. H., Plasma membrane folds on the mast cell surface and their relationship to secretory activity, *J. Cell Biol.*, **74**: 690-697, 1977.
- [30] CAULFIELD J., LEWIS R. A., HEIN A., AUSTEN K. F., Secretion in dissociated human pulmonary mast cells. Evidence for solubilization of granule contents before discharge, *J. Cell Biol.*, **89**: 299-312, 1980.

- [31] CHABEY R., DELISI C., HOOK W. A., SIRAGANIAN R. P., Receptor cross-linking and histamine release in basophils, *J. Biol. Chem.*, **255**: 4628–4635, 1980.
- [32] CHANDLER D. E., HAUSER J. A., Arrest of membrane fusion events in mast cells by quick-freezing, *J. Cell Biol.*, **86**: 666–674, 1980.
- [33] CHARKRAVARTY N., The metabolism of mast cells and biochemical changes associated with histamine release, *The Mast Cell.*, ed. Pepys J., Pittman Press, 1979.
- [34] — The role of plasma membrane Ca^{2+} , Mg^{2+} -activated adenosine triphosphatase of rat mast cells in histamine release. *Acta Pharmacol. Toxicol.*, **47**: 223–235, 1980.
- [35] — Regeneration of rat mast cells after histamine secretion: changes in histidine decarboxylase activity and heparin synthesis., *Acta Pharmacol Toxicol*, **52**: 281–286, 1983.
- [36] — Histamine release from mast cell granules, *Agents Actions*, **13**: 126–129, 1983.
- [37] CHARKRAVARTY N., ECHETEBU Z., Plasma membrane triphosphatase in rat peritoneal mast cells and macrophages—the relation of the mast cell membrane enzyme to histamine release, *Biochem. Pharmacol.*, **27**, 1561–1569, 1979.
- [38] CHARKRAVARTY N., NIELSEN E. H., Calmodulin in mast cells and its role in histamine secretion. *Agents Actions*, **16**: 122–125, 1985.
- [39] CHEUNG W. Y., Calmodulin plays a pivotal role in cellular regulation, *Science*, **207**: 19–27, 1980.
- [40] CHEUNG W. Y., Calmodulin: an overview, *Fed. Proc.*, **41**: 2253–2257, 1982.
- [41] CHI E. Y., HENDERSON W. R., KLEBANOFF S. J., Phospholipase A_2 -induced rat mast cell secretion, Role of arachidonic acid metabolites. *Lab. Invest.*, **47**: 579–585, 1982.
- [42] CISŁO M., Role of H-2 histamine receptors in the immunological responses. *Przegl. Dermatol.*, **68**: 627–630, 1981.
- [43] COCHRANE D. E., DISTEL D. L., Association of ^{45}Ca with rat mast cells stimulated by 48/80: effects of inactivation, calcium and metabolic inhibition, *J. Physiol.*, **330**: 413–427, 1982.
- [44] COCHRANE D. E., DISTEL D. L., LANSON J. B., PATERSON B. M., Stimulus-secretion coupling in rat mast cells: inactivation of extracellular calcium dependent secretion, *J. Physiol.*, **323**: 423–435, 1982.
- [45] COCHRANE D. E., DOUGLAS W. W., Histamine release by exocytosis from rat mast cells on reduction of extracellular sodium: a response inhibited by calcium, strontium or magnesium, *J. Physiol.*, **257**: 433–448, 1976.
- [46] COCKROFT S., GOMPERS B. D., Evidence for a role of phosphatidylinositol turnover in stimulus-secretion coupling. Studies with rat peritoneal mast cells, *Biochem. J.*, **178**: 681–687, 1979.
- [47] — The ATP^{4-} -receptor of rat mast cells, *Biochem. J.*, **188**: 789–798, 1980.
- [48] — Role of guanine nucleotide binding protein in the activation of phosphoinositide phosphodiesterase, *Nature*, **314**: 534–536, 1985.
- [49] CONRAD D. H., FROESE A., Characterization of the target cell receptor for IgE. II. Polyacrylamide gel analysis of the surface IgE receptor from normal rat mast cells and from RBL cells, *J. Immunol.*, **116**: 319–326, 1976.
- [50] CONRAD D. H., FROESE A., Characterization of the target cell receptor for IgE. III. Properties of the receptor isolated from RBL cells by affinity chromatography, *J. Immunol.*, **120**: 429–437, 1978.
- [51] — Characterization of the target cell receptor for IgE. IV. Isolation of IgE-receptor complexes. *Immunochemistry*, **15**: 283–288, 1978.
- [52] CONRAD D. H., HELM R. M., HING-YUN S., FROESE A., ISHIZAKA T., ISHIZAKA K., Characterization of the target cell receptor for IgE. V. Studies with an antiserum specific for the receptor. *J. Immunol.*, **122**: 2238–2244, 1979.
- [53] COOPER A. D., BALAKRISHNAN K., McCONNEL H. M., Mobile haptens in liposomes stimulate serotonin release from RBL cell in the presence of specific immunoglobulin E., *J. Biol. Chem.*, **236**: 9379–9381, 1981.

- [54] DAERON M., DUC H. T., KANELLOPOULOS J., LeBOUTEILLR P., KINSKY R., VOISIN G. A., Allogeneic mast cell degranulation induced by histocompatibility antibodies: an in vitro model of transplantation anaphylaxis, *Cell. Immunol.* **20**: 133-155, 1975.
- [55] DAERON M., STERK A. R., HIRATA F., Biochemical analysis of glucocorticoid-induced histamine release inhibition of IgE-mediated histamine release from mast cells, *J. Immunol.*, **129**: 1212-1218, 1982.
- [56] DELISI C., SIRAGANIAN R. P., Receptor cross-linking and histamine release. II. Interpretation and analysis of anomalous dose response patterns, *J. Immunol.*, **122**: 2293-2299, 1979.
- [57] DELISI C., The magnitude of signal amplification by ligand induced receptor clustering., *Nature*, **289**: 322-323, 1981.
- [58] DEMBO M., KAGEY-SOBOTKA A., LICHTENSTEIN L. M., GOLDSTEIN K. B., Kinetic analysis of histamine release due to covalently linked IgE dimers, *Mol. Immunol.*, **19**: 421-434, 1982.
- [59] DIAMANT B., Energy production in rat mast cells and its role for histamine release, *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.*, **49**: 155-171, 1975.
- [60] — Intracellular mechanisms leading to mediator release *Adv. Allergy Appl. Immunol.*, 163-170, 1980.
- [61] DIAMANT B., KAZIMIERCZAK W., PATKAR S. H., Mechanism of histamine release induced by the ionophore X537A from isolated rat mast cells, *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.*, **56**: 179-187, 1978.
- [62] DORSCH W., RING J., RIEPEL H., Effect of 15-eicosatetraenoic acid (15-HETE) on anti-immunoglobulin E, and calcium ionophore induced histamine release from human leukocytes. *Int Arch. Allergy Appl. Immunol.*, **73**: 274-279, 1984.
- [63] DOUGLAS W. W., NEMETH E. F., On the calcium receptor activating exocytosis: inhibitory effects of calmodulin interacting drugs on rat mast cells, *J. Physiol.*, **323**: 229-244, 1982.
- [64] DUFTON M. J., CHARRY R. J., COLEMAN J. W., STANWORTH D. R., The capacity of basic peptides to trigger exocytosis from mast cells correlates with capacity to immobilize band 3 protein in erythrocyte membranes, *Biochem. J.*, **223**: 67-71, 1984.
- [65] DVORAK A. M., GALLI S. J., MORGAN E., HAMMOND M. E., DVORAK H. F., Anaphilactic degranulation of guinea pig basophilic granulocytes. I. Function of granule membrane and cytoplasmic vesicles: formation and resolution of degranulation sacs, *Lab. Invest.*, **44**: 174-191, 1981.
- [66] DVORAK A. M., GALLI S. J., SCHULMAN E. S., LICHTENSTEIN L. M., DVORAK H. F., Basophil and mast cell degranulation: ultrastructural analysis of mediator release, *Fed. Proc.*, **42**, 2510-2515, 1983.
- [67] ENNIS M., PEARCE F. L., Differential reactivity of mast cells isolated from the rat and guinea pig., *Eur. J. Pharmacol.*, **66**: 339-345, 1980.
- [68] ENNIS M., PEARCE F. L., DOLLARY C. T., Calcium antagonists and histamine secretion from rat peritoneal mast cells, *Agents Actions*, **13**: 144-148, 1983.
- [69] ENNIS M., ROBINSON C., DOLLERY C. T., Action of 3-isobutyl-1-methylxantine and prostaglandins D₂ and E₁ on histamine release from rat and guinea pig mast cells, *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.*, **72**: 289-293, 1983.
- [70] ENNIS M., TRUNEH A., WHITE J. R., PEARCE F. L., Inhibition of mast cell secretion, *Nature*, **289**: 186-187, 1981.
- [71] EZENENAMUZIE I. C., ASSAM E. S. K., A study of histamine release from human basophils and mast cells by products of lymphocyte stimulation, *Agents Actions*, **13**: 144-148, 1983.
- [72] FARNAM J., GRANT J. A., LETT-BROWN M. L., HUNT C., THUESON D. O., GIDAS P. C., Complement- and IgE-mediated release of histamine from basophils in vitro. V. Differential effects of drugs modulating arachidonic acid metabolism, *J. Immunol.*, **134**: 541-547 1985.

- [73] FOREMAN J. C., Receptor secretion-coupling in mast cells, *Trends Pharmacol. Sci.*, December, 460-462, 1980.
- [74] FOREMAN J. C., HALLET M. B., MONGAR J. L., Site of action of anti-allergic drugs cromoglycate and doxantrazole, *Br. J. Pharmac. Chemother.*, **59**: 475-476P, 1977.
- [75] — The relationship between histamine secretion and 45 calcium uptake by mast cells, *J. Physiol.*, **271**: 193-214, 1977.
- [76] FROESE A., The presence of two kind of receptors for IgE on rat mast cells, *J. Immunol.*, **125**: 981-987, 1982.
- [77] FROESE A., HELM R. M., CONRAD D. H., IZERSKY C., ISHIZAKA T., KULCZYCKI A., Comparison of the receptors for IgE of various RBL cell lines. I. Receptors isolated by IgE-sepharose and IgE and anti-IgE, *Immunology*, **46**: 117-123, 1982.
- [78] FROESE A., HELM R. M., CONRAD D. H., IZERSKY C., ISHIZAKA T., Comparison of the receptors for IgE of various RBL cell lines. II. Studies with different anti-receptor antisera, *Immunology*, **46**: 107-116, 1982.
- [79] FURUICHI K., RIVERA J., IZERSKY C., The receptor for IgE on RBL cells. Effect of ligand binding on receptor expresion, *PNAS USA*, **82**: 1522-1525, 1985.
- [80] GARCIA R., SASTRE J., LANZURICA P., TRICAS L., GURBINDO C., LAHOZ C., Transmethylation reactions in human basophils induced by anti-IgE or specific antigen, *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.*, **73**: 237-241, 1982.
- [81] GOMPERTS B. D., Involvement of guanine nucleotide-binding protein in the gating of Ca^{2+} by receptor, *Nature*, **306**: 64-66, 1983.
- [82] GROSMAN N., JANSEN S. M., JOHANSEN F. F., Histamine release from isolated rat mast cells induced by opiates: effect of sterical configuration and calcium, *Agents Actions*, **12**: 417-424, 1982.
- [83] HEIMAN A., CREWS F. T., Characterization of the effects of phorbol esters on rat mast cell secretion, *J. Immunol.*, **134**: 548-555, 1985.
- [84] HEMPSTED B. L., KULCZYCKI C., PARKER C. W., Phosphorylation of IgE receptor in antigen stimulated rat mast cells, *PNAS USA*, **80**, 3050-3053, 1981.
- [85] HEMPSTED B. L., PARKER C. W., KULCZYCKI C., Phosphorylation of the IgE receptor from ionophore A 23187 stimulated intact rat mast cells, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **98**: 815-822, 1981.
- [86] HIRATA F., AXELROD J., CREWS F. T., Concanavalin A stimulates phospholipid methylation and phosphatidylserine decarboxylation in rat mast cells, *PNAS USA*, **76**: 4813-4816, 1979.
- [87] HOLGATE S. T., LEWIS R. A., AUSTEN K. F., Role of the adenylate cyclase in immunologic release of mediators from rat mast cells: agonistic and antagonist effects of purine- and ribose-modified adenosine analogues, *PNAS USA*, **77**: 6800-6804, 1980.
- [88] HOLGATE S. T., LEWIS R. A., MAGUIRE J. F., ROBERTS J. L., OATES J. A., AUSTEN K. F., Effects of prostaglandin D_2 on rat serosal mast cells — discordance between immunologic mediator release and cAMP levels, *J. Immunol.*, **125**: 1367-1373, 1980.
- [89] HOLGATE S. T., LEWIS R. A., AUSTEN K. F., 3',5'-cyclic AMP dependent protein kinase of rat serosal mast cell and its immunologic stimulation, *J. Immunol.*, **134**: 2093-2099, 1980.
- [90] HOLOWKA D., GITLER C., BERCOVICI Z., METZGER H., Reaction of 5-iodonaphthyl-1-nitrane with the IgE receptor on normal and tumor mast cells, *Nature*, **239**: 806-808, 1981.
- [91] HOLOWKA D., METZGER H., Further characterization of the beta component of the receptor for IgE, *Mol. Immunol.*, **19**: 219-227, 1982.
- [92] HOSSMAN H., LAUER W., VORTISCH U., GUNTER E., BAZIN H., HAMMER D. K., Stimulation and suppression of rat mast cells by alloantibodies. *Eur. J. Immunol.*, **6**: 591-596, 1976.

- [93] ISERSKY C., RIVERA J., MIMS S., SEGAL D. M., TRICHE T., The fate of receptor and ligand during endocytosis of oligomers of IgE, *Fed. Proc.*, **41**: abstr. 3240, 1982.
- [94] ISHIZAKA T., Membrane events in the triggering mast cells, *The Mast Cell*, ed. Pepys J., Pittman Press, 21–29, 1979.
- [95] ISHIZAKA T., Membrane events in triggering mast cells for IgE-mediated histamine release, *Adv. Allergol. Appl. Immunol.*, 157–162, 1980.
- [96] ISHIZAKA T., Analysis of triggering events in mast cells for immunoglobulin E-mediated histamine release, *J. Allergy Clin. Immunol.*, **67**: 90–96, 1981.
- [97] ISHIZAKA T., Biochemical analysis of triggering signals induced by bridging of IgE receptors, *Fed. Proc.*, **41**: 17–21, 1982.
- [98] ISHIZAKA T., Activation of mast cells for mediator release through IgE receptors, *Progr. Allergy*, **34**: 188–235, 1984.
- [99] ISHIZAKA T., CONRAD D. H., Binding characteristics of human IgE receptors and initial triggering events in human mast cells for histamine release, *Monogr. Allergy*, **18**: 14–24, 1982.
- [100] ISHIZAKA T., CONRAD D. H., SCHULMAN E. S., STERK A. R., ISHIZAKA K., Biochemical analysis of initial triggering events of IgE-mediated histamine release from human lung mast cells, *J. Immunol.*, **130**: 2357–2362, 1983.
- [101] ISHIZAKA T., FOREMAN J. C., STERK A. R., ISHIZAKA K., Induction of calcium flux cross the rat mast cell membrane by bridging IgE receptors, *PNAS USA.*, **76**: 5858–5862, 1979.
- [102] ISHIZAKA T., ISHIZAKA K., Cell surface IgE on human basophil granulocytes, *Ann. NY Acad. Sci.*, **254**: 462–475, 1975.
- [103] ISHIZAKA T., ISHIZAKA T., Immunological events at the cell surface of basophil and mast cell which induce degranulation., *The Mast Cell In Relation To Allergic Mechanisms*, ed. Daems W. T., Netherlands Asthma Found., 13–22, 1977.
- [104] ISHIZAKA T., STERK A. R., DAERON M., BECKER E. L., ISHIZAKA K., Biochemical analysis of desensitization of mouse mast cells, *J. Immunol.*, **135**: 492–501, 1985.
- [105] ISHIZUKA Y., IMAI A., NAKASHIMA S., NOZAWA Y., Evidence for de novo synthesis of phosphatidylinositol coupled with histamine release in activated rat mast cells, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **117**: 710–717, 1983.
- [106] ISHIZUKA Y., IMAI A., NOZAWA Y., Phosphatidylinositol turnover in rat mast cells stimulated by antigen: rapid and preferential breakdown of phosphatidylinositol 4-phosphate (DPI), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **123**: 875–881, 1984.
- [107] ISHIZUKA Y., NOZAWA Y., Concerted stimulation of phosphatidylinositol-turnover, Ca^{2+} -influx and histamine release in antigen activated rat mast cells, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **111**: 581–587, 1983.
- [108] JANKOWSKA R., SZALATY H., MAŁOLEPSZY J., Effect of verapamil on interferon production, mastocyte degranulation and histamine release- studies in mice sensitized with ovalbumin, *Arch. Immunol. Therap. Exp.*, **32**: 583–587, 1984.
- [109] JOHANSEN T., Adenosine triphosphate levels during anaphilactic histamine release in rat mast cells in vitro: Effects of glycolytic and respiratory inhibitors, *Eur. J. Pharmacol.*, **58**: 107–115, 1979.
- [110] JOHANSEN T., Histamine release induced from rat mast cells by the ionophore A 23187 in the absence of extracellular calcium, *Eur. J. Pharmacol.*, **62**: 329–334, 1980.
- [111] JOHANSEN T., Estimation of the rate energy production of rat mast cells in vitro, *Acta Pharmacol. Toxicol.*, **53**: 413–416, 1983.
- [112] JOHANSEN T., CHARKRAVARTY N., The utilization of adenosine triphosphate in rat mast cells during histamine release induced by anaphilactic reaction and compound 48/80, *Arch. Pharmacol.*, **280**: 243–250, 1975.
- [113] JOHANSON A. R., MOREN N. C., MAYER S. C., Cyclic AMP content and histamine release in rat mast cells, *J. Immunol.*, **112**: 511–519, 1974.

- [114] KAGEY-SOBOTKA A., DEMBO M., GOLDSTEIN B., METZGER H., LICHTENSTEIN L. M., Quantitative/characteristics of histamine release from human basophils by covalently cross-linked IgE, *J. Immunol.*, **127**: 2285–2291, 1981.
- [115] KAGEY-SOBOTKA A., MacGLASHAN D. W., LICHTENSTEIN L. M., Role of receptor aggregation in triggering IgE-mediated reactions, *Fed. Proc.*, **42**: 12–16, 1982.
- [116] KALINER M., PLATSHON L., The effect of histamine on human lung anaphylaxis, *J. Immunol. Clin. Allergy*, **61**: 130, 1978.
- [117] KANELLOPOULOS J., ROSSI G., METZGER H., Preparative isolation of cell surface receptor for immunoglobulin E, *J. Biol. Chem.*, **254**: 7691–7697, 1980.
- [118] KANELLOPOULOS J., TEH-YUNG L., POY G., METZGER H., Composition and subunit structure of the cell receptor for immunoglobulin E, *J. Biol. Chem.*, **255**: 9060–9066, 1980.
- [119] KANO T., COCHRANE D. E., DOUGLAS W. W., Exocytosis (secretory granules extrusion) induced by injection of calcium into mast cells. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, **51**: 1001–1004, 1973.
- [120] KAZIMIERCZAK W., Current theories on the cellular mechanisms of histamine liberation, *Acta Physiol. Pol.*, **52**, suppl. **22**: 113–120, 1981.
- [121] KAZIMIERCZAK W., DIAMANT B., Mechanisms of histamine release in anaphilactic and anaphilactoid reactions, *Progr. Allergy*, **24**: 257–283, 1978.
- [122] KAZIMIERCZAK W., MEIER H. L., McGLASHAN D. W., LICHTENSTEIN L. M., An antigen-activated DFP-inhibitable enzyme controls desensitization, *J. Immunol.*, **132**: 399–405, 1984.
- [123] KENNERLY D. A., SECOSA C. J., PARKER C. W., SULIVAN T. J., Modulation of stimulated phospholipid metabolism in mast cells by pharmacologic agents that increase 3',5'-adenosine monophosphate levels, *J. Immunol.*, **123**: 1519–1524, 1979.
- [124] KENNERLY D. A., SULIVAN T. J., PARKER C. W., Activation of phospholipid metabolism during mediator release from stimulated rat mast cells. *J. Immunol.*, **122**: 152–159, 1979.
- [125] KIRAT J. P., PEREZ-MONFORT R., METZGER H., Covalent cross-linking of subunits of the receptor for immunoglobulin E induced by immunoprecipitation, *Biochemistry*, **22**: 5729–5732, 1983.
- [126] KONIG W., PFEIFFER P., SZPERALSKI B., Membrane biochemical events in mast cell and basophil activation and secretion, *Behr. Int. Mitt.*, **68**: 30–50, 1981.
- [127] KULCZYCKI A., McNEARNEY T. A., PARKER C. W., The rat basophilic leukemia cell receptor for IgE. I. Characterization as a glycoprotein. *J. Immunol.* **117**: 661–665, 1976.
- [128] KUMAR N., METZGER H., Gel filtration in 6M-guanidine hydrochloride of the alpha subunit (and its fragments) of the receptor for immunoglobulin E, *Molec. Immunol.*, **19**: 1561–1567, 1982.
- [129] LAGUNOFF D., Membrane fusion during mast cell secretion, *J. Cell Biol.*, **57**: 252–259, 1973.
- [130] LASSING J., LINDBERG U., Specific interaction between phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate and profilactin, *Nature*, **314**: 473–474, 1985.
- [131] LEWIS R. A., AUSTEN K. F., Mediation of local homeostasis and inflammation by leukotriens and other mast cell dependent compounds, *Nature*, **293**: 103–108, 1981.
- [132] LEWIS R. A., DHANANI N., RANADIVE N. S., Activation and decay of rat mast cells and its relationship to calcium uptake, *Can. J. Biochem. Cell. Biol.*, **61**: 72–78, 1983.
- [133] LEVINE B. B., The nature of the antigen-antibody complexes which initiate anaphilactic secretion, *J. Immunol.*, **94**: 121–131, 1965.
- [134] LICHTENSTEIN L. M., The mechanism of basophil histamine release induced by antigen and by the calcium ionophore A 23187, *J. Immunol.* **114**: 1692–1699, 1975.
- [135] LICHTENSTEIN L. M., Sequential analysis of the allergic response: cyclic AMP, calcium and histamine, *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.*, **49**: 143–154, 1975.

- [136] LICHTENSTEIN L. M., FOREMAN J. C., COUROY M. C., MARONE J., NEWBALL H. H., Difference between histamine release from human basophils and mast cells and rat mast cells, *The Mast Cell*, ed. Pepys J., Pittman Press, 83-96, 1979.
- [137] LOWSON D., Rat peritoneal mast cells: a model system for studying membrane fusion., *Membrane-Membrane Interactions*, ed. Gilula N. B., Raven Press, 27-44, 1980.
- [138] LUNARDI L.O., VUGMAN T., Dual effect of verapamil on rat peritoneal mast cells: inhibition and induction of histamine release. *Br. J. Med. Biol. Res.*, **15**: 269-273, 1982.
- [139] McGLASHAN D. D., SCHLEIMER R. P., PETERS S. P., SCHULMAN E. S., ADAMS G. K., NEWBALL H. H., LICHTENSTEIN L. M., Generation of leukotriens by purified human lung mast cells, *J. Clin. Invest.*, **70**: 747-751, 1982.
- [140] MAGRO A. M., BRAI M., Evidence for lipoxygenase activity in induction of histamine release from rat peritoneal mast cells by chelated iron, *Immunology*, **49**: 1-8, 1983.
- [141] MARONE G., AMBROSIO G., BONADUCE D., GENOVESE A., TRIGGIANI M., CONDORELLI M., Inhibition of immunoglobulin E mediated histamine release from human basophils and mast cells by phenoterol, *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.*, **74**: 356-361 1984.
- [142] MARONE G., COLUMBO M., POTO S., BIANCO P., TORELLA G., CONDORELLI M., Possible role of calmoduline in human inflammatory reactions, *Mon. Allergy*, **18**: 290-299, 1983.
- [143] MARONE G., McGLASHAN D. W., KAGEY-SOBOTKA A., LICHTENSTEIN L. M., Desensitization and phospholipid metabolism in human basophils, *Adv. Allergol. Appl. Immunol.*, 147-154, 1980.
- [144] MARONE G. POTO S., COLUMBO M., QUATTRIN S., CONDORELLI M., Histamine release from human basophils in vitro: effects of age of cell donor, *Mon. Allergy*, **18**: 139-143, 1983.
- [145] MARONE G., POTO S., PETRACCA R., TRIGGIANI M., CONDORELLI M., Activation of human basophils by staphylococcal protein, *Clin. Exp. Immunol.*, **50**: 661-668, 1982.
- [146] MARQUARDT D. L., WASSERMAN S. I., Characterization of rat mast cell beta-adrenergic receptor in resting and stimulated cells by radioligand binding, *J. Immunol.*, **129**: 2122-2127, 1982.
- [147] MARTIN T. W., LAGUNOFF D., Inhibition of mast cell histamine secretion by N-substituted derivatives of phosphatidylserine, *Science*, **204**: 631-633, 1979.
- [148] MASINI E., BLANDINA P., MANNAIONI A., PECHT J., Mast cell receptors controlling histamine release: influences on the mode of action of drugs used in the treatment of advers drug reactions., *Klin. Wochenschrift.*, **60**: 1031-1038, 1982.
- [149] MAZUREK N., PASHKIN P., PETRANK A., PECHT J., Basophils variants with impaired cromoglycate binding do not respond to an immunological degranulation stimulus, *Nature*, **303**: 528-530, 1983.
- [150] MAZUREK N., PASHKIN P., LOYTER A., PECHT J., Restoration of Ca²⁺ influx and degranulation capacity of variant RBL-2H3 cells upon implantation of isolated cromolyn binding protein, *PNAS USA*, **80**: 6014-6018, 1983.
- [151] McCLAIN D., DONLON M., CHOCK S., CATRAVAS G., The effect of calmodulin on histamine release in the rat peritoneal mast cell, *Biochem. Biophys. Acta*, **763**: 419-425, 1983.
- [152] McGIVNEY A. M., CREWS F. T., HIRATA A., AXELROD J., SIRAGANIAN R. P., RBL cell lines deffective in phospholipid methyltransferase enzymes, Ca²⁺-influx and histamine release: reconstitution by hybridization, *PNAS USA*, **78**: 6176-6180, 1981.
- [153] MEIER L. M., GRAHAM C. L., GROG B. P., KILDUFF J. E., The role of esterases in the mechanism of histamine release from human basophils, *J. Allergy Clin. Immunol.*, **75**: 127, 1985.
- [154] MENDOZA C., METZGER H., Distribution and valency of the receptor for IgE on rodent mast cells and related tumor cells, *Nature*, **264**: 548-550, 1976.

- [155] METCALFE D. D., Effector cell heterogeneity in immediate hypersensitivity reactions, *Clin. Rev. Allergy*, **1**: 311-325, 1983.
- [156] METZGER H., The IgE mast cell system as a paradigm for the study of antibody mediated mechanisms, *Immunol. Rev.*, **41**: 186-199, 1978.
- [157] METZGER H., A previously unrecognized subunit of the receptor for immunoglobulin E, *Biochemistry*, **22**: 5722-5728, 1983.
- [158] METZGER H., GOETZE A., KANELLOPOULOS J., HOLOWKA D., FEWTRELL C., Structure of the receptor for IgE, *Fed. Proc.* **41**: 8-11, 1982.
- [159] METZGER H., WANK S. A., RIVNAY B., The receptor for immunoglobulin E taking it apart-putting it back together, *Mon. Allergy*, **18**: 1-3, 1983.
- [160] MICHELL R. H., Is phosphatidylinositol really out of the calcium gate?, *Nature*, **296**: 492-493, 1982.
- [161] MONGAR J. L., FOREMAN J. C., Control of histamine secretion. *The Mast Cell*, ed. Pepys J., Pittman Press, 30-37, 1979.
- [162] MORITA Y., SIRAGANIAN R. P., Inhibition of IgE-mediated histamine release from RBL cells and rat mast cells by inhibitors of transmethylation, *J. Immunol.*, **127**: 1339-1344, 1981.
- [163] MORITA Y., MIYAMOTO T., Role of phospholipase A₂ activation in histamine release from human basophils, *Allergy*, **38**: 413-418, 1983.
- [164] NAKAO A., BUCHMAN A. A., POTOKAR D. S., The involvement of phospholipase A₂ in the antigen and A 23187 induced histamine release from purified rat mast cells, *The Mast Cell*, ed. Pepys J., Pittman Press, 847-848, 1979.
- [165] NEMETH A., DOUGLAS W. W., Lipoxygenase inhibitors exert secretagogue specific effects on mast cell exocytosis, *Eur. J. Pharmacol.*, **79**: 315-318, 1982.
- [166] NEMETH A., ROHLICH P., Early membrane retrieval following exocytosis in rat mast cells, *Eur. J. Cell Biol.*, **28**: 39-46, 1982.
- [167] NEWMAN S. A., ROSSI G., METZGER H., Molecular weight and valency of the cell-surface receptor for immunoglobulin E, *PNAS USA*, **74**: 869-872, 1977.
- [168] NIELSEN E. H., BYTZER P., CLAUSEN J., CHARKRAVARTY N., Electron microscopy study of the regeneration of rat peritoneal mast cells in vitro, *Cell. Tissue Res.*, **216**: 635-645, 1981.
- [169] NIELSEN E. H., CLAUSEN J., Electron microscopy study of the regeneration of rat peritoneal mast cells after histamine secretion in vivo, *Cell. Tissue Res.*, **224**: 465-468, 1982.
- [170] NIELSEN E. H., CLAUSEN J., BYTZER P., Membrane retrieval in non-exocytotic and exocytotic rat peritoneal mast cells, *Exp. Cell Res.*, **135**: 291-298, 1981.
- [171] NISHIZUKA Y., Phospholipid degradation and signal transduction for protein phosphorylation, *Trends Biochem. Sci.*, **1**: 13-16, 1983.
- [172] NISHIZUKA Y., Protein kinases in signal transduction, *Trends Biochem. Sci.*, **9**: 163-166, 1984.
- [173] OHKI K., SEKIYA T., YAMAUCHI T., NOZAWA Y., Effect of phosphatidylinositol replacement by diacylglycerol on various physical properties of artificial membranes with respect to the role of phosphatidylinositol response, *Biochem. Biophys. Acta*, **693**: 341-350, 1982.
- [174] ORR T. S. C., Mode of action of disodium cromoglycate, *Acta Allergol.*, **32** (suppl.), 9-27, 1977.
- [175] ORR T. S. C., Fine structure of mast cell with special reference to human cells, *The Mast Cell*, ed. Pepys J., Pittman Press, 1-7, 1977.
- [176] PATKAR S. A., DIAMANT B., Mechanism of histamine release from rat peritoneal mast cells, *Klin. Wochenschr.*, **60**: 948-953, 1982.
- [177] PAUWELS R., VAN DER STRAATEN M., Drugs that modify mast cell function: their mode of action, *The Mast Cell*, ed. Pepys J., Pittman Press, 61-68, 1979.

- [178] PEARCE F. L., Functional heterogeneity of mast cells from different species and tissues, *Klin. Wochenschr.*, **60**: 954–957, 1982.
- [179] PEARCE F. L., Calcium and histamine secretion from mast cells, *Progr. Med. Chem.*, **19**: 60–109, 1982.
- [180] PEARCE F. L., MESSIS P. D., Phosphatidic acid induces histamine secretion from rat peritoneal mast cells, *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.*, **68**: 93–95, 1982.
- [181] PEARCE F. L., RAFFI-TABOR E., Inhibition of anaphilactic histamine secretion from rat peritoneal mast cells by disodium cromoglycate in the presence of phosphatidylserine, *Agents Actions*, **13**: 212–215, 1983.
- [182] PECHT J., SAGI-EISENBERG R., MAZUREK N., Modulation of calcium ion fluxes as signal for mast cell and basophil degranulation, *Mobility and Recognition in Cell Biology.*, 409–427, 1983.
- [183] PECOUD A. R. CONRAD D. H., Characterization of the IgE receptor by triptic mapping, *J. Immunol.*, **127**: 2208–2214, 1981.
- [184] PEREZ-MONFORT R., FEWTRELL C., METZGER H., Changes in the receptor for immunoglobulin E coincident with receptor mediated stimulation of basophilic leukemia cells, *Biochemistry*, **22**: 5729–5732, 1983.
- [185] PETERS S. P., SIEGAL M. J., KAGEY-SOBOTKA A., LICHTENSTEIN L. M., Lipoxygenase products modulate histamine release in human basophils, *Nature*, **292**: 455–456, 1981.
- [186] PISON V., THEOBALD K., BOLM A., KUNAN H. W., KONIG W., Evidence for phospholipase-arachidonic acid-involvement in anaphilatoxin induced smooth muscle contraction and histamine release from mast cells, *Mon. Allergy*, **18**: 206–210, 1983.
- [187] PTAK W., ASKENASE P. W., ROSENSTEIN R. W., GERSHON R. K., Transfer of an antigen-specific immediate hypersensitivity-like reaction with an antigen binding factor produced by T cells, *PNAS USA*, **79**: 1969–1973, 1982.
- [188] RANADIVE N. S. LEWIS R., Extracellular effect of calcium on compound 48/80 stimulated mast cells, *Can. J. Cell Biol.*, **61**: 79–84.
- [189] RADAI J., BALAZS M., JUSZUPOWA S., Changes in membrane fluidity of mast cells induced by antigen-anaphilactic antibody reaction, *Acta Biochem. Biophys. Acad. Sci. Hung.*, **14**: 223–227, 1979.
- [190] ROSSI S. S., MILLER R. J., Regulation of mast cell histamine release by neurotensin, *Life Sci.*, **31**: 509–516, 1982.
- [191] ROHLICH R. P., Calcium-phospholipid interactions in secretory cells: a new perspective on stimulus secretion coupling, *Fed. Proc.*, **41**: 2181–2187, 1982.
- [192] RYCHLIK G., RYCHLIK E., Histamina — wpływ na procesy immunologiczne (w przygotowaniu).
- [193] RYCHLIK G., Rola komórek tucznych w układzie immunologicznym (w przygotowaniu).
- [194] RUBIN R. P., Membrane associated microfilaments in the cortical cytoplasm of the rat mast cells, *Exptl. Cell Res.*, **93**: 293–298, 1975.
- [195] SAGI-EISENBERG R., LIEMAN H., PECHT J., Protein kinase C regulation in histamine secreting RBL cells, *Nature*, **313**: 59–60, 1985.
- [196] SCHLEIMER R. P., LICHTENSTEIN L. M., Inhibition of basophil histamine release by antiinflammatory steroids, *Nature*, **292**: 454–455.
- [197] SCHLEIMER R. P., GILLESPIE E., LICHTENSTEIN L. M., Release of histamine from human leukocytes stimulated with tumor promoting phorbol diesters, *J. Immunol.*, **126**: 570–574, 1981.
- [198] SCHLEIMER R. P., McGLASHAN D. W., GILLESPIE E., LICHTENSTEIN L. M., Inhibition of basophil histamine release by anti-inflammatory steroids. II. Studies on the mechanism of action, *J. Immunol.*, **129**: 1632–1636, 1982.
- [199] SEGAL D. M., SHARROW S. O., JONES J. F., SIRAGANIAN R. P., Fc (IgG) receptors on RBL cells, *J. Immunol.*, **126**: 138–145, 1981.

- [200] SIEGHART W., THEOHARIDES T. C., ALPER S. L., DOUGLAS W. W., GREENEGARD P., Calcium dependent protein phosphorylation during secretion by exocytosis in the mast cell, *Nature*, **275**: 329–331, 1978.
- [201] SIEGHART W., THEOHARIDES T. C., DOUGLAS W. W., GREENEGARD P., Phosphorylation of a single mast cell protein in response to drugs which inhibit secretion, *Biochem. Pharmacol.*, **30**: 27–37, 1981.
- [202] SIRAGANIAN R. P., HAZARD K. E., Mechanism of mast cell activation for IgE-mediated histamine release, *J. Immunol.*, **122**: 1719–1725, 1979.
- [203] SIRAGANIAN R. P., HOOK W. A., LEVINE B. B., Specific in vitro histamine release from basophils by divalent haptens: evidence for activation by simple bridging of membrane bound antibody, *Immunochemistry*, **12**: 149–157, 1975.
- [204] SIRAGANIAN R. P., MCGIVNEY A., BURSUNIAN E. L., CREWS F. T., HIRATA F., AXELROD J., Variants of RBL cell line for the study of histamine release, *Fed., Proc.*, **41**: 30–34, 1982.
- [205] SIRAGANIAN R. P., SIRAGANIAN P. A., Mechanism of action of concanavalin A on human basophils, *J. Immunol.*, **114**: 886–890, 1984.
- [206] SIRAGANIAN R. P., URATA C., MCGIVNEY A., Arachidonic acid release during IgE and Ca^{2+} -ionophore activation of RBL cells, *Mon. Allergy*, **18**: 120–133, 1982.
- [207] STANWORTH D. R., The role of non-antigen receptors in mast cell signaling processes, *Mol. Immunol.*, **21**: 1183–1190, 1984.
- [208] STEINHOFF M. M., LEE L. H., JAKSHIK B. A., Enzymatic formation of prostaglandin D_2 by RBL cells and normal rat mast cells, *Biochem. Biophys. Acta*, **618**: 28–34, 1980.
- [209] STENDAHL O., MOLIN L., DIDROTH M., Granulocyte mediated histamine release from mast cells. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.*, **70**: 277–284, 1983.
- [210] STERK A. R., ISHIZAKA T., Binding properties of IgE receptors on normal mouse mast cells, *J. Immunol.*, **128**: 838–843, 1982.
- [211] SUGIYAMA K., KENTARY O., KATSUDA N., Fibronectin on the surface of rat mast cells, *Exptl. Cell Res.*, **133**: 449–451, 1981.
- [212] SUZUKI T., MORI K., UHIDA M., Effects of calmodulin inhibitor on histamine release and calcium influx of rat mast cells, *Eur. J. Pharmacol.*, **85**: 155–161, 1982.
- [213] SUZUKI T., OHISHI K., UHIDA M., Inhibition of histamine release by calcium antagonists, *Gen. Pharmac.*, **14**: 273–275, 1983.
- [214] SYNDBOM A., FREDHOLM B., UVNAS B., Evidence against the role of cyclic nucleotides in the regulation of anaphilactic histamine release in isolated rat mast cells, *Acta Physiol. Scand.*, **112**: 47–56, 1981.
- [215] SYNDBOM A., FREDHOLM B. B., The mechanism by which theophylline inhibits histamine release from rat mast cells, *Acta Physiol., Scand.*, **112**: 47–56, 1981.
- [216] SZCZEKLIK A., Prostaglandins, allergy and asthma, *Adv. Allergol. Appl. Immunol.*, **181–185**, 1980.
- [217] TAMORI-NATORI Y., NOJIMA S., Activation of histamine secretion from rat mast cells by phosphatidylserine analogues resistant to phospholipase A_2 action, *J. Biol. Chem.*, **91**: 1825–1828, 1982.
- [218] TAMIZAKI Y., AKAGI K., NAM-LEE K., TOWNLEY L. G., Inhibitory effect on skin reactions and ^{45}Ca uptake and histamine release in rat mast cells induced by various stimulating agents, *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.*, **72**: 102–109, 1983.
- [219] TAUROG J. D., FEWTRELL C., BECKER E. L., IgE-mediated triggering of RBL cells: lack of evidence for serine esterase activation, *J. Immunol.*, **122**: 2150–2153, 1979.
- [220] TASAKA K., Intracellular calcium release provoked by certain histamine releasers and its prevention by some antiallergic drugs, *J. Allergy Clin. Immunol.*, **75**: 124, 1985.
- [221] THEOHARIDES T., BONDY P. K., GREENEGARD P., DOUGLAS W. W., Antiallergic drug cromolyn may inhibit histamine secretion by regulating phosphorylation of a mast cell protein, *Science*, **207**: 80–82, 1980.

- [222] THEOHARIDES T., KOPS S. K., BONDY P. K., ASKENASE P. W., Differential release of serotonin without comparable histamine under diverse conditions in the rat mast cells, *Biochem. Pharmacol.*, **34**: 102-109, 1985.
- [223] THEOHARIDES T., SIEGHART W., TSAKALOS N. D., ASKENASE P. W., Differential serotonin and histamine release from mast cells, *Nature*, **297**: 229-231, 1982.
- [224] THUESON D. O., PLANK D. E., LANGFORD P. E., LEIT-BROWN M. A., GRANT J. A., Lymphocyte derived histamine releasing activity (HRA), *Fed. Proc.*, **41**: 964, 1982.
- [225] TOLONE G., BONASERA L., PONTIERI G. M., Histamine binding to H₂ receptors stimulates phospholipid methylation, *Experientia*, **38**: 966, 1982.
- [226] TRUNEH A., PEARCE F. L., Characterization of calcium requirements for histamine release from rat peritoneal mast cells, *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.*, **66**: 68-75, 1981.
- [227] TRUNEH A., PEARCE F. L., Effect of antiallergic compounds on histamine release, *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.*, **66**: 76-82, 1981.
- [228] TSAKALOS M. D., THEOHARIDES T., KOPS S. K., DWYER J., ASKENASE P. W., Dialyzable leukocyte extract induces mast cell secretion, *Cell. Immunol.*, **66**: 383-393, 1982.
- [229] TUNG R., KAGEY-SOBOTKA A., PLAUT M., LICHTENSTEIN L. M., H₂-antihistaminics augment antigen induced histamine release from human basophils in vitro, *J. Immunol.*, **129**: 2113-2115, 1982.
- [230] WEILL B. J., RENOUX M. L., Study of granule reappearance and histamine synthesis in rat mast cells maintained in short term cultures, *Cell. Immunol.*, **68**: 220-233, 1982.
- [231] WESCOTT W. L., HUNT W. A., KALINER M., Histamine H₁ receptors on rat peritoneal mast cells, *Life Sci.*, **81**: 1911-1919, 1982.
- [232] WEST W. L., Calmodulin regulated enzymes: modifications by drugs and disease, *Fed. Proc.*, **41**: 2251-2253, 1982.
- [233] WELLS E., MANN J., Phosphorylation of a mast cell protein in response to treatment with antiallergic compounds, *Biochem. Pharmacol.*, **32**: 837-846, 1982.
- [234] WHITE J. R., PEARCE F. L., Effects of antiallergic compounds on anaphylactic histamine release., *Immunology*, **46**: 361-367, 1982.
- [235] WINSLOW C. M., AUSTEN K. F., Enzymatic regulation of mast cell activation and secretion by adenylate cyclase and cyclic AMP-dependent protein kinases, *Fed. Proc.*, **41**: 22-29, 1982.
- [236] WŁODARSKI K., RYCHLIK G., Pochodzenie, morfologia i hodowla in vitro komórek tucznych (w przygotowaniu).
- [237] WŁODARSKI K., WŁODARSKA J., ZALESKI M., Komórki tuczne — komórki immunologicznie czynne, *Immunologia Pol.*, **II**, **1**: 35-53, 1977.
- [238] ZUCKER-FRANKLIN D., Ultrastructural evidence for the common origin of human mast cells and basophils, *Blood.*, **56**: 534-540, 1980.

The following is a list of the names of the members of the Society who have been elected to the office of President for the year 1900-1901. The names are arranged in alphabetical order of their surnames.

1. Mr. J. H. B. ...

2. Mr. J. H. B. ...

3. Mr. J. H. B. ...

4. Mr. J. H. B. ...

5. Mr. J. H. B. ...

6. Mr. J. H. B. ...

7. Mr. J. H. B. ...

8. Mr. J. H. B. ...

9. Mr. J. H. B. ...

10. Mr. J. H. B. ...

11. Mr. J. H. B. ...

12. Mr. J. H. B. ...

13. Mr. J. H. B. ...

14. Mr. J. H. B. ...

15. Mr. J. H. B. ...

16. Mr. J. H. B. ...

17. Mr. J. H. B. ...

18. Mr. J. H. B. ...

19. Mr. J. H. B. ...

20. Mr. J. H. B. ...

21. Mr. J. H. B. ...

22. Mr. J. H. B. ...

23. Mr. J. H. B. ...

24. Mr. J. H. B. ...

25. Mr. J. H. B. ...

26. Mr. J. H. B. ...

27. Mr. J. H. B. ...

28. Mr. J. H. B. ...

29. Mr. J. H. B. ...

30. Mr. J. H. B. ...

31. Mr. J. H. B. ...

32. Mr. J. H. B. ...

33. Mr. J. H. B. ...

34. Mr. J. H. B. ...

35. Mr. J. H. B. ...

36. Mr. J. H. B. ...

37. Mr. J. H. B. ...

38. Mr. J. H. B. ...

39. Mr. J. H. B. ...

40. Mr. J. H. B. ...

41. Mr. J. H. B. ...

42. Mr. J. H. B. ...

43. Mr. J. H. B. ...

44. Mr. J. H. B. ...

45. Mr. J. H. B. ...

46. Mr. J. H. B. ...

47. Mr. J. H. B. ...

48. Mr. J. H. B. ...

49. Mr. J. H. B. ...

50. Mr. J. H. B. ...

51. Mr. J. H. B. ...

52. Mr. J. H. B. ...

53. Mr. J. H. B. ...

54. Mr. J. H. B. ...

55. Mr. J. H. B. ...

56. Mr. J. H. B. ...

57. Mr. J. H. B. ...

58. Mr. J. H. B. ...

59. Mr. J. H. B. ...

60. Mr. J. H. B. ...

61. Mr. J. H. B. ...

62. Mr. J. H. B. ...

63. Mr. J. H. B. ...

64. Mr. J. H. B. ...

65. Mr. J. H. B. ...

66. Mr. J. H. B. ...

67. Mr. J. H. B. ...

68. Mr. J. H. B. ...

69. Mr. J. H. B. ...

70. Mr. J. H. B. ...

71. Mr. J. H. B. ...

72. Mr. J. H. B. ...

73. Mr. J. H. B. ...

74. Mr. J. H. B. ...

75. Mr. J. H. B. ...

76. Mr. J. H. B. ...

77. Mr. J. H. B. ...

78. Mr. J. H. B. ...

79. Mr. J. H. B. ...

80. Mr. J. H. B. ...

81. Mr. J. H. B. ...

82. Mr. J. H. B. ...

83. Mr. J. H. B. ...

84. Mr. J. H. B. ...

85. Mr. J. H. B. ...

86. Mr. J. H. B. ...

87. Mr. J. H. B. ...

88. Mr. J. H. B. ...

89. Mr. J. H. B. ...

90. Mr. J. H. B. ...

91. Mr. J. H. B. ...

92. Mr. J. H. B. ...

93. Mr. J. H. B. ...

94. Mr. J. H. B. ...

95. Mr. J. H. B. ...

96. Mr. J. H. B. ...

97. Mr. J. H. B. ...

98. Mr. J. H. B. ...

99. Mr. J. H. B. ...

100. Mr. J. H. B. ...

PREKURSORY PEPTYDÓW OPIOIDOWYCH*

OPIOID PEPTIDE PRECURSORS

Barbara RZESZOTARSKA

Zakład Chemii Organicznej, Instytut Chemii
Wyższa Szkoła Pedagogiczna, Opole

Streszczenie: Omówiono organizację molekularną trzech znanych prekursorów peptydów opioidowych: prepro-opiomelanokortyny, preproenkefaliny i preprodynorfiny.

Summary: Molecular organization of three known opioid peptide precursors: prepro-opiomelanocortin, preproenkephalin and preprodynorphin, has been discussed.

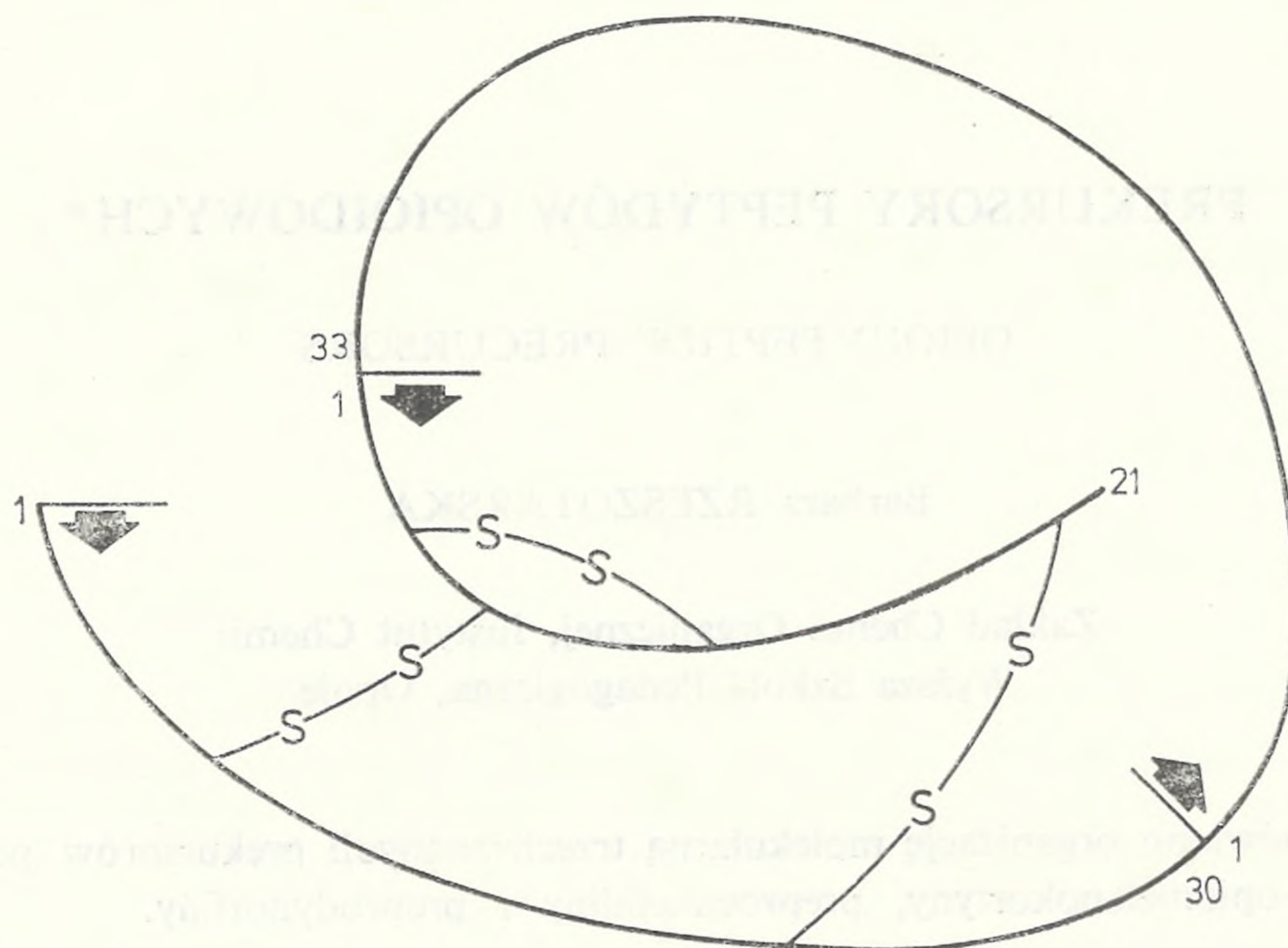
W 1967 r. Steiner stwierdza, że insulina jest biosynteżowana jako proinsulina — białko prawie dwa razy większe od właściwego hormonu, który powstaje z proinsuliny w drodze degradacji enzymatycznej (ryc. 1). Nie ma powodów sądzić, że insulina jest peptydem wyjątkowym, lecz wręcz przeciwnie, należy założyć, że i inne hormony peptydowe są biosynteżowane jako większe cząsteczki.

Z hormonów peptydowych, obok insuliny, w latach sześćdziesiątych bada się zwłaszcza ACTH, gdyż ten 39 peptyd, tak jak i insulina, znalazł się w tym czasie w zakresie możliwości chemicznej syntezy peptydów. W 1965 r. znana także była sekwencja owczej β -lipotropiny, a potem następnych lipotropin z innych gatunków.

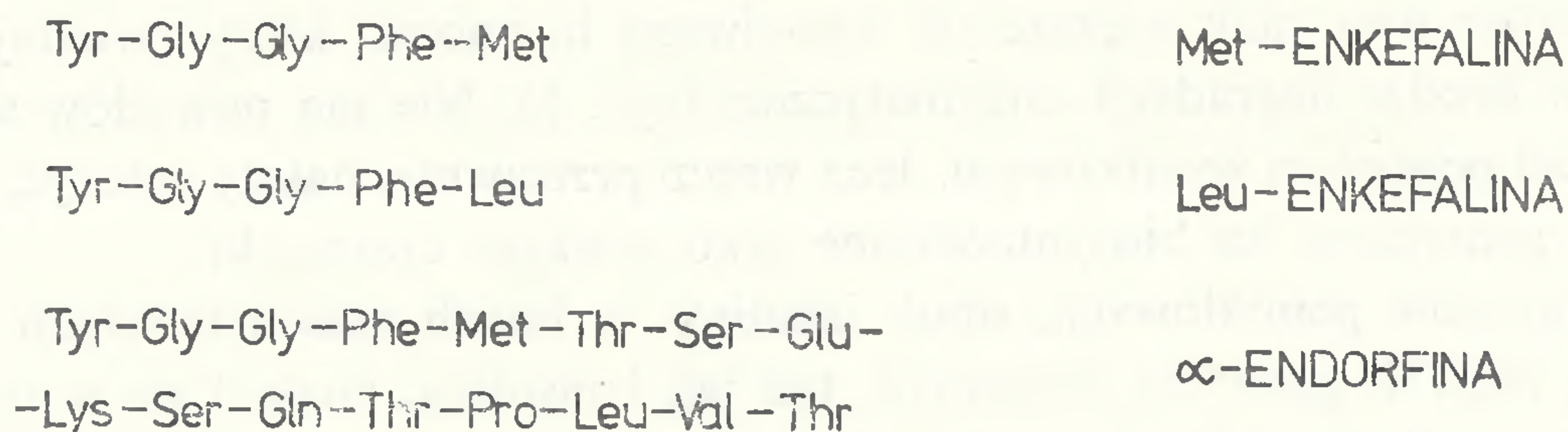
Już w 1973 r. stwierdza się w materiale biologicznym obecność tzw. dużego ACTH lub proACTH. Prawie równocześnie, bo w 1975 r. z ekstraktów mózgu wyodrębniono dwa pentapeptydy Met- i Leu-enkefalinę (ryc. 2) o profilu biologicznym, podobnym do morfiny, a w 1976 r. z podwzgórzy wyodrębniono heksadekapeptyd α -endorfinę także o aktywności morfinopodobnej. W sekwencji α -endorfiny zawarta jest sekwencja Met-enkefaliny, a sekwencja α -endorfiny okazała się

* Referat wygłoszony na 15 Konferencji Szkoleniowej z zakresu Biologii Komórki na temat neuropeptydów, zorganizowanej przez Sekcję Endokrynologii PAN, Polskie Towarzystwo Anatomiczne, Polskie Towarzystwo Histo- i Cytochemików oraz Redakcję Postępów Biologii Komórki 1985.11.22 w Warszawie. Referat opracowano na podstawie siedmiu artykułów przeglądowych cytowanych literaturze.

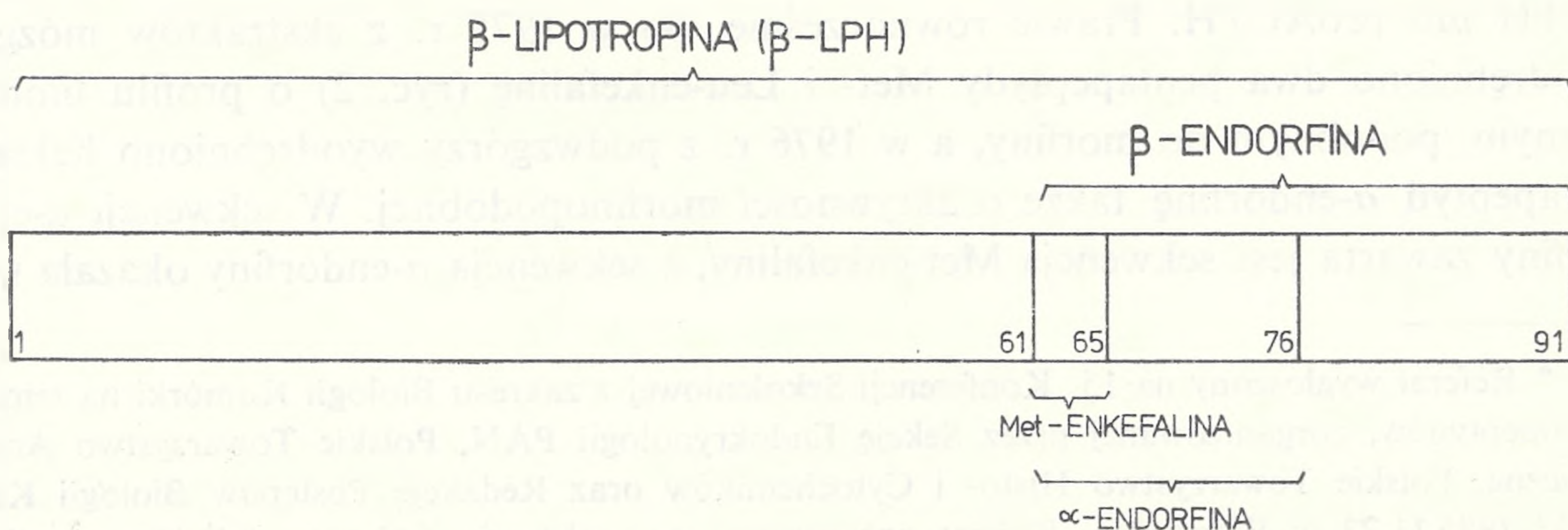
częścią β -endorfiny, również o działaniu morfinopodobnym. Z kolei sekwencja β -endorfiny jest C-końcowym fragmentem β -lipotropiny (ryc. 3). Wynika więc stąd hipoteza, że β -lipotropina jest prekursorem enkefalin, a brak w jej sekwencji Leu-enkefaliny przypisywano temu, że istnieje jeszcze większe białko — prekursor β -lipotropiny, w którego składzie znajduje się sekwencja Leu-enkefaliny.



Ryc. 1. Schematyczne przedstawienie proinsuliny. Strzałki wskazują miejsca rozszczepień enzymatycznych uwalniających insulinę



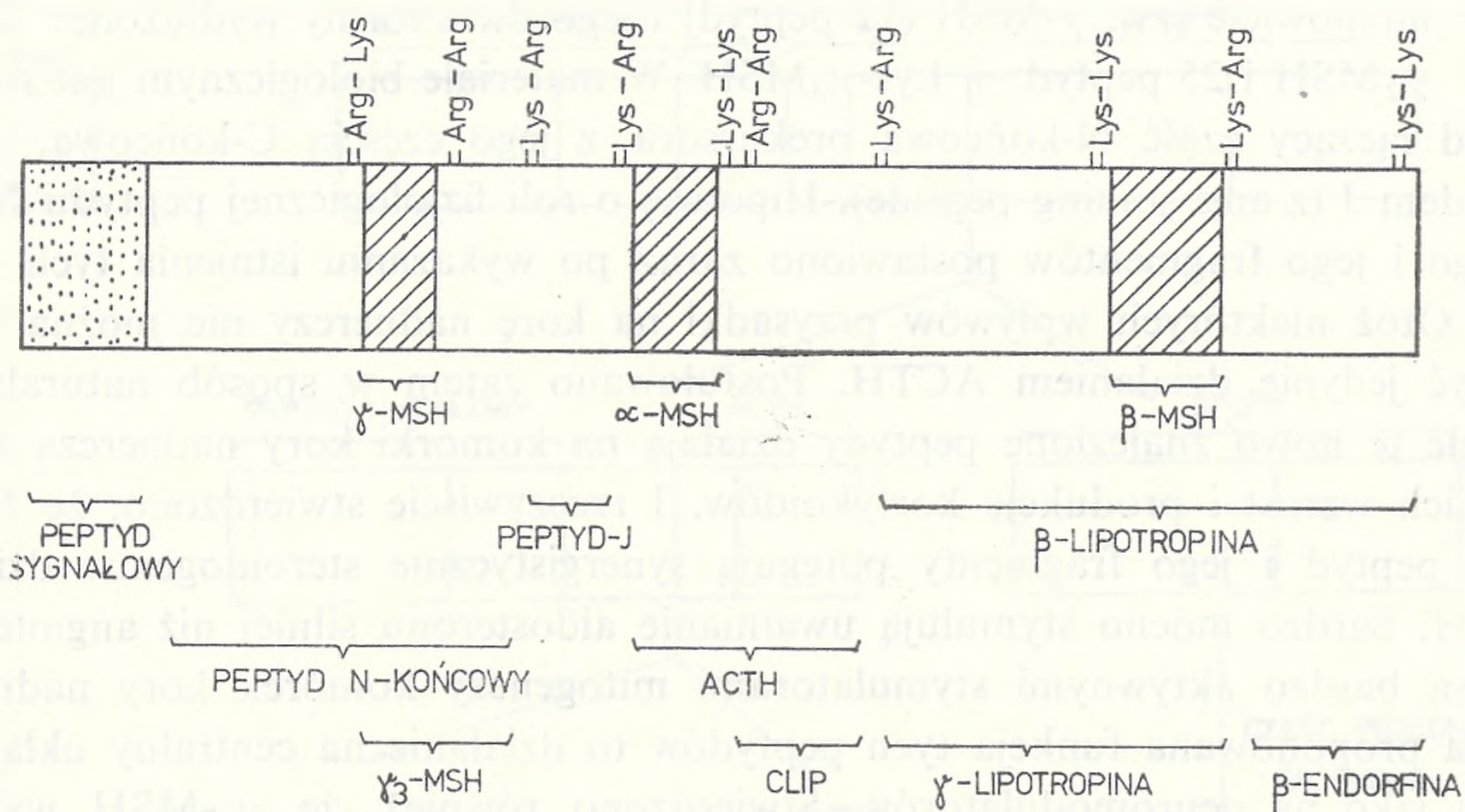
Ryc. 2. Sekwencje aminokwasowe enkefalin i α -endorfiny



Ryc. 3. Zależności między niektórymi peptydami opioidowymi i w obrębie β -lipotropiny

PREPRO-OPIOMELANOKORTYNA*

Poszukiwania i badania w latach 1977–1979 prekursora β -lipotropiny, jak i prekursora ACTH doprowadziły do wyodrębnienia z części gruczołowej mysiej przysadki mózgowej białka, które okazało się wspólnym prekursorem ACTH i β -lipotropiny, i które nazwano prekursorem ACTH- β -LPH. Jego całkowitą sekwencję ustalono w 1979 r. Wyodrębniono z części pośredniej bydłowej przysadki odpowiedni mRNA, wyklonowano cDNA i ustalono jego sekwencję. Pochodzący z badań białka i cDNA obraz prekursora, jaki się wyłonił, upoważniał do nazwania go jeszcze inaczej niż dotychczas, mianowicie prepro-opiomelanokortyna, gdyż w jego sekwencji, obok α -MSH zawartego w ACTH, i β -MSH zawartego w β -lipotropinie, była jeszcze w obrębie tzw. N-końcowego peptydu trzecia cząsteczka MSH, γ -MSH, dotychczas nieznanego.



Ryc. 4. Organizacja molekularna bydłowej prepro-opiomelanokortyny. CLIP — C-końcowy fragment kortykotropiny po odszczepieniu od niej α -MSH (z ang. corticotropin like intermediate lobe peptide)

Bydłeca prepro-opiomelanokortyna składa się z 265 aminokwasów. Na jej N-końcu znajduje się 26 peptyd sygnałowy niezbędny do translokacji białka przez błonę siateczki śródplazmatycznej. Ten peptyd sygnałowy, tak jak w przypadku prekursorów innych peptydów opioidowych, rozpoczyna się resztą metionylową. Wzdłuż sekwencji pro-opiomelanokortyny jest kilka charakterystycznych par reszt aminokwasów zasadowych, stanowiących miejsce działania enzymów proteolitycznych podobnych w charakterze do trypsyny i karboksypeptydazy B. O enzymach powodujących rozszczepienie prekursorów peptydów opioidowych wia-

* Inna nazwa: prekursor kortykotropiny i β -lipotropiny. Skrót: POMC lub ACTH- β -LPH prekursor.

domo do dziś niewiele. W 1984 r. doniesiono o oczyszczeniu do stanu najprawdopodobniej homogenności jednego z nich, mianowicie podobnego w działaniu do karboksypeptydazy B. Między parami aminokwasów zasadowych umieszczone są sekwencje hormonów tropowych i endorfinowych.

Jest więc sekwencja ACTH, a w niej α -MSH (13 peptyd) i tzw. peptyd CLIP (z ang. corticotropin-like intermediate lobe peptide). Jego roli fizjologicznej na razie nie znamy. Warto jednak przypomnieć, że (7–39) ACTH jest naturalnym antagonistą ACTH. Może zatem peptyd oznaczony CLIP ma podobną funkcję? W pro-opiomelanokortynie jest sekwencja β -lipotropiny, a w niej γ -lipotropina i β -endorfina. γ -lipotropina zawiera sekwencję β -MSH (u bydła — 18 peptyd, u człowieka — 22 peptyd). Mimo że w sekwencji β -endorfiny występuje sekwencja Met-enkefaliny, to nie zaobserwowano powstawania tego ostatniego peptydu z pro-opiomelanokortyny.

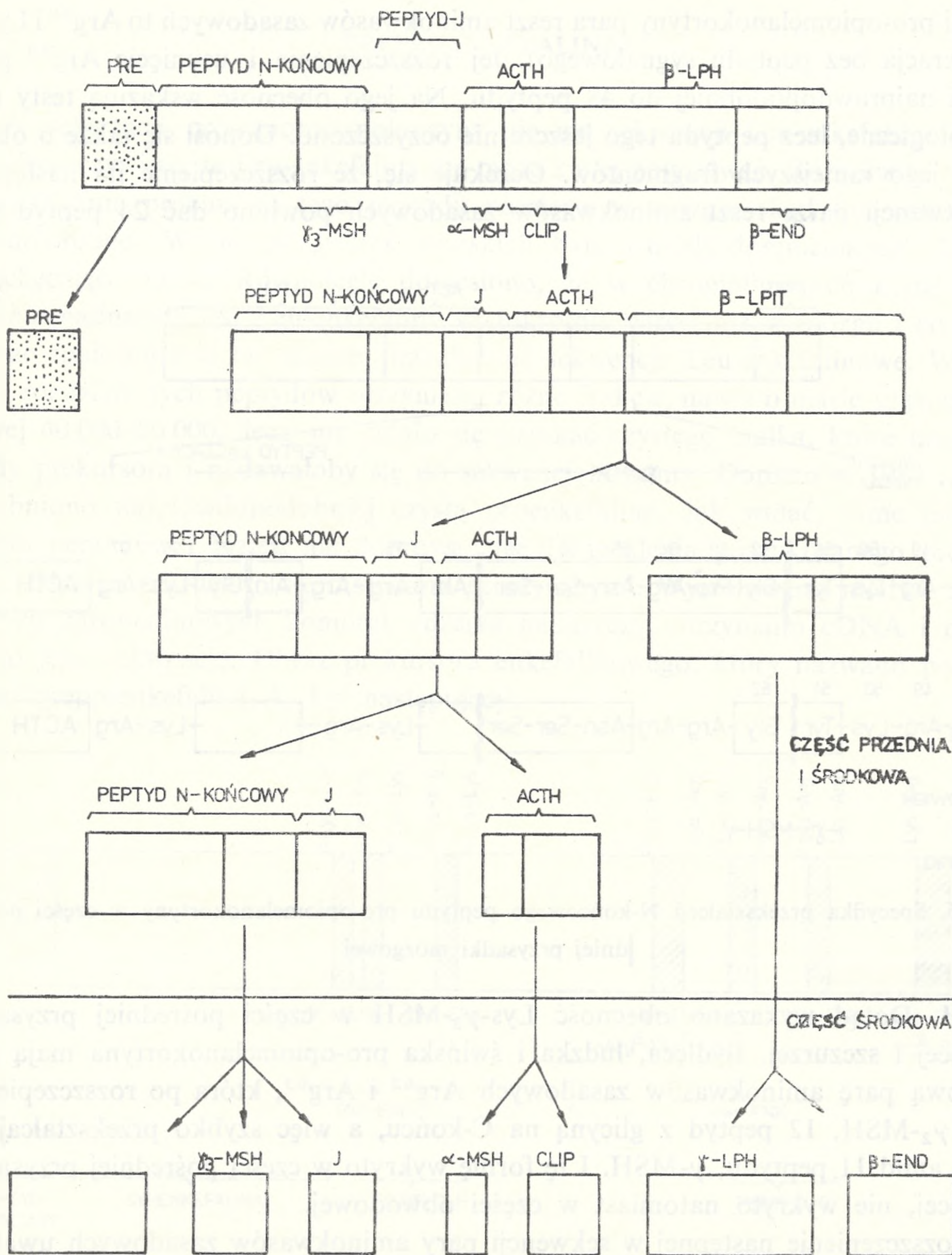
W połowie N-końcowej jest tzw. N-końcowy peptyd, który znaleziono w materiale biologicznym. Znaleziono też jego fragmenty, m. in. trzeci rodzaj cząsteczek MSH, mianowicie tzw. γ -MSH (11 peptyd) i jego dwie formy wydłużone: 12 peptyd — γ_2 MSH i 25 peptyd — Lys- γ_3 MSH. W materiale biologicznym jest również peptyd łączący część N-końcową prekursora z jego częścią C-końcową, zwany peptydem J (z ang. joining peptide). Hipotezę o roli fizjologicznej peptydu N-końcowego i jego fragmentów postawiono zaraz po wykazaniu istnienia tych związków. Otóż niektórych wpływów przysadki na korę nadnerczy nie można wytłumaczyć jedynie działaniem ACTH. Postulowano zatem w sposób naturalny, że właśnie te nowo znalezione peptydy działają na komórki kory nadnercza stymulując ich wzrost i produkcję kortykoidów. I rzeczywiście stwierdzono, że N-końcowy peptyd i jego fragmenty potęgują synergistycznie steroidogenne działanie ACTH, bardzo mocno stymulują uwalnianie aldosteronu silniej niż angiotensyna II i są bardzo aktywnymi stymulatorami mitogenezy komórek kory nadnercza. Druga proponowana funkcja tych peptydów to działanie na centralny układ nerwowy jako na neuromodulatorów. Stwierdzono również, że γ_3 -MSH wykazuje silny efekt hypotermiczny i efekt przejściowej nadaktywności behawioralnej.

Po oznaczeniu sekwencji bydłowej prepro-opiomelanokortyny oznaczono także sekwencję prekursora mysiego, szczurzego i ludzkiego. Okazały się one bardzo podobne. We wszystkich występują regiony wysoce konserwatywne o stopniu homologii przeciętnie 90%, a dochodzącym i do 100%. Te konserwatywne regiony to: peptyd N-końcowy, ACTH i β -endorfina. Duża homologia świadczy o ich ważnej roli biologicznej, w tym i peptydu N-końcowego, o którego działaniu wiemy na razie bardzo niewiele. W innych obszarach pro-opiomelanokortyny homologia wynosi przeciętnie 50%.

Uwalnianie z białka prekursorowego poszczególnych hormonów jest regulowane mechanizmami kaskadowymi na wszystkich etapach, począwszy od syntezy mRNA, przez jego translację i posttranslacyjne modyfikacje białka do jego proteolizy. Wyodrębniono kilka czynników regulatorowych i stwierdzono, że każdy z wymienionych etapów wykazuje specyficzność tkankową. Te same czynniki, które regulują transkrypcję genu prepro-opiomelanokortyny w jednej tkance, nie

działają w drugiej, nawet bardzo podobnej, jak np. części przysadki mózgowej. W regulacji proteolizy obserwuje się jeszcze inny rodzaj specyficzności tkankowej, mianowicie w zależności od tkanki uwalniane są inne typy bioaktywnych peptydów. Omówimy to na przykładzie obwodowej i pośredniej części przysadki mózgowej szczura (ryc. 5).

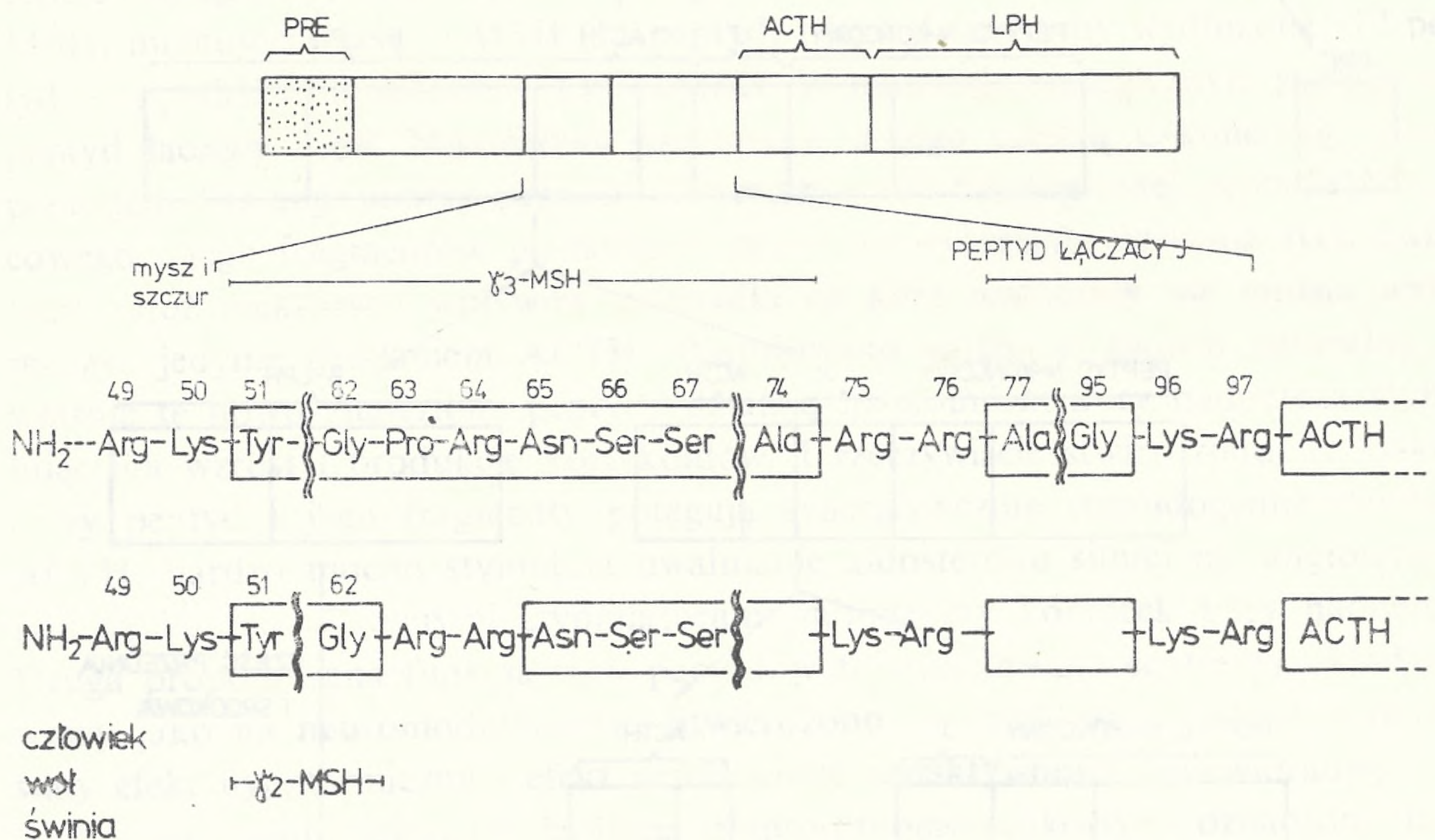
W części obwodowej przysadki mózgowej przeważa ACTH, podczas gdy w części pośredniej — α -MSH i peptyd CLIP. Postawiono więc hipotezę, że właśnie



Ryc. 5. Specyfika przekształceń pro-opiomelanokortyny w obwodowej i pośredniej części przysadki mózgowej

ACTH jest bezpośrednim prekursorem α -MSH i peptydu CLIP. Obydwie części różnią się zawartością β -lipotropiny, β -endorfiny i N-acylowanych pochodnych tej ostatniej. Część obwodowa zawiera głównie β -lipotropinę, natomiast pośrednia głównie β -endorfinę i jej pochodne. Ponieważ N-acylowanie β -endorfiny pozbawia ją działania analgetycznego, może to być więc mechanizm regulowania jej aktywności w przysadce.

Mniej znane są przekształcenia peptydu N-końcowego, chociaż wiadomo, że jest on intensywniej rozszczepiany w części pośredniej przysadki (ryc. 6). Pierwsza w sekwencji pro-opiomelanokortyny para reszt aminokwasów zasadowych to Arg⁴⁹ i Lys⁵⁰ (numeracja bez peptydu sygnałowego). Jej rozszczepienie i usunięcie Arg⁴⁹ prowadzi najprawdopodobniej do 48 peptydu. Na jego obecność wskazują testy immunologiczne, lecz peptydu tego jeszcze nie oczyszczono. Donosi się także o obecności jego mniejszych fragmentów. Oczekuje się, że rozszczepienie na następnej w sekwencji parze reszt aminokwasów zasadowych powinno dać 24 peptyd γ_3 -



Ryc. 6. Specyfika przekształceń N-końcowego peptydu pro-opiomelanokortyny w części pośredniej przysadki mózgowej

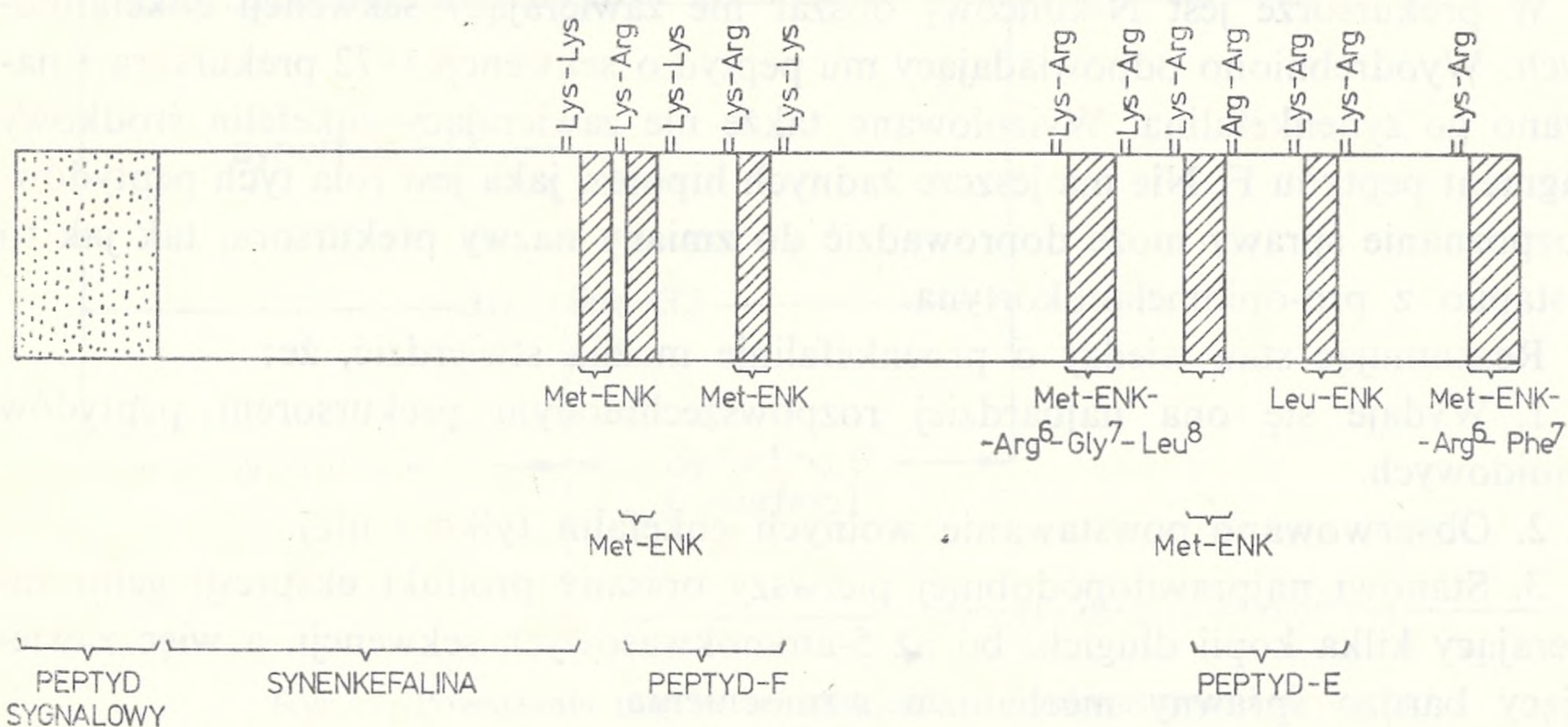
-MSH. Dotąd wykazano obecność Lys- γ_3 -MSH w części pośredniej przysadki bydlęcej i szczurzej. Bydlęca, ludzka i świńska pro-opiomelanokortyna mają dodatkową parę aminokwasów zasadowych Arg⁶² i Arg⁶³, która po rozszczepieniu daje γ_2 -MSH, 12 peptyd z glicyną na C-końcu, a więc szybko przekształcający się w amid 11 peptydu, γ -MSH. I tę formę wykryto w części pośredniej przysadki bydlęcej, nie wykryto natomiast w części obwodowej.

Rozszczepienie następnej w sekwencji pary aminokwasów zasadowych uwalnia tzw. peptyd J o charakterze kwasowym. Jego długość wynosi od 19 reszt aminokwasowych u myszy do 31 u człowieka. U niektórych gatunków ma on formę amidu.

Rekapitułując stan wiedzy o pro-opiomelanokortynie, możemy stwierdzić, że pro-opiomelanokortyna jest pierwszą scharakteryzowaną neuroendokrynną białkową cząsteczką prekursorową multihormonalną, czyli jest źródłem peptydów regulatorowych wspólnych dla systemów nerwowego i endokrynnego. Stanowi ona doskonały przykład możliwości komórek eukariotycznych tworzenia z produktu ekspresji jednego genu różnorodnych funkcjonalnie peptydów.

PREPROENKEFALINA*

W sekwencji pro-opiomelanokortyny nie ma sekwencji Leu-enkefaliny. Stało się więc oczywiste, że Leu-enkefalina nie może z niej powstawać. Rozpoczęto zatem poszukiwania prekursora tego peptydu najpierw w mózgu, skąd Leu-enkefalinę wyodrębniono. W mózgu świnek morskich było jednak domniemanego białka zniechęcająco mało. Równolegle doniesiono, że w chromafinowych komórkach rdzenia nadnerczy jest Leu-enkefaliny wielokrotnie więcej niż w mózgu i co ważniejsze znaleziono w tej tkance przedłużone sekwencje Leu-enkefalinowe. W wyniku rozdziału tych peptydów otrzymano różne frakcje, nawet o masie cząsteczkowej 40 000–50 000, lecz nie udało się uzyskać czystego białka, które nosiłoby cechy prekursora i nadawałoby się do sekwencjonowania. Dopiero w 1984 r. wyodrębniono najprawdopodobniej czystą proenkefalinę. Jak widać, same metody chemii peptydów i białek nie doprowadziły do ustalenia poszukiwanego prekursora. Dlatego posłużono się metodami genetycznymi. Wyizolowano mRNA z bydłych chromafinowych komórek rdzenia nadnerczy, otrzymano cDNA i oznaczono jego sekwencję. Obraz prekursora enkefalinowego, który nazwano początkowo preproenkefaliną A, był następujący:



Ryc. 7. Organizacja molekularna bydłowej preproenkefaliny, ENK — enkefalina

* Inna nazwa — preproenkefalina A.

Prekursor składa się z 263 aminokwasów i zawiera 24-aminokwasowy peptyd sygnałowy. Wzdłuż cząsteczki rozmieszczone jest 12 par reszt aminokwasów zasadowych, między którymi zawarte są sekwencje:

czterech kopii Met-enkefaliny,

Leu-enkefaliny,

Met-enkefaliny wydłużonej o Arg⁶-Gly⁷-Leu⁸ (andrenorfina lub metorfamid),

Met-enkefaliny wydłużonej o Arg⁶-Phe⁷.

Razem w prekursorze enkefalinowym występuje siedem sekwencji enkefalinowych, w tym dwie sekwencje przedłużone od C-końca i tylko jedna sekwencja Leu-enkefaliny. Nazwano więc początkowo białko preproenkefaliną A, zakładając, że jeszcze musi istnieć prekursor Leu-enkefaliny, a więc preproenkefalina B. W dalszych badaniach znaleziono jednak tylko prekursor wydłużonych form Leu-enkefaliny (dynorfiny). Wobec tego proenkefalinę A nazwano krótko proenkefaliną, uznając tym samym fakt, że jest ona jedynym prekursorem enkefalin.

W trakcie nieudanych prób wyodrębnienia prekursora enkefalinowego otrzymano kilka peptydów dłuższych niż kilkuaminokwasowe, zawierających jedną lub dwie sekwencje enkefaliny. Okazały się one częściami prekursora. Na ryc. 7 pokazano przykładowo dwa takie peptydy: E i F. Mają one także aktywność opiatową, czasami wyższą niż enkefaliny (test jelita świnki morskiej), której warunkiem jest arginina w pozycji 7 i aminokwas zasadowy w pozycji 10 lub 11. Obok sekwencji proenkefaliny bydlęcej oznaczono sekwencję prekursora ludzkiego. Otóż wiele z dłuższych peptydów, o których mowa, okazało się całkowicie konserwatywnych w tych dwóch gatunkach. Tymczasem o funkcji fizjologicznej tych peptydów nie wiemy prawie nic. W rdzeniu nadnercza enkefaliny i peptydy je zawierające uwalniane są razem z katecholoaminami, zatem być może wpływają one na działanie tych ostatnich w miejscach peryferyjnych. Są przesłanki, aby sądzić, że jest to działanie antagonistyczne.

W prekursorze jest N-końcowy obszar nie zawierający sekwencji enkefalinowych. Wyodrębniono odpowiadający mu peptyd o sekwencji 1-72 prekursora i nazwano go synenkefaliną. Wyizolowano także nie zawierający enkefelin środkowy fragment peptydu F. Nie ma jeszcze żadnych hipotez, jaka jest rola tych peptydów. Rozpoznanie sprawy może doprowadzić do zmiany nazwy prekursora, tak jak to nastąpiło z pro-opiomelanokortyną.

Reasumując stan wiedzy o proenkefalinie można stwierdzić, że:

1. Wydaje się ona najbardziej rozpowszechnionym prekursorem peptydów opioidowych.

2. Obserwowano powstawanie wolnych enkefalin tylko z niej.

3. Stanowi najprawdopodobniej pierwszy opisany produkt ekspresji genu zawierający kilka kopii długich, bo aż 5-aminokwasowych sekwencji, a więc zawierający bardzo sprawny mechanizm wzmocnienia.

PREPRODYNORFINA*

Już od 1975 r. gromadzono fakty, które naprowadziły na trop trzeciego prekursora peptydów opioidowych i wyodrębniono, chociaż jeszcze nie scharakteryzowano, ciekawy peptyd o właściwościach opiatowych.

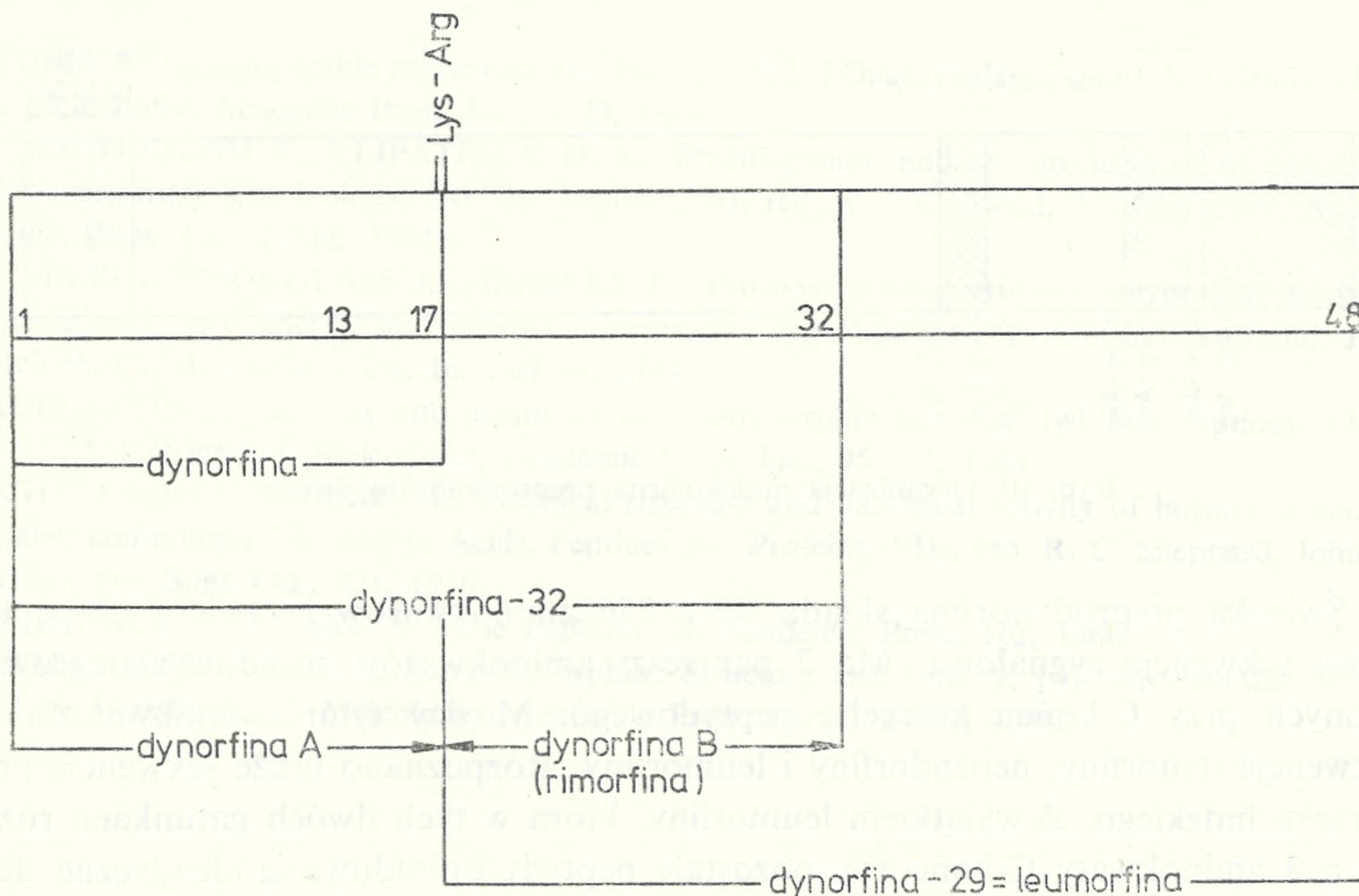
1. Miał on bardzo duże powinowactwo do receptorów jelita świnki morskiej, stąd nazwano go dynorfiną (od grec. dyn — siła, potęga).

2. Jego masa cząsteczkowa wynosiła około 1800, a więc leżała między enkefalinami a β -endorfiną.

3. Peptyd był mocno zasadowy, a więc zawierał reszty argininowe.

4. Jego aktywność nie zmieniała się pod wpływem bromocyjanu (BrCN), lecz była bardziej podatna na hydrolizę trypsyną niż aktywność β -endorfiny.

Wyciągnięto stąd wniosek, że peptyd jest wydłużoną formą Leu-enkefaliny. Peptyd oczyszczono i stwierdzono, że składa się z siedemnastu reszt aminokwasowych. Ustalono w sposób pewny sekwencję pierwszych 13 aminokwasów, a 14 miejsce było niepewne. Zsyntezowano wobec tego 13 peptyd, który wykazał znaczną aktywność równą aktywności 17 peptydu. Wtedy udało się wyizolować dłuższą formę dynorfiny, tzw. dynorfinę-32 (ryc. 8). W jej cząsteczce była sekwencja Lys-Arg i peptyd można było rozszczepić na 17 i 13 peptyd. Peptyd 13 miał także w swoim obrębie sekwencję Leu-enkefaliny. Nazwano wobec tego pierwszy peptyd dynorfiną

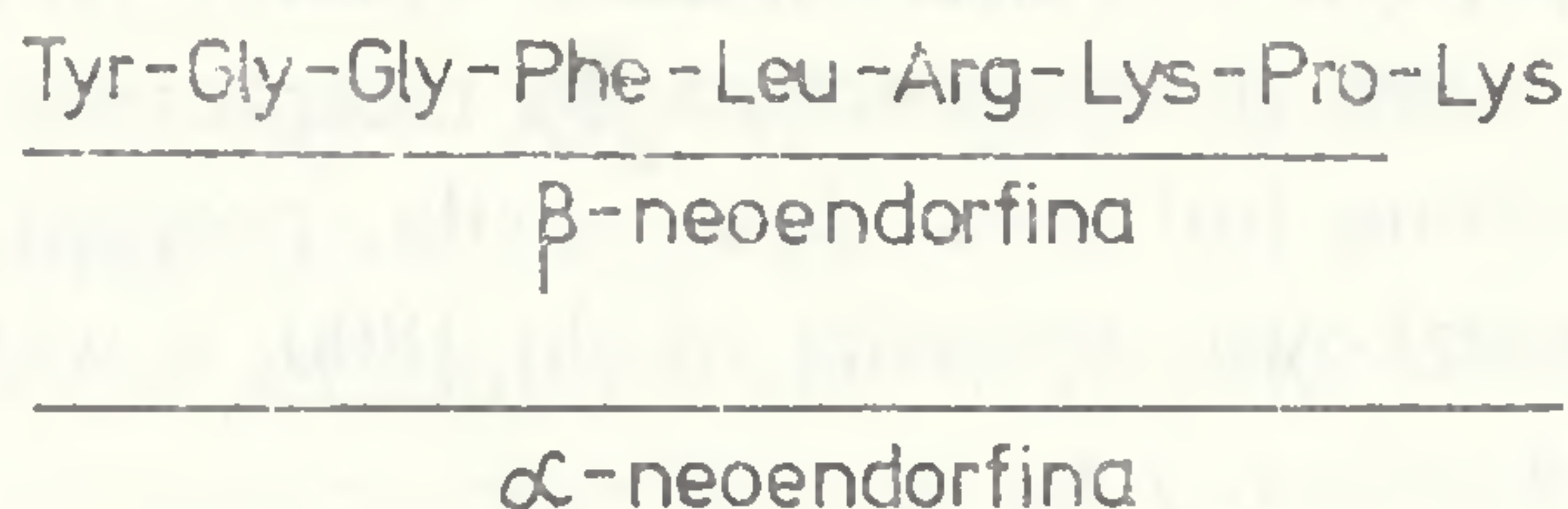


Ryc. 8. Powiązania między sekwencjami aminokwasowymi dynorfin

* Inne nazwy — preproenkefalina B i prepronorfina.

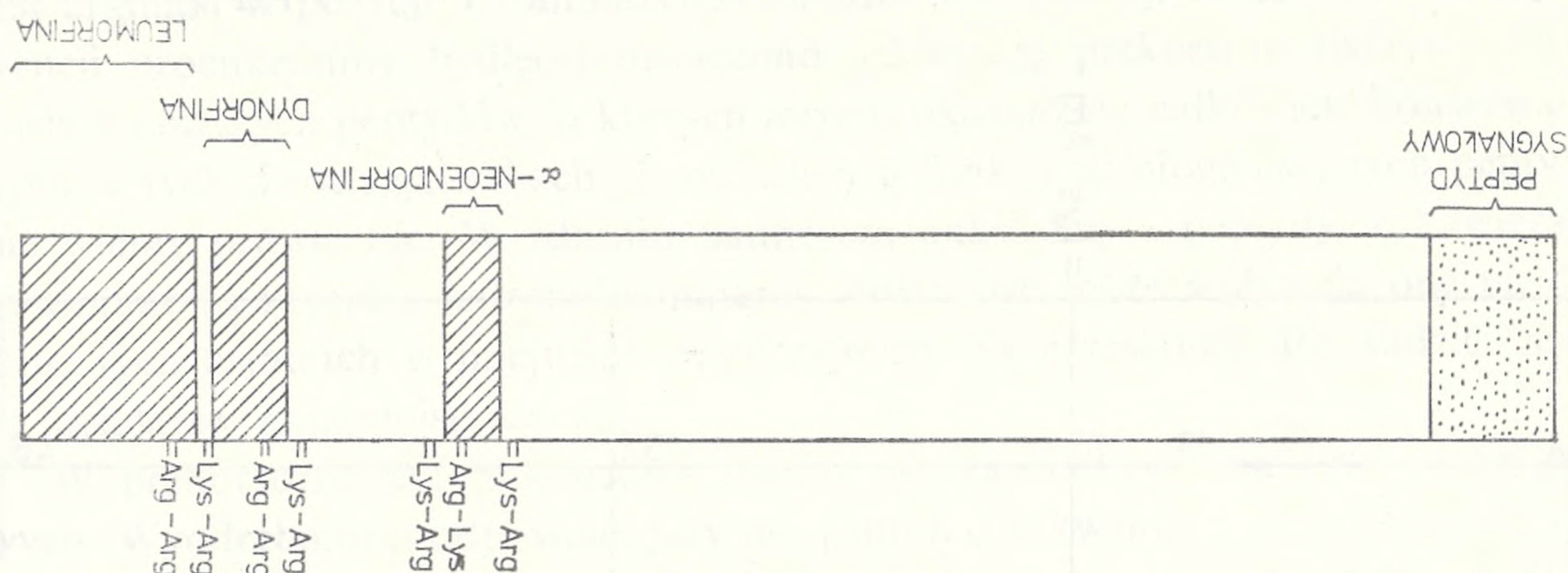
A, a drugi — dynorfiną B lub rimorfiną. Wyodrębniono te żpeptyd będący dynorfiną B wydłużoną o 16 reszt aminokwasowych. Nazwano go leumorfiną.

Wreszcie wykryto neoendorfinę α (oktapeptyd) i neoendorfinę β (nonapeptyd), które tak jak dynorfiny okazały się wydłużonymi formami Leu-enkefaliny.



Ryc. 9. Sekwencja aminokwasowa neoendorfin

Nagromadzono dowody wspólnego występowania dynorfin i neoendorfin w mózgu. Doprowadziło to do wniosku, że dynorfiny i neoendorfiny mają wspólną cząsteczkę prekursorową, tzn. są produktami ekspresji tego samego genu. Tak jak w przypadkach poprzednich prekursorów wyodrębniono mRNA, otrzymano cDNA i oznaczono jego sekwencję. Tym razem była to sekwencja prekursora świni. Prekursor nazwano preproenkefaniną B lub preprodynorfiną lub prepronorfiną.



Ryc. 10. Organizacja molekularna preprodynorfiny świni

Świńska preprodynorfina składa się z 256 aminokwasów i zawiera 20-peptydową sekwencję sygnałową. Ma 7 par reszt aminokwasów zasadowych zgromadzonych przy C-końcu łańcucha peptydowego. Między tymi aminokwasami są sekwencje dynorfiny, neoendorfiny i leumorfiny. Rozpoznano także sekwencję prekursora ludzkiego. Z wyjątkiem leumorfiny, która w tych dwóch gatunkach różni się o 3 aminokwasy C-końcowe, pozostałe peptydy opioidowe są idendyczne. Jest to ostatni z rozpoznanych prekursorów i na razie jeszcze mało znany. W prekursorze np. jest bardzo duży obszar ciągnący się od jego N-końca, o którego przekształceniach i funkcjach nie wiemy nic.

UWAGI KOŃCOWE

1. Znamy trzy prekursory peptydów opioidowych: endorfinowy, enkefalinowy i dynorfinowy.

2. Wszystkie prekursory biosyntezy są razem z sekwencjami sygnałowymi, a więc ulegają modyfikacjom posttranslacyjnym. Mają zbliżoną wielkość i zawierają około 260 reszt aminokwasowych.

3. Prekursory, obok peptydów opioidowych, zawierają w swojej sekwencji inne peptydy regulatorowe. Znamy tylko niektóre funkcje nielicznych spośród tych innych peptydów.

4. Ekspresja genów prekursorów następuje w różnych tkankach, a wynik proteolizy białek prekursorowych jest specyficzny tkankowo, przy czym niewiele wiemy o enzymach powodujących rozszczepienie prekursorów i mechanizmach regulacji ich działania.

5. Otwartą sprawą jest pochodzenie w organizmach Leu-enkefaliny (z prekursora enkefalinowego czy dynorfinowego?).

LITERATURA

- [1] NUMA S., Opioid peptide precursors and their genes, [w] *The Peptides*, VI, red. S. Udenfriend, J. Meienhofer, Academic Press, Inc., 1-23, 1984.
- [2] UNDERFRIEND S., KLIPATRICK D. L., Proenkephalin and the products of its processing: chemistry and biology, [w] *The Peptides*, VI, red. S. Udenfriend, J. Meienhofer, Academic Press, Inc., 25-68, 1984.
- [3] CIVELLI O., DOUGLASS J., HERBERT E., Pro-opiomelanocortin: A polyprotein at the interface of the endocrine and nervous systems, [w] *The Peptides*, VI, red. S. Udenfriend, J. Meienhofer, Academic Press, Inc., 69-94, 1984.
- [4] GOLDSTEIN A., Biology and chemistry of the dynorphin peptides, [w] *The Peptides*, VI, red. S. Udenfriend, J. Meienhofer, Academic Press, Inc., 95-145, 1984.
- [5] SCHAFER D. J., SZELKE M., Chemical structure and biological activity of hormones and related compounds, [w] *Amino Acids, Peptides and Proteins*, VIII, red. R. C. Sheppard, John Wright and Sons Ltd., 421, 1976.
- [6] SCHRÖDER E., LÜBKE K., *The Peptides*, II, Academic Press, 162, 1966.
- [7] YAMASHIRO D., LI Ch. H., β -Endorphin: Structure and activity, [w] *The Peptides*, VI, red. S. Udenfriend, J. Meienhofer, Academic Press, Inc., 191-217, 1984.

Faint, illegible text, likely bleed-through from the reverse side of the page.

Faint, illegible text, likely bleed-through from the reverse side of the page.

FARMAKOLOGIA MOLEKULARNA β -ENDORFINY*MOLECULAR PHARMACOLOGY OF β -ENDORPHIN

Barbara RZESZOTARSKA

Zakład Chemii Organicznej, Instytut Chemii,
Wyższa Szkoła Pedagogiczna, Opole

Streszczenie. Omówiono różne podejścia do badania molekularnego oddziaływania β -endorfiny z receptorem. Przedyskutowano otrzymane wyniki.

Summary. Various approaches to investigation of molecular interaction of β -endorphin with its receptor as well as obtained results have been discussed.

Farmakologia molekularna zajmuje się mechanizmem oddziaływania związku biologicznie czynnego z receptorem i zależnością między strukturą tego związku a jego aktywnością.

Zbieżność neurofarmakologii z endokrynologią wyłaniająca się po odkryciu sekwencji Met-enkefaliny w sekwencji β -lipotropiny (1975 r.) uzyskała molekularny dowód w sekwencji prepro-opiomelanokortyny, wspólnego prekursora niektórych hormonów tropowych i neurohormonów (1979 r.). Od tego momentu rośnie zainteresowanie β -endorfiną (ryc. 1), głównym agonistą opioidowym, pochodzącym z przekształceń enzymatycznych pro-opiomelanokortyny.

Mimo wielu lat badań nie znaleziono modelu receptorów opioidowych, a więc i modelu receptorów endorfinowych. Udało się jednak w chwili obecnej osiągnąć konsensus odnośnie do pewnych wspólnych cech różnych modeli kompleksów β -endorfina–receptor. Stwierdzono, że do pełnej biologicznej aktywności neuro-

* Referat wygłoszony na 15 Konferencji Szkoleniowej z zakresu Biologii Komórki na temat neuropeptydów, zorganizowanej przez Sekcję Endokrynologii PAN, Polskie Towarzystwo Anatomiczne, Polskie Towarzystwo Histo- i Cytochemików oraz Redakcję Postępów Biologii Komórki 1985.11.22 w Warszawie. Referat opracowano na podstawie siedmiu artykułów przeglądowych cytowanych w literaturze.

PODEJŚCIE KONFORMACYJNE DO BADANIA ODDZIAŁYWANIA
 β -ENDORFINA-RECEPTOR

Wyobrażenie aktywnej konformacji łańcucha β -endorfiny w oddziaływaniu z receptorem jest bardzo niejasne.

Rysunek 2 pochodzący z 1982 r. przedstawia następujący obraz:

N-koniec endorfiny ma strukturę przypadkowego zwoju;

dalej w łańcuchu występuje struktura α -helisy,

jeszcze dalej znajduje się β -sfałdowanie,

na C-koncu cząsteczki mamy β -zgięcie.

Pewne fakty, budzą wątpliwości w akceptowaniu tego modelu w szczególach.

W roztworze wodnym struktura N-konca peptydu nie jest przypadkowa, lecz uporządkowana. Należy więc sądzić, że jest uporządkowana i w kontaktach z receptorem.

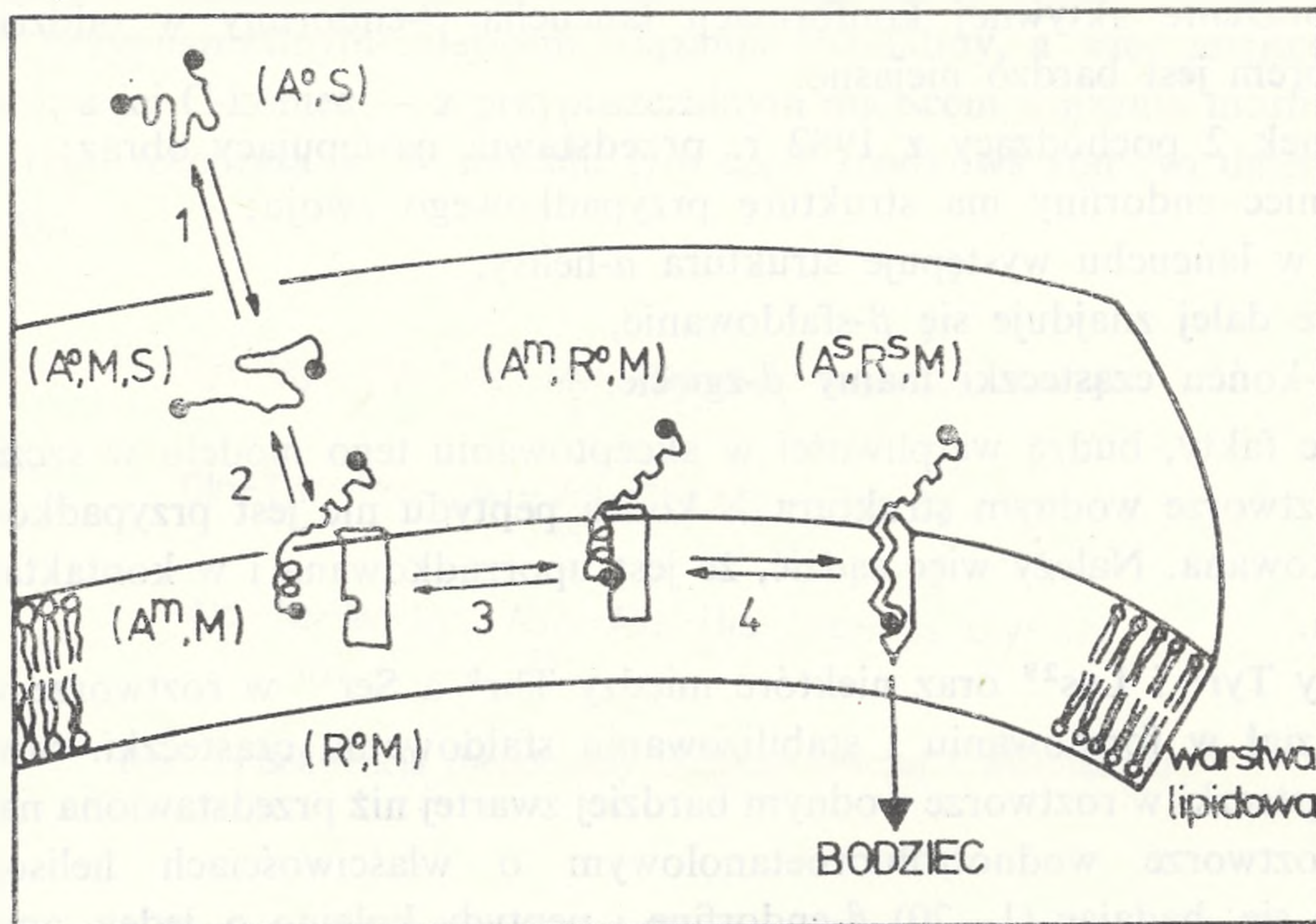
Reszty Tyr¹ i Lys²⁸ oraz niektóre między Thr⁶ a Ser¹⁰ w roztworze wodnym biorą udział w formowaniu i stabilizowaniu sfałdowania cząsteczki. Stwarza to obraz cząsteczki w roztworze wodnym bardziej zwartej niż przedstawiona na rycinie.

W roztworze wodnotrifluoroetanolowym o właściwościach helisogennych stwierdza się, badając (1–20) β -endorfinę i peptydy kolejno o jeden aminokwas dłuższe, wzrost helikalności łańcucha korelujący ze wzrostem aktywności w teście jelita świnki morskiej, immunogennym, analgetycznym i wiązania do receptorów. Wydaje się więc, że w działaniu biologicznym ważny jest potencjał helisotwórczy reszt aminokwasowych β -endorfiny od 21 do 31. Cała cząsteczka β -endorfiny w roztworze wodnotrifluoroetanolowym ma 40% struktury w formie α -helisy.

W 1984 r. stwierdzono, że dotychczas obowiązujący model 1-etapowego oddziaływania agonisty z receptorem nie może być akceptowany. Wyłania się bardziej kompleksowe spojrzenie na tę interakcję. Otóż Schwyzer badając oddziaływanie ACTH lub dynorfiny ze sztucznymi membranami stwierdza indukowanie różnych konfiguracji i orientacji cząsteczki peptydu. Sugeruje to ważną rolę lipidowej fazy błony docelowej w pośredniczeniu w funkcjonalnych kontaktach peptyd–receptor i ich katalizowaniu. Schwyzer buduje model mechanizmu oddziaływania peptyd–receptor katalizowanego błoną lipidową, przedstawiony na ryc. 3.

W cytoplazmie agonista ma mniej lub bardziej giętką przypadkową konformację (A^0) i jest zasocjowany z drobnocząsteczkowymi związkami z roztworu, zwanymi ogólnie solwentem (A^0S). W pierwszym etapie agonista adsorbuje się siłami elektrostatycznymi na granicy faz warstwa wodna–błona i tworzy luźny kompleks (A^0MS). W etapie drugim peptyd wbudowuje się w warstwę lipidową, następuje odłączenie solwentu i tworzy się kompleks agonista–błona (A^mM). W etapie trzecim następuje dyfuzja agonisty do receptora i tworzy się 3-składnikowy luźny kompleks (A^mR^0M), a więc między agonistą w konformacji związanej z membraną A^m , receptorem niepobudzonym R^0 i lipidami błonowymi M . W etapie czwartym zmienia się zarówno konformacja agonisty, jak i receptora i tworzy się

kompleks między agonistą w formie stymulującej a stymulowanym receptorem zanurzonym w błonie ($A^S R^S M$). Etapem rządzącym stymulacją receptora jest etap o największej energii aktywacji.



Ryc. 3. Model oddziaływania peptyd-receptor katalizowanego błoną lipidową

Model ten nasuwa następujące pytania: która konformacja β -endorfiny rzędzi stymulacją receptora i jaką konformację cząsteczki badamy, tj. z którego etapu jej oddziaływania z receptorem? Pytania te być może wiążą się z niejasnym wyobrażeniem aktywnej konformacji β -endorfiny.

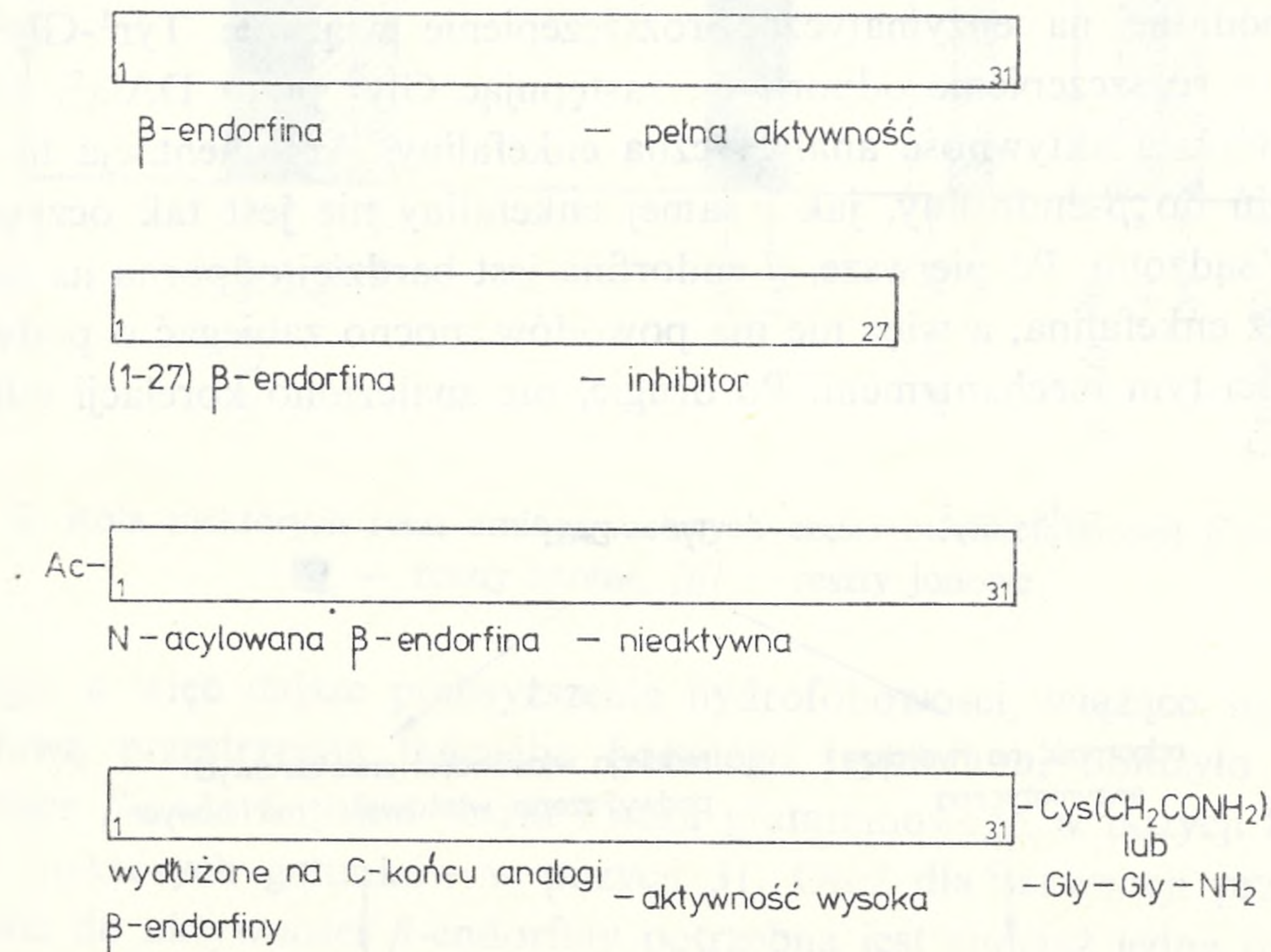
PODEJŚCIE CHEMICZNE DO BADANIA ODDZIAŁYWANIA β -ENDORFINA-RECEPTOR

Do badania zależności między strukturą chemiczną a aktywnością β -endorfiny syntezowano:

1. sekwencje skrócone i wydłużone,
2. sekwencje zhybrydyzowane,
3. sekwencje z aminokwasami wymienionymi na inne.

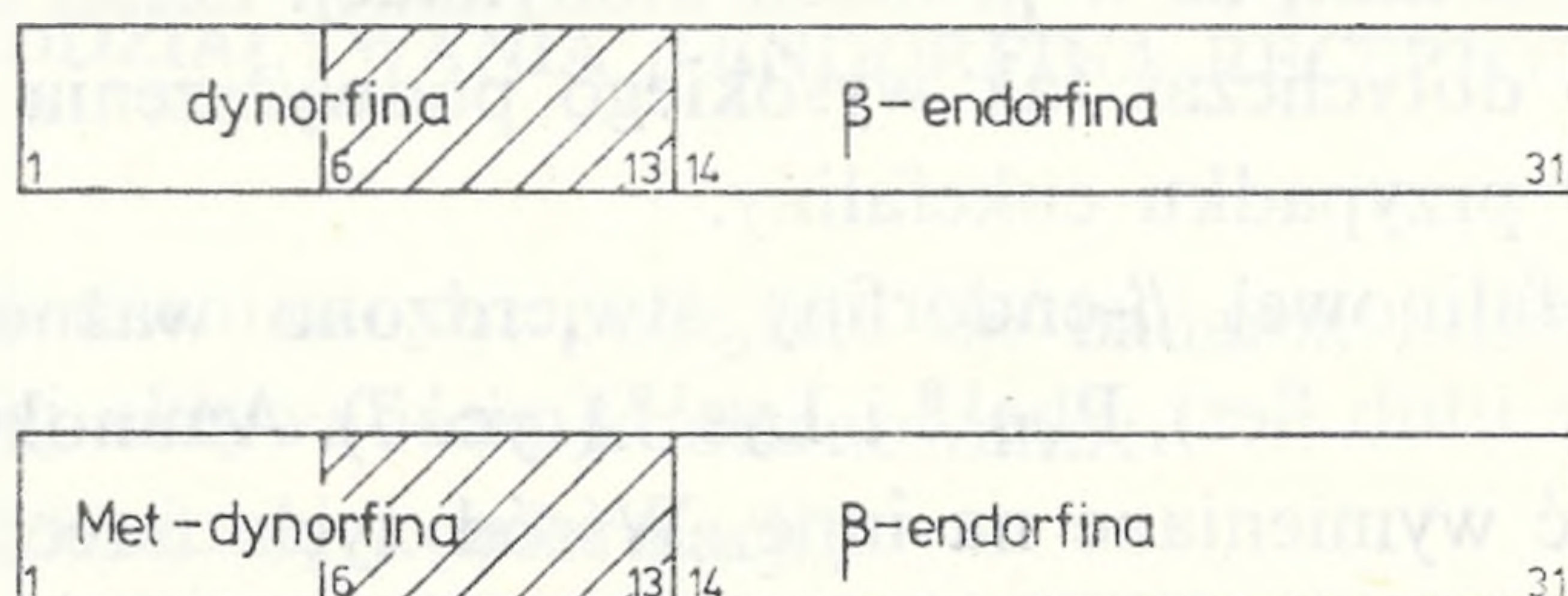
Ad 1. Skracanie łańcucha β -endorfiny zarówno od C-, a zwłaszcza od N-końca powoduje, jak wspomniano, spadek jej aktywności. (1–27) β -endorfina wykazuje już właściwości inhibitorowe. Nie można też bez ujemnych skutków dla działania biologicznego przedłużać łańcucha peptydu od N-końca. Acylowanie grupy aminowej N-końcowej tyrozyny daje peptyd nieaktywny. Można bez wpływu na czyn-

ność biologiczną β -endorfiny przedłużać jej łańcuch od C-końca. Otrzymano np. [Cys(OH₂CONH₂)³²] β -endorfinę i [Gly³², Gly-NH₂³³] β -endorfinę i są one wysokoaktywne (ryc. 4). „Wycięcie” z cząsteczki β -endorfiny środkowego odcinka od pozycji 6 do 15 daje (1–5)(16–31) β -endorfinę o aktywności w teście jelita świnki morskiej wyższej niż peptydu macierzystego, lecz o aktywności analgetycznej o trzy rzędy niższej.



Ryc. 4. Wpływ skracania i wydłużania łańcucha β -endorfiny na jej aktywność

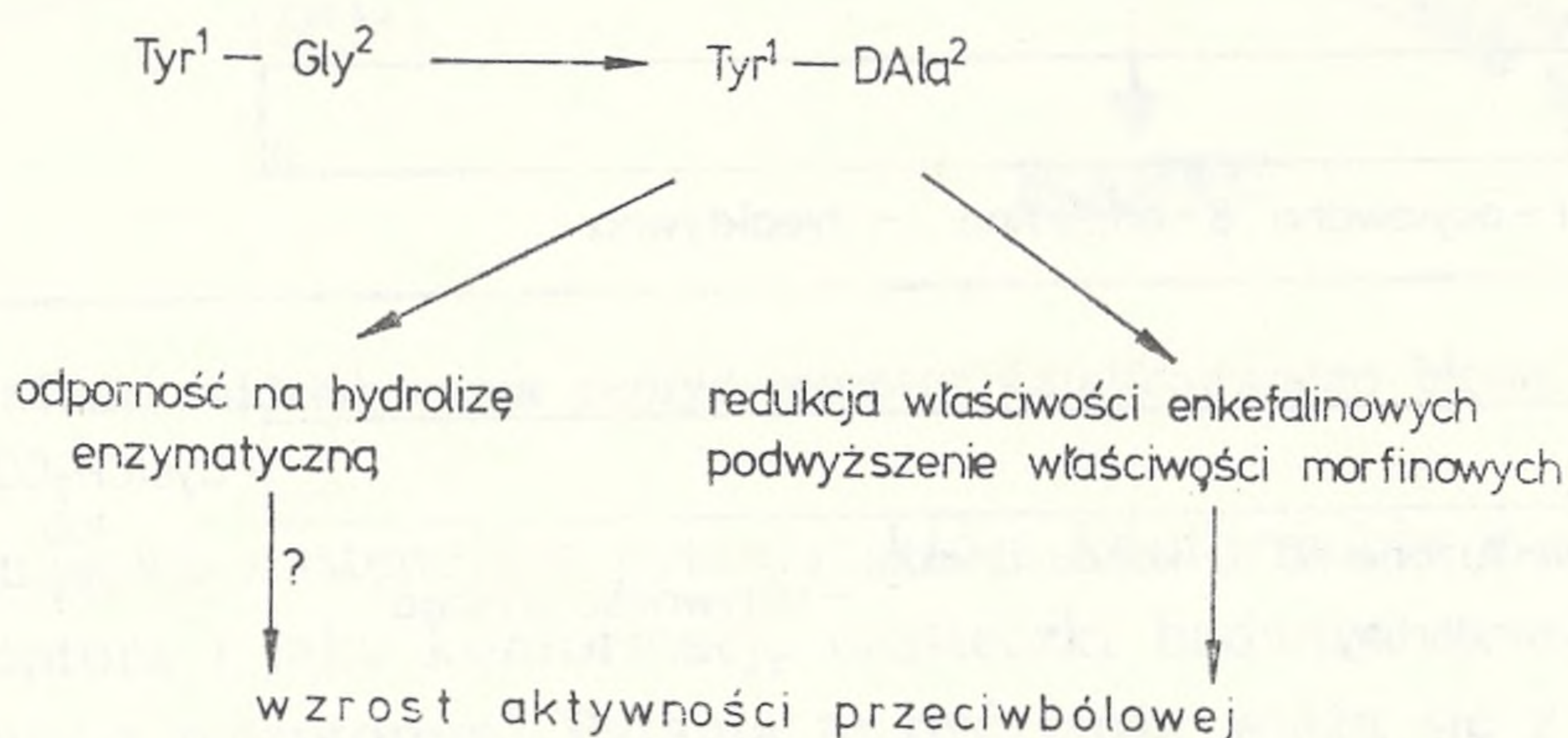
Ad 2. Zsyntezowano m. in. hybryd (1–13) dynorfiny i (1–13) [Met⁵] dynorfiny z (14–31) β -endorfiną (ryc. 5). Związki te w stosunku do β -endorfiny różnią się sekwencją aminokwasową od pozycji 6 do 13. Hybrydy nie miały aktywności ani dynorfinowej, ani β -endorfinowej. Stąd wniosek, że reszty aminokwasowe od pozycji 6 do 13 mają najprawdopodobniej zupełnie inną funkcję w dynorfynie, a zupełnie inną w β -endorfinie. Reszty te są zatem kluczowe dla wyróżnienia endorfin od innych wydłużonych na C-końcu enkefalin.



Ryc. 5. Hybrydy (1–13) dynorfiny i 1(–13) [Met⁵] dynorfiny z (14–31) β -endorfiną

Ad 3. Sekwencję β -endorfiny można dogodnie podzielić na dwie części: enkefalinową (1–5) i nieenkefalinową (6–31).

Zsyntezowano przeszło 2000 analogów cząsteczki enkefaliny i przebadano ich aktywność. Naturalną zatem rzeczą była w pierwszym rzędzie próba ekstrapolacji na część enkefalinową endorfin wyników uzyskanych w badaniach zależności między strukturą a aktywnością enkefalin. Okazało się, że efektów obserwowanych w przypadku enkefalin nie można przenieść bezpośrednio na cząsteczkę β -enkefaliny. Dlaczego? Większość modyfikacji enkefalin prowadzono zakładając, że podatne na enzymatyczne rozszczepienie wiązanie Tyr¹-Gly² można uczynić na to rozszczepienie odpornym, zastępując Gly² przez DAla², co równocześnie podwyższa aktywność analgetyczną enkefaliny. Argumentacja ta zarówno w odniesieniu do β -endorfiny, jak i samej enkefaliny nie jest tak oczywista, jak początkowo sądzono. Po pierwsze, β -endorfina jest bardziej odporna na atak enzymatyczny niż enkefalina, a więc nie ma powodów mocno zabiegać o podwyższenie jej aktywności tym mechanizmem. Po drugie, nie znaleziono korelacji między sta-

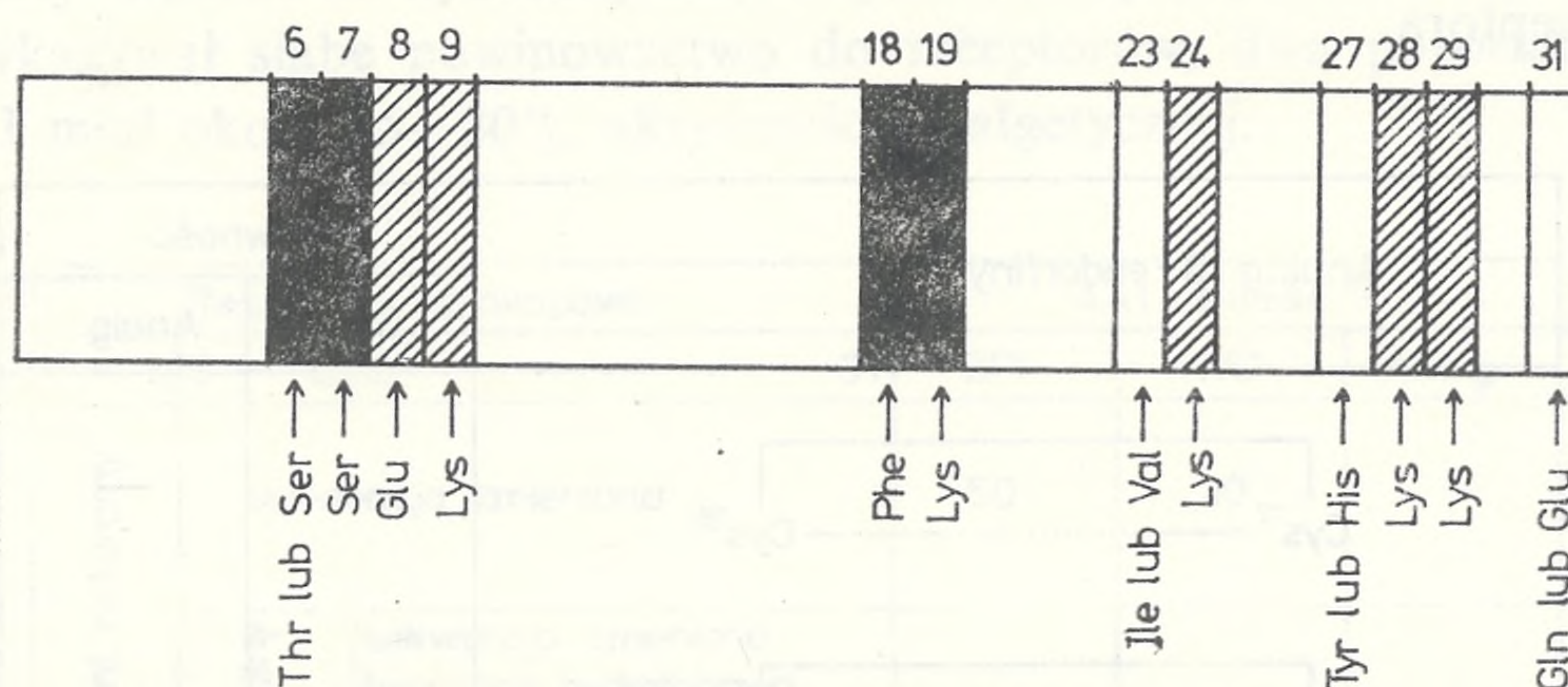


Ryc. 6. Istota modyfikacji enkefalin podwyższająca ich aktywność

bilnością enzymatyczną analogów enkefalinowych a ich aktywnością analgetyczną (ryc. 6). Wykazano natomiast, że zmiany struktury prowadzące do wyższej aktywności przeciwbólowej enkefaliny redukują enkefalinową, a podwyższają morfinową naturę peptydu, tj. powodują przesunięcie preferencji do receptorów, mianowicie od receptorów δ do receptorów μ . Tymczasem w modelu oddziaływania β -endorfiny z receptorem zakłada się (ryc. 2), że nie należy w cząsteczce β -endorfiny obniżać powinowactwa do receptorów δ . Oto dlaczego wyników badań zależności struktura-aktywność enkefaliny nie można przenieść na cząsteczkę β -endorfiny. Konsekwencją tego jest fakt, że w próbach modyfikacji części enkefalinowej β -endorfiny nie uzyskano dotychczas tak wysokiego podwyższenia aktywności, jak to udało się osiągnąć w przypadku enkefaliny.

W części nieenkefalinowej β -endorfiny stwierdzono ważność dla aktywności pozycji 6 i/lub 7 (Thr i/lub Ser), Phe¹⁸ i Lys¹⁹ (ryc. 7). Aminokwasy zaś w pozycji 23, 27 i 31 mogą być wymieniane na inne. Wśród tych trzech ostatnich najciekawsza wydaje się pozycja 27. W naturalnych endorfinach różnych gatunków występuje tu jeden z dwóch aminokwasów bardzo różnych chemicznie i pod względem

hydrofobowości, mianowicie histydyna albo tyrozyna. Pierwsza jest silnie hydrofilowa, a druga — silnie hydrofobowa. Modyfikując część nieenkefalinową β -endorfiny wprowadzono w tę pozycję tryptofan — najbardziej hydrofobowy aminokwas. Otrzymano analog β -endorfiny o największej aktywności wśród dotychczas znanych. Wprowadzenie w pozycję 2 tryptofanu dodatkowego ugrupowania aro-



Ryc. 7. Rola niektórych reszt aminokwasowych części nieenkefalinowej β -endorfiny.

■ — reszty istotne, //// — reszty jonowe

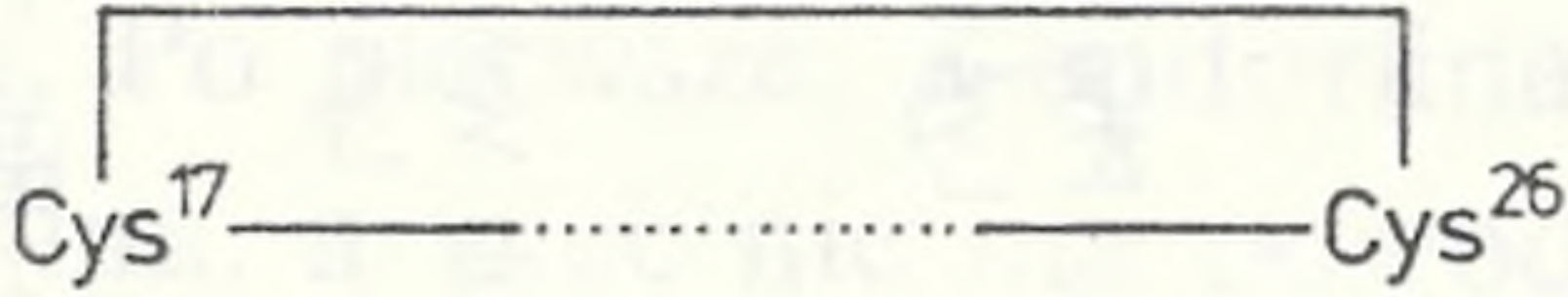
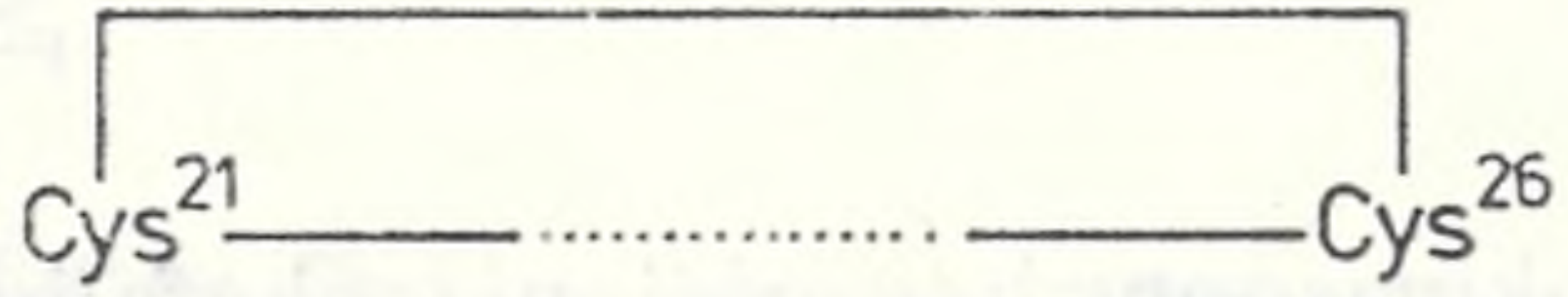
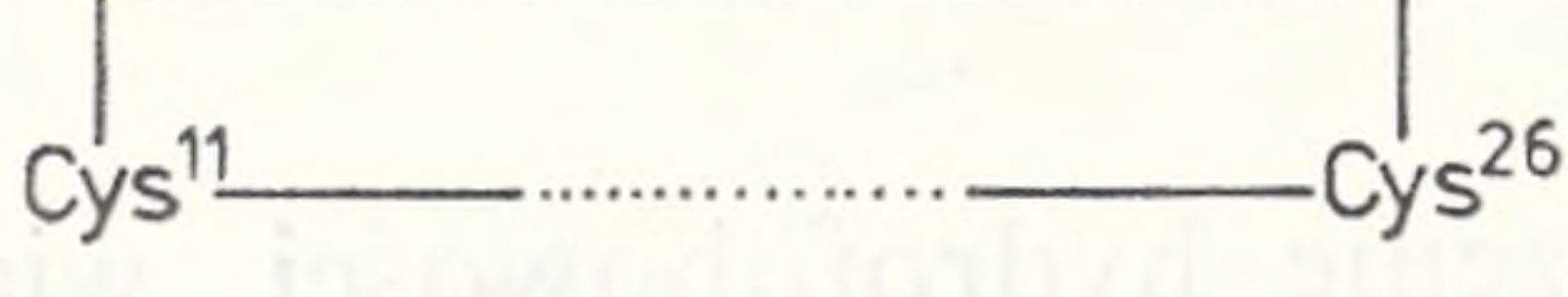
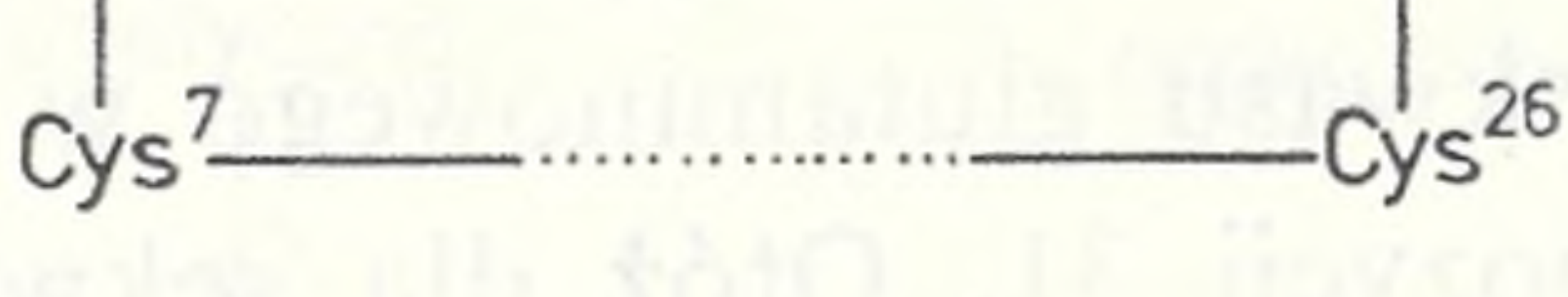
matycznego, a więc dalsze podwyższenie hydrofobowości, wiążące się oczywiście z rozbudową przestrzenną łańcucha bocznego tryptofanu, obniżyło aktywność. W cząsteczce β -endorfiny jest reszta kwasu glutaminowego w pozycji 8 i w β -endorfinach niektórych gatunków w pozycji 31. Otóż dla sekwencji przedłużonych na C-końcu do aktywności β -endorfiny potrzebna jest chociaż jedna reszta kwasu glutaminowego w pozycji 8, albo w pozycji 31. Natomiast dla sekwencji 31 aminokwasowych obydwie reszty kwasu glutaminowego mogą być wymienione na reszty niepolarne lub nawet o przeciwnym znaku, np. na reszty argininowe. W części nieenkefalinowej β -endorfiny jest 5 reszt lizynowych w pozycji 9, 19, 24, 28 i 29. Modyfikując cząsteczkę β -endorfiny zastąpiono je resztami argininowymi. Wymiana wszystkich reszt lizynowych na argininowe daje inhibitor. Zastępując resztami argininowymi 3 ostatnie reszty lizynowe, tj. Lys²⁴, Lys²⁸ i Lys²⁹, otrzymuje się peptyd o znacznej aktywności.

PODEJŚCIE KONFORMACYJNO-CHEMICZNE DO BADANIA ODDZIAŁYWANIA β -ENDORFINA-RECEPTOR

W konformacyjno-chemicznym podejściu do badania zależności między strukturą β -endorfiny a jej aktywnością konstruowano:

1. analogi o usztywnionej konformacji;
2. sekwencyjne różne cząsteczki, lecz o zachowanych właściwościach topologicznych.

Ad 1. Zsyntezowano m.in. 4 analogi β -endorfiny, każdy z dwoma resztami cysteinowymi. Jedną z nich zawsze umieszczano w pozycji 26, a drugą w jednej z pozycji następujących: 21, 17, 11 lub 7. Po zamknięciu między pierwszą a drugą resztą cysteinową wiązania disulfidowego tworzyły się struktury o różnej wielkości pierścienia. Aktywność otrzymanych analogów przedstawia ryc. 8. Badania te wskazują wymogi geometryczne efektorowego przystawania cząsteczki β -endorfiny do receptora.

Analog β -endorfiny	Aktywność	
	GPI	Analg.
		—
	+	
	+	—
	—	

Ryc. 8. Wyniki biologiczne usztywnienia konformacji β -endorfiny wiązaniami disulfidowymi.
GPI — test jelita świnki morskiej

Ad 2. Zamiast badać cząsteczki bioaktywnych peptydów przez wymianę jednej reszty aminokwasowej na drugą grupa prof. Kaisera w Stanach Zjednoczonych na Uniwersytecie Rockefellera studiuje ogólną topologię cząsteczki*. A więc konstruuje się sekwencyjnie inną cząsteczką, lecz w taki sposób, aby otrzymać kształt zgodny z oczekiwanym kształtem cząstki badanej. Grupa ta założyła, że w cząsteczce β -endorfiny są trzy fragmenty:

enkefalinowy 1—5,

hydrofilowy odstępnik 6—12,

amfilowa (hydrofilowa i hydrofobowa) lub amfipatyczna (hydrofobowa i jonowa) helisa 13—31, której hydrofobowa domena zajmuje połowę powierzchni, skręcając się wokół osi długiej lub biegnąc równoległe do niej.

Skonstruowano zatem trzy analogi I—III. W każdym z nich część enkefalinowa była nie zmieniona. W analogu pierwszym zmieniono sekwencję 6—31; w ana-

* Topologia jest to dział matematyki zajmujący się właściwościami figur geometrycznych (zbioru punktów) niezmiennymi przy pewnych przekształceniach tego zbioru, np. rozciągania lub ściskania.

logach II i III pozostawiono nie zmieniony hydrofilowy odstępnik, a zmiany następowały dopiero od pozycji 13. W przypadku analogu II skonstruowano hydrofobową domenę skreconą wokół osi długiej, a w analogu III — równoległą do tej osi. W roztworze wodnotrifluoroetanolowym każdy z analogów wykazywał w około 50% strukturę α -helikalną. W analogicznych warunkach naturalna β -endorfina ma, jak już podano, około 40% struktury w tej formie. Wszystkie analogi były bardziej odporne na hydrolizę enzymatyczną niż peptyd macierzysty. Pierwszy analog wykazywał słabe powinowactwo do receptorów, dwa pozostałe — duże. Analog III miał około 15–30% aktywności analgetycznej.

Reszty aminokwasowe				Aktywność *)		
1 – 5	6 – 12	13	— 31	GPI	RVD	Analg.
fragment naturalny	sekwencja zmieniona			50	10	—
	fragment naturalny	sekwencja zmieniona tworząca hydrofobową domenę skreconą wokół osi długiej		400	-100	-3
		sekwencja zmieniona tworząca hydrofobową domenę równoległą do osi długiej		200	-100	15–30

*) % w stosunku do β -endorfiny

Ryc. 9. Istota zmian cząsteczki β -endorfiny dokonanych przez Kaisera i otrzymane wyniki. GPI — test jelita świnki morskiej, RVD — test powrózka nasiennego szczura

Wnioski z przedstawionych badań są następujące:

Obszar hydrofilowego odstępника 6–12 w cząsteczce β -endorfiny może być ważny dla jej powinowactwa z receptorami.

Amfifilowa helikalna struktura fragmentu (13–31) β -endorfiny wnosi wkład do wiązania peptyd-receptor i do odporności cząsteczki na proteolizę.

UWAGI KOŃCOWE

1. Przebadano około 70 analogów i homologów β -endorfiny.
2. Nie znamy budowy receptora β -endorfiny i jej „aktywnej konformacji”.
3. Wiązaniem z receptorami rządzą ogólne topochemiczne właściwości reszt (14–31) β -endorfiny, lecz dla pełnego wyrażenia właściwości analgetycznych („posłania” analgetycznego) potrzebne są pewne specyficzne strukturalne elementy tej części cząsteczki.
4. Nie uzyskano na razie spektakularnych osiągnięć w konstruowaniu wyso-koaktywnych analogów β -endorfiny.

LITERATURA

- [1] NUMA S., Opioid peptide precursors and their genes, [w] *The Peptides*, VI, red. S. Udenfriend, J. Meienhofer, Academic Press Inc. 1-23, 1984.
- [2] CIVELLI O., DOUGLASS J., HERBERT E., Pro-opiomelanocortin: A polyprotein at the interface of the endocrine and nervous systems, [w] *The Peptides*, VI, red. S. Udenfriend, J. Meienhofer, Academic Press, Inc. 69-94, 1984.
- [3] YAMASHIRO D., LI Ch. H., β -Endorphin: structure and activity, [w] *The Peptides*, VI, red. S. Udenfriend, J. Meienhofer, Academic Press, Inc. 191-217, 1984.
- [4] HANSEN P. E., MORGAN B. A., Structure-activity relationship in enkephalin peptides, [w] *The Peptides*, VI, red. S. Udenfriend, J. Meienhofer, Academic Press, Inc. 269-321, 1984.
- [5] SCHWYZER R., Interactions between biologically active peptides and artificial lipid membrane: catalytic action of target cell membranes on receptor stimulation ?, [w] *Natural Products Chemistry. A Collection of Invited Section and Colloquium Lectures Presented at the 14th IUPAC International Symposium on the Chemistry of Natural Products*, Poznań, Poland, red. R. I. Zalewski, J. J. Skolik, Elsevier Science Publishers B. V. 591-598, 1985.
- [6] MORLEY J. S., Synthetic Endorphins, [w] *Perspectives in Peptide Chemistry*, red. A. Eberle, R. Geiger, T. Wieland, Karger-Basel 329-343, 1981.
- [7] RZESZOTARSKA B., Prekursory peptydów opioidowych, *Postępy Biologii Komórki*, 309-319, 1986.

Adres autorki: ul. Oleska 48, 45-052 Opole

CONTRACTILE APPARATUS IN STRIATED MUSCLE MAINTAINED IN EXCESSIVE EXTENSION

A. JAKUBIEC-PUKA, H. CHOMONTOWSKA

Laboratory of Protein Metabolism, Nencki Institute of Experimental Biology, Warsaw, Poland

The ultrastructure of muscles maintained in extension was investigated. Under these conditions the number of sarcomeres in myofibrils is known to increase within a short time to attain sarcomere length optimal for muscle tension [2, 6]. The present study was performed to elucidate the way of reconstruction of the contractile apparatus during formation of additional sarcomeres. Mature rat skeletal muscles of different type were observed.

Within a few days the weight, length and diameter of the muscles increased, and several changes developed in the structure of the muscle fibers. The contractile apparatus became irregular. The size of sarcomeres in the neighbouring myofibrils, as well as that of the neighbouring sarcomeres in the same myofibril became variable (Fig. 1, 2). "Extra sarcomeres" also commonly appeared (Fig. 1, arrow). Myofibrils of one region of muscle fiber differed in diameter, and longitudinally "split" myofibrils were frequently seen. Different kinds of abnormalities of the Z-line appeared. Thickening of this line and changes like "Z-line streaming" (Fig. 2) were frequently seen, especially in the slow muscle. Irregularity of the Z-line and its wavy pattern (with corresponding displacement of T-system and triads) were very common. Occasionally a "double Z-line" was present. Total disorganization of the contractile structure was rather rare. Numerous lysosomes and myelin-like figures developed in the space between myofibrils and in the subsarcolemmal region of muscle fibers (Fig. 1). These changes were found in both the central and the tendon regions of muscle fibers. The character of the changes in the contractile structure was dependent on fibre type.

Structures like those described above were also earlier observed in the contractile apparatus striated muscles of lower animals and in cardiac mammalian muscle.

They were attributed to production of new sarcomeres [1, 3-5]. Thus, we suppose that these changes found in the rat skeletal muscle maintained in extension are intermediate forms in the course of reconstruction of the contractile apparatus to form new sarcomeres.

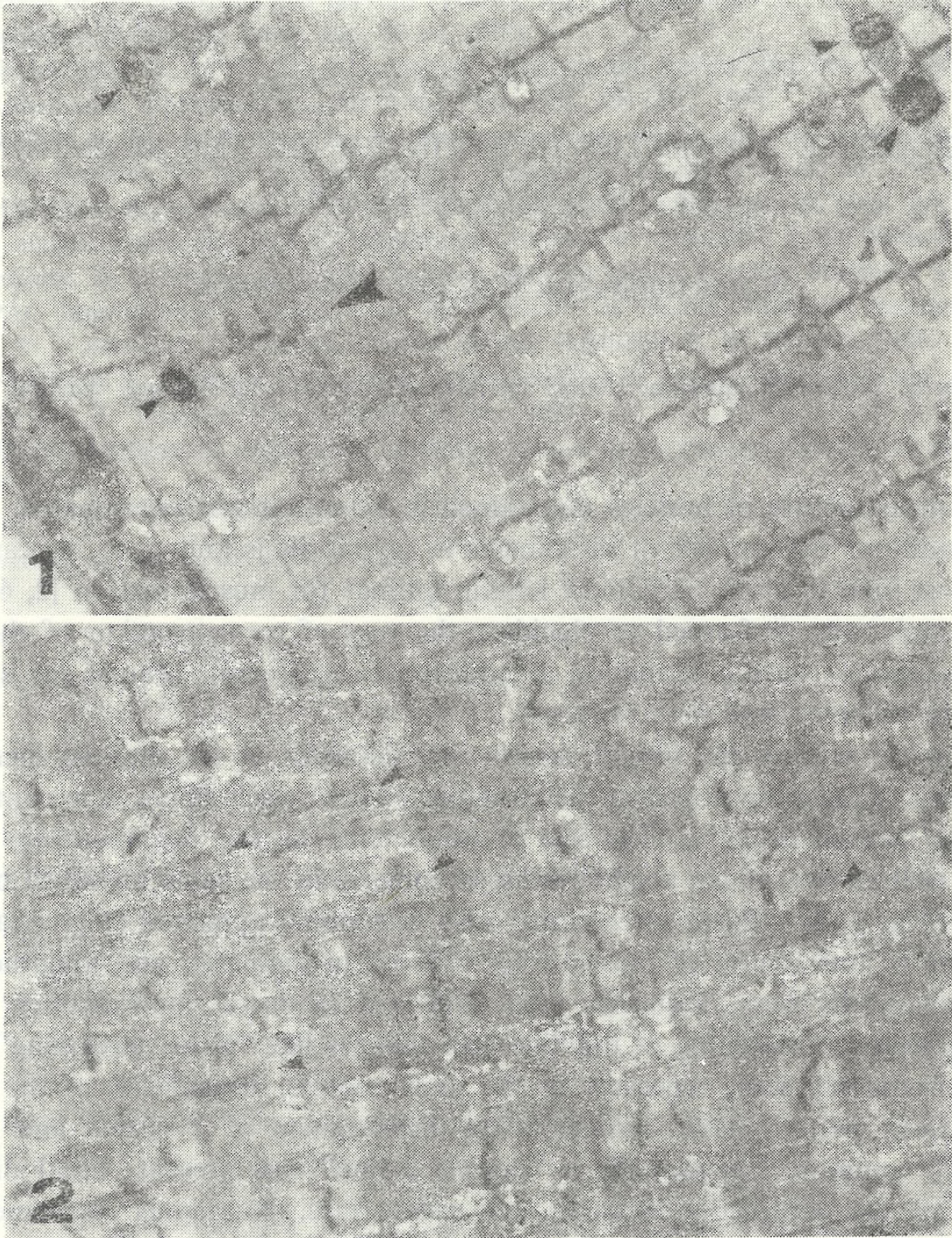


Fig. 1. The soleus muscle on the fourth day after tenotomy of synergists (i.e. partial tenotomy of gastrocnemius muscle). "Extra" sarcomere is seen (larger arrow). Lysosomes are present between myofibrils (smaller arrows). $\times 11.000$

Fig. 2. The rat soleus muscle on the fourth day after tenotomy of synergists (i.e. total tenotomy of gastrocnemius muscle). The contractile structure is irregular and Z-line "streaming" is seen (arrows). $\times 10.000$

REFERENCES

- [1] HOULIHAN D. F., NEWTON J. R. L., J. Insect Physiol., **25**: 879-893, 1979.
- [2] Huet de la TOUR E., TABARY J. C., TABARY C., TARDIEU C., J. Physiol. (Paris), **75**: 589-592, 1979.
- [3] JAHROMI S. S., CHARLTON M. P., J. Cell Biol., **80**: 736-742, 1979.
- [4] LEGATO M. J., J. Mol. Cell Cardiol., **4**: 299-317, 1972.
- [5] THORNELL L.-E., J. Mol. Cell Cardiol., **5**: 409-417, 1973.
- [6] WILLIAMS P. E., GOLDSPINK G., J. Anat., **127**: 459-468, 1978.

Otrzymano: czerwiec 1983.

Praca ukazuje się z opóźnieniem z powodu zaginięcia oryginalnego egzemplarza streszczenia w trakcie redagowania zeszytu nr 3-4, t. 11, za co Redakcja tego zeszytu (W. Kilarski) przeprasza.

The first step in the process of aging is the loss of physical strength and health. This is followed by a decline in cognitive and emotional functioning.

As a result of these changes, older adults often experience a sense of loss and isolation. This can lead to depression and other mental health issues.

It is important for older adults to maintain a positive outlook and stay socially active. This can help to reduce the negative effects of aging.

Research has shown that older adults who are socially active and engaged in meaningful activities are more likely to experience better health and well-being.



Fig. 1. The main components of the aging process. (Note: The figure content is illegible.)

LIMFOCYTY B I T: CHARAKTERYSTYKA, STYMULACJA AKTYWNOŚCI I ROLA W ZWALCZANIU NOWOTWORÓW

LYMPHOCYTES B AND T: CHARACTERISATION, STIMULATION OF ACTIVITY AND ROLE IN THE OVERCOMING OF TUMOURS

Tomasz SKÓRSKI

Zakład Cytofizjologii, Centrum Medyczne Kształcenia Podyplomowego, Warszawa

Streszczenie. Omówiono etapy dojrzewania i różnicowania limfocytów B i T i drogi prowadzące do aktywacji tych komórek. Przedstawiono działanie cytotoksyczne przeciwciał i dopełniacza oraz cytotoksycznych limfocytów T w aspekcie antynowotworowej roli limfocytów B i T *in vivo*.

Summary. The steps of maturation and differentiation of lymphocytes B and T are presented. The mechanisms of cytotoxic effects of antibodies and complement and cytotoxic action of lymphocytes T in view of the antitumour role of lymphocytes B and T *in vivo* are discussed.

Skróty

- APC — komórka prezentująca antygen,
- CTL — limfocyt T cytotoksyczny,
- DTH — reakcja nadwrażliwości typu opóźnionego,
- Ia — antygen zgodności tkankowej klasy II,
- IFN — interferon,
- IL-1 — interleukina 1,
- IL-2 — interleukina 2,
- IL-3 — interleukina 3,
- komórki LAK -- komórki cytotoksyczne aktywowane limfokiną,
- LT — limfotoksyna,
- MAF — czynnik aktywujący makrofagi,
- T_{CS} — limfocyt T kontrasupresorowy,
- T_H — limfocyt T pomocniczy,
- T_S — limfocyt T supresorowy.

Immunologia nowotworów ciągle intryguje wielu badaczy. W pracach [137, 138] omówiono rolę makrofagów, monocytów, granulocytów, komórek NK i K w zwalczaniu nowotworów. W tej pracy przedstawiono aktualne poglądy na rolę limfocytów B i T w rozwoju odpowiedzi immunologicznej przeciwko nowotworom.

Odpowiedź tę otrzymamy, gdy na komórkach nowotworowych są obecne antygeny, których nie ma na „zdrowych” komórkach danego organizmu (antygeny nowotworowe, antygeny związane z nowotworem). W związku z tym te antygeny mogą być rozpoznane jako „obce” i może powstać przeciwko nim odpowiedź immunologiczna typu komórkowego (limfocyty T cytotoksyczne) lub/i humoralnego (przeciwciała antynowotworowe).

LIMFOCYTY B

1. POCHODZENIE I DOJRZEWANIE

U dorosłego osobnika prekursorzy limfocytów B wywodzą się ze szpiku kostnego [34]. Podczas dojrzewania limfocytów B następuje przestawienie (rearrangement) genów kodujących immunoglobuliny w stosunku do stanu tych genów we wczesnych prekursorach limfocytów B. W wyniku tego poszczególne komórki zostają zaprogramowane do produkcji przeciwciał o danej swoistości, a następnie w cytoplazmie są syntetyzowane łańcuchy ciężkie — pojawiają się one w komórkach prekursorowych B (pre-B). Te komórki dzielą się i różnicują w małe nieproliferujące limfocyty B, które syntetyzują również łańcuchy lekkie i mają powierzchniowe receptory immunoglobulinowe. Zmianom może podlegać izotyp produkowanego przeciwciała oraz klasa łańcucha ciężkiego przechodząca z μ przez δ do γ , α , ϵ . Czynnikiem wzrostowym dla limfocytów pre-B jest interleukina 3 (IL-3) [99].

Niedojrzałe mysie limfocyty B nie mają antygenów powierzchniowych Lyb-3,5 i znajdują się w śledzionie, natomiast dojrzałe limfocyty B są Lyb-3⁺5⁺ i znajdują się w węzłach chłonnych, śledzionie i innych skupieniach tkanki limfatycznej [141]. Przeciwciała monoklonalne można także użyć do odróżniania limfocytów B w zależności od miejsca ich pobytu. Monoklonalne przeciwciało BL13 wiąże się z ludzkimi limfocytami B obecnymi w węzłach i grudkach chłonnych, natomiast BL14 — z limfocytami B krążącymi w płynach ustrojowych oraz obecnymi w tkankach [7]. Za pomocą monoklonalnych przeciwciał anti-B1 i anti-B2 ludzkie limfocyty B występujące we krwi obwodowej, śledzionie, migdałkach i węzłach chłonnych można podzielić na dwie główne subpopulacje: B1⁺B2⁺ i B1⁺B2⁻ [2]. Limfocyty B1⁺B2⁺ mają powierzchniowe immunoglobuliny klasy IgM lub IgD, natomiast limfocyty B1⁺B2⁻ — powierzchniowe immunoglobuliny klasy IgG. Ludzkie limfocyty B wiążą także przeciwciała monoklonalne OKB2 i OKB7, mają na powie-

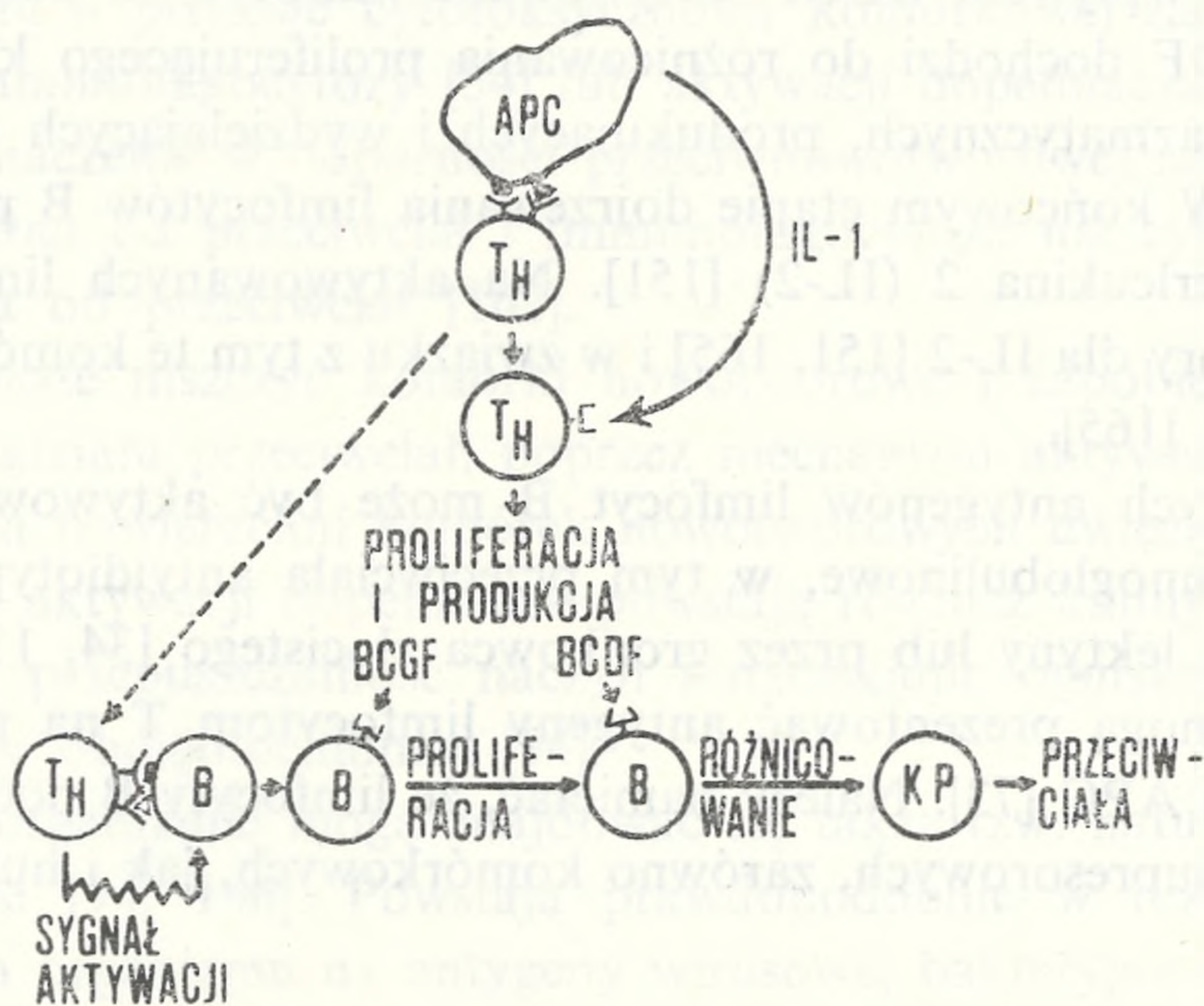
rzchni antygeny Ia oraz mogą mieć receptory dla FcIgG, C3 i erytrocytów mysich [136].

Dojrzewanie funkcjonalne limfocytów B odbywa się w obwodowych narządach limfatycznych (śledziona, węzły chłonne) [57].

2. AKTYWACJA I RÓŻNICOWANIE

Przeciwciała powstają w wyniku aktywacji, proliferacji i różnicowania swoich klonów limfocytów B. Do aktywacji może dojść po związaniu antygeny przez swoiste receptory immunoglobulinowe na powierzchni limfocyty B (antygeny grasiczo niezależne). Jednak do rozwinięcia się produkcji przeciwciał przeciwko większości antygenów (antygeny grasiczo zależne) dochodzi przy współudziale komórek kooperujących, którymi są limfocyty T pomocnicze (T helper = T_H) [135] oraz komórki prezentujące antygen (antigen presenting cells = APC) [29]. Aktywacja limfocytów B może przebiegać różnymi torami zależnie od stadium dojrzałości.

Małe, spoczynkowe (nieodjrzałe) limfocyty B ($Lyb-5^-$) potrzebują do aktywacji związania swoistego dla ich receptorów immunoglobulinowych antygeny oraz bodźca od limfocytów T_H identycznych pod względem antygenów zgodności tkanekowej z limfocytami B [81, 135, 141]. Duże preaktywowane (dojrzałe) limfocyty B ($Lyb-5^+$) mogą być pobudzone przez limfocyty T_H uczulone na nieswoiste lub



Ryc. 1. Proponowany schemat rozwoju odpowiedzi immunologicznej typu humoralnego przeciwko antygenom nowotworowym. APC — komórka prezentująca antygen, T_H — limfocyt T pomocniczy, B — limfocyt B, KP — komórka plazmatyczna, IL-1 — interleukina 1, BCGF — czynnik wzrostu limfocytów B, BCDF — czynnik różnicowania limfocytów B, \blacktriangle — „zmienny” antygen nowotworowy, \triangle — antygen Ia, Ψ — receptor dla antygeny nowotworowego, Υ — receptor dla antygeny Ia, \uparrow — receptor dla IL-1, \uparrow — receptor dla BCGF, \uparrow — receptor dla BCDF

swoiste antygeny [135, 141]. Aktywacja limfocytów Lyb-5⁻ jest kontrolowana przez antygeny zgodności tkankowej klasy II, a aktywacja komórek Lyb-5⁺ może być kontrolowana lub nie [81].

Limfocyty T_H rozpoznają na powierzchni APC swoisty antygen oraz antygen Ia i ulegają pobudzeniu [110, 112]. Te pobudzone limfocyty T_H rozpoznają ten sam swoisty antygen na powierzchni limfocyta B oraz antygen Ia. W wyniku tej interakcji powstaje sygnał pomocniczy do aktywacji limfocyta B [112, 141, 143, 164]. Ten sygnał może polegać na:

a) wydzieleniu przez limfocyt T_H czynnika pomocniczego w bezpośredniej bliskości limfocyta B;

b) bezpośrednim kontakcie limfocyta T_H z limfocytym B za pomocą antygeny Ia limfocyta B oraz receptora limfocyta T_H, w wyniku czego dochodzi do wyzwolenia sygnału dla aktywacji limfocyta B [81].

Po związaniu antygeny przez limfocyt B, na jego powierzchni pojawia się duża liczba antygenów Ia [17], co może ułatwiać interakcję limfocytów T_H i B [81]. Przekazanie sygnału aktywacji do wnętrza limfocyta B odbywa się przez hydrolizę fosfatydyloinozytolu, który uwalnia dwuacetyloglicerol aktywujący kinazę C białek [17]. W następstwie aktywacji limfocyt B syntetyzuje receptory dla dwóch czynników: wzrostu limfocytów B (B cell growth factor = BCGF) oraz różnicowania się limfocytów B (B cell differentiation factor = BCDF) [98, 164]. Receptory dla BCGF pojawiają się wcześniej na powierzchni limfocyta B niż receptory dla BCDF [143]. Te czynniki są produkowane przez limfocyty T_H [34, 110] i są różne od interleukin [151]. Pod wpływem BCGF aktywowane limfocyty B dzielą się, a potem przy udziale BCDF dochodzi do różnicowania proliferującego klonu limfocytów B do komórek plazmatycznych, produkujących i wydzielających duże ilości przeciwciał [63, 98]. W końcowym etapie dojrzewania limfocytów B pewną rolę może też odgrywać interleukina 2 (IL-2) [151]. Na aktywowanych limfocytach B pojawiają się receptory dla IL-2 [151, 165] i w związku z tym te komórki mogą rosnąć w obecności IL-2 [165].

Oprócz swoistych antygenów limfocyt B może być aktywowany przez przeciwciała antyimmunoglobulinowe, w tym przeciwciała antyidiotypowe oraz przez lipopolisacharydy, lektyny lub przez gronkowca złocistego [34, 112].

Limfocyty B mogą prezentować antygeny limfocytom T na podobnych zasadach jak komórki APC [73]. Należy pamiętać, że limfocyty B podlegają wpływom wielu czynników supresorowych, zarówno komórkowych, jak i humoralnych [114].

3. EFEKT CYTOTOKSYCZNY

Limfocyty B nie mają zdolności do wywierania efektu cytotoksycznego bezpośrednio. Biorą w nim udział pośrednio poprzez produkcję przeciwciał zdolnych do wiązania i aktywowania właściwego czynnika cytotoksycznego — dopełniacza [53].

Limfocyty B dzięki produkcji przeciwciał uczestniczą także pośrednio w efektach cytotoksycznych, wywieranych przez inne komórki. Można tu wymienić cytotoksyczność komórkową zależną od przeciwciał (ADCC) [71, 109] lub immunofagocytozę [54]. Przepuszczalnie limfocyty B mogą same uczestniczyć w zjawisku cytotoksyczności zależnej od przeciwciał [109].

4. UDZIAŁ PRZECIWCIAŁ I DOPEŁNIACZA W ZWALCZANIU NOWOTWORÓW

Antynowotworowe przeciwciała wykrywano u pacjentów z nowotworami przewodu pokarmowego, sutka, pęcherza moczowego, czerniakami, mięsakami, guzem Burkitta i różnymi białaczkami [11, 40, 158, 161]. Obecność tych przeciwciał może świadczyć o pomyślnym rokowaniu [151]. Najczęściej przeciwciała antynowotworowe stwierdza się na początku choroby nowotworowej lub w okresie regresji [40]. Mogą one hamować wzrost nowotworu *in vivo* [133]. Do przeciwciał najbardziej skutecznych w hamowaniu rozwoju nowotworu należą immunoglobuliny klasy IgG2a [16, 62, 130], IgG3 [62] i IgG1 [56, 134]. IgM nie odgrywają zwykle większej roli [16]. Wykazano, że gdy choroba nowotworowa postępuje wolno i odpowiedź humoralna może się w pełni rozwinąć (przełączenie IgM→IgG), istnieje większa szansa zniszczenia nowotworu [16].

Zaobserwowano, że komórki nowotworowe guzów mogą być opłaszczane przeciwciałami antynowotworowymi klasy IgG [41, 43]. Te komórki mogą ulec *in vivo* zniszczeniu w procesie cytotoksyczności komórkowej zależnej od przeciwciał [54, 130], immunofagocytozy [54] lub aktywacji dopełniacza [53, 54]. Wydaje się, że większe znaczenie w odporności przeciwnowotworowej ma cytotoksyczność komórkowa zależna od przeciwciał i immunofagocytoza niż cytotoksyczność dopełniacza zależna od przeciwciał [162].

Dopełniacz może niszczyć komórki nowotworowe i zapobiegać powstawaniu przerzutów bez udziału przeciwciał, poprzez mechanizm aktywacji C5 przez złogi fibryny obecne na powierzchni komórek nowotworowych uwięzłych w naczyniach [146]. W wyniku aktywacji dopełniacza powstają również kininy i anafilatoksyny, które zwiększają przepuszczalność naczyń i naciekanie ogniska nowotworowego przez granulocyty obojętnochłonne [54].

W zdrowym organizmie mogą znajdować się także tzw. naturalne przeciwciała antynowotworowe [94, 146]. Powstają prawdopodobnie w rezultacie niezauważalnego uczulenia organizmu na antygeny wirusowe, bakteryjne lub inne nieznanne antygeny o budowie podobnej do antygenów nowotworowych [156]. Naturalne przeciwciała antynowotworowe mogą odgrywać ważną rolę w odporności na nowotwory. Przypisuje się im funkcję pierwszej linii obrony przeciwko powstałym właśnie komórkom nowotworowym [15]. Wykryto ich obecność przeciwko czerniakom [95], białaczkom [84], mięsakom [5, 84] i rakom [84]. Wykazano, że wspólnie z dopełniaczem mogą niszczyć komórki nowotworowe *in vivo* [156].

Limfocyty B i komórki plazmatyczne mogą także produkować przeciwciała

przeciwnowotworowe niezdolne do uruchomienia mechanizmów efektorowych [140, 142]. Opłaszczają one komórkę nowotworową maskując jej antygeny. Może dojść także do powstania przeciwciał przeciwiidiotypowych, tzn. skierowanych przeciwko własnym przeciwciałom przeciwnowotworowym lub receptorom cytotoksycznych i pomocniczych limfocytów T [79].

LIMFOCYTY T

W populacji limfocytów T wyróżnia się kilka subpopulacji: limfocyty T cytotoksyczne (cytotoxic T lymphocytes = CTL), limfocyty T pomocnicze (helper T cells = T_H), limfocyty T supresorowe (suppressor T cells = T_S), limfocyty T kontrasupresorowe (contrasuppressor T cells = T_{SC}) i inne. Każdej z tych subpopulacji przypisuje się inne funkcje.

1. POCHODZENIE I DOJRZEWANIE LIMFOCYTÓW T

Prekursory limfocytów T pochodzą ze szpiku (protymocyty). Migrują one do grasicy, której mikrośrodowisko jest niezbędne do ich dalszego dojrzewania i różnicowania. Dojrzałe tymocyty są wysyłane do krwi obwodowej i obwodowych narządów limfatycznych. Zmiany antygenów identyfikowanych za pomocą monoklonalnych przeciwciał na powierzchni błony komórkowej są wskaźnikami przemian zachodzących w ontogenezie limfocytów T [120].

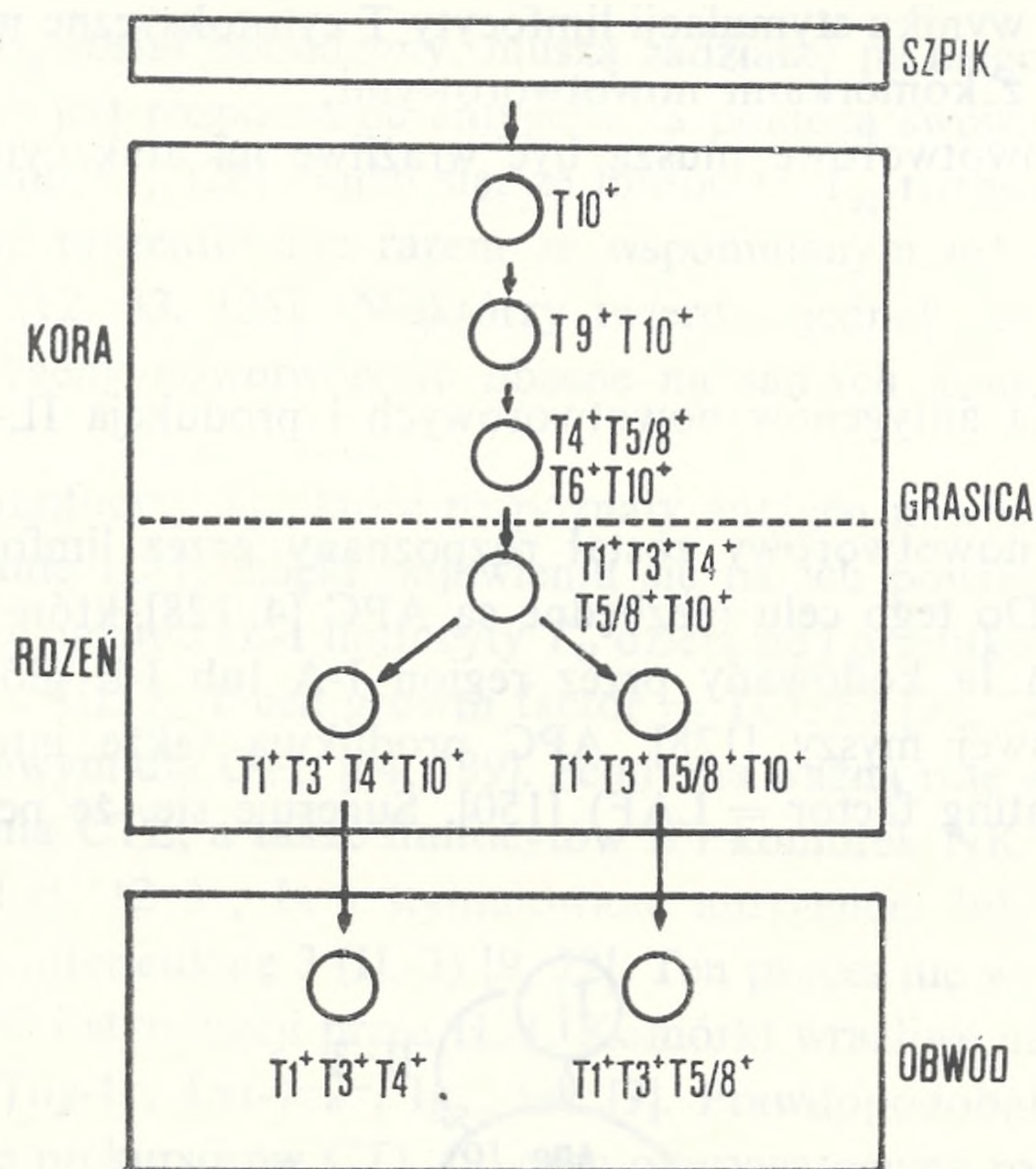
Najmłodsze ludzkie komórki limfatyczne w grasicy nie mają antygenów charakterystycznych dla dojrzałych limfocytów T [118], mają natomiast antygeny T9 i T10, które również są obecne na komórkach szpiku. Stanowią 10% populacji tymocytów. Podczas dojrzewania tracą one antygen T9, ale zachowują T10. Pojawiają się nowe antygeny: T4, T5/8 i T6. Komórki $T4^+T5^+T6^+T10^+$ stanowią 80% populacji tymocytów.

Wymienione tu dwie subpopulacje tymocytów znajdują się w korze grasicy. Przemieszczenie się tymocytów z kory do rdzenia grasicy związane jest z utratą antygeny T6 i pojawieniem się antygenów T1 i T3. W rdzeniu grasicy tymocyty można podzielić na dwie subpopulacje: $T1^+T3^+T5^+T10^+$ ($T5^+$) oraz $T1^+T3^+T4^+T10^+$ ($T4^+$) [116]. Różnią się one pod względem obecności antygenów T4 i T5 i stanowią 10% populacji tymocytów. Na tym etapie tymocyty osiągają dojrzałość immunologiczną (immunologic competence), która rozwija się w pełni dopiero poza grasycą [116].

Po opuszczeniu grasicy limfocyty tracą antygen T10. Tymocyty, które były $T1^+T3^+T4^+T10^+$, stają się $T1^+T3^+T4^+(T4^+)$ i na obwodzie mogą pełnić funkcję limfocytów T pomocniczych /induktorowych (helper/inducer) [115, 117]. Tymo-

cyty $T1^+T3^+T5^+T10^+$ na obwodzie stają się $T1^+T3^+T5^+$ ($T5^+$) i mogą pełnić funkcję limfocytów T cytotoksycznych/supresorowych (cytotoxic/suppressor) [119]. Antygen T4 jest obecny w 55–65% limfocytów T we krwi, a antygen T5 w 20–30%.

U myszy limfocyty T pomocnicze są $Lyt-1^+2^-3^-$, a limfocyty T cytotoksyczne/supresorowe są $Lyt-1^-2^+3^+$ [120, 129]. Wykazano, że mysie limfocyty pre-T cytotoksyczne są $Lyt\ 1^+2^+$ [82].



Ryc. 2. Etapy różnicowania ludzkich limfocytów T badane za pomocą monoklonalnych przeciwciał (wg [120])

Receptory swoiste dla obcych antygenów mogą pojawiać się na powierzchni limfocytów T bardzo wcześnie. Obserwowano ich obecność już na niektórych prekursorach limfocytów T jeszcze przed przejściem przez grasicę [14].

2. MECHANIZMY INDUKCJI CYTOTOKSYCZNYCH LIMFOCYTÓW T (CTL)

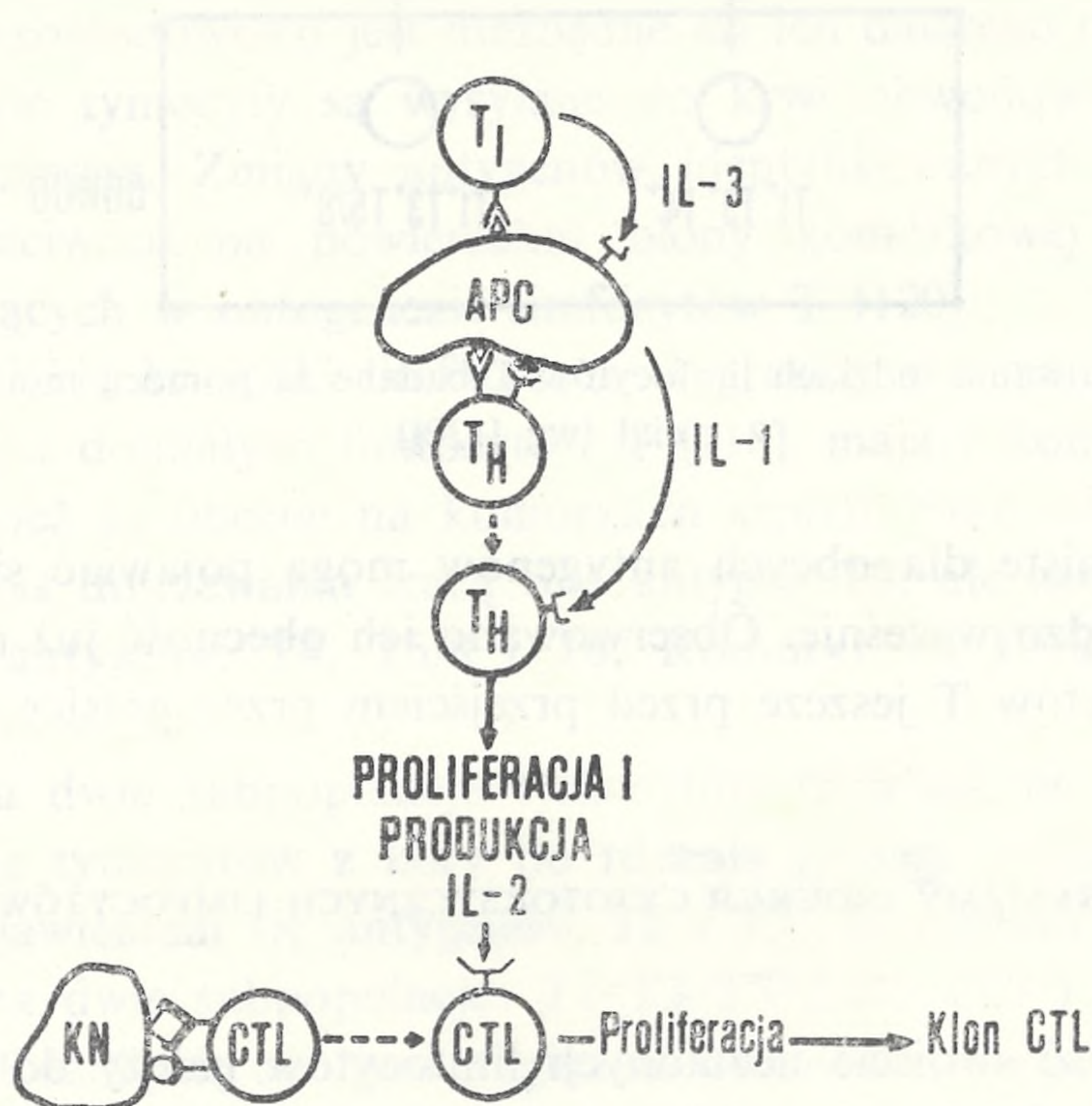
Cytotoksyczność swoście uczulonych limfocytów należy do dawno opisanych komórkowych mechanizmów efektorowych immunologicznej odpowiedzi przeciwnowotworowej [147, 149]. Zjawisko to polega na zewnątrzkomórkowym zabijaniu komórek nowotworowych przez cytotoksyczne limfocyty T (CTL), które uprzednio weszły w kontakt z antygenami powierzchniowymi tych komórek nowotworowych. Na skutek tego kontaktu, po przejściu przez etap proliferacji i różnicowania, limfocyty T nabywają własności cytotoksycznych skierowanych wybiórczo

przeciwko tym właśnie komórkom nowotworowym. Aby taki proces mógł zajść, musi być spełnionych kilka warunków:

- komórki nowotworowe muszą mieć antygeny, które są wystarczająco silnymi immunogenami;
- musi zaistnieć możliwość kontaktu tych antygenów z prekursorami pomocniczych i cytotoksycznych limfocytów T;
- komórki te muszą być zdolne do reakcji;
- powstałe w wyniku stymulacji limfocyty T cytotoksyczne muszą wejść w bezpośredni kontakt z komórkami nowotworowymi;
- komórki nowotworowe muszą być wrażliwe na atak cytotoksycznych limfocytów T.

2.1. Prezentacja antygenów nowotworowych i produkcja IL-1

Aby antygen nowotworowy został rozpoznany przez limfocyty T, musi być zaprezentowany. Do tego celu niezbędne są APC [4, 128], które mają na swej powierzchni antygen Ia kodowany przez region I-A lub I-E głównego kompleksu zgodności tkankowej myszy [128]. APC produkują także interleukinę 1 (IL-1, lymphocyte activating factor = LAF) [150]. Sugeruje się, że pewna subpopulacja



Ryc. 3. Proponowany schemat indukcji cytotoksycznych limfocytów T (CTL) przeciwko antygenom nowotworowym. APC — komórka prezentująca antygen, T_I — limfocyt T induktorowy, T_H — limfocyt T pomocniczy, CTL — cytotoksyczny limfocyt T, KN — komórka nowotworowa, IL-1 — interleukina, IL-2 — interleukina 2, IL-3 — interleukina 3, ○ — antygen nowotworowy, ● — „zmieniony” antygen nowotworowy, △ — antygen Ia, ◇ — antygen MHC klasy I, Y — receptor dla antygeny nowotworowego, Y — receptor dla antygeny Ia, Y — receptor dla antygeny MHC klasy I, Y — receptor dla IL-1, Y — receptor dla IL-2, Y — receptor dla IL-3

limfocytów T, tzw. induktorowe limfocyty T, poprzez produkcję interleukiny 3 (IL-3) indukuje i kontroluje prezentację antygenów oraz produkcję IL-1 przez APC [150].

2.2. Stymulacja limfocytów T pomocniczych (T_H) i produkcja IL-2

Aby limfocyt T_H został pobudzony, muszą zadziałać na niego dwa bodźce [71, 150]. Jednym z nich jest rozpoznanie antygeny za pomocą swoistego receptora lub zadziaływanie mitogenu [31, 126]. Sądzi się, że limfocyty T_H rozpoznają tylko antygeny nowotworowe prezentowane razem ze wspomnianym już antygenem Ia na powierzchni APC [12, 83, 128]. Niektórzy twierdzą jednak, że mogą być także rozpoznawane antygeny nowotworowe obecne na samych komórkach nowotworowych [72].

Po tym etapie limfocyty T_H , które rozpoznały antygen nowotworowy, stają się wrażliwe na działanie IL-1, dzięki pojawieniu się na ich powierzchni receptorów dla IL-1 [150]. Po działaniu IL-1 limfocyty T_H dzielą się i produkują różne czynniki, m. in. interleukinę 2 (IL-2, T cell growth factor = TCGF) [31, 74, 126], która jest czynnikiem wzrostowym dla CTL [64, 139]. Pełni ona ważną rolę w procesie dojrzewania i różnicowania CTL, a także limfocytów B i komórek NK [122].

Limfocyty T ($Lyt-1^{+2-3-}$, Ia^{-}) stymulowane antygenem lub mitogenem produkują i wydzielają interleukinę 3 (IL-3) [9, 52]. Ten proces nie wymaga prezentacji antygeny przez APC i stymulacji przez IL-1. Komórki wrażliwe na IL-3 są $Thy-1^{+}$, $Lyt-1^{-2-}$ [52] lub $Thy-1^{-}$, $Lyt-1^{-2-}$, Ig^{-} , Ia^{-} [9]. Prawdopodobnie IL-3 zapoczątkowuje dojrzewanie prekursorów CTL [9] oraz odgrywa pewną rolę w dojrzewaniu limfocytów B [99].

Pobudzone limfocyty T_H produkują i wydzielają jeszcze inne czynniki działające na komórki układu immunologicznego oraz inne komórki [117].

Wykazano, że ludzkie limfocyty T_H składają się z komórek Ia^{+} i Ia^{-} [120]. Większość czynników pomocniczych produkowana jest przez limfocyty $T_H Ia^{+}$, ale obie subpopulacje są potrzebne do rozwinięcia optymalnej odpowiedzi immunologicznej.

2.3. Aktywacja cytotoksycznych limfocytów T (CTL)

Do aktywacji CTL potrzeba dwóch bodźców [8, 150]. Pierwszym jest rozpoznanie obcego antygeny za pomocą swoistego receptora. CTL, które rozpoznały antygen, stają się wrażliwe na działanie mitogenne drugiego bodźca IL-2 dzięki pojawieniu się receptorów dla IL-2 na ich powierzchni. IL-2 wiąże się ze swoistym receptorem [121, 122] i zapoczątkowuje proliferację komórek [60], powodując przejście limfocytów z fazy G_1 do S [64, 139]. Obecność receptora dla IL-2 można wy-

kryć przeciwciałem monoklonalnym anti-Tac [123]. Zwiększenie się liczby receptorów dla IL-2 na limfocytach T powodują: IL-1 [59], IL-2 [154] oraz związanie antygeny [44].

2.4. Kontrasupresja

Aktywność cytotoksyczna CTL może być hamowana przez wiele czynników i komórek, m. in. przez limfocyty T supresorowe [37, 120]. Antagonistami limfocytów T_S są limfocyty T kontrasupresorowe (T_{CS}) [37, 38]. Przyjmuje się, że populacja limfocytów T_{CS} , podobnie jak T_S , składa się z 3 subpopulacji komórek: indukcyjnych, transduktorowych i efektorowych.

Komórki indukcyjne są $Lyt-1^{-2+}$, $I-J^+$ [30] i wydzielają czynnik $T_{CSI}F$, który może wiązać antygen i zawiera białko kodowane przez subregion I-J [159]. Komórki indukcyjne wraz z czynnikiem $T_{CSI}F$ działają na komórki transduktorowe ($Lyt-1^{+2+}$, $I-J^+$) i aktywują kontrasupresję [30, 159]. To oddziaływanie komórek jest kontrolowane przez region V_H genu immunoglobulin [37]. Komórki transduktorowe oddziałują na komórki efektorowe, które są $Lyt-1^{+2-}$, $I-J^+$ oraz mają receptory dla lektyny z nasion wyki kosmatej (*Vicia villosa*). Komórki efektorowe działają za pośrednictwem produkowanego czynnika bezpośrednio na limfocyty T_H , czyniąc je niewrażliwymi na działanie komórek T_S [30, 36]. Kontrasupresorowe komórki efektorowe mogą oddziaływać także na limfocyty B i APC [38].

3. CZYNNIKI ZWIĘKSZAJĄCE CYTOTOKSYCZNOŚĆ CTL

Już istniejącą cytotoksyczność CTL można zwiększać dodaniem interferonu (IFN) [69], ale nie jest to regułą [46]. IL-2 również zwiększa aktywność cytotoksyczną CTL, które same mogą produkować IL-2 i odpowiadać na nią [23, 82]. IL-2 może również indukować lub zwiększać produkcję IFN przez limfocyty T [23].

Wybiórczym stymulatorem aktywności CTL jest kwas rutynowy [20].

4. DZIAŁANIE CYTOTOKSYCZNE LIMFOCYTÓW T

4.1. Antygeny rozpoznawane przez CTL

CTL mogą zabijać syngeniczne komórki nowotworowe [153]. Rozpoznają one antygeny nowotworowe, ale do wyzwolenia efektu cytotoksycznego CTL muszą rozpoznać także autologiczne lub syngeniczne antygeny zgodności tkankowej obecne na komórkach nowotworowych [131, 163]. CTL rozpoznają antygeny zgodności tkankowej klasy I, a limfocyty T_H — klasy II [83, 93, 100].

4.2. Receptory limfocytów T rozpoznające „obce” antygeny

Receptor, za pomocą którego limfocyty T swoiście rozpoznają „obcy” antygen, jest podobny do fragmentu Fab immunoglobuliny [83, 157]. Receptor ten jest heterodimerem (Mr 90 000) zbudowanym z dwóch łańcuchów glikoproteinowych α i β , które są połączone wiązaniami dwusiarczkowymi [19, 58]. Na powierzchni ludzkiego limfocyta T receptor występuje w kompleksie z cząsteczką T3, wiążącą monoklonalne przeciwciało OKT3 [124]. Geny dla łańcuchów α i β są podobne do genów dla immunoglobulin i składają się z fragmentów zmiennego (V = variable) i stałego (C = constant) [19, 83]. Te fragmenty ulegają przestawieniu (rearrangement) podczas ontogenezy limfocytów T.

4.3. Działanie cytotoksyczne CTL na komórki nowotworowe

Podczas zabijania komórki nowotworowej przez CTL można wyróżnić 3 etapy [32, 87, 104]: 1. rozpoznanie i kontakt CTL i komórki nowotworowej; 2. aktywacja CTL zwana programowaniem do lizy, która prowadzi do zaistnienia efektu letalnego w komórce nowotworowej; 3. zachodzi liza komórki nowotworowej.

Pierwszy etap trwa 1 min, a drugi 3–15 min i oba wymagają obecności CTL [27, 86, 87, 104]. Trzeci etap przebiega w ciągu kilku godzin i nie wymaga obecności CTL [85, 104]. Jest to tzw. liza niezależna od komórki efektorowej (KCIL = = killer cell independent lysis). CTL nie zużywają się, tzn. mogą wchodzić w kontakt z wieloma komórkami nowotworowymi po kolei i niszczyć je [45]. Mogą zabijać komórki nowotworowe niezależnie od fazy cyklu komórkowego, w jakiej one się znajdują [82].

Rozpoznanie i kontakt błony komórkowej CTL i komórki nowotworowej wymaga wydatku energetycznego komórki efektorowej [3, 25], sprawnego układu cytoszkieletowego [25, 27] oraz obecności jonów Mg^{++} i Ca^{++} w środowisku [3, 25, 27, 105]. Wykazano, że mikrofilamenty i mikrotubule komórki efektorowej biorą udział w wiązaniu komórki nowotworowej przez CTL [33]. Związanie antygenu nowotworowego przez swoisty receptor na powierzchni CTL indukuje polaryzację włókien aktyny w okolicy miejsca wiązania [78]. Centrum organizacyjne mikrotubuli CTL jest zlokalizowane między jądrem a miejscem kontaktu z komórką docelową. Jeżeli CTL połączy się z komórką nowotworową, to takie wiązanie jest stabilne i podtrzymanie go nie wymaga wydatku energetycznego komórki efektorowej [3]. W drugim etapie CTL ulega aktywacji zależnej od jonów Ca^{++} [27, 105], w wyniku czego zostaje wyzwolony efekt lityczny i komórka nowotworowa ulega nieodwracalnej zmianie letalnej (lethal hit), spowodowanej czynnikiem cytotoxicznym.

Liza komórki nowotworowej nie wymaga wydatku energetycznego [3] i polega na utracie integralności błony komórkowej [58]. Podczas lizy zachodzą następujące zjawiska w komórce: uszkodzenie błony komórkowej \rightarrow napływ wody do

wnętrza komórki i przemieszczanie się jonów i cząsteczek → zmiany ciśnienia osmotycznego → rozpad komórki [32, 89]. Zaobserwowano jednak, że CTL może zabijać komórki docelowe przez „rozpad wewnątrzkomórkowy”, który zaczyna się od zmian w jądrze [149]. Rozpoczynają się one już kilka minut po kontakcie CTL z komórką docelową, a następnie błona komórkowa traci swą ciągłość i komórka rozpada się. Badania morfologiczne potwierdzają te spostrzeżenia [88, 127].

W ciągu kilku ostatnich lat udało się dokładniej scharakteryzować czynnik(i) odpowiedzialny(e) za zabicie komórki nowotworowej przez CTL. Stwierdzono, że CTL mają ziarenka cytoplazmatyczne zawierające białka cytolityczne, zwane perforynami, które są najprawdopodobniej odpowiedzialne za zabijanie komórki docelowej [107, 108]. Podczas efektu cytotoksycznego CTL za pośrednictwem aparatu Golgiego wydzielają te ziarenka w miejscu kontaktu z komórką nowotworową. Takie ziarenka nie są obecne w innych subpopulacjach limfocytów T. Cytotoksyczność tych ziarenek jest nieswoista i różnie nasiloną w zależności od rodzaju komórki docelowej. W ziarenkach znajduje się kilka typów białek cytolitycznych ($M_r = 14\ 000\text{--}75\ 000$). Niektóre z nich, mieszczące się w błonie tych ziarenek, są odpowiedzialne za zależną od jonów Ca^{++} aktywację innych białek znajdujących się wewnątrz.

Podczas efektu cytolitycznego zachodzi polimeryzacja tych białek, w wyniku czego powstają pierścieniowe kompleksy tubularne (poliperforyny) przy udziale wiązań dwusiarczkowych. Obserwuje się tu duże podobieństwo do zjawisk zachodzących podczas cytolitycznego działania dopełniacza [106]. Takie pierścieniowe struktury tubularne umieszczane są w błonie komórki nowotworowej i przerywając jej ciągłość tworzą kanały (transmembrane channels) o średnicy 50–70 lub 160 Å. Nie jest wykluczone, że przez powstałe kanały z komórki efektorowej do komórki docelowej są transportowane nukleazy, proteiny, toksyny oraz aktywne białka powierzchniowe [1, 35, 64].

Inni badacze czynnik cytolityczny CTL nazywają limfotoksyną (LT) [6, 115]. Pre-LT jest wielkocząsteczkowym kompleksem błonowych glikoprotein [68]. Może ona być związana z błoną komórkową lub wydzielana w formie rozpuszczalnej [35, 48]. Pod względem funkcjonalnym pre-LT składa się z trzech głównych podjednostek [48, 49]:

- a) specyficznego dla antygeny receptora, który funkcjonuje jako jednostka rozpoznająca;
- b) jednostki litycznej, składającej się z cząsteczek α , β , γ , a istniejącej w formie nieaktywnej;
- c) jednostki aktywującej, która przenosi sygnał rozpoznania antygeny do jednostki litycznej, zapoczątkowując w ten sposób proces cytolizy.

Uwalnianie limfotoksyny z CTL jest zależne od jonów Ca^{++} oraz enzymów podobnych do esteraz [152].

Sugeruje się również udział serynowych proteinaz [45, 113] i fosfolipazy A_2 [50]

w procesie cytolitycznym CTL. Wykazano, że powierzchniowe proteiny CTL są aktywowane po związaniu komórki docelowej [6].

Limfocyty mogą wydzielać limfokinę zwaną leukoregulina, która wykazuje działanie cytolityczne lub cytostatyczne na komórki nowotworowe, a także nasila wrażliwość tych ostatnich na efekt cytotoksyczny komórek NK [111]. Leukoregulina różni się od limfotoksyny, interleukin, MAF i interferonu, a działanie jej jest powiązane z szybkimi zmianami przepuszczalności błony komórki nowotworowej.

Limfocyty T, mające receptor dla Fc IgG lub IgM, mogą zabijać komórki nowotworowe w procesie cytotoksyczności komórkowej zależnej od przeciwciał (ADCC) [71].

Nowotwory nie mające antygenów zgodności tkankowej, nie mają również zdolności indukcji CTL [70], a indukują natomiast cytostatyczne limfocyty T o fenotypie $Lyt-1^{+2-3-}$. Mogą one działać cytostatycznie w obecności podobnych do makrofagów komórek adherencyjnych, mających antygen Ia. Działanie cytostatyczne na komórki nowotworowe (zatrzymanie w fazie $G_0(G_1)$) wywiera również ludzka limfotoksyna razem z interferonem γ [77].

5. ROLA LIMFOCYTÓW T W ZWALCZANIU NOWOTWORÓW

Limfocyty T mogą hamować wzrost nowotworu *in vivo* [21, 33, 101]. Gromadzą się (naciekają) one w miejscu wzrostu nowotworu [42, 65, 145], a ich liczba jest uzależniona m. in. od jego immunogenności. Cytotoksyczne limfocyty T naciekają guzy o dużej immunogenności, w wyniku czego ulegają one regresji [42, 61]. Nowotwory ulegające regresji mają trzy razy więcej limfocytów T w nacieku niż guzy rosnące progresywnie [80]. W okresie regresji guza 70% komórek mogą stanowić limfocyty T, a 1% komórki nowotworowe [22]. CTL izolowane z guza ulegającego regresji mają bardzo dużą aktywność cytotoksyczną dla autologicznych komórek nowotworowych [51]. U ludzi CTL przeciwko komórkom nowotworowym izolowano również z węzłów chłonnych i śledziony [13, 42, 65].

Doświadczalne nowotwory indukowane wirusami są bardziej immunogenne niż nowotwory indukowane chemicznie [75, 144]. Wykazano, że limfocyty T kontrolują powstawanie nowotworów indukowanych wirusami [67, 76]. Może to być spowodowane uprzednią spontaniczną immunizacją gospodarza na antygeny wirusowe, które są potem obecne na komórkach nowotworowych [102, 103].

Zachodzi korelacja między obecnością CTL a stanem klinicznym. Gdy nowotwór jest niewielki, obserwuje się aktywność CTL, natomiast gdy choroba nowotworowa jest zaawansowana, tej aktywności nie stwierdza się [18]. CTL mogą raczej hamować tworzenie się przerzutów niż je niszczyć [28, 97]. Ludzie, których guzy są naciezione przez dużą liczbę CTL, mają lepsze rokowanie [47, 132]. Wzrost nowotworu hamują też limfocyty T pomocnicze [12, 24], które są uczulone na anty-

geny nowotworowe i mogą także indukować reakcją DTH w miejscu wzrostu guza, co może spowodować jego regresję [160].

Limfocyty T mogą mieć niekorzystne działanie na układ immunologiczny w przebiegu choroby nowotworowej. Wykazano, że limfocyty T supresorowe przez wydzielane swoiste czynniki supresorowe, wpływające hamująco na limfocyty T pomocnicze, mogą hamować zarówno odpowiedź humoralną, jak i komórkową [29, 37]. Należy brać pod uwagę istnienie tzw. przeciwiidotypowych cytotoksycznych limfocytów T, zdolnych do zabijania autologicznych cytotoksycznych limfocytów T uczulonych przeciwko komórkom nowotworowym [26].

AKTYWOWANE KOMÓRKI CYTOTOKSYCZNE

Limfocyty ludzkie można podzielić na limfocyty T, B oraz limfocyty trzeciej populacji, wśród których znajdują się „duże ziarniste limfocyty” (large granular lymphocytes = LGL). Część z nich po 48–72-godzinnej inkubacji z IL-2 [39, 92, 96], lektynami [90] lub allogenicznymi limfocytami [91] staje się cytotoksyczna dla różnych komórek nowotworowych: syngenicznych, allogenicznych lub świeżo pobranych autologicznych. Zabijają one nieswoiście zarówno komórki nowotworowe odporne, jak i wrażliwe na efekt cytotoksyczny komórek NK. Tak pobudzone limfocyty nazywane są aktywowanymi komórkami cytotoksycznymi (activated killer cells = AK cells).

Najwięcej uwagi poświęcono dotychczas komórkom AK, które były aktywowane przez IL-2 (lymphokine activated killer cells = LAK cells). Przypuszcza się, że w początkowym etapie aktywacji komórek pre-LAK oprócz IL-2 potrzebny jest interferon wydzielany przez limfocyty pod wpływem IL-2 [96]. Prekursory komórek LAK (pre-LAK) różnią się pod względem cech powierzchni z prekursorami komórek NK (pre-NK) i prekursorami cytotoksycznych limfocytów T (pre-CTL) [125]. Mysie komórki pre-LAK mają fenotyp powierzchniowy Thy-1⁺, Lyt-1-2⁺, nie przylegają do plastiku i waty nylonowej [125]. Ludzkie komórki pre-LAK są następujące: OKM 1⁻, OKT 3⁻, OKT 4⁻, OKT 8⁻, OKT 10⁻, OKT 11⁻, Leu 1⁻, Leu 7⁻ [125, 148]. Komórki pre-NK np. różnią się, bo są: OKM 1⁺, OKT 11⁺, Leu 7⁺, natomiast komórki pre-CTL są OKT 3⁺ i Leu 1⁺ [125]. Niektórzy badacze uważają, że komórki pre-LAK znajdują się zarówno w populacji komórek NK, jak i T [10].

Po inkubacji z IL-2 dojrzałe komórki LAK upodabniają się do cytotoksycznych limfocytów T. Są to: OKM 1⁻, OKT 3⁺, OKT 8⁺, OKT 10⁻ i Leu 1⁺, natomiast różnią się od dojrzałych komórek NK: OKM 1⁺, OKT 3⁻ i OKT 8⁻ [39, 125]. Komórki LAK, NK i CTL różnią się również pod względem czasu potrzebnego do wyindukowania ich własności cytotoksycznych. Cytotoksyczne komórki NK mogą być obecne od razu, komórki LAK pojawiają się po 2–3 dniach od za-

działania IL-2, a limfocyty CTL — po 5 lub 6 dniach od zetknięcia się ze swoistym antygenem [125].

Komórki LAK mogą pełnić ważną rolę w odporności na powstawanie nowotworów oraz w zwalczaniu już istniejących [125]. Wykazano, że hamują one rozwój powstałych uprzednio przerzutów czerniaka w płucach [92, 125].

LITERATURA

- [1] AGGARWALT B. B., MOFFAT B., NARKINS R. N., Human lymphotoxin, *J. Biol. Chem.*, **259**: 686–691, 1984.
- [2] ANDERSON K. C., BOYD A. W., FISCHER D. C., SLAUGHENHOUP T. B., GROOPMAN J. E., O'HARA C. J., DALEY J. F., SCHLOSSMAN S. F., NADLER L. M., Isolation and functional analysis of human B cell populations. I. Characterisation of the B1⁺B2⁻ and B1⁺B2⁻ subsets, *J. Immunol.*, **134**: 820–827, 1985.
- [3] BERKE G., GABISON D., Energy requirements of the binding and lytic steps of T lymphocyte-mediated cytotoxicity of leukemic cells in vitro, *Eur. J. Immunol.*, **5**: 671–675, 1975.
- [4] BIASI G., SAGGIN L., DAZZI F., De ROSSI A., COLLAVO D., Role of accessory cells in the induction of a secondary cytotoxic response to Moloney murine sarcoma virus-induced tumors, *J. Immunol.*, **130**: 1447–1450, 1983.
- [5] BLOOM E. T., Further definition by cytotoxicity test of cell surface antigens of human sarcomas in culture, *Cancer Res.*, **32**: 960–967, 1972.
- [6] BONAVIDA B., FAN J., HISERODT J. C., T-cell membrane antigens associated with cytotoxic function, *Immunol. Today*, **5**: 140–145, 1982.
- [7] BROCHIER J., MAGAUD J. P., CORDIER G., MILLET I., MARTI J., BRYON P. A., Heterogeneity of human B lymphocytes as revealed by monoclonal antibodies, *Ann. Immunol.*, **135D**: 283–299, 1984.
- [8] BURAKOFF S. J., Cell-mediated cytotoxicity, *Fed. Proc.*, **43**: 266–267, 1983.
- [9] BURGER C. J., ELGERT K. D., Interleukin 3 activity in tumor-bearing hosts: decreased splenocyte production of and responsiveness to IL 3, *Immunol. Commun.*, **13**: 255–268, 1984.
- [10] BURNS G. F., TRIGLIA T., WERKMEISTER J. A., In vitro generation of human activated lymphocyte killer cells: separate precursors and modes of generation of NK-like cells and "anomalous" killer cells, *J. Immunol.*, **133**: 1656–1663, 1984.
- [11] CARPENTIER N. A., FIERE D. M., SCHUH D., LANGE G. T., LAMBERT P. H., Circulating immune complexes and the prognosis of acute myeloid leukemia, *N. Engl. J. Med.*, **307**: 1174–1180, 1982.
- [12] CARTER R. H., DREBIN J. A., SCHATTEN S., PERRY L. L., GREENE M. I., Regulation of the immune response to tumor antigens. IX. In vitro Lyt-1⁺2⁻ cell proliferative responses to cell bound or subcellular tumor antigen, *J. Immunol.*, **130**: 997–1002, 1983.
- [13] CHEN Y., ANDERSON A. B., WILLIAMS K. G., Cytostatic immune effector T cells in murine plasmacytoma, *Fed. Proc.*, **43**: 1662, 1984.
- [14] CHERVENAK R., MOORHEAD J. W., COHEN J. I., Prethymic T cell precursors express receptors for antigen, *J. Immunol.*, **134**: 695–698, 1985.

- [15] CHOW D. A., WOLOSIN L. B., GREENBERG A. K., Murine natural antitumor antibodies. II. The contribution of natural antibodies to tumor surveillance, *Int. J. Cancer*, **27**: 459-469, 1981.
- [16] CIAVARRA R. P., TERRES G., Immune rejection mechanisms in murine leukemia. I. Timing of tumor cell rejection process relative to the development of humoral and cell-mediated cytotoxic immune responses, *Int. J. Cancer*, **34**: 681-688, 1984.
- [17] COGGESHALL K. M., CAMBIER J. C., B cell activation. VIII. Membrane immunoglobulins transduce signals via activation of phosphatidylinositol hydrolysis, *J. Immunol.*, **133**: 3382-3386, 1984.
- [18] CURRIE G., Immunological aspects of host resistance to the development and growth of cancer, *Bioch. Bioph. Acta*, **458**: 135-165, 1976.
- [19] DEMBIĆ Z., BANNWARTH W., TAYLOR B. A., Steimetz M., The gene encoding the T-cell receptor α -chain maps close to the Np-2 locus on mouse chromosome 14, *Nature*, **314**: 271-273, 1985.
- [20] DENNERT G., LOTAN R., Effects of retinoic acid on the immune system: stimulation of T killer cell induction, *Eur. J. Immunol.*, **8**: 23-29, 1978.
- [21] ENGERS H. D., LAHAYE T., SORENSON G. D., GLASERBROOK A. E., HORVATH C., BRUNNER K. T., Functional activity in vivo of effector T cell populations. II. Anti-tumor activity exhibited by syngeneic anti-MoMULV-specific cytolytic T cell clones, *J. Immunol.*, **133**: 1664-1670, 1984.
- [22] EVANS R., Host cells in transplanted murine tumors and their possible relevance to tumor growth, *J. Reticuloendothel. Soc.*, **26**: 427-437, 1979.
- [23] FARRAR W. L., JOHNSON H. M., FARRAR J. J., Regulation of the production of immune interferon and cytotoxic T lymphocytes by interleukin 2, *J. Immunol.*, **126**: 1120-1125, 1981.
- [24] FERNANDEZ-CRUZ E., WODA B. A., FELDMAN J. D., Elimination of syngeneic sarcomas in rats by a subset of T lymphocytes, *J. Exp. Med.*, **152**: 823-841, 1980.
- [25] FISHELSON Z., BERKE G., Tumor cell destruction by cytotoxic T lymphocytes: the basis of reduced antitumor cell activity in syngeneic hosts, *J. Immunol.*, **126**: 2048-2052, 1981.
- [26] FLOOD P. M., KRIPKE M. L., ROWLEY D. A., SCHREIBER H., Suppression of tumor rejection by autologous anti-idiotypic immunity, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**: 2209-2213, 1980.
- [27] GATELY M. K., MARTZ E., Comparative studies on the mechanisms of nonspecific, Con A-dependent cytotoxicity and specific T cell-mediated cytotoxicity, *J. Immunol.*, **119**: 1711-1722, 1977.
- [28] GENOVESI E. V., MARX P. A., WHEELOCK E. F., Susceptibility of Friend virus antigen-modulated erythroleukemic cells to lysis by T-lymphocytes from mice with dormant Friend virus infection, *J. Immunol.*, **122**: 795-800, 1979.
- [29] GERMAIN R. N., BENACERRAF B., Helper and suppressor T cell factors, *Springer Semin. Immunopathol.*, **3**: 93-127, 1980.
- [30] GERSHON R. K., EARDLEY D. D., DURUM S., GREEN D. R., SHEN F. W., YAMAUCHI K., CANTOR H., MURPHY D. B., Contrasuppression: An novel immunoregulatory activity, *J. Exp. Med.*, **153**: 1533-1546, 1981.
- [31] GILLIS S., SMITH K. A., Long-term culture of tumor-specific cytotoxic T-cells, *Nature*, **268**: 154-156, 1977.
- [32] GOLDSTEIN P., SMITH E. T., Mechanism of T cell-mediated cytotoxicity: the lethal hit stage, *Contemp. Top. Immunobiol.*, **4**: 273-285, 1977.
- [33] GOLDSTEIN P., FOA C., MacLENNAN I. C. N., Mechanism of T cell-mediated cytotoxicity: the differential impact of cytochalasins at the recognition and lethal hit stages, *Eur. J. Immunol.*, **8**: 302-309, 1978.
- [34] GÓRSKI A., Immunoregulacja syntezy przeciwciał u człowieka, *Immunol. Polska*, **IX**: 29-35, 1984.

- [35] GRANGER G. A., YAMAMOTO R. S., FAIR D. S., HISERODT J. C., The human LT system. I. Physical-chemical heterogeneity of LT molecules released by mitogen activated human lymphocytes in vitro, *Cell. Immunol.*, **38**: 388–402, 1978.
- [36] GREENE D. R., EARDLEY D. D., KIMURA A., MURPHY D. B., YAMAUCHI K., GERSHON R. K., Immunoregulatory circuits which modulate responsiveness to suppressor cell signals: Characterisation of an effector cell in the contrasuppressor circuit, *Eur. J. Immunol.*, **11**: 973–979, 1981.
- [37] GREENE D. R., FLOOD P. M., GERSHON R. K., Immunoregulatory T-cell pathways, *Ann. Rev. Immunol.*, **1**: 439–463, 1983.
- [38] GREENE D. R., MARTIN S. S., Suppression and contrasuppression in the regulation of GUT-associated immune responses, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **409**: 284–291, 1983.
- [39] GRIMM E. A., RAMSEY K. M., MAZUMDER A., WILSON D. J., DJEU J. Y., ROSENBERG S. A., Lymphokine-activated killer cell phenomenon. II. The precursor phenotype is serologically distinct from peripheral T lymphocytes, memory CTL, and NK cells, *J. Exp. Med.*, **157**: 884–897, 1983.
- [40] HARŁOZIŃSKA A., LANGE A., WOŹNIEWSKI A., KASPRZAK A., ŻÓLCZYŃSKA-KASPEROWICZ B., SZYMAŃSKA J., Antitumor immunity in patients with carcinoma of the large intestine, *Arch. Immunol. Ther. Exp.*, **22**: 541–549, 1974.
- [41] HASKILL J. S., FETT J. W., Possible evidence for antibody-dependent macrophage-mediated cytotoxicity directed against murine adenocarcinoma cells in vivo, *J. Immunol.*, **117**: 1922–1998, 1976.
- [42] HASKILL J. S., YAMAMURA Y., RADOV L., PARTHENAIS E., Discussion paper: Are peripheral and in situ tumor immunity related?, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **76**: 373–380, 1976.
- [43] HASKILL J. S., RADOV L. A., FETT J. U., PARTHENAIS E., The antibody response to the T1699 murine adenocarcinoma: antibody class and subclass heterogeneity detected in serum and in situ. *J. Immunol.*, **119**: 1000–1005, 1977.
- [44] HEMLER M. E., BRENNER M. B., McLEAN J. M., STROMINGER J. L., Antigenic stimulation regulates the level of expression of interleukin 2 receptor on human T cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**: 2172–2175, 1984.
- [45] HERBERMAN R. B., ORTALDO J. R., Natural killer cells: their role in defenses against disease, *Science*, **214**: 24–30, 1981.
- [46] HERON I., HOKLAND M., MØLLER-LARSEN A., BERG K., The effects of interferon on lymphocyte-mediated effector cell functions: selective enhancement of natural killer cells, *Cell. Immunol.*, **42**: 183–187, 1979.
- [47] HIRATSUKA H., IMAMURA M., ISHII Y., KIKUCHI K., Immunohistologic detection of lymphocyte subpopulations infiltrating in human oral cancer with special reference to its clinical significance, *An. J. Clin. Pathol.*, **81**: 464–470, 1984.
- [48] HISERODT J. C., YAMAMOTO R. S., GRANGER G. A., The human LT system. IV. Studies on the large MW LT-complex class: association of these molecules with specific antigen binding receptor(s) in vitro, *Cell. Immunol.*, **41**: 380–396, 1978.
- [49] — The human LT system. III. Characterisation of a large molecular weight LT class (complex) composed of the various smaller LT classes and subclasses in association with Ig-like molecules, *Cell. Immunol.*, **38**: 417–433, 1978.
- [50] HOFFMAN T., HIRATA F., BOUGNOUX F., FRASER B. A., GOLDFARB R. H., Herberman R. B., Axelrod J., Phospholipid methylation and phospholipase A₂ activation in cytotoxicity by human natural killer cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**: 3839–3843, 1981.
- [51] HOLDEN H. T., HASKILL J. S., KIRCHNER H., HERBERMAN R. B., Two functionally distinct anti-tumor effector cells isolated from primary murine sarcoma virus-induced tumors, *J. Immunol.*, **117**: 440–446, 1976.
- [52] IHLE J. N., HAPER A., GREENBERG J., LEE J. C., REIN A., Possible role of inter-

- leukin 3 in the regulation of lymphocyte differentiation, [w] *The Potential Role of T Cells in Cancer Therapy*, red. A. Fefer and A. Goldstein, Raven Press, New York 1982, 93–112.
- [53] IRIE K., IRIE R. F., MORTON D. L., Evidence for in vivo reaction of antibody and complement to surface antigens of human cancer cells, *Science*, **186**: 454–456, 1974.
- [54] JAMES K., An introduction to tumour immunology, *Arch. Immunol. Ther. Exp.*, **31**: 795–808, 1985.
- [55] JELINEK D. F., LIPSKY P. E., The role of B cell proliferation in the generation of immunoglobulin-secreting cells in man, *J. Immunol.*, **130**: 2597–2604, 1983.
- [56] JOHNSON B. J., PASTERNAK G. R., SHIN H. S., Antibody mediated suppression of tumor growth. I. Suppression by murine IgG, isolated from alloantiserum, *J. Immunol.*, **118**: 489–493, 1977.
- [57] JOHNSTONE A. P., Chronic lymphocytic leukemia and its relationship to normal B lymphopoiesis, *Immunol. Today*, **12**: 343–346, 1982.
- [58] JONES N., LEIDEN J., DIALYNAS D., FRASER J., CLABBY M., KISHIMOTO T., STROMINGER J. L., ANDREWS D., LANE N., WOODY J., Partial primary structure of the alpha and beta chains of human tumor T-cell receptors, *Science*, **227**: 311–314, 1985.
- [59] KAYE J., GILLIS S., MIZEL S. B., SHEVACH E. M., MALEK T. R., DINARELLO C. A., LACHMAN L. B., JANEWAY C. A., Growth of a cloned helper T cell line induced by a monoclonal antibody specific for the antigen receptor: interleukin 1 is required for the expression of receptors for interleukin 2, *J. Immunol.*, **133**: 1339–1345, 1984.
- [60] KERN D. E., GILLIS S., OKADA M., HENNEY C. S., The role of interleukin-2 (IL-2) in the differentiation of cytotoxic T cells: the effect of monoclonal anti-IL-2 antibody and absorption with IL-2 dependent T cell lines, *J. Immunol.*, **127**: 1323–1328, 1981.
- [61] KIKUCHI K., ISHII Y., UENO H., KOSHIBA H., Cell-mediated immunity involved in autochthonous tumor rejection in rats, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **76**: 188–206, 1976.
- [62] KIRCH M. E., HAMMERLING U., Immunotherapy of murine leukemias by monoclonal antibody. I. Effect of passively administered antibody on growth of transplanted tumor cells, *J. Immunol.*, **127**: 805–810, 1981.
- [63] KISHIMOTO T., YOSHIZAKI K., KIMOTO M., OKADA M., KURITANI T., KIKUTANI H., SHIMIZU K., NAKAGAWA T., NAKAGAWA N., MIKI Y., KISHI H., FUKUNAGA K., YOSHIKIKO T., TAGA T., B cell growth and differentiation factors and mechanisms of B cell activation, *Immunol. Rev.*, **78**: 97–118, 1984.
- [64] KLAUS G. G. B., HAWRYLOWICZ C. M., Cell-cycle control of lymphocyte stimulation, *Immunol. Today*, **5**: 15–19, 1984.
- [65] KLEIN E., VANKY F., GALILI U., VOSE B. M., FOPP M., Separation and characteristics of tumor-infiltrating lymphocytes in man, *Contemp. Top. Immunobiol.*, **10**: 79–107, 1980.
- [66] KLEIN E., BECKER S., SVEDMYR E., JONDAL M., VANKY F., Tumor infiltrating lymphocytes, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **76**: 207–216, 1976.
- [67] KLEIN G., KLEIN E., Immune surveillance against virus-induced tumors and nonresectability of spontaneous tumors: Contrasting consequences of host versus tumor evolution, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **75**: 2121–2125, 1977.
- [68] KLOSTERGAARD J., YAMAMOTO R. S., GRANGER G. A., Human and murine lymphotoxins as a multicomponent system: progress in purification of the human α_H component, *Mol. Immunol.*, **17**: 613–623, 1980.
- [69] KRIM M., Towards tumor therapy with interferon, part I. Interferons: production and properties, *Blood*, **55**: 711–721, 1980.
- [70] KURATA S., TSUCHIYA T., NORIMURA T., YAMASHITA U., Evidence for cytostatic T cell activity in the effector mechanism against syngeneic TMT mammary tumor cells in mice, *J. Immunol.*, **130**: 496–500, 1983.
- [71] LAMON E. W., T cell specificity: endogenous versus acquired receptors, *Transplantation*, **29**: 1–3, 1980.

- [72] LANNIN D. R., YU S., McKHANN C. F., T cell must recognize tumor antigen in association with self-MHC antigen, *Transplant. Proc.*, **13**: 739-741, 1981.
- [73] LANZAVECCHIA A., Antigen-specific interaction between T and B cells, *Nature*, **314**: 537-539, 1985.
- [74] LARSSON E.-L., ISCOVE N. N., COUTINHO A., Two distinct factors are required for induction of T-cell growth, *Nature*, **283**: 664-666, 1980.
- [75] LeCLERC J. C., CANTOR H., T cell-mediated immunity to oncornavirus-induced tumors. I. Ly phenotype of precursor and effector cytolytic T lymphocytes, *J. Immunol.*, **124**: 846-850, 1980.
- [76] LeCLERC J. C., CANTOR H., T cell-mediated immunity to oncornavirus-induced tumors. II. Ability of different T cell sets to prevent tumor growth in vivo, *J. Immunol.*, **124**: 851-854, 1980.
- [77] LEE S. H., AGGARWAL B. B., RINDERKNECHT E., ASSISI F., CHIU H., The synergistic anti-proliferative effect of γ -interferon and human lymphotoxin, *J. Immunol.*, **133**: 1083-1086, 1984.
- [78] LEOPARDI E., FRIEND D. S., ROSENAU W., Target cell lysis: ultrastructural and cytoskeletal alternations, *J. Immunol.*, **133**: 3429-3436, 1984.
- [79] LEWIS M. G., PHILLIPS T. M., JERRY L. M., Immunizing against receptors for antigen, *Lancet*, **2**: 858, 1976.
- [80] LILL P. H., FORTNER G. W., Identification and cytotoxic reactivity of inflammatory cells recovered from progressing or regressing syngeneic UV-induced murine tumors, *J. Immunol.*, **121**: 1854-1860, 1978.
- [81] LoCASCIO N. J., HAUGHTON G., ARNOLD L. W., CORLEY R. B., Role of cell surface immunoglobulin in B-lymphocyte activation, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**: 2466-2469, 1984.
- [82] MacDONALD H. R., SEKALY R. P., KANAGAWA O., THIERNESSE N., TASWELL C., CEROTTINI J.-C., WEISS A., GLASEBROOK A. L., ENGERS H. D., KELSO A., BRUNNER K. T., BRON C., Cytolytic T lymphocyte clones, *Immunobiology*, **161**: 84-106, 1982.
- [83] MARRACK P., More on the T-cell receptor, *Nature*, **309**: 310-311, 1984.
- [84] MARTIN S. E., MARTIN W. J., Anti-tumor antibodies in normal mouse sera, *Int. J. Cancer*, **15**: 658-664, 1975.
- [85] MARTZ E., BURAKOFF S. J., BENACERRAF B., Interruption of the sequential release of small and large molecules from tumor cells by low temperature during cytolysis mediated by immune T cells or complement, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **71**: 177-181, 1974.
- [86] MARTZ E., Early steps in specific tumor cell lysis by sensitized mouse T lymphocytes. I. Resolution and characterisation, *J. Immunol.*, **115**: 261-265, 1975.
- [87] — Mechanism of specific tumor cell lysis by alloimmune T lymphocytes: Resolution and characterisation of discrete steps in the cellular interaction, *Contemp. Top. Immunobiol.*, **7**: 301-315, 1977.
- [88] MATTER A., Microcinematographic and electron microscopic analysis of target cell lysis induced by cytotoxic T lymphocytes, *Immunology*, **36**: 179-190, 1979.
- [89] MAYER M. M., The complement system, *Sci. Am.*, **229**: 54-66, 1973.
- [90] MAZUMDER A. M., GRIMM E. A., ZHANG H. Z., ROSENBERG S. A., Lysis of fresh human solid tumours by autologous lymphocytes activated in vitro with lectins, *Cancer Res.*, **42**: 913-918, 1982.
- [91] MAZUMDER A., GRIMM E. A., ROSENBERG S. A., The lysis of fresh human solid tumors by autologous lymphocytes activated in vitro by allosensitization, *Cancer Immunol. Immunother.*, **15**: 1-10, 1983.
- [92] MAZUMDER A., ROSENBERG S. A., Successful immunotherapy of natural-killer-resistant established pulmonary melanoma metastases by the intravenous adoptive transfer of syngeneic lymphocytes activated in vitro by interleukin-2, *J. Exp. Med.*, **159**: 495-507, 1984.

- [93] McDEVITT H. O., Speculations on how Ia antigens (Ir genes) influence the specificity of the immune response, *Ann. Immunol.*, **135D**: 17-19, 1984.
- [94] MENARD S., COLNAGHI M. I., DELLA PORTA G., Natural anti-tumor serum reactivity in Balb/c mice. I. Characterization and interference with tumor growth, *Int. J. Cancer*, **19**: 267-274, 1977.
- [95] MORGAN A. C., ROSSEN R. D., TWOMEY J. J., Naturally occurring circulating immune complexes: normal human serum contains idiotype-antiidiotype complexes dissociable by certain IgG antiglobulins, *J. Immunol.*, **122**: 1672-1680, 1979.
- [96] NISHIMURA T., HASHIMOTO Y., Induction of nonspecific killer T cells from non-immune mouse spleen cells by culture with interleukin 2, *Gann*, **75**: 177-186, 1984.
- [97] NORTH R. J., KIRSTEIN D. P., T-cell-mediated concomitant immunity to syngeneic tumors, *J. Exp. Med.*, **145**: 275-292, 1977.
- [98] OKADA M., SAKAGUCHI N., YOSHIMURA N., HARA H., SHIMIZU K., YOSHIDA N., YOSHIZAKI S., YAMAMURA Y., KISHIMOTO T., B cell growth factors and B cell differentiation factor from human T hybridomas, *J. Exp. Med.*, **157**: 583-590, 1983.
- [99] PALACIOS R., HENSON G., STEINMETZ M., McKEARN J. P., Interleukin-3 supports growth of mouse pre-B-cell clones in vitro, *Nature*, **309**: 126-131, 1984.
- [100] PATEK P. Q., COLLINS J. L., COHN M., Evidence that cytotoxic T cells and natural cytotoxic cells use different lytic mechanisms to lyse the same targets, *Eur. J. Immunol.*, **13**: 433-436, 1983.
- [101] PERRY L. L., GREENE M. I., T cell subset interactions in the regulation of syngeneic tumor immunity, *Fed. Proc.*, **40**: 39-44, 1981.
- [102] PLATA R., JONGEENEL V., CEROTTINI J. C., BRUNNER K. T., Antigenic specificity of the cytolytic T lymphocyte (CTL) response to murine sarcoma virus-induced tumors, *Eur. J. Immunol.*, **6**: 823-829, 1976.
- [103] PLATER C., DEBRE P., LECLERC J. C., T cell-mediated immunity to oncornavirus-induced tumors. III. Specific and nonspecific suppression in tumor bearing mice, *Eur. J. Immunol.*, **11**: 39-44, 1981.
- [104] PLASTOUCAS C. D., Human T cell antigens involved in cytotoxicity against allogeneic or autologous chemically modified targets. Association of the Leu 2a/T8 antigen with effector-target cell binding and of the T3/Leu 4 antigen with triggering, *Eur. J. Immunol.*, **14**: 566-577, 1984.
- [105] PLAUT M., BUBBERS J. E., HENNEY C. S., Studies on the mechanisms of lymphocyte-mediated cytotoxicity. VII. Two stages in the T cell-mediated lytic cycle with distinct cation requirements, *J. Immunol.*, **116**: 150-155, 1976.
- [106] PODACK E. R., TSCHOPP J., Circular polymerization of the ninth component of complement (poly C9): ring closure of the tubular complex confers resistance to detergent dissociation and to proteolytic degradation, *J. Biol. Chem.*, **257**: 15204-15212, 1982.
- [107] PODACK E. R., KONIGSBERG P. J., Cytolytic T cell granules. Isolation, structural, biochemical, and functional characterisation, *J. Exp. Med.*, **160**: 695-710, 1984.
- [108] PODACK E. R., The molecular mechanism of lymphocyte-mediated tumor cell lysis, *Immunol., Today*, **6**: 21-27, 1985.
- [109] POLLOK B. A., LAMON E. W., Murine T cells that lyse antibody-sensitized targeted cells. IV. Analysis of Thy 1 and Lyt surface antigen expression among thymic K cells, *Cell. Immunol.*, **65**: 272-279, 1981.
- [110] RAMILA G., STUDER S., KENNEDY M., SKLENAR I., ERB P., Evaluation of accessory cell heterogeneity. I. Differential accessory cell requirement for T helper cell activation and for T-B cooperation, *Eur. J. Immunol.*, **15**: 1-6, 1985.
- [111] RANSOM J. H., EVANS C. H., McCABE R. P., POMATO N., HEINBAUGH J. A., CHIN M., HANNA M. G., Leukoregulin, a direct-acting anticancer immunological hormone that is distinct from lymphotoxin and interferon, *Cancer Res.*, **45**: 851-862, 1985.

- [112] RATCLIFFE M. H. J., MITCHISON N. A., Function of Ig receptors in B-cell triggering, *Ann. Immunol.*, **135D**: 73–79, 1984.
- [113] REDELMAN D., HUDIG D., The mechanism of cell-mediated cytotoxicity. I. Killing by murine cytotoxic T lymphocytes requires cell surface thiols and activated proteases, *J. Immunol.*, **124**: 870–878, 1980.
- [114] REINHERZ E. L., SCHLOSSMAN S. F., Human inducer- and suppressor-T-cell-subset regulation of B-cell immunoglobulin production, [w] *Human B-lymphocyte function: Activation and immunoregulation*, red. A. S. Fauci and R. E. Ballieux, Raven Press, New York 1978, 201–212.
- [115] REINHERZ E. L., KUNG P. C., GOLDSTEIN G., SCHLOSSMAN S. F., Further characterisation of the human inducer T cell subset defined by monoclonal antibody, *J. Immunol.*, **123**: 2894–2896, 1979.
- [116] — A monoclonal antibody with selective reactivity with functionally mature human thymocytes and all peripheral human T cells, *J. Immunol.*, **123**: 1312–1317, 1979.
- [117] — Separation of functional subsets of human T cells by a monoclonal antibody, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **64**: 4061–4065, 1979.
- [118] REINHERZ E. L., KUNG P. C., GOLDSTEIN G., LEVEY R., SCHLOSSMAN S. F., Discrete stages of human intrathymic differentiation: analysis of normal thymocytes and lymphoblasts of T cell lineage, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**: 1588–1592, 1979.
- [119] REINHERZ E. L., KUNG P. C., GOLDSTEIN G., SCHLOSSMAN S. F., A monoclonal antibody reactive with the human cytotoxic-suppressor T cell subset previously defined by a heteroantiserum termed anti-TH₂, *J. Immunol.*, **124**: 1301–1307, 1980.
- [120] REINHERZ E. L., SCHLOSSMAN S. F., Strategies for regulating the human immune response by selective T cell subset manipulation, [w] *The Potential Role of T Cells in Cancer Therapy*, red. A. Fefer and A. Goldstein, Raven Press, New York 1982, 253–268.
- [121] ROBB R. J., MUNCK A., SMITH K. A., T cell growth factor receptors: quantitation, specificity, and biological relevance, *J. Exp. Med.*, **154**: 1455–1474, 1981.
- [122] ROOB R. J., Interleukin 2: the molecule and its function, *Immunol. Today*, **5**: 203–205, 1984.
- [123] ROBB R. J., GREENE W. C., RUSK C. M., Low and high affinity cellular receptors for interleukin 2: implications for the level of Tac antigen, *J. Exp. Med.*, **160**: 1126–1146, 1984.
- [124] ROBERTSON M., T-cell receptor. The present state of recognition, *Nature*, **317**: 768–771, 1985.
- [125] ROSENBERG S. A., Adoptive immunotherapy of cancer: accomplishments and prospects, *Cancer Treat. Rep.*, **68**: 233–255, 1984.
- [126] RUSCETTI F. W., GALLO R., Human T lymphocyte growth factor: regulation of growth and function of T lymphocytes, *Blood*, **57**: 379–394, 1981.
- [127] SANDERSON C. J., GLAUERT A. M., The mechanism of T cell mediated cytotoxicity *Immunology*, **36**: 119–129, 1979.
- [128] SCHATTEN S., DREBIN J. A., GRANSTEIN R. D., GREENE M. I., Differential antigen presentation in tumor immunity, *Fed. Proc.*, **43**: 2460–2464, 1984.
- [129] SCHREIER M. H., TEES R., NORDIN A. A., RENNER R., BIANCHI A. T. J., van ZWIETEN M. J., Functional aspects of helper T cell clones, *Immunobiol.*, **161**: 107–138, 1982.
- [130] SETO M., TAKAHASHI T., NAKAMURA S., MATSUDAIRA Y., NISHIZUKA Y., In vivo anti-tumor effects of monoclonal antibodies with different immunoglobulin classes, *Cancer Res.*, **43**: 4768–4773, 1983.
- [131] SHEARER G. M., REHN T. G., GARBARINO C. G., Cell-mediated lympholysis of trinitrophenyl-modified autologous lymphocytes. Effector cell specificity of modified cell surface components controlled by the H-2K and H-2D serological regions of the murine major histocompatibility complex, *J. Exp. Med.*, **141**: 1348–1364, 1975.
- [132] SHIMOKAWARA I., IMAMURA M., YAMANAKA N., ISHII Y., KIKUCHI K., Mo-

- dification of lymphocytes subpopulation in human breast cancer tissue and its significance: An immunoperoxidase study with antihuman T- and B-cell area, *Cancer*, **49**: 1456–1464, 1982.
- [133] SHIN H. S., HAYDEN M., LANGLEY S., KALISS N., SMITH M. R., Antibody-mediated suppression of grafted lymphoma. III. Evaluation of the role of thymic function, non-thymus derived lymphocytes, macrophages, platelets, and polymorphonuclear leukocytes in syngeneic and allogeneic hosts, *J. Immunol.* **114**: 1255–1263, 1975.
- [134] SHIN H. S., ECONOMOU J. S., PASTERNAK G. R., JOHNSON R. J., HAYDEN M. L., Antibody-mediated suppression of grafted lymphoma. IV. Influence of time of tumor residency in vivo and tumor size upon the effectiveness of suppression by syngeneic antibody, *J. Exp. Med.*, **144**: 1274–1283, 1976.
- [135] SINGER A., ASANO Y., SHIGETA M., HATHCOCK K. S., AHMED A., FATHMAN C. G., HODES R. J., Distinct B cell subpopulations differ in their genetic requirements for activation by T helper cells, *Immunol. Rev.*, **64**: 137–160, 1982.
- [136] SIWICKI J. K., Zastosowanie przeciwciał monoklonalnych do identyfikacji antygenów różnicujących subpopulacje komórek układu odpornościowego, *Immunol. Polska*, **VIII**: 55–76, 1983.
- [137] SKÓRSKI T., Rola makrofagów, monocytów i granulocytów w zwalczaniu nowotworów, *Post. Biol. Kom.*, **3–4**: 185–204, 1985.
- [138] — Komórki NK i K: charakterystyka, stymulacja aktywności i rola w zwalczaniu nowotworów, *Post. Biol. Kom.*, **1**, 1986.
- [139] SMITH K. A., T-cell growth factor, *Immunol. Rev.*, **51**: 337–357, 1980.
- [140] SONIS S. T., STELOS P., FITZGERALD M. A., BEAR S. A., WILSON R. E., The role of effector cells and antiserum in the inhibition of cell-mediated cytotoxicity of allogeneic tumor cells, *Transplantation*, **22**: 52–60, 1976.
- [141] SPRENT J., T/B collaboration in vivo vs. in vitro, *Ann. Immunol.*, **135D**: 98–105, 1984.
- [142] THEOFILOPOULOS A. N., Immune complexes in cancer, *N. Engl. J. Med.*, **307**: 1208–1209, 1982.
- [143] THEOFILOPOULOS A. N., PRUD'HOMME G. J., DIXON F. J., Interleukins in murine lupus, *Cancer Treat. Rep.*, **1**: 53–60, 1985.
- [144] TING C.-C., BONNARD G. D., Cell-mediated immunity to Friend virus-induced leukemia. IV. In vitro generation of primary and secondary cell-mediated cytotoxic responses, *J. Immunol.*, **116**: 1419–1425, 1976.
- [145] TING C.-C., RODRIGUES D., NORDAN R., Studies of the mechanisms for the induction of in vivo tumor immunity. VI. Induction of specific and nonspecific cell-mediated immunity in tumor-bearing hosts and its correlation with transplantation tumor immunity, *Cell. Immunol.*, **66**: 45–58, 1982.
- [146] VAAGE J., In vivo and in vitro lysis of mouse cancer cells by antimetastatic effectors in normal plasma, *Cancer Immunol. Immunother.*, **4**: 257–261, 1978.
- [147] VOSE B. M., Specific T-cell-mediated killing of autologous lung tumour cells, *Cell. Immunol.*, **55**: 12–19, 1980.
- [148] VOSE B. M., MOORE M., Cultured human T-cell lines kill autologous solid tumours, *Immunol. Lett.*, **3**: 237–241, 1981.
- [149] VOSE B. M., BONNARD G. D., Human tumour antigens defined by cytotoxicity and proliferative responses of cultured lymphoid cells, *Nature*, **296**: 359–361, 1982.
- [150] WAGNER H., HARDT C., HEEG K., PFIZENMAYER K., STÖTTER H., RÖLLINGHOFF M., The in vivo effects of interleukin 2 (TCGF), *Immunobiology*, **161**: 139–156, 1982.
- [151] WALDMANN T. A., GOLDMANN C. K., ROBB R. J., DEPPER J. M., LEONARD W. J., SHARROW S. O., BONGIOVANNI K. F., KORSMEYER S. J., GREENE W. C., Expression of interleukin 2 receptors on activated human B cells, *J. Exp. Med.*, **160**: 1450–1466, 1984.

- [152] WARE C. F., GRANGER G. A., Mechanisms of lymphocyte-mediated cytotoxicity. III. Characterization of the mechanisms of inhibition of the human alloimmune lymphocyte-mediated cytotoxicity reaction by polyspecific anti-lymphotoxin sera in vitro, *J. Immunol.*, **126**: 1934-1940, 1981.
- [153] WEISS A., MacDONALD H. R., CEROTTINI J.-C., BRUNNER K. T., Inhibition of cytolytic T lymphocyte clones reactive with Moloney leukemia virus-associated antigens by monoclonal antibodies: a direct approach to the study of H-2 restriction, *J. Immunol.*, **126**: 482-485, 1981.
- [154] WELTE K., ANDREEFF M., PLATZER E., HOLLOWAY K., RUBIN B. Y., MOORE M. A. S., MERTELSMANN R., Interleukin 2 regulates the expression of Tac antigen on peripheral blood T lymphocytes, *J. Exp. Med.*, **160**: 1390-1403, 1984.
- [155] WHEELOCK E. F., WEINHOLD K. J., INGENITO G. G., GOLDSTEIN L. T., In vivo lysis of L5178Y cells in the establishment of the tumour dormant state in DBA/2 mice, *J. Immunol.*, **124**: 1642-1647, 1980.
- [156] WHEELOCK E. F., ROBINSON M. K., Biology of disease. Endogenous control of the neoplastic process, *Lab. Invest.*, **48**: 120-139, 1983.
- [157] WILLIAMS A. F., The T-lymphocyte antigen receptor — elusive no more, *Nature*, **308**: 108-109, 1984.
- [158] WOOD W. C., KORNBLITH P. L., QUINDLEN E. A., POLLOK L. A., Detection of humoral immunoresponse to human brain tumors, *Cancer*, **43**: 86-90, 1979.
- [159] YAMAUCHI K., GREEN D. R., EARDLEY D. D., MURPHY D. B., GERSHON R. K., Immunoregulatory circuits that modulate responsiveness to suppressor cell signals: The failure of B10 mice to respond to suppressor factors can be overcome by quenching the contrasuppressor circuit, *J. Exp. Med.*, **153**: 1547-1561, 1981.
- [160] ZBAR B., WEPSIC H. T., RAPP H. J., STEWARD L. C., BORSOS T., Two step mechanism of tumor graft rejection in syngeneic guinea pigs, *J. Natl Cancer Inst.*, **44**: 701-708, 1970.
- [161] ZBROJA-SONTAG W., Autoprzeciwiała w surowicy krwi chorych z nowotworami jajnika, *Immunol. Polska*, **VII**: 49-58, 1982.
- [162] ZIGHELBOIM J., BONAVIDA B., FAHEY J. L., Antibody-mediated in vivo suppression of EL4 leukemia in a syngeneic host, *J. Natl. Cancer Inst.*, **52**: 879-881, 1974.
- [163] ZINKERNAGEL R. M., DOHERTY P. C., MHC-restricted cytotoxic T cells: studies on the biological role of polymorphic major transplantation antigens determining T cell restriction-specificity function and responsiveness, *Adv. Immunol.*, **27**: 51-177, 1979.
- [164] ZUBLER R., Roles of the specific T-helper signal and the antigen signal in B-cell activation, *Ann. Immunol.*, **135D**: 79-82, 1984.
- [165] ZUBLER R. H., LOWENTHAL J. W., ERARD F., HASHIMOTO N., DEVOS R., MacDONALD R., Activated B cells express receptors for, and proliferate in response to, pure interleukin 2, *J. Exp. Med.*, **160**: 1170-1183, 1984.

Otrzymano: 15.12.1985

Przyjęto: 14.04.1986

Adres autora: ul. Marymoncka 99/103, 01-813 Warszawa

II OGÓLNOPOLSKA KONFERENCJA BIOLOGII KOMÓRKI

ABSTRACTS OF POSTERS PRESENTED AT THE SECOND NATIONAL CONFERENCE
ON CELL BIOLOGY

Warsaw, 18—20 September, 1985

SECTION I

GENOMES, GEN EXPRESSION, DIFFERENTIATION AND DEVELOPMENT

The formation of “accessory nuclei” in the developing oocytes of *Siphonophanes grubei* (Dybowski) (Crustacea, Anostraca).

Ryszard T. Adamski, Department of General Zoology, Zoological Institute, Wrocław University, Sienkiewicza 21, 50-335 Wrocław, Poland.

During vitellogenesis in the oocytes of *S. grubei* there appear structures resembling nuclei though different in being Feulgen-negative. Similar structures were described in insects. In *S. grubei* the nuclear envelope folds and the accessory nuclei “budge” from the oocyte nucleus. Their role and further fate are still unclear. In moderately advanced vitellogenesis they are scattered throughout the ooplasm. During further vitellogenesis they accumulate in the peripheral ooplasm, the latter becoming more and more basophilic as a result of free ribosome accumulation. Around the accessory nuclei an electron dense material occurs, especially around the pores. Its origin and role in ribosome formation are unknown. The peripheral distribution of numerous organelles resembling nuclei and containing RNA during the protein yolk synthesis, their possible regulatory role in the proces is discussed. The accessory nuclei still persist after the protein yolk formation has been completed. Thus, though they might regulate the process, they are not transformed into the protein yolk spheres. Their Feulgen-negativity suggests them being controlled by the oocyte nucleus.

Changes in chromatin condensation degree in the nuclei of pollen cell in relation to DNA replication and transcription level.

E. Bednarska, Copernicus University, Institute of Biology, Department of Plant Cytology and Genetics, 87-100 Toruń Poland.

The changes in chromatin condensation degree observed during the interphase of pollen nuclei occur independently of the replication process of nuclear DNA. Such changes have been observed both in the generative nucleus undergoing replication and in the vegetative nucleus, no matter whether it synthesizes DNA (*Hyacinthus orientalis* (or not) *Convallaria maialis*). The changes in chromatin condensation degree are linked to the transcription level. The process of chromatin decondensation is concomitant with an enhancement of RNA synthesis, whereas condensation goes together with a drop in RNA synthesis.

Oocyte-follicle cell gap junctions in the ovaries of the beetles: *Tribolium destructor* and *Gyrinus natator*. Their occurrence and possible role in oogenesis.

S. Biliński, T. Szklarzewicz. Institute of Zoology, Jagiellonian University, 30-060 Kraków, Poland.

During previtellogenesis in the species under study oocyte-follicle cell gap junctions are infrequent whereas at the onset of vitellogenesis the number of gap junctions increases considerably. It might be suggested that the increase in gap junction number is due to the action of a juvenile hormone, which is known to act at the onset of vitellogenesis. It seems probable that during vitellogenesis the gap junctions are actively involved in the transport of low-molecular-weight yolk precursors from follicle cells to the oocyte.

Sperm cell development in the pollen grains of *Sambucus*.

Maria Charzyńska, Department of Plant Physiology, Warsaw University, Poland.

Sperm cell development as a result of generative cell division in tricellular type pollen grains of *Sambucus nigra* was examined using light and electron microscopy. It has been shown that the generative cell divides after detachment from the pollen grain wall. The generative cell at division time is a free, not walled cell situated within the vegetative cell. It is surrounded by labile pericellular space only, which is delimited by the generative and vegetative cell plasma membranes.

Conventional mitosis in the generative cell is followed by cytokinesis involving the cell plate formation. The cell plate separates sperm cell protoplasts, nevertheless two sperm cells are enclosed together by a common pericellular space and the vegetative cell plasma membrane. This sperm cell association appears to be maintained during sperms maturation as well as during their passage through the pollen tube.

White- and monochromatic-light-induced luminescence of isolated meiotic cells of *Larix europaea* D.C. during their development.

W. B. Chwirot, R. S. Dygdała*, S. Chwirot*, Institute of Biology, Institute of Physics*, Copernicus University, ul. Gagarina 9, 87-100 Toruń, Poland.

A great similarity of variations of the level of induced photon emission (IPE) from the microsporocytes and of the ultraweak photon emission (PE) from the whole inflorescences (Chwirot et al. 1984, 1985 — Cytobios) points out the latter as a possible source of biophotons considered by

Nagl and Popp (1983, *Cytobios*, 37, 45–62) as the carriers of a long-distance information regulating the microsporocyte development. It is also shown that the decay behaviour of IPE from microsporocytes in 8 of 13 stages of development can be described as a hyperbolic one. Following Nagl and Popp such decays are due to the coherent rescattering of photons in biological systems. The developmental variations of the level of IPE and the dependence of the other IPE characteristics on the spectral composition of the exciting light cannot at present be explained in the frame of the Nagl and Popp's model of differentiation.

Morphological and metabolic transformations of microsporocytes of *Larix europaea* D.C. in the diplotene.

B. W. Chwirot and M. Gajewska, Institute of Biology, Department of Plant Cytology and Genetics, 87-100 Toruń, Poland.

In the longest phase of meiosis in larch, the diplotene, it is possible to distinguish three stages: contraction I, the diffuse stage and contraction II. The introduction of these stages is proposed by Klasterska and Ramel (*Genetica*, 51, 1, 1979) following Wilson (1925) with reference to the diplotene of some plants. The diplotene in larch, sometimes considered a period of winter dormancy, has proved to be the phase of the greatest variations in the activity level of many enzymes during the whole meiosis. In that period changes are also observed in the electrophoretic pattern of the protein fraction (Chwirot and Górska-Bryllass *Acta Soc. Bot. Pol.* 50, 1981) and of acid phosphatase isoenzymes. These facts point to the necessity of introducing a new division of prophase I, which would take into account the morphological and metabolic differentiation of the diplotene stage.

Ultrastructural and biochemical studies of microsporocytes of *Larix europaea* after the first meiotic division during the formation of the cell wall.

B. W. Chwirot and M. Tkacz, Institute of Biology, Department of Plant Cytology and Genetics, 87-100 Toruń, Poland.

In microsporocytes after the first meiotic division a deep restructuring of the cytoplasm takes place in the period of wall formation. It concerns the displacement of organelles and their morphological transformations. At that stage an increase was observed in the population of mitochondria with well developed crestaes and in that of amyloplast with large starch grains. In the middle period of phragmoplast formation an increase in the number of dictyosomes was noted. The morphological transformations of mitochondria and dictyosomes are consistent with the change in the level of their marker enzymes: cytochrome c-oxidase and IDP-ase. They are accompanied by a reduction in the α and β amylase level.

Analysis of number and spacing of somatic kineties in cells of different size (*Ciliata*, *Dileptus anser*).

Jolanta Drzewińska, Department of Cell Biology, M. Nencki Institute of Experimental Biology, Warsaw 02-093, Poland.

Four groups of cells were studied: control cells, overfed cells, and small cells obtained from anterior and middle parts of dileptuses. The overfed and control cells were of the same length, but their circumference was different. Both groups of small cells were also of similar length, and had significantly different circumferences. The number of somatic kineties has been found to be related to the circumference of the cell. The increase in the circumference evokes an increase in the number of kineties. The highest mean number of kineties was found in the overfed cells, while the lowest number was found in cells obtained from anterior parts of dileptuses. Cells obtained from the middle parts of dileptuses had both their circumferences and number of kineties similar to these in controls. The above observations suggest that the length of the cell has no influence upon the number and spacing of somatic kineties.

Regionalization of mlm gene expression in the cortical pattern of the mutant *Paraurostyla weissei* (Ciliata).

Bożena Dubielecka, M. Nencki Institute of Experimental Biology, Polish Academy of Sciences, 3 Pasteur str., 02-093 Warszawa, Poland.

Protargol stained wild type cells and mutant mlm lines of the ciliate *P. weissei* were analyzed. The cortical pattern investigated in this study is located on the ventral surface of the cell. Mutation mlm evokes disturbances in the cortical pattern. The most important feature of the altered pattern is the multiplication of the number of rows of the left marginal cirri which varies from 1 to 8 (wild type possess 1 row). The left marginal rows form sometimes short segments containing few cirri which are placed mainly in the posterior part of the cell. The distance between last ventral row and the first marginal row is variable in mlm cells and constant in wild type cells. In the mlm lines there is less transverse cirri than in wild type cells. The number of the ventral rows, right marginal cirri and frontal cirri in mutant does not show any alterations in comparison to wild type pattern. On the basis of data mentioned above the alterations in cortical pattern in mlm lines cells are located in the left and posterior part of the cell. Thus the disturbances in developmental control of pattern formation may be limited to this particular area of the *Ciliata cortex*.

Mass inducing of amiconucleate cells in *Tetrahymena thermophila*. Requirement of micronucleus for cell division.

J. Gaertig¹, H. M. Seyfert², G. Cleffmann², ¹ — Inst. of Zoology, Warsaw University, Krakowskie Przedmieście 24/26 00-927/1 Warsaw, Poland, ² — Inst. für Tierphysiologie, Wartweg 95, 6300 Giessen F. R. G.

The addition of antitubuline drug — Nocodazole (ND) to the logarithmically growing *Tetrahymena* brings about the arrest of micro- (Mi.) and macronuclear (Ma.) divisions, however cytokinesis block is leaky and the cells slowly progress through division, producing 4 classes of offspring by the random distribution of arrested nuclei: 1) cells with Mi. and Ma., 2) cells only with Mi., 3) cells only with Ma. 4) cells "empty" with no nuclei. Isolations of treated cells to the drops of nutrient medium have shown that cells with Mi. and Ma. form vigorous clones but other fractions don't survive. The amiconucleate cells and "empty" cells die out immediately in contrast to the amiconucleates which divide 2–3 times and then form "monsters" — cells blocked in cytokinesis. These "monsters" stay alive for a prolonged period of time in drop cultures. The DNA content of their Ma. increases and Ma. may divide in absence of cell division. This is the evidence

of normal function of house-keeping genes in amiconucleate cells but some genes specific for the micronucleus required for cell division are absent. These genes may be localized in chromosome 1 because it was not possible to isolate nullisomic lines missing both copies of chromosome 1 (Bruns et al., Acta Protozool. Special Congress vol., 1982).

Structural disturbances in mouthparts of large cells (*Ciliata, Dileptus anser*).

Krystyna Golińska, Department of Cell Biology, M. Nencki Institute of Experimental Biology, Warsaw 02-093, Poland.

Overfed cells of *Dileptus anser* have body circumference 54% larger than the controls. Mouthparts of the overfed dileptuses are either of normal size (an outline of cytostomal field was measured), or they are both larger and deformed. At first there is an indentation formed in the margin of cytostomal field, concomitant to 15.5% increase in the length of its circumference. Further increase in the size of mouthparts goes alongside with more severe deformations of structure, leading to formation of two or more cytostomal subfields.

This is supposed to reflect the discrepancy between an increased number of kinetids on the outline of the field and maintenance of a stable length of fibres which extend from the margin of the field toward the cytostome. This finite length of microtubular fibres is proposed as a factor controlling the upper size of oral structures in *Dileptus*.

The development of endodermis in the wheat (*Triticum aestivum* L.) root.

G. Grymaszewska, W. Golinowski, Department of Botany, Institute of Plant Biology Warsaw Agricultural University, Rakowiecka 26/30, 02-528 Warsaw.

In the process of wheat root differentiation four development stages have been described. Proendodermal cells present the structure typical for meristematic cells. They contain very few vacuoles filled with granular osmophilic, phenolic-like substance. Large starch grains are visible in the plastids. Numerous plasmodesmata can be seen in the thin cell walls. In the next stage Casparian strips are formed in the radial walls. Numerous ER cisterns and dictyosomes are present in the endodermal cell protoplast. Then a suberin layer is deposited on the entire inner surface of the cell wall. In the final stage U-shape secondary wall is formed. In the inner tangential wall pits are formed. An asynchronous pattern of endodermal cell maturation is observed in the wheat root. Endodermis develops earlier over the phloem bundles.

Inducing role of hormon flux in cell differentiation exemplified by circular vesseles induced in stem segments of ash by application of auxin.

Z. Hejnowicz, E. Kurczyńska, Silesian University, Jagiellońska 28, 40-032 Katowice, Poland.

In the segments of internodes of *Fraxinus* stimulated by auxin in vitro there are vessels oriented in a flow-like pattern. However, close to basal end or above an incision, there are vessel membranes arranged in separate loops. A loop may involve a different number of members, but often

there are only 2 members in a loop. It is known that the factor inducing vessels is auxin flow. The flow follows preferably the original polarity of cells, but there is a feedback relation: polarity directs the flux and the latter induces and maintains polarity. If the organ is wounded or new sources and sinks of auxin appear in it, the flow can diverge from existing polarity. Our studies indicate that if the flow cannot follow a forward route, for instance at tissue end, it may make a closed loop creating circular polarity. It is our hypothesis that in this way morphogenetic centers with defined rotational direction (to the right or to the left) may appear.

Studies on growth, form and cytoskeleton of *Paramecium* cell.

Janina Kaczanowska and Andrzej Kaczanowski, Institute of Zoology, Warsaw University, Warsaw 00-927/1, Poland.

In highly patterned *Paramecium tetraurelia* the growth and shaping of the cell and patterning of new organelles take place during the period of divisional morphogenesis. Proliferation of cortical units (cytoskeletal elements of cell surface) occurs exclusively within the equatorial zone of dividing cell, while polar regions do not grow. However, the stationary nondividing mutated *Paramecium tetraurelia* sc 6 may also display another type of cell growth due to asymmetrical proliferation of cortical units at the posterior pole. This growth leads to the abnormal cell shape and to the twist of the entire cytoskeleton.

It is suggested that the recruitment of the area of the cortical units proliferation is monitored by the appearance of planar compressive stresses acting at a proper angle on parental cortical units. Two types of growth in sc 6 *Paramecium tetraurelia* may result from different locations of the areas of planar compression within the cortex over the cell surface.

Nuclear abnormalities and failure in nuclear fusion in *Tetrahymena* induced with Nocodazole.

Andrzej Kaczanowski and Jacek Gaertig, Zoological Institute, University of Warsaw, Poland 00-927.

Nocodazole ND blocks nuclear divisions in *T. thermophila* at relatively high conc. of 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$. The low conc. of ND of 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ has some other specific effects on conjugation, however it does not block division of nuclei. Conjugation pairs, which were treated with 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of ND, beginning from meiotic prophase, were developing next abnormal configurations of nuclei. In normal sequence 2 macronuclear Anlagens (An) and 2 Micronuclei (Mi) appear in late pairs. This pattern was observed only in 20% of treated cells. More than 2 An's were seen in 65% of cases, and less than 2 in 15%. Number of Mi's was also variable: less than 2 Mi's were found in 50%, 2 in 35% and more than 2 in 15% of treated cells. The total number of nuclei at the stage of Anlagens was varying from 0 to 12. The syndrome of abnormal nuclear pattern was correlated with specific genetical effects. The abnormal exconjugants retained old macronuclei and parental phenotypes. However many exconjugant clones were heterocaryons up to 50% with homozygous, diploid Mi derived from germinal nuclei, received from their mate partners. Thus ND at low conc. blocks nuclear fusion, and then Macronuclear development, but it does not block transfer of pronuclei at conjugation, for cells were exposed to the drug before the transfer.

Morphological variation in protozoan cells (*Ciliata*).

Stanisław Kazubski, Institute of Parasitology, Polish Academy of Sciences, 3 Pasteur str., Warsaw, Poland.

The morphological variation in ciliates is a very diverse and compound phenomenon having various sources. Within it two main groups may be distinguished: an individual variation connected with different situations in the cellular and developmental cycles and the population variation conditioned by genetic and environmental factors. To the first group ought to be referred the variation connected with growth, division and conjugation of ciliates as well as the variation resulting from the life cycle stages, the variation between proter and opisther etc. Interclonal variations, resulting from different genotypes, mutational and teratological variation are recognized as genetic variations. A variation influenced by environmental factors is the result of action of these factors on protozoan cells. Seasonal variations connected with the height of the habitat above the sea level are conditioned by the thermal factor. The variation resulting from the mode of life, e.g. in facultative parasites, the variation dependent of food behaviour, change of the diet (e.g. change of the host species) or starvation may be listed here. There may be also some other local factors bearing on the variation. The geographical variation represents a special type having genetic background, being the result of distance and isolation of populations. This variation is also conditioned by environmental factors, but much more diversified than other cases. In general, it is stated that various types of variations, having different sources, may occur simultaneously and interfere among themselves.

The effect of Alcian Blue on sexual recognition in *Tetrahymena*.

Maryla Kiersnowska, Leonora Bużańska¹ and Janina Kaczanowka, Institute of Zoology, Warsaw University, Warsaw 00-927/1, Poland.

Negatively charged moieties of the cell surface coat participate in sexual recognition in *Tetrahymena* (Ofer et al., J. Cell Biol. 70, 287, 1976). The soluble polycationic copper phthalocyanine – Alcian Blue dye (AB) reveals 1) high affinity and binding to the negatively charged moieties of the cell surface coat of *Tetrahymena*, 2) acts as a signal molecule for secretion of secretory granules of this ciliate, 3) stains cell surface coat and expelled secreted material, which may be traced if swallowed by *Tetrahymenas* themselves.

We found that AB reversibly interferes both with sexual recognition of competent cells and with implementation of adhesion of sexual cells. Excess delay of sexual recognition depends also upon the rate of phagocytosis of AB-stained material. In our experiments both these effects are dissected.

The development of endodermis in pea (*Pisum sativum* L.) root.

J. Kopcińska, W. Golinowski, Department of Botany, Institute of Plant Biology, Warsaw Agricultural University, Rakowiecka 26/30, 02-528 Warsaw.

On the basis of cytological studies of the pea root four stages in the endodermis development have been distinguished: proendodermis, formation of Casparian strips, laying down of suberin lamellae and the formation of secondary cell wall. Proendodermal cells with vacuole-like structu-

res containing phenolic substances are visible 1 mm away from the root tip. Casparian strips are positioned in the radial walls and their length does not exceed 1/3 of the wall length. In the Casparian strip region plasmalemma adheres to the cell wall which in this place, reveals a homogenous structure. Suberin lamellae are deposited on the entire endodermal cell wall, but over the Casparian strips they develop much later. The secondary cell wall is present on both radial and tangential walls and does not show any significant variations in thickness.

RNA of *Tetrahymena* during DAPI-arrested regeneration of cilia.

Wanda Krawczyńska¹ and Barbara Kłudkiewicz², ¹ M. Nencki Institute of Experimental Biology, Warszawa, ² Institute of Biochemistry and Biophysics, Warszawa, Poland.

A DNA-ligand 4'6-diamidine-2-phenylindole DAPI present in the starvation buffer before cilia amputation delays regeneration of *Tetrahymena* ciliature, which is accompanied by the inhibition of RNA synthesis (Krawczyńska 1983: Acta Protozool. 22, 33-42).

The present study was undertaken to elucidate the mechanism of DAPI action.

The total RNA was extracted from the DAPI-treated and the control cells at the 50-th min. of cilia regeneration, using a guanidin-hydrochloride method. The isolated RNA was separated on 2.4% polyacrylamide gel with a 23 S r-RNA from *E. coli* as a standard.

The preliminary results revealed the presence of three peaks of high molecular weight DNA: 34 S, 32 S, 30 S and the peaks of 25 S and 17 S of ribosomal RNA. These RNA classes were also found in the control sample, except the peak of 34 S and the peak of 32 S which were significantly reduced.

These results suggest that DAPI may influence the processing of RNA in deciliated *Tetrahymena* cells.

Activation of meiosis in multimicronuclear cells of *Tetrahymena*.

Marzena Krucińska, Andrzej Kaczanowski, Zoology Institute, University of Warsaw, 02-927 Warsaw, Poland.

Multimicronuclear cells of *T. thermophila* were generated by shifting the conditional mutant line cda A1 for cell division arrest to non-permissive temp. Then they were conjugated with normal cells of the opposite mating type at permissive temp. Since micronuclei (Mi) of pairing cells are competent to meiosis, this approach is a convenient method of generating multimicronuclear meiocytes. They consisted of 2-17 Mi's, and more than 1 Mi's per cell were entering into meiosis. However in multimicronuclear cells there were also some not activated Mi's and with a growing number of nuclei there were proportionally more nuclei which did not enter into meiosis. In addition to normal "crescent" stages, in which chromosomes are uniformly and parallelly stretched, there were also some stages of "partial crescents", which did not appear in the normal sequence. In the case the main bulk of chromatin remained in the center of the nucleus, while these nuclei consisted of also thin, unipolar or bipolar, finger-like processes. Up to 14 activated Mi's and up to 9 regular "crescents" were observed within a single cell. However, no more than 5 nuclei were observed at metaphase I. We suggest that in multimicronuclear cells, inducing of meiosis and progression through developmental sequence depend upon quantitatively limited cytoplasmic factors.

Cell polarity and the mitotic spindle orientation.

Jan Lamprecht, Piotr Zięba, and Paweł Strojny, Department of Histology and Embryology, Institute of Biostructure, Medical Academy, 02-004 Warsaw, Chałubińskiego 5.

The establishment of the plane of cell division is of fundamental importance in the generation and maintenance of tridimensional form of mature tissues. The purpose of our study was to define the range of freedom of the mitotic spindle axis orientation during consecutive stages of mitosis in mouse small intestinal epithelium. We have analysed the relationship between the spindle axis and the cell polarity axis or the long axis of intestinal crypts in 291 mitotic cells (meta-, ana-, and telophases) by combination of high-resolution light microscopy and computer — assisted morphometric analysis on the semithin sections. The cells have been analysed on defined planes (transverse, longitudinal, and grazing) in relation to the long axis of intestinal crypt.

The results revealed that the mitotic spindle in a dividing cell of the intestinal epithelium is not assembled randomly. The spindle axis is formed in a plane which tends to be perpendicular to the cell polarity axis) “the plane of the spindle” (giving “horizontal” mitoses. On “the plane of the spindle” mitotic spindle axis could occupy any position. The position of the spindle axis is established during metaphase and no reorientation of the spindle at subsequent stages of mitosis has been observed.

Morphometric parameters of *Chlorella* cells during synchronous growth.

U. Mazurek, A. Wilczok, Department of Biochemistry and Biophysics, Silesian Medical Academy, Jagiellońska 4, 44-200 Sosnowiec, Poland.

Morphometric parameters describing the shape, size and intracellular extinction of *Chlorella* cells were determined by the use of image analysis microscope Morphoquant and computer KRS-4100. A special analyzing computing program Microscan 80 containing 20 cell parameters has been applied. Three parameters were used to describe the size, five the shape and twelve the intracellular extinction of the analyzed cells. The synchronous culture of *Chlorella vulgaris* Beijerinck 1890 (Böhm — Borns 1972) has been based on 10 h light period and 14h — dark period. Starting from ellipsoidal free autospores through the Da-Dn-L₁-L₅ stages of their development, mature mother cells were obtained able to divide into eight autospores. The values of all parameters measured during the life cycle are described. At 0 h of cultivation the max diameter was 3,0–4,8 μm, the total extinction to total surface ratio 0.11–0.24, the cell symmetry 0.02–0.22, the mean absorption of cell wall 0.05–0.16, the percentage of cell occupied by chloroplast 36%–69%. After the light period (10h) the listed parameters were 7.8–9.6 μm, 0.18–0.25, 0.01–0.08, 0.11–0.26, 47%–61%, respectively.

Immature embryos of wheat as a source of protoplasts.

R. Mól, Laboratory of General Botany, Faculty of Biology, Adam Mickiewicz University, 61-713 Poznań, Poland.

A procedure for isolation of protoplasts from immature embryos of *Triticum aestivum* L. was developed. After preincubation of the embryos in osmoticum, the protoplasts were isolated in a solution with 2% Cellulase RS, 0,5% Macerozyme R10, 1% Hemicellulase, 0.05% Pecto-

lyase Y-23, 20% seawater and 0,57 M mannitol. The protoplast suspensions obtained from the embryos 0.8–1.2 mm long were cultured in media CC-10, KM, V 47+AA supplemented with 2,4-D, BAP, NAA and zeatin. A strong tendency for aggregation of protoplasts was observed after plating in a medium. A lot of protoplasts regenerated cell walls and remained viable till the fourteenth day of culture. The protoplasts obtained from the embryos 0.3–0.6 mm long fused spontaneously in the enzymatic solution and consequently macro-protoplasts were observed.

Nuclear body — structure and relationship with nuclear RNP.

S. Orkisz, Department of Histology and Embryology, Military Medical Academy, Plac 9 Maja 1, 90-647 Łódź, Poland.

The nuclear bodies (NB) have been already reported in the normal and pathological cells. Their biogenesis is a subject of numerous discussions (Yasuzumi G., Shirai T., *Cytobiol.*, 11:30–43, 1975). Morphological studies of NB have been performed in regeneration rat liver cells and hepatocytes irradiated with dose 6.5 Gy. Cytochemical processing of RNP structures according to Bernhard method have been carried out (Bernhard W., *J. Ultrastr. Res.* 27:250–265, 1969). In experimental groups NB were found very frequently. Their structural relationship with nucleoli as well as accompanying changes in nucleoli enable to accept their morphogenesis with disturbed synthesis and processing rRNA.

Calcium in the insect oocyte.

A. Przełęcka, B. L. Allakhverdov, S. K. Głowacka, A. G. Pogorelov, Nencki Institute of Experimental Biology, Warsaw, Poland Institute of Biological Physics, Pushchino, U.S.S.R.

The oocytes of a representant of *Lepidoptera* — *Galleria mellonella* — prepared for X-ray microanalysis by the freeze-substitution technique, display high concentration of calcium correlating with the degree of accumulation of yolk in the ooplasm (Przełęcka et al., *Histochemistry*, 67, 321, 1980).

The results gained after application of two different cytochemical methods, using either ammonium oxalate (AO) or N,N-naphthaloylhydroxylamine as the Ca precipitating agents, followed with X-ray "on line" analysis, indicate the presence of calcium in the yolk spheres.

In the oocytes in which calcium has been precipitated with AO, the mass concentration of calcium amounts up to 9 mM per 1.000 g w wt. This value is of the same order as that calculated for freeze-substituted oocytes. In the AO-untreated oocytes the mass concentration of calcium equals zero.

The selection of cytostatic compounds of plant origin and an introductory estimation of their biological effects on *Tetrahymena*.

Henryk Rebandel* and Wojciech Dymowski**, *Department of General Biology and Parasitology, Institute of Biostructure, and **Department of Pharmaceutical Botany, Institute of Drug Science, Medical Academy, Warsaw, Poland.

The extracts obtained from callus (tissue culture) of the Indian tree *Maytenus wallichiana* were fractionated chemically (LC, TLC). Screening tests of toxicity and of growth inhibition in mass cultures of *Tetrahymena* showed differences in biological activity of the fractions. The effects were in relation to the degree of purification of the substance.

The two fractions of highest activity contained strongly cytostatic substances ($ID_{50} = 3.9 \mu\text{g/ml}$, $ID_{50} = 0.4 \mu\text{g/ml}$ respectively). These substances showed different mode of action against dynamics of cell multiplication, and against processes of cytokinesis, phagocytosis and pairing for conjugation.

The effect of celistin on oral replacement in *Tetrahymena pyriformis*.

Leszek Szablewski, Bożena Oleszczak, Department of General Biology and Parasitology, Institute of Biostructure, Medical Academy, ul. Chałubińskiego 5, 02-004 Warsaw.

In effect, it has been ascertained that this antibiotic in each experimental concentration stopped the process of oral replacement. As in the case of cells from experimentally-growing cultures, there takes place a recovery of the number of cells undergoing oral replacement to contral value. On the other hand, the effect of celistin on the process of oral replacement is weaker than on the process of predivision stomatogenesis. The authors think that in the process of stomatogenesis in *Tetrahymena*, the essential thing is membranelle development and the kind of stomatogenesis (predivision stomatogenesis or oral replacement) seems to be less significant.

The role of Ca^{2+} and peroxidase in the synthesis of callose walls during microsporogenesis in larch.

A. Tretyn and E. Bednarska, Copernicus University, Institute of Biology Department of Plant Cytology and Genetics, 87-100 Toruń, Poland.

During microsporogenesis the developing dyad and tetrad cells are separated from each other by a callose wall, synthesized with the participation of peroxidase. The fluorescence method with the use of chlorotetracycline (Reiss and Herth, Protoplasma 97, 1978) made it possible to demonstrate that prior to the onset of peroxidase activity there is an accumulation of Ca^{2+} ions at the place of future development of the callose wall of the dyads and tetrads. After the onset of peroxidase activity located in the zone of the prospective callose septum a gradual decrease of fluorescence is observed, which is the evidence of decrease in Ca^{2+} ions.

On the grounds of the present results as well as of literature on the subject, it is assumed that the synthesis of callose walls in Larch microsporocytes starts in places of accumulation of Ca^{2+} ions and continues with the participation of peroxidase under high IAA level conditions (Gór-ska-Brylass et al. Acta Soc. Bot. Pol. 50, 1-2, 1981).

Morphoguant analysis of *Cyanophora paradoxa* in two cultures under various temperature and light conditions.

D. Tyrawska, U. Mazurek, B. Sosak, Institute of Ecology, Polish Academy of Sciences, 05-092 Dziekanów Leśny Institute of Biochemistry, Silesian Academy of Medicine, Sosnowiec, Narcyzów 3.

First morphoquant studies on *Cyanophora paradoxa* cells from various cultures of the same tribe showed changes in sizes, shapes and optical activities of the cells. Twenty parameters were calculated by system "Microscan 80" indicating that cells cultured under better conditions (15°C) were smaller and more spherical than those under less suitable conditions (20°C), and there were differences in the optical activity of the cells under these two regimes.

Seed coats as barriers for lead in plants resistant and nonresistant to heavy metals.

M. Wierzbicka*, B. Łobodzińska*, B. Godzik**. *Laboratory of Electron Microscopy, Institute of Botany, Warsaw University, Krakowskie Przedmieście 26/28, 00-927 Warszawa. **Laboratory of Ecology and Plant Geography, Institute of Botany, Polish Academy of Sciences, Lubicz 46, 31-512 Kraków.

Investigations were carried out on *Biscutella laevigata*, *Rumex thyrsiflorus*, *Thymus pulegioides* seeds from plants grown on calamine heap in Bolesławiec or from plants grown on areas with very small level of environmental pollution. Seeds of cultivated plants such as *Zea mays*, *Brassica napus*, *Lactuca sativa*, *Allium cepa* were also investigated. Pb⁺⁺ was given as Pb(NO₃)₂ or PbCl₂ during seed inhibition. Distribution of lead in tissues was observed using rhodizonate method. Influence of lead on water uptake by seeds and on seed germination was investigated. It was determined that seed husks are very strong barriers for lead penetration to the inside of seeds so that under conditions of a typical environmental pollution the embryos are completely protected from lead penetration. This holds both for species resistant and nonresistant to metals. However deposition of lead in cell walls of seed husks can result in changes of water penetration into seeds and this finally delays seeds germination.

Cellular events in the prothoracic glands and ecdysteroid titers during the last larval instar of *Spodoptera littoralis*.

Grażyna Zimowska¹, Alfred M. Handler³ and Bronisław Cymborowski¹, ¹Department of Invertebrate Physiology, Zoological Institute, University of Warsaw, Żwirki i Wigury 93, Warszawa 02-089, Poland and ²Developmental Biology Center, University of California, Irvine, CA 92717, USA.

Changes in prothoracic glands morphology were correlated to developmental events and ecdysteroid titers (20-hydroxyecdysone equivalents) during the last larval instar in *Spodoptera littoralis*. After ecdysis to the last larval instar the haemolymph ecdysteroid titre remained at about 45 ng/ml, when the prothoracic glands appeared quiescent. The first signs of distinct gland activity, indicated by increased cell size and radial channel formation, were observed at about 12 h prior to the cessation of feeding, accompanied by a gradual increase in ecdysteroid titre to 110 ng/ml haemolymph, at the onset of metamorphosis. During this phase ecdysteroid titres remained at a constant level (150–210 ng/ml haemolymph) and prothoracic gland cellular activity was absent for a short period. A rapid increase in ecdysteroids began on the fourth night (1600 ng/ml haemolymph) reaching a maximal level (4000 ng/ml haemolymph) at the beginning of the fourth day. In freshly moulted pupae a relatively high ecdysteroid titre (1100 ng/ml haemolymph) was still observed, although during a decrease to almost negligible levels. The increase in ecdysteroid level during the third and the fourth nights of the last larval instar was correlated with the period when almost all the prothoracic gland cells showed signs of high activity.

Differentiation of the idioblastic cells as the markers of the internode origin.

Alicja M. Zobel, Lab. of Plant Anatomy and Cytology, Warsaw University.

In some plants there are idioblastic cells containing phenolics which length is similar to the height of the whole internode not entering nodes what means that the mother cell of these idioblasts can be the marker for the mother cell layer of the whole internode. Such the mother cell can be distinguished from promeristem cells by having more electron dense ground cytoplasm, changed endoplasmic reticulum and increased nucleus volume in the first stage of differentiation. In the second stage such the cells being twice as long as surrounding cells undergo intensive vacuolisation, what was already shown in *Sambucus racemosa* L. shoot apexes (Zobel, *Annals of Botany*, 1985, 55).

SECTION II**BIOCHEMICAL SYSTEMS, MAINTENANCE AND INTEGRATION OF THE CELL****Morphological evidences of the thymus secretion function.**

H. Bartel, Department of Histology and Embryology, Military Medical Academy Plac 9 Maja 1, 90-647 Łódź, Poland.

With the progress in research concerning thymus there has been a growing number of hormones and inhibitors identified as secreted by that organ (N. Trainin et al., *Immunology Today*, 4:16-21, 1983).

Reticulum endothelial cells are the ones where those compounds are produced. Against the background of vast knowledge and literature about various aspects of the thymus function, the phenomena connected with the thymus secretion are still little known. Basing on the ultrastructural investigations of the thymus in human, mice and rats thymus, the author presents these organelles and endothelial reticular cell elements, connected with different phases of thymus secretion.

Localization of phosphorylation site of brain myosin heavy chain.

Barbara Baryłko*, Philip Tooth** and John Kendrick-Jones**, *Nencki Institute of Experimental Biology, Warsaw, Poland, **Laboratory of Molecular Biology, MRC, Cambridge, U.K.

Biological functions of myosins from muscle and nonmuscle sources are regulated by phosphorylation of either their light or heavy chains. It has been recently published that brain myosin can be phosphorylated in both the light and the heavy chains (S. Matsumura et al. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 109, 683, 1982). ³²P-phosphorylated bovine brain myosin was subjected to limited proteolysis with chymotrypsin and papain. Chymotrypsin produced two major fragments of M. W. 140 K and 68 K. The 140 K fragment was further degraded into 120 K and 23 K polypeptides in the presence of papain. All heavy chain radioactivity was associated

with 140 K or 120 K fragment when digestion was carried out at low salt. Digestion of ^{32}P -phosphorylated myosin at high salt (0.7 M NaCl) produced 140 K and 120 K fragments devoid of radioactivity and the 5 K radioactive peptide appeared. The 140 K and 23 K fragments were found to bind the light chains as determined using a gel overlay method with ^{125}I -labeled 20 K light chain. Using rotary shadowing technique it was found that chymotryptic digest contained molecules with the tail which length was roughly the same as that of undigested myosin. These results indicate that the most susceptible site of brain myosin to proteolysis is the region between globular and "neck" part of molecule and that the phosphorylation region is located at C terminal end of myosin molecule.

Thymic secretory cells of poikilothermic vertebrates.

Janusz Bigaj* and Barbara Płytycz**; *Institute of Applied Zoology, Academy of Agriculture, Kraków; **Department of Comparative Anatomy, Jagiellonian University, Kraków, Poland.

The main primary lymphoid organ, the thymus, is absent in cyclostomes, while it is present in jawed poikilothermic vertebrates, i.e. fish, amphibians, and reptiles. Like endothermic vertebrates, i.e. birds and mammals, it consists of lymphoid cells within epithelial framework, as well as myoid, interdigitating, and secretory cells (e.g. Bigaj, J. & Płytycz, B., *Fol. Histochem. Cytochem.*, 22:63, 1984). Some secretory cells contain clear vesicles with flocculent or amorphous material. Their ultrastructural appearance indicates that they are peptide-secreting cells of the APUD series. Other epithelial secretory cells are variable in appearance and contain more or less densely stained cytoplasmic granules of various sizes. Their ultrastructural features indicate that they are mucous-secreting cells. In favourably oriented material it could be seen that epithelial secretory cells are organized into cystic structures which may be the secretory units of the thymus, gland.

During winter hibernation the thymuses of frogs, toads, and snakes consist of an unusually abundant population of secretory units. Secretory material is released at the beginning of active life. Population of cells filled with secretory granules is significantly diminished during an active life of these animals (e.g. Płytycz, B. & Bigaj, J., *Thymus*, 5:327, 1983). Thus hibernating species can serve as a very convenient material for studying the thymic secretory cells.

Prediction of calcium binding properties of troponin C like proteins on the basis of amino acids sequence.

G. Boguta and D. Stepkowski, Nencki Institute of Experimental Biology, Pasteura 3, 02-093 Warsaw, Poland.

Calcium binding proteins during the reaction with calcium ions change their spatial conformation. Such a phenomenon determines the activation of many enzymatic processes controlled by Ca^{2+} concentration. In our work we tried to find correlation between the primary structure and the affinity of calcium binding to these groups of proteins. Examination of 34 known amino-acids sequences with 106 domains of the helix-loop-helix arrangement was carried out and secondary structures were predicted by the method of Garnier et al. (*J. Mol. Biol.* 120, 97, 1978). On the basis of the primary structure of proteins with known calcium binding constants (K_{Ca}) the criterion of the domain ability to Ca^{2+} binding was resolved. A single site model and a two site co-operative

model were examined to estimate cation binding constants to a single domain or to two helix-loop-helix regions. On the basis of both models K_{Ca} for proteins with unknown ion binding properties were predicted.

Chloride ion transport in human red blood cells after reductive methylation of functionally essential lysine groups.

T. Broda, Department of Physics and Biophysics, Agricultural Academy, Wrocław, Norwida 25, Poland.

Chloride self-exchange in RBC can be maximally inhibited by 75% after reductive methylation of lysine groups in the band 3 protein.

The apparent overall affinity K_{Cl} under condition of $Cl_o = Cl_i$ and the apparent extracellular affinity $K_{1/2}^o$ (max) for chloride remained unchanged after methylation.

The apparent affinity for DNDS (the competitive inhibitor) of chloride transport was found to be close to the control value.

It was concluded that the methylated lysine groups are rather more involved in the translocation step than in the binding step of the studied transport process.

An application of autoradiographic 2-deoxyglucose method for the study of functional organization of brain neurons.

Jolanta Chmielowska, Department of Neurophysiology, Nencki Institute of Experimental Biology, Pasteur 3, Warsaw, Poland.

The ^{14}C -2-deoxyglucose method (2-DG), developed by Sokoloff et al (J. Neurochem 28: 897-916) for the purpose of studying local cerebral glucose metabolism in vivo, can provide information concerning the functional organization of large arrays of neurons. A modification of this technique using 3H -labeled 2-DG and emulsion (J Histochem Cytochem 29:190-194) increases the resolution of the 2-DG technique to the single cell level and provides an opportunity to determine precisely the location of active neurons in the brain cortex. I used the 2-DG method for the study of functional activity of the cortical neurons activated by the stimulation of a single vibrissa. The vibrissae (large whiskers) on the mouse face project to multicellular units termed barrels, in layer IV of the contralateral, somatosensory cortex. Stimulation of a single vibrissa produced focal labeling in the contralateral cortex, extending throughout all cortical layers and centered on the appropriate barrel. The use of 3H -2-DG and emulsion enabled the localization of labeled neuronal structures (cell bodies and neuropil around them) with respect to the underlying barrel cytoarchitecture.

Stereological investigation of mitochondria during implantation of mouse blastocyst.

L. Cieciora, B. Jaszczuk-Jarosz, K. Pietrkowska, Department of Histology and Embryology, Military Medical Academy, Plac 9 Maja 1, 90-647 Łódź, Poland.

The following stereological parameters of mitochondria were compared in trophoblast of 5 and 6 day blastocysts: volume density of inner membrane (V_{im}), outer membrane (V_{om}), matrix (V_{mat}), outer compartment (V_{oc}), surface density of outer membrane (S_{om}) and inner membrane (S_{im}). They were the basis to calculate the partition coefficient of matrix (E_{mm}) and the partition coefficient of outer compartment (E_{ocm}). On 6 day after fertilization we found statistically significant volume increase of V_{im} , V_{oc} , S_{im} , S_{om} , E_{ocm} and volume decrease of V_{om} , V_{mat} and E_{mm} . Mitochondria visual evaluation and stereological analysis made for both groups allow to classify them to metabolic transitional state.

Ultrastructural studies on the zonal function of pineal gland.

L. Cieciura, G. Krakowski, Department of Histology and Embryology, Military Medical Academy, Plac 9 Maja 1, 90-647 Łódź, Poland.

Membrane — membrane relations were analysed in the pineal gland of the rat. It was found, that the neighbouring pinealocytes could contain mitochondria in various configurational states. Pinealocytes adjacent to the same glial cell, mitochondria in the same metabolic state have been found. It was observed clearly, in the regions of the gland, where the cells did not contact vessels. In neighbouring vessels pinealocytes were in the same metabolic state when the perivascular space was surrounded by one glial cell only. It was also found that there were investitial cells with mitochondria in the same configurational state around the nerve endings.

Stereologic studies on human gastrocnemius mitochondria after prolonged hypokinesis.

L. Cieciura, W. Okrój, W. Godlewski, Department of Histology and Embryology Military Medical Academy, Plac 9 Maja 1, 90-647 Łódź, Poland.

In the present study we tried to evaluate changes in mitochondria of the muscle red fibers after hypokinesis lasting 60 to 90 days, caused by stiff dressing. Relative volumes and areas of mitochondrial compartments and membranes were estimated in groups of mitochondria subjected to analysis. No unidirectional changes were observed and, what more, the changes were opposing in some patients. Such discrepancies could arise due to the differences in muscles behaviour under stressing (isometric myospasm or movements while trying to walk).

Freeze-fracture studies of the rat spermatocyte and spermatide mitochondrial membranes.

L. Cieciura, P. Pięta, I. Klimek, Department of Histology and Embryology, Military Medical Academy, Plac 9 Maja 1, 90-647 Łódź, Poland.

Mitochondria of spermatocytes and spermatides show separation of two folded laminae of the mitochondrial cristae freeze-fracture exposes large areas of both halves of the inner membrane. On the fracture face adjacent to the outer compartment (imo) there were arrangements of particles surrounding a pit. The whole resembled a crater. On the fracture face adjacent to the matrix (imm) there were large numbers of intramembranous particles between which pits were observed. Morphometric analysis and reconstruction of craters suggest that these structures are channels in the inner membrane with an internal diameter of approximately 180 Å.

Freeze-fracture studies on the inner mitochondrial membrane in guinea pig epinephrocytes after acute anaphylactic shock.

L. Cieciora, P. Zdunowski, P. Pięta, *B. Kmiec, Department of Histology and Embryology Military Medical Academy, Plac 9 Maja 1, 90-647 Łódź, Poland, *Department of Histology and Embryology, Medical Academy of Łódź, Poland.

Separation of two laminae of the mitochondrion cristae was observed in ultrathin sections from epinephrocytes of adrenal glands. Crater — like arrangements of intramembraneous particles (IMPS) were found on the fracture face of the inner membrane adjacent to the outer compartment (imo). On the convex fracture face adjacent to the matrix (imm) there were large numbers of IMPS between which regularly arranged pits were observed. Similar IMPS arrangements were found in mitochondria of rat spermatocytes and spermatides (Cell and Tissue Research in press).

Effect of colchicine on the peritoneal transport of uric acid (UA) in vitro.

K. Czyżewska, J. Knapowski, Department of Pathophysiology, Medical Academy, Poznań, Poland.

Mechanism of peritoneal transport of UA has not been defined as yet, however, some suggestions were made that this solute in non-ionized form penetrates the peritoneal mesothelium through intercellular pathway. Experiments were performed to check this hypothesis using an in vitro model of the membrane and colchicine, a cytoskeletal poison that blocks the intercellular spaces. Fragments of parietal peritoneum were taken from rabbits. The membrane was mounted in Ussing-type chamber. The chamber was filled with Hanks solution. UA was added on the vascular side to create concentration gradient across the membrane of 20 mg/dl and consecutive samples of the fluid from both sides were taken every 15 min. and the transport calculated. After control period lasting 75 min colchicine was added (final conc. 10^{-5} M) to the medium on the mesothelial side. It was found that colchicine decreased the UA transport by 30%. This seems to confirm the hypothesis that the solute traverses the peritoneal membrane through intercellular route.

Effects of cetyl trimethyl ammonium bromide on ciliary reversal induced in marine ciliate *Fabrea salina* by potassium/calcium factor in external medium.

Stanisław Dryl, Department of Cell Biology, M. Nencki Institute of Experimental Biology, 3 Pasteur Str., 02-093 Warszawa, Poland.

It is known from recent studies that *Fabrea salina* incubated in highly concentrated salt solution (1.1 M NaCl + 0.1 M MgCl₂ + 0.016 M CaCl₂ + 0.005 M Tris/HCl, pH 7.2) shows long lasting ciliary reversal (CR) when exposed to medium containing 0.25 M KCl or higher concentration of potassium ions.

Fabrea preincubated for 3–4 minutes in salt solution containing 1×10^{-6} to 4×10^{-6} g/ml cetyl trimethyl ammonium bromide (CTAB) showed only short lasting CR or complete inhibition of CR response. Addition of appropriate concentration of CTAB to potassium rich medium — containing ciliates with induced CR — caused delayed inhibition of CR appearing after 2–3 minutes of exposure to CTAB. It is suggested that CR inhibiting action of CTAB depends on inactivation of hypothetical voltage-sensitive calcium channels located within ciliary cell membrane.

Steroid hormones synthesis from HDL [³H] — cholesterol in rats adrenocortical cells in suspension.

Teresa Duda, Alicja Waliszewska, Piotr Galiński, Denis Mathé*, Wiesław Trzeciak, Katedra Chemii Fizjologicznej Akademii Medycznej, 60-780 Poznań, Święcickiego *Laboratoire de la Nutrition, Univ. Paris-Sud Orsay-Cedex, France.

In the presented results of investigations the isolated rats' fasciculatareticularis cells transform HDL [³H]-cholesterol into [³H]-steroid hormones (pregnenolone, deoxycorticosterone and corticosterone). In the absence of stimulators the transformation was negligible but in presence of increasing amounts of β_{1-24} ACTH or db cAMP in incubation medium the uptake of HDL [³H]-cholesterol and its metabolism was increased. The time-dependence of [³H] steroid hormones synthesis was also observed.

Long-term incubation at high concentration of β_{1-24} ACTH or db cAMP led mainly to a production of [³H]-corticosterone, the major rats glucocorticoid. The obtained results showed, that β_{1-24} ACTH or db cAMP influenced all steps of glucocorticoid synthesis.

Force of intercellular erythrocyte adhesion in the presence of dextran.

M. Duszyk, P. Pawłowski and J. Doroszewski, Medical Centre of Postgraduate Education, Department of Biophysics and Biomathematics, 01-813 Warsaw, Marymoncka 99, Poland.

The influence of dextran on the erythrocyte aggregation has been investigated by many authors (e.g. D. Brooks, J. Coll. Interface Sci., 1973, 43, 700), the mechanism of cell aggregation remains, however, unknown.

In this work the results of the study of the force of cell adhesion in different concentrations of dextran are presented. The essay consists of measuring velocity of cell suspension flow at which disaggregation of cells is observed. Estimation of the value of this parameter allows to assess the magnitude of force of cell adhesion.

The results which we have obtained do not agree with the value of adhesion forces predicted by DLVO theory. They can be explained by hypothesis of Brooks according to which the force of adhesion is a superposition of the sticking force mediated by dextran and the electrostatic repulsive forces.

Effects of cholesterol-phospholipid liposomes on phagocytosis of *Tetrahymena pyriformis*.

Hanna Fabczak, Department of Cell Biology, M. Nencki Institute of Experimental Biology, 3 Pasteur Str. 02-093 Warszawa, Poland.

The incubation of *Tetrahymena pyriformis* with cholesterol-phospholipid liposomes resulted in a significant alteration of food vacuole formation rate. For the cell submerged in the suspension of liposomes having cholesterol to phospholipid ratio (C/P) = 0.7 and carmine, the vacuole formation activity increase to double value of the control (i.e. cells treated with carmine only). About half an hour after the beginning of experiment the rate of vacuole production slowed down with the saturation of this process (i.e. constant number of food vacuole was observed). Modulation of vacuole formation in *Tetrahymena* by cholesterol-phospholipid liposomes was entirely reversible; the removing of liposomes from tested suspension restored the control rate of vacuole for-

mation. Similar results were obtained with liposomes with a ratio of C/P 1. The findings reported here suggest that the cell's ability of vacuole formation is determined, besides other parameters, by the attainment of the exogenous membrane material of appropriate composition (i.e. C/P ratio).

Intracellular sodium and potassium ion activities in *Stentor coeruleus*.

Stanisław Fabczak, Leszek Kuźnicki: Department of Cell Biology, M. Nencki Institute of Exp. Biology, 3 Pasteura Str., 02-093 Warszawa, Poland.

The control over intracellular ion activities in the protozoan *Stentor coeruleus* by means of passive and active transmembrane Na and K transport was investigated. Measurements of internal sodium, Na_i^+ , and potassium, K_i^+ , ion activities were taken out with electrophysiological technique in combination with ion-sensitive microelectrodes selective for Na^+ and K^+ in Pringsheim's solution at pH of 7.3–7.4 and temperature of 14–15°C. In resting conditions internal ion activities of Na_i^+ and K_i^+ were found to be 2.8 and 15.8 mM, respectively. In the cells adapted slowly to low temperature a significant decrease in K_i^+ and increase in Na_i^+ were noticed. Ouabain added to surrounding solution produced a distinct increase in Na_i^+ , whereas K_i^+ was not affected by this agent. The findings suggest that *Stentor*'s cells regulate their internal sodium content by an active transmembrane sodium-extrusion system.

Properties of Ca^{2+} -stimulated, Mg^{2+} -dependent ATPase from heavy microsomal fraction of rat liver.

Konrad S. Famulski and Ernesto Carafoli*, Nencki Institute of Experimental Biology, Warsaw, Poland, and Swiss Federal Institute of Technology, Zurich, Switzerland*.

In liver, at least two different Ca^{2+} -pumping systems are involved in the regulation of the cytosolic levels of ionized calcium. One of them is located in the membranes of endoplasmic reticulum and is calmodulin-dependent. The other one derives mainly from the bile canalicular region of the plasma membrane and is calmodulin-insensitive (1, 2, 3). We found that also the heavy microsomal fraction is capable of calcium ion accumulation in an ATP-dependent way. Detailed examination of the properties of the latter system shows that it differs from the two systems mentioned above regarding its parameters, pH optimum, the effect of detergents and sensitivity to phospholipase treatment.

1. Famulski, K.S. and Carafoli, E. (1982) Cell Calcium 3, 263–281.
2. Famulski, K. S. and Carafoli, E. (1984) Eur. J. Biochem. 141, 15–20.
3. Bachs, O., Famulski, K. S., Mirabelli, F. and Carafoli, E. (1985) Eur. J. Biochem. 147, 1–7.

The effect of hypothyroidism and hyperthyroidism on sarcolemmal and sarcoplasmic reticulum membranes in fast-twitch muscles of the rabbit.

Konrad S. Famulski, Maria Pilarska and Gabriela Sarzała, Nencki Institute of Experimental Biology, Warsaw, Poland.

Skeletal muscle is one of the major targets of thyroid hormones, where the metabolic rate and relaxation rate are the parameters affected.

Three membrane-bound enzymes in muscles are responsible for the muscle relaxation rate. They are: Ca^{3+} -dependent ATPase from sarcoplasmic reticulum, Ca^{2+} and calmodulin-independent ATPase from sarcolemma and (Na^+-K^+) -dependent ATPase from sarcolemma. Our results indicate that both hypothyroidism and hyperthyroidism caused small but substantial activation of Ca^{2+} -dependent ATPases and, on the other hand, evidently suppress the activity of (Na^+-K^+) -dependent ATPase. This may, in turn, affect the contraction-relaxation cycle of the skeletal muscle. Moreover, hypothyroidism influences also other protein components in sarcolemma as is judged by the electrophoretic analysis of the endogenous membrane-bound substrates of the cAMP-dependent protein kinase.

Effect of caldesmon on assembly of actin filaments.

Barbara Gałązkiewicz and Renata Dąbrowska, Nencki Institute of Experimental Biology, Warsaw, Poland.

Caldesmon, a calmodulin and actin binding protein, is proposed to be a part of regulatory system of actin-myosin interaction in smooth muscle and non-muscle cells. This protein is able to induce G \rightarrow F-actin transformation in the absence of salt, forming single filaments or a network of actin filaments. In the presence of Ca^{2+} and calmodulin this process is reversed. At substoichiometric ratios to actin monomer, caldesmon accelerates nucleation and elongation of actin. In the presence of salt actin filaments on influence of caldesmon form bundles.

Skeletal muscle actomyosin ATPase activity is inhibited in the presence of caldesmon. Consequently, caldesmon-induced actin polymers have a reduced ability to activate myosin Mg^{2+} — ATPase as well as actin filaments formed in the presence of 100 mM KCl with added caldesmon.

Correlation between chloroplast ultrastructure, hill reaction activity, manganese content and free fatty acid level in chloroplasts of chilled leaves.

Joanna Gemel, Barbara Zabłocka, Władysław Golinowski* and Zbigniew Kaniuga, University of Warsaw, Institute of Biochemistry, Al. Żwirki i Wigury 93, 02-089 Warsaw and *Warsaw Agricultural University, Institute of Plant Biology Rakowiecka 26/30, 02-528 Warsaw.

The cold and dark storage of leaves of chilling-sensitive plants — tomato and bean for 4 days results in alterations of chloroplast ultrastructure such as: swelling of plastids, formation of small vesicles of the envelope, grana disintegration, thylakoid dilation and starch granules disappearance. These changes are accompanied by the following phenomena: an increase of chloroplast free fatty acid level, a release of loosely-bound manganese and a decrease of Hill reaction activity. On the illumination of leaves, chloroplast ultrastructure as well as biochemical parameters are similar to those observed for fresh tomato leaves. In contrast, cold and dark storage of leaves of spinach, a chilling-resistant plant, does not have an appreciable effect on chloroplast ultrastructure — no dilation of thylakoids is observed. However, grana stacks are pushed aside to the peripheral part of organelle. The biochemical efficiency of spinach chloroplasts under cold stress is also preserved. These observations seem to indicate that low temperature induced accumulation of free fatty acids in chloroplasts of chilling-sensitive plants may be responsible for their ultrastructural changes, release of manganese and loss of Hill reaction activity.

Modification of ionic groups of cell surface changes the phagocytotic activity of *Acanthamoeba castellanii*.

S. K. Głowacka and A. Sobota, Nencki Institute of Experimental Biology, Warsaw.

The main purpose of the study was the determination of the influence of cell surface residues on the uptake of erythrocytes by amoeba, on the distribution of calcium binding sites on plasma membrane, and on the localization of Ca-ATPase activity (Głowacka et al., 1985, Cell Biol. Int. Rep. 9, 183–191). For the modification of electrostatic properties of the cell surface, amoebae were treated either with polycations (polylysine, cationized ferritin) or with polyanions (polyhistidine and polyglutamine). Polylysine and cationized ferritin — binding to the anionic outer residues of the plasma membrane, as well as polyhistidine and polyglutamine — binding to cationic outer residues of the plasma membrane, caused the aggregation of subplasmalemmal calcium deposits and of the products of Ca-ATPase activity on one end of the cell. Under these conditions, phagocytosis was inhibited by about 30% in comparison with the control values. These results suggest that binding of polyanions and polycations to ionic groups of plasma membrane disturbs the native distribution of ionic residues on cell surface, and in consequence a reduction of phagocytotic activity was observed.

Two components in the movement of markers on the cell surface of *Amoeba proteus*.

Andrzej Grębecki, Nencki Institute of Experimental Biology, 02-093 Warszawa, Poland.

The ectoplasmic cylinder of the amoeba retract centripetally toward the main substrate attachment sites, i.e., it moves forwards in the tail, remains stationary in the adhesion zone, and retreats from unattached fronts in the fountain zones. Latex beads and many other minute markers added to the medium move generally forwards, independently of the ectoplasmic movements, but in accord with the direction and speed of endoplasmic streaming and advancing front. They flow in that direction not only in direct contact with the cell surface, but even several μm from the membrane. Glass wool hairs “caught” by leading pseudopodia by adhesion, on the contrary, repeat the behaviour of cortical cylinder: they are drawn back from the front in the fountain zone and transported forwards in the tail. They precisely accompany their neighbor ectoplasmic granules on the opposite side of the membrane, but are independent of latex flowing generally forwards on the same side. Both markers, when moving in opposite directions, may cross one another at a very short distance, which proves a high fluidity of the surface material in the amoeba. In fact, even the latex spheres and other markers bound to the cell surface form two populations. Some of them do not follow the general forward flow, but their movements are strictly ectoplasm-dependent. Most often they change from one type of movement to another just behind the frontal cap, where the new ectoplasm is formed. The ectoplasm-correlated transport of a particle may terminate by its endocytosis. It is concluded that the movement of extracellular particles on the surface of the amoeba is bidirectional. One component reflects the behaviour of fluid membrane fraction, together with the mucous sheet, which generally flows forward to supplement the surface material according to the changes in cell shape and position. The second component, apparently homologous to capping, is represented by particles kept by adhesion, which presumably follow the movements of surface receptors anchored to the intracellular contractile cytoskeletal layer.

The influence of respiration inhibition on the pinocytotic activity of *Amoeba proteus*.

Barbara Hrebenda and Leszek Kuźnicki, Department of Cell Biology, M. Nencki Institute of Experimental Biology, 3 Pasteura Str., 02-093 Warsaw, Poland.

The external application of potassium cyanide causes a tenfold decrease of pinocytotic activity in *Amoeba proteus*, while locomotion is not disturbed. Ketoglutarate or malate and pyruvate change the pinocytotic activity only in a small degree. Substrates mentioned above do not change the uptake of oxygen, measured with Clark electrode. The presence of potassium cyanide in the surrounding medium of *Amoeba proteus* stops its uptake of oxygen completely. Salicylhydroxamic acid (SHAM), an inhibitor of KCN-resistant respiration, affects neither the pinocytotic activity nor the respiration. Monoiodoacetate, 2-deoxy-D-glucose as well as rotenone decrease the pinocytotic activity from 20 to 50 per cent of the control. In the presence of potassium cyanide the pinocytotic activity is reduced to zero. It is likely that the inhibition of cytochrome oxidase leads to the utilization of energy from glycolitical processes rather than from an alternative pathway of respiration.

Preliminary studies on translocation of lead in apical root cells of poplar-*Populus nigra* "Italica".

K. Idzikowska, Laboratorium Mikroskopii Elektronowej Uniwersytetu A. Mickiewicza ul. Grunwaldzka 6, 60-780 Poznań.

The preliminary studies on the determination of root parts responsible for lead absorption, and the way of translocation of this element from cell to cell have been performed. The root tip of poplar- *Populus nigra* "Italica" was used as the experiment material. The observations were limited to only two regions of the root tip: a) the meristem and b) the root cap.

The root cuttings were cultivated for 15 days in distilled water with $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ (0.7 g/l). After becoming rooted, the plants were moved for 24h to a $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ solution. The reason of this experiment was the investigation of lead penetration between the root cells. On the base of electron microscope observation it is suggested that several cell structures were involved in the process of lead penetration into the cells.

The effect of light and ions of heavy metals on electrogenic proton pump in plasmalemma of plant cells.

Waldemar Karcz, Maria Zientara, Tomasz Wąsik and Mariusz Małkowski, Department of Plant Physiology, University of Silesia, 40-032 Katowice, Poland.

Active transport of hydrogen ions from cytoplasm to cell wall and consecutively to outer medium operates in plasmalemma of plant cells (Spanswick, R. M. Ann. Rev. Plant Physiol. 32: 267-289, 1981). The main function of this proton pump driven by metabolism is the regulation of intracellular pH and the creation of electrochemical potential gradient across plasmalemma, which provides the driving force for the transport of other ions. We have shown that in the cells of maize coleoptiles white light enhanced the proton pump, whereas UV-irradiation or the administration of CdCl_2 or PbCl_2 to the outer medium suppressed the stimulatory effect of white light. On the contrary, manganese ions stimulated proton extrusion and prevented the inhibitory effect of UV. The concentration of ions was 10^{-5}M . The enhancement of proton pump was accompanied by hyperpolarization, while the inhibition of proton extrusion resulted in depolarization of the cell interior. The inhibition of the proton pump by UV, lead or cadmium brought about the retardation of cell elongation, which was measured with a shadowgraphic method. Our results suggest that the injurious effect of Cd and Pb ions plant cells is presumably accounted for by their inhibitory action on the proton pump.

Cross-effects of different inducers of pinocytosis in *Amoeba proteus*.

Wanda Kłopocka and Lucyna Grębecka, Nencki Institute of Experimental Biology, 02-093 Warszawa, Poland.

The postpinocytotic rosette-shaped amoebae, at the stage when no more channels might be seen were rinsed twice with the Pringsheim culture medium and then exposed again to the same or to a different inducer (NaCl, heparin, EDTA). The cell which accomplished the Na- or heparin-induced pinocytosis cannot repeat it under the influence of the same agents, even after their cross-application. However, an abundant pinocytosis is easily induced in them by EDTA. When EDTA is used as the primary inducer, the second pinocytotic cycle cannot be provoked by any other factor, except the second exposure to EDTA (a moderate effect). Such differences in the cross-effects of EDTA and other inducers are incompatible with the commonly accepted view that the intense consumption of cell membrane reserves is the universal limiting factor in the formation of new channels, which excludes an immediate induction of a second pinocytotic cycle. If so, limitation in time of the primary pinocytosis as well cannot be explained by a general exhaustion of the membrane pool. It is suggested that EDTA, acting directly on the distribution and movements of Ca ions on the cell surface and in the submembraneous contractile layer, is much more general and exclusive inducer than other agents which act more indirectly and, therefore, may be more specific.

Hormone-stimulated gluconeogenesis and ureagenesis in isolated hepatocytes from young and old rats.

Zbigniew Kmiec, Andrzej Myśliwski, Department of Histology, Medical School, PL-80210 Gdańsk, Poland.

Hepatocytes from young (6 months) and old (24 months) starved rats were obtained after enzymatic perfusion of the liver. Effects of glucagon or catecholamines stimulation on glucose synthesis from five precursors in hepatocytes of rats of different ages were compared. The production of glucose by non-stimulated hepatocytes and after stimulation by epinephrine or norepinephrine was almost the same in both age groups. The effect of glucagon stimulation was significantly greater in hepatocytes of young rats than of old ones when lactate/pyruvate or alanine were used as substrates, while no such difference was observed when fructose or glycerol were used. The production of urea from lactate, pyruvate, NH_4Cl and ornithine was almost the same in both groups of rats either in the absence or in the presence of glucagon or epinephrine.

TEA prolongs the K^+ — induced ciliary reversal in a marine ciliate *Fabrea salina*.

Andrzej Kubalski, Department of Cell Biology, M. Nencki Institute of Experimental Biology, 3 Pasteur Str. 02-093 Warszawa, Poland.

A marine ciliate *Fabrea salina* is grown in highly concentrated salts solution containing 1.1 M NaCl. Removal of sodium from the medium prolongs K^+ — induced ciliary reversal and has a direct effect on the repolarization phase of the membrane potential (Kubalski, Acta Protozool. 24, 2, 111–116, 1985).

In the present study the cells were extracellularly treated with 3 concentrations (5, 10, 50 mM) of K^+ — conductance antagonist — Tetraethylammonium (TEA) in the presence and in the ab-

sence of Na^+ . It was found that K^+ — induced ciliary reversal was prolonged in both cases, although the time of its duration in the absence of Na^+ was 4 to 5 times longer. It is suggested that K^+ — Na^+ exchange system could be responsible for that fact.

It was found also for the cells bathed in Na^+ — free medium that in the presence of low TEA concentrations (up to 10 mM) K^+ — evoked ciliary reversal was delayed and the cells were immobilized during the first 3 minutes after the addition of KCl.

The influence of amphiphilic derivatives of glycine esters on the properties of phospholipid macrovesicles.

J. Kuczera*, T. Janas*, M. Oświęćimska**, *Department of Physics and Biophysics Agricultural Academy of Wrocław, Poland, **Institute of Organic and Polymer Technology Technical University of Wrocław, Poland.

The dependence of electrical conductivity and breakdown voltage of model biological membranes in the form of lecithin macrovesicular bilayers modified by glycine esters of formula $[(\text{CH}_3)_3\text{NCH}_2\text{COOC}_n\text{H}_{2n+1}]\text{Cl}$, $n = 10, 12, 14, 16$, on the membranes was investigated. It was found that for small percentage of the esters in the membrane the electrical conductivity decreases when the length of the alkyl chain increases. In the greater part of these esters in the membrane an inverse relationship was found. The breakdown voltage decreases with increasing content of the esters in the membrane, the ester of $n = 14$ showing the strongest effect. The molecular mechanism of the action of the investigated compounds on lecithin bimolecular membrane is discussed in this paper.

Effect of fructose-diphosphate aldolase from rabbit muscle on some properties of bimolecular lipid membranes.

Marek Langner, Jan Gutowicz, Department of Biophysics, Academy of Medicine, ul. Chaubińskiego 10, 50-368 Wrocław, Poland.

It is known from the literature, that a glycolytic enzyme, fructose-diphosphate aldolase, may be considered as a peripheral membrane protein. In this communication the effect of the aldolase association with the membrane on some properties of the spherical "black" lipid membrane formed from bovine erythrocyte lipids is presented. It has been shown that the electric resistance and capacity of the membrane was not markedly altered by the enzyme, but the value of the cationic transference number (for K^+), and the filtration coefficient for water were decreased. The temperature-dependent changes of these parameters indicated a phase transition in the membrane, taking place at 35–38°C, which disappeared if aldolase was present.

Extracellular calcium in hippocampus studied in vivo with dialysisperfusion: effects of kainic ACID.

Jerzy W. Łazarewicz*, Henrik Hagberg** and Anders Hamberger**, Medical Research Centre, Polish Academy of Sciences, Warsaw, Poland and **Institute of Neurobiology, University of Göteborg, Sweden.

Extracellular levels of Ca^{2+} in the rabbit hippocampus were investigated in vivo with perfusion-dialysis. A thin semipermeable tubing was implanted and perfused at a constant rate with Ca^{2+} -free medium. Ca^{2+} was estimated from changes in ^{45}Ca radioactivity in the dialysate after labelling the endogenous Ca pool with ^{45}Ca . Extracellular amino acids were analysed with HPLC. Kainic acid was administered with dialysis medium.

Using this method we found that KA as well as veratridine suppress Ca^{2+} . The effect of KA, but not of veratridine, was insensitive to tetrodotoxine. When applied in dialysate, organic Ca antagonists: nimodipine, verapamil and flunarizine failed to inhibit KA-induced drop in Ca^{2+} . These compounds did not modify KA-evoked changes in extracellular amino acids. Ca^{2+} ions, potent blockers of voltage-dependent Ca channels greatly interfered with amino acid levels, remaining without effect on KA-induced drop in Ca^{2+} .

These results indicate that KA promotes the influx of Ca^{2+} to brain cells with possible involvement of voltage-independent, receptor-regulated Ca channels.

Modification of the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase conformational state by the association with liposomes — fluorescence studies.

K. Michalak, J. Gutowicz, T. Modrzycka, Department of Biophysics, Academy of Medicine, Chałubińskiego 10, 50-368 Wrocław, Poland.

The association of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase have been evidence many times. It may be one of the regulatory factor for glycolysis in vivo. Up to now, studies of the interaction between the enzyme and phospholipid model membranes have shown its binding ability to lipid bilayers and the modification of its catalytic properties. The presented paper deals with the mechanism of activity modification induced by the interaction. From comparison of intrinsic tryptophan fluorescence of the enzyme and its quenching by acrylamide we suggest that the adsorption induces conformational changes of the enzyme. Investigations with the use of covalently bound fluorescence probe (o-phthaldialdehyde) support this conclusion. The observed changes in emission spectra and in efficiency of energy transfer between tryptophans and the probe as well as in polarization degree we compared with the influence of typical modifier of protein structure (urea).

Activity of PK C during regenerations of planarian *Dugesia gonocephala*.

Moraczewski J., I. Martelly, R. Franquinet, M. Castagna, Institute of Zoology University of Warsaw Poland, Université Paris Val de Marne 94010 Créteil France Institut de Recherches Scientifiques sur le Cancer B. P. 8 94802 Villejuif France.

We established that the regeneration of planarian *Dugesia gonocephala* is accompanied with: a) phosphorylation of many proteins b) change of the pattern of activity cAMP dependent and independent protein kinases (PK).

The primary change concerns the activity of PK during the first hours after ablation. Phospholipid dependent protein kinase (PK C) was partially purified from planarians homogenate soluble and particulate fractions. The enzyme was activated by dioleine (DO) and 12-0-tetratecanylophorbol-13-acetate (TPA). This activation did not depend upon the presence of Ca^{++} , and was present both in soluble and membrane fractions. During 1 hr of regeneration there was an

increase of activity of PK C in membrane fraction. During this period PK C was more sensitive to TPA than to DO. It is suggested that this activity immediately after ablation is related to the serotonin secretion observed just at this period.

Mastocytes in the mammary gland at various functional states.

A. Peryt, M. Sporniak, J. Zarzycki, Department of Histology and Embryology, Medical Academy of Wrocław, Poland.

The ultrastructure of mastocytes occurring in the mammary gland during pregnancy and lactation was investigated. Two sub-populations of granules were found to occur during pregnancy: dia. 210–340 nm and 560–620 nm. Both types have the same densities and are frequently surrounded by a "halo". During lactation large granules are predominant, with clearing-ups in the central part, without any "halo". The results indicate that in the course of pregnancy the secretory granules become ripe, which is connected with the gland being prepared for secretory activity. Clearing-ups in granules occurring during the lactation period and the absence of any "halo" might suggest a change in their functional state.

The role of polar head group in the interaction of biologically active substances with model membranes.

S. Przystalski, J. Sarapuk, A. Hendrich Jr., Department of Physics and Biophysics, Agricultural Academy, ul. Norwida 25, 50-375 Wrocław, Poland.

The action of three biologically active morpholinium chlorides on the model membranes was studied by means of DSC and BLM techniques. The tested substances were: N-dodecyl-N-methyl-morpholinium chloride (salt I), N-benzyl-N-dodecyl-morpholinium chloride (salt II) N-dodecyl-N-[39-(β methyl- β -nitrovinyl)-4-methoxybenzyl] morpholinium chloride (salt III). They all possess alkyl chains of the same length and differ in the head groups. Both microcalorimetric and electric measurements have shown that the effectiveness of interaction between the studied compounds and lipids depends on the polar head group structure. The lowest efficiency was observed in the case of salt I, i.e. the salt whose polar head was the morpholinium group. Addition of the benzyl group to the morpholinium one (salt II) significantly increased the interaction of this salt with the model membranes. Slightly bigger increase was observed when benzyl group additionally possessed methyl and nitrovinyl radicals (salt III). Such results correspond to those obtained for the same compounds when tested biologically (RBC haemolysis, activity against *Alternaria tenuis* and *Botrytis cinerea* fungi).

Calorimetric determination of critical micelle concentration of biological active substances.

B. Różycka-Roszak*, S. Przystalski* and M. Oświęcimska**, *Department of Physics and Biophysics, Academy of Agriculture, Wrocław, Poland, **Institute of Organic and Polymer Technology, Technical University, Wrocław, Poland.

Salts of some glycine esters of general formula $(\text{CH}_3)_3\text{NCH}_2\text{COOC}_n\text{H}_{2n+1} \text{Cl}^-$, where $n = 10, 12, 14, 16$ belong to surface active substances and influence ion transport through biological membranes (Kuczera et al. *Studia Biophysica* 96, 203, 1983).

The influence seems to be dependent on whether these substances are used in concentrations lower than the critical micelle concentration (CMC) or higher. It was, therefore of interest to determine the CMC value of the studied compounds. For that purpose the calorimetric titration method was applied. The following values equal to 0.024; 0.0059; 0.0019; 0.0006 mol/dm³ for $n = 10, 12, 14, 16$ respectively were obtained.

The effect of pH of surrounding medium on the cytoplasmic streaming in *Paramecium bursaria*.

Jerzy Sikora, Marzena Krucińska, Leszek Kuźnicki, Department of Cell Biology, Nencki Institute of Experimental Biology, Warszawa, Poland.

Since there is substantial evidence for the interaction between particulate material in the surrounding medium and the velocity of cytoplasmic streaming in *Paramecium bursaria* it was worth while to examine the nature of interactions between the cell surface and the particles responsible for stimulation. The possible role of net surface charge of the *Paramecium* have been tested by use of 5 mM MES-NaOH and 5 mM TRIS-HCl buffers enriched with 1 mM of: CaCl₂, MgCl₂ and KCl. *Paramecia* incubated in the solutions of different pH should differentially change their net surface charge. For the sake of experimental procedure, *Paramecia* prior to immobilization by means of nickel-ion-method have been incubated in the presence of latex particles for 3 minutes, in order to evoke a standard mechanical stimulation. It was found that there is an increase of the velocity of cytoplasmic streaming in *Paramecia* incubated in buffers from pH 6 to 8. Over this range a decline in velocity has been noticed. Enhancement of velocity of cytoplasmic movement due to changes of the pH of medium suggests that in the presence of constant concentration of particulate material, the reception of stimuli may depend on changes of net charge of *Paramecium* surface.

Labelling of erythrocyte spectrin with phenylisothiocyanate.

Aleksander F. Sikorski¹ and Marian Kuczek², ¹Institute of Biochemistry, University of Wrocław, 50-137 Wrocław, Tamka 2, Poland; ²Department of Biochemistry, Medical School, 50-368 Wrocław, Chałubińskiego 10, Poland.

Radioactive [¹⁴C] phenylisothiocyanate, a group-specific, hydrophobic reagent was used to label spectrin in erythrocytes, ghosts and also isolated spectrin in solution. Spectrin isolated from erythrocytes, which have been incubated with 3–8 mM phenylisothiocyanate is covalently modified with about 3 mol of the probe per spectrin dimer. The reaction is a saturating process; products are stable under the excess of nucleophile in alkaline conditions. The labelling is very little or not affected by preincubation of erythrocytes or membranes with p-sulfophenylisothiocyanate, polar, structural analogue of the probe. When erythrocyte ghosts are subjected to labelling, 40% increase in degree of spectrin reactivity is observed. Subunits of labelled spectrin separated electrophoretically show similar amount of attached label. Purified spectrin treated with the same concentrations of phenylisothiocyanate can bind up to 10 mol of the probe after preincubation with and up to 12 mol without preincubation with p-sulfophenylisothiocyanate.

Supported by Polish Academy of Sciences, MR II.1.

Effect of La^{3+} ions on permeability of parietal peritoneal mesothelium in vitro.

M. Simon, B. Kiejnowski, J. Knapowski, Department of Pathophysiology, Medical Academy, Poznań.

Determination of tight junction's permeability for La^{3+} ions in electron microscopy in one of the elements of characterization of epithelia. Experiments were carried out on isolated fragments of rat and rabbit parietal peritoneum preparations mounted in Ussing chambers. During exposure to La^{3+} , in final concentration of 10^{-3}M , electrophysiological parameters (potential difference PD and resistance R) were measured. The studies have shown permeability of intercellular tight junctions for the used marker. In both tissues a statistically significant increase of R was found after addition of La^{3+} to the mesothelial side of membrane. Addition to the vascular side or to the tissue after desquamation of the peritoneum did not provoke this change. The obtained results show an inhibitory effect of La^{3+} ions on transport function of the parietal peritoneal mesothelium.

The accessibility of RN-ase to the RNA/DAPI complex in vivo and in vitro.

Bogna Skoczylas, Maria Zwierzyk, Department of Cell Biology, Marcel Nencki Institute of Experimental Biology, 3 Pasteura Str., 02-093 Warsaw.

DAPI, a fluorescent ligand of DNA, is a useful model compound for tracing the penetration of low molecular negatively charged molecules into the cell. If the penetration of DAPI from extracellular medium through a food vacuole (FV) to the cell nucleus of *Paramecium* takes place in the presence of RNA, it has been stated that RNA delays significantly the passage of the drug from FV to the cell nucleus. DAPI, unlike RNA, is concentrated more than thousandfold in FV. In this case, the RNA/DAPI molar ratio changes from 500 in the extracellular medium to 0,5 in the FVs compartment. The experiments carried out in vitro, have shown that almost the whole complex of DAPI with RNA is precipitated from the solution when RNA/DAPI molar ratio equals 4. However, about 80% of RNA remains in the solution when the RNA/DAPI molar ratio equals 10, but 40% of RNA/DAPI soluble complex is resistant to the RN-ase. Therefore, it may be assumed that, in FV, the condensed drug is fixed in an undigestible complex and it is egested from the cell instead of being delivered to the nucleus.

Factors determining the Ca-sequestration in the subplasmalemmal region of *Acanthamoeba*

A. Sobota, Nencki Institute of Experimental Biology, Warsaw.

Electron micrographs of cell surface regions of *Acanthamoeba* showed the presence of electron-dense, calcium-phosphorus-containing deposits on the cytoplasmic surface of the plasma membrane. The formation of the deposits is enhanced when the cells are preincubated and fixed in the presence of ATP. Treatment of the deposits with EDTA or with trichloroacetic acid evoke a decomposition of these structures. Paper chromatography analysis of the trichloroacetic acid extracts showed that pyrophosphate, inorganic phosphate and adenosine monophosphate are probably the main compounds involved in the formation of these deposits. Partial decomposition of the deposits is observed when they are treated with alkaline phosphatase. After such treatments fibrilous fine-organized networks appear inside the "empty" deposits. It is suggested that pyrophosphate (Ca or phosphate) Ca salts, may be precipitated on these plamenteous matrix which are localized in subplasmalemmal region of the cell, and thus forming the electron-dense Ca-deposits.

Image of cytoskeleton elements in secretory cells of the mammary gland.

M. Sporniak, B. Perissel¹, Department of Histology and Embryology, Medical Academy of Wrocław, Poland, ¹Department of Histology, Embryology and Cytogenetics, University of Clermont-Ferrand, France.

The spatial system of microtubules in the mouse mammary epithelial cells was analyzed during pregnancy, lactation and involution. In various functional states of the gland the arrangement and number of microtubules undergo changes and become most different in the lactation period. In the peribasic zone the forms parallel to the basement membrane are predominant, in the perinuclear part of the cell the microtubules are arranged parallel to the long axis of the cell and in the apical zone perpendicularly and obliquely to the apical plasma membrane. The results indicate that spatial organization of the cytoskeleton is related to the degree of differentiation of elements of the synthesizing system.

The lead causes the modifications of localization and enzymatic activity of peroxidases as well as electrophoretic pattern of soluble proteins in root growth tips of lupin.

M. Spychała and R. Przymusiński, Laboratory of General Botany, University of Poznań, 61-713 Poznań, Poland.

Root growth tips of lead-treated seedlings of *Lupinus luteus* were investigated. As a result of histo- and cytochemical studies a considerable increase in peroxidase activity was discovered. This increase was documented mainly for cells of columella of root cap, apical region of promeristeme and procambium. Electrophoretically separated peroxidases isolated from the above mentioned root region also had higher enzymatic activity under lead treatment. This metal additionally caused quantitative changes in electrophoretic pattern of soluble proteins. The higher amount of 1400 daltons fraction was found in lead-treated seedlings. This is probably lead-binding fraction. Some quantitative changes were also documented for another proteins.

The participation of cytokinins in light-induced electric reaction in plant cells.

Jan Stolarek and Barbara Michalczyk, Department of Plant Physiology, University of Silesia, ul. Jagiellońska 28, 40-032 Katowice, Poland.

The action of light on ion transport and membrane potential in plant cells has been investigated by various authors (Zurzycki, J. *Acta Soc. Bot. Pol.* 37, 4, 517-531, 1968; Spanswick, R. M., *BBA*, 332, 387-398, 1974; Stolarek, J., in: Spanswick, R. M. (Ed.), *Plant Membrane Transport*, North Holland/Elsevier, 1980). However, so far there is no unanimous opinion concerning the nature of light-triggered electric phenomena in plants. Our investigations revealed that photoelectric reaction in plants is under hormonal control. The experiments were carried out with *Cucurbita pepo* leaves and cotyledons, which were enriched in cytokinins or depleted of these hormones according to the procedure described by Klyachko, N. L. and coworkers (*Biochem. Physiol. Pflanzen*, 175, 712-721, 1980). Photoelectric responses to light flashes were recorded using a conventional electrophysiological technique. We have found that the first response resembles the action potential, whereas consecutive irradiation with light flashes brought about the appearance of electric impulses of a small amplitude. Photoelectric reaction in kinetin enriched leaves and cotyledons substantially differed in shape and magnitude from the response of cytokinin deficient leaves and cotyledons. Kinetin suppressed the first rapid reaction, whereas consecutive

photoelectric responses were practically unaffected. In view of the fact that kinetin was found to stimulate activity of carboxydismutase it is possible that this enzyme is involved in photoelectric reactions in plants.

The conformational changes of F-actin induced by the binding of phosphorylated and dephosphorylated heavy meromyosin.

D. Szczęśna, Yu. S. Borovikov* and I. Kąkol, Nencki Institute of Experimental Biology, 02-093 Warszawa, Poland, *Institute of Cytology of the Academy of Sciences of the USSR, Leningrad 194064.

The conformational changes of F-actin induced by the binding of phosphorylated and dephosphorylated heavy meromyosin to F-actin in ghost fibre were studied by the method of polarized UVfluorescence microscopy.

The binding of phosphorylated heavy meromyosin to F-actin in ghost fibre at high Ca^{2+} concentration increased and at low Ca^{2+} concentration decreased the anisotropy of intrinsic tryptophan fluorescence of F-actin, contrary to the effect of the binding of dephosphorylated heavy meromyosin.

Since the changes of fluorescence anisotropy reflect the conformational changes of F-actin, it may be assumed that the modulation of myosin-actin interaction by the changes of the form of myosin depends on Ca^{2+} concentration.

The interaction of calmodulin with myosin light chain kinase and erythrocyte membrane Ca^{2+} -ATPase.

W. Szyja, A. Wrzosek, H. Brzeska and M. G. Sarzała, Nencki Institute of Experimental Biology, 3 Pasteur str., Warsaw, Poland.

In this study we used tryptic fragments of calmodulin: $\text{TR}_1\text{-C}$ (1-77 amino acid residues), $\text{TR}_2\text{-C}$ (78-148) and $\text{TR}_3\text{-E}$ (107-148), in order to localize the site(s) of interaction of calmodulin with smooth muscle myosin light chain kinase (MLCK) and erythrocyte membrane Ca^{2+} -ATPase.

The contamination of all fragments with calmodulin was estimated to be lower than 0.03%. The ability of these fragments to bind the enzymes as well as to activate them was checked using affinity chromatography and activity assays respectively. In the case of Ca^{2+} -ATPase, fragments $\text{TR}_2\text{-C}$ and $\text{TR}_1\text{-C}$ were able to bind and to activate the enzyme. In the case of MLCK, only fragment $\text{TR}_2\text{-C}$ bound the enzyme, but contrary to Ca^{2+} -ATPase it failed to activate it in a detectable manner. The other two fragments were not able either to bind or to activate MLCK.

These results indicate the existence of two enzyme binding sites in calmodulin molecule: the first one in COOH-terminal half which seems to be common for both enzymes investigated, and a second one in NH_2 -terminal half which interacts only with Ca^{2+} -ATPase. This and the observed difference in the ability of fragment $\text{TR}_2\text{-C}$ to activate both enzymes suggest a different mode of calmodulin interaction with Ca^{2+} -ATPase and MLCK.

Cytochemical localization of acetylcholinesterase in the caryopses of wheat.

Edward Ślesak and Andrzej Tretyn, Department of Plant Physiology Wrocław University, 50-328 Wrocław, Poland. Department of Plant Cytology and Genetics, Toruń University, 87-111 Toruń, Poland.

The histochemical localization of acetylcholinesterase (AChE) (Karnovsky M. J., Roots J., J. Histochem. Cytochem. 42, 219, 1964) in the caryopses of wheat was studied using light and electron microscopy. It has been shown that the product of reaction corresponding with enzyme activity is localized within the aleuronic layer and embryo only. Ultrastructural investigations revealed that this enzyme occurs in the outer part of plasmalemma. The activity of AChE within the cells of aleuronic layer is higher in their parts adjacent to pericarpium and endosperm and lower between particular cells of this layer. Neostygmine and ambenonium chloride inhibited the activity of AChE completely. In the light of the hypothesis determining the role of acetylcholine as "local hormone" (Jaffe M. J., Plant Physiol. 46, 768, 1970) the activity of AChE can serve as an indicator of germination capacity of seeds.

Influence of hormones on sperm motility and survival in mice.

Leopold Śliwa, Nicolaus Copernicus Academy of Medicine in Cracow, Institute of Biomorphology, Department of Biology, Kopernika 7, 31-034 Kraków.

Sperm metabolism, motility and survival are influenced *in vivo* by gonadotropic and sex hormones (Wyrobek et al., Mutation Res., 115; 1, 1983). Will *in vitro* incubation with other hormones also modify the motility of sperms?

A statistically significant decrease of motility (i.e. of the percent of moving sperms) was found following 40 min incubation of vas deferens sperms with hormones of the posterior pituitary vasopressin and oxitocin, and with pancreatic hormones insulin and glucagon. A slight decrease in sperm motility was observed in the presence of calcitonin and HCGH. ACTH and adrenalin had no influence on motility of sperms, whereas thyroxin slightly increased it.

None of the investigated hormones influenced the mice sperm survival.

Quantum — energetic model of the nerve cell.

Mariusz Trojański, The Military Hospital No. 10, Bydgoszcz, Poland.

On the ground of the energy quantization of the electric potential field of the nerve cell we introduced a new energetic unit-neuroquantum. This unit gives facilities for characterizing a physical conditions accompanying transmission and formation of the action potentials, postsynaptic potentials and restoring potentials.

Development of one class of synapses in the cortex of the cat's brain depends on physiological stimulation of the structure.

K. Turlejski, Nencki Institute, Warsaw, Poland.

The density of synapses was determined from electronmicrographs taken from area 17 of cats binocularly deprived of pattern vision for 6 months and in normally reared litter mates. In each cat the optic radiation was transected on one side 4 days before sacrifice and the density of synapses of subcortical origin was estimated by comparing the density of normal synapses re-

maintaining on the lesioned side with the density of synapses on the unlesioned side. In normal animals 36% of the synapses were formed by subcortical afferents, but in the binocularly deprived animals this figure was reduced to only 17%. The pool of cortico-cortical synapses remained unchanged. Therefore the cells of subcortical nuclei, unlike the cortical cells depend on physiological level of visual stimulation when forming proper number of synapses. The elaborate network of cortico-cortical connections probably produces enough stimulation by itself, so the cells can form a proper number of synapses.

Histamine level in rat brain synaptosomes obtained from control, anaesthetized, hypoxic and glucocortical treated animals.

J. Waśkiewicz*, E. Wałajtys-Rode** and U. Rafałowska*, *Dept. Neurochemistry, Medical Research Centre, Pol. Acad. Sci., 00-784 Warsaw; **Dept. Pneumonology, Institute of Internal Medicine, 02-097 Warsaw, Poland.

During the last years a large amount of information has been accumulated which suggest that histamine, beside its role in immune processes, may also act as neurotransmitter in the central nervous system. In our studies the effect of certain pathological conditions on the level of histamine in rat brain synaptosomes was investigated. Synaptosomal fraction was obtained by flotation technique in discontinuous Ficoll gradient. Histamine was measured by isotopic enzymatic assay using specific histamine methyltransferase from the brain of a guinea pig, with ^3H — S-adenosylmethionine as a substrate. Comparing to the control values (119 ± 65 pg/mg p) nembutal anaesthesia increased histamine level by 50%, whereas under hypoxic conditions (7% O_2 + 93% N_2 , 30 min) changes were much less pronounced. Prolonged glucocortical treatment of the animals caused small decrease of histamine level in synaptosomes (about 20%). Observed changes might affect regulatory function of histamine on neurotransmission, termoregulation and secretion of vasopressin and ACTH.

Age — dependent changes of transmembrane potential of murine and human blood lymphocytes.

Jacek Witkowski, Jolanta Myśliwska and Andrzej Myśliwski, Department of Histology, Medical School, 80-211 Gdańsk, Poland.

It is known that characteristic fluctuations of the transmembrane potential (TMP) of murine and human lymphocytes are necessary for the proper activation of these cells and, therefore, for the immune response. Also it is known that the immune response deteriorates with individual age.

The transmembrane potential of the peripheral blood lymphocytes of young and aged people was then evaluated by means of microphotometric measurement of the cells stained with fluorescent dye, dihexyloxacarbocyanine iodide ($\text{DiOC}_6/3$).

The data from this evaluation were compared with earlier results obtained from similarly stained lymphocytes from different lymphatic organs of young and old mice by means of flow cytometry (Witkowski J., Immunology, 1985, in press).

It was shown that the amount of cyanine dye incorporated into the cytoplasm of lymphocytes of old people, corresponding to the TMP of these cells, was significantly lower than that of young ones. This observation was consistent with the recent findings in mice.

Synaptosomes and synaptosomal membranes ATPases activities and exogenous glucose concentrations.

Renata Wojtkowiak and Lilla Lachowicz, Department of Biochemistry, Institute of Physiology and Biochemistry, School of Medicine, Lindleya 6, 90-131 Łódź, Poland.

Glucose is a substantial substrate for metabolic processes in the central nervous system (CNS). Utilization of glucose is linked to the functional activity of the brain and the control of metabolite and ion transport processes.

The labelled activities of (Na^+K^+) and $(\text{Ca}^{2+}\text{Mg}^{2+})$ -ATPases in CNS cells determine univocally the role which this enzymatic complex plays in sustaining appropriate concentrations of main cations in nervous cells.

The aim of this work was to examine *in vitro* the influence of various glucose concentrations upon the (Na^+K^+) and $(\text{Ca}^{2+}\text{Mg}^{2+})$ ATPases activities in synaptosomes and synaptosomal membranes obtained from the selected areas of rat brain.

It has been found that 20 mM glucose causes 100% increase of $(\text{Ca}^{2+}\text{Mg}^{2+})$ ATPase activity in synaptosomes from the cerebral cortex and hippocampus. We observed a similar growth of (Na^+K^+) ATPase activity in the area of cerebral cortex and a 7 fold rise of this enzyme in the hippocampus.

Synaptosomal membranes obtained as a result of hipoosmotic shock were incubated at three different concentrations of glucose.

Our results point to a diversiform influence of exogenous glucose upon the activities of the examined enzymes in synaptosomes and synaptosomal membranes.

The differences are connected with glucose concentration, and also with the localization of ATPases in particular brain areas.

The fate of lead in root tip cells of higher plants.

A. Woźny, M. Książek, Laboratory of General Botany, University of Poznań, 61-713 Poznań, Poland.

The presence of an excess of lead in soil or in water usually results in its intake and accumulation by plants. Usually lead does not cause an immediate injury in plants due to a series of metabolic processes such as the storage of lead in a metabolically inactive compartments, i.e. the vacuole and (or) the cell wall. Accumulation of lead in those structures appears to occur in most plant cells.

On the ground of the presence of lead in the endoplasmic reticulum (ER) and in the Golgi apparatus (GA) we suggest that this metal can be translocated to the vacuole and (or) to the cell wall, among others, by the membrane flow mechanism.

Phosphorylation and dephosphorylation of 18 kDa light chains in crude myosin preparation.

M. Wrotek, D. Stepkowski, I. Kałol, Nencki Institute of Experimental Biology, 3 Pasteur str., 02-093 Warsaw, Poland.

The studies of the rate of phosphorylation and dephosphorylation of skeletal muscle myosin 18 kDa light chains by endogenous myosin light chains kinase and phosphatase, in crude myosin preparation were performed. Full phosphorylation of the light chains was achieved after 3 min.

or 12 min. at low and high ionic strength, respectively. The biphasic kinetics of dephosphorylation has been observed. It may suggest that dephosphorylation of myosin 18 kDa light chains in the muscle can be an ordered process.

Does *Paramecium* possess membrane β -receptors?

Elżbieta Wyroba, Department of Cell Biology, Nencki Institute of Experimental Biology, 02-093 Warsaw, Poland.

The existence of membrane β -receptors in unicellular protozoan cell *Paramecium aurelia* is postulated on the basis of studies on endocytosis and its inhibition carried out in light, electron and fluorescence microscopy.

The following processes have been observed: i) latex particles uptake, ii) endocytosis of ruthenium red occurring during simultaneous staining and fixation of starved cells, iii) internalization of cycloheptaamylose-dansyl chloride complex in the course of fluorescent labelling of cell surface. All these endocytic processes have been inhibited by 20 min pretreatment of the cells with 70 μ M of dichloroisoproterenol — an antagonist of beta-reception. The sensitivity of the fed cells to inhibitor has been found to be higher than that of the starved ones.

It has been demonstrated by Allen and Fok that phagosomal membrane in *Paramecium* is derived from the pool of the discoidal vesicles by means of which the membrane recycling occurs (J. Cell Sci. 45, 131). Ultrastructural observations on dichloroisoproterenol — pretreated ciliates indicate that the discoidal vesicles can be detected in these cells. Thus it seems that inhibitor action does not affect the intracellular pool of membranes indispensable in the endocytic process.

Test by the identification of the particular zones of liver acini on the base of cytochemical and cytoenzymatical studies in hepatocytes.

B. Zapolska-Downar, Department of Histology and Embryology IBM Academy of Medicine, Narutowicza 60, 90-136 Łódź.

It is known that the particular three zones of the liver acinus as a morphophysiological unit of the liver are included (but with no significant limit) almost selectively in three types of the metabolic processes: carbohydrates (first zone), carbohydroprotein (second zone), and fatty (third zone). The aim of the work was: the identification of the proper cytochemical and cytoenzymatical methods for revealing the scope and the area of these zones, which is impossible in routine histological investigations. The activity of several enzymes included among others in carbohydrate, protein, lipid metabolic processes has been investigated as well as such chemical compounds as glycogen, proteins and lipids. The investigations revealed that: 1) the intensity of cytochemical reaction on the studied enzymes is not identical in the particular zones of the liver acinus, 2) the activity of the dehydrogenases and ATP-ase, TPP-ase, AP, NE is high exclusively in the first zones. This zone shows a very intense histochemical reaction on glycogen, 3) such enzymes as: dehydrogenases succinic, citric, NADH, NADPH and phosphorylases show a weak activity in the second zones. The histochemical reactions on glycogen and proteins are of medium-intensity. 4) In the third zones the following dehydrogenases show a high activity: glutaminic, alcoholic, NADH and TPP-ase, ATP-ase, glucose-6-phosphate, and lipase. In this zone we observe intensive reactions to lipids.

“Light cells” in the secretory epithelium of the mammary gland.

J. Zarzycki, B. Krajewska, M. Sporniak, Department of Histology and Embryology, Medical Academy of Wrocław, Poland.

The ultrastructure of “light cells” during pregnancy and lactation was investigated. These cells were found to appear only within the epithelium of secretory segments and their large number during pregnancy drops down during lactation. The cells exhibit various degrees of regression of the synthesizing system and configurations of their cytoskeleton resemble the system found in the involution cells. These results suggest that these are epithelioid cells in which regressive changes occur due to insufficient formation of the cytoskeleton. These changes are induced by fully formed secretory cells.

SECTION III**CANCER CELLS****Antioxidative enzymes activities in normal and leukemia lymphocytes.**

J. Bartkowiak, G. Graczyk and E. Polkowska-Kulesza, Department of Oncology, Medical Academy, 93-509 Łódź, Gagarina 4, Poland.

Antioxidative enzymes — superoxide dismutase (SOD), catalase and glutathione peroxidase — are thought to protect all aerobic cells against oxygen toxicity. In this study their activities were determined in human normal and leukemia lymphocytes. Lymphocytes were separated on Ficoll-Paque gradient. The purity of cell preparations was more than 95%. The level of SOD was assayed by the method of Misra and Fridovich (J. Biol. Chem. 247, 3179, 1972). Cyanide sensitivity of superoxide dismutase was measured in order to differentiate between Cu-Zn SOD and Mn SOD activities (K. Utsumi et al., FEBS Lett. 79, 1, 1977). Amounts of catalase and peroxidase were determined acc. to Beers and Sizer (J. Biol. Chem. 195, 133, 1952) and Paglia and Valentine (J. Lab. Clin. Med. 70, 158, 1967), respectively. The presented results indicated that both in normal and in leukemia human lymphocytes the total SOD activity was very similar. But the level of mitochondrial-type enzyme (Mn SOD) was significantly lower (or absent) in leukemia cells. Catalase activity also declined in leukemia lymphocytes in comparison to normal cells. However, the level of glutathione peroxidase was comparable in both kinds of lymphocytes. In conclusion, these findings suggest that active oxygen radicals and abnormal amounts of antioxidant enzymes are playing a significant role in the development of leukemia. They confirm the general hypothesis of Oberley (J. Theor. Biol. 106, 403, 1984) that Mn — containing SOD is involved in carcinogenesis.

The major monosialo- and disialoganglioside from murine spontaneous thymoma.

Zbigniew Bartoszewicz, Department of Radiobiology, Institute of Nuclear Chemistry and Technology, Dorodna 16, 03-195 Warszawa.

Gangliosides from lymphocytes in AKR/J mice spontaneous thymoma were isolated and compared with these of normal thymus. Compositional analysis, methylation followed by gas chromatography coupled with mass spectrometry and the use of exoglycosidases allowed us to determine complete structures of major monosialoganglioside (IV³NeuAc-GgOse₄ ceramide) and disialoganglioside (IV³NeuAc₂-GgOse₄ ceramide) from thymoma. The possible pathway for the biosynthesis of disialoganglioside is presented.

Chitosan and its chemical modifications as supports for the culture of epithelial cells.

B. Dolińska and P. Popowicz, Department of Biochemistry, Teacher's Training College, Olsztyn Department of Pathophysiology, Medical Academy, Poznań.

Epithelial cells of established line, MDCK were cultured on plastic surfaces coated with chitosan, glutaryl-chitosan or N-acetyl-chitosan. Chitosan was spread on the bottom of Petri dishes and after the formation of a thin film the chemical modifications were performed with glutaraldehyde or acetic anhydride to test new derivatives as supports for cell growth.

Cells were plated directly into the culture dish at 300.000/cm³. Continuous monolayer appeared after 5 days in Petri dishes without the coated bottoms. The total cell protein content in cultures grown on tested materials as compared to control cultures was 72% for glutaryl-chitosan, 60% for chitosan and 5% for N-acetyl-chitosan.

Isolation and characterization of lecitin-resistant variants of Lewis lung carcinoma cells.

D. Duś, W. Budzyński, L. Strządała, J. Rak, H. Kuśnierczyk, C. Radzikowski, Tumor Immunology Department, Institute of Immunology and Experimental Therapy, Polish Academy of Sciences, Czerska 12, 53-114 Wrocław, Poland.

Established in vitro mouse Lewis lung carcinoma (LL₂) cell line, which has preserved its tumorigenicity and metastatic potential was subjected to selection with wheat germ agglutinin (WGA). Two variant sublines were selected: LL₂5, and LL₂8, resistant to 20 µg and 100 µg of WGA/ml, respectively. In vitro and in vivo biological characteristics of both variant sublines, as compared with the parent LL₂ line, were performed. WGA-resistant variants preserved the tumorigenicity of the parent LL₂ cell line, but lost their metastatic potential after s.c. inoculation and revealed diminished ability to form metastases after i.v. inoculation. The LL₂ cell line and its two WGA-resistant sublines were used as a model for immunobiological aspects of metastasis studies.

The use of caffeine to detect potentially lethal DNA breaking in L5178Y cells treated with inhibitors of DNA synthesis.

B. Gołos, J. Sawicka and J. Malec, Department of Biochemistry, Institute of Haematology, 00-957 Warsaw, Poland.

Several studies on the relationship between cell death and DNA breaks suggest that the efficiency of cell killing by the DNA damaging agent is related to the efficiency of DNA repair. We have tried to approach the relationship between DNA breakage and cell survival by the use of caf-

feine (CAF), known as a potential DNA repair inhibitor. The experimental design was to compare the rate of cell growth, cell killing and DNA breaking following acute and long-term exposure of cells in culture to various inhibitors of DNA synthesis (hydroxyurea, dTh or mixture of dThR, dCR, dAR and dGR in excess) in the presence or absence of CAF. It was found that the presence of CAF during the treatment and in the post-treatment period resulted under certain experimental conditions in an increase of cell growth inhibition and in a decrease of cell survival in comparison with CAF untreated cells. Such effect of CAF was correlated with CAF-induced elevation of DNA damage as evaluated by hydroxyapatite analysis and the rate of recovery of DNA synthesis. When the state of DNA synthesis inhibition was not correlated with the CAF-induced elevation of DNA breaks, the influence of CAF on cell growth and survival was negligible. In conclusion we suggest that the response of cells to CAF treatment following the exposure to agents interfering with DNA synthesis might be a useful preliminary screening test to distinguish between DNA breaking and unbreaking agents.

The pyruvate kinase sensitive to inhibitory action of L-cysteine in different experimental tumours and normal tissues.

M. Gumińska, E. Marchut, T. Kędryna, M. Stachurska, J. Ignacak, Cz. Radzikowski, H. Kuśmierczyk, Institute of Medical Biochemistry, Medical Academy, Cracow and Institute of Immunology, Wrocław.

Previous studies indicated that tumour pyruvate kinase, in contrast to pyruvate kinase obtained from normal tissues, has different regulatory properties. It is less sensitive to normal negative effectors like fatty acids or ATP but acquires sensitivity to inhibitory action of L-cysteine.

The assumption that this pyruvate kinase variant might be used as a marker of malignant transformation has been confirmed in the studies of a broad spectrum of experimental tumours transplanted in mouse, rat and hamster.

More detailed studies with disc electrophoresis indicated that sensitivity to L-cysteine is connected with pyruvate kinase isoenzyme of the lowest mobility in polyacrylamide gel (pH 8.4).

Pyruvate kinase (PK) sensitive to L-cysteine in human urothelial cell of normal and neoplastic origin of different transplantations grades.

M. Gumińska, M. Stachurska, E. Marchut, T. Kędryna, J. Kieler, Cz. Radzikowski, D. Duś, Institute of Medical Biochemistry, Cracow, Poland, The Fibiger Institute, Copenhagen, Denmark, and Institute of Immunology, Wrocław, Poland.

Previous studies of Ehrlich ascites tumour (Kędryna et al. *Biochim. Biophys. Acta* 763, 64, 1983), ten different experimental tumours in mice, Morris hepatoma in rat and polyoma tumour in hamster (Marchut et al. VIIth Meeting of EACR, 1985 — Abstracts, p. 46) suggested that PK sensitive to L-cysteine may be used as a specific tumour marker.

In the present study the authors wanted to find out whether it is possible to see differences in PK electrophoretic pattern between transformed cell lines cultivated in vitro of normal and tumour origin and of different transformation grades.

Immortal cells of normal bladder (HCV 29) and urethra (Hu 609) epithelium irrespectively on their TGr (II or III) showed two PK isoenzymes insensitive to L-cysteine. Cells of human bladder

carcinoma TCC (Hu 456, Hu 1703 He) differed in the presence of third slow migrating isoenzyme sensitive to L-cysteine.

The studies confirmed the suggestion that PK isoenzyme sensitive to L-cysteine may be a new tumour marker also in *in vitro* studies.

Antigenic heterogeneity of human epithelial ovarian carcinomas.

A. Harłodzińska, B. Ślesak, R. Richter, J. Rabczyński, M. Cisło, Department of Pathological Anatomy and Clinic of Gynecological Surgery, Medical Academy, 50-368 Wrocław, Poland.

Antigenic reactivity of glycoprotein antigens extracted from individual cases of mucinous and serous ovarian adenocarcinomas was characterized in comparison with the reactivity of CEA, NCA, alpha-1-antichymotrypsin, and alpha-1-acid glycoprotein in double immunodiffusion test, rocket immunoelectrophoresis, and immunofluorescence test. In all studies the specific immune sera against perchloric acid extracts of individual cases of mucinous and serous ovarian cystadenocarcinomas and antisera against reference antigens mentioned above were used. It was established that mucinous and serous ovarian adenocarcinomas are immunologically different and possess various tumor-related antigens. Ovarian mucinous adenocarcinomas contain considerable amounts of CEA and NCA in comparison to negligible or undetectable amounts of these antigens in serous type of ovarian cancer. Both types of neoplasms showed the activity of alpha-1-antichymotrypsin and alpha-1-acid glycoprotein. Our data indicate that ovarian mucinous and serous adenocarcinomas could derive from separate lineages of epithelium.

The lymphatic leukemia cell trypsin inhibitor in the complex with DNA.

Hoser, G., Department of Cytophysiology, Medical Centre of Postgraduate Education, Marymoncka 99, 01-813 Warszawa.

There is but scant information on the regulation of proteinases acting upon proteins and peptides within the cell. Proteinase inhibitors may have this regulatory function and have been isolated from various plant and animal tissues (Keilova, H. et al. *Acta biol. med. germ.* 36: 1873-1881, 1977).

The trypsin inhibitor was isolated from lymphatic leukemia cells grown in inbred DBA/2wf mice. The inhibitor purified on Sephadex QAE A-50 is eluted from the column together with DNA, when the ratio of $A_{280\text{nm}}$ to $A_{260\text{nm}}$ absorbance falls below 0.5. In affinity chromatography on Sepharose-trypsin and gel filtration on Sephadex G-50 two inhibitor fractions were found: one bound and the other unbound to DNA.

The inhibitor is a thermostable peptide resistant to pH changes within the range pH 2-10.

Propionibacterium granulosum KP-45-induced stimulation of metabolism and cytotoxic activity of large granular lymphocytes (LGL) isolated from spleens of C3H mice.

M., Janiak B. Gnatowski, E. Kączkowska*, B. Sokolska, and S. Szmigielski, Center for Radiobiology and Radioprotection, Warsaw, Poland. *Institute of Mother and Child, Warsaw, Poland.

Large granular lymphocytes (LGL) are believed to act as effectors in natural killer (NK) cell-mediated cytotoxicity against tumors in man, rats and mice. These effectors can be separated on discontinuous density gradients of Percoll solution. In the present study LGL-like cells were isolated from suspensions of splenocytes obtained from normal and Propionibacterium granulosum KP-45 (Pg)-treated C3H mice. LGL-enriched suspensions of both normal and Pg-stimulated splenocytes recovered from Percoll gradient were nearly twice as effective in non-specific killing of YAC-1 targets as control cells separated only on nylon wool columns. Although the number of normal and Pg-treated LGLs was comparable, the latter exhibited higher activity of acid phosphatase, succinic dehydrogenase, and nonspecific esterase. These results suggest, that treatment with Pg stimulates metabolism and/or cytolytic antitumor activity within the population of LGL-like cells in mice.

Adhesiveness of human granulocytes.

Jadwiga Jakubas-Przewłocka, Medical Centre of Postgraduate Education, Dept. Biophysics and Biomathematics Marymoncka 99, 01-813 Warszawa, Poland.

The object of the study was the adhesiveness of human peripheral blood neutrophils (PMNs) from healthy adults and granulocytic cells from patients with chronic myeloid leukaemia. The results are as follows:

- the adhesiveness of PMNs from healthy adults is greater than that of myeloid leukaemia cells,
- the adhesiveness of immature granulocytes depends on the stage of maturation,
- the energy of adhesion varied from $3.8-6.9 \times 10^{-20} \text{J}$ for normal PMNs, and $1.2 \times 10^{-20} \text{J}$ to $2.8 \times 10^{-20} \text{J}$ for myeloid leukaemia cells (new method of measurements has been applied).

Immunomodulatory effects of cyclophosphamide-treated leukemia cells.

J. Kawiak, T. Skórski, M. Kawalec, Department of Cytophysiology, Medical Centre of Postgraduate Education, Marymoncka 99, 01-813 Warsaw, Poland.

Cyclophosphamide (CY), the often used alkylating agent with immunosuppressive action, has been shown under experimental conditions to enhance antitumor responses. We performed experiments with CY-treated L 1210/V leukemia cells. The median survival time of DBA/2Wf or CD2F1 hybrid mice increased after administration of 10^3 of the malignant leukemia cells when the recipient mice were injected earlier with similar leukemia cells treated with CY. To achieve this effect four weekly i.p. injections of 10^7 CY-treated cells should be given per mouse. The injected CY-treated leukemia cells survive in a mice for 2-3 days and does not transfer the CY nor its derivatives. This immunomodulatory effect is specific.

Studies of the effect of Ra irradiation on metabolism of neoplastic cells in female genital organs.

I. Kertyńska, A. Kazimierczak, A. Karmowski*, Department of Histology and Embryology, *Institute of Oncology, Medical Academy of Wrocław, Poland.

The activity of dehydrogenase succinate (DB), lactate (DM), acid (FK) and alkaline phosphatase (FZ) in neoplastic cells of the uterine cervix on the 1st, 7th and 14th day after brachytherapy was investigated. The activities of DB, DM and FZ were found to drop down in proportion to the time elapsed in neoplastic cells; however, that of FK was increasing up to the 7th day and then dropped down which was accompanied, by an increase in activity in the atroma and inflammatory infiltration cells, maintained until the 14th day. The results indicate that the destruction process in the neoplastic cells is accompanied by a decrease in their enzymatic activity and the elements of the stroma exhibit higher resistance to radiation.

The lack of HLA expression on human testicular germ cells.

I. Kowalik¹, A. Jakubowiak², G. Szymczyński³, M. Kurpisz¹, ¹ Institute of Human Genetics, Pol. Acad. Sci. Święcickiego 6, Poznań, Poland; ² Department of Histology, Medical School, Święcickiego 6, Poznań, Poland; ³ Department of Andrology, Medical School, Poznań, Poland.

The human testicular germinal cells were isolated mechanically or by enzymatic digestion of seminiferous tubules (Fenderson et al. Dev. Biol., 103: 117-128, 1984), alternatively, tissue sections of testis were used for tests of surface antigens detection. The testicular material was fixed in three different ways (Bouin's fixative, 4% paraformaldehyde, 0.1% glutaraldehyde) prior to further examination. Evaluation of HLA expression studied by immunoperoxidase technique (second antibody: horseradish peroxidase conjugated anti-mouse IgG; MILES-YEDA, Israel) and cell-binding radioimmunoassay (second antibody: anti-mouse Ig ¹²⁵J-labelled, F(ab')₂ fragment; Amersham, UK) using monoclonal antibodies: W6/32 specific for HLA Class I (HLA-A, B, C) and L243 specific for Class II (HLA-DR).

Preliminary data indicated the possible lack of HLA expression on testicular cells of human spermatogenesis.

Adhesion of L 1210 cells to different substrates.

Hanna M. Kowalczyńska and Małgorzata Nowak, Medical Centre of Postgraduate Education, Department of Biophysics and Biomathematics. ul. Marymoncka 99, 01-813 Warszawa, Poland.

The early adhesive interaction of living cells with substrates was examined. The relative number of cells adhering under stationary conditions, and remaining adherent cells to the substrate under the operation of a shearing force of known value, was determined.

The following results were obtained for cells adherent to different substrates, both in the presence and absence of serum in the medium.

1. The number of adhering cells increases with the value of the time of interaction with the substrate under stationary conditions, and tends to reach a plateau.

2. When the time of cell-substrate interaction is relatively small, the number of cells adhering to the substrate decreases with diminishing shearing force.

3. The Brownian motion of cells interacting with substrates in the absence of serum disappears in a short time. The time during which Brownian cell motion is observable depends on the kind of substrate.

The parameters of morphological, cytochemical and immunological differentiation of leucemic cells in liquid culture.

K. Kuliczkowski, A. Noworolska, K. Sędek, S. Kotlarek-Haus, R. Richter, A. Harłodzińska, I. Frydecka, Department of Hematology and Department of Pathological Anatomy Medical Academy Wrocław.

Liquid cultures of cells from bone marrow or peripheral blood of patients with acute leukemias and chronic granulocytic leukemias were carried out. The cells were incubated with different stimulating agents such as Ara-C and TPA. After 5 days cells smears were morphologically evaluated and cytochemical reactions for peroxidase activity, alpha-naphtyl acetate esterase activity, PAS reaction and presence of NCA were determined. Immune phenotypes of cells with monoclonal antibodies were also estimated. It was shown that Ara-C and TPA treatment caused the morphological, immunological and/or cytochemical changes in myeloblastic, monocytic and lymphoblastic leucemic cells. They were accompanied by changes in NCA expression. After treatment of CGL cells with TPA and Ara-C the variability of cytochemical and immunological features and decrease of NCA expression were also noticed.

Expression of Qa-1 antigen on resting and activated lymphocytes.

Piotr Kuśnierczyk, Department of Tumor Immunology, Institute of Immunology and Experimental Therapy, Polish Academy of Sciences, Czerska 12, 53-114 Wrocław, Poland.

The aim of this study was to obtain anti-Qa-1 antisera and to use them for monitoring the expression of Qa-1 antigen on lymphocytes during proliferative response to Concanavalin A. The presence of Q-1 antigen on lymphocytes was determined by complement dependent cytotoxicity assay. Among four antisera obtained in different donor-recipient combinations, only two contained anti Qa-1 antibodies. These antibodies were cytotoxic for Concanavalin A induced lymphoblasts but not for resting peripheral lymphocytes. A comparison of the proliferation kinetics of Concanavalin A stimulated spleen cells with the kinetics of Qa-1 antigen expression showed that the time of maximal expression of Qa-1 is short and occurs one day before the peak of proliferative response.

Synthesis of rat plasma proteins by primary cultures of hepatocytes and *Morris hepatoma* cells.

D. Magielska, H. Rokita, K. Ciężka and A. Koj, Institute of Molecular Biology, Jagiellonian University, Al. Mickiewicza 3, 31-120 Kraków.

Suspensions of cells from rat liver and *Morris hepatoma* 7777 were obtained by digestion of liver or tumor with collagenase. The cells were cultured in 5% CO₂ on glass or collagen in modified Parker or Eagle media with 5% FCS and 1 10⁻⁶ M dexamethasone. In some experiments medium was supplemented with dialysed supernatant from rat peritoneal macrophages stimulated by endotoxin in vitro. Medium from hepatocytes and hepatoma cells was suitably concentrated and used for quantitative determinations of rat albumin, fibrinogen, alpha-2-macroglobulin, alpha-foetoprotein and alpha-1-acute phase globulin by means of rocket immunoelectrophoresis. Macrophage-derived cytokines and dexamethasone caused profound changes in the secreted plasma protein pattern of cultured cells.

The ultrastructural cytoarchitecture of the actin microfilaments in *Melanoma* cells.

Marek Małecki, Center of Oncology, Wawelska 15, 02-034 Warszawa, Poland.

The ultrastructure of the cancer cells cytoskeleton remains unknown. This study was undertaken to reveal the actin cytoarchitecture in *Melanomas* excised during the surgical treatment of the patients. I carried on the investigations with the aid of the conventional electron stereomicroscopy of serial ultrathin sections and samples rotary shadowed.

Within the observed cells, there were three kinds of arrangement of the microfilaments. They were arranged in three-dimensional lattice mostly in cellular processes. In the cytoplasm, stress fibres configurations were observed. Microfilaments located under cellular membrane formed brush-like arrangements.

I conclude, that the cytoarchitecture of the actin microfilaments is related to the motility and, in the effect, to the invasive properties of the cancer cells.

The comparison of the native microfilaments and purified F-actin from *Melanoma* cells.

Marek Małecki, Jan Sosiński, Center of Oncology, Wawelska 15, 02-034 Warszawa, Poland; Institute of Experimental Biology, Pasteura 3, 02-093 Warszawa, Poland.

Our investigations were intended to compare the native microfilaments and the purified F-actin isolated from *Melanoma* cells. We present the results obtained with the conventional electron microscopy of the samples obtained with negative staining and shadow casting methods related to SDS acrylamide gel electrophoresis and ATP-ase activation.

The native microfilaments were to teens microns in length and different from F-actin polymers obtained from purified actin. The increase ionic strength and magnesium ions caused the polymerization of the part of the actin. The increased filamentogenesis occurred, when ethylene-glycoltetraacetic acid was applied. The investigated actin had the property of stimulating the activity of ATP-ase.

We conclude, that in the cancer cells there is the calcium dependent factor affecting the organization of the actin.

Metabolism of anticancer quinazoline antifolate in mouse organs.

M. Manteuffel-Cymborowska, E. Sikora, B. Grzelakowska-Sztabert, Department of Cellular Biochemistry, Nencki Institute of Experimental Biology, 3 Pasteur str., 02-093 Warszawa, Poland.

N¹⁰-Propargyl-5,8-dideazafolic acid (CB 3717), the strong inhibitor of thymidylate synthase in vivo and promising anticancer drug, when injected into mice ([³H] CB 3717; 20 mg/kg) accumulated in their livers and kidneys. In the isolated organs both unchanged quinazoline and its metabolites — CB 3717 polyglutamates, susceptible to endo- and exogenous conjugases hydrolyzing the glutamyl residues, were found. The amount of CB 3717 polyglutamates was time dependent and in liver 48–72 hours after drug injection reached 35% of recovered radioactivity.

The binding of immune complexes to human red cells through the complement (C3b) receptor.

J. J. Nowicka, J. S. Nowak, Institute of Human Genetics, Polish Academy of Sciences, ul. Święcickiego 6, 60-781 Poznań, Poland.

Technical conditions for binding the labelled ^{125}I -immune complexes (by lactoperoxidase method) to the surface of human erythrocytes via the C3b receptor have been studied. The following parameters have been determined: incubation time-30 min, temperature -37°C , and dilution of guinea pig complement-1:40. Heat aggregated IgG (at 65°C) preincubated with guinea pig serum have been used as immune complexes. Binding of aggIgG-C3b complexes in different concentration (from $2\mu\text{g}$ to $600\mu\text{g/ml}$) has been estimated. The control tests included binding of aggIgG without complement as well as with heat inactivated complement. The binding of radio-labelled complexes correlated with the results of passive hemagglutination assay. The obtained results suggest the individually dependent density of binding sites for aggIgG-C3b complexes on human erythrocytes.

H-2 antigens expression on lecithin-resistant variant cells of Lewis lung carcinoma.

A. Opolski, D. Duś, C. Radzikowski, Tumor Immunology Department, Institute of Immunology and Experimental Therapy, Polish Academy of Sciences, Czerska 12, 53-114 Wrocław, Poland.

The studies on correlations between expression of histocompatibility antigens (H-2) and metastatic ability were performed on metastatic line of Lewis lung carcinoma LL₂ and its two non-metastatic. Wheat Germ Agglutinin (WGA)-selected variants: LL₂5 and LL₂8. The method of quantitative absorption of anti-H-2 antisera was used. Quantitative differences of H-2^b antigens expression as well as appearance of illegitimate H-2^k and H-2^d specificities were detected on studies lines. The highest expression of alien H-2 antigens was observed on LL₂5 variant cells. A simple correlation between histocompatibility antigens expression and metastatic cell phenotype was not found.

Mitogenic properties of a new lectin from *Aleuria aurantia* (AAA).

F. Pajtasz, D. Duś, Tumor Immunology Department, Institute of Immunology and Experimental Therapy, Czerska 12, 53-114 Wrocław, Poland.

In the present study, BALB/c mouse lymphoid cells were used to check the mitogenic activity of AAA.

It occurred that AAA, at the concentration of $1\mu\text{g/ml}$, stimulated proliferation of lymph node cells, nonadherent spleen cells and hydrocortisone-resistant thymus cells. Anti-Thy 1.2 serum and complement, but not anti-IgG serum and complement, blocked mitogenic stimulation of spleen cells with the lectin.

The results suggest that sensitive to mitogenic activity of AAA are predominantly cells with mature thymocytes characteristics.

Effects of 5-fluorouracil on mitotic index and incorporation of ^3H -thymidine into DNA in erythropoietic mouse spleen.

Barbara Panfil and Stanisław Bitny-Szlachto, Department of Radiobiology WIHIE Warsaw.

The influence of 5-fluorouracil on the development of erythropoietic tissue, induced in mice by two doses of phenylhydrazine, was investigated. Daily 5-fluorouracil doses 30 mg/kg reduced the mitotic index by half in comparison with normal spleens, and 15-times in relation to corresponding groups of animals which were given only phenylhydrazine. That arrest of the mitotic index persisted for three days, and then, in spite of continued administration of 5-fluorouracil, the mitotic index increased and reached 50% of the corresponding control. Incorporation of ^3H -thymidine into DNA was found to be affected to a lesser extent than the cell proliferation. Restoration of the mitotic activity during continued 5-fluorouracil treatment indicates the existence of some blastic cells resistant to this cytostatic.

Antiproliferative activity of (+) R and (—) S enantiomers of cyclophosphamide and ifosfamide.

M. Paprocka, C. Radzikowski, Tumor Immunology Department, Institute of Immunology and Experimental Therapy, Polish Academy of Sciences, Czerska 12, 53-114 Wrocław, Poland.

Having demonstrated the differences in antitumor activity of Cyclophosphamide and Ifosfamide (+) R and (—) S enantiomers we evaluated their direct antiproliferative activity on selected types of normal and neoplastic cells.

P-388 leukemic cells in LCFL (Leukemic Colony Forming Units) assay and Lewis lung cells in experimental metastasis assay were applied as model neoplastic cells. Bone marrow stem cells were applied as representative of normal proliferating cells in NCFU (Normal Colony Forming Units) and RPNCFU (Rapidly Proliferating Normal Colony Forming Units) tests.

In all four models (—) S enantiomers exerted higher antiproliferative effect than their counterparts (\pm) RS — racemic forms revealed their activity exactly intermediate between (+) R and (—) S forms. These data confirm the results obtained in chemotherapeutic experiments and seem to be more precise.

Inhibition of T lymphocyte rosettes formation with SRBC and Leydig cells with monosaccharides.

T. Pawłowski, W. Niedbała, P. Tabaczewski, W. Skorupski, J. Morkowski, K. Wiktorowicz, Department of Immunology and Rheumatology, University Medical School, 60-967 Poznań, Poland.

T lymphocytes, forming in vitro rosettes with SRBC, showed also the ability to bind with Leydig cells. It was recently found that human Leydig cells bound autologous and allogeneic T lymphocytes. The binding was blocked with monosaccharides similarly as in the case of SRBC binding. The strongest inhibitor was glucose and its derivatives. α -methyl-F-mannoside was the least effective. Probably both kinds of cells are bound to the same lectin-like receptor on the T lymphocyte surface.

In vitro interactions of murine sarcoma cells and semisyngeneic peritoneal macrophages. Studies on glass and collagen substrata.

Barbara Płytycz*, Sigrun Espelid**, Jarl Bøggwald** and Rolf Seljelid**, *Department of Comparative Anatomy, Jagiellonian University, Kraków, Poland, **Department of Morphology I, IMB, University of Tromsø, Tromsø, Norway.

The AA cells are an ascites subline (Klein, G., *Can. Res.*, 14: 482, 1954) of methylcholanthrene induced sarcoma, evoked in C3H mice (Miller, G. L. et al., *Canc. Res.*, 10: 141, 1950). The AA cells alone are not adapted to in vitro conditions and die at a similar rate both over glass and collagen substrata. In contrast, the AA cells are much more vital in vitro in coculture with murine peritoneal macrophages (PM) of semisyngeneic origin (C3H×DBA)F1, but not with semisyngeneic peritoneal non-adherent cells nor with fibroblast cell line L 929. Monocytes/macrophages are also essential in vivo for sustained growth of other murine sarcomas (Evans, R., *Br. J. Canc.*, 37: 1086, 1978; Kadhim, S. A. and Rees, R. C., *Cell. Immunol.*, 87: 259, 1984).

Radiolabelled thymidine (3HthR and 14CthR) incorporation assays indicate that AA cells and PM mutually induce DNA synthesis during in vitro coculture. However, glass adherent PM are cytotoxic versus tumor cells thus AA multiplication is not evident in this system. After 5 days the culture consists of extensively spread PM only. In contrast, proliferation of AA cells is more distinct in coculture with PM on collagen substratum, where PM without contact with "foreign" glass surface are, as a rule, not detectably cytotoxic to tumor cells. Thus collagen cultures reflect much better the in vivo system, where AA cells proliferate within murine peritoneal cavity despite the AA contact with PM.

System of hemopoietic cell culture in collagen discs floating in medium.

Zygmunt Pojda*, Dariusz Jaskulski** and Wiesław Wiktor Jędrzejczak**, *Department of Radiobiology WIHiE, Szaserów 128, 00-909 Warsaw, **Department of Immunology CKP WAM, Szaserów 128, 00-909 Warsaw, Poland.

An improved method hemopoietic cell culture is described. Mononuclear cells obtained from mouse bone marrow (MBM), human bone marrow (HBM) or human peripheral blood (HPB), suspended in Dulbecco's modified medium (DMEM), were mixed with collagen stock solution (4°C). Immediately thereafter, pre-cut glass syringes, 2 ml volume, were filled with the cell mixture. After 4-6 min inside the syringes appeared collagen clots, which were gradually pressed outside and cut with sterile surgical knife to obtain discs (approx. 0.1 ml vol.). Collagen discs were put into DMEM enriched with L-glutamine and fetal calf serum. Colony stimulating factor and/or erythropoietin were added in proportions commonly used in hemopoietic cell cultures. Discs were incubated in liquid medium in Leyton's culture flasks for 8 days (MBM) or 20 days HBM and HPB). Colony growth was controlled using inverted microscope at daily intervals. Permanent preparations were made on microscopic slides after dehydration of collagen discs and stained using routine cytological methods. Results are comparable to or better than these obtained using other culture methods.

Epithelial cell culture on millipore filter — early effects of anticancer drugs on transepithelial ions transport.

P. Popowicz and J. Knapowski, Department of Pathophysiology, Medical Academy, Świącickiego 6, 60-781 Poznań.

Epithelial membranes composed of cells of established line MDCK grown as monolayer on millipore filter offer a convenient experimental model to study early effects of anticancer drugs. When placed in typical chambers the membranes generate the spontaneous potential difference (PD); according to the Ussing's method short-circuit current (I_{sc}) is measured and resistance (R) calculated by Ohm's law.

Observations showed that after an addition of some antineoplastic drugs (Ledakrin, Cyclophosphamide, Adriamycin, Daunorubicin) the bioelectrical parameters increased significantly. Changes in PD, I_{sc} and R developed rapidly which may suggest that the tested anticancer drugs affect the transepithelial ion transport in cultured cells by changing the permeability of the plasma membrane.

Antipromoting effect of 13-cis retinoic acid on thymic lymphoma incidence in C57B1 and AKR mice.

Małgorzata Przybyszewska, Przemysław Janik, Bożena Szaniawska, Institute of Oncology, Department of Cell Biology, Wawelska 15, Warsaw, Poland.

The aim of the experiment was to study the impact of 13-cis retinoic acid on thymic lymphoma occurrence in C57B1 (X-ray induced lymphoma) and AKR mice (spontaneous lymphomas). The prolonged feeding with the retinoid in animal chow (300 mg/kg of chow) resulted in a drastic reduction of lymphoma incidence in C57B1 mice. The same dose of the retinoid in AKR mice led to a lower reduction of lymphomas, whereas the side effect was expressed stronger than in C57B1 mice.

In parallel experiments a different sensitivity of lymphoma cells in C57B1 and AKR mice to cyclophosphamide was observed.

Culture of adherent murine Omental Lymphoid Organ (OLO) cells in vitro.

Mariusz Z. Ratajczak, Department of Immunology, CKP WAM, Szaserów 128, Warsaw, Poland.

Adherent cells obtained through OLO (Dux 1977) digestion in 0.2% collagenase in DMEM (30') were cultured in DMEM+20% FCS in Leighton Flasks. After 3 days of culture four types of adherent cells were observed and simultaneously groups of small non-adherent cells with large dark nuclei were present. After 9 days of culture the monolayer was formed. Supernate collected between the 9th and the 14th day of culture was found to stimulate colonies of macrophages in bone marrow cells agar culture. When the adherent cells were passaged following 7 days of culture a new monolayer was formed. It was, however, not associated with appearance of small non-adherent cells.

Influence of cyclophosphamide (endoxan) on properties of L 1210 leukemia cells.

T. Skórski, M. Kawalec, Department of Cytophysiology, Medical Centre of Postgraduate Education, Marymoncka 99, 01-813 Warsaw, Poland.

The L 1210 cells modified in vivo by twice repeated treatment with cyclophosphamide 200 mg/kg, were immunogenic, when injected to semisyngeneic mice. These cells were unable to kill syngeneic immunosuppressed mice, but they were lived in the dye exclusion test. They had the ability to synthesize proteins, RNA, and partially DNA. The contents of cellular proteins and phospholipids in modified cells were elevated 1.2 and 1.2 times respectively. The relative amounts of histocompatibility and tumour-associated antigens were increased. The changes in cellular protein composition of modified cells were detected.

Monoclonal antibodies to T (Thomsen-Friedenreich) antigen: production and preliminary characterization.

I. Steuden, M. Duk, C. Radzikowski, E. Lisowska, Institute of Immunology and Experimental Therapy, Polish Academy of Sciences, Czerska 12, 53-114 Wrocław, Poland.

This paper presents preliminary characterization of monoclonal antibodies to T antigen. T antigen has been reported to be present on breast and lung adenocarcinomas. An IgM monoclonal antibodies BM 22.19.20.7 and BM 22.19.14.13 were produced following immunization of BALB/c mice with human asialo glycoprotein M from normal erythrocytes. We assumed that these monoclonal antibodies may be used as a specific diagnostic marker.

Metastatic ability of lecitin-resistant variants of Lewis lung carcinoma.

L. Strzdała, J. Rak, H. Kuśnierczyk, D. Duś, C. Radzikowski, Tumor Immunology Department, Institute of Immunology and Experimental Therapy, Polish Academy of Sciences, Czerska 12, 53-114 Wrocław, Poland.

Tumorigenicity and metastatic capacity of parental LL₂ and WGA-resistant variant cell lines LL₂-5 and LL₂-8 were compared. The s.c inoculation of 1×10^6 LL₂ or variant cells resulted in tumor takes in 100% of the animals and progressive tumor growth at the site of inoculation. The cells of LL₂ line spontaneously metastasized to the lungs. In contrast, LL₂-5 and LL₂-8 variant cells were not able to produce lung metastasis following s.c. inoculation and were poorly metastatic following i.v. inoculation. LL₂-5 and LL₂-8 cells metastasized to the lungs following i.v. inoculation into cyclophosphamide pretreated animals.

Growth arrest and polyploidization induced by metahalone microtubule inhibitors on rat glioma cells in culture.

Bożena Szaniawska*, Rolf Bjerkgvig**, Ole Didrik Laerum**, *Institute of Oncology Department of Cell Biology, Wawelska 15, Warsaw, Poland. **The Gade Institute, Department of Pathology, University of Bergen, 5016 Haukeland Hospital, Norway.

Two pyrimidine analogs have been tested for their effect on the growth on rat glioma cells in monolayer and spheroid culture. Arrest of mitosis was accompanied by repeated cycles of DNA synthesis, leading to different levels of polyploidization up to 16 and 36 ploid cells. The effect was

not reversible through a culture period of 4 days. Reduced ability to directional migration on a plastic surface was seen for 16 days after exposure. The reaction to microtubule inhibitors seems to be different depending on the type of tumor cells.

Modulation of mouse neuroblastoma cell proliferation by quiescent 3T3 cells in culture.

Bożena Szaniawska, Przemysław Janik, Małgorzata Przybyszewska, Institute of Oncology, Department of Cell Biology, Wawelska 15, Warsaw, Poland.

In the mixed culture system nontransformed 3T3 fibroblast cells have the ability to inhibit proliferation of neuroblastoma cells which is lost when they are heat-or methanol-killed. In contrast, chloroform — methanol killed 3T3 fibroblasts reduced the plating efficiency of neuroblastoma cells to the same extent as caused by living 3T3 cells. The possibility that non — transformed cell surface compounds can modify proliferation of neuroblastoma cells is discussed.

The effect of exogenous DNA on proliferation and function of human lymphocyte subpopulation.

K. Szyfter and K. Wiktorowicz, Institute of Human Genetics, Polish Academy of Sciences, ul. Strzeszyńska 30, 60-479 Poznań, and Department of Immunology and Rheumatology, Poznań Medical University School, Poland.

The inhibitory effect of exogenous DNA added to the culture of human peripheral blood lymphocytes, induced to proliferation by non-specific mitogens (PHA, ConA, PWM) or by allogeneic cells, was shown. The same inhibitory effect was observed in the case of cell lines of T origin. T cell suppressor activity was also markedly diminished in the presence of exogenous DNA. The target cell for exogenous DNA action seems to be T suppressor lymphocyte. It is likely that exogenous DNA acts via steroid receptor.

The effect of theophylline and its derivatives on human lymphocyte proliferation and function in in vitro cultures.

P. Tabaczewski, M. Kotecki, K. Wiktorowicz, W. Samborski, A. Pawlak, A. Mackiewicz, W. M. Stolzmann, Department of Immunology and Rheumatology, 60-967 Poznań, Poland.

Theophylline and its derivatives: aminophylline (theophylline complexed with ethylenediamine) and diprophylline (7-beta-gamma-dihydroxypropyl-theo-phylline), phosphodiesterase inhibitors, decrease proliferation of human lymphocytes in in vitro culture, increasing intracellular cAMP concentration. The extent of blocking effect was measured as decrease in ³H-thymidine incorporation, decrease in lymphoblast percentage, and increase in I division cell mitoses. Con A induced suppressor activity was also decreased. The effect of aminophylline was stronger than theophylline which may be due to better water solubility. Diprophylline was much less effective as a proliferation inhibitor, which may be caused by its lower affinity to phosphodiesterase.

The effect of modifiers of chemical carcinogenesis on the induction of skin papillomas in BALB/c mice by 7,12-dimethylbenzanthracene.

B. Tudek, J. Miłoszewska, M. Przybyszewska¹, Department of Biochemistry, Warsaw Medical Academy, Banacha 1, 02-097 Warsaw, ¹Department of Cancer Biology, Institute of Oncology, Wawelska 15, Warsaw.

Anticarcinogenic properties of the extract from wheat sprouts and 13-cis retinoic acid have been investigated. The extract from wheat sprouts (S-30 fraction) contained compounds which revealed antimutagenic activity against benzo(a)pyrene, 2-acetylaminofluorene and 7,12-dimethylbenzanthracene in the Ames test.

Papillomas have been induced with 7,12-dimethylbenzanthracene (1 dose of 100 $\mu\text{g}/\text{mouse}$) and croton oil (10 $\mu\text{l}/\text{mouse}$, twice a week, for 22 weeks). The extract from wheat sprouts has been injected under the skin for 10 days (3 days before and 7 days after treatment with DMBA), each day in the amount of 1 ml per mouse. 13-cis retinoic acid was painted on the skin the day after the treatment with the croton oil.

It has been observed that the extract from wheat sprouts doubled the number of mice with papillomas and the mean number of papillomas per mouse.

It has also been shown that 13-cis retinoic acid only slightly diminished the induction of papillomas in BALB/c mice by DMBA and croton oil.

The influence of acute phase proteins on human lymphocyte proliferation in vitro.

K. Wiktorowicz, S. Mackiewicz, A. Mackiewicz, J. Morkowski, Dept. of Immunology and Rheumatology, University Medical School, 60-967 Poznań, Poland.

Creactive protein (CRP), one of the acute phase reactants with unknown biological function shows some lectin-like properties. In in vitro cultures CRP either decreased or increased mitogen-induced proliferation of human peripheral blood lymphocytes. Inhibition effect was observed with lymphocytes incubated with CRP prior to mitogen addition. CRP added to the culture a few hours after mitogen had an opposite effect, stimulating lymphocyte proliferation. Both effects were dose-dependent, varied also with the mitogen and cell subpopulation. We suppose that CRP may influence early events in T lymphocyte activation.

Action of caffeine on X-irradiated L5178Y-S Cells: survival, DNA synthesis, progression through the cell cycle, chromatin condensation.

D. Włodek*, E. Budzicka*, K. J. Johanson**, G. Seibold***, I. Szumiel*, *Institute of Nuclear Chemistry and Technology, 03-195 Warszawa, Poland; **Swedish University of Agricultural Sciences, 750-07 Uppsala, Sweden; ***University of Giessen, German Federal Republic.

L5178Y-S cells are extremely radiosensitive (mean lethal dose, $D_0 = 0.5 \text{ Gy}$); 2 mM caffeine (Caf) treatment decreases D_0 by a factor of 1.25. 25% inhibition of DNA synthesis caused by X-irradiation (2.5 Gy) is due to impaired initiation with elongation proceeding at the control rate. The exceptionally long postirradiation arrest in G2 phase (11h/1Gy) is considerably shortened by Caf: irradiated, Caf-treated cells progress through the cell cycle without delay. Change in highly condensed chromatin content was observed 0.5–1 h after treatment and/or irradiation; this change was most pronounced in cells subjected to combined treatment. These results point to a possible link between chromatin organization and the cellular response to ionizing radiation.

Reversibly permeable mouse carcinoma cells.

A. Wroniszewska, K. Bogucka and M. Balińska, M. Nencki Institute of Experimental Biology, Polish Academy of Sciences, 02-093 Warsaw, Poland.

A brief treatment of Ehrlich carcinoma or L 1210 cells with 15. mg/ml lysolecithin results in a cell population which is permeable to low molecular weight charged molecules that cannot normally cross the cell membrane.

The cell structure, some metabolic processes and cellular oxidation using metabolites and inhibitors in lysolecithin-treated cells were investigated.

These results demonstrated that permeation of cells does not disrupt cell structure integrity.

Participation of acid alpha-1-glycoprotein in the interaction of IgG-3 with leukocytes.

Zdzisław Wróblewski, Institute of Biochemistry, Wrocław University, Tamka 2; 30-137 Wrocław, Poland.

Human alpha-1-glycoprotein (AGP) forms complexes with IgG-3 (Wróblewski Z. *Acta Biochim. Polon.* 31, 17–24, 1984). Since AGP was found to exist in leukocyte membrane (Gahmberg C., Andersson L., *J. Exp. Med.* 148, 507–521, 1978) the interaction of purified, [¹²⁵I] labelled IgG-3 with leukocytes was tested. In neutral pH human leukocytes bind 10–15 µg [¹²⁵I] IgG-3 per 10⁶ cells and only this subclass is released from the cell surface upon treatment with AGP. This event was not observed in the case of mixture of lymphocytes T and B.

Supported by Polish Academy of Sciences, MR II-1.

Immunocytochemistry of thyroid parafollicular cells.

M. Zabel and I. Biela-Jacek, Department of Histology and Embryology, Academy of Medicine, Poznań, Poland.

Studies pertain suitability of immunocytochemical antigen detection in studies on thyroid parafollicular cells. Immunocytochemical studies have been conducted on localization of calcitonin, somatostatin, serotonin and neuron-specific enolase in thyroids of control and experimental rats. PAP technique (using avidin-biotinated peroxidase complex), protein A — gold and gold labelled antigen technique have been employed, as applied to light and electron microscopy. Parafollicular cells are capable of storing several hormones (e.g. calcitonin, somatostatin, serotonin) which can be detected immunocytochemically. The hormones have been demonstrated in the same secretory granules. As a rule, parafollicular cells feature high, although variable, number of secretory granules containing at least one of the hormones. Most extensive immunocytochemical studies of our own and of other authors have pertained calcitonin and most of investigators are of the opinion that it can be detected in any parafollicular cell, either in control or experimental conditions. However, we have demonstrated cases in which the number of somatostatin-storing cells has been clearly higher than the number of calcitonin-storing cells. Moreover, presence of cells devoid totally or almost completely of secretory granules as has been shown in experiments. In such cases immunocytochemical reactions aiming at detecting the hormones have yielded negative results. The situation was completely different in case of neuron-specific enolase. The enzyme can be detected in normal parafollicular cells and in cells which lack any secretory granules. This is possible due to the exclusive cytosol localization of the enzyme in parafollicular cells.

Porphyrins and GGTP activity in the transplantable clear cell adenocarcinoma of kidney induced by aflatoxin B₁.

B. Zawirska, Department of Pathological Anatomy, Medical Academy, 50-368 Wrocław, Poland.

The clear cell adenocarcinoma induced by aflatoxin B_c was transplanted sc to Wistar rats. The porphyrins and GGTP were estimated in tumors, kidneys and livers, and GTTP also in serum of the hosts. In all tumors the content of proto-, copro-, and especially uroporphyrin was significantly lower than in the host kidneys. The content of porphyrins, particularly uroporphyrin, increased in renal tissue of tumor bearing rats with the successive passages. The summarized GGTP level in females beginning from VII transplant, was 3-10.2, higher and in males from X passage 6.3-19.2 times higher than the normal values. Histologically the tumors were similar to the primary human renal cancer. Metastases were not seen. Probably the kidney of rats bearing transplantable tumor derived from renal proximal tubules react with the pathological synthesis of porphyrins and GGTP.

The same results were obtained in human primary cancer of kidney.

...the ... of ...

...the ... of ...

...the ... of ...

...the ... of ...

...the ... of ...

...the ... of ...

...the ... of ...

Warunki prenumeraty kwartalnika

POSTĘPY BIOLOGII KOMÓRKI

Prenumeratę na kraj przyjmują i informacji o cenach udzielają urzędy pocztowe i doręczy-
ciele na wsi oraz Oddziały RSW „Prasa—Książka—Ruch” w miastach.

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. Wysyłka za granicę pocztą zwykłą jest droższa od
prenumeraty krajowej o 50% dla zleceniodawców indywidualnych i o 100% dla zlecających insty-
tucji i zakładów pracy.

Terminy przyjmowania prenumerat na kraj i za granicę:

- do 10 listopada na I półrocze roku następnego i na cały rok następny,
- do 1 czerwca na II półrocze roku bieżącego.

Bieżące i archiwalne numery można nabyć lub zamówić we Wzorcowni Ośrodka Rozpow-
szczenia Wydawnictw Naukowych PAN, Pałac Kultury i Nauki, 00-901 Warszawa.

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.

TREŚĆ

G. RYCHLIK, K. WŁODARSKI, Współczesne koncepcje zależnych od IgE mechanizmów degranulacji komórek tucznych	279
B. RZESZOTARSKA, Prekursory peptydów opioidowych . . .	309
B. RZESZOTARSKA, Farmakologia molekularna β -endorfiny	321
A. JAKUBIEC-PUKA, H. CHOMONTOWSKA, Contractile apparatus in striated muscle maintained in excessive extension	331
T. SKÓRSKI, Limfocyty B i T: charakterystyka, stymulacja aktywności i rola w zwalczaniu nowotworów	335
II Ogólnopolska Konferencja Biologii Komórki	359