

PL ISSN 0324-833X

POLSKIE
TOWARZYSTWO
ANATOMICZNE

TOM 14-NR 4

1987 (255-360)

Postępy Biologii Komórki

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 we Wrocławiu

Nakład 573 + 97 egz. Ark. wyd. 9; ark druk. $6\frac{5}{8} + \frac{1}{8}$ ark. kredy.
Papier druk. sat. kl III, 80 g, 70 × 100 cm. Oddano do składania w sierpniu 1987 r.
Podpisano do druku w grudniu 1987 r. Druk ukończono w styczniu 1988 r.
Zam. nr 405/87. Cena 140 zł

Wrocławska Drukarnia Naukowa, Wrocław, ul. Lelewela 4

<http://rcin.org.pl>

BADANIA ANTYGENÓW UKŁADU ROZRODCZEGO METODAMI
IMMUNOLOGICZNYMISTUDIES OF ANTIGENS OF MALE REPRODUCTIVE SYSTEM BY
IMMUNOLOGICAL TECHNIQUES

Maciej KURPISZ

Zakład Genetyki Człowieka PAN w Poznaniu

Streszczenie. Przegląd poświęcony jest badaniom antygenów komórek rozrodczych. Substancje o właściwościach antygenowych były identyfikowane za pomocą surowic poliklonalnych oraz monoklonalnych przeciwciał, stosując metody immunochemiczne. Szczególną uwagę poświęcono antygenom plemnika, które sklasyfikowano według poszczególnych kompartmentów komórkowych, tj. struktur błonowych (w tym akrosomu), jądra, cytoplazmy oraz mitochondriów. Omówiono immunogenność ważniejszych antygenów oraz ewentualną ich rolę w immunologicznej antykoncepcji. Przedstawiono badania nad wyodrębnieniem antygenów różnicowania cyklu spermatogenezy, kontrowersje dotyczące występowania antygenów narządowieswoistych na komórkach rozrodczych oraz podstawowe mechanizmy i teorie immunologiczne tłumaczące stan tolerancji męskiego i żeńskiego układu odpornościowego wobec męskich komórek rozrodczych.

Summary. The review describes antigenic determinants of male germinal cells. The antigenic substances were identified by immunochemical methods using polyclonal antisera and monoclonal antibodies. Spermatozoal antigens were classified according to cell compartments i.e. cellular membranes (acrosomal compartment was separately described), nucleus, cytoplasm and mitochondria. The immunogenicity of most important antigens was pointed out and their potential role in immunocontraception was discussed. Briefly summarized some attempts undertaken to identify the differentiation antigens of spermatogenic cycle, then controversies concerning expression of tissue non-specific antigens on germinal cells and basic mechanisms or theories of immunological toleration to male germinal cells.

WSTĘP

Wzrastający odsetek niepłodnych par małżeńskich w społeczeństwach krajów rozwiniętych, a w związku z tym szerokie stosowanie techniki zapładniania *in vitro* (IVF), a równocześnie poszukiwania nieszkodliwej

antykoncepcji immunologicznej spowodowały zwiększenie zainteresowania immunologią rozrodu. Immunologia rozrodu to młoda dziedzina wiedzy, zajmująca się badaniem substancji o cechach antygenowych komórek rozrodczych. Badania te stanowią jakościowo nowe podejście do zagadnienia niepłodności człowieka. W praktyce klasyczne kryteria andrologiczne, określające stopień prawdopodobieństwa płodności danego osobnika, okazały się niewystarczające. Powstałe określenie idiopatycznej niepłodności ludzkiej określa stan, w którym nie dochodzi do zapłodnienia, pomimo występowania prawidłowych parametrów klinicznych [124]. Zrozumiałe jest więc poszukiwanie innych kryteriów oceniających niepłodność męską, w tym również na poziomie molekularnym.

Najważniejszymi kryteriami oceny andrologicznej są: liczba plemników w ejakulacie, ich morfologia i zdolność do ruchu postępującego. Całkowita liczba plemników w ejakulacie dowodzi jedynie ilościowo prawidłowego różnicowania się komórek w procesie spermatogenezy (60×10^6 komórek). Do prawidłowego ejakulatu przyjmuje się odsetek morfologicznie nieprawidłowych komórek poniżej 30%. Wysoki procent morfologicznie prawidłowych plemników nie daje jednak jeszcze szansy dotarcia ich do jajowodu. Bardzo ważnym z andrologicznego punktu widzenia elementem warunkującym zapłodnienie jest zdolność plemników do ruchu postępującego, którą powinno wykazywać ponad 70% gamet w ejakulacie.

Te najważniejsze parametry andrologiczne ejakulatu nie uwzględniają zagadnienia samego wniknięcia plemnika do komórki jajowej oraz późniejszego rozwoju zygoty. W tych zjawiskach decydującą rolę pełnić mogą mechanizmy molekularne. W mechanizmach tych biorą m.in. udział enzymy zawarte w akrosomie plemnika, umożliwiające penetrację plemnika do komórki jajowej. Cykl zmian zachodzących w błonie komórkowej oraz w metabolizmie plemnika, umożliwiający zapoczątkowanie tzw. reakcji akrosomalnej, nosi nazwę kapacytacji i jest procesem odwracalnym w odróżnieniu od samej reakcji akrosomalnej, która zachodzi w sposób nieodwracalny z powodu destrukcji błon biologicznych. Zatem zablokowanie kapacytacji lub reakcji akrosomalnej może być jedną z możliwych dróg uzyskania męskiej antykoncepcji. Z punktu widzenia biologicznego, penetracja plemnika do komórki jajowej nie przesądza jeszcze prawidłowego rozwoju zygoty.

Znane są obserwacje, w których plemnik może wnikać również do komórek somatycznych [9, 71]. Dowodzi to uniwersalnej roli enzymów akrosomalnych w „trawieniu” różnego typu błon biologicznych, jednakże są one tylko jednym z wielu czynników współdecydujących o prawidłowym zapłodnieniu. Kluczowe wydają się substancje mające właściwości antygenów, zakotwiczone prawdopodobnie w błonie komórko-

wej plemnika. Należy rozgraniczyć integralne antygeny błonowe plemnika odziedziczone w wyniku procesu spermatogenezy oraz nabyte (lub zmodyfikowane) w trakcie jego dojrzewania w najądrzu i zaadsorbowane z wydzielin dodatkowych gruczołów męskich dróg wyprowadzających, takich jak: gruczoł krokowy, pęcherzyki nasienne, gruczoły opuszkowo-cewkowe oraz gruczoły cewki moczowej. Antygeny biernie zaadsorbowane na powierzchni plemnika (SCA — sperm coating antigens) utrudniają badania integralnych antygenów błony komórkowej. Ze względu na istnienie wielu zespołów chorobowych o niewyjaśnionej etiologii, objawiających się zahamowaniem dojrzewania nabłonka plemnikotwórczego na różnych etapach różnicowania, postuluje się poznanie antygenów różnicowania spermatogenezy (zespoły te w zasadzie nie poddają się leczeniu). Niemniej badania antygenów cyklu spermatogenezy natrafiają na olbrzymie trudności techniczne.

1. IDENTYFIKACJA ANTYGENÓW UKŁADU ROZRODCZEGO

Omówione zostaną dotychczas wykryte substancje, będące składnikami plemnika. Ponieważ identyfikowano je metodami immunologicznymi, za przykładem innych autorów [50, 135] będą więc nazywane one antygenami.

1.1. ANTYGENY PLEMNIKÓW ZWIERZĄT DOŚWIADCZALNYCH

Biorąc pod uwagę organizację komórkową plemnika, podzielono antygeny na: błonowe (powierzchniowe), akrosomalne, jądrowe, cytoplazmatyczne oraz mitochondrialne.

Antygeny błonowe

Jednym z pierwszych wykrytych antygenów błonowych był autoantygen T świnki morskiej. Antygen T jest integralnym białkiem błonowym [135] o właściwościach aspermatogennych, tzn. po podaniu tego antygeny zwierzętom doświadczalnym obserwuje się zahamowanie spermatogenezy. Najbardziej oczyszczona forma tego antygeny składa się z 5 łańcuchów polipeptydowych, a sam antygen jest prawdopodobnie lipoproteina.

Następne dwa aspermatogenne autoantygeny, znane pod nazwą GPSA I i GPSA IV (GPSA — guinea pig sperm antigen), są obecnie klasyfikowane jako antygeny akrosomalne [41]. Ponadto na błonie akrosomalnej zakotwiczony jest antygen AP1 (AP — acrosomal protein [60]).

Ciekawą próbą charakterystyki rodziny antygenów plemnika świnki

morskiej było zastosowanie monoklonalnych przeciwciał przeciwko różnym topograficznie rejonom błony komórkowej [94]. Wyróżniono 4 rodzaje antygenów oznaczonych jako: 1) antygen części przedniej główki plemnika AH-1 (AH — anterior head), 2) antygen części tylnej główki plemnika PH-1 (PH — posterior head), 3) antygen główki plemnika WH-1 (WH — whole head) oraz 4) antygen witki plemnika PT-1 (PT — posterior tail). Określono ich masę cząsteczkową odpowiednio 52, 60 oraz 42 Kd. Antygen witki plemnika nie został dotąd sprecypitowany, a w związku z tym jego masa cząsteczkowa nie została określona. Sugeruje się specyficzne funkcje tych antygenów związane z ich lokalizacją. I tak błona komórkowa części przedniej główki plemnika ulega podczas reakcji akrosomalnej fuzji z błoną akrosomalną, natomiast błona części tylnej główki plemnika jest miejscem inicjującym kontakt plemnika z komórką jajową i ich późniejszą fuzję.

Podobną regionalizację antygenów zaobserwowano badając antygeny błonowe plemników myszy przy użyciu surowicy króliczej [114] lub szczurzych przeciwciał monoklonalnych przeciwko plemnikom myszy [119]. Fragmenty Fab, uzyskane z surowicy króliczej, hamowały interakcję plemnik-komórka jajowa oraz penetrację plemnika do jaja. Na podstawie ilości sprecypitowanego białka wyróżniono dwie różne rodziny antygenów, zidentyfikowane w żelu poliakryloamidowym. Pierwsza z nich składała się z 4 antygenów o masach: 200, 55-63, 37 i 33 Kd i występowała w dużych ilościach (grube prążki w żelu), druga zaś z 3 antygenów o m.c. 110, 48 i 40 Kd, zaznaczając się słabymi prążkami w żelu. Monoklonalne przeciwciała w badaniach metodą immunofluorescencji wykazały regionalizację tych antygenów w błonie akrosomalnej, na szyjce oraz witce. Dwa spośród uzyskanych przeciwciał identyfikowały integralne antygeny błonowe, dwa pozostałe — antygeny nieintegralne, należące prawdopodobnie do rodziny SCA [119].

Bardzo pouczające były badania funkcji antygenów błonowych plemników, wykonane na plemnikach króliczych. Samicom królika wstrzykiwano ekstrakt plemników uzyskany przez zadziałanie roztworem dwujodosalicylanu litu [86]. Następnie badano płodność królic, po podaniu tego ekstraktu, w porównaniu z płodnością królic kontrolnych (nieimmunizowanych). Stwierdzono zahamowanie zapłodnienia królic immunizowanych ekstraktem, objawiające się brakiem kontaktu plemnik-komórka jajowa oraz ich fuzji. W podobnych eksperymentach, stosując immunizację królic plemnikami pozostałymi po uprzedniej ekstrakcji (tzn. antygenami nie poddającymi się ekstrakcji dwujodosalicylanem litu), stwierdzono zaburzenia płodności, objawiające się zmniejszeniem liczby pomysłnych implantacji zarodków (prawdopodobnie wskutek zahamowania rozwoju zarodków), natomiast nie zauważono zahamowania samego pro-

cesu zapłodnienia komórki jajowej. W związku z tym można sugerować istnienie różnych systemów antygenowych dla kontaktu plemnika z komórką jajową, jej penetracji, późniejszej fuzji oraz rozwoju zarodka. Poszczególne stadia są prawdopodobnie związane z odpowiednimi „wartościami” antygenów plemnika, położonymi na różnej głębokości albo w mniej lub w bardziej trwały sposób zakotwiczonymi w błonie i przez to odpowiedzialnymi za kolejne stadia procesu zapłodnienia.

Użycie monoklonalnych przeciwciał pozwoliło zidentyfikować 3 antygeny plemników króliczych, określone jako RSA-1, RSA-2 i RSA-3 (RSA — rabbit sperm antigen), o masie cząsteczkowej 87, 15 i 13 Kd. Znajdują się one w środkowej części szyjki plemnika, a ich zablokowanie odpowiednimi przeciwciałami monoklonalnymi hamuje penetrację plemników do komórki jajowej chomika chińskiego, pozbawionej osłonki przejrzystej (zona pellucida). Zatem rola tych antygenów wydaje się przypadać na okres przed zapłodnieniem. Przeciwciała identyfikujące te antygeny reagują krzyżowo z plemnikami ludzkimi [101-103]. Interesującym antygenem wydaje się także glikoproteina o masie 63 Kd, zidentyfikowana przez odpowiednie monoklonalne przeciwciała [97, 98], zlokalizowana w główce plemnika. Glikoproteina ta spełnia rolę biologiczną w okresie po zapłodnieniu. Zniesienie jej działania powoduje zahamowanie rozwoju zarodkowego w 9 dniu po zapłodnieniu. Przeciwciało monoklonalne, identyfikujące ten antygen, nie aglutynuje plemników ani ich nie immobilizuje, natomiast krzyżowo reaguje z plemnikami ludzkimi.

Antygenem o znacznie szerszym spektrum działania jest antygen sprecypitowany z mysiej linii komórkowej F9 (F9 — teratocarcinoma embryonale), obecny na plemnikach oraz wczesnych zarodkach [132]. Składa się on z łańcuchów polipeptydowych o m.c. 44 i 22 Kd, często sprzężona z nimi jest cząsteczka o masie 12 Kd. Blokowanie tego antygeny powoduje zahamowanie rozwoju zarodka.

Antygeny cytoplazmatyczne

Jednym z najlepiej poznanych antygenów cytoplazmatycznych jest dehydrogenaza mleczanowa, LDH-X, o właściwościach auto- i izoantygenu (izoantygen — antygen wzbudzający odpowiedź immunologiczną u innych osobników tego samego gatunku, genetycznie różnych). LDH-X jest enzymem o m.c. 140 Kd i składa się z czterech podjednostek C, różniących się od podjednostek A i B występujących w izoenzymach LDH w komórkach somatycznych [33]. Interesującą cechą LDH-X jest jego zdolność do wykorzystywania szerokiej gamy substratów, co pozwala na stabilną regulację poziomu pirogronianów, mimo zmieniającego się środowiska tlenowego w trakcie wędrówki plemnika [33, 49]. Aczkolwiek

LDH-X jest zarówno enzymem wewnątrz-, jak i pozamitochondrialnym, w znacznej większości jest on zlokalizowany w cytoplazmie [36, 52, 126]. W plemnikach królika 90% tego enzymu występuje poza mitochondriami [126]. LDH-X w mysich spermatocytach i spermatach występuje głównie w cytoplazmie [52]. Podczas spermatogenezy LDH-X pojawia się dopiero w spermatocytach pierwszego rzędu, po czym występuje już na wszystkich pośrednich etapach różnicowania, aż do dojrzałego plemnika [52, 83].

Enzymami specyficznymi dla cytoplazmy plemnika są również izoenzymatyczne odmiany heksokinazy, kwaśnej fosfatazy oraz dehydrogenazy sorbitolowej [36].

Antygeny mitochondrialne

Jedynym znanym antygenem mitochondrialnym, specyficznym dla męskiego układu rozrodczego, jest cytochrom c opisany u myszy jako c_t — cytochrom jądra (testis) [38, 51]. Cytochrom c_t nie występuje nigdy poza komórkami rozrodczymi [38]. Wyizolowany z jądra (testis) różni się od swojego odpowiednika w komórkach somatycznych 13 spośród 104 aminokwasów. W cyklu spermatogenezy cytochrom c_t pojawia się najwcześniej w mitochondriach spermatocytów pierwszego rzędu, występując podczas różnicowania się we wszystkich późniejszych stadiach komórek rozrodczych. Ewidentna korelacja związana z pojawieniem się aktywności cytochromu c_t z jednoczesną zmianą morfologii mitochondriów w trakcie spermatogenezy może być interesującą przesłanką do dalszych badań. Auto- i izoantygenowość cytochromu c_t nie były dotąd szczegółowo badane.

1.2. ANTYGENY PLEMNIKÓW LUDZKICH

Antygeny błonowe

W badaniu antygenów plemników ludzkich wystąpiły poważne trudności w uzyskiwaniu monoklonalnych przeciwciał, spowodowane przede wszystkim obecnością na powierzchni plemnika zaadsorbowanych antygenów płynu nasiennego (SCA). Uzyskiwane przeciwciała w większości przypadków nie rozpoznawały lub nie wykazywały zadowalającego powinowactwa do antygenów integralnych plemnika, co z kolei w znacznym stopniu ograniczało możliwości identyfikacji antygeny metodami immunochemicznymi. Pierwsze więc informacje dotyczące antygenów błonowych plemnika pojawiły się dzięki użyciu przeciwciał o właściwościach aglutynujących lub immobilizujących plemniki od pacjentów nie-

plodnych na podłożu immunologicznym. Interesujący cykl badań wykonany przez grupę Hjorta i Poulsena [53, 54, 109, 110] wykazał istnienie autoantygeny o m.cz. ponad 150 Kd, składającego się z 6 łańcuchów polipeptydowych o m.cz. 21, 32 i 41 Kd, dwóch łańcuchów o m.cz. 77 Kd oraz jednego o m.cz. 120 Kd. Antygen ten został zidentyfikowany immunochemicznie za pomocą surowicy o właściwościach aglutynacyjnych w stosunku do plemników. Ponadto przeprowadzono próbę korelacji między surowicami powodującymi różne typy aglutynacji a występowaniem dotychczas wykrytych łańcuchów polipeptydowych antygeny. Wyodróżniono 4 podstawowe typy aglutynacji plemników: 1) główka do główki, 2) witka do witki, 3) końcowa część witki do końcowej części witki oraz 4) mieszany. Surowice od niepłodnych pacjentów powodują zaś zwykle jeden charakterystyczny typ aglutynacji, w rzadszych przypadkach dwa lub więcej. Badając właściwości wyselekcjonowanych surowicy według typu spowodowanej aglutynacji stwierdzono jednak, że każda z surowicy „rozpoznaje” pełen zestaw uprzednio wykrytych łańcuchów polipeptydowych, składających się na ten sam autoantygen (z wyjątkiem aglutynacji końcowa część witki do końcowej części witki). Wydaje się więc, że naturalnie występujące przeciwciała w surowicach niepłodnych pacjentów, klasyfikowane według typu powodowanej przez nie aglutynacji, nie mogą być przydatne do dalszych badań antygenów błonowych plemnika ze względu na to, że identyfikują one zwykle tylko jeden antygen.

Ze względu na obecność SCA na powierzchni plemnika, wiele wysiłków zmierzających do uzyskania monoklonalnych przeciwciał przeciwko integralnym białkom błonowym plemnika doprowadziło do identyfikacji właśnie tych antygenów SCA i otrzymania przeciw nim przeciwciał [76, 107, 121]. Przeciwciała te były pozbawione zdolności aglutynacyjnych.

Badania metodą immunofluorescencji przy użyciu ostatnio uzyskanego przeciwciała monoklonalnego przez Yan i wsp. [141] przyniosły odkrycie nieznanego antygeny o m.cz. 84 Kd, zlokalizowanego w środkowej części szyjki plemnika oraz na witce. Białko to jest prawdopodobnie integralnym składnikiem błony, a dołączenie się do niego przeciwciała powoduje aglutynację plemników, natomiast w zasadniczy sposób nie hamuje ich ruchliwości. Całkowicie inną funkcję wydają się pełnić uprzednio wspomniane antygeny plazmy nasiennej, biernie zaadsorbowane na powierzchni plemnika [58, 121], zidentyfikowane przez przeciwciała monoklonalne o właściwościach immobilizujących. Do takich antygenów należą białko o m.cz. 15 Kd [58].

Niewątpliwie ciekawym spostrzeżeniem było zidentyfikowanie innego antygeny błony plemnika za pomocą niedawno uzyskanego przez Naz i wsp. [96] przeciwciała monoklonalnego, które nie ma ani właściwości

aglutynujących, ani immobilizujących. Przeciwciało to identyfikuje antygen o m.cz. 23 Kd, zlokalizowany w części postakrosomalnej plemnika, środkowej części szyjki oraz na witce. Blokowanie monoklonalnym przeciwciałem tej glikoproteiny (identycznej z glikoproteiną uzyskaną z tkanki jądra) hamowało penetrację przez ludzkie plemniki komórki jajowej chomika chińskiego, pozbawionej osłonki przejrzystej. Ponieważ przeciwciało to reagowało krzyżowo z plemnikami myszy, przeprowadzono więc analogiczne badania z użyciem mysich plemników i komórki jajowej z utrzymaną osłonką przejrzystą. Przeciwciało to, opłaszczając plemniki mysie, hamowało również zapłodnienie komórki jajowej, co dowodzi, że antygen wykryty przez to przeciwciało jest odpowiedzialny za interakcję plemnika z komórką jajową i może być kluczowym komponentem prawidłowej reakcji akrosomalnej. Istnieją dowody, że przeciwciała uzyskane od wielu niepłodnych na tle immunologicznym pacjentów, silnie reagują z tym właśnie antygenem.

Konferencja dotycząca identyfikacji i klasyfikacji dotychczas uzyskanych przeciwpłomnikowych przeciwciał monoklonalnych, zorganizowana przez Światową Organizację Zdrowia (Toronto 1986), doprowadziła do wyodrębnienia innego interesującego przeciwciała, zakodowanego pod nazwą H316, które wydaje się wiązać do akrosomu ludzkiego plemnika tylko po uprzedniej kapacytacji i w ten sposób może być bardzo pożyteczną sondą oceniającą proces kapacytacji plemnika [4].

Innym wnioskiem z tej Konferencji są dane wskazujące, że większość wykrytych błonowych antygenów plemnika może ulegać ograniczonej ekspresji również na innych tkankach, jak np. wczesnego zarodka [85, 123], łożyska [4, 10], jajnika [85], limfocytów T [81], mózgowej [123] oraz różnych tkankach nowotworowych [2].

Antygeny jądrowe główki plemnika

Stosunkowo wiele substancji jądrowych, takich jak histony, kompleksy histonów z DNA, samo DNA itd., może spełniać funkcje autoantygenów. Zwykle obserwuje się pojawienie przeciwciał przeciw tym antygenom w chorobach powstałych na tle autoimmunologicznym. Jednakże antygeny te są wspólne dla większości komórek, w tym także i dla plemników [55]. Ponadto plemniki mają również inne specyficzne antygeny jądrowe. Są one syntetyzowane w trakcie spermiogenezy, kiedy występuje formowanie się ostatecznego kształtu główki dojrzałego plemnika. Najlepiej poznanymi substancjami jądrowymi, specyficznymi dla plemników, są silnie zasadowe białka zwane protaminami. Protaminy występują w plemnikach ryb, ptaków oraz ssaków z człowiekiem łącznie [117]. Wiązania krzyżowe między tymi białkami (za pośrednictwem mostków dwusiarczkowych) nadają stabilność jądra plemnika [69].

Substancje białkowe, wyodrębnione z jąder ludzkich plemników, noszą nazwę protaminy 1 oraz protaminy 2 i są swoiste tylko dla komórek rozrodczych [116]. Ich masa cząsteczkowa wynosi odpowiednio 6,3 i 7,7 Kd. Składają się one odpowiednio z 47 oraz 51 aminokwasów. Białka te mają charakterystyczny skład aminokwasów, są bogate w reszty argininy i cysteiny oraz są nierozpuszczalne w SDS (SDS — sodium dodecyl sulphate, tj. sól sodowa siarczanu dodecyłu I) [69]. Kolk i Samuel sugerują wysoką swoistość protamin na tej podstawie, że przeciwciała skierowane przeciwko nim nie reagują krzyżowo z histonami zawartymi w jądrze. Przeciwciała przeciwko protaminom, uzyskane z surowic osobników niepłodnych na tle immunologicznym, wykrywane są metodą immunofluorescencji jako przeciwciała towarzyszące u osobników posiadających w wysokich mianach przeciwciała skierowane przeciwko antygenom błonowym. Stąd znaczenie przeciwciał przeciwprotaminowych w diagnostyce niepłodności lub ewentualnej immunoantykoncepcji jest bardzo ograniczone.

1.3. ANTYGENY AKROSOMALNE A ANTYKONCEPCJA IMMUNOLOGICZNA

Enzymy swoiste dla komórek rozrodczych, jak LDH-X (zaliczany do antygenów cytoplazmatycznych), hialuronidaza oraz akrozyna, były historycznie pierwszymi antygenami, które starano się wykorzystać do celów immunologicznej antykoncepcji.

Hialuronidaza o masie cząsteczkowej ok. 60 Kd jest zarówno izo-, jak i autoantygenem [91, 142]. Występuje w jądrze (testis) w bardzo licznych odmianach, stąd też znaczne rozbieżności w ustaleniu dokładnej masy cząsteczkowej. Aktywność antyhialuronidazowa obserwowana była w surowicach mężczyzn z podwiązanyymi nasieniowodami [88]. Jednakże izo- i autoprzeciwciała wykazywały inhibicyjne właściwości wobec form uzyskanych z jądra (testis), a nie komórkowych tego enzymu. Ponadto przeciwciała przeciwko hialuronidazie są wysoce swoiste gatunkowo [87], z wyjątkiem kozy i owcy, mających przeciwciała wspólne [88]. Aktywność hialuronidazy występuje w granicach pH 2-pH 8, a maksimum aktywności przypada na pH 4,5 [91]. Hamowanie działania hialuronidazy występuje poprzez tworzenie kompleksów antygen—przeciwciało blokujących interakcję enzym—substrat. Przy mniejszych pH, tworzenie kompleksów antygen—przeciwciało jest znacznie utrudnione. Ponieważ optimum działania tego enzymu występuje przy mniejszych pH, wartość więc tych przeciwciał, jako czynnika antykoncepcyjnego, jest mała. W trakcie spermatogenezy hialuronidaza pojawia się równocześnie z wytworzeniem akrosomu. Precyzyjne określenie lokalizacji hialuronidazy

przedstawia duże trudności. Obecnie sugeruje się, że jest ona związana z zewnętrzną i wewnętrzną błoną akrosomu [91, 104].

Akrozyna — enzym podobny do trypsyny, ma m.c.z. ok. 38 Kd i optimum aktywności w granicach pH 8,0-8,5 [14, 84]. Akrozyna jest izoantygenem [88], jednak przeciwciała przeciwko akrozyinie reagują również krzyżowo z innymi substancjami [91], co przemawia przeciw klasyfikowaniu akrozyny jako swoistego autoantygeny. Ponadto w akrosomie plemnika występują esterazy, fosfolipazy, neuraminidaza, beta-N-acetylglukozaminidaza oraz sulfataza arylowa.

Jak już wspomniano, najszerzej stosowanym do celów antykoncepcji immunologicznej był izoenzym LDH-X (LDH—C₄). Jego dostępność w sensie ilościowym pozwoliła na oczyszczenie go w formie krystalicznej, jak również określono już jego sekwencję aminokwasów [33]. Obecne badania skierowane są na uzyskanie syntetycznego łańcucha polipeptydowego, indukującego odpowiedź immunologiczną [138]. Reszty aminokwasowe LDH—C₄ myszy od 152 do 159 zawierają unikatową determinantę antygenową, eksponowaną na powierzchni natywnej cząsteczki [40]. Do celów immunoantykoncepcji stosowane są również reszty aminokwasowe od 5 do 16 oraz od 211 do 222.

We wcześniejszych badaniach wykazano, że immunizacja samic królika oraz myszy enzymem LDH—C₄ spowodowała u nich znaczne zmniejszenie liczby ciąży [34, 35]. Podobny wynik dawała immunizacja samic pawiana [39]. Mechanizm antykoncepcyjnego działania polegał na wystąpieniu w jajowodach przesieku surowiczego, zawierającego przeciwciała powodujące aglutynację plemników lub ich lizę z udziałem komplementu [67, 68]. Cykl owulacyjny nie był zakłócony, jak również nie zaobserwowano efektów ubocznych. Antykoncepcyjny sukces immunizacji samic pawianów LDH—C₄ występował tylko w przypadku wysokiego miana przeciwciał skierowanych przeciwko temu enzymowi. Zaprzestanie immunizacji powodowało zmniejszanie się miana przeciwciał, w wyniku czego dochodziło do zapłodnienia samic, które następnie rodziły zdrowe potomstwo. Wyniki te dowodzą, że unieczynnianie LDH—C₄ może zapobiegać zapłodnieniu u naczelnych, a efekt ten jest nietoksyczny i odwracalny [39]. Krytycy tego postępowania podkreślają, że nie osiągnięto ono nigdy wymaganego dla antykoncepcji poziomu, tj. zahamowania płodności w 95-100%. W tej sytuacji prowadzone są badania nad optymalizacją immunizacji samic LDH—C₄ poprzez ustalenie optymalnej dawki antygeny, stosowania odpowiednich adiuwantów, drogi oraz schematu szczepienia.

Podobny był efekt częściowego hamowania płodności w przypadku immunizacji owiec akrozyną. Efekt ten zaobserwowano raczej w przypadku częściowo, a nie całkowicie oczyszczonego preparatu akrozyny

[92], co może sugerować zanieczyszczenie badanego preparatu innymi substancjami. Królicze fragmenty przeciwciał Fab, skierowane przeciw owczej akrozyinie, hamowały aktywność enzymu w stosunku do jednych substratów przy zachowaniu aktywności wobec innych. Pomimo utrzymywania wysokiego miana przeciwciał (powodującego także aglutynację plemników), nie uzyskano znaczącego zahamowania płodności samic i z pewnością nie można wobec tego oczekiwać 100% bezpłodności samic poprzez uczulanie akrozyiną.

Hamowanie aktywności hialuronidazy do celów antykoncepcji było przedmiotem badań w znacznie większym zakresie niż akrozyiny. Przeciwciała skierowane przeciw hialuronidazie królika hamowały rozluźnianie komórek wzgórka jajonośnego, jak również zapłodnienie *in vitro* [87, 88]. W przypadku królic immunizowanych oczyszczoną hialuronidazą nie uzyskano znaczącego obniżenia współczynnika płodności [88]. Negatywne były również wyniki badań przeprowadzonych w układzie modelowym z owcą.

Lokalizacja w plemniku trzech już tu omówionych enzymów zdaje się wskazywać na ich rolę w poszczególnych fazach procesu zapłodnienia. Zasłonięte błoną komórkową plemnika antygeny te mogą stać się celem dla przeciwciał w stosunkowo ograniczonym przedziale czasowym (aczkolwiek zaobserwowano występowanie naturalnych przeciwciał przeciw LDH—C₄ w surowicy krwi [120]). Zwłaszcza zaś akrozyina i hialuronidaza, związane z błonami akrosomalnymi (w większym stopniu z wewnętrzną błoną akrosomalną), są do czasu kapacytacji lub nawet reakcji akrosomalnej niedostępne dla przeciwciał. Stąd do osiągnięcia immunoantykoncepcji konieczne są bardzo wysokie miana przeciwciał przeciw tym enzymom w żeńskich drogach rozrodczych.

1.4. ANTYGENY DOJRZEWANIA PLEMNIKÓW

Etapy dojrzewania plemników rozpatrywano w poszczególnych regionach najądrza, ułatwiających obserwacje kolejno pojawiających się antygenów. Badania te były prowadzone u barana. Pierwsza faza dojrzewania plemników (głowa najądrza) charakteryzowała się rozległą transformacją powierzchni plemnika, na którą składały się: 1) zanik większych białek powierzchniowych o m.c.z. od 78 do 119 Kd, charakterystycznych dla plemników jądrowych; 2) pojawienie się nowych przejściowych komponentów o m.c.z. 50 Kd oraz trwałych o m.c.z. 97 Kd; 3) zwiększenie ekspresji kilku komponentów o mniejszych m.c.z., tj. 65, 32 i 17 Kd, będących pierwotnymi antygenami plemników jądrowych. Proces rozwojowy plemników barana jest dość szybki. Czas ich wędrówki przez głowę najądrza trwa 2 dni, natomiast czas wędrówki przez całe

najądrze około 12-15 dni [105]. W drugim regionie topograficznym (trzon najądrza) zachodzi faza przejściowa dojrzewania plemników. Nadal obecne są na nich komponenty o m.cz. 32 i 17 Kd i w zasadzie brak danych o pojawianiu się nowych lub utracie dawnych komponentów.

Plemniki znajdujące się w ogonie najądrza miały jako dominujące antygeny o m.cz. 97, 65 i 41 Kd. Jednocześnie pojawił się nowy komponent o m.cz. 24 Kd. Zatem wydaje się, że najbardziej rozległa transformacja plemników zachodzi w obrębie głowy najądrza. Zmiany te mają poważne konsekwencje funkcjonalne. Fakt, że w odróżnieniu od plemników jądrowych zarówno metabolizm, jak i ruchliwość plemników z głowy najądrza mogą być stymulowane przez inhibitory fosfodiesterazy, wskazuje na możliwą zależność tych procesów od stężenia cAMP w plemnikach najądrzowych, przy braku takiej zależności w stosunku do plemników jądrowych. Stanowi to zasadniczą różnicę między plemnikami najądrzowymi a jądrowymi, związaną z ich dojrzewaniem [17].

W głowie najądrza i częściowo w jego trzonie plemniki nabywają w ok. 60-90% receptory dla immunoglobulin. Inne zmiany funkcjonalne, które odbywają się w tym samym rejonie topograficznym najądrza, to zwiększenie ruchliwości plemników [18], możliwość wystąpienia aglutynacji plemników typu główka do główki [18] oraz możliwość aglutynacji indukowanej lektynami [46].

Układ białek powierzchniowych plemników znajdujących się w ogonie najądrza jest jakościowo nie zmieniony. Obserwuje się zwiększenie ekspresji podstawowych komponentów o m.cz. 97, 65, 41 i 24 Kd, co koreluje z wystąpieniem ruchu postępującego plemników [1, 18].

Sugeruje się kilka mechanizmów odpowiedzialnych za zmiany antygenowości plemników najądrzowych obejmujących adsorpcję, przegrupowanie, proteolizę oraz internalizację białek [8, 44, 56, 100, 134]. Podnosi się również rolę glikozylacji istniejących, natywnych białek powierzchniowych plemnika, co może powodować rozległe modyfikacje powierzchni komórki [45], obejmujące wyraźną zmianę ekspresji białka o m.cz. 97 Kd.

Nadal jednak ogromną rolę w zmianach antygenowości powierzchni plemnika przypisuje się adsorpcji komponentów białkowo-cukrowych. Zjawisko to stwierdzano u kilku gatunków, tj. u szczura, chomika, królika, knura i barana [21, 66, 90, 118, 133, 134], przy jednoczesnym wykazaniu syntezy i sekrecji glikoprotein przez nabłonek najądrzowy myszy [29], szczura [31], królika [63, 90] i knura [13, 118]. W skład frakcji glikoproteinowej u szczura wchodzi następujące reszty cukrowe: 19% D-mannozy, 3% D-galaktozy, 33% n-acetylo-D-glukozaminy, 31% kwasu n-acetylo-neuraminowego oraz 13% D-glukozy. Wysoka zawartość D-glukozy, ze względu na rzadkie występowanie w połączeniu z białkami, pozwala traktować tę cechę jako charakterystyczną dla glikopro-

tein wydzielanych przez nabłonek najądrza. Stwierdzono, że synteza glikoprotein najądrzowych podlega regulacji poprzez hormony androgenne [15, 16].

Obecność antygenów plemnika, pojawiających się najczęściej dopiero w najądrzu, potwierdzono ostatnio za pomocą odpowiednich monoklonalnych przeciwciał [28], które skierowane były przeciw antygenom plemników myszy tego samego szczepu wsobnego. Powierzchniowe antygeny wykrywano, używając plemników z trzonu najądrza. Antygeny te nie miały odpowiedników na powierzchni plemników jądrowych. Trzy spośród uzyskanych monoklonalnych przeciwciał wykrywały antygeny główki plemnika. Sugeruje to, że przynajmniej jedno z nich wykrywało antygen części przedniej akrosomu, który może być rozpoznawany przez receptor na komórce jajowej lub bierze udział w reakcji akrosomalnej. Czwarte monoklonalne przeciwciało rozpoznawało antygen zlokalizowany na witce (SMA-4: sperm monoclonal antibody), odgrywający prawdopodobnie rolę w procesach związanych z ruchliwością plemnika.

Reasumując, istnieje wiele dowodów, że antygeny powierzchniowe plemnika, nabywane w trakcie jego dojrzewania, nie są strukturalnie tymi samymi białkami, które zostają wydzielane w środowisku jądrowym lub w najądrzu. Istniejące dane dowodzą nie tylko rozległej adsorpcji, ale i intensywnej modyfikacji komponent powierzchniowych plemników. Obecnie trwają badania nad ustaleniem sekwencji aminokwasów tych białek, mogące wyjaśnić fundamentalne zagadnienie dotyczące dojrzewania najądrzowego oraz „nabywania” antygenów opłaszczających plemniki (SCA). Tym ostatnim przypisywano jak dotąd tylko właściwości maskujące antygeny integralne plemnika, nie zaś faktyczny udział w procesie zapłodnienia.

1.5. ANTYGENY SPERMATOCYTÓW, SPERMATYD ORAZ INNYCH KOMÓREK TKANKI JĄDRA

Stosunkowo mało informacji dotyczących antygenów różnicowania komórek cyklu spermatogenezy spowodowane jest znacznymi trudnościami technicznymi. Aby uzyskać np. tradycyjną poliwalentną surowicę skierowaną przeciwko danemu stadium zróżnicowania komórki w czasie spermatogenezy, należy uczulić zwierzę doświadczalne frakcją jednorodnych komórek tego stadium. Od dawna frakcjonowanie komórek szeregu spermatogenezy było przedmiotem wielu prób i jeżeli w przypadku innych ssaków (niestety nie u człowieka) uzyskano pewien postęp, to dzięki następującym czynnikom. Po pierwsze: możliwość uzyskania praktycznie nieograniczonej ilości materiału biologicznego; po drugie: synchronizacja danego stadium spermatogenezy w obrębie danego kanalika plemnikotwórczego. U człowieka bardzo ograniczona jest

możliwość uzyskania przyżyciowego gonad (tylko w wyniku nielicznych form terapii, jak np. w operacyjnym leczeniu raka gruczołu krokowego), ponadto brak jest synchronizacji fali spermatogenetycznej w obrębie kanalik plemnikotwórczego. Powoduje to uzyskanie bardzo niejednorodnej mieszaniny komórek rozrodczych z danego fragmentu tkanki.

Opierając się na badaniach komórek spermatogenezy u szczura [130] i świnki morskiej [129], możemy podzielić antygeny różnicowania komórek rozrodczych na trzy podgrupy: antygeny wczesnych stadiów różnicowania dotyczące szczególnie spermatocytów I rzędu w pachytenie, zanikające na etapie spermatydy; antygeny pojawiające się w stadium spermatocyta I rzędu w pachytenie i obecne we wszystkich etapach różnicowania, aż do dojrzałego plemnika (np. opisany w poprzednim rozdziale antygen królika RSA 1) oraz antygeny pojawiające się w późnym etapie różnicowania (spermatydy). Przyjmuje się, że antygeny powstające w środkowej fazie spermiogenezy są szczególnie związane z akrosomem plemnika, wyodrębniającym się na tym etapie, wchodząc na trwałe w skład antygenów komórki rozrodczej.

Interesujące badania wykonano na komórkach spermatogenezy myszy, stosując elektroforezę dwukierunkową dla identyfikacji antygeny na podstawie powinowactwa antygeny od określonych lektyn. Wykryto 4 glikoproteiny o powinowactwie do lektyny z rośliny *Bandeiraea simplicifolia* o m.c. od 55 do 76 Kd oraz w punkcie izoelektrycznym (pI) od 6,0 do 6,3. Zidentyfikowano też ok. 20 glikoprotein powierzchniowych o m.c. od 50 do 151 Kd oraz pI 5,7 do 7,0 o powinowactwie do konkanawaliny A (Con A). Białko o m.c. 151 Kd oraz pI 6,0 zlokalizowano na błonie komórkowej zarówno spermatocytów w pachytenie, jak i kulistych spermatyd. Wykazano też, że glikoproteina ta występuje na zewnętrznej powierzchni błony komórkowej komórek spermatogenezy i może pośredniczyć w interakcjach komórkowych zachodzących między komórkami rozrodczymi i komórkami podporowymi (Sertoliego). Ponadto wyodrębniono dwa składniki błony komórkowej komórek rozrodczych, które uważa się obecnie za markery swoiste dla danego etapu spermatogenezy, tj. białko o m.c. 73 Kd i pI 5,7 wykryte na powierzchni pachytenowych spermatocytów oraz specyficzne dla kulistych spermatyd białko o m.c. 84 Kd i pI 6,3 [89]. Stosując surowicę króliczą, skierowaną przeciw komórkom spermatogenezy myszy z okresu przedpokwitaniowego, zidentyfikowano składnik białkowy błony komórkowej o m.c. 39 Kd, obecny na komórkach spermatogenezy myszy 17-dniowej, tzn. na spermatocytach I rzędu w preleptotenie, leptotenie, zygotenie i wczesnym pachytenie, przy braku jego występowania u 8-dniowych myszy na komórkach podporowych i spermatogoniach [99].

Interesujące wyniki dotyczące struktur powierzchniowych komórek spermatogenezy myszy uzyskano za pomocą monoklonalnych przeciwciał skierowanych przeciw tym komórkom, które roboczo oznaczono J1, C6 i A5. Po potraktowaniu tych komórek sialidazami, przeciwciała C6 i A5 rozpoznawały antygeny spermatocytów I rzędu w preleptotenie, leptotenie i zygotenie. Wiązanie przeciwciała J1 do komórek rozrodczych jądra hamowane było swoiście przez N-acetyloglukozaminę, a wiązanie C6 i A5 przez N-acetylolaktozaminę. Uzyskane wyniki wskazują na obecność polilaktozamin (keratan) zasocjowanych z błonami komórkowymi mejotycznych oraz haploidalnych komórek spermatogenezy. Ponadto stwierdzano wyraźne zmiany ilościowe i jakościowe reszt kwasu sialowego na powierzchni błony komórkowej, towarzyszące różnicowaniu komórek od wczesnych etapów profazy mejotycznej do spermatocytów I rzędu w pachytenie [25].

Identyfikacja antygenów spermatogenezy ludzkiej za pomocą elektroforezy dwukierunkowej doprowadziła do wyodrębnienia swoistości gatunkowej antygenów spermatocytów I rzędu w pachytenie myszy i człowieka, swoistości allotypowej (różnic antygeny między różnymi osobnikami tego samego gatunku) oraz antygenów swoistych dla danego etapu spermatogenezy [95]. Polipeptydy dla ludzkich spermatocytów charakteryzowały się m.c. 45 Kd i pI 5,9 oraz 67 Kd i pI 5,2, natomiast w spermatocytach myszy występował komponent 65 Kd o pI 5,5. Poszukując różnic allotypowych za pomocą elektroforezy, wykazano ok. 90% homologii dla antygeny 65 Kd (pI 5,5) oraz niektóre znacznie różniące się allotypy w obrębie białka 45 Kd (pI 5,9); ponadto wykazano, że białko to jest swoiste dla spermatocytów.

Niestety, wszystkie opisane już tu antygeny (za wyjątkiem RSA 1) nie zostały dotąd scharakteryzowane funkcjonalnie. Badania zasługują jednak na uwagę ze względu na ich fundamentalne znaczenie dla poznania procesu spermatogenezy, a w dalszym aspekcie również jej regulacji.

Antygen H-Y

Dla zidentyfikowania antygeny H-Y, występującego na gonadach, posłużono się linią komórek Daudi (komórki chłoniaka Burkitta), charakteryzującą się stałą syntezą i sekrecją antygeny H-Y. Antygen ten zidentyfikowano jako polimer kilku podjednostek o m.c. 18 Kd, połączonych międzylańcuchowymi mostkami dwusiarczkowymi [59]. Łączenie się tego antygeny (w formie polimeru) z miejscami receptorowymi na błonie komórkowej niezróżnicowanych, embrionalnych komórek

gonad u bydła o kariotypie XX [59] powoduje przedwczesne różnicowanie gonad. Pseudotetraploidalna linia komórkowa Daudi wydziela także zmienioną formę podjednostek o m.cz. 18 Kd. Podjednostki te wiążą się w polimery tracą właściwości wiązania receptora gonadalnego. Niemniej, podjednostki te wiązały przeciwciała skierowane przeciwko antygenowi H-Y.

1.6. ANTYGENY NARZĄDOWO NIESWOISTE KOMÓREK ROZRODCZYCH

Istnieje wiele kontrowersyjnych wyników dotyczących ekspresji antygenów zgodności tkankowej na komórkach rozrodczych, ich możliwej roli w procesie zapłodnienia oraz udziału w interakcji zachodzącej między płodem a organizmem matki jako tkanek odmiennych genetycznie. U myszy, stosując różne metody, wykazano obecność antygenów zgodności tkankowej na plemnikach [22, 37, 136]. Ponadto wykazano obecność tych antygenów na komórkach spermatogenezy od stadium spermatocyta I rzędu [24] oraz ich brak na spermatogoniach [137]. Jedynym zastrzeżeniem, jakie nasuwa się wobec wyników stwierdzających obecność tych antygenów, jest fakt niemożności ich wykazania metodą immunoprecypitacji, która zwykle stanowi ostateczny i jednoznaczny dowód doświadczalny na obecność danego antygeny [131].

Interpretacja badań ekspresji antygenów HLA na plemnikach ludzkich jest bardziej skomplikowana. Niektórzy autorzy donoszą konsekwentnie o obecności antygenów HLA [7, 23, 26, 27, 42, 43], wobec braku jednoznacznego potwierdzenia z innych ośrodków zajmujących się tym problemem [3, 73, 75]. Ostatnie wyniki wskazują raczej na brak ekspresji antygenów HLA na komórkach spermatogenezy człowieka [5, 70, 72]. W związku z tym doniesienia o obecności tych antygenów na plemnikach ejakulatowych powinny być bardzo ostrożnie interpretowane. Brak powtarzalności wyników w badaniach dotyczących plemników uzyskanych z różnych ejakulatów tego samego osobnika dowodzi raczej możliwości biernej adsorpcji antygenów HLA w trakcie dojrzewania lub wędrówki plemników w drogach wyprowadzających męskich. Pozytywne wyniki, uzyskane na niedojrzałych komórkach rozrodczych od niepłodnych osobników (azoospermia), dowodzą raczej nieprawidłowego procesu różnicowania spermatogenezy [73].

Podobnie interpretuje się wyniki dotyczące ekspresji antygenów grupowych ABO krwi na plemnikach ludzkich. Zwiększa się możliwość adsorpcji przez plemniki antygenów A i B, obecnych w płynie nasennym u osobników wydzielających te antygeny, do płynów ustrojowych. Jak dotąd nie udowodniono obecności antygenów grupowych krwi jako natywnych składników błony komórkowej plemnika [50].

2. DOZÓR IMMUNOLOGICZNY USTROJU A ANTYGENY KOMÓREK ROZRODCZYCH

2.1. TOLERANCJA IMMUNOLOGICZNA WOBEC ANTYGENÓW KOMÓREK ROZRODCZYCH

Ocenia się, że spośród potencjalnej liczby różnicujących się komórek spermatogenezy tylko 20% całkowitej liczby plemników opuszcza jądro, a pozostałe oraz cytoplazma resztkowa (pozostałość po cytoplazmie spermatyd, zawierająca także autoantygeny plemnikowe) są resorbowane przez nabłonek plemnikotwórczy [64, 65]. W związku z tym musi istnieć skuteczny mechanizm zapobiegający reakcji immunologicznej przeciwko znacznej ilości autoantygenowych produktów resztkowych spermatogenezy. Funkcję prewencyjną w tym przypadku zapewnia bariera krew-jądro, której nieodzowną składową stanowią komórki podporowe. Komórki te, mające udział w tworzeniu bariery krew-jądro, mają ponadto właściwości fagocytozy i degradacji plemników czy cytoplazmy resztkowej, jak również wydzielają białka, które prawdopodobnie mają właściwości immunoregulacyjne [122].

Aczkolwiek naczynia krwionośne włosowate jądra nie mają budowy okienkowej, to jednak zachodzi przez nie aktywny transport immunoglobuliny G. Między kanalikami nasiennymi leżą liczne naczynia krwionośne, komórki śródmiąższowe jądra (Leydiga), makrofagi, komórki tuczne i plazmatyczne. Stosunek komórek śródmiąższowych do makrofagów wypłukiwanych z tkanki jądra drogą perfuzji wynosi 4 : 1. Krążące limfocyty osiągają tkankę śródmiąższową jądra przechodząc następnie do lokalnej sieci limfatycznej, skąd przeciwciała oraz krążące limfocyty z łatwością mogą przejść do tkanki śródmiąższowej jądra [128].

Stwierdzono znaczne ilości białek w osoczu krwi oraz limfy jądra, natomiast bardzo niskie stężenia białek w tzw. płynie sieci jądra. Kanaliki plemnikotwórcze u większości gatunków otoczone są miofibroblastami tworzącymi błonę graniczną. Komórki te służą jako częściowa bariera dla dużych cząsteczek u szczura i świnki morskiej, ale nie u naczelnych. U szczura w ponad 80% komórek mioidalnych występują obwódkowe połączenia międzykomórkowe, które tworzą pewnego rodzaju barierę dla dużych cząsteczek, co stwierdzano badając przepuszczalność dla lantanu. Warstwa komórek mioidalnych u świnki morskiej stanowi również barierę dla dużych cząsteczek (np. koloidowy węgiel lub dwutlenek toru), pozostając przepuszczalna dla małych cząsteczek (np. ferrytyna). Przeciwciała klasy IgG, skierowane przeciwko antygenom błony podstawnej, wiążą się z błoną podstawną otaczającą sieć jądra, gdzie brak jest komórek mioidalnych, natomiast nie wiążą się z błoną podstawną otaczającą kanaliki nasieniowórcze [128].

Najbardziej szczerłą część bariery między krwią a światłem kanali-

ków naseniotwórczych tworzą komórki podporowe dzięki licznym wypustkom łączącym poszczególne komórki. Dym i Fawcett [19] podzielili ścianę kanalika na dwa przedziały:

1) przypadawny, zawierający spermatogonie i preleptotenowe spermatocyty

2) przyśrodkowy, zawierający bardziej dojrzałe postacie komórek rozrodczych (oddzielone wypustkami komórek podporowych).

Kiedy migrujące spermatocyty przechodzą do przestrzeni przyśrodkowej, komórki podporowe tworzą między sobą natychmiast nowe połączenia, zanim jeszcze dojdzie do całkowitego zaniknięcia poprzednich. W ten sposób wszystkie stadia komórkowe spermatogenezy, za wyjątkiem spermatogonii i preleptotenowych spermatocytów, oddzielone są od przestrzeni śródmiąższowej. Komórki podporowe tworzą specjalne połączenia międzykomórkowe, tzw. wyspecjalizowane połączenia kompleksowe (tight junctions), składające się z wielu małych złączy podobnych do desmosomów, ułożonych w szereg. Błony komórkowe w obrębie złącza są bardzo zbliżone do siebie, a wąska przestrzeń między nimi wypełniona jest substancją sklejącą. Bariera sieci jądra (nie mająca komórek podporowych) jest znacznie bardziej przepuszczalna dla białek surowicy (w tym także IgG) niż bariera na poziomie kanalików naseniotwórczych. Stosując surowicę zawierającą przeciwciała przeciw plemnikom świnki morskiej, wykazano w sieci jądra wiązanie IgG do akrosomu plemnika, natomiast całkowity brak wiązania IgG do plemników znajdujących się w kanaliku naseniotwórczym [128].

Sugeruje się ponadto, że fizjologiczny „przeciek” antygenów komórek rozrodczych może wzbudzić stan fizjologicznej tolerancji organizmu [127]. Jednocześnie komórki cyklu spermatogenezy (głównie spermatocyty i spermatydy) mogą mieć właściwości supresyjne w stosunku do limfocytów, albo aktywują limfocyty supresorowe [57, 74]. Obecnie jednak zasadniczą rolę supresyjną przypisuje się komórkom śródmiąższowym [12], które wyraźnie hamują reaktywność immunologiczną limfocytów we wszystkich możliwych układach hodowlanych. Komórki śródmiąższowe mają ponadto zdolność selektywnego wiązania limfocytów oraz mają na swej powierzchni antygeny zgodności tkankowej [5]. Zdolność wiązania limfocytów i towarzyszące temu zjawisku hamowanie reaktywności immunologicznej in situ odgrywają ważną rolę w obserwowanych u chłopców nawrotach ostrej białaczki limfoblastycznej [115, 140], u których jądro stanowi rezerwuar komórek białaczkowych (jako miejsce uprzywilejowane immunologicznie). Z czynników dodatkowych należy wspomnieć o hamującym wpływie hormonów jądra na reaktywność immunologiczną [106, 113, 139], zwłaszcza modulujący wpływ testosteronu [48] oraz prostaglandyn wydzielanych przez komórki śródmiąż-

szowe. Zatem autoimmunizacja skierowana przeciwko antygenom komórek rozrodczych może wystąpić tylko w takim przypadku, w którym dochodzi do rozległej resorpcji tych antygenów w organizmie (uraz jądra, stany zapalne) lub dochodzi do „przecieku” całych komórek (przecięcie lub podwiązanie nasieniowodów). Swoiste zaburzenia autoregulacyjnego mechanizmu immunologicznego obserwuje się w pewnej odmianie psów gończych, u których występuje spontanicznie lub towarzyszące limfocytowemu zapaleniu tarczycy genetycznie uwarunkowane zapalenie jądra [30]. Również u szczurów rasy Lewis, usunięcie grasicy prowadzi do autoimmunologicznego zapalenia jądra oraz syntezy przeciwciał przeciw plemnikom [77].

2.2. TOLERANCJA ANTYGENÓW MĘSKICH KOMÓREK ROZRODCZYCH PRZEZ OSOBNIKÓW PŁCI ZEŃSKIEJ

Los plemników u samic jest różny u różnych gatunków. U człowieka większość plemników ejakulatowych wypływa z pochwy i tylko mała ich część dociera do macicy. Tu z kolei są one usuwane przez makrofagi i granulocyty obojętnochłonne. Plemniki mogą również penetrować inne komórki, np. metaplastyczny nabłonek szyjki. Niejasne jest, czy fagocytoza dotyczy tylko martwych plemników. Sztucznej inseminacji do celów koncepcyjnych u kobiet można dokonać nawet 6 dni przed owulacją, co dowodzi, że żywe plemniki mogą przebywać w żeńskich drogach rozrodczych przez stosunkowo długi okres.

Przyczyna, dla której fagocytoza plemników nie prowadzi do inicjowania odpowiedzi immunologicznej, nie jest znana. Jedną z możliwości jest fakt, że dawka antygeny jest mała, dzięki czemu normalna odpowiedź immunologiczna nie może być inicjowana, a przeciwnie, dochodzi do stanu tolerancji immunologicznej. U myszy odpowiedź typu komórkowego na plemniki, oceniana w teście adherencji leukocytów oraz hamowania migracji, nie była mierzalna u zwierząt dziewiczych, natomiast pozytywne wyniki uzyskano po skojarzeniu zwierząt [112]. U kobiet uzyskano w analogicznych testach również wyniki negatywne, zanim podjęły one życie płciowe. Po podjęciu życia płciowego 6 na 7 badanych, bezdzietnych kobiet wyniki były pozytywne. Wyniki pozytywne uzyskano także u kobiet wielodzietnych. Wykazano również inne mechanizmy utrzymujące stan tolerancji immunologicznej w żeńskich drogach rozrodczych, jak np. zewnętrzny płaszcz antygenowy plemników (np. opłaszczenie plemników laktoferryną może zapobiegać rozpoznawaniu antygenów plemnika) [11]. Niektóre dane dowodzą, że enzymy zawarte w plazmie nasiennej [82, 93] wpływają na obniżanie immunogenności antygenów powierzchniowych plemnika. Składniki płynu na-

siennego mogą także hamować stymulację limfocytów przez mitogeny [79] lub wiązać się do receptorów dla erytrocytów barana na limfocytach T, uniemożliwiając tworzenie rozetek [80]. Ponadto dodawane do testów funkcjonalnych *in vitro* hamują aktywność większości typów komórek, biorących udział w odpowiedzi immunologicznej, tj. limfocytów T [78], limfocytów B [6, 78], komórek NK (NK — natural killer, komórki o naturalnej cytotoksyczności) [32, 62, 111], makrofagów i leukocytów wielojądrazastych [61, 108, 125]. Istnieje również hipoteza ograniczonej reaktywności naturalnych przeciwciał skierowanych przeciw plemnikom, które miałyby utrzymywać stan tolerancji na plemniki u kobiety [47].

PIŚMIENNICTWO

- [1] AMANN R. D., HAY S. R., HAMMERSTEDT R. H., Yield, characteristics, mobility and cAMP content of sperm isolated from seven region of ram epididymis, *Biol. Reprod.*, **27**: 723-733, 1982.
- [2] ANDERSON D. J., ALEXANDER N. J., FULGHAM D. L., VANDENBERK A. A., BERGER D. R., Immunity to tumour-associated antigens in vasectomized men, *J. Natl. Cancer Inst.*, **69**: 551-562, 1982.
- [3] ANDERSON D. J., BACH D. L., YUNIS E. J., DEWOLF W. C., Major histocompatibility antigens are not expressed on human epididymal sperm, *J. Immunol.*, **129**: 453-454, 1982.
- [4] ANDERSON D. J., JOHNSON P. M., The monoclonal antibody 316 which recognizes polymorphic antigens expressed on human trophoblast also reacts with human testicular germ cells and capacitated sperm, *J. Reprod. Immunol., Suppl.*: **31**, 1986 (abstract).
- [5] ANDERSON D. J., NARAYAN P., DEWOLF W. C., Major histocompatibility antigens are not detectable on post-meiotic human testicular germ cells, *J. Immunol.*, **133**: 1962-1965, 1984.
- [6] ANDERSON D. J., TARTER T. H., Immunosuppressive effects of mouse seminal plasma components *in vivo* and *in vitro*, *J. Immunol.*, **128**: 535-541, 1982.
- [7] ARNAIZ-VILLENA A., FESTENSTEIN H., HLA genotyping by using spermatozoa: evidence for haploid gene expression, *Lancet*, **2**: 620-621, 1976.
- [8] BEDFORD J. M., COOPER G. W., Membrane fusion events in the fertilization of vertebrate eggs, [w] Poste G., Nicolson G. L. eds., *Membrane fusion*, Amsterdam: Elsevier/North-Holland Biomedical Press, 1978, 65-125.
- [9] BENDICH A., Penetration of somatic mammalian cells by sperm, *Science*, **183**: 857-861, 1974.
- [10] BERKOWITZ R. S., ALEXANDER N. J., GOLDSTEIN D. P., ANDERSON D. J., Reactivity of anti-human sperm monoclonal antibodies with normal placenta, hyditiiform mole and gestational chorioncarcinoma, *Gynecol. Oncol.*, **22**: 334-341, 1985.
- [11] BOETTCHER B., *Immunology and reproduction*, International Planned Parenthood Federation, London, 1968, 148-154.

- [12] BORN W., WEKERLE H., Leydig cells nonspecifically suppress lymphoproliferation in vitro: implications for the testis as an immunologically privileged site, *Am. J. Reprod. Immunol.*, **2**: 291-295, 1982.
- [13] BOTWICK E. F., BENTLEY M. D., HUNTER A. G., HAMMER R., Identification of a surface glycoprotein on porcine spermatozoa and its alteration during epididymal maturation, *Biol. Reprod.*, **23**: 161-169, 1980.
- [14] BROWN C. R., HARTREE C. F., Studies on ram acrosin. Activation of proacrosin accompanying the isolation of acrosin from spermatozoa and purification of the enzyme by affinity chromatography, *Biochem. J.*, **175**: 227-238, 1978.
- [15] CAMEO M. S., BLAQUIER J. A., Androgen-controlled specific in rat epididymis, *J. Endocrinol.*, **69**: 47-55, 1976.
- [16] CAMEO M. S., CUASNICU P. S., GARBERI J. C., GONZALES-ECHEVERRIA F., KOHANE A., PIAZZA A., PINEIRO L., BLAQUIER J. A., Some studies on secretory epididymal proteins and their possible relation to sperm maturation, [w] Agata R., Lipsett M. B., Polosa P., Van der Molen H. J. eds., *Recent advances in male reproduction: molecular basis and clinical implications*, New York: Raven Press, 1983, 27-35.
- [17] DACHEUX J. L., PAQUIGNON M., Effects of caffeine on ram and boar spermatozoa. Influence of their stage of maturation and the medium initiation of progressive motility of testicular spermatozoa, [w] Steinberger E., Steinberger A. eds., *Testicular development, structure and function*, New York: Raven Press, 1980, 513-522.
- [18] DACHEUX J. L., PAQUINON M., COMBARNOUS Y., Head-to-head agglutination of ram and boar epididymal spermatozoa and evidence of an epididymal antiglutinin, *J. Reprod. Fertil.*, **67**: 181-189, 1983.
- [19] DYM M., FAWCETT D. W., Observations on the blood-testis barrier and on physiological compartmentation of the seminiferous epithelium, *Biol. Reprod.*, **3**: 308-326, 1970.
- [20] ENG L. A., OLIPHANT G., Rabbit sperm reversible decapacitation by membrane stabilization with a highly purified glycoprotein from seminal plasma, *Biol. Reprod.*, **27**: 1076-1083, 1982.
- [21] FAYE J. C., DUGGETT L., MAZZUC A. M., BAYARD F., Purification, radioimmunoassay and histochemical localization of a glycoprotein produced by rat epididymis, *Biol. Reprod.*, **23**: 423-432, 1980.
- [22] FELLOUS M., Antigenicity of sperm cells, MD Thesis, University of Paris, 1969, 1-143.
- [23] FELLOUS M., DAUSSET J., Probable haploid expression of HLA antigens on human spermatozoa, *Nature*, **225**: 191-193, 1970.
- [24] FELLOUS M., ERICKSON R. P., GACHELIN G., JACOB F., The time of appearance of Ia antigens during spermatogenesis in the mouse, *Transplantation*, **22**: 440-444, 1976.
- [25] FENDERSON B. A., O'BRIEN D. A., MILETTE C. M., EDDY E. M., Stage-specific expression of three cell surface carbohydrate antigens during murine spermatogenesis detected with monoclonal antibodies, *Devel. Biol.*, **103**: 117-128, 1984.
- [26] FESTENSTEIN H., HALIM K., ARNAIZ-VILLENA A., Selection of haploid spermatozoa and its application to HLA-D typing, *Scand. J. Immunol.*, **6**: 519, 1977.
- [27] FESTENSTEIN H., HALIM K., ARNAIZ-VILLENA A., HLA antigens on

- human spermatozoa, [w] Cohen J., Hendry H. E., eds., Sperm, antibodies and infertility, Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1978, 11.
- [28] FEUCHTER F. A., VERNON R. B., EDDY E. M., Analysis of the sperm surface with monoclonal antibodies: topographically restricted antigens appearing in the epididymis, *Biol. Reprod.*, **24**: 1099-1110, 1981.
- [29] FLICKINGER S. J., Synthesis and secretion of glycoprotein by the epididymal epithelium, *J. Androl.*, **4**: 157-161, 1983.
- [30] FRITZ T. E., LOMBARDI L. S., TYLER S. A., NORRIS W. P., Pathology and familial incidence of orchitis and its relation to thyroiditis in a closed beagle colony, *Exp. Mol. Pathol.*, **24**: 142-157, 1976.
- [31] GARBERI J. C., KOHANE A. C., CAMEO M. S., BLAQUIER J. A., Isolation and characterization of specific rat epididymal proteins, *Mol. Cell. Endocrinol.*, **13**: 73-82, 1979.
- [32] GLATER G. B., ANDERSON D. J., Human seminal plasma inhibits the cytotoxic effect of natural killer (NK) cells, *J. Androl.*, **6**: P-57, 1985 (abs).
- [33] GOLDBERG E., Amino acid composition and properties of crystalline lactate dehydrogenase-X from mouse testes, *J. Biol. Chem.*, **247**: 2044-2048, 1972.
- [34] — Infertility in female rabbits immunized with lactate dehydrogenase-X, *Science*, **181**: 458-473, 1973.
- [35] — Effects of immunization with LDH-X on fertility, *Acta Endocrinol. (Suppl)*, **78**: 202-214, 1975.
- [36] — Isozymes: current topics in biological and medical research, Academic Press, New York, 1977, 79-124.
- [37] GOLDBERG E. H., AOKI T., BOYSE E. A., BENNETT D., Detection of H-2 antigens on mouse spermatozoa by the cytotoxicity test, *Nature*, **228**: 570-572, 1970.
- [38] GOLDBERG E., SHERNA D., WHEAT T. E., URBANAKI G. J., MARGOLIASH E., Cytochrom c: immunofluorescent localization of the testis-specific form, *Science*, **196**: 1010-1012, 1977.
- [39] GOLDBERG E., WHEAT T. E., POWELL J. E., STEVENS V. C., Reduction of fertility in female baboons immunized with lactate dehydrogenase C₄, *Fertil. Steril.*, **35**: 214-223, 1981.
- [40] GONZALES-PREVATT V., WHEAT T. E., GOLDBERG E., Identification of an antigenic determinant of mouse lactate dehydrogenase C₄, *Mol. Immunol.*, **19**: 1579-1585, 1982.
- [41] HAGOPIAN A., LIMJUCO G., JACKSON J. J., CARLO D., EYLAR E. H., Experimental allergic aspermatogenic orchitis. IV. Chemical properties of sperm glycoproteins isolated from guinea pig testis, *Biochem. Biophys. Acta*, **434**: 354-364, 1976.
- [42] HALIM K., FESTENSTEIN H., HLA-D on sperm is haploid, enabling use of sperm for HLA-D typing. *Lancet*, **2**: 1255-1257, 1975.
- [43] HALIM K., ABBASI K., FESTENSTEIN H., The expression of the HLA-A antigens on human spermatozoa, *Tissue Antig.*, **4**: 1-7, 1974.
- [44] HAMILTON D. W., Structure and function of epithelium lining the ductus efferentes, ductus epididymis and ductus efferens, [w] Hamilton D. W. ed., *Handbook of physiology, male reproductive system*, Bethesda MD: American Physiological Society, 1975, 259-301.
- [45] — Evidence for alpha-lactalbumin-like activity in reproductive tract fluids of the male rat, *Biol. Reprod.*, **25**: 385-392, 1981.

- [46] HAMMERSTEDT R. H., HAY S. R., AMANN R. P., Modification of ram sperm membranes during epididymal transit, *Biol. Reprod.*, **27**: 745-754, 1982.
- [47] HANCOCK R. J. T., Spermatozoa, antibodies and infertility, Oxford, Blackwell Scientific Publications, 1978, 1-9.
- [48] HAOUR F., MATHER J., SAEZ J. M., KOUTZNETZOVA B., DRAY F., Role of prostaglandin in Leydig cell stimulation by hCG, [w] Crastes de Paulet A., Thaler-Dao H., Dray F. eds., *Prostaglandins et physiologie de la reproduction*, Paris, INSERM, 1980, 75-88.
- [49] HAWTREY C., NAIDU A., NELSON C., WOLFE D., Isozymes II, Physiological function, Academic Press, New York, 1975, 171-180.
- [50] HEKMAN A., RUMKE P., Auto and isoimmunity against spermatozoa, [w] Miescher P. A., Müller-Eberhardt H. J., eds., *Textbook of immunopathology* New York: Grune and Stratton, 1976, 947-962.
- [51] HENNIG B., Change of cytochrome c structure during development of the mouse, *Eur. J. Biochem.*, **55**: 167-183, 1975.
- [52] HINTZ M., GOLDBERG E., Immunohistochemical localization of LDH-X during spermatogenesis in mouse testes, *Devel. Biol.*, **57**: 375-384, 1977.
- [53] HJORT T., AHUJA S. P., POULSEN F., Studies on sperm membrane antigens, [w] Shulman S., Dondero F., Nicotra M. eds., *Immunological factors in human reproduction*, London and New York: Academic Press, 1982, 77-90.
- [54] HJORT T., POULSEN F., Analysis of auto-antigens in the human sperm membrane by a F(ab')₂ blocking system, *J. Clin. Lab. Immunol.*, **6**: 61-67, 1981.
- [55] HUGHES G. R. V., LACHMANN P. J., Clinical aspects of immunology, Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1975, 1117.
- [56] HUNTER A. C., Differentiation of rabbit sperm antigen from those of seminal plasma, *J. Reprod. Fertil.*, **20**: 413-418, 1969.
- [57] HURTENBACH U., MORGENSTERN F., BENNETT D., Induction of tolerance in vitro by autologous murine testicular cells, *J. Exp. Med.*, **151**: 827-836, 1980.
- [58] ISOJIMA S., KOYAMA K., FUJIWARA N., Purification of human seminal plasma no 7 antigen by immunoaffinity on bound monoclonal antibody, *Clin. Exp. Immunol.*, **49**: 449-456, 1982.
- [59] IWATA H., NAGAI Y., STAPLETON D. D., SMITH R. C., OHNO S., Identification of human H-Y antigen and its testis-organizing function, *Arthritis and Rheumatism*, **22**: 1211-1216, 1979.
- [60] JACKSON J. J., HAGOPIAN A., CARLO D. J., LIMJUCO G. A., EYLAR E. H., Experimental allergic aspermatogenic orchitis. 1. Isolation of a spermatozoa protein (AP-1) which induces allergic aspermatogenic orchitis, *J. Biol. Chem.*, **250**: 6141-6150, 1975.
- [61] JAMES K., HARVEY J., BRADBURY A. W., HARGEAVE T. B., CULLEN R. T., DONALDSON K., The effect of seminal plasma on macrophage function-possible contributory factor in sexually transmitted disease, *AIDS Res.*, **1**: 45-52, 1983.
- [62] JAMES K., SZYMANIEC S., Human seminal plasma is a potent inhibitor of natural killer cell activity in vitro, *J. Reprod. Immunol.*, **8**: 61-68, 1985.
- [63] JOHNSON W. C., HUNTER A. G., Distribution of seminal antigens and enzymes in rabbit ductus epididymis, *J. Anim. Sci.*, **49**: 143-150, 1979.
- [64] JOHNSON L., PETTY C. S., NEAVES W. B., Further quantification of human

- spermatogenesis: germ cell loss during postprophase of meiosis and its relationship to daily sperm production, *Biol. Reprod.*, **29**: 207-215, 1983.
- [65] JOHNSON L., ZANE R. S., PETTY C. S., NEAVES W. B., Quantification of the human Sertoli cell population: its distribution, relation to germ cell numbers, and age-related decline, *Biol. Reprod.*, **31**: 787-794, 1984.
- [66] JONES R., PHOLPRAMOOL C., SETCHELL B. P., BROWN C. R., Labelling of membrane glycoproteins on rat spermatozoa collected from different regions of the epididymis, *Biochem. J.*, **200**: 457-460, 1981.
- [67] KILLE J. W., GOLDBERG E., Female reproductive tract immunoglobulin responses to a purified sperm specific antigen (LDH-C₄), *Biol. Reprod.* **20**: 863-879, 1979.
- [68] KILLE J. W., GOLDBERG E., Inhibition of oviductal sperm transport in rabbits immunized against sperm-specific lactate dehydrogenase (LDH-C₄), *J. Reprod. Immunol.*, **2**: 15-26, 1980.
- [69] KOLK A. H. J., SAMUEL T., Isolation, chemical and immunological characterization of two strongly basic nuclear proteins from human spermatozoa, *Biochem. Biophys. Acta*, **393**: 307-319, 1975.
- [70] KOWALIK I., KURPISZ M., JAKUBOWIAK A., JANECKI A., ŁUKASZYK A., SZYMCZYŃSKI G., Evaluation of HLA expression on germinal, testicular cells w przyg.
- [71] KURPISZ M., CZURKO J., JAROSZEWSKI J., RUCKI T., Blast transformation induced by spermatozoa, *Ann. Med. Sect. Pol. Acad. Sci.*, **21**: 215-220, 1976.
- [72] KURPISZ M., FERNANDEZ N., SZYMCZYŃSKI G., KOWALIK I., The non-mature sperm cells: evaluation of surface markers and interaction in in vitro cultures, *Archiv. Immunol. Therap. Experiment.*, **34**: 101-109, 1986.
- [73] KURPISZ M., FERNANDEZ N., WITT M., KOWALIK I., SZYMCZYŃSKI G. A., FESTENSTEIN H., HLA expression on human germinal cells, *J. Immunogen.*, 1987, **14**: 23-32, 1987.
- [74] KURPISZ M., SZYMCZYŃSKI G., Proliferation of lymphocytes induced by the seminal non-spermatozoal cells, *Arch. Androl.*, **5**: 221-222, 1980.
- [75] LAW H. Y., BODMER W. F., Use of microimmobilization and microagglutination assays for attempted detection of HLA antigens and beta two microglobulin on human sperm, *Tissue Antig.*, **12**: 249-269, 1978.
- [76] LEE C. Y. G., HUANG Y. S., HUANG C. H., HU P. C., MENGE A. C., Monoclonal antibodies to human sperm antigens, *J. Reprod. Immunol.*, **4**: 173-181, 1982.
- [77] LIPSCOMB H. L., GARDNER P. J., SHARP J. G., The effect of neonatal thymectomy on the induction of autoimmune orchitis in rats, *J. Reprod. Immunol.*, **1**: 209-212, 1979.
- [78] LORD E. M., SENSABAUGH G. F., STITES D. P., Immunosuppressive activity of human seminal plasma. I. Inhibitor of in vitro lymphocyte activation, *J. Immunol.*, **118**, 1704-1712, 1977.
- [79] MARCUS Z. H., FREISHEIM J. H., HOUK J. L., HERMAN J. H., HESS E. V., In vitro studies in reproductive immunology. I. Suppression of CMI response by human spermatozoa and fractions isolated from human seminal plasma, *Clin. Immunol. Immunopathol.*, **9**: 318-329, 1978.
- [80] MARCUS Z. H., HESS E. V., HERMAN J. H., TROIANO P., FREISHEIM J. J., In vitro studies in reproductive immunology. 2. Demonstration of the inhibitory effect of male genital tract constituents on PHA-stimulated mito-

- genesis and E-rosette formation of human lymphocytes, *J. Reprod. Immunol.*, **1**: 97-112, 1979.
- [81] MATHUR S., GOUST J. M., WILLIAMSON H. O., FUDENBERG H. H., Cross-reactivity of sperm and T lymphocyte antigens, *Amer. J. Reprod. Immunol.*, **1**: 113-118, 1981.
- [82] MAZZINI M. N., CERACI P., De CERESO J. M. S., CERESO A. S., Carbohydrates of the surface of the normal human spermatozoon, *Am. J. Reprod. Immunol., Microbiol.*, **11**: 107-113, 1986.
- [83] MEISTRICH M. L., TROSTLE P. K., FRAPART M., ERICKSON R. P., Biosynthesis and localization of lactate dehydrogenase X in pachytene spermatocytes and spermatids of mouse testes, *Devel. Biol.*, **60**: 428-441, 1977.
- [84] MEIZEL S., MUKERJI S. K., Proacrosin from rabbit epididymal spermatozoa: partial purification and initial biochemical characterization, *Biol. Reprod.*, **13**: 83-93, 1975.
- [85] MENGE A. C., FLEMING C. H., Detection of sperm antigens on mouse ova and early embryos, *Dev. Biol.*, **63**: 111-117, 1978.
- [86] MENGE A. C., PEEGEL H., RIOLO M. L., Sperm fractions responsible for immunologic induction of pre- and postfertilization infertility in rabbits, *Biol. Reprod.*, **20**: 931-937, 1979.
- [87] METZ C. B., Role of specific sperm antigens in fertilization, *Fed. Proc.*, **32**: 2057-2064, 1973.
- [88] — In *Contraceptive Technology Symposium National Academy of Science*, New York, 1979.
- [89] MILETTE C. F., SCOTT B. K., Identification of spermatogenic cell plasma membrane glycoproteins by two-dimensional electrophoresis and lectin blotting, *J. Cell Sci.*, **65**: 233-248, 1984.
- [90] MOORE H. D. M., Localization of specific glycoproteins secreted by the rabbit and hamster epididymis, *Biol. Reprod.*, **22**: 705-718, 1980.
- [91] MORTON D. B., *Immunobiology of gametes*, Cambridge University Press, Cambridge, 1977, 115-155.
- [92] MORTON D. B., Mc ANULTY P. A., The effect on fertility of immunizing sheep with ram sperm acrosin and hyaluronidase, *J. Reprod. Immunol.*, **1**: 61-73, 1979.
- [93] MUKHERJEE D. C., AGRAWAL A. K., MANJUNATH R., MUKHERJEE A. B., Suppression of epididymal sperm antigenicity in the rabbit by uteroglobin and transglutaminase in vitro, *Science*, **219**: 989-995, 1983.
- [94] MYLES D. G., PRIMAKOFF P., BELLVE A. R., Surface domains of the guinea pig sperm defined with monoclonal antibodies, *Cell*, **23**: 433-439, 1981.
- [95] NARAYAN P., SCOTT B. K., MILETTE C. F., DEWOLF W. C., Human spermatogenic cell marker proteins detected by two-dimensional electrophoresis, *Gamete Res.*, **7**: 227-239, 1983.
- [96] NAZ R. K., ALEXANDER N. J., ISAHAKIA M., HAMILTON M. S., Monoclonal antibody to a human cell membrane glycoprotein that inhibits fertilization, *Science*, **225**: 342-344, 1984.
- [97] NAZ R. K., SAXE J. M., MENGE A. C., Inhibition of fertility in rabbits by monoclonal antibodies against sperm, *Biol. Reprod.*, **28**: 249-254, 1983.
- [98] NAZ R. K., ROSENBLUM B. B., MENGE A. C., Characterization of membrane antigen from rabbit testes and sperm isolated by using monoclonal antibodies, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**: 857-861, 1984.

- [99] O'BRIEN D., MILETTE C. F., Identification and immunochemical characterization of spermatogenic cell surface antigens that appear during early meiotic prophase, *Devel. Biol.*, **101**: 307-317, 1984.
- [100] OLSON G. E., HAMILTON D. W., Characterization of the surface glycoprotein of rat spermatozoa, *Biol. Reprod.*, **19**: 26-35, 1978.
- [101] O'RAND M. G., Inhibition of fertility and sperm-zona binding by antiserum to the rabbit sperm membrane autoantigen RSA-1, *Biol. Reprod.*, **25**: 621-628, 1981.
- [102] O'RAND M. G., IRONS G. P., Monoclonal antibodies to rabbit sperm autoantigens. II. Inhibition of human sperm penetration of zona-free hamster eggs, *Biol. Reprod.*, **30**: 731-736, 1984.
- [103] O'RAND M. G., IRONS G. P., PORTER J. P., Monoclonal antibodies to rabbit sperm autoantigens. I. Inhibition of in vitro fertilization and localization on the egg, *Biol. Reprod.*, **30**: 721-729, 1984.
- [104] O'RAND M. G., METZ C. B., Isolation of "immobilizing antigen" from rabbit sperm membranes, *Biol. Reprod.*, **14**: 586-598, 1976.
- [105] ORTAVANT R., Le cycle spermatogenetique chez le Belier. D. Sc. Thesis, University of Paris, 1958, 1-127.
- [106] PAAVONEN T., ANDERSON L. C., ADLEROREUTZ H., Sex hormone regulation of in vitro immune response. Estradiol enhances human B cell maturation via inhibition of suppressor T cells in pokeweed mitogen-stimulated cultures, *J. Exp. Med.*, **154**: 1935-1945, 1981.
- [107] PAUL S., BAUKLOH V., BAILLIE M., METTLER L., Generation of monoclonal antibodies against human spermatozoa and seminal plasma constituents, *Clin. Reprod. Fertil.*, **1**: 235-240, 1983.
- [108] PETERSON B. H., LAMMEL C. J., STITES D. P., BROOKS G. F., Human seminal plasma inhibition of complement, *J. Lab. Clin. Med.*, **96**: 582-588, 1980.
- [109] POULSEN F., The nature of an iso-antigen of the human sperm membrane, *J. Reprod. Immunol.*, **5**: 49-54, 1983.
- [110] POULSEN F., HJORT T., Identification of auto-antigens of human sperm membrane, *J. Clin. Lab. Immunol.*, **6**: 69-74, 1981.
- [111] REES R. C., VALLEY P., CLEGG A., POTTER C. W., Suppression of natural and activated human antitumour cytotoxicity by human seminal plasma, *Clin. Exp. Immunol.*, **63**: 687-695, 1986.
- [112] ROBERTS T. K., TUMBOH-OBRI A. G., DORSMAN B. G., HALL R., LEWINS E., Immunological influence on human fertility, Academic Press, Sydney, 1977, 271-273.
- [113] ROUBINIAN J. R., PAPAIAAN R., TALAL N., Androgenic hormones modulate autoantibody responses and improve survival in murine lupus, *J. Clin. Invest.*, **59**: 1066-1070, 1977.
- [114] SALING P. M., O'RAND M. G., Fertility inhibition in vitro and preliminary antigen identification, *J. Androl.*, **3**: 434-439, 1982.
- [115] SATHER H., MILLER D., NESBIT M., HEYN R., HAMMOND D., Differences in prognosis for boys and girls with acute lymphoblastic leukaemia, *Lancet*, **1**: 739-743, 1981.
- [116] SAMUEL T., Differentiation between antibodies to protamines and somatic nuclei of spermatozoa and somatic cells, *Clin. Exp. Immunol.*, **32**: 290-298, 1978.

- [117] SAMUEL T., KOLK A. H. J., RUMKE P., Studies on the immunogenicity of protamines in humans and experimental animals by means of a micro-complement fixation test, *Clin. Exp. Immunol.*, **33**: 252-260, 1978.
- [118] SCHELLPFEFFER D. A., HUNTER A. G., Specific proteins of the male reproductive tract, [w] Spilman C. H., Lobl T. J., Kirton K. T., eds., *Regulatory mechanisms of male reproductive physiology*, Amsterdam: Excerpta Medica, 1976, 115-132.
- [119] SCHMELL E. D., YUAN L. C., GULYAS B. J., AUGUST J. T., Identification of mammalian sperm surface antigens. I. Production of monoclonal anti-mouse sperm antibodies, *Fertil. Steril.*, **37**: 249-257, 1982.
- [120] SHELTON J., GOLDBERG E., Serum antibodies to LDH-C₄, *J. Reprod. Immunol.*, **8**: 321-325, 1985.
- [121] SHIGETA M., WATANABE T., MARUYAMA S., KOYAMA K., ISOJIMA S., Spermimmobilizing monoclonal antibody to human seminal plasma antigens, *Clin. Exp. Immunol.*, **42**: 458-462, 1980.
- [122] SKINNER M., COSAND W. L., GRISWOLD M. D., Purification and characterization of testicular transferrin secreted by rat Sertoli cells, *Biochem. J.*, **218**: 313-321, 1984.
- [123] SOLTER D., SCHACHNER M., Brain and sperm cell surface antigen (NS-4) on preimplantation mouse embryos, *Dev. Biol.*, **63**: 98-104, 1976.
- [124] SPEROFF L., GLASS R. H., KASE N. G., *Clinical gynecologic endocrinology*, Williams and Wilkins, Baltimore, 1978, 311.
- [125] STANKOVA L., DRACH G. W., HICKS T., ZUKOSKI C. F., CHVAPIL M., Regulation of some functions of granulocytes by zinc of the prostate fluid and prostate tissue, *J. Lab. Clin. Med.*, **88**: 640-645, 1976.
- [126] STOREY B. T., KAYNE F. J., Energy metabolism of spermatozoa. VI. Direct intramitochondrial lactate oxidation by rabbit sperm mitochondria, *Biol. Reprod.*, **16**: 549-556, 1977.
- [127] TUNG K. S. K., Autoimmunity of the testis, [w] Dhindsa D. S., Schumacher G. F. B. eds. *Immunological aspects of infertility and fertility regulations*, New York: Elsevier/North Holland, 1980, 33-91.
- [128] — Models of autoimmunity to spermatozoa and testis, *Devel. Immunol.*, **9**: 34-37, 1980.
- [129] TUNG K. S. K., HAN L. B., EVAN A. P., Differentiation antigen of testicular cells and spermatozoa in the guinea pig, *Dev. Biol.*, **68**: 224-238, 1979.
- [130] TUNG P. S., FRITZ I. B., Specific surface antigens on rat pachytene spermatocytes and successive classes of germinal cells, *Devel. Biol.*, **64**: 297-315, 1978.
- [131] VITETTA E. S., ARTZT K., BENNETT D., Structural similarities between a product of the T/t-locus isolated from sperm and teratoma cells and H-2 antigens isolated from splenocytes, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **72**: 3215-3221, 1975.
- [132] VITETTA S., CAPRA J. D., The protein products of the murine 17th chromosome: genetics and structure, *Adv. Immunol.*, **26**: 147-193, 1978.
- [133] VOGLMAYR J. K., FAIRBANKS G., JACKOWITZ M. A., COLLELA J. R., Post testicular developmental changes in the ram sperm cell surface and their relationship to luminal proteins of the reproductive tract, *Biol. Reprod.*, **22**: 655-667, 1980.
- [134] VOGLMAYR J. K., FAIRBANKS B., VESPA D. B., COLELLA J. R., Studies on mechanisms of surface modification in ram spermatozoa during the final stages of differentiation, *Biol. Reprod.*, **26**: 483-500, 1982.
- [135] VOISIN G. A., TOULLET F., D'ALMEIDA M., Characterization of spermato-

- zoa auto, iso and alloantigens, [w] Diczfalusy E. ed. Immunological approaches to fertility, Stockholm: Karolinska Institutet, 1974, 173-201.
- [136] VOJTISKOVA M., POLACKOVA M., POKORNA Z., Histocompatibility antigens on mouse spermatozoa. *Folia Biol.*, **15**: 322-327, 1969.
- [137] VOJTISKOVA M., POKORNA Z., Developmental expression of H-2 antigens in the spermatogenic cell series: possible bearing on haploid gene action, *Folia Biol.*, **18**: 1-14, 1972.
- [138] WHEAT T. A., GOLDBERG E., Immunologically active peptide fragments of the sperm-specific lactate dehydrogenase C₄ isozyme, [w] Rich D. H., Gross E. eds., *Peptides: synthesis-structure-function*, Rockford IL: Pierce Chemical Company, 1981, 557.
- [139] WHITMORE W. F., GITTES R. F., Intratesticular grafts: the testis as an exceptional immunologically privileged site, *Trans. Am. Assn. Gen. Urol. Surg.*, **70**: 76-80, 1978.
- [140] WILLIAMS H. J. H., BARKHAM P., SLATER N. G. P., Testicular relapse in acute leukemia, *Lancet*, **2**: 1152-1154, 1978.
- [141] YAN Y. C., WANG L. F., SATO E., KOIDE S. S., Monoclonal antibody inducing human sperm agglutination, *Amer. J. Reprod. Immunol.*, **4**: 11-115, 1983.
- [142] YANG C. H., SRIVASTAVA P. N., Purification and properties of hyaluronidase from bull sperm, *J. Biol. Chem.*, **250**: 79-83, 1975.

Nadesłano: 20 stycznia 1987.

Przyjęto: 25 czerwca 1987.

Adres autora: ul. Strzeszyńska 32, 60-479 Poznań.

ROLA KOMÓREK ŚRÓDBŁONKA PŁUCNEGO W NIEODDECHOWEJ FUNKCJI PŁUC

ROLE OF PULMONARY ENDOTHELIAL CELLS IN NONRESPIRATORY FUNCTIONS OF THE LUNGS

Krzysztof HELEWSKI, Janusz KONECKI, Grażyna KOWALCZYK

I Katedra i Zakład Histologii i Embriologii Śląskiej Akademii Medycznej
w Katowicach

Streszczenie. Przedstawiono funkcje komórek śródbłonkowych, nie związane bezpośrednio z wymianą gazową. Zwrócono uwagę na wysoką aktywność metaboliczną śródbłonka naczyń płucnych, biorącego udział zarówno w rozkładzie, jak i w syntezie pewnych grup prostaglandyn oraz innych prostanoidów, w metabolizmie nukleotydów adeninowych, niektórych amin biogennych, hormonów i leków, a także w przekształcaniu bradykininy i angiotensyny I. Z komórkami śródbłonka ma również związek płucny metabolizm lipidów, a także proces fibrynolizy oraz krzepnięcia krwi.

Summary. The article represents functions of the endothelial cells not related directly with the gas exchange, the article calls attention to the high metabolic activity of the endothelial blood vessels in the lungs that take part in inactivation as well as synthesis of certain prostaglandine groups and other prostanoids, metabolism of adenine nucleotides, biogenic amines, hormones, drugs and also in the transformation of bradykinin and angiotensin I. In connection with endothelial cells is the lungs metabolism of lipids and the process of fibrinolysis and blood coagulation.

WSTĘP

Jedną z lepiej poznanych funkcji płuc jest wymiana tlenu i dwutlenku węgla przez barierę powietrze—krew. Płuca spełniają także wiele funkcji nieoddechowych, a w ostatnich 20-25 latach znacznie rozszerzono zakres wiedzy na ten temat. Opublikowanie badań donoszących o zidentyfikowaniu ponad 40 rodzajów komórek wchodzących w skład płuca [165] sugerowało różnorodność funkcji i aktywności metabolicz-

nych tych komórek. Obecnie wiemy, że płuco jest metabolicznie czynnym narządem anabolizującym i katabolizującym farmakologicznie czynne substancje przenoszone przez krew. Naczynioaktywne substancje, takie jak: serotonina, bradykinina, angiotensyna I, noradrenalina czy prostaglandyny E i F, są inaktywowane podczas przejścia przez płuca, inne, jak histamina, adrenalina, prostaglandyny A, angiotensyna II i III, nie podlegają przemianom [12, 147, 181]. Poza tym płuco bierze udział w syntezie lipidów i protein, a także spełnia funkcję obronną dla całego organizmu [67, 70].

TABELA 1

Wpływ płucnego łożyska naczyniowego na biologicznie aktywne substancje krążące we krwi

-
- | | |
|----|--|
| A. | Usuwane z krążenia płucnego |
| | Serotonina |
| | Bradykinina |
| | Noradrenalina |
| | Nukleotydy adeninowe |
| | Prostaglandyny E i F |
| | Angiotensyna I |
| | Hormony endogenne, takie jak: hormony sterydowe, insulina, glukagon, gastryna |
| | Leki, takie jak: methadon, morfina, chlorphenteramina, phenteramina, cyclizina, diphenhydramina, chloropromazyna, fluphenazyna, oxprenolol, propranolol, desipramina, imipramina |
| B. | Uwalniane przez krążenie płucne |
| | Angiotensyna II i III |
| | Prostaglandyny, PGI ₂ i inne prostanoidy |
| | Histamina |
| | Kalikeina |
| | Wcześniej zakumulowane leki i ich metabolity |
| C. | Nie ulegające przekształceniu w krążeniu płucnym |
| | Adrenalina |
| | Prostaglandyny A |
| | Histamina |
| | Angiotensyna II i III |
| | Wazopresyna |
-

Wiadomo również, iż naczynia włosowate pęcherzyków płucnych działają jak filtr, oczyszczając krew z cząstek powodujących mikrozatory. Płuca uczestniczą w utrzymywaniu stałego poziomu krążących leukocytów poprzez usuwanie z krwi części granulocytów, limfocytów i monocytów. Z megakariocytów zlokalizowanych w płucach powstaje 7-17% trombocytów organizmu.

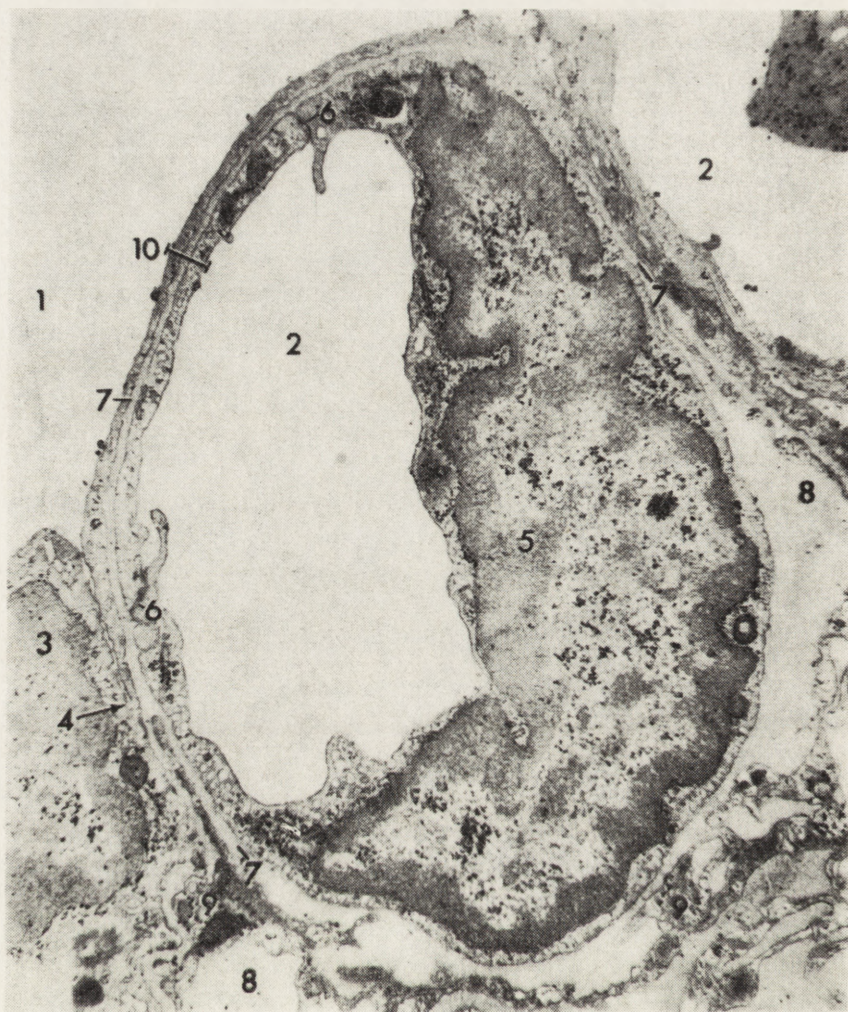
Do innych nieoddechowych funkcji płuc można zaliczyć: usuwanie nadmiernej ilości wody i ciepła, ekskreację ciał rozpuszczonych przy udziale dwutlenku węgla oraz wydalanie z wydychanym powietrzem metabolitów krwi (lotnych w temperaturze 37°C), które po przejściu przez barierę powietrze—krew wchodzą w obrębie pęcherzyków w fazę gazową [132]. Funkcje nieoddechowe płuc bezpośrednio i pośrednio wpływają na czynność oddechową i odwrotnie. Typowym przykładem ścisłego powiązania obu funkcji jest rola płuc w regulacji równowagi kwasowo-zasadowej. Regulacja jest realizowana przez płuco oraz nerki. Narządy te wydalają produkty przemiany materii, a w zależności od potrzeb wydalają lub zatrzymują jony wodorowe i zasady, co prowadzi w efekcie do utrzymania stałego stężenia jonów wodorowych (pH) w płynach ustrojowych, a to z kolei jest jednym z głównych warunków prawidłowego przebiegu procesów biochemicznych w organizmie.

W niniejszej pracy zostanie przedstawiony udział komórek śródbłonka płucnego łożyska naczyniowego w nieoddechowej funkcji płuc.

KOMÓRKI ŚRÓDBŁONKA

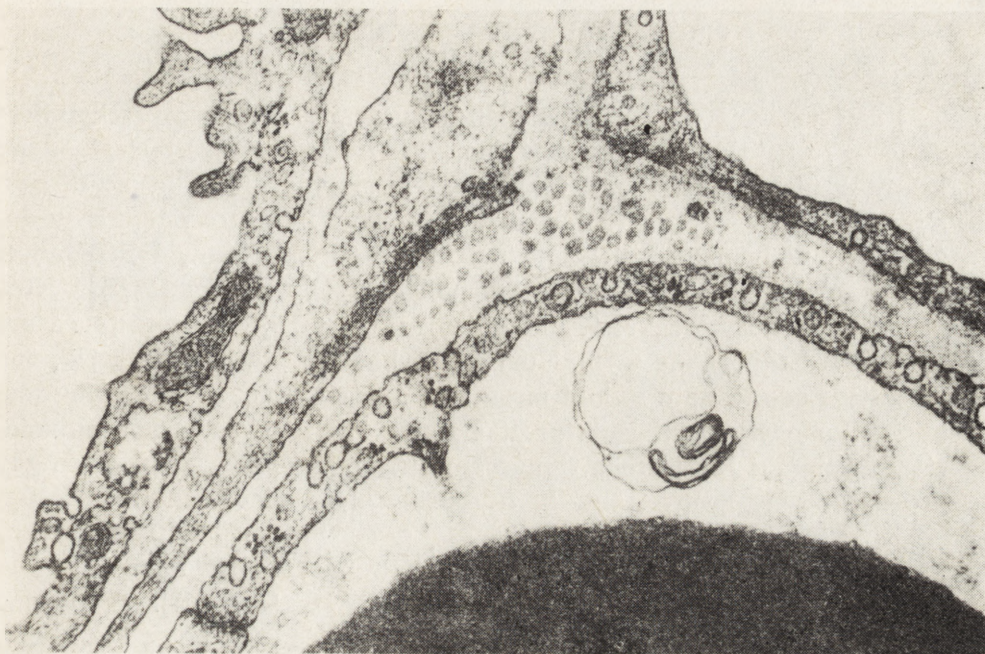
Śródbłonek płucnego łożyska naczyniowego (z wyjątkiem krążenia oskrzelowego, gdzie śródbłonek jest typu okienkowego) jest ciągły [164]. Komórki endotelialne naczyń włosowatych przegrody międzypęcherzykowej różnią się od śródbłonka tętnic i żył płucnych. W głównym pniu tętnicy płucnej komórki śródbłonka zawierają liczne filamenty śródkomórkowe, dobrze rozwinięty system mikrotubul i mają liczne uwypuklenia powierzchni, drobne wypustki palczaste, a czasem mikrokosmki [78, 163]. Filamenty wewnątrzkomórkowe występują również w śródbłonku tętniczek oskrzelowych, lecz nie są tak wyraźne w komórkach śródbłonka naczyń włosowatych płuca. Filamenty składają się z białek kurczliwych — aktyny i miozyny [9, 75], obecnie uważa się, że *in vitro* komórki śródbłonka w pewnych warunkach mogą wykazywać właściwości kurczliwe [32, 36, 50, 65, 100]. Uwypuklenia powierzchni endotelium są również bardziej wydatne w żyłach i tętnicach niż w kapilarach [196]. Charakterystycznymi cechami komórek śródbłonka płucnego jest ich mała grubość (mniej niż 0,1 μm w niektórych miejscach), mała liczba organeli, aktywność wydzielnicza lub duża aktywność metaboliczna oraz obecność licznych cytoplazmatycznych pęcherzyków plazmolemalnych, ich form otwartych na powierzchni błony komórkowej oraz mniejszych od nich pęcherzyków pinocytarnych [78, 101, 155].

Dojrzałe płuca mają około $3 \cdot 10^9$ pęcherzyków płucnych, a każdy



Ryc. 1. Fragment przegrody międzypęcherzykowej szczura. Komórki śródbłonka naczyń włosowatych: 1 — światło pęcherzyka płucnego, 2 — światło naczyń włosowatych, 3 — jądro komórki pęcherzykowej typu I, 4 — strzałka wskazuje punkt, gdzie wąski rąbek cytoplazmy komórki typu I zaczyna otaczać naczynie włosowate, 5 — jądro komórki, śródbłonka naczyń włosowatych, 6 — złącza między komórkami śródbłonka, 7 — błona podstawna, 8 — włókna kalagenowe w tkance łącznej warstwy śródmiąższowej przegrody pęcherzykowej, 9 — fibroblasty, 10 — bariera powietrze—krew (0,2-0,3 μm). ME 23 000 \times wg [132]

pęcherzyk może mieć 1000 lub więcej naczyń włosowatych. Długość naczyń może się zmieniać w zależności od gatunku, lecz średnica jest stała i mieści się w zakresie 8-15 μm . Łożysko naczyń włosowatych, ułożone w linii prostej, może rozciągać się na 2500 km lub więcej, a 1 ml



Ryc. 2. U góry po lewej i prawej stronie światło pęcherzyków płucnych. Na dole światło naczynia włosowatego otoczone komórkami śródbłonka. Widoczne liczne pęcherzyki pinocytarne, z których część otwiera się do światła naczynia (według Rogers A. W., *Cells and Tissues. An Introduction to Histology and Cell Biology*, Academic Press, London, New York, Paris, San Diego, San Francisco, Sao Paulo, Sydney, Tokyo, Toronto 1983)

krwi mieści się w kapilarach długości 16 km [151, 159]. Jest to więc największe łożysko naczyń włosowatych ciała, a jego powierzchnia jest określana u człowieka na 70 m² [46]. Opisane własności sprzyjają wymianie gazowej i są także korzystne dla wzajemnego oddziaływania komórek śródbłonka i nietłych substancji rozpuszczonych we krwi [80]. Obecnie wiadomo, że komórki śródbłonka naczyń płucnych są jednymi z najbardziej czynnych metabolicznie komórek płuca [12, 93, 108, 158, 184]. Związane jest to z ich strategicznym położeniem w obrębie układu krążenia, gdyż uwalniają syntetyzowane produkty i metabolity bezpośrednio do ogólnego krążenia tętniczego, jako że krążenie płucne jest jedynym systemem naczyniowym ciała, otrzymującym krew całkowitej pojemności minutowej serca [125]. Tak więc komórki te są ostatnim odcinkiem, w którym ulega określeniu ostateczny skład krwi tętniczej [151, 160].

PROSTAGLANDYNY I INNE EIKOZANOIDY

Płuca usuwają z krwi prostaglandyny grup E i F oraz przekształcają je w 15-keto-dwuwodoropochodne [79, 125, 141, 145]. Prostaglandyny grupy A nie są usuwane w takim samym stopniu, będąc mimo to substratami dla 15-OH dehydrogenazy — enzymu, który występuje w dużej ilości w homogentach płuc. Ponad 90% PGE₁, PGE₂ i PGF_{2α} jest inaktywowanych przez krążenie płucne kota [44], natomiast PGA₁ i PGA₂ pozostają w dużym zakresie nie zmienione po przejściu przez płuca psa [106]. Bardzo podobne wyniki uzyskano, badając płuca ludzkie [57, 66], lecz nieco odmienne u świnki morskiej [127], co wskazuje na pewne różnice gatunkowe. Degradacja prostaglandyn E i F wymaga ich wnikięcia do komórki [145] drogą transportu aktywnego [39, 194], podczas gdy prostaglandyny grupy A nie są transportowane, co może tłumaczyć, dlaczego PGA₁ i PGA₂ nie są w większym stopniu metabolizowane [11]. Płuca mogą inaktywować za pośrednictwem 15-OH dehydrogenazy prostaglandynowej również prostacyklinę PGI₂ [40, 107]. Egzogenna PGI₂ jest w 14% metabolizowana przez perfundowane płuca [192]. Inni uważają jednak, że prostacyklina PGI₂ nie jest usuwana z krwi podczas jej przejścia przez płuca [8, 123, 185], co prawdopodobnie spowodowane jest niskim powinowactwem PGI₂ do systemu transportowego płuc [11, 69]. Komórkowe i subkomórkowe miejsca transportu oraz lokalizacja 15-OH dehydrogenazy nie są sprecyzowane. Prawdopodobnie miejsca wiązania prostaglandyn E i F znajdują się blisko powierzchni luminalnej płucnych komórek endotelialnych, a 15-OH dehydrogenaza może nie być związana z tymi komórkami [150].

Płuca, poza degradacją prostaglandyn mają również zdolność ich syntezy. Izolowane i perfundowane płuca w dużym stopniu przekształcają kwas arachidonowy w cykliczne nadtlutki prostaglandynowe (PGG₂ i PGH₂), służące jako związki pośrednie do syntezy poszczególnych prostanoidów [113]. Zdolność tkanki płucnej poszczególnych gatunków do uwalniania różnych prostanoidów czy eikozanoidów jest dobrze udokumentowana. Lista prostanoidów syntetyzowanych i uwalnianych z płuc, przedstawiona przez Änggarda i Samuelssona [7], a uzupełniona przez Pipera i Vane'a [126, 128], staje się coraz dłuższa i zawiera: cykliczne nadtlutki prostaglandyn (dawniej określane jako RCS — „substancja kurcząca aortę królika”), prostaglandyny E₂, F_{2α}, G₂, H₂, tromboksan A₂ (TxA₂) i B₂ (TxB₂), wolno reagującą substancję anafilaksji — SRS-A (będącą, jak już wiadomo, serią leukotrienów, C₄, D₄ i E₄) oraz PGI₂ [4, 25, 31, 59, 60, 64, 114, 122, 167, 172, 182, 183]. Dla uzupełnienia tej listy dodać należy różne metabolity prostanoidów [40].

Prostacyklina (PGI_2), silnie działający prostanoid rozszerzający naczynia [173] i hamujący agregację płytek [24, 110, 169], jest produkowana przez płuca kilku gatunków [58, 112], a także przez płuca człowieka [72]. PGI_2 jest syntetyzowana i uwalniana z izolowanych płuc [59, 61, 62, 68, 179], ze skrawków płuc [1] oraz różnych kultur tkankowych, pochodzących z płuc [130, 131]. Przyjmuje się, że *in vivo* PGI_2 jest uwalniana z komórek endotelialnych, które wyścielają ogromną powierzchnię naczyń włosowatych płuc [15, 60, 112, 166]. Uważa się również, że to raczej komórki śródbłonka naczyniowego niż komórki mięśni gładkich lub fibroblasty stanowią główne źródło PGI_2 [73, 90, 105, 111, 115, 189], choć znaczne ilości PGI_2 są także produkowane przez komórki mezotelium wyścielające opłucną [74].

Liczne dane wskazują zatem, że to właśnie komórki śródbłonka płucnego są głównie odpowiedzialne za syntezę prostaglandyn i substancji pochodnych [83, 97, 116, 133, 157]. Obecne badania zmierzają do określenia subkomórkowej lokalizacji systemu cyklooksygenazy. Roth i Majerus [136] drogą badań biochemicznych wykazali, że synteza prostaglandynowa jest acetylowana przez aspirynę, a Rome, Lands, Roth i Majerus [135] donieśli, że dotyczy to jedynie formy enzymatycznie aktywnej. Badania autoradiograficzne płucnych komórek śródbłonkowych inkubowanych ze specyficznym inhibitorem syntetazy prostaglandynowej (^3H) acetylosalicylanem wykazały, że śródbłonkowa syntetaza prostaglandynowa występuje w sieci endoplazmatycznej [151]. Aspiryna nie jest jednak specyficznym czynnikiem acetylującym, ponieważ może acetylować również lizynową resztę albumin i nukleoprotein [180, 186]. Mimo to, we wspomnianych badaniach autoradiograficznych ponad 63% znakowanej substancji było zlokalizowane w sieci endoplazmatycznej, co było zgodne z biochemicznymi wynikami badań, świadczącymi, że syntetaza prostaglandynowa występuje we frakcji mikrosomowej [71]. Badania te wskazują, że komórki śródbłonkowe płuc mają zdolność syntezy prostaglandyn i substancji pochodnych. Do tej pory nie wiadomo jednak, czy zdolność tą mają także inne rodzaje komórek płucnych i jak wiele różnych typów komórek może dostarczać prostaglandyny i substancji pochodnych do krwi żyłnej płuc [41].

NUKLEOTYDY ADENINOWE

Liczne badania dowiodły, że płuca biorą udział w metabolizmie nukleotydów adeninowych. Już stosunkowo dawno wykazano, że adenylo-5'-trójfosforan (ATP) jest usuwany z krwi podczas przejścia przez płuca. Eksperymenty przy użyciu znakowanych ^3H , ^{14}C lub ^{32}P ATP

i 5'-AMP unaocznily, iż są one metabolizowane w płucach perfundowanych roztworem soli fizjologicznej przez enzymy zlokalizowane na powierzchni komórek śródbłonkowych [141, 152, 162]. Potwierdziły to badania Dierterlego i wsp. [33] z komórkami śródbłonka płucnego w hodowli. Autorzy ci demonstrowali także wchłanianie adenozy — metabolitu ATP przez komórki śródbłonka, a związek ten może brać udział w rozszerzaniu naczyń krwionośnych [63]. Bardzo podobne procesy metaboliczne zaobserwowano niedawno w przypadku ADP [26]. Metabolizm nukleotydów odbywa się na drodze hydrolizy wiązań estrowo-fosforanowych, a w mniejszym stopniu dezaminacji. Procesy te nie wymagają wnikięcia substratu do komórki, a związane z nimi enzymy nie są wydzielane do światła naczyń. Badania w mikroskopie elektronowym płuc perfundowanych 5'-AMP i Pb (NO₃)₂ wykazały złogi fosforanu ołowiu w pęcherzykach pinocytarnych otwartych do światła naczyń. Dane te wskazują, że nukleotydy są hydrolizowane przez esterazę fosforanową, znajdującą się w cytoplazmatycznych pęcherzykach plazmolemalnych lub pęcherzykach pinocytarnych śródbłonka [141]. Podobną aktywność enzymatyczną stwierdzono w pęcherzykach pinocytarnych śródbłonka serca i przepony [151]. W związku z faktem, że nukleotydy adeninowe mogą być uwalniane z mięśni podczas wytężonej pracy lub powstania rany miażdżonej [48], płuca mogą zapobiegać ich wejściu do ogólnego krążenia tętniczego.

AMINY BIOGENNE

Serotonina, związek silnie kurczący naczynia krwionośne i powodujący agregację płytek, jest szybko usuwana z krwi podczas przepływu przez płuca wielu gatunków, w tym także płuca człowieka [5, 27, 37, 47, 49, 174, 190]. Zjawisku temu towarzyszy pojawienie się 5-hydroksyindolowego kwasu octowego w płucnym odpływie żylnym. Stopień inaktywacji mieści się w zakresie od 33 [30] do 98% [175] i zależy od warunków, w jakich przeprowadzano doświadczenia, lecz większość badaczy podaje stopień powyżej 50%. Usuwanie serotoniny przez płuca obejmuje transport dokomórkowy przez komórki śródbłonka płucnego, wewnątrzkomórkowy metabolizm oraz uwalnianie produktów metabolizmu. Być może pierwsza wskazówka co do losu serotoniny w płucach pochodziła z 1925 r. z badań Starlinga i Verney'a [168]. Dalsze badania za pomocą technik autoradiograficznych wykazały, że komórki śródbłonka płuc [171] oraz komórki śródbłonka w hodowli [92] wychwytyują radioaktywność pochodzącą z infuzji (³H) serotoniny. Podobne badania biochemiczne udowodniły, że wchłanianie (³H) serotoniny przez płuca jest procesem aktywnym i przebiega aż do nasycenia. Jest to transport wymagający

energii, zależny od jonów Na^+ , zachodzący za pośrednictwem nośnika i związany z ATP-azą zależną od jonów Na^+ i K^+ [47, 170]. Absorpcja jest hamowana przez imipraminę, chloropromazyne, kokainę, wysokie zewnątrzkomórkowe stężenie jonów K^+ i niskie zewnątrzkomórkowe stężenie jonów Na^+ [19, 95]. Metabolizm serotoniny zachodzi wewnątrzkomórkowo [2]. Niedawno Small i wsp. [161] udowodnili, że hodowane komórki śródbłonna (pochodzące z aorty wołu i ludzkiej żyły pępkowej) metabolizują serotoninę do 5-hydroksyindolowego kwasu octowego. Tego typu przemiany metaboliczne nie są ograniczone tylko do endotelium, lecz występują także w fibroblastach ludzkiego napletka [134]. Przy użyciu techniki fluorescencyjnej Hillarp-Falck wykazano, iż serotonina jest wychwytywana *in vivo* przez komórki śródbłonkowe, lecz już po minucie jest magazynowana przez śródmiąższowe komórki tuczne [94].

Komórki śródbłonna płucnego biorą również udział w przetwarzaniu noradrenaliny w sposób podobny do metabolizmu serotoniny. 20-40% noradrenaliny jest inaktywowane podczas jednorazowego przejścia przez krążenie płucne [54-56, 82]. Badania autoradiograficzne płuc perfundowanych znakowaną noradrenaliną wykazują akumulację radioaktywności w komórkach śródbłonna [118]. Podobne wyniki uzyskano w hodowli komórek śródbłonna płucnego [92]. Wchłanianie noradrenaliny jest hamowane przez kokainę, imipraminę, quabainę, niską temperaturę i niskie stężenie jonów Na^+ w płynie zewnątrzkomórkowym [19, 151]. Chociaż wchłanianie serotoniny i noradrenaliny przez komórki śródbłonna zachodzi za pośrednictwem podobnego mechanizmu transportu, to istnieją różne farmakologicznie miejsca dokomórkowego transportu tych amin [84]. W różny sposób przebiega także wewnątrzkomórkowy metabolizm. Serotonina jest rozkładana przez oksydazę monoaminową (MAO) i dehydrogenazę aldehydową, natomiast noradrenalina jest metabolizowana przez komórki śródbłonkowe na drodze o-metylacji i dezaminacji za pośrednictwem oksydazy monoaminowej i metylotransferazy katecholowej [47].

Przetwarzanie amin biogennych w płucach, a najprawdopodobniej w komórkach śródbłonna jest procesem wybiórczym. Serotonina jest metabolizowana, histamina zaś nie i podobnie, noradrenalina jest, a adrenalina nie [181]. Endogenna histamina jest uwalniana z płuc podczas podawania tlenu [88].

LIPIDY I CHYLOMIKRONY

Komórki śródbłonna płuc, podobnie jak gruczoł sutkowy w okresie laktacji, mogą prawdopodobnie przetwarzać chylomikrony za pomocą lipazy lipoproteinowej [151]. Większość wchłoniętych w przewodzie po-

karmowym lipidów (ok. 95%) dostaje się do krwi żyły głównej górnej, a pierwszym narządem, do którego trafiają, są płuca. Wchłanianiu lipidów z przewodu pokarmowego towarzyszy wzrost zawartości lipidów płuc [96]. Występowanie esterazy, prawdopodobnie hydrolazy estrów glicerolowych wzdłuż powierzchni luminalnej endotelium płucnego [151], może mieć istotny związek z metabolizmem lipidów. Za miarę aktywności lipolitycznej płuc można uznać stężenie wolnych kwasów tłuszczowych we krwi przed przejściem i po przejściu przez narząd. Badania porównawcze stężeń wolnych kwasów tłuszczowych we krwi pobranej z prawej komory i aorty 20 pacjentów wykazały, iż zawartość ich zwiększa się we krwi po przejściu przez płuca [109]. Może to świadczyć o aktywności lipolitycznej płuc.

KININY I ANGIOTENSYNY

Od roku 1967 wiadomo, że płuca mogą wybiórczo przekształcać naczynioaktywne hormony polipeptydowe krążące we krwi. Ferreira i Vane [45], a następnie inni [3, 137] wykazali, że bradykinina jest w znacznym stopniu eliminowana podczas przejścia przez płucne łożysko naczyniowe, natomiast angiotensyna II nie jest inaktywowana w czasie przejścia przez płuca. Badania nad angiotensyną I wykazały, że odprowadzenie żylnie płuc perfundowanych angiotensyną I zawiera większą aktywność angiotensyny niż wskazywałaby na to ilość angiotensyny I użytej do perfuzji [117]. Świadczyłoby to o przekształcaniu się angiotensyny I w angiotensynę II podczas przejścia przez płuca. Przepuszczenia te potwierdzono badaniami Ryana i wsp. [139].

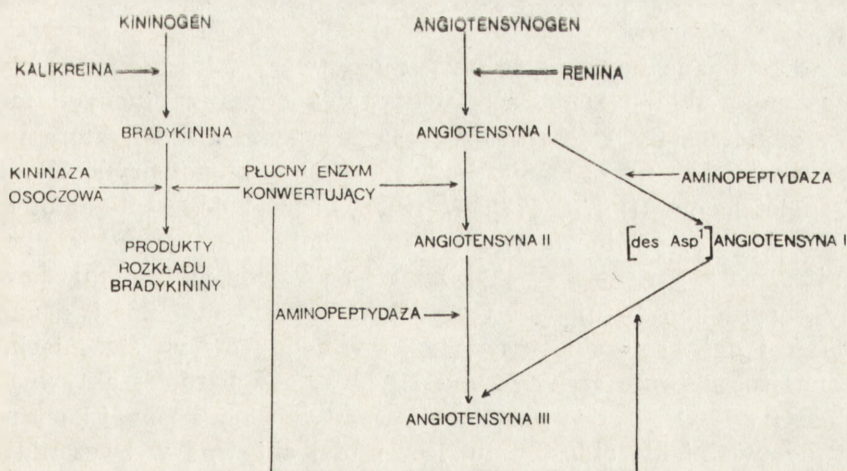
Pierwsza informacja o roli komórek śródbłonkowych w wybiórczym przekształcaniu hormonów i prohormonów pochodzi z badań znakowanej bradykininy w izolowanych i perfundowanych płucach [137]. Podczas jednokrotnego przejścia bradykininy przez płucne łożysko naczyniowe ulega hydrolizie co najmniej pięć z jej ośmiu wiązań peptydowych [21, 138]. Jednakże radioaktywność nie jest pochłaniana przez komórki śródbłonka, a jest odzyskiwana w tej samej ilości w odprowadzeniu żylnym płuca. Enzymy hydrolizujące wiązania peptydowe nie są uwalniane przez płuca, enzymy zaś krwi nie biorą udziału w hydrolizie bradykininy. Kinetyka metabolizmu bradykininy przez płuca jest identyczna z kinetyką przemian nukleotydów adeninowych, które są metabolizowane przez enzymy na luminalnej powierzchni komórek śródbłonka płuc [138, 141, 142, 156].

Podobne wyniki uzyskano w czasie badań znakowanej angiotensyny I. Ng i Vane [117] wykazali, że 40-50% angiotensyny I użytej do perfuzji

było w czasie 10 s przekształcane w angiotensynę II. Angiotensyna I pod wpływem enzymu konwertującego odszczepia dwupeptyd His-Leu i daje angiotensynę II, a także może metabolizować w kierunku innych polipeptydów [42, 139]. W procesach tych nie biorą udziału enzymy krwi, radioaktywność zaś nie jest pochłaniana przez płuca, a jest ponownie uwidaczniana w odprowadzeniu żylnym [43, 143].

Homogenaty całego płuca rozkładają angiotensynę I i bradykininę na wolne aminokwasy. Produkty tego typu nie są uzyskiwane w płucach nienaruszonych. Podobnie homogenaty płuc metabolizują angiotensynę II, która nie podlega przemianom w płucach nienaruszonych [76]. Jest rzeczą oczywistą, że nie wszystkie peptydazy i proteazy nienaruszonych płuc mają dostęp do substancji krążących we krwi, takich jak kininy i angiotensyny. Na podstawie tych wyników można założyć, że bradykinina i angiotensyna I są metabolizowane przez enzymy na/lub blisko powierzchni luminalnej płucnych komórek endotelialnych [139, 140, 143].

Obecnie wiadomo, że płuczny enzym konwertujący angiotensynę (kininaza II) może działać zarówno na bradykininę, jak i na angiotensynę I [34]. Zgodnie z nazwą, enzym ten przekształca angiotensynę I w angiotensynę II. Działa on jak karboksypeptydaza dwupeptydydowa o małej specyficzności [23, 35, 177, 193]. W rzeczywistości preferowanym substratem dla enzymu jest bradykinina, gdyż przekształcanie angiotensyny I w angiotensynę II można łatwo hamować przez dodawanie stosunkowo niskich stężeń bradykininy [23, 34]. Do tej pory nie wiadomo jednak, czy istnieje fizjologiczne współzawodnictwo między bradykininą a angiotensyną I w stosunku do enzymu konwertującego angiotensynę.



Ryc. 3. Schemat ilustrujący działanie płucnego enzymu konwertującego

Enzym ten po raz pierwszy został oczyszczony z płuca świni w 1972 r. Od tego czasu enzym konwertujący angiotensynę oczyszczono także z nerki świni, płuca ludzkiego [121], płuca szczura [99], płuca królika [16, 28, 29] i osocza krwi ludzkiej [16]. Dalszych danych dostarczyły badania immunocytochemiczne i immunofluorescencyjne z zastosowaniem przeciwciał dla enzymu konwertującego [146, 148, 149, 153]. Wykazano, że z przeciwciałami skierowanymi przeciw temu enzymowi reagowały komórki śródbłonka dużych tętnic, żył i naczyń włosowatych. Występowanie enzymu nie jest ograniczone do endotelium płucnego [154]. Wykryto go także w komórkach śródbłonka aorty [144, 152] oraz w naczyniach włosowatych trzustki, nadnerczy, wątroby i nerki [18]. Ponadto enzym ten można znaleźć w połączeniu z rąbkiem szczoteczkowym części proksymalnej nefronu oraz w komórkach śródbłonka ludzkiej żyły pępkowej [77, 187, 188]. Przeciwciała dla enzymu konwertującego angiotensynę wiążą się w płucu wyłącznie z komórkami śródbłonka. Badania hodowli komórek mięśnia gładkiego z głównego pnia tętnicy płucnej oraz komórek pęcherzykowych typu II nie wykazały aktywności enzymu konwertującego angiotensynę [22, 152].

Rozmieszczenie enzymu konwertującego na powierzchni luminalnej śródbłonka płuc prawdopodobnie ma związek z homeostazą ciśnienia krwi. Tak więc enzym inaktywujący bradykininę i tworzący angiotensynę II jest stale przemywany przez krew, przenosząc produkty jego reakcji do ogólnoustrojowej krwi tętniczej. Jak wykazano tu, enzym konwertujący angiotensynę wprawdzie występuje nie tylko w płucach, lecz w płucnym łożysku naczyniowym, nie następuje inaktywacja angiotensyny II i dlatego płuca są jedynym narządem produkującym angiotensynę II na eksport.

Najnowsze dane sugerują, że płuca mogą tworzyć jeszcze inną aktywną substancję układu renina-angiotensyna. Jednym z płucnych metabolitów angiotensyny I jest des-Asp¹-angiotensyna I [139], która może być przekształcana przez enzym konwertujący w angiotensynę III (des-Asp¹-angiotensyna II) [23, 177]. W rzeczywistości des-Asp¹-angiotensyna I ma większe powinowactwo do enzymu konwertującego angiotensynę niż sama angiotensyna I [23]. Na tej podstawie można wnioskować, że gdy enzym konwertujący występuje w ograniczonej ilości, a angiotensyna I i des-Asp¹-angiotensyna I są w jednakowych stężeniach, to tworzona jest głównie angiotensyna III. Jest ona bardziej aktywna od angiotensyny II w procesie pobudzania warstwy kłębuszkowej kory nadnerczy do uwalniania aldosteronu, lecz mniej aktywna w zwężaniu naczyń [13]. Tak więc płuca mogą dostarczać czynników humoralnych, wpływających na objętość krwi i na napięcie naczyń.

INNE HORMONY

Inne endogenne hormony nie były tak dokładnie badane, lecz wykazano wzajemne przekształcenia między kortyzolem i kortyzonem w krążeniu płucnym płodowych [14, 52] oraz dojrzałych płuc zwierząt [14, 119]. Ludzkie płuca płodów rozkładają testosteron [10], natomiast metabolizm insuliny i glukagonu zachodzi w płucnym krążeniu psa [51]. Ponadto wykazano inaktywację gastryny w płucach [98].

LEKI

Liczne leki o dużym znaczeniu terapeutycznym są usuwane przez krążenie płucne. Są to m.in.: amfetamina, methadon, morfina, chlorphenteramina, phenteramina, cyclizina, diphenhydramina, chloropromazyne, fluphenazyne, oksprenolol, propranolol, desipramina, czy imipramina [124, 125]. W większości są to zasadowe aminy o pK większym niż 8, a wielkość akumulacji w płucach wydaje się zależeć od określonych właściwości chemicznych [120, 129]. Dokładne komórkowe miejsca wychwytywania leków nie są znane, lecz szczegółowe badania imipraminy [6, 38, 91], methadonu [191] oraz innych leków wskazują, że akumulacja jest zależna od stopnia nasycenia składników leku.

FIBRYNOLIZA I KRZEPNIĘCIE KRWI

Badania Todda [176] wykazały, że komórki śródbłonna tętnicy płucnej żył i naczyń włosowatych zawierają czynnik inicjujący fibrynolizę. Czynnik ten, prawdopodobnie aktywator plazminogenu, występuje w dużej ilości w naczyniach krwionośnych płuc, serca i mózgu [17, 103, 104]. Przekształcanie plazminogenu w plazminę zachodzi również w hodowli komórek śródbłonna żyły głównej górnej [104].

Zapoczątkowanie procesu krzepnięcia krwi jest możliwe dzięki enzymom związanym z frakcją mikrosomów płuca. Badania przy użyciu przeciwciał połączonych z peroksydazą i skierowanych przeciw czynnikowi tkankowemu (tromboplastynie) płuca wołu wskazały, że antygen jest zlokalizowany w błonach plazmatycznych kilku różnych typów komórek, m.in. w komórkach śródbłonna tętnicy płucnej i jej naczyń [195]. Czynnik tkankowy ma aktywność peptydazy i hydrolizuje angiotensynę I, angiotensynę II, bradykininę, Lys-bradykininę, Met-Lys-bradykininę i substancję P. Na tej podstawie sądzono, że komórki śródbłonna

płuc mogą uczestniczyć w degradacji wymienionych tu substancji. Jednakże angiotensyna II i substancja P nie są hydrolizowane podczas przejścia przez płucne łożysko naczyniowe, a więc rola tromboplastyny w przekształcaniu krążących hormonów polipeptydowych nie jest jeszcze w pełni wyjaśniona [102].

W komórkach śródbłonna żyły pępkowej znaleziono antygen podobny do czynnika VIII, jednak bez aktywności prokoagulacyjnej [85, 86]. Podobny antygen zlokalizowano w komórkach śródbłonna naczyń w innych tkankach [20, 53, 81, 87, 89, 178]. Jednakże nie badano dotychczas zawartości czynnika VIII w śródbłonku płucnego łożyska naczyniowego.

LITERATURA

- [1] ADCOCK J. J., GARLAND R. G., MONCADA S., SALMON J. A., Enhancement of anaphylactic mediator release from guinea-pig perfused lungs by fatty acid hydroperoxides, *Prostaglandins* **16**: 163-175, 1978.
- [2] ALABASTER V. A., BAKHLE Y. S., Removal of 5-hydroxytryptamine in the pulmonary circulation of rat isolated lungs, *Brit. J. Pharmacol.*, **40**: 468-482, 1970.
- [3] ALABASTER V. A., BAKHLE Y. S., The inactivation of bradykinin in the pulmonary circulation of isolated lungs, *Brit. J. Pharmacol.*, **45**: 299-309, 1972.
- [4] ALABASTER V. A., HAWKESWOOD E., PGI₂ release from guinea-pig lungs: detection and bioassay, *Brit. J. Pharmacol.*, **62**: 467-468, 1978.
- [5] AL-UBAIDI F., BAKHLE Y. S., Metabolism of vasoactive hormones in human isolated lung, *Clin. Sci.*, **58**: 45-51, 1980.
- [6] ANDERSON M. W., ORTON T. C., PICKETT R. D., ELING T. E., Accumulation of amines in the isolated perfused rabbit lung, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **189**: 456-466, 1974.
- [7] ÄNGGARD E., SAMUELSSON B., Biosynthesis of prostaglandins from arachidonic acid in guinea-pig lung, *J. Biol. Chem.*, **240**: 3518-3521, 1965.
- [8] ARMSTRONG J. M., LATTIMER N., MONCADA S., VANE J. R., Comparison of the vasodepressor effects of prostacyclin and 6-oxo prostaglandin F_{1α} with those of prostaglandin E₂ in rats and rabbits, *Brit. J. Pharmacol.*, **62**: 125-130, 1978.
- [9] BECKER C. G., NACHMAN R. L., Contractile proteins of endothelial cells, platelets and smooth muscle, *Am. J. Pathol.*, **71**: 1-22, 1973.
- [10] BENAGIANO G., MANCUSO S., MANCUSO F. P., Studies on the metabolism of C-19 steroides in the human fetoplacental unit, *Acta Endocrinol.*, **57**: 187-207, 1968.
- [11] BITO L. Z., BAROODY R. A., REITZ M. E., Dependence of pulmonary prostaglandin metabolism on carrier-mediated transport process, *Am. J. Physiol.*, **232**: 382-387, 1977.
- [12] BLOCK E. R., STALCUP S. A., Metabolic functions of the lung. Of what clinical relevance?, *Chest*, **81**: 215-223, 1982.

- [13] BRAVO E. L., KHOSLA M. C., BUMPUS F. M., The role of angiotensins in aldosterone production, *Circ. Res. (Suppl. 2)*, **38**: 104-107, 1976.
- [14] BROOKES S. M., SHOLITON L. J., WESSEL J. J., BRANDON-TAYLOR B. S., Cortisol metabolism by the lung, *Chest (Suppl.)*, **71**: 275-279, 1977.
- [15] BRYANT R. W., FEINMARK S. J., MAKHEJA A. N., BAILEY J. M., Lipid metabolism in cultured cells. Synthesis of vasoactive thromboxane A₂ from (¹⁴C)-arachidonic acid by cultured lung fibroblasts, *J. Biol. Chem.*, **253**: 8134-8142, 1978.
- [16] BULL H. G., THORNBERRY N. A., CORDES E. H., Purification of angiotensin converting enzyme from rabbit lung and human plasma by affinity chromatography, *J. Biol. Chem.*, **260**: 2963-2972, 1985.
- [17] BUSCH P. C., OWEN W. G., Identification in vitro of an endothelial cell surface cofactor for antithrombin III. Parallel studies with isolated perfused rat hearts and microcarrier cultures of bovine endothelium, *J. Clin. Invest.*, **69**: 726-731, 1981.
- [18] CALDWELL P. R. B., SEEGAL B. C., HSU K. C., DAS M., SOFFER R. L., Angiotensin-converting enzyme: vascular endothelial localization, *Science*, **191**: 1050-1051, 1976.
- [19] CATRAVAS J. D., GILLIS C. N., Pulmonary clearance of ¹⁴C-5-hydroxy tryptamine and ³H-norepinephrine in vivo: effects of pretreatment with imipramine or cocaine, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **213**: 120-127, 1980.
- [20] CHAN T. K., CHAN V., Factor VIII-RAg from human endothelial cells, *Thromb. Haemost.*, **46**: 37-43, 1981.
- [21] CHERRY P. D., FURCHGOTT R. F., ZAWADZKI J. V., JOTHIANANDAN D., Role of endothelial cells in relaxation of isolated arteries by bradykinin, *Proc. Natnl. Acad. Sci. USA*, **79**: 2106-2112, 1982.
- [22] CHIU A. T., RYAN J. W., RYAN U. S., DORER F. E., Asensitive radiochemical assay for angiotensin-converting enzyme (kinase II), *Biochem. J.*, **149**: 297-300, 1975.
- [23] CHIU A. T., RYAN J. W., STEWART J. M., DORER F. E., Formation of angiotensin III by angiotensin-converting enzyme, *Biochem. J.*, **155**: 189-192, 1976.
- [24] CHRIST-HAZELHOF E., NUGTEREN D. H., Prostacyclin, a circulating hormone?, *Acta Therap.* **6** (Suppl.), **33**: (Abstr.), 1980.
- [25] CRUTCHLEY D. J., BOYD J. A., ELING T. E., Enhanced thromboxane B₂ release from challenged guinea-pig lung after oxygen exposure, *Am. Rev. Respir. Dis.*, **121**: 695-699, 1980.
- [26] CRUTCHLEY D. J., RYAN U. S., RYAN J. W., Effects of aspirin and dipyridamole on the degradation of adenosine diphosphate by cultured cells derived from bovine pulmonary artery, *J. Clin. Invest.*, **66**: 29-35, 1980.
- [27] DAS D. K., STEINBERG H., Specific binding of serotonin in rat lung, *Am. J. Physiol.*, **248**: E58-63, 1985.
- [28] DAS M., SOFFER R. L., Pulmonary angiotensin-converting enzyme. Structural and catalytic properties, *J. Biol. Chem.*, **250**: 6762-6768, 1975.
- [29] — Pulmonary angiotensin-converting enzyme antienzyme antibody, *Biochemistry* **15**: 5088-5094, 1976.
- [30] DAVIS R. B., WANG Y., Rapid pulmonary removal of 5 hydroxytryptamine in the intact dog, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **118**: 799-800, 1965.
- [31] DAWSON W., BOOT J. R., COCKERILL A. F., MULLEN D. N. B., OSBORNE

- D. J., The release of novel prostaglandins and thromboxanes after immunological challenge of guinea-pig lung, *Nature (London)*, **262**: 699-702, 1976.
- [32] DeCLERK F., DeBRABANDER M., Direct evidence for the contractility of endothelial cells, *Thromb. Res.*, **23**: 505-509, 1981.
- [33] DIERTERLE Y., ODY C., EHRENSBERGER A., STALDER H., JUNOD A. F., Metabolism and uptake of ATP and adenosine by porcine aortic and pulmonary endothelial cells and fibroblasts in culture, *Circ. Res.*, **42**: 869-876, 1978.
- [34] DORER F. E., KAHN J. R., LENTZ K. E., LEVINE M., SKEGGS L. T., Hydrolysis of bradykinin by angiotensin-converting enzyme, *Circ. Res.*, **34**: 824-827, 1974.
- [35] — Formation of angiotensin II from tetradecapeptide renin substrate by angiotensin-converting enzyme, *Biochem. Pharmacol.*, **24**: 1137-1139, 1975.
- [36] DRENCKHAHN D., Cell motility and cytoplasmic filaments in vascular endothelium, *Progr. Appl. Microcirc.*, **1**: 53-58, 1983.
- [37] EISEMAN B., BRYANT B., WALTUCH T., Metabolism of vasomotor agents by the isolated perfused lung, *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.*, **48**: 798-806, 1964.
- [38] ELING T. E., PICKETT R. D., ORTON T. C., ANDERSON M. W., A study of the dynamics of imipramine accumulation in the isolated perfused rabbit lung, *Drug Metab. Dispos.*, **3**: 389-400, 1975.
- [39] ELING T. E., ANDERSON M. W., Studies on the biosynthesis, metabolism and transport of prostaglandins by the lung, *Agents Actions* **6**: 543-546, 1976.
- [40] ELING T. E., ALLY A. I., Pulmonary biosynthesis and metabolism of prostaglandins and related substances, *Bull. Europ. Physiopath. Resp.*, **17**: 611-625, 1981.
- [41] EMAU P., GIRI S. N., BRUSS M. L., Role of prostaglandins, histamine and serotonin in the pathophysiology induced by pasteurized hemolytic endotoxin in sheep, *Circ. Shock* **12**: 47-51, 1984.
- [42] ERDÖS E. G., Conversion of angiotensin I to angiotensin II, *Am. J. Med.*, **60**: 749-759, 1976.
- [43] FANBURG B. L., GLAZIER J. B., Conversion of angiotensin 1 to angiotensin 2 in the isolated perfused dog lung, *J. Appl. Physiol.*, **35**: 325-331, 1973.
- [44] FERREIRA S. H., VANE J. R., Prostaglandins: their disappearance from and release into the circulation, *Nature* **216**: 868-873, 1967.
- [45] — The disappearance of bradykinin and eledoisin in the circulation and vascular beds of the cat, *Br. J. Pharmacol. Chemother.*, **30**: 417-424, 1967.
- [46] FISHMAN A. P., Dynamics of the pulmonary circulation, [w] *Handbook of physiology section 2: circulation*, vol. 2., red. W. F. Hamilton, P. Dow, American Physiol. Soc. Washington 1963, 1667-1743.
- [47] FISHMAN A. P., PIETRA G. G., Handling of bioactive material by the lung, *N. Engl. J. Med.*, **290**: 884-890, 953-959, 1974.
- [48] FORRESTER T., LIND A. R., Adenosine triphosphate in the venous effluent and its relationship to exercise, *Federation Proc.*, **28**: 1280-1283, 1969.
- [49] GADDUM J. H., HEBB C. O., SILVER A., SWAN A. A. B., 5-hydroxytryptamine. Pharmacological action and destruction in perfused lungs, *Q. J. Exp. Physiol. Cogn. Med. Sci.*, **38**: 255-262, 1953.
- [50] GALDAL K. S., EVENSEN S. A., BROSTAD F., Thrombin induces injury to cultured human endothelial cells, *Proc. II: 2nd Int. Symp. on the Biol. of the Vasc. Endothelial Cell*, Cambridge, U.K., 1981, 30-35.
- [51] GEDDES D. M., BLACKBURN J. P., BAILEY J. S., MILLER F. J., Effects

- of pulmonary circulation on blood levels of insulin and glucagon in ambulant dogs, *J. Appl. Physiol.*, **46**: 593-598, 1979.
- [52] GIANNOPOULOS G., Uptake and metabolism of cortisone and cortisol by the foetal rabbit lung, *Steroids* **23**: 845-853, 1974.
- [53] GIDDINGS J. C., JARVIS A. L., BLOOM A. L., Factor VIII related antigen (FVIII RAG) in porcine endothelial cells, *Thromb. Haemostas.*, **46**: 37-43, 1981.
- [54] GILLIS C. N., GREENE N. M., CRONAU L. H., HAMMOND G. L., Pulmonary extraction of 5-hydroxytryptamine and norepinephrine before and after cardipulmonary bypass in man, *Circ. Res.*, **30**: 666-674, 1972.
- [55] GINN R., VANE J. R., Disappearance of catecholamines from the pulmonary circulation, *Br. J. Pharmacol.*, **35**: 209-242, 1968.
- [56] — Disappearance of catecholamines from the circulation, *Nature (Lond.)*, **219**: 740-742, 1968.
- [57] GOLUB M., ZIA P., MATSUMO M., HORTON R., Metabolism of PGA_1 and E_1 in man, *J. Clin. Invest.*, **56**: 1404-1410, 1975.
- [58] GRYGLEWSKI R. J., KORBUT R., OCETKIEWICZ A., Generation of prostacyclin by lungs in vivo and its release into the arterial circulation, *Nature (Lond.)*, **273**: 765-767, 1978.
- [59] GRYGLEWSKI R. J., KORBUT R., OCETKIEWICZ A., SPŁAWIŃSKI J., WOJTASZEK B., SWIES J., Lungs as a generator of prostacyclin-hypothesis on physiological significance, *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, **304**: 45-50, 1978.
- [60] GRYGLEWSKI R. J., KORBUT R., SPŁAWIŃSKI J., A new endocrine-like function of the lungs: generation of prostacyclin, *Materia Med. Pol.*, **37**: 247-253, 1978.
- [61] GRYGLEWSKI R. J., The lung as a generator of prostacyclin, [w] *Metabolic Activities of the Lung*, red. R. Porter, J. Whelan, Ciba Foundation Symposium 78, Excerpta Medica, Amsterdam 1980, 147-156.
- [62] GRYGLEWSKI R. J., SPŁAWIŃSKI J., KORBUT R., Endogenous mechanisms that regulate prostacyclin release, [w] *Advances in Prostaglandin and Thromboxane Research*, vol. 7, red. B. Samuelsson i wsp., Raven Press, New York 1980, 777-787.
- [63] HADDY F. J., SCOTT J. B., Metabolically linked vasoactive chemicals in local regulation of blood flow, *Physiol. Rev.*, **48**: 688-691, 1968.
- [64] HAMBERG M., SAMUELSSON B., Prostaglandin endoperoxides. VIII. Novel transformations of arachidonic acid in guinea pig lung, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **61**: 942-947, 1974.
- [65] HAMMERSEN F., Endothelial contractility-does it exist?, *Adv. Microcirc.*, **9**: 95-97, 1980.
- [66] HAMMOND G. L., CRONAU L. H., WHITTAKER D., GILLIS C. N., Fate of prostaglandins E_1 and A_1 in the human pulmonary circulation, *Surgery* **81**: 716-722, 1977.
- [67] HARPER T. W., WESTCOTT J. Y., VOELKEL N., MURPHY R. C., Metabolism of leukotrienes B4 and C4 in the isolated perfused rat lung, *J. Biol. Chem.*, **259**, 14437-14440, 1984.
- [68] HARTIALA J., TOIVONEN H., UOTILA P., Demonstration of PGI_2 production by isolated perfused rat lungs with platelet aggregation test, *Prostaglandins* **20**: 127-134, 1980.
- [69] HAWKINS H. J., WILSON A. G. E., ANDERSON M. W., ELING T. E., Uptake and metabolism of prostaglandins by isolated perfused lung: species

- comparisons and the role of plasma protein binding, *Prostaglandins* **14**: 251-259, 1977.
- [70] HECHTMAN H. B., SHEPRO D., Lung metabolism and systemic organ function, *Circ. Shock* **9**: 457-467, 1982.
- [71] HEMLER M., LANDS W. E. M., SMITH W. L., Purification of the cyclo-oxygenase that forms prostaglandins. Demonstration of two forms of iron in the holoenzyme, *J. Biol. Chem.*, **251**: 5575-5579, 1976.
- [72] HENSBY C. N., BARNES P. J., DOLLERY C. T., DARGIE H., Production of 6-oxo-PGF_{1 α} by human in vivo, *Lancet* **2**: 1162-1163, 1979.
- [73] HERMAN A. G., MONCADA S., VANE J. R., Formation of prostacyclin (PGI₂) by different layers of the arterial wall, *Arch. Int. Pharmacodyn.*, **227**: 162-163, 1977.
- [74] HERMAN A. G., CLAEYS M., MONCADA S., VANE J. R., Prostacyclin production by rabbit aorta, pericardium, pleura, peritoneum and dura mater, *Arch. Int. Pharmacodyn.*, **236**, 303-304, 1978.
- [75] HERMAN I. M., POLLARD T. D., WONG A. J., Contractile proteins in endothelial cells, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **401**: 50-54, 1982.
- [76] HESSE B., RASMUSSEN S., HILUND-CARLSEN P. F., DAMKJAER-NIELSEN M., HARTLING O. J., MAVVING J., GIESE J., Generation and elimination of angiotensins I and II in the kidney, liver and lung, *Acta Med. Scand. (Suppl.)*, **677**: 97-100, 1983.
- [77] HIAL V., GIMBRONE M. A. Jr., WILCOX G., PISANO J. J., Human vascular endothelium contains angiotensin I converting enzyme and renin-like activity, *Federation Proc.*, **35**: 705-708, 1976.
- [78] HINEK A., Komórki śródbłónka, [w] *Struktura funkcjonalna komórek i tkanek*, red. Z. Bielańska-Osuchowska, J. Kawiak, PWN, Warszawa 1981, 87-102.
- [79] HORTON E. W., JONES R. L., Prostaglandins A1, A2 and 19-hydroxyA1; their actions on smooth muscle and their inactivation on passage through the pulmonary and hepatic portal vascular beds, *Brit. J. Pharmacol.*, **37**: 705-722, 1969.
- [80] HOUSSET B., Biochemical response of endothelial cells to hyperoxia, *Curr. Probl. Clin. Biochem.*, **13**: 82-87, 1983.
- [81] HOYER L. W., De los SANTOS R. P., HOYER J. R., Antihemophilic factor antigen. Localization in endothelial cells by immunofluorescent microscopy, *J. Clin. Invest.*, **52**: 2737-2744, 1973.
- [82] HUGHES J., GILLIS C. N., BLOOM T. E., The uptake and disposition of dl-noradrenaline in perfused rat lung, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **169**: 237-248, 1969.
- [83] INGERMAN-WOJENSKI C., SILVER M. J., SMITH J. B., MACARAK E., Bovine endothelial cells in culture produce tromboxane as well as prostacyclin, *J. Clin. Invest.*, **67**: 1292-1296, 1981.
- [84] IWASAWA Y., GILLIS C. N., Pharmacological analysis of norepinephrine and 5-hydroxytryptamine removal from the pulmonary circulation: Differentiation of uptake site for each amine, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **188**: 386-392, 1974.
- [85] JAFFE E. A., HOYER L. W., NACHMAN R. L., Synthesis of antihemophilic factor antigen by cultured human endothelial cells, *J. Clin. Invest.*, **52**: 2757-2764, 1973.
- [86] JAFFE E. A., NACHMAN R. L., BECKER C. G., MINICK C. R., Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. Identification by morphologic and immunologic criteria, *J. Clin. Invest.*, **52**: 2745-2756, 1973.

- [87] JAFFE E. A., Synthesis of factor VIII by endothelial cells, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **401**: 163-168, 1982.
- [88] JANUSZKIEWICZ A. J., FAIMAN M. D., The effect of in vivo hyperoxic exposure on the release of endogenous histamine from the rat isolated perfused lung, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **72**: 134-141, 1984.
- [89] JEANNEAU C., SULTAN Y., Intracellular localization of FVIII-RAG: in platelet and endothelial cells using peroxidase FAB conjugates in electron microscopy, *Thromb. Haemost.*, **46**: 37-42, 1981.
- [90] JOHNSON A. R., Human pulmonary endothelial cells in culture. Activity of cells from arteries and cells from veins, *J. Clin. Invest.*, **65**: 841-850, 1980.
- [91] JUNOD A. F., Accumulation of ¹⁴C imipramine in isolated perfused rat lungs, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **183**: 182-187, 1972.
- [92] JUNOD A. F., ODY C., Amine uptake and metabolism by endothelium of pig pulmonary artery and aorta, *Am. J. Physiol.*, **232**: 88-94, 1977.
- [93] JUNOD A. F., The metabolic function of the pulmonary endothelium: its clinical relevance, *Curr. Probl. Clin. Biochem.*, **13**: 116-122, 1983.
- [94] KJELLSTRÖM T., AHLMAN H., DAHLSTRÖM A., RISBERG B., The cellular uptake of 5-hydroxytryptamine in the rat lung in vivo — a histochemical study, *Acta Physiol. Scand.*, **116**: 455-460, 1982.
- [95] KJELLSTRÖM T., AHLMAN H., DAHLSTRÖM A., HANSSON G. K., RISBERG B., The uptake of 5-hydroxytryptamine in endothelial cells cultured from the pulmonary artery in rats — a cytochemical study, *Acta Physiol. Scand.*, **120**: 243—250, 1984.
- [96] KLUGE A., SCHMIDT H., Zur Bedeutung der Lange als Fettdepot, *Klin. Wochenschr.*, **36**: 1138-1142, 1958.
- [97] KOBAYASHI T., Effect of ozone exposure on prostacyclin synthesis in lung, *Prostaglandins* **26**: 1021-1027, 1983.
- [98] KORMAN M. G., HANSKY J., RITCHIE B. C., Disappearance of gastrin across the lung, *Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci.*, **51**: 679-687, 1973.
- [99] LANZILLO J. J., FANBURG B. L., Membrane-bound angiotensin-converting enzyme from rat lung, *J. Biol. Chem.*, **249**: 2312-2318, 1974.
- [100] LAPOSATA M., DOVNARSY D. K., SHIN H. S., Thrombin-induced gap formation in confluent endothelial cell monolayers in vitro, *Blood* **62**: 549-557, 1983.
- [101] LEVESQUE M. L., NEREM R. M., Hemodynamics and vascular endothelium, *Int. J. Microcirc.*, **1**: 239-240, 1982.
- [102] LOLLAR P., OWEN W. G., Clearance of thrombin from circulation in rabbits by high-affinity binding sites on endothelium. Possible role in the inactivation of thrombin by antithrombin III, *J. Clin. Invest.*, **66**: 1222-1226, 1980.
- [103] LOSKUTOFF D. J., EDGINGTON T. S., Synthesis of fibrinolytic activator and inhibitor by endothelial cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **74**: 3903-3907, 1977.
- [104] LOSKUTOFF D. J., EDGINGTON T. S., An inhibitor of plasminogen activator in rabbit endothelial cells, *Thrombos. Haemostas.*, **46**: 82-87, 1981.
- [105] MacINTYRE D. E., PEARSON J. D., GORDON J. L., Localization and stimulation of prostacyclin production in vascular cells, *Nature (Lond.)*, **271**: 549-551, 1978.
- [106] McGIFF J. C., TERRAGNO N. A., STRAND J. C., LEE J. B., LONIGRO A. J., NG K. K. F., Selective passage of prostaglandins across the lung, *Nature* **223**: 742-745, 1969.
- [107] McGUIRE J. C., SUN F. F., Metabolism of prostacyclin. Oxidation by Rhesus-

- monkey lung 15-hydroxyl prostaglandin dehydrogenase, *Arch. Biochem. Biophys.*, **189**: 92-96, 1978.
- [108] METHA J., ROBERTS A., Human vascular tissues produce thromboxane as well as prostacyclin, *Am. J. Physiol.*, **244**: 839-845, 1983.
- [109] MICHAJLIK A., BARTNIKOWSKA E., Czy płuca biorą udział w przemianie lipidowej?, *Pol. Tyg. Lek.*, **37**: 823-824, 1982.
- [110] MONCADA S., GRYGLEWSKI R., BUNTING S., VANE J. R., An enzyme isolated from arteries transforms PG endoperoxides to an unstable substance that inhibits platelet aggregation, *Nature (Lond.)*, **263**: 663-665, 1976.
- [111] MONCADA S., HERMAN A. G., HIGGS E. A., VANE J. R., Differential formation of prostacyclin (PGX or PGI_2) by layers of the arterial wall. An explanation for the anti-thrombotic properties of vascular endothelium, *Thromb. Res.*, **11**: 323-344, 1977.
- [112] MONCADA S., KORBUT R., BUNTING S., VANE J. R., Prostacyclin is a circulating hormone, *Nature (Lond.)*, **273**: 767-768, 1978.
- [113] MONCADA S., VANE J. R., Pharmacology and endogenous roles of prostaglandin endoperoxides, thromboxane A_2 and prostacyclin, *Pharmacol. Rev.*, **30**: 293-331, 1978.
- [114] MORRIS H. R., PIPER P. J., TAYLOR G. W., TIPPINS J. R., The role of arachidonate lipoxygenase in the release of SRS-A from guinea-pig chopped lung, *Prostaglandins* **19**: 371-383, 1980.
- [115] MULLANE K. M., MONCADA S., Prostacyclin release and the modulation of some vasoactive hormones, *Prostaglandins* **20**: 25-49, 1980.
- [116] NEWMAN J. H., SHELLER J. R., Arachidonic acid metabolites in the healthy and diseased lung, *Am. J. Med. Sci.*, **288**: 75-80, 1984.
- [117] NG K. K. F., VANE J. R., The conversion of angiotensin I to angiotensin II, *Nature (Lond.)*, **216**: 762-766, 1967.
- [118] NICHOLAS T. E., STRUM J. M., ANGELO L. S., JUNOD A. F., Site and mechanism of uptake of 3H -l-norepinephrine by isolated perfused rat lung, *Circ. Res.*, **35**: 670-678, 1974.
- [119] NICHOLAS T. E., KIM P. A., The metabolism of 3H cortisone and 3H cortisol by the isolated perfused rat and guinea pig lungs, *Steroids*, **25**: 387-402, 1975.
- [120] ORTON T. C., ANDERSON M. W., PICKETT R. D., ELING T. E., Xenobiotic accumulation and metabolism by isolated perfused rabbit lungs, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **186**: 482-497, 1973.
- [121] OSHIMA G., GECSE A., ERDÖS E. G., Angiotensin I-converting enzyme of the kidney cortex, *Biochim. Biophys. Acta*, **350**: 26-37, 1974.
- [122] PACE-ASCIAC C. R., RANGARAJ G., Distribution of prostaglandin biosynthetic pathways in several rat tissues. Formation of 6-keto prostaglandin $F_{1\alpha}$, *Biochim. Biophys. Acta*, **486**: 579-582, 1977.
- [123] PACE-ASCIAC C. R., ROSENTHAL A., DOMAZET Z., Comparison between the in vivo rate of metabolism of prostaglandin I_2 and its blood-pressure-lowering response after intravenous administration in the rat, *Biochim. Biophys. Acta*, **574**: 182-186, 1979.
- [124] PANG J. A., BLACKBURN J. P., BUTLAND R. J. A., GEDDES D. M., First pass propranolol uptake by dog lungs in vivo, *Br. J. Pharmacol.*, **70**: 114, 1980.
- [125] PANG J. A., GEDDES D. M., The biochemical properties of the pulmonary circulation, *Lung* **159**: 231-242, 1981.

- [126] PIPER P. J., VANE J. R., Release of additional factors in anaphylaxis and its antagonism by anti-inflammatory drugs, *Nature (London)* **223**: 29-35, 1969.
- [127] PIPER P. J., VANE J. R., VYLLIE J. H., Inactivation of prostaglandins by the lungs, *Nature* **225**: 600-604, 1970.
- [128] PIPER P. J., VANE J. R., The release of prostaglandins from lungs and other tissues, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **180**: 363-385, 1971.
- [129] PHILPOT R. M., ANDERSON M. W., ELING T. E., Uptake, accumulation and metabolism of chemicals by the lung, [w] *Metabolic Functions of the Lung*, red. Y. S. Bakhle, J. R. Vane, Marcel Dekker Inc., New York 1977, 123-171.
- [130] POLGAR P., YASKOSKI K., TAYLOR L., Prostaglandin synthesis in aging and developing cells from the lung, *Federation Proc.*, **38**: 406 (Abstr.) 1979.
- [131] POLGAR P., TAYLOR L., Stimulation of prostaglandin synthesis by ascorbic acid via hydrogen peroxide formation, *Prostaglandins* **19**: 693-701, 1980.
- [132] RHODIN J. A. G., *Histology*, New York—Oxford University Press—London—Toronto 1974, 607-645.
- [133] ROBINSON C., HARDY C. C., HOLGATE S. T., Pulmonary synthesis, release and metabolism of prostaglandins, *J. Allergy Clin. Immunol.*, **76**: 265-271, 1985.
- [134] ROBINSON-WHITE A., PETERSON S., HECHTMAN H. B., SHEPRO D., Serotonin uptake by isolated adipose capillary endothelium, *J. Pharm. Exp. Ther.*, **316**: 125-128, 1981.
- [135] ROME L. H., LANDS E. M., ROTH G. J., MAJERUS P. W., Aspirin as a quantitative acetylating reagent for the fatty acid oxygenase that forms prostaglandins, *Prostaglandins* **11**: 23-30, 1976.
- [136] ROTH G. J., MAJERUS P. W., The mechanism of the effect of aspirin on human platelets. I. Acetylation of a particulate fraction protein, *J. Clin. Invest.*, **56**: 624-632, 1975.
- [137] RYAN J. W., ROBLERO J., STEWART J. M., Inactivation of bradykinin in the pulmonary circulation, *Biochem. J.*, **110**: 795-797, 1968.
- [138] RYAN J. W., ROBLERO J., STEWART J. M., Inactivation of bradykinin in rat lung, *Adv. Exp. Med. Biol.*, **8**: 263-271, 1970.
- [139] RYAN J. W., STEWART J. M., LEARY W. P., LEDINGHAM J. G., Metabolism of angiotensin I in the pulmonary circulation, *Biochem. J.*, **120**: 221-223, 1970.
- [140] RYAN J. W., NIEMEYER R. S., GOODWIN D. W., SMITH U., STEWART J. M., Metabolism of (8- α -)¹⁴C(phenylalanine)-angiotensin I in the pulmonary circulation, *Biochem. J.*, **125**: 921-923, 1971.
- [141] RYAN J. W., SMITH U., Metabolism of adenosine 5-monophosphate during circulation through the lungs, *Trans. Assoc. Am. Physicians* **84**: 297-306, 1971.
- [142] RYAN J. W., NIEMEYER R. S., GOODWIN D. W., Metabolic fates of bradykinin, adenine nucleotides and prostaglandin E₁ and F_{2 α} in the pulmonary circulation, *Adv. Exp. Med. Biol.*, **21**: 259-265, 1972.
- [143] RYAN J. W., SMITH U., NIEMEYER R. S., Angiotensin I: metabolism by plasma membrane of lung, *Science* **176**: 64-66, 1972.
- [144] RYAN J. W., SMITH U., The metabolism of angiotensin I by endothelial cells, [w] *Proteides of the Biological Fluids*, red. H. Peeters, Pergamon, Oxford 1973, 379-456.

- [145] RYAN J. W., NIEMEYER R. S., RYAN U., Metabolism of prostaglandin F₁α in pulmonary circulation, *Prostaglandins* **10**: 101-108, 1975.
- [146] RYAN J. W., RYAN U. S., Metabolic activities of plasma membrane and caveolae of pulmonary endothelial cells, with a note on pulmonary prostaglandin synthetase, [w] *Lung Metabolism*, red. A. F. Junod, R. de Haller, Academic Press, New York 1975, 399-424.
- [147] RYAN J. W., RYAN U. S., Proceedings: Pulmonary endothelial cells, metabolism of vasoactive substances, *Thromb. Diath. Haemorrh.*, **34**: 330, 1975.
- [148] RYAN J. W., RYAN U. S., SCHULTZ D. R., WHITAKER C., CHUNG A., DORER F. E., Subcellular localization of pulmonary angiotensin-converting enzyme (kininase II), *Biochem. J.*, **146**: 497-499, 1975.
- [149] RYAN J. W., DAY A. R., RYAN U. S., CHUNG A., MARLBOROUGH D. I., DORER F. E., Localization of angiotensin converting enzyme (kininase II). I. Preparation of antibody-hemecapeptide conjugates, *Tissue Cell* **8**: 111-124, 1976.
- [150] RYAN J. W., RYAN U. S., Correlation of pulmonary structure with pharmacokinetic function, *Agents Actions* **6**: 510-515, 1976.
- [151] RYAN J. W., RYAN U. S., Pulmonary endothelial cells, *Federation Proc.*, **36**: 2683-2691, 1977.
- [152] RYAN U. S., RYAN J. W., CHIU A., Kininase II (angiotensin converting enzyme) and endothelial cells in culture, *Adv. Exp. Med. Biol.*, **70**: 217-227, 1976.
- [153] RYAN U. S., RYAN J. W., WHITAKER C., CHIU A., Localization of angiotensin converting enzyme (kininase II). II. Immunocytochemistry and immunofluorescence, *Tissue Cell* **8**: 125-145, 1976.
- [154] RYAN U. S., RYAN J. W., Angiotensin-converting enzyme: II. Pulmonary endothelial cells in culture, *Environ. Health Perspect.*, **35**: 171-180, 1980.
- [155] RYAN U. S., Isolation and culture of pulmonary endothelial cells, *Environ. Health Perspect.*, **56**: 103-114, 1984.
- [156] RYAN U. S., RYAN J. W., Cell biology of pulmonary endothelium, *Circulation* **70**: 46-62, 1984.
- [157] SALDEEN T., SALDEEN P., Pathological vessels produce thromboxane, *Int. J. Microcirc. Clin. Exp.*, **3**: 88-92, 1984.
- [158] SHEPRO D., D'AMORE P. A., Endothelial cell metabolism, *Adv. Microcirc.*, **9**: 161-205, 1980.
- [159] SIMIONESCU M., Ultrastructural organization of the alveolar-capillary unit, [w] *Metabolic Activities of the Lung*, red. R. Porter, J. Whelan, Ciba Foundation Symposium, new ser. **78**, Elsevier, Holland 1980, 11-36.
- [160] SIMIONESCU M., Alveolar capillary endothelium, functional morphology, *Curr. Probl. Clin. Biochem.*, **13**: 74-81, 1983.
- [161] SMALL R., MACARAK E., FISHER A. B., Production of 5-hydroxyindolacetic acid from serotonin by cultured endothelial cells, *J. Cell Physiol.*, **90**: 225-231, 1977.
- [162] SMITH U., RYAN J. W., An electron microscopic study of the vascular endothelium as a site for bradykinin and ATP inactivation in rat lung, [w] *Advances in Experimental Medicine Biology*, vol. **8**, red. N. Back, F. Sicuteri, M. Rocha e Silva, Plenum Press, New York 1970, 249-262.
- [163] SMITH U., RYAN J. W., MICHIE D. D., SMITH D. S., Endothelial projections as revealed by scanning electron microscopy, *Science* **173**: 925-927, 1971.

- [164] SMITH U., RYAN J. W., Electron microscopy of endothelial and epithelial components of the lung: correlations of structure and function, *Federation Proc.*, **32**: 1957-1962, 1973.
- [165] SOROKIN S. P., The cell of the lungs, [w] *Morphology of Experimental Carcinogenesis*, red. P. Nettesheim, M. G. Hanna, Jr., J. W. Deatherage, Oak Ridge, TN.US. Atomic Energy Comission 1970, 3-41.
- [166] SPŁAWIŃSKI J., GRYGLEWSKI R. J., Release of prostacyclin by the lung, *Bull. Europ. Physiopath. Resp.*, **17**: 553-569, 1981.
- [167] SPŁAWIŃSKI J., WOJTASZEK B., MARCINKIEWICZ E., Bioassay of thromboxane A₂ by contraction of guinea-pig parenchymal lung strip, *Thromb. Res.*, **21**: 35-44, 1981.
- [168] STARLING E. H., VERNEY E. B., The secretion of urine as studied on the isolated kidney, *Proc. Roy. Soc. Lond. Biol. Sci.*, **97**: 321-363, 1925.
- [169] STEER M. L., MACINTYRE D. E., LEVIBE L., SALZMAN E. W., Is prostacyclin a physiologically important circulating anti-platelet agent?, *Nature (Lond.)* **283**: 194-195, 1980.
- [170] STEINBERG H., BASSETT D. J. P., FISHER A. B., Depression of pulmonary 5-hydroxytryptamine uptake by metabolic inhibitors, *Am. J. Physiol.*, **228**: 1298-1303, 1975.
- [171] STRUM J. M., JUNOD A. F., Radioautographic demonstration of 5-hydroxytryptamine ³H uptake by pulmonary endothelial cells, *J. Cell. Biol.*, **54**: 456-458, 1972.
- [172] SVENSSON J., HAMBERG M., SAMUELSSON B., Prostaglandin endoperoxides. IX. Characterization of rabbit aorta contracting substance (RCS) from guinea-pig lung and human platelets, *Acta Physiol. Scand.*, **94**: 222-228, 1975.
- [173] SZCZEKLIK A., GRYGLEWSKI R. J., NIZANKOWSKI R., MUSIAŁ J., PIĘTON R., MRUK J., Circulatory and anti-platelet effects of intravenous prostacyclin in healthy men, *Pharmacol. Res. Commun.*, **10**: 545-556, 1978.
- [174] TARKKA M., Removal of serotonin (5-hydroxytryptamine) by the lungs. An experimental study in dogs, *Scand. J. Thorac. Cardiovasc. Surg. Suppl.*, **32**: 8-56, 1981.
- [175] THOMAS D. P., VANE J. R., 5 hydroxytryptamine in the circulation of the dog, *Nature (Lond.)* **216**: 335-338, 1967.
- [176] TODD A. S., The histological localization of fibrinolysin activator, *J. Pathol. Bacteriol.*, **78**: 281-293, 1959.
- [177] TSAI B. S., PEACH M. J., KHOSLA M. C., BUMPUS F. M., Synthesis and evaluation of (Des-Asp1)angiotensin I as a precursor for (Des-Asp1)angiotensin II (angiotensin III), *J. Med. Chem.*, **8**: 1180-1183, 1975.
- [178] TUDDENHAM E. G. D., LAZARCHICK J., HOYER L. W., Synthesis and release of factor VIII by cultured human endothelial cells, *Brit. J. Haematol.*, **47**: 617-623, 1981.
- [179] UOTILA P., HILTUNEN A., MAKILA K., MANNISTO J., TOIVONEN H., HARTIALA J., The metabolism of arachidonic acid in isolated hamster, rat and guinea-pig lungs, *Prost. Med.*, **5**: 149-162, 1980.
- [180] UOTILA P., PAAJANEN H., SCHALIN M., SIMBERG N., The metabolism of arachidonic acid in hamster lung microsomes is not completely inhibited by aspirin and indomethacin, *Prostaglandins Leukotrienes Med.*, **12**: 227-234, 1983.

- [181] VANE J. R., The release and fate of vasoactive hormones in the circulation, *Brit. J. Pharmacol.*, **35**: 209-242, 1969.
- [182] VANE J. R., Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs, *Nature (New Biol.)* **231**: 232-235, 1971.
- [183] VARGAFTIG B., DAO HAI N., Release of vasoactive substances from guinea-pig lungs by slow-reacting substance C and arachidonic acid. Its blockade by non steroidal anti-inflammatory agents, *Pharmacology* **6**: 99-108, 1971.
- [184] WAGNER R. C., Endothelial cell embryology and growth, *Adv. Microcirc.*, **9**: 45-54, 1980.
- [185] WALDMAN H. M., ALTER I., KOT P. A., ROSE J. C., RAMWELL P. W., Effect of lung transit on systemic depressor responses to arachidonic acid and prostacyclin in dogs, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **204**: 289-293, 1978.
- [186] WALKER J. E., Lysine residue 199 of human serum albumin is modified by acetylsalicylic acid, *FEBS Lett.*, **66**: 173-175, 1976.
- [187] WARD P. E., GEDNEY C. D., DOWBEN R. M., ERDÖS E. G., Isolation of membranebound renal kallikrein and kininase, *Biochem. J.*, **151**: 755-758, 1975.
- [188] WARD P. E., ERDÖS E. G., GEDNEY C. D., DOWBEN R. M., REYNOLDS R. C., Isolation of membrane-bound renal enzymes, that metabolize kinins and angiotensins, *Biochem. J.*, **157**: 643-650, 1976.
- [189] WEKSLER B. B., MARCUS A. J., JAFFE E. A., Synthesis of prostaglandin I₂ (prostacyclin) by cultured human and bovine endothelial cells, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **74**: 3922-3926, 1977.
- [190] WIKBERG J. E. S., HEDE A. R., Characterization of 5-hydroxytryptamine uptake in sliced rat lung, *Acta Pharmacol. Toxicol.*, **48**: 151-156, 1981.
- [191] WILSON A. G., LAW F. C., ELING T. E., ANDERSON M. W., Uptake, metabolism and efflux of methadone in "single pass" isolated, perfused rabbit lungs, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **199**: 360-367, 1976.
- [192] WONG P. Y.-K., MCGIFF J. C., SUN F. F., MALIK K. U., Pulmonary metabolism of prostacyclin (PGI₂) in the rabbit, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **83**: 731-738, 1978.
- [193] YANG H. Y. T., ERDÖS E. G., LEVIN Y., Characterization of a dipeptide hydrolase (kininase II: angiotensin converting enzyme), *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **177**: 291-300, 1971.
- [194] ZAORSKA B., Rola prostaglandyn, prostacyliny i tromboksanów w patofizjologii wieku dziecięcego, [w] *Prostaglandyny i inne eikozanoidy*, red. B. Zaorska, PZWL, Warszawa 1986, 144-159.
- [195] ZELDIS S. M., NEMERSON Y., PITLICK F. A., LENTZ T. L., Tissue factor (thromboplastin): localization to plasma membranes by peroxidase-conjugated antibodies, *Science* **175**: 766-768, 1972.
- [196] ZETTER B. R., The endothelial cells of large and small blood vessels, *Diabetes* **30**, Suppl. **2**: 24-28, 1981.

Nadesłano: 23 stycznia 1987.

Przyjęto: 26 czerwca 1987.

Adres autorów: ul. K. Marksa 19, 41-808 Zabrze.

CZYNNIKI KONDENSACJI CHROMATYNY W CYKLU ŻYCIOWYM KOMÓREK EUKARIOTYCZNYCH

CHROMATIN CONDENSATION FACTORS IN THE LIFE CYCLE OF EUKARYOTIC CELLS

Marek MALESZEWSKI

Zakład Embriologii, Instytut Zoologii UW, Warszawa

Streszczenie. Przedstawiono eksperymenty badające czynniki, które kontrolują kondensację i dekondensację chromatyny w cyklu komórkowym. Rezultaty tych doświadczeń wskazują na obecność w komórkach, będących w mitozie lub mejozie, aktywnych czynników białkowych, które po wprowadzeniu ich do komórki interfazowej drogą fuzji lub mikroiniekcji są zdolne wywoływać jej przejście do fazy M.

Wykazano także, że aktywność czynników kondensacji jest inaktywowana przez inne czynniki białkowe, obecne w komórkach będących w fazie G1. Stwierdzono, że fosforylacja i defosforylacja białek odgrywa kluczową rolę w regulacji kondensacji i dekondensacji chromosomów.

Summary. Experiments on the factors controlling chromatin condensation and decondensation during the cell cycle are presented. These studies have shown that active protein factors are present in mitotic and meiotic cells, and that after cell fusion or microinjection these proteins can induce transition from interphase to M-phase.

It has been also shown that the activity of condensation factors is inactivated by other protein factors present in cell during the G1 period. Furthermore, these studies have revealed that protein phosphorylation plays a pivotal role in the regulation of condensation and decondensation of chromosomes.

1. WSTĘP

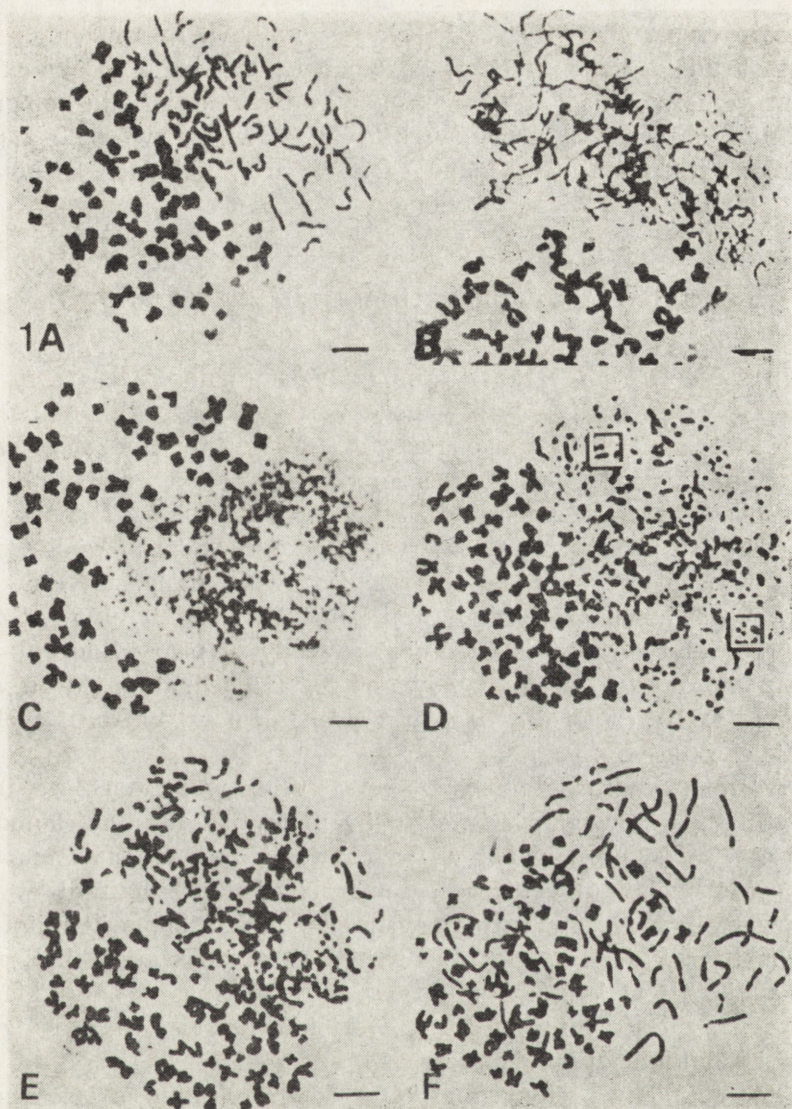
W cyklu życiowym komórek eukariotycznych występują dwa zjawiska decydujące o jego podziale na fazy S i M. Są to: replikacja DNA (faza S), dzięki której zachodzi powielenie informacji genetycznej zawar-

tej w jądrze komórkowym, i mitozy (faza M), proces, który sprawia, iż powielony w czasie replikacji DNA jest prawidłowo rozdzielany między jądra komórek potomnych tak, że są one pod względem ilości i jakości materiału genetycznego identyczne z jądrem komórki wyjściowej. W przeważającej większości typów komórek między tymi dwoma kluczowymi wydarzeniami zachodzą okresy przerwy: pierwsza po podziale (faza G1), druga po fazie syntezy (faza G2).

Od roku 1953, w którym dokonano podziału cyklu komórkowego na fazy G1, S, G2 i M [23], nasza wiedza na ten temat znacznie się rozszerzyła. Wiele już można powiedzieć o procesach zachodzących w jądrze komórkowym w trakcie interfazy i mitozy, jednak w większości słabo zbadane pozostają mechanizmy regulujące, które warunkują prawidłowy przebieg cyklu komórkowego. Również sam proces mitozy, kluczowy dla ekwiwalentnego podziału materiału genetycznego między komórki potomne, choć dobrze opisany pod kątem zjawisk zachodzących w jego trakcie, jest mało poznany, gdy chodzi o mechanizmy działające na poziomie molekularnym i kontrolujące jego przebieg.

Zjawiskiem, które wydaje się najbardziej spektakularne w trakcie przechodzenia komórki przez fazy cyklu życiowego, jest kondensacja chromatyny, która na poziomie dostępnym obserwacji w mikroskopie optycznym widoczna jest jako przejście od interfazowego jądra komórkowego do chromosomów metafazowych. Na poziomie molekularnym wyraża się ona przechodzeniem od 10 nm włókna nukleosomowego, tworzącego 30 nm solenoid — struktura chromatyny interfazowej [12] — przez coraz wyższe stadia upakowania, którego najwyższy poziom stanowią chromosomy metafazowe. W 1963 r. Mazia zaproponował model cyklu kondensacji chromatyny [29], zgodnie z którym dekondensacja chromosomów zaczyna się w telofazie podziału mitotycznego. Proces ten jest kontynuowany w trakcie fazy G1, by w fazie S, w czasie replikacji DNA, osiągnąć najwyższy poziom zdekondensowania włókien chromatyny. Następnie zachodzi stopniowa kondensacja, której kulminację stanowią chromosomy metafazowe. Model ten potwierdzają wyniki badań prowadzonych za pomocą różnych metod [20, 31, 32, 38, 39, 47, 48]. Zjawisko przedwczesnej kondensacji chromatyny (PCC) w wyniku fuzji komórki mitotycznej z interfazową [25] dostarczyło bezpośrednich dowodów na istnienie zależności organizacji chromatyny (stopnia jej kondensacji) od fazy cyklu komórkowego nie tylko w czasie przejścia G2-M, ale także i w trakcie interfazy [3, 17, 21, 42, 44] (ryc.). Dlatego też czynniki kontrolujące poziom kondensacji chromatyny są istotnym fragmentem układu, który zapewnia prawidłową regulację cyklu komórkowego.

Przegląd ten koncentrować się będzie na prezentacji wyników prac



Ryc. Obraz z mikroskopu optycznego przedwczesnej kondensacji chromatynej jąder komórek z różnych faz cyklu życiowego. PCC wywołano fuzją z komórką mitotyczną: A — wczesna faza G1; B — późna faza G1; C — wczesna faza S; D — środkowa faza S; E — późna faza S; F — faza G2; ciemno wybarwione, zlokalizowane po lewej stronie każdej fotografii chromosomy metafazowe pochodzą z komórki mitotycznej, której użyto do indukcji PCC; kreska — 5 μm [17]

zmierzających do charakterystyki tych czynników. Informacje, jakie na ten temat udało się dotychczas zgromadzić, uzyskano dzięki eksperymentom wykorzystującym trzy podstawowe metody: fuzje komórkowe, mikroiniekcje i eksperymenty, w których zjawiska związane z przejściem komórki do fazy M badane są *in vitro* w układach bezkomórkowych.

2. BADANIA WYKORZYSTUJĄCE FUZJE KOMÓRKOWE

W badaniach tych wykorzystano zjawisko polegające na fuzji komórek pod wpływem inaktywowanego wirusa Sendai, glikolu polietylenowego lub pola elektrycznego. Punktem wyjścia było odkrycie wspomnianego już zjawiska przedwczesnej kondensacji chromatyny (PCC), która zachodzi w komórce interfazowej poddanej fuzji z komórką mitotyczną [25]. Na podstawie tej obserwacji przeprowadzono wiele eksperymentów wyjaśniających oddziaływanie jądrowo cytoplazmatyczne w hybrydach uzyskanych w wyniku fuzji komórek różnych typów. Szczegółowy przegląd tych doświadczeń jest zawarty w pracy Rao [40] i wykracza poza ramy tej pracy. Omówione zostaną jednak te, które wnoszą zasadniczy wkład do wiedzy na temat mechanizmów kontrolujących kondensację chromatyny.

Gdy komórki mitotyczne wyznakowane już w fazie G2 za pomocą ^3H tryptofanu i leucyny poddano fuzji z niewyznakowanymi komórkami interfazowymi (synteza białek w trakcie fuzji była zahamowana za pomocą cykloheksimidu), autoradiogramy uzyskanych hybryd wyraźnie wskazywały na migrację wyznakowanych białek z komórki mitotycznej do chromatyny, która uległa przedwczesnej kondensacji [43]. Rezultaty te wskazują, że w komórce mitotycznej występują czynniki białkowe, które po przemieszczeniu się do komórki interfazowej wiążą się z chromatyną i indukują jej kondensację.

Na to, że białka cytoplazmatyczne odpowiedzialne są za regulację kondensacji chromatyny wskazują także wyniki doświadczeń polegających na fuzji komórek interfazowych z komórkami mitotycznymi, które w czasie przejścia z fazy G2 do mitozy hodowane były w obecności inhibitorów syntezy białka [28]. W hybrydach takich nie obserwowano przedwczesnej kondensacji chromatyny jądra komórki interfazowej, co wskazuje na to, że wśród białek syntetyzowanych przez komórkę są też czynniki kondensacji chromatyny.

W eksperymentach polegających na fuzjach komórkowych jako dawców aktywnych czynników kondensacji używano również komórek mejotycznych. Wykazano, że dojrzewający oocyt myszy po fuzji z blasto-

merem interfazowym indukuje w nim przedwczesną kondensację chromatyny [51]. Podobna reakcja zachodzi w hybrydach składających się z owulowanego oocyta będącego w metafazie II i blastomeru interfazowego [51] lub owulowanego oocyta myszy i mysich tymocytów [9]. Gdy schemat doświadczenia odwrócono, okazało się, że blastomer metafazowy, pochodzący z 4-komórkowego zarodka myszy, w którym podziały zablokowano kolcemidem, po fuzji z „niedojrzałym” oocytem myszy (niezdolnym do spontanicznego dojrzewania *in vitro*) indukuje w nim rozpad otoczki jądrowej i kondensację chromatyny [5]. Dowodzi to, że w wypadku fuzji komórkowych reakcja wywołana w komórce interfazowej jest podobna, niezależnie od rodzaju komórki będącej dawką czynników kondensacji.

Eksperymenty, w których fuzje z blastomerem interfazowym poprzedzało przecinanie owulowanego, metafazowego oocyta na część zawierającą chromosomy i część bezjądrową pozwoliły poznać rozmieszczenie aktywnych czynników kondensacji [10]. Okazało się, że aktywność indukującą PCC zachowują obydwa fragmenty, jednak na podstawie obserwowanej różnicy częstości indukcji tej reakcji w dwóch rodzajach uzyskiwanych hybryd oraz stosunku objętości ich składników, z którego wynika rozcieńczenie cytoplazmy mitotycznej w hybrydzie, wnioskować można, iż większość czynników kondensacji zlokalizowana jest we fragmentach zawierających chromosomy.

3. CHARAKTERYSTYKA BIOCHEMICZNA BIAŁEK MITOTYCZNYCH NA PODSTAWIE TESTU ICH AKTYWNOŚCI BIOLOGICZNEJ — MIKROINIEKCJE

Dla wszelkich prób oczyszczania i scharakteryzowania biochemicznego białek kontrolujących kondensację chromatyny niezbędne było opracowanie testu pozwalającego wykrywać ich aktywność w badanych preparatach. Sunkara [50] wykazał, że ekstrakt uzyskany za pomocą buforu zawierającego 0,2 M NaCl z komórek HeLa, które były synchronizowane w różnych fazach cyklu komórkowego, może być testowany pod kątem obecności aktywnych czynników kondensacji przez wstrzykiwanie do niedojrzałych oocytów *Xenopus laevis*. Czynniki wprowadzone w ten sposób do oocyta indukują w nim dojrzewanie mejotyczne, tj. rozpad otoczki jądrowej i kondensację chromatyny. Na podstawie tego testu stwierdzono, iż ekstrakt uzyskany z komórek będących w fazach G1 i S nie wykazuje aktywności kondensującej. We wczesnej i środkowej fazie G2 aktywność ta pojawia się, ale utrzymuje się na niskim poziomie, wzrasta gwałtownie w trakcie późnej fazy G2, by

najwyższy poziom osiągnąć w trakcie mitozy. Z doświadczenia tego, jak i z doświadczeń polegających na fuzjach komórkowych [6] wnioskować można o braku bariery międzygatunkowej dla czynników kondensacji. Dalszym potwierdzeniem tego były pozytywne wyniki eksperymentów, w których wstrzykiwane do oocytów *Xenopus* czynniki kondensacji pochodziły z mitotycznych komórek CHO [33] i mutantów cdc drożdży [52].

Nie można z całą pewnością powiedzieć, że czynniki pochodzące z mitotycznej komórki somatycznej, a powodujące PCC w wyniku fuzji z komórką interfazową, są tożsame z tymi, które wywołują dojrzewanie mejotyczne niedojrzałych oocytów płazów. Jednakże kinetyka ich nagromadzania w cyklu komórkowym jest taka sama, takie same są też efekty ich działania: rozpad otoczki jądrowej i kondensacja chromatyny w komórce biorcy — podobieństwo to pozwala przypuszczać, iż we wszystkich tych trzech zjawiskach (mejoza, mitoza i przedwczesna kondensacja chromatyny) zaangażowane są te same czynniki.

Opierając się na tym założeniu prowadzono dalsze badania właściwości czynników kontrolujących fazę M życia komórki (MF — M-phase factors), w której zanika otoczka jądrowa, a chromatyna ulega kondensacji (stan charakterystyczny dla mitozy, mejozy i PCC).

Białkowy charakter czynników mitotycznych wykazano w eksperymencie, w którym ekstrakt uzyskany z mitotycznych komórek HeLa przed wstrzyknięciem do oocytów *Xenopus laevis* poddano działaniu enzymu proteolitycznego. W ekstrakcie takim aktywność czynników mitotycznych była zredukowana do 18% w stosunku do kontroli [49]. Inkubacja z RN-azą nie wywierała natomiast żadnego efektu na jego zdolność do indukcji dojrzewania mejotycznego. Ekstrakt z mitotycznych komórek HeLa wykazywał obecność aktywnych czynników mitotycznych również w tych oocytach, w których synteza białek była zablokowana cykloheksimidem [49]. Dane te wskazują, że synteza nowych białek w oocycie nie jest konieczna do działania egzogennych czynników kondensacji.

Aktywność czynników mitotycznych, stymulująca dojrzewanie oocytów, wykazywała negatywną zależność od obecności jonów Ca^{2+} w buforze ekstrakcyjnym. Już przy 1 mM stężeniu tych jonów jest ona w pełni zniesiona, nie wpływają na nią natomiast jony Mg^{2+} , nawet o dużym stężeniu (10 mM) [49].

Również inkubacja ekstraktu mitotycznego przez 10 min w temp. 50°C okazuje się wystarczająca dla inaktywowania czynników indukujących dojrzewanie oocytów *Xenopus* [49].

Wyczerpujące dializowanie ekstraktu wobec buforów o pH od 6,5 do 7,5 nie wpływało na jego aktywność, gdy jednak pH wynosiło 8,0, wówczas następowała gwałtowna redukcja aktywności [49].

Do ustalenia, jakiej wielkości cząsteczki są odpowiedzialne za występowanie w ekstrakcie aktywności MF, był on wirowany przez roztwór sacharozy o liniowym gradiencie stężenia (5-20%). Uzyskano rozdział na frakcje, które testowano w oocytach *Xenopus*. Aktywność stymulująca dojrzewanie lokowała się w pojedynczej frakcji o współczynniku sedimentacji ok. 4-5 S [49].

Gdy przeprowadzono chromatografię ekstraktu mitotycznego na kolumnie z DEAE-celulozy, która eluowana była buforem o wzrastającej sile jonowej, aktywność stymulująca dojrzewanie mejotyczne wymywana była 0,15 M NaCl [49].

Trzykrotne wzbogacenie aktywności ekstraktu białek mitotycznych uzyskano na drodze precypitacji 40% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, o dalsze pięć razy zagęszczono ją ekstrahując tak wytrącone białka za pomocą 2% TCA (kwas trójchlorooctowy) [2].

Wykazano także, iż aktywność mitotyczna ekstraktu jest w sposób istotny stabilizowana przez obecność w buforze inhibitorów enzymów proteolitycznych i inhibitorów fosfataz [2]. Potwierdzają to również doświadczenia z czynnikami mitotycznymi, pochodzącymi z komórek CHO, których aktywność także zależała od obecności w układzie czynników hamujących usuwanie z cząsteczek białka kowalencyjnie związanych reszt fosforanowych [33].

Przeprowadzono również eksperymenty mające na celu stwierdzenie, czy czynniki mitotyczne z komórek HeLa, które indukują dojrzewanie mejotyczne po wprowadzeniu ich drogą mikroiniekcji do niedojrzałych oocytów *Xenopus laevis*, są zlokalizowane w cytoplazmie, czy też są związane z chromosomami mitotycznymi [2]. W tym celu komórki mitotyczne poddano traktowaniu dwustopniowemu, uzyskując wstępnie preparat cytoplazmatyczny za pomocą buforu o niskim stężeniu soli, z którego przez wirowanie wydzielono chromosomy. Następnie z osadu chromosomów ekstrahowano czynniki mitotyczne buforem o wysokim stężeniu soli. Oba ekstrakty: cytoplazmatyczny i chromosomowy testowano wstrzykując je do oocytów *Xenopus*. Uzyskane rezultaty sugerują, iż ilość czynników kondensacji w ekstrakcie z chromosomów jest co najmniej trzykrotnie wyższa niż w ekstrakcie z cytoplazmy mitotycznej. Powinowactwo czynników mitotycznych do chromosomów staje się bardziej oczywiste, gdy podobnej procedurze poddano frakcję cytoplazmatyczną i jądrową z komórek w różnych stadiach fazy G2 [2]. Aktywność indukująca kondensację jest niewykrywalna w cytoplazmie komórek HeLa we wczesnej i środkowej fazie G2, podczas gdy ekstrakt jądrowy wykazuje już jej istotny poziom. Komórki w późnej fazie G2 wykazują obecność aktywności kondensacyjnej zarówno w jądrze, jak i w cytoplazmie w proporcjach takich jak w komórkach mitotycznych. Rezultaty te sugerują, iż aktywne czynniki mitotyczne są syntetyzowane (lub akty-

wowane) w czasie trwania fazy G2 i równocześnie szybko i specyficznie wiązane z chromatyną. Gdy komórka przygotowuje się do mitozy, syntetyzuje ona (lub aktywuje) te czynniki w większej ilości, tak że pewien ich poziom utrzymuje się również w cytoplazmie. Rezultaty te pozostają w ścisłej zgodności z tymi, które uzyskano z pomocą fuzji komórkowych; tam również wykazano chromosomową lokalizację czynników kondensacji [10] i specyficzne wiązanie ich z chromatyną, która uległa PCC [43].

4. PRZECIWCIAŁA SPECYFICZNE WZGLĘDEM KOMÓREK MITOTYCZNYCH

Istotnym krokiem do poznania mechanizmów, które w cyklu komórkowym kontrolują fazę M, było uzyskanie przeciwciał monoklonalnych, specyficznych względem komórek mitotycznych [11]. Przeciwciała takie uzyskano standardową procedurą, w której za źródło antygenów posłużył ekstrakt z komórek HeLa zsynchronizowanych w mitozie. Uzyskane w ten sposób przeciwciała reagują specyficznie z komórkami będącymi w metafazie, co wykazało badanie immunofluorescencyjne. Związane przeciwciała wykryto zarówno w chromosomach, jak i w cytoplazmie; poziom fluorescencji w komórkach metafazowych był ponad $10 \times$ wyższy niż w będących w fazie G1 i S. Komórki będące w anafazie i telofazie wykazywały poziom fluorescencji wynoszący ok. $\frac{2}{3}$ poziomu charakterystycznego dla metafazy, w G2 zaś ok. 23%. Pojawienie się w fazie G2 w jądrach komórkowych zdolności wiązania przeciwciał do komórek mitotycznych, która rośnie i punkt najwyższy osiąga w metafazie, obejmując zarówno chromosomy, jak i cytoplazmę, dokładnie odpowiada kinetyce występowania w cyklu mitotycznym i lokalizacji w komórce aktywności odpowiedzialnej za indukowanie dojrzewania mejotycznego oocytów *Xenopus*.

Zbadano również, czy uzyskane przeciwciała reagować będą z komórkami w fazie M innymi niż HeLa. Wynik był pozytywny w przypadku tak różnych komórek jak komórki człowieka (normalne i nowotworowe), myszy, chomika, kurczęcia, żaby, nicieni i komara, a także dla komórek mejotycznych z jąder szczura, co wskazuje na brak specyfiki gatunkowej oraz na brak różnic między mitozą i mejozą pod względem występowania antygenów charakterystycznych dla fazy M [11].

Tych samych przeciwciał monoklonalnych używano do wykrywania w ekstraktach komórkowych białek związanych z występowaniem antygenów mitotycznych [11]. W tym celu wyekstrahowane z mitotycznych komórek HeLa białka rozdzielano elektroforetycznie w żelu poliakrylamidowym, zawierającym SDS (sól sodowa siarczanu dodecyłu), a następnie, po przeniesieniu na nitrocelulozę, identyfikowano te z nich,

które wiążą przeciwciała monoklonalne, specyficzne względem komórek będących w fazie M. Okazało się, że przeciwciała rozpoznają całą rodzinę białek (ok. 16 prążków) w zakresie MW od 40 000 do ponad 200 000. Wśród tych specyficznych dla mitozy antygenów dominujące były prążki odpowiadające białkom o MW 182 000, 118 000 i 70 000.

Stwierdzono, iż analogiczne frakcje białkowe, wykazujące wspólną antygenowość, występują w komórkach metafazowych człowieka, chomika i myszy; dwie z tych frakcji wykryto także w mejotycznych oocytach żaby [11].

Mitotyczne komórki HeLa wyznakowano w fazie G2 za pomocą ^{32}P , a następnie analizowano elektroforetycznie i autoradiograficznie te białka, które uległy precypitacji w wyniku reakcji z przeciwciałami przeciwko komórkom mitotycznym. Okazało się, że wszystkie trzy główne frakcje są białkami ulegającymi fosforylacji [11].

Gdy fosfoproteiny poddać działaniu alkalicznej fosfatazy, następuje usuwanie reszt fosforanowych z cząsteczek białka. Przeprowadzono eksperyment, w którym tego rodzaju traktowaniu enzymatycznemu poddano białka ekstraktu mitotycznego [11]. Następnie analizowano je pod kątem obecności antygenów rozpoznawanych przez przeciwciała przeciwko komórkom mitotycznym. W rezultacie okazało się, że usunięcie reszt fosforanowych jest wystarczające do utraty antygenowości charakterystycznej dla mitozy. Świadczy to o tym, że fosforylacja białek mitotycznych ma decydujący wpływ na ich strukturę.

5. BADANIA NAD FOSFORYLACJĄ BIAŁEK MITOTYCZNYCH

Fosforylacja białek jest reakcją enzymatyczną, katalizowaną przez kinazy białkowe, odwracalną dzięki działaniu fosfataz. Tego rodzaju modyfikacja postsyntetyczna odgrywa znaczną rolę w regulacji licznych procesów komórkowych [26]. Już dość dawno zaobserwowano związek fosforylacji histonów (głównie H1) z mitozą. W wielu pracach wykazano, że w cyklu komórkowym ssaków przejściu z fazy G2 do mitozy towarzyszy superfosforylacja histonu H1 [14, 22]. Dalsze prace wykazały, że zjawisko to ma charakter uniwersalny, np. w cyklu podziałowym śluzowca *Physarum polycephalum* stwierdzono, iż mitozie również towarzyszy fosforylacja tego histonu. Jedna jego cząsteczka może mieć wtedy związanych kowalencyjnie nawet 28 reszt fosforanowych — stanowi on najwyżej ufosforylowane ze znanych białek [24]. Histon H1 ulega także fosforylacji w czasie przedwczesnej kondensacji chromatyny [18]. Wykazano również, że sama fosforylacja histonu H1 nie jest wystarczająca do kondensacji chromatyny [18, 27]. Do zajścia zjawisk związanych z mi-

tożą mogą być też konieczne inne warunki, prawdopodobnie fosforylacja białek niehistonowych, takich jak HMG (high mobility group) [7, 37], białek cytoszkieletowych [8, 45], lamin [13, 36], czy rybosomowego białka S6 [35].

Wyniki opisanych dotychczas w tym przeglądzie doświadczeń sugerują, że wystąpieniu aktywności związanej z białkowymi czynnikami kondensacji (PCC, indukcja dojrzewania mejotycznego) towarzyszy fosforylacja białek.

Fosforylację białek niehistonowych w cyklu komórkowym komórek HeLa badano znakując je za pomocą ^{32}P w fazie S, a następnie analizując autoradiograficznie rozdzielone w elektroforezie białka obecne w uzyskanych ekstraktach buforem zawierającym 0,2 M NaCl z komórek będących w kolejnych fazach cyklu [46]. Uzyskane rezultaty wskazują na 8-10-krotny wzrost poziomu fosforylacji w badanej frakcji białek niehistonowych, związany z przejściem komórki z fazy G2 do M. Tego samego rzędu spadek fosforylacji towarzyszy zjawiskom związanym z zakończeniem podziału i wejściem w fazę G1. Obserwowana fosforylacja wzrastała w czasie trwania fazy G2, najwyższy poziom osiągając w czasie metafazy.

Autoradiografia zeli pozwoliła na wykrycie ośmiu wyraźnych prążków, odpowiadających białkom o MW od 27 500 do 100 000, których fosforylacja wykazywała zależność od fazy cyklu komórkowego, osiągając swój najwyższy poziom w czasie podziału, a wzrost i spadek odpowiednio przy przejściach G2 — M i M — G1. Związek poziomu fosforylacji białek niehistonowych ze stopniem kondensacji chromatyny potwierdza obserwacja, iż w fazie S najsilniejszej dekonkondensacji chromosomów towarzyszy najniższe ufosforylowanie tych białek: 3-5% poziomu z metafazy.

W cyklu komórkowym komórek CHO stwierdzono występowanie analogicznej kinetyki fosforylacji białek niehistonowych do opisanej już tu dla komórek HeLa [53]. W dalszym ciągu nie wiadomo jednak, jakiego rodzaju procesy molekularne kryją się za tą korelacją oraz które zjawiska stanowią przyczynę, a które skutek. Wydaje się, że odwracalna fosforylacja białek może być kluczowym mechanizmem w złożonym procesie regulacji kondensacji — dekonkondensacji chromatyny.

6. INHIBITORY BIAŁEK MITOTYCZNYCH

Istotne wydaje się pytanie, czy dla dekonkondensacji chromosomów, zaczynającej się z początkiem fazy G1, konieczne jest pojawienie się aktywności innej od tej, która związana jest z białkami mitotycznymi, oraz

jakie oddziaływania zachodzą ewentualnie między tymi dwiema grupami czynników. Do otrzymania odpowiedzi przeprowadzono doświadczenie, w którym mieszano w różnych proporcjach ekstrakt mitotyczny z ekstraktem uzyskanym z komórek będących w fazie G1 [3]. Mieszanie ekstraktów wstrzykiwano następnie do oocytów *Xenopus*, obserwując, jaki wpływ wywiera ekstrakt z komórek z fazy G1 na zdolność ekstraktu mitotycznego do indukcji dojrzewania oocytów. Ekstrakt mitotyczny rozcieńczony buforem ekstrakcyjnym był kontrolną. W tym przypadku obniżenie stężenia czynników mitotycznych aż do 20% w stosunku do wyjściowego nie wywierało większego wpływu na ich aktywność. W przeciwieństwie do tego, ekstrakt mitotyczny tracił zupełnie zdolność indukowania dojrzewania mejozy przy stężeniu równym 66,6%, gdy rozcieńczany był ekstraktem pochodzącym z komórek z fazy G1. Dane te wskazują na obecność w ekstrakcie z komórek z fazy G1 czynników, które inaktywują białka mitotyczne.

Dalsze, opisane w tej pracy [3] doświadczenia wykazały, że aktywność inhibitorów czynników mitotycznych pojawia się w cyklu komórkowym bardzo wcześnie, prawdopodobnie już w telofazie, jest wysoka w trakcie fazy G1 i we wczesnych stadiach fazy S, spada w środkowej i późnej fazie S, by zaniknąć w fazie G2. Zahamowanie cykloheksimidem syntezy białek w trakcie podziału i wczesnych stadiów fazy G1 nie wpływało na aktywność inhibitorów mitotycznych wyekstrahowanych z takich komórek, co sugeruje ich aktywację po zakończeniu podziału, nie zaś syntezę *de novo*.

Do stwierdzenia lokalizacji inhibitorów czynników mitotycznych w komórce ekstrahowano je z rozdzielonych frakcji cytoplazmatycznej i jądrowej komórek będących w fazie G1, a następnie ekstrakty badano pod kątem ich zdolności do inaktywowania ekstraktu mitotycznego [41]. Aktywność ekstraktu cytoplazmatycznego była równa tej, którą uzyskano z całych komórek, natomiast ekstrakt jądrowy nie wykazywał jej w ogóle, co sugeruje, że inhibitory czynników mitotycznych zlokalizowane są w cytoplazmie.

Przeprowadzono również charakterystykę biochemiczną inhibitorów czynników mitotycznych [41]. Wykazano, że są to wrażliwe na działanie proteazy białka niehistonowe, na których aktywność nie wpływają: RN-aza, EGTA i EDTA. W przeciwieństwie do czynników mitotycznych są one dosyć stabilne w wysokiej temperaturze (65°C przez 15 min) i w szerokim zakresie pH 6,0-10,0 (pH poniżej 5,0 znosi ich aktywność). Przybliżona masa cząsteczkowa tych białek wynosi około 12 000. Działanie inhibitorów prawdopodobnie nie polega na ich aktywności proteazowej, albowiem obecność inhibitorów proteaz w buforze stosowanym

do ich ekstrakcji nie wpływa hamująco na ich oddziaływanie z czynnikami mitotycznymi.

Stwierdzono, iż chromosomy komórek HeLa, zablokowanych w metafazie kolcemidem, ulegają dekondensacji, jeżeli komórki inkubowane są w obecności arabinozylocytozyny i hydroksymocznika po poddaniu ich działaniu promieniowania ultrafioletowego (UV) [47]. Ekstrakt z komórek mitotycznych poddanych takiemu działaniu wykazuje bardzo niski poziom aktywnych czynników kondensacji w teście z oocytami *Xenopus* [4]. Jeżeli jednak w analogiczny sposób oddziaływano nie na nienaruszone komórki mitotyczne, a na uzyskany z nich ekstrakt, to nie wywierało to wpływu na jego aktywność. Sugeruje to, iż za inaktywację czynników mitotycznych nie jest bezpośrednio odpowiedzialne działanie UV, lecz specyficzna reakcja komórek wywołana tym promieniowaniem, a także że zachodzi związek przyczynowo-skutkowy między dekondensacją chromosomów indukowaną przez UV i spadkiem aktywności czynników mitotycznych.

Wyjaśnienie kwestii mechanizmów prowadzących do inaktywacji czynników kondensacji w komórkach naświetlanych UV przybliżyć może nas do poznania procesów regulujących stan chromatyny w cyklu komórkowym. W tym celu badano zależność poziomu fosforylacji niehistonowych białek mitotycznych od dekondensacji chromatyny indukowanej działaniem UV [1]. Zmierzono ilość radioaktywnego fosforanu wbudowywanego do tej frakcji białek przez komórki mitotyczne, poddane opisanemu już tu działaniu UV, i stwierdzono, iż poziom fosforylacji w komórkach doświadczalnych był kilkakrotnie niższy niż w kontrolnych, nie poddanych działaniu UV.

Gdy podanie ^{32}P poprzedzało blok mitotyczny, w komórkach doświadczalnych poddanych działaniu UV stwierdzono silne, skorelowane z dekondensacją chromosomów zdefosforylowanie białek mitotycznych, które zidentyfikowano elektroforetycznie i autoradiograficznie. Sugeruje to, iż naświetlenie komórek mitotycznych UV powoduje aktywację fosfataz, które mogą specyficznie defosforylować białka kondensacji chromatyny w formie aktywnej, występujące w postaci fosfoprotein.

Pozostaje pytanie o związek między zjawiskami mającymi miejsce w trakcie dekondensacji chromatyny komórek mitotycznych poddanych działaniu UV, a tymi, które zachodzą w trakcie cyklu komórkowego przy przejściu od fazy M do fazy G1. Odpowiedź dało doświadczenie, które wykazało, iż taka sama defosforylacja czynników kondensacji zachodzi w wyniku inkubacji ich z ekstraktem z komórek z fazy G1 [1]. Wskazuje to na obecność podobnych, o ile nie identycznych, aktywnych fosfataz w komórkach będących w fazie G1 i komórkach mitotycznych, w których UV zaindukowano dekondensację.

Podsumowując, wyniki opisanych doświadczeń sugerują, że aktywność kinaz i fosfataz specyficznych dla białek mitotycznych może stanowić mechanizm regulujący kondensację chromatyny w cyklu życiowym komórki.

7. MITOTYCZNE KINAZY BIAŁKOWE

Poszukiwanie w fazie M aktywnych w niej kinaz białkowych wśród niehistonowych białek mitotycznych stanowiło naturalną konsekwencję opisanych eksperymentów. Doświadczenia, w których jako metodę badawczą zastosowano elektroforezę prowadzoną w niedenaturującym żelu poliakrylamidowym, poprzedzającą reakcją fosforylacji *in situ* w obecności lub przy braku substratu egzogenego, pozwoliły na wykrycie kilku kinaz między białkami fazy M [15]. Część z nich wykazywała zdolność do autofosforylacji; spośród tej grupy enzymów zidentyfikowano w żelu prążek odpowiadający aktywności obecnej w komórce tylko w czasie mitozy. Podobne rezultaty uzyskano dla białek izolowanych z komórek mejotycznych płazów [15].

Tą samą metodą posłużono się w dalszych badaniach zmierzających do charakterystyki tych enzymów i wykazano, że aktywność kinazowa specyficzna dla fazy M nie jest zależna od cAMP [16].

Opierając się na technice elektroforezy i fosforylacji w żelu, poszukiwano odpowiedzi na pytanie, czy ekstrakt białek z komórek będących w fazie G1, wykazujący obecność aktywnych inhibitorów czynników mitotycznych, wywiera wpływ na aktywność wykrytych uprzednio kinaz [16]. W tym celu analizowano tą techniką aktywności kinazowe w ekstraktach mitotycznym i z fazy G1 zmieszanych w różnych proporcjach. Wykryto, że pod wpływem czynników cytoplazmatycznych, obecnych w komórkach w fazie G1, specyficznemu hamowaniu podlega ta aktywność kinazowa, w której poznaną wcześniej cechą charakterystyczną jest występowanie tylko w fazie M cyklu komórkowego [15]. Wyniki te dowodzą kluczową rolę fosforylacji i defosforylacji białek niehistonowych w regulacji procesów zachodzących w trakcie cyklu komórkowego.

8. PERSPEKTYWY W BADANIACH CYKLU KOMÓRKOWEGO

Przy analizie wyników doświadczeń opisanych już tu nasuwa się refleksja, iż jesteśmy jeszcze bardzo daleko od poznania mechanizmów tak fundamentalnego procesu, jakim jest podział komórki. Odnieść można

wrażenie, że dotychczas przeprowadzane doświadczenia badały jakby dwa krańcowe poziomy tego procesu, bez prób znalezienia powiązań między nimi. Mamy bowiem obserwacje mikroskopowe zjawisk cyto logicznych, zachodzących w trakcie cyklu komórkowego, a równocześnie badania biochemiczne, odkrywające reakcje zachodzące na poziomie molekularnym. Aby jednak móc mówić o postępie w badaniach cyklu komórkowego, należy znaleźć powiązanie nie tylko czasowe, ale i funkcjonalne między procesami molekularnymi i zjawiskami, które obserwujemy za pomocą mikroskopu.

Bardzo obiecujące wydają się prace nad wykrytymi mutantami cyklu komórkowego drożdży. Stwierdzono, iż gen *cdc2/cdc28* odgrywa kluczową rolę przy przejściu z fazy G1 do fazy S, a następnie z fazy G2 do mitozy. Gen ten prawdopodobnie koduje kinazę białkową, która może być regulowana przez fosforylację [19]. Odkrycie to daje możliwość zastosowania metod współczesnej genetyki molekularnej w badaniach nad regulacją cyklu komórkowego.

Innego rodzaju obiecującą metodą badawczą są techniki *in vitro*, których przykładem zastosowania do badania interesującego nas problemu jest praca Miake-Lye i Kirschnera [30], w której analizowano działanie białkowych czynników fazy M jednocześnie na trzech poziomach: molekularnym, mikroskopii elektronowej i optycznej.

Wczesne zjawiska zachodzące w trakcie mitozy badane były w układzie bezkomórkowym, w którym na jądra komórkowe, izolowane z tymocytów szczura lub komórek CHO, działano ekstraktem białek fazy M, pochodzącym w tym wypadku z mejotycznych komórek *Xenopus laevis*. Gdy do zawiesiny izolowanych jąder komórkowych dodawano ekstrakt białek z fazy M, to uzyskiwano ciąg reakcji odznaczający się powtarzającymi się zależnościami czasowymi. Kondensacja chromatyny rozpoczynała się ok. 25-30 min po dodaniu białek ekstraktu, a 15-20 min później zanikała otoczka jądrowa i poszczególne chromosomy zaczynały być rozróżnialne. Wywołany w ten sposób stan mitotyczny był, podobnie jak i w nienaruszonej komórce, przejściowy — 60-70 min po dodaniu ekstraktu białek fazy M chromosomy rozpoczynały spontaniczną de kondensację i następowała rekonstrukcja jąder interfazowych. Kilkakrotne podawanie czynników kondensacji przedłużało trwanie fazy M, co sugeruje, że ich inaktywacja jest odpowiedzialna za powrót jąder do stanu interfazowego.

W tym samym układzie, wykorzystując techniki znakowania izotopowego i dwukierunkowej elektroforezy białek, badano czasową zależność między fosforylacją lamin i rozpadem otoczki jądrowej indukowanym działaniem czynników kondensacji. Wzrost poziomu fosforylacji lamin wykryto już po 15 min, co poprzedza rozpad otoczki jądrowej o ok.

25 min. Istnienie tej przerwy było zagadką w świetle znanych faktów korelacji ufosforylowania lamin z tą fazą cyklu komórkowego, w której białka te nie są zagregowane i nie tworzą jednolitej laminy jądrowej [13, 36].

Ponieważ żadne zmiany morfologii otoczki jądrowej nie były zauważalne na skrawkach analizowanych w mikroskopie elektronowym, badaniu poddano samą lamine jądrową, używając techniki immunofluorescencji do wykrycia ewentualnych zmian w jej strukturze związanych z fosforylacją lamin, a poprzedzających zanik otoczki jądrowej. Uzyskane wyniki sugerują, że w okresie między fosforylacją a rozpadem otoczki jądrowej następuje stopniowa depolimeryzacja laminy, wyrażająca się obserwowanym osłabieniem tej struktury, które poprzedza stopniowy zanik barwienia immunofluorescencyjnego, oznaczający pełną depolimeryzację laminy.

Ponieważ między wprowadzeniem do układu czynników kondensacji a fosforylacją białek laminy następuje 10-15 min przerwy, pojawia się więc pytanie o ewentualne jeszcze wcześniejsze zjawiska mitotyczne. Aby je zbadać, analizowano w elektroforezie dwukierunkowej białka jądrowe izolowane po 10 min od dodania ekstraktu białek fazy M. Wykryto, że trzy rodzaje nieznanymi białek ulegają fosforylacji w tak wczesnym etapie indukcji zjawisk mitotycznych, co świadczy, że w jej trakcie procesy biochemiczne znacznie poprzedzają jakiegokolwiek zmiany morfologiczne.

Rezultaty opisanych doświadczeń dostarczają nowych danych o regulacji fazy M życia komórki. Po pierwsze dowodzą, że czynniki kondensacji to stymulatory wielu procesów występujących równolegle i prowadzących do przejścia struktur istniejących w komórce ze stanu charakterystycznego dla interfazy do tego, który odpowiada fazie M. Po drugie, wnioski z analizy wczesnych wydarzeń mitotycznych popierają hipotezę o roli kaskady fosforylacji w ich indukcji i regulacji. Na przykładzie lamin widzimy, iż pośrednim etapem przejścia komórki z interfazy do fazy M może być aktywacja kinaz specyficznych względem tych białek jądrowych, których fosforylacja związana jest z rozpadem otoczki jądrowej i kondensacją chromatyny. Ponieważ jednak laminy nie są fosforylowane natychmiast po wprowadzeniu do układu białek fazy M, wydaje się więc, że białka te nie są bezpośrednimi kinazami lamin. Aktywacja kinaz białek strukturalnych, takich jak laminy, może być dalszą, jakby wykonawczą reakcją indukcji fazy M w komórce. Procesem decydującym o przejściu z fazy G2 do mitozy może być autofosforylacja obecnych w cytoplazmie czynników kondensacji, prowadząca do specyficznego transportu do jądra komórkowego i indukcji ich aktyw-

ności kinazowej, której substratem mogą być ulegające fosforylacji „wczesne” białka jądrowe.

Podsumowując wszystkie rezultaty, widać wyraźnie, jak skomplikowanym i trudnym do ujęcia w jednym modelu procesem jest przejście komórki w jej cyklu życiowym z interfazy do mitozy. Przedstawione doświadczenia zajmują się bowiem tylko pewnym wycinkiem bardzo szerokiego i podstawowego dla biologii zagadnienia, jakim jest regulacja cyklu życiowego komórki.

LITERATURA

- [1] ADLAKHA R. C., SAHASRABUDDHE C. G., WRIGHT D. A., BIGO H., RAO P. N., Role of nonhistone protein phosphorylation in the regulation of mitosis in mammalian cells, [w] *Growth, Cancer and the Cell Cycle*, red. P. Skehan, S. J. Friedman, Humana Press, New Jersey 1984, 59-69.
- [2] ADLAKHA R. C., SAHASRABUDDHE C. G., WRIGHT D. A., LINDSEY W. F., RAO P. U., Localization of mitotic factors on metaphase chromosomes, *J. Cell Sci.*, **54**: 193-206, 1982.
- [3] ADLAKHA R. C., SAHASRABUDDHE C. G., WRIGHT D. A., RAO P. N., Evidence for the presence of inhibitors of mitotic factors during G1 period in mammalian cells, *J. Cell Biol.*, **97**: 1707-1713, 1983.
- [4] ADLAKHA R. C., WANG J. C., WRIGHT D. A., SAHASRABUDDHE C. G., BIGO H., RAO P. N., Inactivation of mitotic factors by ultraviolet irradiation of HeLa cells in mitosis, *J. Cell Sci.*, **65**: 279-295, 1984.
- [5] BAŁAKIER H., Induction of maturation in small oocytes from sexually immature mice by fusion with meiotic or mitotic cells, *Exp. Cell Res.*, **112**: 137-141, 1978.
- [6] BAŁAKIER H., Interspecific heterokaryons between oocytes and blastomeres of the mouse and the bank vole, *J. Exp. Zool.*, **209**: 323-329, 1979.
- [7] BHORJEE J. S., Differential phosphorylation of nuclear nonhistone high mobility group proteins HMG 14 and HMG 17 during the cell cycle, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**: 6944-6948, 1981.
- [8] BRAVO R., FEY S. J., MOSE LARSEN P., CELIS J. E., Modification of vimentin polypeptides during mitosis, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, **46**: 379-385, 1982.
- [9] CZOŁOWSKA R., MODLIŃSKI J. A., TARKOWSKI A. K., Behaviour of thymocyte nuclei in nonactivated and activated mouse oocytes, *J. Cell Sci.*, **69**: 19-34, 1984.
- [10] CZOŁOWSKA R., WAKSMUNDZKA M., KUBIAK J. Z., TARKOWSKI A. K., Chromosome condensation activity in ovulated metaphase II mouse oocytes assayed by fusion with interphase blastomeres, *J. Cell Sci.*, **84**: 129-138, 1986.
- [11] DAVIES F. M., TSAO T. Y., FOWLER S. K., RAO P. N., Monoclonal antibodies to mitotic cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **80**: 2926-2930, 1983.
- [12] FELSENFELD G., MCGHEE J. D., Structure of the 30 nm chromatin fiber, *Cell*, **44**: 375-377, 1986.
- [13] GERACE L., BLOBEL G., Nuclear lamina and the structural organization

- of the nuclear envelope, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, **46**: 967-978, 1982.
- [14] GURLEY L. R., TOBEY R. A., WALTERS R. A., HILDEBRAND C. E., HOHMANN P. D., D'ANNA J. A., BARHAM S. S., DEAVEN L. L., Histone phosphorylation and chromatin structure in synchronized mammalian cells, [w] *Cell Cycle Regulation*, red. J. R. Jeter, I. L. Cameron, G. M. Padilla, A. M. Zimmerman, Academic Press, New York 1978, 37-60.
- [15] HALLECK M. S., LUMLEY-SAPANSKI K., REED J. A., IYER A. P., MASTRO A. M., SCHLEGEL R. A., Characterization of protein kinases in mitotic and meiotic cell extracts, *FEBS Lett.*, **167**: 193-198, 1984.
- [16] HALLECK M. S., LUMLEY-SAPANSKY K., REED J. A., SCHLEGEL R. A., Involvement of protein kinases in mitotic-specific events, [w] *Growth, Cancer and the Cell Cycle*, red. P. Skehan, S. J. Friedman, Humana Press, New Jersey 1984, 143-150.
- [17] HANKS S. K., GOLLIN S. M., RAO P. N., WRAY W., HITTELMAN, W. N., Cell cycle-specific changes in the ultrastructural organization of prematurely condensed chromosomes, *Chromosoma*, **88**: 333-342, 1983.
- [18] HANKS S. K., RODRIGUEZ L. V., RAO P. N., Relationship between histone phosphorylation and premature chromosome condensation, *Exp. Cell Res.*, **148**: 293-302, 1983.
- [19] HAYLES J., NURSE P., Cell cycle regulation in yeast, *J. Cell Sci. Suppl.*, **4**: 155-170, 1986.
- [20] HILDEBRAND C. E., TOBEY R. A., Cell cycle-specific changes in chromatin organization, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **63**: 134-139, 1975.
- [21] HITTELMAN W. N., RAO P. N., Mapping G1 phase by the structural morphology of the prematurely condensed chromosomes, *J. Cell. Physiol.*, **95**: 333-341, 1978.
- [22] HOHMANN P., Phosphorylation of H1 histones, *Mol. Cell. Bioch.*, **57**: 81-92, 1983.
- [23] HOWARD A., PELC S. R., Synthesis of deoxyribonucleic acid in normal and irradiated cells and its relation to chromosome breakage, *Heredity Suppl.*, **6**: 261-273, 1953.
- [24] JERZMANOWSKI A., MALESZEWSKI M., Phosphorylation and methylation of Physarum H1 histone during mitotic cycle, *Biochemistry*, **24**: 2360-2367, 1985.
- [25] JOHNSON R. T., RAO P. N., Mammalian cell fusion: Induction of premature chromosome condensation in interphase nuclei, *J. Cell. Physiol.*, **95**: 333-341, 1970.
- [26] KREBS E. G., The phosphorylation of proteins: a major mechanism for biological regulation, *Biochem. Soc. Trans.*, **13**: 813-820, 1985.
- [27] KRYSTAL G. W., POCCIA D. L., Phosphorylation of cleavage stage histone H1 in mitotic and prematurely condensed chromosomes, *Exp. Cell Res.*, **134**: 41-48, 1981.
- [28] MATSUI S., WEINFELD H., SANDBERG A. A., Dependence of chromosome pulverization in virus-fused cells on events in the G2 period, *J. Natl. Cancer Inst. (US)*, **47**: 401-411, 1971.
- [29] MAZIA D., Synthetic activities leading to mitosis, *J. Cell. Comp. Physiol.*, **62** (Suppl. I): 123-140, 1963.
- [30] MIAKE-LYE R., KIRSCHNER M. W., Induction of early mitotic events in a cell-free system, *Cell*, **41**: 165-175, 1985.

- [31] MOSER G. C., FALLON R. J., MEISS H. K., Fluorometric measurements and chromatin condensation patterns of nuclei from 3T3 cells throughout G1, *J. Cell. Physiol.*, **106**: 293-301, 1981.
- [32] MOSER G. C., MULLER H., ROBBINS E., Differential nuclear fluorescence during the cell cycle, *Exp. Cell Res.*, **91**: 73-78, 1975.
- [33] NELKIN B., NICHOLS C., VOGELSTEIN B., Protein factor(s) from mitotic CHO cells induce meiotic maturation in *Xenopus laevis* oocytes, *FEBS Lett.*, **109**: 233-238, 1980.
- [34] NICOLINI C., AJIRO K., BORUN T. W., BASERGA R., Chromatin changes during the cell cycle of HeLa cells, *J. Biol. Chem.*, **250**: 3381-3385, 1975.
- [35] NIELSEN P. J., THOMAS G., MALLER J. L., Increased phosphorylation of ribosomal protein S6 during meiotic maturation of *Xenopus*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**: 2937-2941, 1982.
- [36] OTTAVIANO Y., GERACE L., Phosphorylation of nuclear lamins during interphase and mitosis, *J. Biol. Chem.*, **260**: 624-632, 1985.
- [37] PAULSON J. R., TAYLOR S. S., Phosphorylation of histones 1 and 3 and nonhistone high mobility group 14 by an endogenous kinase in HeLa metaphase chromosomes, *J. Biol. Chem.*, **257**: 6064-6072, 1982.
- [38] PEDERSON T., Chromatin structure and the cell cycle, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **69**: 2224-2228, 1972.
- [39] PEDERSON T., ROBBINS E., Chromatin structure and the cell division cycle. Actinomycin binding in synchronized HeLa cells, *J. Cell Biol.*, **55**: 322-327, 1972.
- [40] RAO P. N., The phenomenon of premature chromosome condensation, [w] *Premature Chromosome Condensation: Application in Basal, Clinical and Mutation Research*, red. P. N. Rao, R. T. Johnson, K. Sperling, Academic Press, New York 1982, 1-41.
- [41] RAO P. N., ADLAKHA R. C., Chromosome condensation and decondensation factors in the life cycle of eukaryotic cells, [w] *Mediators in Cell Growth and Differentiation*, red. R. J. Ford, A. L. Maizel, Raven Press, New York 1985, 45-69.
- [42] RAO P. N., HANKS S. K., Chromatin structure during the prereplicative phases in the life cycle of mammalian cells, *Cell. Biophys.*, **2**: 327-337, 1980.
- [43] RAO P. N., JOHNSON R. T., Regulation of cell cycle in hybrid cells, *Cold Spring Harbor Conf. Cell Proliferation*, **1**: 785-800, 1974.
- [44] RAO P. N., WILSON B. A., PUCK T. T., Premature chromosome condensation and the cell cycle analysis, *J. Cell. Physiol.*, **91**: 131-142, 1977.
- [45] ROBINSON S. I., NELKIN B., KAUFMANN S., VOGELSTEIN B., Increased phosphorylation rate of intermediate filaments during mitotic arrest, *Exp. Cell Res.*, **133**: 445-449, 1981.
- [46] SAHASRABUDDHE C. G., ADLAKHA R. C., RAO P. N., Phosphorylation of non-histone proteins associated with mitosis in HeLa cells, *Exp. Cell Res.*, **153**: 439-450, 1984.
- [47] SCHOR S. L., JOHNSON R. T., WALDREN C., Changes in the organization of chromosomes during the cell cycle: Response to ultraviolet light, *J. Cell Sci.*, **17**: 539-565, 1975.
- [48] SPERLING K., RAO P. N., Mammalian cell fusion. V. Replication behaviour of heterochromatin as observed by premature chromosome condensation, *Chromosoma*, **45**: 121-131, 1974.
- [49] SUNKARA P., WRIGHT D. A., ADLAKHA R. C., SAHASRABUDDHE C. G.,

- RAO P. N., Characterization of chromosome condensation factors of mammalian cells, [w] *Premature Chromosome Condensation: Application in Basic, Clinical and Mutation Research*, red. P. N. Rao, R. T. Johnson, K. Sperling, Academic Press, New York 1982, 233-251.
- [50] SUNKARA P., WRIGHT D. A., RAO P. N., Mitotic factors from mammalian cells induce germinal vesicle breakdown and chromosome condensation in amphibian oocytes, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**: 2799-2802, 1979.
- [51] TARKOWSKI A. K., BAŁAKIER H., Nucleo-cytoplasmic interactions in cell hybrids between mouse oocytes, blastomeres and somatic cells, *J. Embryol. Exp. Morphol.*, **55**: 319-330, 1980.
- [52] WEINTRAUB H., BUSCAGLIA M., FERREZ M., WEILLIER S., BOULET A., FABRE F., BAULIEU E., „MPF” activity in *Saccaromyces cerevisiae*, *C. R. Hebd. Seances Acad. Sci. Ser. 3*, **295**: 787-790, 1983.
- [53] WESTWOOD J. T., WAGENAAR E. B., CHURCH R. B., Changes in protein phosphorylation during the cell cycle of CHO cells, *J. Cell Biol.*, **97**: 147a, 1983.

Otrzymano: 2 marca 1987.

Przyjęto: 21 marca 1987.

Adres: Krakowskie Przedmieście 26/28, 00-927 Warszawa.

ZIARNISTOŚCI INTERCHROMATYNOWE

INTERCHROMATIN GRANULES

Anna ZBOREK

Zakład Biologii Nowotworów, Centrum Onkologii — Instytut
im. M. Skłodowskiej-Curie, Oddział w Gliwicach

Streszczenie. Omówiono dane dotyczące ziarnistości interchromatynowych, ich morfologii i właściwości cytochemicznych oraz związku tych struktur z innymi komponentami jądra komórkowego. Przedstawiono hipotezy dotyczące roli ziarnistości interchromatynowych w funkcjach jądrowych.

Summary. This review presents the data on interchromatin granules, their morphology, cytochemistry and relations to other components of the cell nucleus. Hypotheses concerning the role of interchromatin granules in nuclear functions are presented.

I. MORFOLOGIA I WYNIKI BADAŃ CYTOCHEMICZNYCH

Od lat sześćdziesiątych, gdy do mikroskopii elektronowej wprowadzono wiele nowych metod, takich jak podwójne utrwalanie, barwienie kontrastowe nukleoprotein, trawienia enzymatyczne i wysokorozdzielczą autoradiografię, coraz lepiej poznawane są morfotyczne składniki jądra komórkowego. W materiale utrwalonym w aldehydzie glutarowym i OsO_4 oprócz jąderka i chromatyny zostają uwidocznione różne włókniste i ziarniste struktury nukleoplazmy. Wśród nich strukturami powszechnie występującymi w jądrach komórek organizmów eukariotycznych są ziarnistości interchromatynowe (IG). Chociaż dawno już zostały odkryte i opisane [34, 94], ich udział w funkcji jądra komórkowego pozostaje ciągle nieznany.

Ziarnistości interchromatynowe, obserwowane w mikroskopie elektronowym, widoczne są w postaci nieregularnych, kulistych lub pałeczkowatych struktur o średnicy około 20-25 nm [56]. Obserwacje znacznie

powiększonych zarówno ultracienkich skrawków mrożonych, jak i skrawków eponowych pozwalają sądzić, że poszczególne ziarenka IG zbudowane są z delikatnych, skręconych włókienek [67, 104]. Rzadko występują one pojedynczo, częściej tworzą różnej wielkości skupiska rozrzucone w przestrzeniach interchromatynowych jądra komórkowego (ryc. 1). Poszczególne ziarenka w skupiskach są zwykle połączone ze sobą cienkimi włókienkami, tworząc łańcuchy i rozluźnione sieci [8, 15, 56]. Łańcuchowy układ IG obserwowano nie tylko w skrawkach ultracienkich, ale również w preparatach nie skrawanych (whole mount) [41]. W skrawkach półcienkich, oglądanych w mikroskopie elektronowym, zauważono ponadto połączenia między poszczególnymi skupiskami IG [104]. Mają one postać niteczek z nanizanymi pojedynczymi ziarenkami. Zwrócono również uwagę na występowanie skupisk IG połączonych z włókienkami perichromatynowymi [67, 104].

Ziarnistości interchromatynowe wykazują silną barwliwość w preparatach kontrastowanych barwnikami wiążącymi się z grupami fosforanowymi, takimi jak octan uranylu i wodorotlenek ołowiu. Dlatego przypuszczano, że zawierają one kwasy nukleinowe. Wyniki badań cytochemicznych przeczą jednak obecności DNA w ziarnistościach interchromatynowych; są one bowiem odporne zarówno na trawienie samą DN-azą, jak również DN-azą po uprzednim trawieniu proteazą [56]. Ponadto zauważono, że ziarnistości interchromatynowe nie wybarwiają się barwnikami, które wybiórczo kontrastują DNA, takimi jak aminowany odczynnik osmowy [18, 67] lub odczynnik Schiff-thalium [61]. Według badań Watsona i Aldridge'a [105], IG barwią się indem, co wskazywałoby na obecność w nich dużej ilości niekompletnie zestryfikowanych grup kwasowych. Zdaniem tych autorów barwienie to nie jest jednak spowodowane obecnością kwasu nukleinowego, gdyż IG mają większą oporność na ekstrakcję kwasem nadchlorowym w temp. 20-25°C niż DNA. Za pomocą wysokorozdzielczej autoradiografii wykazano, że IG nie wbudowują znakowanej trytem tymidyny zarówno po pulsowej, jak i przedłużonej inkubacji z prekursorem [27], natomiast powszechnie przypuszczano, że ziarnistości interchromatynowe zawierają rybonukleoproteiny (RNP), ponieważ zachowują wysoki kontrast w preparatach barwionych metodą Bernharda [7], preferencyjną dla RNP [9, 56, 78, 86]. Jednakże wyniki wielu badań cytochemicznych z zastosowaniem chemicznych ekstrakcji, trawień enzymatycznych i różnych metod barwienia nie potwierdzają jednoznacznie tego przypuszczenia. Stwierdzono, że trawienie RN-azą lub pronazą i RN-azą ultracienkich skrawków materiału utrwalonego w aldehydzie glutarowym i zatopionego w rozpuszczalnej w wodzie żywicy — metakrylanie glikolu, nie obniża kontrastu ziarnistości interchromatynowych, a jedynie

powoduje zmniejszenie ich rozmiarów [56]. Również dużą oporność na trawienie enzymatyczne wykazują IG w materiale nie utrwalonym. Shankar Narayan i wsp. [78] zauważyli, że trawienie RN-azą izolowanych jąder komórek wątrobowych i guza Walkera powoduje jedynie częściową destrukcję IG i zmniejszenie ich kontrastu, podczas gdy w tych samych warunkach jąderko ulega strawieniu. Większość IG zanika dopiero po następujących kolejno trawieniach RN-azą i pepsyną. Zbliżone wyniki otrzymali Smetana i wsp. [85] w doświadczeniach przeprowadzonych na utrwalonych w formalinie granulocytach ludzkich. Zanik IG następował dopiero po podwójnym trawieniu — najpierw pepsyną, a następnie RN-azą. Tak więc wyniki badań z zastosowaniem trawień enzymatycznych nie rozwiązały jednoznacznie kwestii obecności RNA w ziarnistościach interchromatynowych.

Fakan i Bernhard [25] stwierdzili, że po krótkotrwałej inkubacji komórek hodowanych *in vitro* z trytowaną urydyną, prekursor wbudowywał się jedynie w obrzeża niektórych skupisk IG. Część skupisk IG nie znakowała się wcale. Po przedłużeniu czasu znakowania oraz postinkubacji z nieradioaktywnym prekursorem, liczba znakowanych skupisk wzrastała tylko nieznacznie [26]. Autorzy sugerowali, iż IG mogą zawierać RNA o wolnym metabolizmie. Również tylko słabe znakowanie trytowaną urydyną skupisk IG obserwowano w izolowanych hepatocytach szczura [31] i w komórkach CHO [29], hodowanych *in vitro*, oraz w komórkach Sertoliego w badaniach *in vivo* [40].

Na podstawie omówionych badań autoradiograficznych wątpliwa jest tożsamość IG z cząstkami RNP wyizolowanymi z jąder wątroby szczura przez Monneron i Moule [59]. Cząstki te o stałej sedymentacji 40S i wymiarach 20—30 nm, chociaż morfologicznie przypominały IG *in situ* i miały podobną wrażliwość na trawienia enzymatyczne, zawierały jednak szybko znakujący się RNA [60].

Rezultaty omówionych prac nie rozstrzygnęły problemu obecności RNA w IG. Wybitny kontrast w preparatach barwionych metodą Bernharda [7] także nie dowodzi ich rybonukleoproteinowej natury, gdyż technika ta, choć preferencyjna, nie jest specyficzna dla RNP. Mimo to powszechnie przypuszczano, że IG zawierają pewne ilości RNA o wolnym metabolizmie, dobrze zabezpieczonego przed działaniem enzymów nukleolitycznych [24, 26, 30].

Zastosowanie metod cytochemicznych pozwoliło wykazać występowanie pewnych aktywności enzymatycznych w ziarnistościach interchromatynowych. W ultracienkich skrawkach mrożonych różnych tkanek szczura Vorbrodtt i Bernhard [102] wykryli obecność GTP-azy i ATP-azy. Ten ostatni enzym wykryto również w IG w izolowanych jądrach wątrobowych [12, 71]. W obrębie konglomeratów IG stwierdzo-

no także występowanie innych fosfataz, a mianowicie β -glicerofosfatazy [12, 71] i pirofosfatazy NAD [12]. Zastosowanie jako utrwalacza preparatów do mikroskopu elektronowego nasyconego wodnego roztworu piroantymonianu potasu — związku, który precypituje nieorganiczne kationy, takie jak Mg^{2+} , Ca^{2+} , Na^+ w postaci elektronowo gęstego strątu [98], pozwoliło wykazać obecność tych kationów w IG [42, 90, 99]. Fakt ten łączono z możliwością udziału rejonów zawierających IG w procesach transkrypcji, sugerując, że w IG może być zlokalizowana polimeraza RNA o aktywności zależnej od jonów nieorganicznych, odpowiedzialna za syntezę wolno znakujących się rodzajów RNA [99]. Sugerowano również, że w rejonach występowania precypitatu mogą być obecne także inne enzymy, których aktywność jest zależna od jonów nieorganicznych, np. trójfosfatazy nukleozydowe [99].

Szczegółowe badania cytochemiczne ziarnistości interchromatynowych przeprowadziła Wassef [103, 104] w celu scharakteryzowania obecnych w IG reaktywnych grup chemicznych, które są odpowiedzialne za wysokie powinowactwo do IG związków kontrastujących, takich jak octan uranylu, wodorotlenek ołowiu lub winian bizmutu. Stosując różne blokady histochemiczne — acetylację, metylację i oksydacyjną dezaminację oraz metodę barwienia solami bizmutu, autorka potwierdziła wcześniejsze przypuszczenia, wyrażone na podstawie pozytywnej reakcji z cytrynianem ołowiu [73], że IG zawierają fosforylowane białka. Niezestryfikowane grupy fosforanowe, obecnie właśnie w części białkowej, a nie w RNA, decydowałyby — zdaniem autorki, o wysokim powinowactwie związków kontrastujących do IG. Fakt obecności fosfoprotein w IG nie wyklucza jednak możliwości, że zawierają one również niewielkie ilości stabilnego RNA, chociaż nie dowiedziono tego bezpośrednio [104].

II. WPLYW CZYNNIKÓW ZAKŁÓCAJĄCYCH METABOLIZM JĄDRA KOMÓRKOWEGO NA LICZBĘ I LOKALIZACJĘ ZIARNISTOŚCI INTERCHROMATYNOWYCH

Wielokrotnie notowano zjawisko agregowania małych skupisk IG w duże konglomeraty w rozmaitych warunkach patologicznych (ryc. 2). Często towarzyszył temu wzrost liczby IG. Zjawisko to występuje w wyniku działania na komórkę bardzo różnych czynników, zarówno chemicznych, jak i fizycznych, zakłócających jej metabolizm [83].

Już Swift w 1959 r. [94] opisał agregowanie ziarnistości interchromatynowych w komórkach nowotworowych. Konglomeraty IG obserwowano w komórkach poddanych działaniu supranormalnych temperatur

[82], a także w komórkach wątroby myszy lub szczura, degenerujących w czasie autolizy *in vitro* [38, 100]. Niejednokrotnie stwierdzono tworzenie się konglomeratów IG pod wpływem środków interkalujących do DNA — proflawiny, daunomycyny i bromku etydyny [81], a z grupy aminoakrydyn — chinakryny [32, 48] i Ledakrinu (1-nitro-9/3-dimethylpropyloamine/acridine-2 HCl) [44, 101]. Po działaniu Ledakrinu stwierdzono ponadto pojawianie się w obrębie konglomeratów IG licznych zagęszczeń ziarnistości, widocznych jako elektronowo gęste plamki [46]. Duże konglomeraty IG powstają również pod wpływem antybiotyku U-12241, wiążącego się z DNA poprzez adeninę lub tymidynę [83]. Konglomerację IG powodują również inhibitory syntezy RNA — etionina [55, 79] i metionina [80] oraz inhibitor polimerazy II RNA — α -amanityna [52, 63]. Crozet i Szöllösi [20] zaś, badając wpływ aktynomycyny D i α -amanityny na reinicjację dojrzewania mysich oocytów stwierdzili, że w obecności środka zapobiegającego dojrzewaniu oocytów do mejozy (isopropyl-N-phenylcarbamate), α -amanityna powoduje rozluźnienie agregatów i zmniejszenie się ilości IG. Tworzenie się konglomeratów IG zanotowano również w komórkach traktowanych kancerogenami — aflatoksyną i lasiokarpiną [57, 58], oraz tlenkiem chinoliny (4-nitro-quinoline-N-oxide) [47].

Działanie niektórych kancerogenów powoduje, oprócz agregacji IG, również wzrost ich liczby; zauważono to w przypadkach zatrucia aflatoksyną, etioniną, lasiokarpiną, tioacetamidem, kwasem digalusowym i dimetylonitrozaminą [93]. Wzrost liczby IG oraz ich konglomeracja mogą być także następstwem zakażenia komórek wirusami. Singer [84] zaobserwował konglomeraty IG po zakażeniu hodowli ludzkich komórek NB parwowirusem HI. Dupuy-Coin i wsp. [23] przeprowadzili ilościowe badania występowania IG w trakcie zakażenia wirusem *Herpes simplex*, typ 2 (HSV2), komórek glejowych hodowanych *in vitro*. Odsetek skrawków, w których obserwowano IG, wzrósł od 1—2% w komórkach nie zakażonych do 32% w czasie 24 godz. po infekcji.

Skupianie się IG w konglomeraty i zwiększenie ich liczby zauważono ponadto w niektórych komórkach o nasilonym metabolizmie RNA, jak w mysich spermatocytach [41, 99] i w komórkach Sertoliego [40]. Wzrost ilości IG następuje również podczas blastycznej transformacji limfocytów ludzkich, hodowanych w obecności fitohemaglutyniny [43].

Niejednokrotnie zauważono, w różnych przypadkach zakłócenia metabolizmu, że rozmieszczenie IG w obrębie jądra komórkowego jest inne niż w jądrze komórek kontrolnych. Na przykład w izolowanych hepatocytach szczura, traktowanych analogiem adeniny, DRB (5-6-dichloro-1- β -D-ribofuranosyl benzimidazole), ziarnistości interchromatynowe występują w postaci dużych luźnych skupisk, często w powiązaniu z ją-

derkiem [66]. Zbliżony związek IG z jądrem zauważono w hodowlach komórkowych po podaniu różnych antymetabolitów [74], w mysich oocytach traktowanych aktynomycyną D [20], w wątrobie szczura po podaniu D-galaktozaminy [22], a także w kulturach ludzkich komórek linii NB po zakażeniu parwowirusem H1 [84]. Zanotowano również powiązania konglomeratów IG, wywołanych warunkami patologicznymi, z ulegającą silnej kondensacji chromatyną [74, 84], a zwłaszcza z chromatyną przylegającą do fibrylarnych jąder [54]. Fakt, że procesowi kondensacji chromatyny towarzyszy zjawisko konglomeracji ziarnistości interchromatynowych, nasuwał przypuszczenie, że istnieją powiązania włókienek chromatynowych ze skupiskami IG. Za pomocą autoradiografii w mikroskopie elektronowym rzeczywiście stwierdzono znakowanie trytowaną tymidyną konglomeratów IG powstałych pod wpływem cytotastyku — Ledakrinu [35]. Ponieważ wiadomo, że ziarnistości interchromatynowe same w sobie nie zawierają DNA, wyniki te mogłyby więc świadczyć o obecności w obrębie konglomeratów IG włókienek chromatynowych, które zostały tam „uwięzione” w procesie agregowania małych skupisk IG.

Jakkolwiek zjawisko agregowania ziarnistości interchromatynowych stanowi charakterystyczną odpowiedź IG na różne czynniki zmieniające metabolizm komórki, nie jest ono reakcją swoistą, która umożliwiłaby zrozumienie powiązań funkcjonalnych IG z innymi strukturami jądra komórkowego. Reakcja ta zachodzi zarówno w przypadku zakłócenia funkcji jąderka, jak i zahamowania pozająderekowej syntezy RNA. Trzeba jednak mieć na uwadze, że cytowane opisy zmian w ilości IG opierają się w zasadzie na ocenie szacunkowej. Określenie liczby IG w preparatach morfologicznych jest bowiem bardzo trudne ze względu na małe rozmiary tych struktur i rozproszenie ich w jądrze komórkowym.

III. ZIARNISTOŚCI INTERCHROMATYNOWE W CZASIE MITOZY

Pierwsza wzmianka na temat zachowania się IG w czasie mitozy pochodzi z pracy Swifta [95]. W cytoplazmie dzielących się komórek raka Ehrlicha autor ten zauważył obecność cząstek, które w utrwalonym materiale były odporne na działanie RN-azy. Mimo że według Swifta średnica tych cząstek dochodziła zaledwie do 10 nm, utożsamiano je później z IG. Następnie Fakan i Nobis [29] stwierdzili występowanie IG w cytoplazmie mitotycznych komórek CHO. Bielańska-Osuchowska [10] opisała obecność tzw. ciałek ziarnistych w cytoplazmie oogonii i oocytów zarodków świni, sugerując, że powstają one z IG wyrzuconych z jądra

komórkowego w czasie podziałów mitotycznych oogonium. Przy użyciu metody immunofluorescencji stwierdzono w cytoplazmie ludzkich komórek HeLa i Raji obecność skupisk IG, utrzymujących się do późnej telofazy [17]. Stosując wybiórczo barwienie IG bizmutem [11] oraz wywołując konglomerację ziarnistości interchromatynowych za pomocą Ledakrinu, Krzyżowska-Gruca i wsp. [45] wykazali obecność IG utrzymujących się w postaci konglomeratów w cytoplazmie dzielących się komórek regenerujący wątroby szczura, raka wysiękowego Ehrlicha i komórek białaczki mysiej L1210 (ryc. 3). W czasie telofazy obserwowali w cytoplazmie, oprócz dobrze zachowanych konglomeratów IG, włókniste struktury barwiące się bizmutem, które interpretowali jako obrazy dezintegracji ziarnistości interchromatynowych. Jednocześnie w jądrach potomnych pojawiały się małe skupiska IG [45]. Podobne obserwacje poczynili Takeuchi i Takeuchi [97], stosując metodę barwienia amoniakalnym azotanem srebra (Ag-AS) według Hernandez-Verdun i wsp. [36]. Stwierdzili oni cytoplazmatyczną lokalizację skupisk IG w metafazie i telofazie dzielących się ektodermalnych komórek zarodków szczura. Ponieważ IG nie występują w cytoplazmie komórek interfazowych, autorzy ci sugerują więc, że w czasie przejścia z telofazy do interfazy pozostające w cytoplazmie IG ulegają rozproszeniu lub dezintegracji.

IV. ZIARNISTOŚCI INTERCHROMATYNOWE JAKO SKŁADNIK MACIERZY JĄDROWEJ

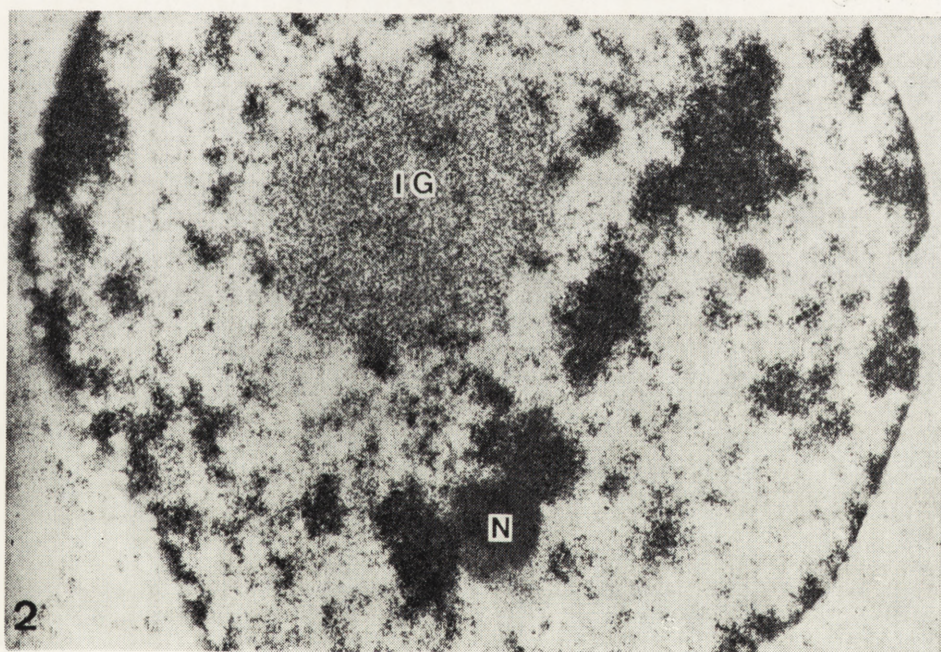
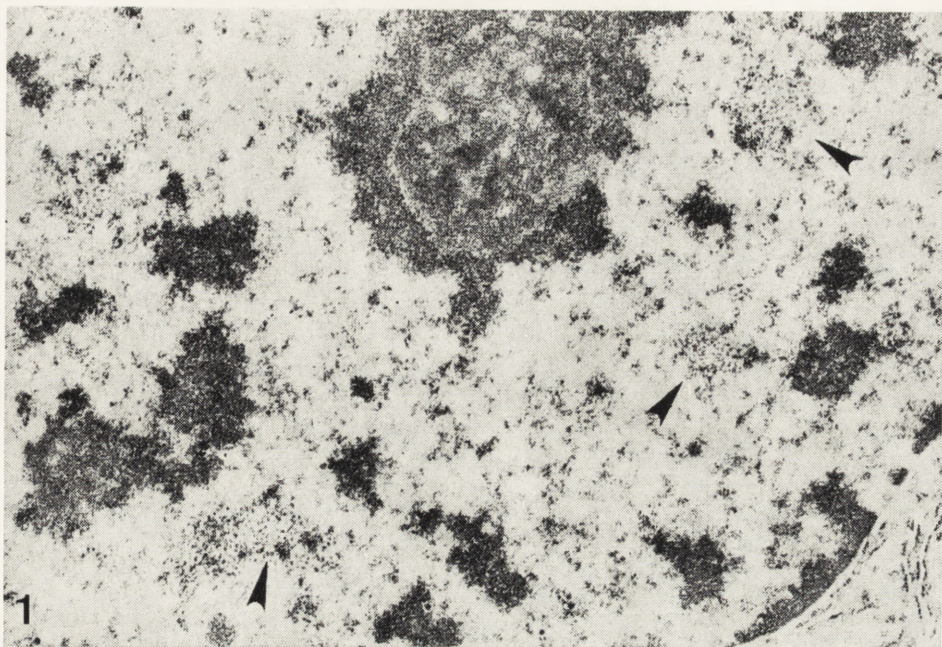
Począwszy już od wczesnych lat czterdziestych pojawiało się wiele doniesień o istnieniu w jądrze komórkowym strukturalnej sieci, zbudowanej z włókienek białkowych pochodzenia niechromatynowego [53, 88, 95, 106, 107]. Podstawą przypuszczenia o istnieniu takiego wewnętrznego szkieletu była oporność części białek jądrowych na czynniki stosowane w celu usunięcia chromatyny. Sieć ta zachowywała kształt jądra po działaniu wysokich stężeń soli (2 M NaCl) i rozcieńczonych alkaliów. Niektórzy autorzy na podstawie tych obserwacji sugerowali, że zbudowana jest ona z rybonukleoprotein i rozciąga się w jądrze między otoczką jądrową i jąderkiem. W obrębie tej sieci rozpoznawano cząstki ziarniste podobne do IG in situ [78, 86, 89]. W 1974 r. Berezney i Coffey [5] opracowali metodę izolacji jądrowej struktury szkieletowej, którą nazwali białkową macierzą jądrową. Metoda ta obejmowała następujące po sobie ekstrakcje jąder roztworem o niskim stężeniu jonów Mg^{2+} , 2 M NaCl, detergentem i trawienie nukleazami. Otrzymana macierz jąd-

rowa, zbudowana w 98% z białek, zachowuje kształt jądra i składa się z pozostałości otoczki jądrowej, resztowego jąderka i łączącej te komponenty wewnętrznej włóknisto-ziarnistej sieci [5]. W obrębie sieci wewnętrznej stwierdzono obecność struktur podobnych do skupisk IG [2, 3, 6, 19]. Krzyżowska-Gruca i wsp. [46] obserwowali zachowanie i lokalizację IG w macierzach jądrowych izolowanych z jąder komórek wątrobowych szczurów traktowanych tioacetamidem, powodującym rozproszenie chromatyny, lub Ledakrinem, wywołującym jej kondensację. Zmianom stopnia kondensacji chromatyny towarzyszyły zmiany rozmieszczenia IG w jądrze — ich rozproszenie lub konglomeracja. W procesie izolacji macierzy jądrowej ziarnistości interchromatynowe zachowywały nie tylko swoją ultrastrukturalną integralność, lecz również układ rozmieszczenia w wewnętrznej sieci macierzy charakterystyczny dla jąder *in situ* (ryc. 4).

Obecność IG w macierzy jądrowej, strukturze niezbędnej do zachowania architektury jądra, oraz, jak się uważa, zaangażowanej w podstawowe funkcje jądra komórkowego, takie jak replikacja, transkrypcja i transport RNA [1, 4], nasuwa pytanie o ewentualny udział IG w wymienionych funkcjach — strukturalnej i metabolicznej. Rezultaty badań ostatnich lat, które zostaną omówione w rozdz. VI, zdają się pozytywnie odpowiadać na to pytanie.

V. PRZYPUSZCZENIA DOTYCZĄCE FUNKCJI IG NA PODSTAWIE MORFOLOGICZNYCH I BIOCHEMICZNYCH POWIĄZAŃ Z INNYMI STRUKTURAMI JĄDRA KOMÓRKOWEGO

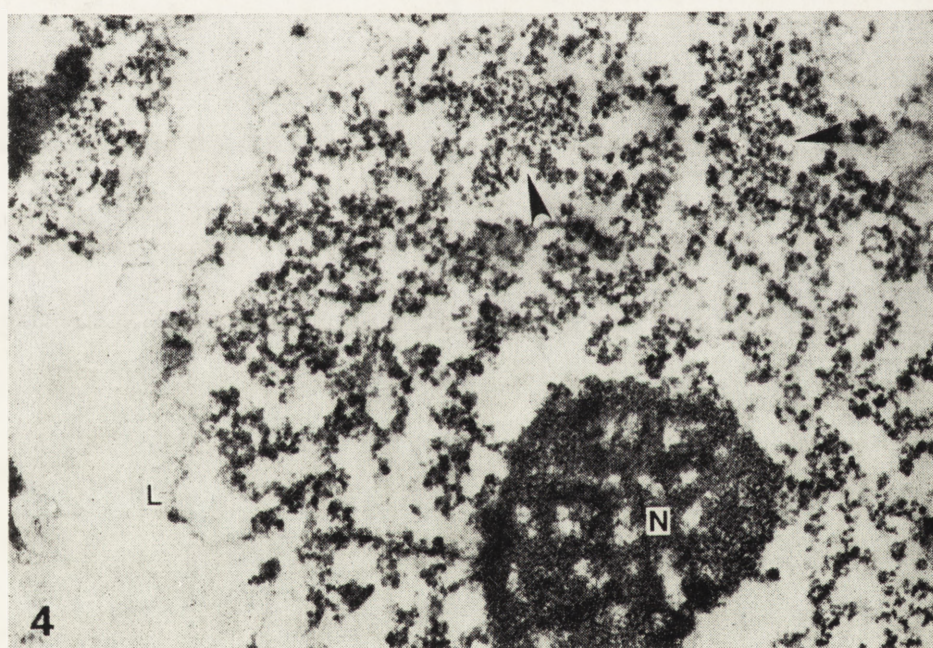
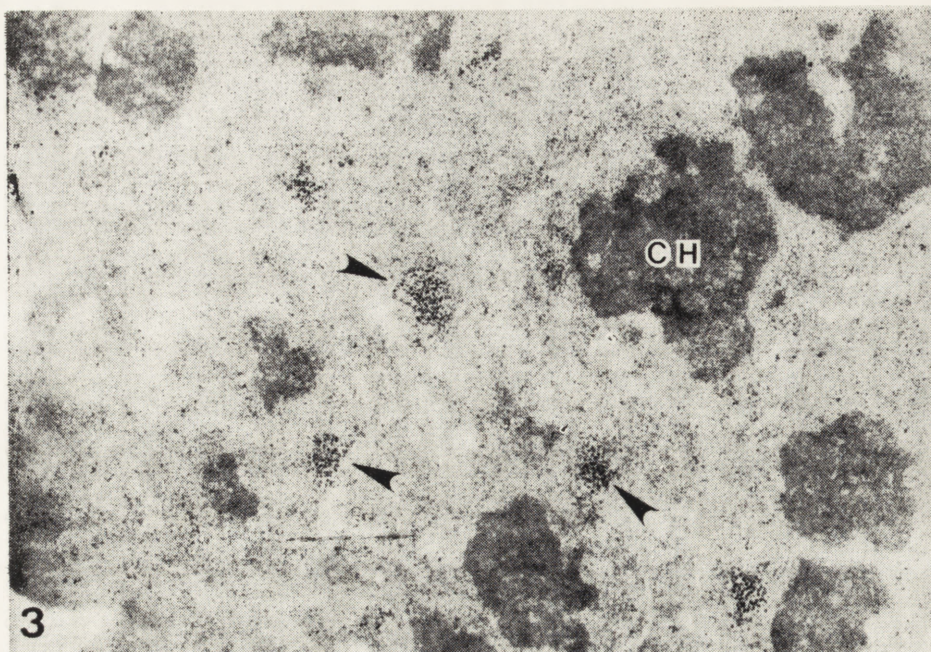
Jakkolwiek wiele informacji zgromadzono na temat budowy ziarnistości interchromatynowych i ich strukturalnych powiązań z innymi elementami jądra komórkowego, do dziś nie udało się ustalić ich funkcji. Nieswoista odpowiedź IG na różne czynniki zakłócające metabolizm jądra komórkowego nie ułatwia tego zadania. Pomimo to sformułowano wiele hipotez wiążących obecność IG w jądrze z metabolizmem RNA; nie udokumentowano jednak przekonująco żadnej z nich. Już w kilka lat po odkryciu IG Smetana i wsp. [86] sugerowali, że gęste elektronowo cząstki, odpowiadające IG, są częścią sieci rybonukleoproteinowej, która rozciągając się między jąderkiem i otoczką jądrową mogłaby stanowić drogę transportu cząsteczek RNP z jądra do cytoplazmy. Shankar Narayan i wsp. [78] postulowali nawet, że sieć RNP, która zawiera IG, jest miejscem syntezy 18S rRNA lub jego prekursorów. Istnienie funkcjonalnego związku IG z jąderkiem sugerowali także Recher i wsp. [72, 73]. Badając wpływ proflawiny na hodowle komórek ludzkich ME180



Ryc. 1. Jądro wątroby szczura. Materiał utrwalony w aldehydzie glutarowym. Skrawki ultracienkie barwione octanem uranylu i cytronianem ołowiu. Strzałki — ziarnistości interchromatynowe. Powiększenie 19 500 ×

Ryc. 2. Jądro wątroby szczura 3 godz. po iniekcji Ledakrinu w dawce 10 mg/kg wagi ciała. Ziarnistości interchromatynowe (IG) tworzą duże skupisko (porównaj ryc. 1).

N — Fragment jąderka, którego składniki uległy segregacji. Powiększenie 15 600 ×



Ryc. 3. Komórka raka włośnikowego Ehrlicha w czasie metafazy. Ziarnistości interchromatynowe występują w postaci małych skupisk (strzałki) rozrzuconych w cytoplazmie między chromosomami (CH). Materiał utrwalony w 5% aldehydzie glutarowym i barwiony bizmitem przed zatopieniem w eponie. Skrawek ultracienki kontrastowany octanem uranylu dla uwidocznienia chromosomów. Powiększenie 20 000 ×

Ryc. 4. Macierz jądrowa komórki wątrobowej szczura uzyskana przez traktowanie izolowanych jąder detergentem niejonowym, DN-azą I i buforem o wysokiej sile jonowej. Ziarnistości interchromatynowe (strzałki) są wyraźnie widoczne wśród włóknistych i ziarnistych struktur wewnętrznej macierzy; L — warstwa gęsta osłonki jądrowej, N — resztkowe jąderko. Powiększenie 25 000 ×

obserwowali oni tworzenie się fibrylarnych guzków (fibrillar nodules) pochodzących z fibrylarniej części jąderka, które występowały w ścisłym powiązaniu z IG [72]. Podobne obrazy opisano pod wpływem kordycepiny [73]. Na podstawie następnych doświadczeń, w których hodowle komórkowe traktowano aktynomycyną D, Recher i wsp. [74] wysunęli przypuszczenie, że IG powstają z pewnej części granularnego komponentu segregowanego jąderka, tzw. frakcji P₂. Zarówno frakcja P₂, jak i związane z nią ziarnistości interchromatynowe znakowały się trytonową urydyną w czasie 45-minutowej inkubacji w obecności antybiotyku. Autorzy sugerowali istnienie relacji prekursor-produkt między granularnymi elementami jąderka i IG; te ostatnie zawierałyby 28S rRNA. Inną sugestię przedstawił Singer [84], który uważał, że konglomeraty IG, przylegające do resztek jąderka w ludzkich komórkach NB zakażonych parwowirusem H1, mogą stanowić produkty dezintegracji jąderka.

Pojawiły się również prace sugerujące powiązanie IG z procesami pozająderekowej syntezy RNA. W warunkach zahamowania jąderkowej syntezy RNA lasiokarpiną stwierdzono za pomocą autoradiografii wbudowywanie trytonowej urydyny w obszary jądra komórkowego, zawierające IG [57].

Istniały również przypuszczenia, że IG są miejscem wewnątrzjądrowego przechowywania informoferów — cząstek RNP o współczynniku sedymentacji 30S, wiążących hnRNA [75, 76]. Louis i Sekeris [51] stwierdzili, że po zahamowaniu syntezy hnRNA przez α -amanitynę ilość wyizolowanych informoferów zmniejsza się. Ponieważ wcześniejsze obserwacje morfologiczne wskazywały, że w takich warunkach ilość IG w jądrze *in situ* ulega zwiększeniu [63], wyrazili więc oni przypuszczenie, że IG są miejscem gromadzenia informoferów nie zaangażowanych w procesy związane z transkrypcją [51]. Jednakże w następnej pracy [92] autorzy wycofali się z tej hipotezy.

Wassef [104] zwróciła uwagę, że obecność fosforylowanych białek w ziarnistościach interchromatynowych odróżnia je od innych części macierzy jądrowej i wysunęła przypuszczenie, że ziarnistości te mogą wytyczać granice nieaktywnych części macierzy jądrowej, zwłaszcza że nie zawierają one szybko znakującego się RNA. Alternatywnie, zdaniem autorki, IG mogłyby reprezentować pulę fosforylowanych białek, zaangażowanych w metabolizm, i transport RNA. Zawierają one bowiem aktywności ATP-azy i GTP-azy, a jak stwierdzono w badaniach *in vitro*, transport szybko znakującego się RNA z izolowanych jąder jest zależny od ATP i GTP.

Ostatnio Puvion i wsp. [65, 69] ponownie podnieśli kwestię związku IG z funkcją jąderka. W ich doświadczeniach izolowane komórki wątro-

by szczura znakowano pulsowo trytowaną urydyną, a następnie hodowano je w obecności DRB — związku zaburzającego dojrzewanie rybosomalnego RNA. W tych warunkach stwierdzono za pomocą wysokorozdzielczej autoradiografii silne znakowanie skupisk IG. Jeśli przed inkubacją z prekursorem zahamowano syntezę jąderkowego RNA niskimi dawkami aktynomycyny D, to ziarnistości interchromatynowe nie wykazywały znakowania po postinkubacji komórek z DRB. Autorzy stwierdzają, że ziarnistości interchromatynowe biorą udział w transporcie lub nagromadzeniu jąderkowego RNA. W ten sposób byłyby one zaangażowane w regulację biogenezy rybosomów. Stwierdzony w wielu pracach prawie całkowity brak wbudowywania trytowanej urydyny do IG w warunkach kontrolnych można by, zdaniem autorów, tłumaczyć dużym tempem transportu podjednostek rybosomalnych z jąderka do cytoplazmy.

Kilka lat temu Fakan i Puvion [30] wyrazili przypuszczenie, że ziarnistości interchromatynowe zawierają niskocząsteczkowe rodzaje RNA w postaci kompleksów z białkiem. Powołując się na wyniki badań, świadczące o obecności snRNP w informoferach — cząstkach, które utożsamiano wtedy z IG [21, 77], sugerowali oni, że ziarnistości interchromatynowe mogłyby stanowić pulę cząsteczek — kompleksów snRNA i białka. W późniejszej pracy przeglądowej Puvion i Moyne [68] zwrócili uwagę na dane dotyczące występowania niskocząsteczkowych RNA, metabolicznie stabilnych, w połączeniu z macierzą jądrową. Strukturami jądrowymi zawierającymi snRNA mogłyby być właśnie ziarnistości interchromatynowe, będące komponentem macierzy jądrowej.

VI. ROLA IG W ŚWIETLE WYNIKÓW BADAŃ IMMUNOCYTOCHEMICZNYCH

Zastosowanie w ostatnich latach technik immunocytochemicznych przyniosło potwierdzenie obecności snRNP w ziarnistościach interchromatynowych i pozwoliło na wykrycie różnych białek IG za pomocą przeciwciał monoklonalnych. Lokalizację snRNP w jądrze komórkowym umożliwiło stwierdzenie, że przeciwciała zawarte w surowicy osób chorych na toczeń rumieniowaty układowy i niektóre inne choroby autoimmunologiczne rozpoznają determinanty antygenowe cząstek rybonukleoproteinowych, zawierających snRNA z grupy oznaczonej przez U [50, 96]. Grupę tę stanowią bogate w kwas urydylowy metabolicznie stabilne kwasy o stałej sedymentacji 4S-8S, syntetyzowane przez polimerazę II RNA. Obejmuje ona 8 rodzajów RNA: U1, U2, U4, U5, U6, U7, występujących w nukleoplazmie [13, 14, 91], oraz U3 i U8, swoiste dla jąderka [13, 39, 64]. Z surowicy chorych uzyskano dwa przeciwciała:

anty-Sm, które rozpoznaje determinanty antygenowe snRNP zawierających U1, U2, U4, U5, U6 i U7 oraz anty-RNP rozpoznające tylko U1 snRNP. Biochemicznie stwierdzono, że wszystkie nukleoplazmatyczne snRNP z tej grupy są zasocjowane z hnRNP. Sugeruje się, że mogą one pełnić rolę w dojrzewaniu pre-mRNA i jego transporcie [13, 21, 33, 62].

W 1983 r. Spector i wsp. [87] przedstawili za pomocą metody immunofluorescencji lokalizację snRNP w komórkach PtK2 i wątrobiaka Novikoffa. Stwierdzili obecność snRNP w regionach nukleoplazmy, zajmowanych zwykle przez skupiska IG. Po traktowaniu komórek DRB inhibitorem syntezy RNA obserwowano przesunięcie fluorescencji do centralnych części jąder, które w mikroskopie elektronowym wykazują obecność dużych konglomeratów IG, powstałych pod wpływem tego związku. Ostatnio Fakan i wsp. [28], stosując przeciwciała skompleksowane ze złotem (metoda immunozłotowa), zbadali w mikroskopie elektronowym lokalizację antygeny rozpoznawanego przez przeciwciała anty-Sm. Autorzy zastosowali do tego celu surowicę chorych na choroby tkanki łącznej oraz odpowiednie przeciwciała monoklonalne. Spośród elementów ultrastrukturalnych jądra komórkowego najsilniej znakowane złotem były ziarnistości interchromatynowe. Zdaniem autorów, obecność snRNP w obrębie skupisk IG sugeruje, że ziarnistości interchromatynowe pełnią funkcję przechowywania snRNA, a ponieważ stanowią one wyraźnie rozpoznawalny nukleoplazmatyczny komponent w obrębie wewnętrznej sieci macierzy jądrowej, nie można więc wykluczyć również możliwości strukturalnej roli snRNP w architekturze jądra.

Puvion i wsp. [70] zidentyfikowali metodą immunocytochemiczną w mikroskopie elektronowym jądrowe struktury zawierające snRNP w izolowanych komórkach wątrobowych szczura w warunkach kontrolnych oraz w komórkach, w których wywołano zmiany ilości i rozmieszczenia komponentów RNP po traktowaniu DRB lub CdCl_2 . Białka snRNA uwidacziano za pomocą przeciwciał znakowanych peroksydazą lub złotem koloidalnym. W komórkach kontrolnych metoda z użyciem peroksydazy ujawniła obecność snRNP w włóknisto-ziarnistych strukturach nukleoplazmy, obejmujących także skupiska IG. Po zastosowaniu metody z użyciem koloidalnego złota najsilniej znakowanymi strukturami okazały się skupiska ziarnistości interchromatynowych. W komórkach traktowanych DRB skupiska IG ulegały agregacji i w metodzie peroksydazowej konglomeraty te były miejscem najsilniej znakowanym, przy bardzo słabym znakowaniu reszty przestrzeni pozajądrowej. Wyniki te, zdaniem autorów, wskazują, że IG są miejscem magazynowania niskocząsteczkowego RNA. Wcześniej wykazano, że w komórkach traktowanych DRB ziarnistości interchromatynowe zawierają także rybosomalny RNA, przeto mogłyby brać udział w transporcie podjednostek

rybosomalnych i/lub regulacji biogenezy rybosomów [69]. Opierając się na danych dotyczących obecności snRNP w ziarnistościach interchromatynowych, autorzy [70] rozpatrują możliwość udziału niskocząsteczkowych RNP w wymienionych procesach. Równocześnie IG mogłyby być według nich zaangażowane w utrzymaniu architektury jądra komórkowego.

W 1984 r. Clevenger i Epstein [16, 17] zastosowali przeciwciała monoklonalne w celu ultrastrukturalnej lokalizacji odpowiednich antygenów w jądrze komórkowym. Przeciwciało oznaczone 780-3, należące do klasy IgM, rozpoznawało swoście komponent białkowy ziarnistości interchromatynowych. Reakcja immunologiczna, wykonana po przeniesieniu na filtry nitrocelulozowe białek jądrowych rozdzielonych w żelu (immunoblotting), wykazała, że przeciwciało 780-3 wiąże się z polipeptydami o ciężarach cząsteczkowych 105 000 i 41 000. Białka te, zdaniem autorów, mogą być dimerem lub monomerem tego samego białka lub też białko 41 000 jest produktem proteolitycznego trawienia białka 105 000. Stosując metodę pośredniej immunofluorescencji stwierdzili oni odmienną lokalizację badanego białka w komórkach płodowych, dojrzałych i transformowanych, a także w różnych fazach cyklu komórkowego. W dojrzałych ludzkich fibroblastach fluorescencja występowała w postaci plamek tylko na terenie jądra komórkowego z wyłączeniem jąderek. Podobną lokalizację, ale zwiększoną ilość badanych białek, stwierdzono w komórkach transformowanych, natomiast w komórkach mitotycznych zanotowano pojawienie się dużej ilości badanych białek w cytoplazmie. Komórki płodowe wykazywały dodatkowo fluorescencję nad obszarami jąderka. Badając lokalizację białek 41 000 i 105 000 w mikroskopie elektronowym z użyciem przeciwciał związanych ze złotem, autorzy stwierdzili wyraźne znakowanie wszystkich skupisk ziarnistości interchromatynowych, a także słabe znakowanie jąderek. W metafazie występuje silne znakowanie w cytoplazmie, obejmujące także konglomeraty IG. Według autorów, zastosowanie monoklonalnego przeciwciała 780-3 stanowi absolutnie czułą próbę, mogącą służyć do wykrywania IG. Wyrazili oni także bardzo śmiały, choć słabo podbudowany wynikami pogląd o istnieniu związku prekursor-produkt między jąderkiem i ziarnistościami interchromatynowymi. IG służyłyby, ich zdaniem, jako elementy strukturalne budujące jąderko, które ulegają zespoleniu lub rozpadowi zależnie od fazy cyklu komórkowego. Na funkcjonalny związek IG z jąderkiem wskazują również wyniki pracy Hügla i wsp. [37]. Obrali oni jako model doświadczalny oocyty *Xenopus laevis* ze względu na wysokie tempo wytwarzania rybosomów w tych komórkach przez liczne, transkrypcyjnie aktywne pozachromosomowe jąderka. Stosując monoklonalne przeciwciało No-194, zidentyfikowali kwaśne białko o ciężarze

cząsteczkowym 40 000, które nazwali rybocharyną. Badania biochemiczne wykazały, że białko to jest zasocjowane z granularnym komponentem jąderka i wyizolowanymi nukleoplazmatycznymi cząstkami 65S. Nie stwierdzono jego obecności w rybosomach. Metodą immunozłotową w mikroskopie elektronowym wykazano lokalizację rybocharyny w granularnym komponentcie jąderka i w IG.

W czasie mitozy cząstki zawierające rybocharynę są zasocjowane z powierzchnią chromosomów, a w późnej telofazie gromadzą się w rekonstruowanym jąderku. Na podstawie tych wyników autorzy sądzą, że rybocharyna reprezentuje rodzaj jąderkowego nierybosomalnego białka, które łączy się z cząsteczkami prekursorowymi, zawierającymi 28S rRNA, jeszcze w obrębie jąderka. Chociaż nie udało się zidentyfikować rybocharyny u wyższych kręgowców — ptaków i ssaków, autorzy sugerują, że białko jąderkowe o podobnych właściwościach może istnieć również u innych gatunków. Cząstka 65S, która zawiera 28S rRNA, różne białka rybosomalne i rybocharynę, byłaby, zdaniem autorów, specjalną formą nukleoplazmatycznego prekursora dużej podjednostki rybosomalnej w drodze do cytoplazmy. Ziarnistości interchromatynowe stanowiłyby ultrastrukturalny odpowiednik cząstek 65S.

Na rolę ziarnistości interchromatynowych, jako elementów macierzy jąderkowej, w procesach transkrypcji, dojrzewania i transportu pozarybosomalnego RNA wskazują wyniki pracy Lehnera i wsp. [49]. Stosując przeciwciało monoklonalne I-14 i metodę immunozłotową, autorzy zbadali rozmieszczenie odpowiedniego białka w obrębie jądra komórkowego i macierzy jąderkowej. Białko to, o ciężarze cząsteczkowym 40 000, zostało zlokalizowane głównie w ziarnistościach interchromatynowych. Występuje ono również we włóknkach perichromatynowych, a ponadto poza jądrem w mitochondriach. Badając możliwość udziału białka I-14 w podstawowych procesach jąderkowych, takich jak replikacja i transkrypcja, autorzy śledzili jego rozmieszczenie w trzech typach komórek kurczenia o różnym stopniu zróżnicowania:

- 1) w embrjonalnych fibroblastach o aktywnych procesach replikacji i transkrypcji;
- 2) w zróżnicowanych *in vitro* wielojądrzastych włóknach mięśniowych nie dzielących się, ale aktywnych transkrypcyjnie;
- 3) w dojrzałych erytrocytach, w których nie zachodzi żaden z tych procesów.

Metoda immunofluorescencji ujawniła obecność białka rozpoznawanego przez przeciwciało I-14 tylko w embrjonalnych fibroblastach i włóknach mięśniowych. Za pomocą metody immunoblotingu potwierdzono brak antygeny o ciężarze cząsteczkowym 40 000 w jądrach erytrocytów. Oporność antygeny na różne techniki ekstrakcji, stosowane zwykle do

uzyskania macierzy jądrowej, wskazuje, zdaniem autorów, że uczestniczy on w organizacji jądra jako element szkieletowy, zaangażowany również w procesach transkrypcji, dojrzewania lub transporcie RNA.

VII. UWAGI KOŃCOWE

1. Przedstawione tu dane o ziarnistościach interchromatynowych są często sprzeczne, a ponadto niektóre z nich są wątpliwe. Spośród różnych hipotez, dotyczących funkcji IG w jądrze komórkowym, żadna nie jest przekonująco udokumentowana. Hipotezy te bardzo często nie uwzględniają danych doświadczalnych innych autorów, dotyczących różnych struktur jądra komórkowego.

2. Wyniki ostatnich prac skłaniają ku pogładowi, że istnieje związek ziarnistości interchromatynowych z funkcją jąderka.

3. Zastanawiające jest, że pomimo iż IG są bardzo konserwatywne morfologicznie, występują w nich białka swoiste gatunkowo, np. rybocharyna.

4. Zjawisko agregowania ziarnistości interchromatynowych w duże konglomeraty można by wykorzystać w celu wyizolowania tych struktur. Pozwoliłoby to na określenie ich składu chemicznego i poznanie charakterystycznych białek. Zadanie to może jednak utrudniać ścisły związek IG z elementami macierzy jądrowej.

5. Wydaje się, że określenie metodami immunocytochemicznymi struktury ziarnistości interchromatynowych może pomóc w określeniu ich funkcji w jądrze komórkowym.

PODZIĘKOWANIE

Dziękuję państwu dr S. Krzyżowskiej-Gruca i drowi S. Grucy za zainteresowanie, krytyczne uwagi i wskazówki w czasie pisanie tej pracy.

LITERATURA

- [1] AGUTTER P. S., RICHARDSON J. C. W., Nuclear non-chromatin proteinaceous structures: their role in the organization and function of the interphase nucleus, *J. Cell Sci.*, **44**: 395-435, 1980.
- [2] BEREZNEY R., Dynamic properties of the nuclear matrix, [w] *The Cell Nucleus*, vol. VII, red. H. Busch, Academic Press Inc., New York 1979, 413-456.

- [3] — Fractionation of the nuclear matrix. I. Partial separation into matrix protein fibrils and a residual ribonucleoprotein fraction, *J. Cell Biol.*, **85**: 641-650, 1980.
- [4] — Organization and functions of the nuclear matrix, [w] *Chromosomal Nonhistone Proteins*, vol. IV, red. L. S. Hnilica, CRC Press, Boca Raton 1984, 120-180.
- [5] BEREZNEY R., COFFEY D. S., Identification of a nuclear protein matrix, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **60**: 1410-1417, 1974.
- [6] — Nuclear matrix. Isolation and characterization of a framework structure from rat liver nuclei, *J. Cell Biol.*, **73**: 616-638, 1977.
- [7] BERNHARD W., A new staining procedure for electron microscopical cytology, *J. Ultrastruct. Res.*, **27**: 250-265, 1969.
- [8] — Drug-induced changes in the interphase nucleus [w] *Advances in Cytopharmacology*, vol. I, Raven Press, New York 1971, 49-67.
- [9] BERNHARD W., GRANBOULAN N., The fine structure of the cancer cell nucleus, *Exptl. Cell Res. Suppl.* **9**: 19-53, 1963.
- [10] BIELAŃSKA-OSUCHOWSKA Z., Granular bodies and dense bodies in oogenesis and oocytes of domestic pig (*Sus scrofa* dom. L) embryos, *Folia Morphol.* (Warsz.), **38**: 177-192, 1979.
- [11] BROWN G. L., LOCKE M., Nucleoprotein localization by bismuth staining, *Tissue a. Cell*, **10**: 365-388, 1978.
- [12] BUCHWAŁOW I. B., UNGER E., Enzyme activity of nuclear ribonucleoproteins, *Exptl. Cell Res.*, **106**: 139-151, 1977.
- [13] BUSCH H., REDDY R., Functional aspects of small nuclear RNAs, *UCLA Symp. Molec. Cell Biol.*, **26**: 235-260, 1985.
- [14] BUSCH H., REDDY R., ROTHBLUM L. R., CHOI Y. C., SnRNAs, snRNPs, RNA processing, *Ann. Rev. Biochem.*, **51**: 617-653, 1982.
- [15] BUSCH H., SMETANA K., The nuclear ribonucleoprotein network and the nuclear residue, [w] *The Nucleolus*, Academic Press, New York 1970, 361-380.
- [16] CLEVENGER C. V., EPSTEIN A. L., Use of immunogold electron microscopy and monoclonal antibodies in the identification of nuclear substructures, *J. Histochem. Cytochem.*, **32**: 757-765, 1984.
- [17] — Identification of a nuclear protein component of interchromatin granules using a monoclonal antibody and immunogold electron microscopy, *Exptl. Cell Res.*, **151**: 194-207, 1984.
- [18] COGLIATI R., GAUTIER A., Mise en évidence de l'ADN et des polysaccharides à l'aide d'un noyau reactif de „type Schiff”, *C. R. Acad. Sci. (Paris) D*, **276**: 3041-3044, 1973.
- [19] COMINGS D. E., OKADA T. A., Nuclear proteins. III. The fibrillar nature of the nuclear matrix, *Exptl. Cell Res.*, **103**: 341-360, 1976.
- [20] CROZET N., SZÖLLÖSI D., Effects of actinomycin D and α -amanitin on the nuclear ultrastructure of mouse oocytes, *Biol. Cell.*, **38**: 163-170, 1980.
- [21] DEIMEL B., LOUIS Ch., SEKERIS C. F., The presence of small molecular weight RNAs in nuclear ribonucleoprotein particles carrying HnRNA, *FEBS Letters*, **73**: 80-84, 1977.
- [22] DIMOVA R., GAJDARDJIEVA K. G., DABEVA M. D., HADJIOLOV A., Early effects of D-galactosamine on rat liver nucleolar structures, *Biol. Cell.*, **35**: 1-10, 1979.
- [23] DUPUY-COIN A. M., ARNOULT J., BOUTEILLE M., Quantitative correla-

- tion of morphological alterations of the nucleus with functional events during in vitro infection of glial cells with Herpes simplex hominis (HSV2), *J. Ultrastruct. Res.*, **65**: 60-72, 1978.
- [24] FAKAN S., High-resolution autoradiography as a tool for the localization of nucleic acid synthesis and distribution in the mammalian cell nucleus, *J. Microsc. (Oxford)*, **106**: 159-171, 1976.
- [25] FAKAN S., BERNHARD W., Localization of rapidly and slowly labelled nuclear RNA as visualized by high resolution autoradiography, *Exptl. Cell Res.*, **67**: 129-141, 1971.
- [26] FAKAN S., BERNHARD W., Nuclear labelling after prolonged ^3H -uridine incorporation as visualized by high resolution autoradiography, *Exptl. Cell Res.*, **79**: 431-444, 1973.
- [27] FAKAN S., HANCOCK R., Localization of newly-synthesized DNA in a mammalian cell as visualized by high resolution autoradiography, *Exptl. Cell Res.*, **83**: 95-102, 1974.
- [28] FAKAN S., LESER G., MARTIN T. E., Ultrastructural distribution of nuclear ribonucleoproteins as visualized by immunocytochemistry on thin sections, *J. Cell Biol.*, **98**: 358-363, 1984.
- [29] FAKAN S., NOBIS P., Ultrastructural localization of transcription sites and of RNA distribution during the cell cycle of synchronized CHO cells, *Exptl. Cell Res.*, **113**: 327-337, 1978.
- [30] FAKAN S., PUVION E., The ultrastructural visualization of nucleolar and extranucleolar RNA synthesis and distribution, *Int. Rev. Cytol.*, **65**: 255-295, 1980.
- [31] FAKAN S., PUVION E., SPOHR G., Localization and characterization of newly synthesized nuclear RNA in isolated rat hepatocytes, *Exptl. Cell Res.*, **99**: 155-164, 1976.
- [32] FEDORKO M. E., HIRSCH J. G., Nucleolar fragmentation in L cells exposed to quinacrine in vitro, *Cancer Res.*, **29**: 918-924, 1969.
- [33] GALLINARO H., JACOB M., An evaluation of small nuclear RNA in HnRNP, *FEBS Letters*, **104**: 176-182, 1979.
- [34] GRANBOULAN N., BERNHARD W., *Cytochimie ultrastructurale. Exploration des structures nucléaires par digestion enzymatique*, *Compt. rend. soc. biol.*, **155**: 1767-1789, 1961.
- [35] GRUCA S., KRZYŻOWSKA-GRUCA S., ZBOREK A., High-resolution autoradiographic study on the presence of chromatin structures within interchromatin granules conglomerations, *Acta histochem.*, **69**: 255-263, 1981.
- [36] HERNANDEZ-VERDUN D., HUBERT J., BOURGEOIS C. A., BOUTEILLE M., Ultrastructural localization of Ag-NOR stained proteins in the nucleolus during the cell cycle and in other nucleolar structures, *Chromosoma (Berl.)*, **79**: 349-362, 1980.
- [37] HÜGLE B., SCHEER U., FRANKE W. W., Ribocharin: a nuclear Mr 40 000 protein specific to precursor particles of the large ribosomal subunit, *Cell*, **41**: 615-627, 1985.
- [38] KARÁSEK J., Ultrastructural nuclear changes of extranucleolar ribonucleoprotein structures during autolysis of normal liver cells, *Virchow's Arch. B. Cell Pathol.*, **18**: 337-346, 1975.
- [39] KATO N., HARADA F., Nucleotide sequence of nuclear 5.45S RNA of mouse cells, *Biochim. Biophys. Acta*, **782**: 127-131, 1984.

- [40] KIERSZENBAUM A. L., RNA synthetic activities of Sertoli cells in the mouse testis, *Biol. Reprod.*, **11**: 365-376, 1974.
- [41] KIERSZENBAUM A. L., TRES L. L., Transcription sites in spread meiotic prophase chromosomes from mouse spermatocytes, *J. Cell Biol.*, **63**: 923-925, 1974.
- [42] KIERSZENBAUM A. L., TRES L. L., TANDLER C. J., The distribution of inorganic cations during spermiogenesis in the mouse, *J. Cell Biol.*, **53**: 239-243, 1972.
- [43] KRZYŻOWSKA-GRUCA S., FILIPOWSKA M., ZBOREK A., GRUCA S., Interchromatin granules in the course of lymphocyte transformation: cytochemical and autoradiographic study, Abstracts of the 21st Symposium of the Polish Histochemical and Cytochemical Society, Akademia Medyczna Kraków 1986, 33.
- [44] KRZYŻOWSKA-GRUCA S., GRUCA S., KWAŚNIEWSKA-ROKICIŃSKA C., VORBRODT A., Nuclear and nucleolar ultrastructural lesions induced by 1-nitro-9 aminoacridine (C₂₈₃) in human ovarian carcinoma cells, *Eur. J. Cancer*, **9**: 785-788, 1973.
- [45] KRZYŻOWSKA-GRUCA S., KULCZYCKA E., ZBOREK A., Cytochemical study on the localization of interchromatin granules during the cell division, *Acta histochem.*, **76**: 49-55, 1985.
- [46] KRZYŻOWSKA-GRUCA S., ZBOREK A., GRUCA S., Distribution of interchromatin granules in nuclear matrices obtained from nuclei exhibiting different degree of chromatin condensation, *Cell Tissue Res.*, **231**: 427-437, 1983.
- [47] LAZARUS S. S., VETHAMANY V. G., SHAPIRO S. H., AMSTERDAM D., Histochemistry and fine structure of 4-nitroquinoline-N-oxide — induced nuclear inclusions, *Cancer Res.*, **26**: 2229-2238, 1966.
- [48] LEDUC E. H., BERNHARD W., VIRON A., FAIN J., PUVION E., Effect of quinacrine on nuclear structure and RNA synthesis in cultured rat hepatocytes, *Cancer Res.*, **41**: 2832-2841, 1981.
- [49] LEHNER C. F., EPPENBERGER H. M., FAKAN S., NIGG E. A., Nuclear substructure antigens. Monoclonal antibodies against components of nuclear matrix preparations, *Exptl. Cell Res.*, **162**: 205-219, 1986.
- [50] LERNER M. R., STEITZ J. A., Antibodies to small nuclear RNAs complexed with proteins are produced by patients with systemic lupus erythematosus, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**: 5495-5499, 1979.
- [51] LOUIS Ch., SEKERIS C. E., Isolation of informoferes from rat liver (effects of α -amanitin and actinomycin D), *Exptl. Cell Res.*, **102**: 317-329, 1976.
- [52] MARINOZZI V., FIUME L., Effects of α -amanitin on mouse and rat liver cell nuclei, *Exptl. Cell Res.*, **67**: 311-322, 1971.
- [53] MAYER D. T., GULICK A., The nature of the proteins of cellular nuclei, *J. Biol. Chem.*, **146**: 433-440, 1942.
- [54] MEYER-SCHULTZ F., PORTE A., Sur le modifications nucléaires provoquées par l' α -amanitine dans les hépatocytes de souris, *Cytobiologie*, **3**: 387-400, 1971.
- [55] MIYAI K., STEINER J. W., Fine structure of interphase liver cell nuclei in acute ethionine intoxication, *Lab. Invest.*, **16**: 677-692, 1967.
- [56] MONNERON A., BERNHARD W., Fine structural organization of the interphase nucleus in some mammalian cells, *J. Ultrastruct. Res.*, **27**: 266-288, 1969.

- [57] MONNERON A., KERROS N., Persistance de la synthèse de RNA extra-nucléolaires dans le foie de rats traités par la lasiocarpine, Etude par autoradiographie a haute résolution, *Int. J. Cancer*, **5**: 55-63, 1970.
- [58] MONNERON A., LAFARGE Ch., FRAYSSINET Ch., Induction par l'aflatoxine et la lasiocarpine d'amas de grains périchromatiniens dans le foie de rat, *C. R. Acad. Sci. (Paris)*, **267**: 2053-2060, 1968.
- [59] MONNERON A., MOULE Y., Étude ultrastructurale de particules ribonucleo-proteiques nucleaires isolées a partir du foie de rat, *Exptl. Cell Res.*, **51**: 531-554, 1968.
- [60] MOULE Y., CHAUVEAU J., Particules ribonucleoproteiques 40S des noyaux de foie de rat, *J. Mol. Biol.*, **33**: 465-481, 1968.
- [61] MOYNE G., Feulgen-derived techniques for electron microscopical cytochemistry of DNA, *J. Ultrastruct. Res.*, **45**: 102-123, 1973.
- [62] NORTHEMANN W., SCHEURLLEN M., GROSS V., HEINRICH P. C., Circular dichroism of ribonucleoprotein complexes from rat liver nuclei, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **76**: 1130-1137, 1977.
- [63] PETROV P., SEKERIS C. E., Early action of α -amanitin on extranucleolar ribonucleoproteins as revealed by electron microscopic observation, *Exptl. Cell Res.*, **69**: 393-401, 1971.
- [64] PRESTAYKO A. W., TONATO M., LEWIS B. C., BUSCH H., Heterogeneity of nucleolar U3 ribonucleic acid of the Novikoff hepatoma, *J. Biol. Chem.*, **246**: 182-187, 1971.
- [65] PUVION E., Presence of RNA in the interchromatin granules of cells treated with dichlorobenzimidazole riboside (DRB), *Biol. Cell.*, **43**: 147-150, 1982.
- [66] PUVION E., BACHELLERIE J-P., BURLEN M-J., Nucleolar perichromatin granules induced by dichlorobenzimidazole riboside, *J. Ultrastruct. Res.*, **69**: 1-12, 1979.
- [67] PUVION E., BERNHARD W., Ribonucleoprotein components in liver cell nuclei as visualized by cryoultramicrotomy, *J. Cell Biol.*, **67**: 200-214, 1975.
- [68] PUVION E., MOYNE G., In situ localization of RNA structures, [w] *The Cell Nucleus*, vol. VIII., red. H. Busch, Academic Press Inc., New York 1981, 59-109.
- [69] PUVION E., VIRON A., XU F. X., High resolution autoradiographical detection of RNA in the interchromatin granules of DRB-treated cells, *Exptl. Cell Res.*, **152**: 357-368, 1984.
- [70] PUVION E., VIRON A., ASSENS C., LEDUC E. H., JEANTEUR Ph., Immunocytochemical identification of nuclear structures containing snRNPs in isolated rat liver cells. *J. Ultrastruct. Res.*, **87**: 180-189, 1984.
- [71] RAIKHLIN N. T., BUKHVALOV I. B., UNGER E., Ultrastructural localization of enzymes of the membranes and RNP-structures of the nuclei of normal and neoplastic cells, *Folia Histochem. Cytochem.*, **14**: 217-222, 1976.
- [72] RECHER L., PARRY N. T., BRIGGS L. G., WHITESCARVER J., Difference in effects of proflavine and actinomycin D on mammalian cell nucleoli, *Cancer Res.*, **31**: 1915-1922, 1971.
- [73] RECHER L., PARRY N. T., WHITESCARVER J., BRIGGS L., Lead-positive nuclear structures and their behavior under the effects of various drugs, *J. Ultrastruct. Res.*, **38**: 398-410, 1972.
- [74] RECHER L., SYKES J. A., CHAN H., Further studies on the mammalian cell nucleus, *J. Ultrastruct. Res.*, **56**: 152-163, 1976.
- [75] SAMARINA O. P., LUKANIDIN E. M., GEORGIEV G. P., On the structural

- organization of the nuclear complexes containing mRNA, *Biochim. Biophys. Acta*, **142**: 561-562, 1967.
- [76] SAMARINA O. P., LUKANIDIN E. M., MOLNAR J., GEORGIEV G. P., Structural organization of nuclear complexes containing DNA-like RNA, *J. Mol. Biol.*, **33**: 251-263, 1968.
- [77] SEKERIS C. E., NIESSING J., Evidence for the existence of a structural RNA component in the nuclear ribonucleoprotein particles containing heterogeneous RNA, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **62**: 643-650, 1975.
- [78] SHANKAR NARAYAN K., STEELE W. J., SMETANA K., BUSCH H., Ultrastructural aspects of the ribonucleoprotein network in nuclei of Walker tumour and rat livers, *Exptl. Cell Res.*, **46**: 65-77, 1967.
- [79] SHINOZUKA H., GOLDBLATT P. J., FARBER E., The disorganization of hepatic cell nucleoli induced by ethionine and its reversal by adenine, *J. Cell Biol.*, **36**: 313-328, 1968.
- [80] SHINOZUKA H., ESTES L., FARBER E., Studies on acute methionine toxicity, *Amer. J. Pathol.*, **64**: 241-250, 1971.
- [81] SIMARD R., Specific nuclear and nucleolar ultrastructural lesions induced by proflavin and similarly acting antimetabolites in tissue culture, *Cancer Res.*, **26**: 2316-2328, 1966.
- [82] SIMARD R., BERNHARD W., A heat-sensitive cellular function located in the nucleolus, *J. Cell Biol.*, **34**: 61-76, 1967.
- [83] SIMARD R., LANGELIER J., MARDEVILLE R., MAESTRACCI N., ROYAL A., Inhibitors as tools in elucidating the structure and function of the nucleus, [w] *The Cell Nucleus*, vol. III, red. H. Busch, Academic Press Inc., New York 1974, 447-487.
- [84] SINGER I. I., Ultrastructural studies of H-1 parvovirus replication. II. Induced changes in the deoxyribonucleoprotein and ribonucleoprotein components of human NB cell nuclei, *Exptl. Cell Res.*, **95**: 205-217, 1975.
- [85] SMETANA K., LEJNAR J., VLASTIBOROVA A., BUSCH H., On interchromatin dense granules of mature human neutrophil granulocytes, *Exptl. Cell Res.*, **64**: 105-112, 1971.
- [86] SMETANA K., STEELE W. J., BUSCH H., A nuclear ribonucleoprotein network, *Exptl. Cell Res.*, **31**: 198-201, 1963.
- [87] SPECTOR D. L., SCHRIER W. H., BUSCH H., Immunoelectron microscopic localization of snRNPs, *Biol. Cell.*, **49**: 1-10, 1983.
- [88] STEELE W. J., BUSCH H., Studies on the acidic nuclear proteins of the Walker tumour and the liver, *Cancer Res.*, **23**: 1153-1163, 1963.
- [89] STEELE W. J., BUSCH H., Studies on the ribonucleic acid component of the nuclear ribonucleoprotein network, *Biochim. Biophys. Acta*, **129**: 54-67, 1966.
- [90] STOCKERT J. C., SCHUCHNER E. B., Distribution of the antimonate precipitate in normal and segregated nucleoli after potassium pyroantimonate fixation, *Exptl. Cell Res.*, **70**: 250-253, 1972.
- [91] STRUB K., GALLI G., BUSSLINGER M., BIRNSTIEL M. L., The cDNA sequence of the sea urchin U7 small nuclear RNA suggests specific contracts between histone mRNA precursor and U7 RNA during RNA processing, *EMBO J.*, **3**: 2801-2807.
- [92] STUNNENBERG H. G., LOUIS Ch., SEKERIS C. E., Depletion in nuclei of proteins associated with hnRNA as a result of inhibition of RNA synthesis, *Exptl. Cell Res.*, **112**: 335-344, 1978.

- [93] SVOBODA D., HIGGINSON J., A comparison of ultrastructural changes in rat liver due to chemical carcinogenes, *Cancer Res.*, **28**: 1703-1733, 1968.
- [94] SWIFT H., Brookhaven Symposia on Structure and Function of Genetic Element, **12**: 134-152, 1959.
- [95] — Cytochemical studies on nuclear fine structure, *Exptl. Cell Res., Suppl.*, **9**: 54-67, 1963.
- [96] TAKANO M., AGRIS P. F., SHARP G. C., Purification and biochemical characterization of nuclear ribonucleoprotein antigen using purified antibody from serum of a patient with mixed connective tissue disease, *J. Clin. Invest.*, **65**: 1449-1456, 1980.
- [97] TAKEUCHI I. K., TAKEUCHI Y. K., Interchromatin granules in the dividing embryonic ectoderm cells of postimplantation rat embryos: an electron microscopic silver-taining study, *J. Electron Microsc.*, **33**: 151-159, 1984.
- [98] TANDLER C. J., KIERSZENBAUM A. L., Inorganic cations in rat kidney. Localization with potassium pyroantimonate-perfusion fixation, *J. Cell Biol.*, **50**: 830-839, 1971.
- [99] TRES L. L., KIERSZENBAUM A. L., TANDLER C. J., Inorganic cations in the cell nucleus selective accumulation during meiotic prophase in mouse testis, *J. Cell Biol.*, **53**: 483-493, 1972.
- [100] TRUMP B. F., GOLDBLATT P. J., STOWELL R. E., Studies of mouse liver necrosis in vitro. Ultrastructural and cytochemical alterations in hepatic parenchymal cell nuclei, *Lab. Invest.*, **14**: 1969-1999, 1965.
- [101] VORBRODT A., Ultrastructural nuclear and nucleolar lesions induced by 1-nitro-9 aminoacridine in rat liver cells, *Folia Histochem. Cytochem.*, **8**: 255-260, 1970.
- [102] VORBRODT A., BERNHARD W., Essais de localization au microscope électronique de l'activité phosphatasique nucléaire dans des coupes a congelation ultrafines, *J. Microsc.*, **7**: 195-201, 1968.
- [103] WASSEF M., Etude cytochimique des grains interchromatiniens dans le noyau d'hepatocyte de rat, *Biol. Cell.*, **34**: 152, 1979.
- [104] WASSEF M., A cytochemical study of interchromatin granules, *J. Ultrastruct. Res.*, **69**: 121-134, 1979.
- [105] WATSON M. L., ALDRIDGE W. G., Selective electron staining of nucleic acids, *J. Histochem. Cytochem.*, **12**: 96-103, 1964.
- [106] ZBARSKY I. B., DEBOV S. S., Proteins of the cell nuclei, *Doklady Akad. Nauk SSSR*, **63**: 795-798, 1948.
- [107] ZBARSKY I. B., GEORGIEV G. P., Cytological characteristics of protein and nucleoprotein fractions of cell nuclei, *Biochim. Biophys. Acta*, **32**: 301-302, 1959.

Otrzymano: 25 marca 1987 r.

Przyjęto: 25 kwietnia 1987 r.

Adres autorki: Wybrzeże Armii Czerwonej 15, 44-100 Gliwice.

WYBRANE KIERUNKI EMBRIOLOGII STOSOWANEJ.
1. KRIOBIOLOGIA JAJ I ZARODKÓW.
2. UZYSKIWANIE MONOGENETYCZNEGO POTOMSTWA

SOME PROBLEMS OF APPLIED EMBRIOLOGY. 1. CRYOBIOLOGY OF EGGS
AND EMBRYOS. 2. THE OBTAINING OF MONOGENETIC OFFSPRINGS

Zdzisław SMORAĞ

Zakład Fizjologii Rozrodu i Sztucznego Unasieniania Zwierząt
Instytutu Zootechniki w Krakowie-Balicach

Streszczenie. Obserwowany w ostatnich kilkunastu latach postęp w zakresie zamrażania zarodków bydłych doprowadził do uproszczenia oraz znacznej efektywności (około 40%) stosowanych metod. Wykazano też możliwość zamrażania zarodków przez witrifikację. Spośród metod uzyskiwania monogenetycznego potomstwa u bydła, praktyczne zastosowanie znajduje bisekcja morul i blastocyst, jako metoda prosta i umożliwiająca uzyskanie w odpowiednich warunkach około 50% ciężarnych bioreczyń.

Summary. The progress in methods of cattle embryo freezing that has been observed for the last several years led to simplification and considerable effectiveness (approx. 40%) of these methods. Moreover the possibility of embryo freezing by vitrification has been demonstrated lately. Among other methods of obtaining monogenetic offsprings the bisection of morulae and blastocysts has found its practical application as a simple and effective method which allows to obtain under optimal conditions approx. 50% of pregnant recipients.

WSTĘP

Przenoszenie zarodków u bydła jest metodą umożliwiającą zwiększenie wydajności rozrodczej samicy. Przy naturalnym rozrodzie uzyskuje się od jednej krowy w ciągu jej życia od 4 do 5 cieląt. Stosując metodę przenoszenia zarodków, liczbę tę można zwiększyć kilkakrotnie, a znane są przypadki krów, od których uzyskano po kilkadziesiąt cieląt. Jeśli więc metoda jest zastosowana w rozrodzie krów najbardziej wartościowo-

wych pod względem hodowlanym, to przyspiesza postęp hodowlany, zwiększając istotnie skuteczność dotychczas stosowanych metod hodowlanych. W aspekcie weterynaryjnym natomiast metoda może być wykorzystana do uzyskiwania zdrowego potomstwa od samic dotkniętych chorobami zakaźnymi. Osłonka przejrzysta zarodka jest bowiem nieprzepuszczalna dla drobnoustrojów. Dlatego też do czasu wylęgnięcia zarodek jest chroniony przed infekcją.

Z wielu powodów metoda przenoszenia zarodków znajduje największe zastosowanie u bydła, chociaż bywa stosowana do realizacji ograniczonych celów praktycznych w hodowli owiec, koni czy świń. Praktyczne stosowanie metody przenoszenia zarodków u bydła obserwuje się na świecie od połowy lat siedemdziesiątych. Od tego czasu notuje się jej systematyczny rozwój, obejmujący coraz to nowe kraje. Trzeba jednak zaznaczyć, że skala praktycznego stosowania metody jest nieporównywalna ze sztucznym unasienianiem u bydła. Przenoszenie zarodków jest z praktycznego punktu widzenia metodą dość skomplikowaną, mimo że w ciągu ostatniego dziesięciolecia zanotowano wiele istotnych uproszczeń.

Pierwszym ogniwem metody jest superowulacja samic-dawczyń, pozwalająca na uzyskanie zwiększonej liczby zarodków w jednym cyklu. Osiąga się ją na ogół przez podanie gonadotropin przysadkowych lub pozaprzysadkowych w połowie fazy lutealnej cyklu. Po dwóch dniach od podania gonadotropin samicom podaje się jeden z analogów prostaglandyn PGF_2 alfa, związku o działaniu luteolitycznym. Po kolejnych dwóch, trzech dniach dochodzi do rui i owulacji i wówczas zwierzęta są inseminowane.

Uzyskiwanie zarodków odbywa się na ogół po 7 dniach od owulacji i zapłodnienia, na drodze niechirurgicznej, poprzez przepłukanie rogów macicy za pomocą kateteru. Wprowadzony płyn jest po przepłukaniu rogów macicy zbierany do naczyń, a zarodki wyszukiwane za pomocą mikroskopu stereoskopowego. Stosując odpowiednie preparaty hormonalne i właściwie wyselekcjonowane krowy, można uzyskać od jednej dawczyni średnio od 5 do 7 nadających się do przenoszenia zarodków.

W warunkach laboratoryjnych 7-dniowe zarodki bydłce zachowują zdolności życiowe przez około 8 godz. W tym też czasie powinny być wprowadzone do dróg rodnych zsynchronizowanych biorczyń. Wprowadzanie zarodków odbywa się na ogół na drodze niechirurgicznej i polega na umieszczeniu zarodka za pomocą katetera w ipsilateralnym rogu macicy. Skuteczność przenoszenia zarodków świeżych wynosi od 50 do 60%.

Przedstawione tu zasadnicze ogniwa metody przenoszenia zarodków

mogą być wzbogacone przez zastosowanie metod uzupełniających. Dwie z nich znajdują już zastosowanie w praktyce niektórych stacji przenoszenia zarodków. Są nimi zamrażanie oraz dzielenie.

1. KRIOBIOLOGIA JAJ I ZARODKÓW

Celem niniejszej pracy jest przedstawienie aktualnego stanu badań oraz osiąganych wyników w zakresie zamrażania zarodków zwierząt gospodarskich, a zwłaszcza bydłych. Uwzględniono również badania przeprowadzone na zarodkach lub komórkach jajowych zwierząt laboratoryjnych, gdy dotyczyły one zagadnień nowych z punktu widzenia kriobiologii, mogących mieć znaczenie dla rozwoju metod zamrażania zarodków zwierząt gospodarskich.

Istnieje zgodność, że siedmio-, a także ósmiodniowe zarodki bydłce, stanowią z punktu widzenia zamrażania, optymalne stadium rozwoju. Należy tu jednak podkreślić, że osiągnięte stadium rozwoju zarodka powinno odpowiadać jego wiekowi, czyli powinny to być zarodki w stadium późnej moruli do ekspandującej blastocysty. Równie istotny jest dobry stan morfologiczny zamrażanych zarodków. Wiadomo jednak, że oprócz zarodków ocenianych jako morfologicznie normalne, przynajmniej kilkanaście procent uzyskanych zarodków wykazuje zaburzenia rozwojowe, takie jak niewbudowane blastomery, degeneracja części blastomerów itd. Cechą wspólną tych zarodków jest mniejsza, w stosunku do zarodków normalnych, ogólna liczba komórek. Prócz tego, jak to wykazały badania Theron i wsp. [50] w czasie zamrażania w blastocystie bydłcej dochodzi do uszkodzenia od 10 do 80% komórek (średnio 25%). Jest więc zrozumiałe, że wyniki po transplantacji takich zarodków są zdecydowanie gorsze w porównaniu z wynikami uzyskiwanymi po transplantacji mrożonych zarodków ocenianych jako morfologicznie normalne [18, 36, 37]. Dochodzi do zbyt dużej redukcji komórek zarodka, najpierw w wyniku zaburzeń w rozwoju, a następnie w trakcie ich zamrażania i rozmrażania. Takie wyjaśnienie potwierdzają wyniki badań nad zamrażaniem zarodków o eksperymentalnie zmniejszonej liczbie komórek w wyniku cięcia zarodka na 2 lub 4 części [5, 6]. Obserwowany tutaj spadek przeżywania jest podobnie jak w przypadku zarodków z deformacjami morfologicznymi, nieproporcjonalnie większy niż po przeniesieniu „połówek” lub „ćwiartek” zarodków świeżych.

Pierwszym etapem postępowania zmierzającego do zamrożenia zarodka jest jego umieszczenie w płynie zawierającym odpowiednią koncentrację związku osłaniającego. Dopuszczalne jest bezpośrednie umiesz-

czenie zarodka w płynie zawierającym związek osłaniający w ilości wymaganej do skutecznego zamrożenia [6, 20]. Czas ekwilibracji w temperaturze pokojowej wynosi dla glicerolu 10-30 min.

Przez wiele lat najczęściej stosowanym do zamrożenia zarodków ssaków związkiem osłaniającym był dwumetylosulfotlenek (DMSO). Ostatnio natomiast obserwuje się coraz powszechniejsze użycie glicerolu. Glicerol okazał się lepszym związkiem osłaniającym przy zamrożeniu 8-blastomerowych zarodków mysich [42], a mikroskopowe obserwacje Ralla i Polga [32] potwierdziły jego dobre właściwości osłaniające. Do zamrażania zarodków bydłych używa się glicerolu w stężeniu od 1 do 2 M, najczęściej 1,4 lub 1,5 M.

Ze względu na potwierdzoną wielokrotnie niewrażliwość morul i blastocyst bydłych na zmiany termiczne w zakresie od temperatury pokojowej do kilku stopni poniżej 0°C , praktykuje się obecnie bezpośrednie przekładanie poddanych ekwilibracji zarodków z temperatury pokojowej do temperatury posiewania, czyli około -6°C [cyt. za 20]. Ten szczególnie metodyczny, podobnie jak jednostopniowe dodawanie związku osłaniającego, wnoszą znaczne uproszczenia do procedury zamrażania. Jeszcze większe uproszczenie tego procesu wynikało z możliwości znacznego skrócenia programu zamrażania od około -70°C do około -30 do -40°C . Obecnie niemal powszechnie praktykuje się zamrażanie zarodków bydłych według tego uproszczonego programu, najczęściej do temp. -30 lub -35°C . Wydaje się, że końcowa temperatura zamrażania, wynosząca -35°C , jest temperaturą optymalną [2]. Najczęściej stosowaną szybkością zamrażania jest szybkość utrzymująca się w granicach około $0,3^{\circ}\text{C}/\text{min}$. Zwiększenie tej szybkości do $1,0^{\circ}\text{C}/\text{min}$ pozwala jeszcze na uzyskiwanie dość wysokich wyników zamrażania [19].

Jak już wspomniano, warunkiem uzyskania wysokiej przeżywalności zarodków zamrażanych według opisanej procedury jest ich szybkie rozmrażanie. Osiąga się to na ogół przez umieszczenie ampułki lub słomki z zamrożonymi zarodkami w łaźni wodnej o temperaturze $+37^{\circ}\text{C}$. Po rozmrożeniu niezbędnym zabiegiem jest usunięcie substancji osłaniającej z komórek zamrażanego zarodka. Dla uniknięcia szoku osmotycznego, czynność ta była wykonywana stopniowo. Praktycznie oznaczało to przenoszenie zarodka poprzez kilka roztworów o zmniejszającej się koncentracji związku osłaniającego. Ten rygorystyczny wymóg stanowił znaczne utrudnienie w praktycznym stosowaniu mrożonych zarodków, wymagającym zarówno czasu i sprzętu, jak i umiejętności manipulowania zarodkami. Zmianą metodyczną o istotnych konsekwencjach praktycznych jest wprowadzenie do rozmrażania zarodków roztworu sacharozy. Sacharoza jest związkiem, który nie przenika do wnętrza komórki i może utrzymywać wysokie ciśnienie osmotyczne na zewnątrz komórki,

podczas usuwania związku osłaniającego. Związek ten został po raz pierwszy użyty do jednostopniowego usuwania glicerolu z rozmrażanych czerwonych ciałek krwi przez Rowe i wsp. [cyt. za 20]. Następnie Leibo i Mazur [cyt. za 20] oraz Kasai i wsp. [17] użyli sacharozy do rozmrażania zarodków mysich. Podobną procedurę usuwania związku osłaniającego z rozmrożonych 7-dniowych zarodków bydłych zastosowali Renard i wsp. [34] oraz Leibo [21]. Wymienieni autorzy zamrażali zarodki w słomkach, zawierających oprócz niewielkiej ilości płynu z zarodkiem, kilkakrotnie większą objętość roztworu sacharozy, oddzielonej od płynu z zarodkiem niewielką bańką powietrza. Bezpośrednio po rozmrożeniu, przez wstrząśnięcie słomką, następuje zmieszanie tych dwóch płynów, a zarodek dostaje się do środowiska zawierającego sacharozę, co pozwala na usunięcie związku osłaniającego z komórek zarodka. Odbywa się to bez otwierania słomki i pozwala na bezpośrednią transplantację zarodka. Możliwe jest również stosowanie tego sposobu usuwania związku osłaniającego w przypadku zarodków zamrażanych w ampulkach. Wówczas zarodek po wyjęciu z próbki należy umieścić w kropli roztworu zawierającego od 0,5 do 1,0 M sacharozy [20]. Optymalna koncentracja sacharozy w roztworze do jednostopniowego usuwania glicerolu może być w pewnym stopniu uzależniona od jego stężenia w płynie do zamrażania [21, 27].

Czynnikiem rozstrzygającym o wprowadzeniu zamrażania zarodków do praktyki, zwłaszcza praktyki przenoszenia zarodków bydłych, jest uzyskiwana efektywność zamrażania. Stosując wolne zamrażanie i rozmrażanie oraz DMSO jako związek osłaniający, uzyskiwano po przeniesieniu rozwój około $\frac{1}{3}$ zamrożonych zarodków. Zastąpienie DMSO glicerolem i wprowadzenie skróconego programu zamrażania oraz szybkiego rozmrażania, pozwoliło na podwyższenie efektywności zamrażania. Ocenia się, że zamrażając i transplantując wyselekcjonowane zarodki, można uzyskać wynik tylko o 10% niższy od tego, jaki uzyskuje się przenosząc zarodki świeże [cyt. za 20]. Wyniki, jakie uzyskano po przenoszeniu zarodków mrożonych w słomkach i jednostopniowym usuwaniu glicerolu przy użyciu sacharozy, również układają się na podobnym [16, 24] lub tylko nieco niższym poziomie [9, 21]. Informacje, jakie napływają z praktyki wskazują, że uzyskiwane tam wyniki są niestabilne i na ogół niższe od przedstawionych tu.

Dla ograniczenia strat spowodowanych zredukowaną liczbą komórek zarodka (takimi są zarodki mrożone), dokonywano prób wzmocnienia sygnału embrionalnego poprzez równoczesne przenoszenie pęcherzy trofoblastycznych (świeżych lub mrożonych), uzyskanych w wyniku cięcia 12-13-dniowych zarodków bydłych. Takie postępowanie doprowadziło

w niektórych przypadkach do poprawy efektywności transplantacji mrożonych zarodków w granicach 20% [15].

W związku z dużym zainteresowaniem, jakie budzi przenoszenie „połówek” zarodków uzyskanych przez dzielenie morul czy blastocyst bydlęcych, pojawiła się potrzeba konserwacji takich zarodków. Wyniki, jakie dotychczas uzyskano, stosując konwencjonalne metody zamrażania, świadczą, że jest wprawdzie możliwe uzyskanie znacznego stopnia przeżywania mrożonych połówek, jednak w większości dotychczasowych prac uzyskane wyniki były stosunkowo niskie [12, 20]. Z doświadczeń na zarodkach mysich wynika, że połówki morul czy blastocyst zamrażane bez osłonek przejrzystych są o wiele mniej podatne na zamrażanie w porównaniu z zarodkami całymi w zona pellucida [38]. Poprawę ogólnej efektywności mrożonych połówek uzyskuje się zwiększając ogólną liczbę komórek zarodkowych, tzn. transplantując — zamiast jednej — dwie połówki [24]. Można by również założyć, że droga do poprawy efektywności transplantacji mrożonych połówek prowadziłaby poprzez równoczesną transplantację pęcherzy trofoblastycznych, o czym już wcześniej wspomniano. Niemniej jednak zasadniczego rozwiązania należy oczekiwać w poszukiwaniu bardziej efektywnych metod zamrażania, minimalizujących straty komórkowe konserwowanych zarodków, a także w umieszczaniu zamrożonych połówek w dwóch osłonkach przejrzystych [29].

Rzeczony rozwój badań nad dojrzewaniem oocytów oraz zapłodnieniem *in vitro* wzbudził zainteresowanie opanowaniem metod zamrażania oocytów bydlęcych. Z dotychczasowych badań wynika, że zamrażalność niedojrzałych oocytów jest bardzo niska, podczas gdy oocyty dojrzałe są bardziej podatne na zamrażanie [13, 46]. Z przedstawionego przeglądu wynika, że w znacznym stopniu opanowano już metody zamrażania zarodków bydlęcych. Można jednak zakładać, że postępy, jakie obserwuje się ostatnio w ogólnej kriobiologii, doprowadzą do istotnych zmian metod zamrażania zarodków, a zwłaszcza dalszego ich uproszczenia.

Poświęćmy nieco uwagi tym badaniom z zakresu kriobiologii, które zapoczątkowały już dość istotne zmiany w podejściu do praktycznych problemów zamrażania wielu obiektów biologicznych, w tym również oocytów i zarodków ssaków. Do najważniejszych należą badania nad dehydratacją komórek oraz wynikającymi z tego konsekwencjami, obserwowanymi na poziomie organelli komórkowych, a zwłaszcza błony komórkowej.

Komórki zwierzęce — jak wiadomo — mają zdolność znacznej utraty wody zarówno w warunkach izotermicznych, np. pod wpływem roztworów hipertonicznych, jak i w trakcie zamrażania, w obecności krysz-

tałów lodu. Zdolność największej utraty wody, bez negatywnego wpływu na funkcje fizjologiczne, mają zwierzęta anhydrobiotyczne. Komórki ssaków natomiast mają zróżnicowane możliwości osmotycznego usuwania wody. Sądzi się, że utrata zdolności życiowych komórek na skutek odwodnienia może być konsekwencją nadmiernego wzrostu koncentracji elektrolitów wewnątrzkomórkowych [22], osiągnięcia minimalnej objętości [23] lub przekroczenia granicy tolerancji błony plazmatycznej na deformacje podczas obkurczania [53]. Te letalne dla odwodnionych komórek procesy, obserwowane na poziomie błony plazmatycznej, objawiają się przechodzeniem fosfolipidów błony z fazy blaszkowatej w przejściową [8]. Niektóre węglowodany mogą jednak stabilizować błonę przy niskiej zawartości wody [8], nie dopuszczając do powstania fazy przejściowej. Chen i wsp. [cyt. za 8] wykazali, że najbardziej efektywne pod tym względem są dwu- i trójcukry, chociaż podobne właściwości wykazuje także trehaloza. Właśnie użycie trehalozy, a zwłaszcza sacharozy, jako nie penetrujących związków do uzyskania dehydratacji komórek w warunkach izotermicznych, jak również do osiągnięcia większej stabilizacji błony zamrażanych komórek, umożliwiło opracowanie prostych i szybkich metod zamrażania. Badania Renarda i wsp. [34], Bui-Xuan-Nguyen i wsp. [4], Heymana i wsp. [11] oraz Renarda i wsp. [35] wykazały, że przeżywalność zarodków króliczych i bydłęcych nie jest obniżona po przetrzymywaniu przez 30 min w stanie obkurczonym w roztworze 1-molarnej sacharozy.

Inne obserwacje wykazały, że zarodki królicze przeżywają 30-minutową ekspozycję nawet w 2-molarnym roztworze sacharozy, czy też w nasyconym roztworze trehalozy [43]. Umieszczone w hipertonicznym roztworze zarodki reagują szybką zmianą objętości (do około 40% objętości wyjściowej). W wielu przypadkach dochodzi także do zmian odwracalnych błony cytoplazmatycznej, w postaci pęcherzy na powierzchni blastomerów, które znikają po ponownym umieszczeniu w roztworze fizjologicznym. Użycie sacharozy pozwoliło ostatnio opracować bardzo prostą i efektywną metodę zamrażania zarodków króliczych [35, 45]. Metoda ta polega na przekładaniu odwodnionych w temperaturze pokojowej zarodków wprost z temperatury pokojowej do temp. -25 [45] lub -30°C [35]. Po przetrzymywaniu w tych temperaturach przez około 150 min, zarodki są przekładane do ciekłego azotu. Metoda ta jest więc prosta i może być stosowana niemal w każdych warunkach. Efektywność metody w przypadku 2-blastomerowych zarodków króliczych jest porównywalna z efektywnością metod konwencjonalnych. Próba zastosowania jej do zamrażania zarodków bydłęcych, zarówno blastocyst [5], jak i zarodków 1- lub 2-blastomerowych, czy też oocytów [13, 46], nie zapewnia w chwili obecnej tak dobrego ich przeżywania.

Jak to już tu przedstawiono, możliwości odwadniania zarodków w temperaturze pokojowej są nadspodziewanie duże, a uzyskiwane zmniejszenie objętości zarodka jest porównywalne z tym, jakie osiągają zarodki po zamrożeniu do temperatury ciekłego azotu. Już w wielu pracach wykazano, że istnieje możliwość zamrażania silnie odwodnionych zarodków mysich przez przełożenie ich wprost z temperatury pokojowej do ciekłego azotu lub par azotu (zamrażanie przez witrifikację) [7, 25, 33, 37]. Do zamrażania zarodków mysich poprzez witrifikację bardzo efektywną okazała się mieszanina penetrujących i niepenetrujących związków osłaniających, a mianowicie DMSO, acetamidu, glikolu propylenowego oraz glikolu polyetylenowego [33]. W dotychczasowych doświadczeniach nad zamrażaniem zarodków bydłęcych przez witrifikację uzyskano również znaczny stopień ich przeżywania zarówno *in vitro*, jak też *in vivo* [7, 25]. Można więc zakładać, że w niedługim czasie witrifikacja stanie się metodą zamrażania zarodków bydłęcych.

2. UZYSKIWANIE MONOGENETYCZNEGO POTOMSTWA

Rozwój izolowanych blastomerów ssaków został stwierdzony po raz pierwszy u 2-komórkowych zarodków szczura w 1942 r. przez Nicholasa i Halla [28]. Następnie badania Seidela z lat pięćdziesiątych wykazały zdolność rozwoju pojedynczych blastomerów królika [cyt. za 49]. Pod koniec lat pięćdziesiątych badania nad rozwojem pojedynczych blastomerów 2-, 4-, i 8-komórkowego zarodka myszy zostały przeprowadzone przez Tarkowskiego [47, 48] oraz Tarkowskiego i Wróblewską [49]. Z badań tych wynikało, że istnieje możliwość pełnego rozwoju pojedynczych blastomerów, chociaż prawdopodobieństwo normalnego rozwoju zmniejszało się wraz z wiekiem zarodka. W pracach opublikowanych w ostatnich latach potwierdzone zostały wyniki wcześniejszych badań Tarkowskiego, dotyczących zdolności do pełnego rozwoju zarodków mysich 2-, 4- czy 8-blastomerowych, a ponadto stwierdzono również rozwój izolowanych blastomerów uzyskanych z zamrożonych zarodków [41].

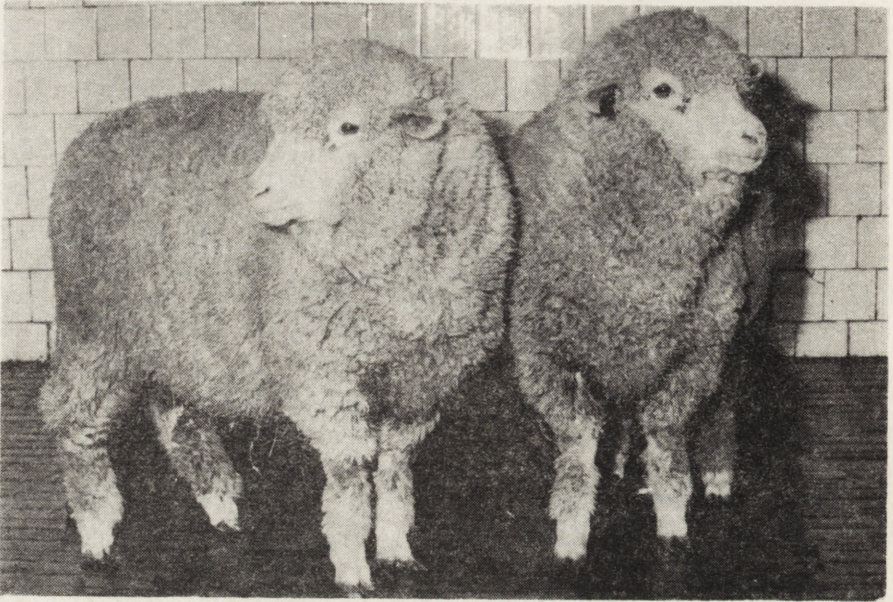
Podobnie możliwości takie zostały stwierdzone pod koniec lat siedemdziesiątych u zwierząt gospodarskich. Badania Willadsena [54] doprowadziły do opracowania metody uzyskiwania monozygotycznych bliźniąt u owiec. Blastomery zarodków owczych w stadium od 2 do 8 komórek izolowano mechanicznie, a następnie umieszczano w zastępczych osłonkach przezrzystych, po czym zatapiano w cylindrach agarowych. Cylindry z blastomerami umieszczano w podwiązanych jajowodach owcy i hodowano aż do osiągnięcia przez zarodek stadium moruli lub

blastocysty. Wówczas cylindry wypłukiwano z jajowodów, a zarodki uwalniano z agaru. Uzyskane zarodki przenoszono ostatecznie do zsynchronizowanych właściwych bioreczeni. Chociaż efektywność metody była wysoka, to jednak konieczność dwukrotnego przenoszenia powoduje, że z praktycznego punktu widzenia jest to metoda zbyt skomplikowana. Z tych powodów bardziej interesujące jest dzielenie wykonywane na zarodkach w późniejszych stadiach rozwojowych, tzn. stadium moruli i blastocysty. Pierwsze udane próby dzielenia zarodków znajdujących się w tych stadiach rozwoju, przeprowadzone przez Meinecke-Tillmann [26], doprowadziły do uzyskania identycznych bliźniąt u owiec.

W latach osiemdziesiątych wykonano wiele prac nad dzieleniem zarodków zwierząt gospodarskich, głównie bydłych [1, 30, 31, 52, 55, 56], ale także owczych [10, 44], kozich [51] i końskich [40]. Bisekcja zarodków weszła już do praktyki stacji przenoszenia zarodków w wielu krajach. W większości publikowanych prac uzyskane w wyniku podziału monozygotyczne połówki przenoszono po ponownym umieszczeniu w zastępczych osłonkach przejrzystych. Pierwszy etap metody obejmuje usuwanie osłonki przejrzystej. Pozbawiony osłonki przejrzystej zarodek jest dzielony przy użyciu mikroskalpela lub szklanej igły osadzonej na ramieniu mikromanipulatora. Uzyskane połówki umieszcza się następnie w zastępczych osłonkach przejrzystych, a przenoszenie następuje bezpośrednio po bisekcji lub po krótkotrwałym okresie hodowli *in vitro*. Opisana procedura pozwalała na uzyskiwanie u bydła efektywności przenoszenia pojedynczych połówek zarodków, wahającej się od 20 do około 50% [1, 31].

W przypadku przenoszenia „nagich” połówek cięcie odbywa się przez osłonkę przejrzystą. Wystarczające jest do tego celu tylko jedno ramie mikromanipulatora [39], a więc w porównaniu z metodą bisekcji, zakładającą wkładanie uzyskanych połówek do zastępczych osłonek przejrzystych, jest sposobem o wiele prostszym. Wyniki przenoszenia połówek zarodków bez osłonek przejrzystych są zachęcające. Z badań Voelkela i wsp. [52] na zarodkach bydłych wynika, że uzyskana efektywność przenoszenia połówek umieszczonych w zastępczych osłonkach przejrzystych układa się na tym samym poziomie, jak po przeniesieniu połówek „nagich”. W badaniach przeprowadzonych w naszym Zakładzie, przenosząc nagie połówki owcze, uzyskiwaliśmy około 30% ciężarnych lub wykończonych bioreczeni [44 oraz dane niepublikowane] (ryc.).

Wydaje się, że spośród wielu możliwych czynników wpływających na uzyskane efekty, niezależnie od metody bisekcji, największą rolę odgrywa bardzo dobra jakość zarodków poddawanych dzieleniu. W badaniach Brema i wsp. [3] uzyskano bowiem ponad 50% ciąży po prze-



Ryc. Monogenetyczne bliźnięta owcze urodzone po przeniesieniu podzielonej blastocysty

noszeniu połówek otrzymanych w wyniku bisekcji zarodków ocenionych jako bardzo dobre, około 30% po połówkach otrzymanych w wyniku bisekcji zarodków ocenionych jako dobre i tylko 6% po połówkach uzyskanych z zarodków o niedostatecznej jakości. Z innych czynników nie związanych bezpośrednio z jakością przenoszonych połówek, a mogących mieć wpływ na osiąganą efektywność przenoszenia, należy wymienić liczbę połówek przenoszonych do jednej biorczyń. Z dotychczasowych badań wynika, że po przeniesieniu dwóch połówek odsetek ciężarnych biorczyń może być nawet dwukrotnie wyższy w porównaniu z wynikami przenoszenia pojedynczych połówek [1, 31], co można tłumaczyć osłabieniem wczesnego sygnału ciążowego, jako wyniku redukcji komórek trofoblastu. Dlatego też rozważa się wzmocnienie wczesnego sygnału ciążowego przez wprowadzenie do rogu macicy pęcherza trofoblastycznego. Badania Heymana [15] wykazały, że w przypadku mrożonych połówek bydłych zabieg taki wpływa korzystnie na odsetek uzyskanych ciąż.

Reasumując, można stwierdzić, że bisekcja morul i blastocyst jest istotnym elementem poszerzającym biologiczne podstawy przenoszenia zarodków i prawdopodobnie będzie stałą składową w praktycznym stosowaniu przenoszenia zarodków.

LITERATURA

- [1] BAKER R. D., EBERHARD B. K., LEFFEL R. F., ROHDE R. F., HENSCHEN T. J., Pregnancy rate following surgical transfer of bovine demi-embryos, 10th Int. Congress Anim. Reprod. Art. Insem., 2: 220, 1984.
- [2] BIELANSKI A., JOHNSON W., SCHNEIDER U., MAPLETOFT R. J., Plunge temperatures and embryo survival, *Theriogenology* 21: 221, 1984 (abstr.).
- [3] BREM G., KRUFF B., SZILVASSY B., TENHUMBERG H., Identical Simmental twins through microsurgery of embryos, *Theriogenology* 21: 225, 1984 (abstr.).
- [4] BUI-XUAN-NGUYEN N., RENARD J. P., GARNIER V., Rapid freezing and thawing of 2 cells stage rabbit embryos after partial dehydration at room temperature, *Cryobiology* 20: 742, 1983 (abstr.).
- [5] BUI-XUAN-NGUYEN N., HEYMAN Y., RENARD J. P., Direct freezing of cattle embryos after partial dehydration at room temperature, *Theriogenology* 22: 389-399, 1984.
- [6] CHUPIN O., PROCURER R., Glycerol equilibration for deep freezing of cattle blastocysts; Effect of number of steps and of total duration, *Theriogenology* 21: 230, 1984 (abstr.).
- [7] CHUPIN D., Quick freezing of rat and cow embryos after dehydration at room temperature. W: Workshop on embryos and oocytes freezing, eds. Y. Menézo and Ch. Merieux, 165-175, Collection Fondation Marcel Merieux, 1986.
- [8] CROWE J. H., CROWE L. M., MOURADIAN R., Stabilization of biological membranes at low water activities, *Cryobiology* 20: 346-356, 1983.
- [9] FALGE R., ROMMEL P., RHEBOCK F., ÖSTERRAICH D., Beitrag zur Tiefgefrierung von Rinderembryonen, *Mh. Vet. Med.*, 38: 867-869, 1983.
- [10] GATICA R., BOLAND M. P., CROSBY T. F., GORDON I., Micromanipulation of sheep morulae to produce monozygotic twins, *Theriogenology* 21: 555-560, 1984.
- [11] HEYMAN Y., SMORAĞ Z., RENARD J. P., Effect of sucrose and rapid freezing on survival of one and two-cell bovine embryos, 10th International Meeting of the Society for Low Temperature Biology, Lyon p.r 2, 1984 (abstr.).
- [12] HEYMAN Y., CHESNE P., Freezing bovine embryos: Survival after cervical transfer of one half, one or two blastocysts frozen in straws, *Theriogenology* 21: 240, 1984 (Abstr.).
- [13] HEYMAN Y., SMORAĞ Z., KAŹSKA L., VINCENT C., Influence of carbohydrates, cooling and rapid freezing on viability of bovine non-maturated oocytes or one-cell fertilized eggs. *Cryo-Letters* 7: 170:183, 1985.
- [14] HEYMAN Y., Factors affecting the survival of whole and half-embryos transferred in cattle, *Theriogenology*, 23: 63-75, 1985.
- [15] HEYMAN Y., INRA Jouy-en-Josas, dane niepublikowane.
- [16] HOOGENHAMP H., Transfer of frozen cow embryos without removing the glycerol, Proc. 10th Int. Cong. Anim. Prod. A. I. Urbana, Vol. II, 229-230, 1984.
- [17] KASAI M., NIWA K., IRITANI A., Survival of mouse embryos frozen and thawed rapidly, *J. Reprod. Fert.*, 59: 51-66, 1980.
- [18] KENNEDY L. G., BOLAND M. P., GORDON I., Effect of bovine embryo quality on survival after rapid freezing and thawing, *Theriogenology*, 19: 135, 1983 (abstr.).

- [19] LEHN-JENSEN H., RALL W. F., Cryomicroscopic observations of cattle embryos during freezing and thawing, *Theriogenology*, **19**: 263-277, 1983.
- [20] LEHN-JENSEN H., Deep freezing of cattle embryos, *Proc. 10th Inter. Cong. Anim. Reprod. A. I. Urbana IV, II*, 1-12, 1984.
- [21] LEIBO S. P., A one-step in situ dilution method for frozen thawed bovine embryos, *Cryo-Letters* **4**: 387-400, 1983.
- [22] LEVELOCK J. E., The mechanism of the protective action of glycerol against haemolysis by freezing and thawing *Biochim. Biophys. Acta* **11**: 28-36, 1953.
- [23] MANSELL J. L., CLEGG J. S., Cellular and molecular consequences of reduced cell water content, *Cryobiology* **20**: 591-612, 1983.
- [24] MASSIP A., van der ZWALMEN P., ECTORS F., Direct transfer of day 7-8 cow embryos frozen in glycerol-sucrose, 10th International Meeting of the Society for Low Temperature Biology, Lyon 6: 1984 (abstr.).
- [25] MASSIP A., van der ZWALMEN P., SCHEFFEN B., ECTORS F., Pregnancies following transfer of cattle embryos preserved by vitrification, *Cryo-Letters* **7**: 270-273, 1986.
- [26] MEINECKE-TILLMANN S., MEINECKE B., WASSMUTH R., Experimentelle Untersuchungen zur Erforschung der regulativen Kapazitäten von Schaf-embryonen in vivo und in vitro, *Zuchthygiene* **14**: 165-169, 1979.
- [27] MERRY D. A., ALLEN R. L., KROG K., WRIGHT R. W., Sucrose dilution of frozen mouse embryos: interaction of glycerol and sucrose concentrations, *Theriogenology* **20**: 325-332, 1983.
- [28] NICHOLAS J. S., HALL B. V., Experiments on developing rats. II. The development of isolated blastomeres and fused eggs, *J. exp. Zool.*, **90**: 441-459, 1942.
- [29] NIEMANN H., BREM G., SACHER B., SCHMIDT D., KRÄUSSLICH H., An approach to successful freezing of demi-embryos derived from day — 7 bovine embryos, *Theriogenology* **25**: 519-524, 1986.
- [30] OZIL J. P., HEYMAN Y., RENARD J. P., Production of monozygotic twins by micromanipulation and cervical transfer in the cow. *Vet. Rec.*, **110**: 126-127, 1982.
- [31] OZIL J. P., Production of identical twins by bisection of blastocysts in the cow, *J. Reprod. Fert.*, **69**: 463-468, 1983.
- [32] RALL W. F., POLGE G., Effect of warming rate on mouse embryos frozen and thawed in glycerol, *J. Reprod. Fert.*, **70**: 285-292, 1984.
- [33] RALL W. F., FAHY G. M., Ice-free cryopreservation of mouse embryos at -196°C by vitrification, *Nature* **313**: 573-575, 1985.
- [34] RENARD J. P., HEYMAN Y., OZIL J. P., Congélation de l'embryon bovin: une nouvelle méthode de décongélation pour le transfert cervical d'embryons conditionnés une seule fois en paillettes, *Ann. Med. Vet.*, **126**: 23-32, 1982.
- [35] RENARD J. P., BUI-XUAN-NGUYEN N., GARNIER V., Two-step freezing of two cell stage rabbit embryos after partial dehydration at room temperature, *J. Reprod. Fert.*, **71**: 573-580, 1984.
- [36] SHEA B. F., JANZEN R. E., McALISTER R. J., McDERMOND D. P., Freezing of bovine embryos: effects of embryo quality, time from thawing to transfer and number frozen per vial, *Theriogenology* **20**: 205-212, 1983.
- [37] SHEFFEN B., van der ZWALMEN P., MASSIP A., A simple and efficient procedure for preservation of mouse embryos by vitrification, *Cryo-Letters* **7**: 260-269, 1986.

- [38] SKRZYSZOWSKA M., BABUŠIK P., Bisection of mouse blastocysts and freezing of obtained halves, *Acta Biologica Cracoviensis* (w druku).
- [39] SKRZYSZOWSKA M., SMORAĞ Z., Effect of splitting on cell losses and the quality of bisected embryos, *Theriogenology*, 1987 (w druku).
- [40] SLADE N. P., WILLIAMS T. J., SQUIRES E. L., SEIDEL G. E. Jr., Production of identical twin pregnancies by microsurgical bisection of equine embryos, 10th Int. Congress Anim. Reprod. Art. Insem., 2, 241, 1984.
- [41] SMORAĞ Z., WIERZBOWSKI S., Freezing as a method of blastomeres isolation, *Bulletin de L'Academie Polonaise des Sciences*, 6: 395-396, 1977.
- [42] SMORAĞ Z., WIERZBOWSKI S., KAŃSKA L., Some factors affecting the success of embryo freezing: storage before freezing, superovulation rate, PBS concentration, cooling and thawing rates, [w] *Frozen Storage of Laboratory Animals* G. H. Zeilmeker eds. 45-54, Gustav Fisher Verlag, Stuttgart—New York, 1981.
- [43] SMORAĞ Z., GARNIER V., RENARD J. P., Effect of extremal concentration of sucrose and propanediol on the viability of 2-cell rabbit embryos, 10th International Meeting of the Society for Low Temperature Biology, Lyon p.r., 3: 1984 (abstr.).
- [44] SMORAĞ Z., OZIL J. P., MODLIŃSKI A. J., WIERZCHOŚ E., BABUŠIK P., SKRZYSZOWSKA M., Uzyskiwanie monozygotycznego potomstwa u owiec, *Med. Wet.*, 10: 627, 1985.
- [45] SMORAĞ Z., GARNIER V., RENARD J. P., WIECZOREK B., Wpływ sacharozy na przeżywanie 2-blastomerowych zarodków króliczych zamrażanych szybko w 1,2-propanediolu, *Med. Wet.*, 8: 495-498, 1986.
- [46] SMORAĞ Z., KAŃSKA L., SKRZYSZOWSKA M., WIECZOREK B., Freezability of oocytes and embryos of laboratory and domestic animals. [w] *Workshop on embryos and oocytes freezing*, Y. Menézo and Ch. Merieux, eds. 57-77, Collection Fondation Marcel Merieux, 1986.
- [47] TARKOWSKI A. K., Experiments on the development of isolated blastomeres of mouse eggs, *Nature* 184: 1286-1287, 1959.
- [48] — Experimental studies on regulation in the development of isolated blastomeres of mouse eggs, *Acta theriol.*, 3: 191-267, 1959.
- [49] TARKOWSKI A. K., WRÓBLEWSKA J., Development of blastomeres of mouse eggs isolated at the 4- and 8-cell stage, *J. Embriol. Exp. Morph.*, 18: 155-180, 1967.
- [50] THERON M. C., RENARD J. P., CROZET N., Histological and ultrastructural study of cell damages on frozen-thawed cow blastocysts, 10th International Meeting of the Society for Low Temperature Biology, Lyon p.r. 1: 1984 (abstr.).
- [51] TSUNODA Y., WAKSON M., YASNI T., SUGIE T., Micromanipulation and freezing of goat embryos, 10th Int. Congress Anim. Reprod. Art. Insem., 2: 249, 1984.
- [52] VOELKEL S. A., HUMES P. E., GODKE R. A., Pregnancy rates resulting from non-surgical transfer of micromanipulated bovine embryos, 10th Int. Congress Anim. Reprod. Art. Insem., 2: 251, 1984.
- [53] WIEST S. C., STEPONKUS P. L., The osmometric behaviour of human erythrocytes, *Cryobiology* 16: 101-104, 1979.
- [54] WILLADSEN S. M., A method for culture of micromanipulated sheep embryos and its use to produce monozygotic twins, *Nature* 277: 298-300, 1979.

- [55] WILLADSEN S. M., POLGE G., Attempts to produce monozygotic quadruplets in cattle by blastomere separation, *Vet. Rec.*, **108**: 211-212, 1981.
- [56] WILLADSEN S. M., LEHN-JENSEN H., FEHILLY C. B., NEWCOMB R., The production of monozygotic twins of preselected parentage by micro-manipulation of non-surgically collected cow embryos, *Theriogenology* **15**: 23-27, 1981.
- [57] WRIGHT J. M., Commercial freezing of bovine embryos in straws, *Theriogenology* **23**: 17-29, 1985.

Nadeslano: 9 kwietnia 1987.

Przyjęto: 11 maja 1987.

Adres autora: 32-083 Balice k/Krakowa.

Warunki prenumeraty kwartalnika

POSTĘPY BIOLOGII KOMÓRKI

Prenumeratę na kraj przyjmują i informacji o cenach udzielają urzędy pocztowe i doręczyciele 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 instytucji 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 Rozpowszechniania 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

M. KURPISZ, Badania antygenów układu rozrodczego metodami immunologicznymi	255
K. HELEWSKI, J. KONECKI, G. KOWALCZYK, Rola komórek śródbłonka płucnego w nieoddechowej funkcji płuc	283
M. MALESZEWSKI, Czynniki kondensacji chromatyny w cyklu życiowym komórek eukariotycznych	307
A. ZBOREK, Ziarnistości interchromatynowe	327
Z. SMORAĞ, Wybrane kierunki embriologii stosowanej. 1. Kriobiologia jaj i zarodków. 2. Uzyskiwanie monogenetycznego potomstwa	347