

PL ISSN 0324-833X

**POLSKIE
TOWARZYSTWO
ANATOMICZNE**

TOM 15-NR 1
1988 (1-116)

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 Wrocławski

Nakład 527 + 93. Ark. wyd. 9,25 ark. druk. 7,25 + 0,25 ark. kredy + 0,25 wkł. roczna. Papier
druk. sat. kl. III, 80 g, 70 × 100. Oddano do składania 14 X 1987 r. Podpisano do druku w lu-
tym 1988 r. Druk ukończono w lutym 1988 r. Zam. nr 509/87. C-14. Cena 100 zł

Wrocławska Drukarnia Naukowa, Wrocław, ul. Lelewela 4

FOSFOLIPIDY INOZYTOŁOWE, ICH METABOLIZM I ZNACZENIE W PROCESIE PRZEKAZYWANIA INFORMACJI

METABOLISM AND ROLE OF PHOSPHOINOSITIDES IN SIGNAL TRANSDUCTION

Hanna WIKIEŁ, Joanna STROSZNAJDER

Zakład Neurochemii, Instytut—Centrum Medycyny Doświadczalnej
i Klinicznej PAN, Warszawa

- CTP — cytydynotryfosforan
GTP — guanozynotryfosforan
ATP — adenozynotryfosforan
CDP — cytydynodifosforan
ADP — adenozynodifosforan
CMP — cytydynomonofosforan
cGMP — cykliczny guanozynomonofosforan
cAMP — cykliczny adenozynomonofosforan
EGTA — kwas etylenoglikodiaminotetraoctowy
PGE₂ — prostaglandyna E₂
PGI₂ — prostaglandyna I₂
5-HT — 5-hydroksytryptamina
PA — kwas fosfatydowy
DG — digliceryd
AA — kwas arachidonowy
PIP — 4 fosforan fosfatydyloinozytolu
PIP₂ — 4,5 fosforan fosfatydyloinozytolu
LPI — lizofosfatydyloinozytol
Ins 1,4,5 P₃ lub IP₃ — 1,4,5 trifosforan inozytolu
Ins 1,3,4 P₃ — 1,3,4 trifosforan inozytolu

| | |
|------------------------|----------------------------|
| Ins 1,4 P ₂ | — 1,4 difosforan inozytoli |
| Ins 4 P | — 4-fosforan inozytoli |
| Ins 1 P | — 1-fosforan inozytoli |
| I | — inozytol |
| PP _i | — pirofosforan |
| P _i | — fosforan |

I. WSTĘP

Receptory zlokalizowane na powierzchni błony cytoplazmatycznej wychwytyją zewnętrzne informacje (hormony, czynniki wzrostu, neuroprzekazniki, kwanty świetlne i in.). Wiązanie agonistów do białkowych receptorów na powierzchni komórki jest procesem dobrze znanym, natomiast mechanizm przekazywania informacji od receptora błonowego do wnętrza komórki nie jest w pełni wyjaśniony. Jedną z klas receptorów związana jest z działaniem cyklicznego adenozymonofosforanu (cAMP), powstającego przy udziale cyklicznej adenylanowej. Sprzężenie cyklicznej adenylanowej z receptorem jest m. in. regulowane przez białka wiążące guanozynotrójfosforan GTP [78].

Istnieją dane doświadczalne [61, 85] sugerujące, że proces metylacji fosfatydyloetnaoloaminy do fosfatydylocholino odgrywa istotną rolę w procesie sprzężenia receptora z cykliczną adenylanową [85], równocześnie inne badania [84, 90] przeczą tej hipotezie. Odpowiedź drugiej klasy receptorów związana jest z mobilizacją wapnia wewnątrzkomórkowego. Tu istotną rolę w procesie przekazywania informacji do wnętrza komórki odgrywa grupa lipidów — fosfolipidy inozytoli [1, 2, 4, 11, 13, 36, 45, 56, 57, 82, 95]. Hydroliza fosfolipidów inozytoli prowadzi do powstania dwóch związków o charakterze przekazników drugiego rzędu: diacyloglicerolu (DG) i inozytolotrójfosforanu (IP₃) oraz zapoczątkowuje kaskadę reakcji powodujących zwiększenie stężenia jonów wapnia w komórce, aktywację kinazy białkowej C, uwalnianie kwasu arachidonowego oraz stymulację cyklicznej guanylowej.

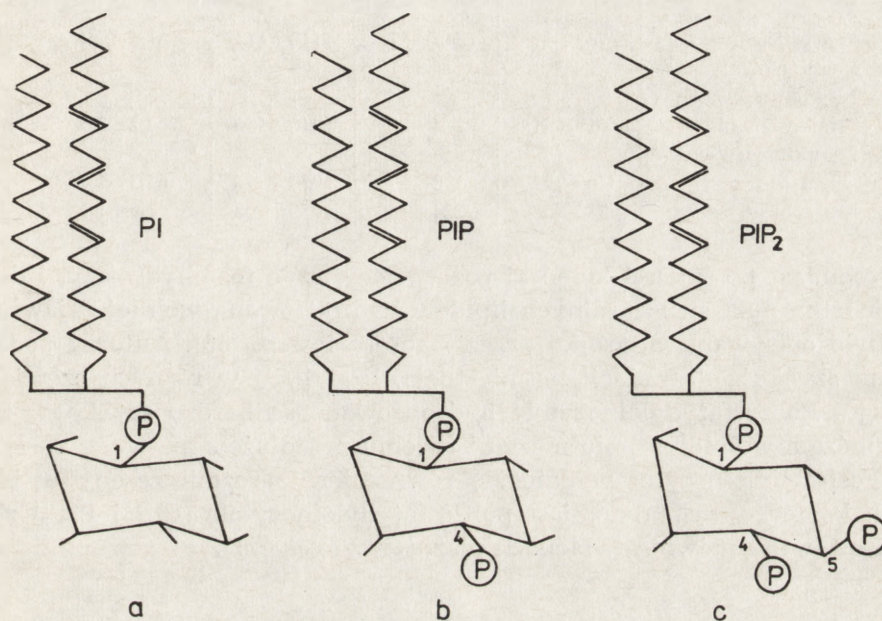
Duża liczba prac doświadczalnych dotyczy różnych aspektów metabolizmu fosfolipidów inozytoli i ich roli w procesie neurotransmisji. Ta praca jest próbą syntezy opisanych danych i hipotez na ten temat w latach 1980-1986.

II. WYSTĘPOWANIE FOSFOLIPIDÓW INOZYTOŁOWYCH

W 1930 r. Anderson i Roberts [5] wyizolowali po raz pierwszy lipidy inozytoli z pałeczki tuberkulinowej ptaków. W 1942 r. Folch i Wooley

[46] stwierdzili występowanie fosfatydyloinozytolu w mózgu i już wtedy zauważono istotne znaczenie fizjologiczne tego lipidu.

Fosfolipidy inozytolowe stanowią około 5% wszystkich fosfolipidów. Wśród nich fosfatydyloinozytol (PI) (ryc. 1a) stanowi około 90% fosfofosfatydyloinozytol (PIP) (ryc. 1b) około 2-3% i difosfofosfatydyloinozytol (PIP₂) (ryc. 1c) około 7-8%. Stosunkowo bogata w fosfolipidy inozy-



Ryc. 1. Struktura fosfolipidów inozytolowych: a — fosfatydyloinozytol PI, b — fosfofosfatydyloinozytol PIP, c — difosfofosfatydyloinozytol PIP₂

tolowe jest tkanka nerwowa, mniejsze ilości obserwuje się w innych tkankach i mikroorganizmach. Znaczne ilości fosfolipidów inozytolowych znajdują się w drożdżach, tj. około 40% wszystkich lipidów [60]. Dokładna analiza lipidów inozytolowych nie jest łatwa z powodu ich szybkiej hydrolizy zachodzącej bezpośrednio po śmierci komórki. Publikowane dane różnią się i w znacznej mierze zależą od metody przerywania procesów metabolicznych w mózgu [93] (tab. 1). W tkance nerwowej 80% zawartości fosfatydyloinozytolu stanowi 1-stearylo, 2-arachidonyloglicerofosfatydyloinozytol. Pozostałe 20% wypełniają pochodne innych kwasów tłuszczowych [60].

Badania Umy i Ramakrishana z 1983 r. [120] wykazały, że w mózgu szczura fosfolipidy inozytolowe, podobnie jak inne lipidy, występują w dwu formach. Jedna metabolicznie bardzo aktywna, hydrolizowana

TABELA

Odzysk fosfolipidów inozytowych z mózgu szczura w zależności od techniki przerywania procesów metabolicznych

| Technika | Fosfolipidy inozytowe (nmol/g tkanki) | | | Fosfor całkowity [μ mol/g tkanki] |
|---|--|--------------|----------------|---|
| | PIP ₂ | PIP | PI | |
| Metoda zamrażania w azocie (freeze-blown) | 763 \pm 39 | 315 \pm 51 | 1110 \pm 111 | 61,5 \pm 1,4 |
| Napromieniowanie mikrofalami | 619 \pm 21 | 264 \pm 22 | 1210 \pm 150 | 62,2 \pm 2,5 |
| Zamrażanie w ciek- łym azocie | 469 \pm 22 | 198 \pm 27 | 1050 \pm 96 | 61,3 \pm 1,7 |
| Mózg neutrowalony | 330 \pm 28 | 224 \pm 18 | 1050 \pm 108 | 61,9 \pm 1,1 |

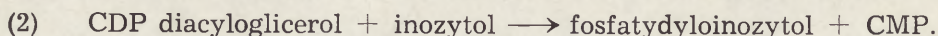
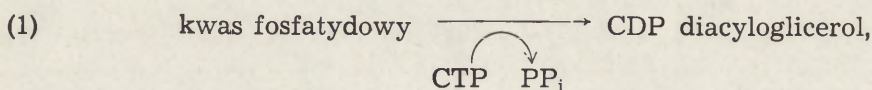
natychmiast po śmierci komórki przez specyficzne fosfohydrolazy, i druga inerta pula strukturalnych lipidów hydrolizowana wolniej. Zjawisko to było opisywane wcześniej przez Hausera i wsp. [55]. Autorzy podają różną szybkość degradacji pośmiertnej PIP i PIP₂ w różnych częściach mózgu. Polifosfatydyloinozytole hydrolizowane są bardzo szybko w korze mózgu, wolniej w pniu mózgu i rdzeniu przedłużonym.

Fosfatydyloinozytol wydaje się równomiernie rozmieszczony w błonach komórkowych, natomiast polifosfatydyloinozytole (PIP i PIP₂) zlokalizowane są głównie w błonach plazmatycznych [21].

III. METABOLIZM FOSFOLIPIDÓW INOZYTOŁOWYCH

BIOSYNTeza FOSFOLIPIDÓW INOZYTOŁOWYCH

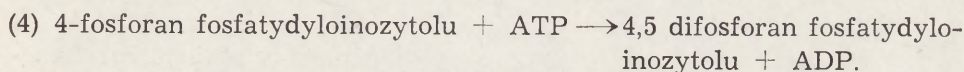
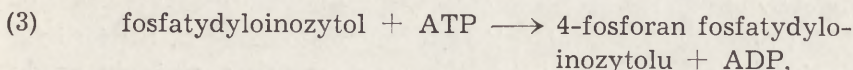
Biosynteza fosfatydyloinozytoli u ssaków ma miejsce przede wszystkim w retikulum endoplazmatycznym razem z syntezą innych fosfolipidów [127]. Została również stwierdzona w błonach aparatu Golgiego [56]. Prace Agranoffa [3] oraz Paulusa i Kenedy'ego [99] podają dwuetapowy szlak syntezy dla fosfatydyloinozytolu (reakcja (1) i (2)):



Enzym CDP diacyloglicerolo-3-fosfatydylotransferaza EC (2.7.8.11), który katalizuje reakcję 2, był wyizolowany i oczyszczony z mózgu szczura [104] i frakcji mikrosomalnej wątroby [114]. Jest on aktywowany

przez kationy magnezu lub manganu. Jak już zauważono wcześniej w mózgu i wątrobie, fosfatydyloinozytol zawiera w pozycji 1 glicerolu głównie kwas stearynowy, a w pozycji 2 — kwas arachidonowy. Kwas fosfatydowy, z którego powstaje PI, ma natomiast inny skład kwasów tłuszczowych. Baker i Thompson [8] zaobserwowali, że jest to możliwe dzięki procesom deacylacji i reacylacji towarzyszącym biosyntezie lipidów.

Synteza polifosfatydyloinozytoli lub inaczej fosforanów fosfatydyloinozytoli odbywa się przez kolejną fosforylację pierścienia inozytowego [58] (reakcje (3) i (4)):



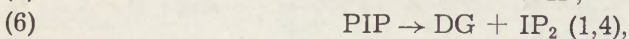
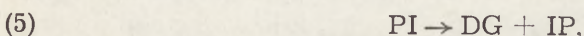
Kinazy katalizujące te reakcje EC (2.7.1.67), EC (2.7.1.68) są enzymami zarówno błonowymi, jak i występującymi w cytosolu. Ich własności katalityczne są zależne od jonów Mg^{+2} ; były opisane i badane w różnych tkankach, jak mózg, nerka, eryocyty i rdzeń nadnercza [29, 52].

Stwierdzono, że wzrastające stężenie difosfosfatydyloinozytoli PIP_2 może hamować kinazę PIP. Efekt hamowania PIP_2 zanika, gdy dochodzi do degradacji tego lipidu [39, 121]. Zjawisko to może mieć znaczenie w procesie regulacji zawartości PIP_2 w błonie [2]. Jolles i wsp. [69] wykazali, że aktywność kinazy PIP znajduje się także pod ścisłą kontrolą związaną z procesami fosforylacji białek.

Kinazy PI to także onkogenne kinazy białkowe, które mogą działać również pośrednio, jako kinazy tyrozyny. Enzymy syntetyzujące fosfatydyloinozytol wykazują największą aktywność we frakcji mikrosomalnej, chociaż lipidy te są składnikami wszystkich błon. Rozprzestrzenianie się fosfatydyloinozytoli do innych błon komórki odbywa się przy udziale specyficznych białek transportujących fosfolipidy inozytowe [34].

KATABOLIZM FOSFOLIPIDÓW INOZYTOŁOWYCH

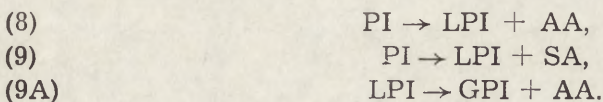
Katabolizm fosfolipidów inozytowych wymaga szerszego omówienia ze względu na istotne znaczenie fizjologiczne tego procesu. Hydroliza fosfolipidów inozytowych w tkankach ssaków następuje w wyniku działania fosfolipazy C (reakcje (5)-(7)):



W wyniku hydrolizy wszystkich trzech fosfoinozytydów powstają proste oraz odpowiednie cykliczne inozitolofosforany [45, 128]. Fosfolipaza C — fosfodiesteraza fosfatydyloinozytolowa EC (3.1.4.10) występuje zarówno w cytozolu [2, 66, 67], jak i w oczyszczonych błonach plazmatycznych [2, 28, 83, 109, 119, 122]. Aktywność jej *in vitro* jest silnie zależna od wielu związków, jak fosfolipidy, wolne kwasy tłuszczowe, pH, lub siły jonowej środowiska [67]. W procesie aktywacji fosfodiesterazy biorą udział białka zależne od GTP [25, 47, 48]. Atherton i Hawthorne [7] nie zaobserwowali charakterystycznych różnic między fosfodiesterazą degradującą fosfatydyloinozytol a fosfodiesterazą hydrolizującą polifosfatydyloinozytole, natomiast Majerus i wsp. [82] uważają, że hydrolizę tych związków katalizują różne formy fosfolipazy C. Stwierdzili, że reakcja hydrolizy PI wymaga jonów wapniowych o stężeniu rzędu milimoli, natomiast polifosfatydyloinozytole są hydrolizowane nawet w obecności EGTA. Badania te zostały potwierdzone ostatnio przez Lapeintę i wsp. [75]. Są jednakże wcześniejsze badania wskazujące, że degradacja PIP₂ do IP₃ związana jest ze wzrostem wewnątrzkomórkowego wapnia, np. w komórkach obojętnochłonnych i neurofilach [23, 24, 26, 27].

W płytkach krwi Low i wsp. [80] scharakteryzowali trzy różne formy fosfolipazy C różniące się ciężarem cząsteczkowym. Oczyszczone enzymy powodują hydrolizę wszystkich fosfoinozytydów w obecności jonów wapnia. W normalnych warunkach fosfatydyloinozytol nie jest dostępny dla fosfolipazy C [111]. Zabezpieczająco wpływają tu jony K⁺, Mg⁺² (dodatknie jony nie wiążące fosforu), białka obdarzone dodatnim ładunkiem, a także fosfolipidy zawierające cholinę. Kwas fosfatydowy i inne kwaśne lipidy są silnymi aktywatorami fosfolipazy C. Jest możliwe, że pobudzenie receptora powoduje w konsekwencji taką reorganizację błony, która pozwala na reakcję fosfolipazy C z substratem.

W wyniku omawianych reakcji degradacji fosfolipidów inozitolowych poza inozitolofosforanami powstaje digliceryd, przy czym DG pochodzącego z degradacji PI jest około 10-krotnie więcej niż powstałego podczas degradacji PIP₂ [82]. Fosfatydyloinozytol może być również degradowany przy udziale fosfolipazy A₂ do lizofosfatydyloinozytolu (LPI) i kwasu arachidonowego (AA) (reakcja 8):

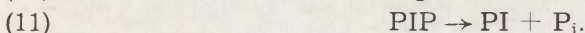
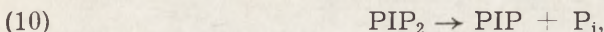


Specyficzność fosfolipazy A₂ względem fosfatydyloinozytolu jest problematyczna. Fosfolipazę A₂, specyficznie degradującą fosfolipidy inozitolowe, wykryto w mózgu [8, 63] oraz w płytkach krwi i komórkach obojętnochłonnych [42, 43]. Enzym ten, wyizolowany z frakcji mikro-

somalnej mózgu szczura, wykazywał największą aktywność w stosunku do fosfatydyloinozytoli chociaż hydrolizował również inne fosfolipidy [49]. Liczne komórki, np. płytki krwi i komórki obojętnochłonne, zawierają zależny i niezależny od wapnia mechanizm degradacji fosfoinozytydów przy udziale fosfolipazy A₂ [42, 43]. Kwas arachidonowy uwalniany z tej reakcji może być wykorzystywany do syntezy prostaglandyn, prostacyklin oraz innych eikozonoidów.

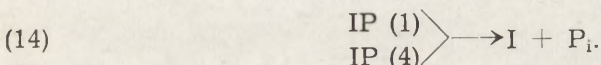
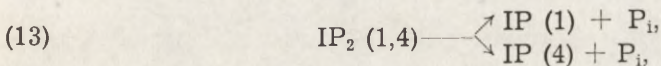
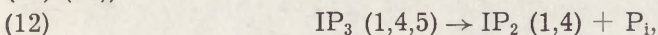
Sugeruje się możliwość stopniowej degradacji fosfatydyloinozytoli poprzez działanie fosfolipazy A₁ [49] z utworzeniem kwasu stearynowego (SA) i lizofosfatydyloinozytoli, który następnie w wyniku reakcji lizofosfolipazy dostarcza glicerofosfoinozytoli (GPI) i kwasu arachidonowego.

Katabolizm polifosfatydyloinozytoli opisują reakcje (10) i (11):



Kolejne odłączanie grup fosforanowych P_i katalizują specyficzne monofosfoesterazy. Aktywność monofosfoesteraz była stwierdzona w nerce [30, 77] oraz w mózgu [67].

Na uwagę zasługuje dalsza hydroliza rozpuszczalnych w wodzie metabolitów fosfolipidów inozytolowych, tj. inozytolofosforanów (reakcje (12)-(14)):



Trifosfataza IP₃ (1,4,5) (reakcja (12)) hydrolizuje wiązanie 5-fosforanowe, w wyniku czego powstaje inozytolodifosforan IP₂ (1,4).

Badania Kukita i wsp. [73] przeprowadzone na makrofagach wykazały aktywność inozytolotrifosfatazy we frakcji błonowej i w cytosolu. Aktywność enzymu cytosolowego wymaga jonów Mg⁺² do pełnej aktywności i jest obniżona przez jony wapnia w stężeniu 10⁻⁷-10⁻⁶M w obecności 1 mM MgCl₂. Rolę jonów magnezu w aktywności trifosfatazy stwierdzili Downes i wsp. [38]. Inozytolodifosforan IP₂ (1,4) następnie hydrolizowany jest w reakcji bisfosfatazy inozytolowej do fosfoinozytoli (inozytolofosforanu) (reakcja 13)) [15].

W ekstrakcie tkanki mózgowej poza inozytolo-1-fosforanem występuje pewna ilość inozytolo-4-fosforanu, co może być spowodowane niezupełną specyficznością bisfosfatazy inozytolowej lub występowaniem odrębnego enzymu, hydrolizującego wiązanie 1-fosforanowe. Oba izomery

inozytlofosforanu są następnie degradowane do inozytolu w wyniku działania inozytolo-1-fosfatazy (reakcja (14)). Aktywność inozytolo-1-fosfatazy jest hamowana specyficznie przez jony Li^+ [50], co zostało wykorzystane przez wielu badaczy do analizy cyklu inozytowego [86]. Ostatnie badania Mayra i Koppitza [86] wskazują na udział inozytlofosforanów w regulacji aktywności enzymów glikolitycznych oraz enzymów cyklu pentozowego. Badacze ci zaobserwowali, że enzymy biorące udział w metabolizmie ufosforylowanych heksoz podlegają regulacji przez $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ i $\text{Ins}(1,4)\text{P}_2$ w stężeniach mikromolarnych. Fosfofrukto-kinaza z mięśni jest silnie pobudzana przez $\text{Ins}(1,4)\text{P}_2$. Mięśniowa i wątrobowa aldolaza jest kompetycyjnie inhibowana przez $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ i $\text{Ins}(1,4)\text{P}_2$. Wątrobowa dehydrogenaza 6-fosfoglukonianu jest również kompetycyjnie inhibowana przez $\text{Ins}(1,4)\text{P}_2$. Pozostałe izomery oraz fosforany inozytolu wykazują znacznie słabszy efekt.

Lit wzmacnia 5-20-krotnie stymulowane przez agonistów nagromadzenie fosfoinozytolu w skrawkach kory mózgu, gruczołach ślinianki i przytarczycznych [11]. Czas utrzymywania się podwyższonego poziomu inozytlofosforanów waha się od 60 s do 30 min w różnych tkankach. Różne szybkości powrotu do stanu spoczynkowego po zadziałaniu bodźca mogą być spowodowane niejednakową aktywnością specyficznych fosfataz inozytlofosforanowych, co może mieć istotne znaczenie fizjologiczne.

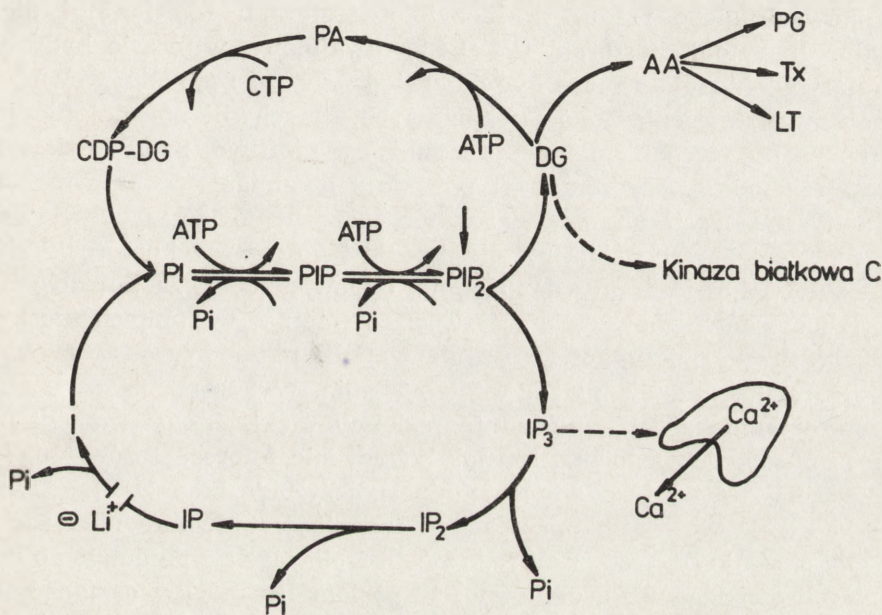
W gruczołach ślinianki owadów fosfataza IP_3 jest bardziej aktywna od fosfatazy IP_2 , co w efekcie daje nagromadzenie IP_2 w tych tkankach podczas stymulacji 5-hydroksytryptaminą [15]. Proces izomeryzacji fosfoinozytoli może powodować również zahamowanie reakcji ich degradacji.

W gruczołach przytarczycznych szczura tylko nieznaczna część nagromadzającego się podczas stymulacji karbacholem IP_3 jest izomerem 1,4,5, pozostała ilość to izomer 1,3,4, który nie jest wrażliwy na działanie fosfatazy LP (1,4,5). Powstaje on z inozytolu 1,3,4,5-tetrafosforanowego w reakcji defosforylacji w pozycji 5 [68]. Znaczenie, funkcja i katabolizm 1,3,4-izomeru IP_3 pozostają do tej pory nie wyjaśnione [2, 91].

IV. CHARAKTERYSTYKA RECEPTORÓW ZWIĄZANYCH Z HYDROLIZĄ FOSFOLIPIDÓW INOZYTOŁOWYCH

Mechanizm przekazywania informacji, związany z mobilizacją jonów wapnia i metabolizmem fosfolipidów inozytlowych, nie jest do chwili obecnej w pełni wyjaśniony. Pobudzenie metabolizmu lipidów inozytlowych w odpowiedzi na działanie acetylocholino było po raz pierwszy zaobserwowane przez Hokin i Hokin w 1953 r. [62]. W toku następnych

badania stało się jasne, że stymulowanie metabolizmu fosfoinozytydów występuje w odpowiedzi na wiele zewnętrznych sygnałów [13, 37, 87]. Durel i wsp. [41] sugerowali, że ten stymulowany metabolizm fosfolipidów inozytolowych może brać udział w funkcji receptorów. Michell [87] zaproponował hipotezę, według której degradacja inozytydów jest następstwem napływu zewnątrzkomórkowego wapnia do komórki. Hipoteza ta nie była jednak w pełni zaakceptowana. Obecnie uważa się, że pobudzenie receptorów związane jest z degradacją fosfolipidów inozytolowych, a wzrost stężenia jonów Ca^{+2} w komórce następuje w wyniku uwolnienia ich z pozamitochondrialnych magazynów komórki (rys. 2). Stwier-



Ryc. 2. Degradacja fosfolipidów inozytolowych w wyniku pobudzenia receptora

dzono, że informatorem między receptorem w błonie cytoplazmatycznej a wewnętrznymi magazynami Ca^{+2} jest trifosfoinozytol IP_3 (1,4,5) [16].

Do agonistów pobudzających metabolizm fosfolipidów inozytolowych należą: acetylocholina [19, 100, 125], noradrenalina [102, 118], histamina [70], 5-hydroksytryptamina [12], asparagina, glutamina [92], wazopresyna [31, 117], sugstancja P [51], angiotensina [18] oraz wiele różnych czynników wzrostu. W tych przypadkach, gdy prowadzono badania farmakologiczne, udało się ustalić, że zmiany w metabolizmie fosfolipidów inozytolowych związane są z receptorami: muskarynowym układu cholinergicznego, α_1 -adrenoreceptorem, H_1 -receptorem histaminergicznym,

v_1 -wazopresynergicznym, glutaminergicznym i innymi. Charakterystyczną cechą tych receptorów jest wielofunkcyjność. Pobudzenie ich powoduje degradację fosfolipidów inozytolowych, mobilizację wapnia, aktywację kinazy białkowej C, uwalnianie kwasu arachidonowego i aktywację cykazy guanylowej [111].

V. FUNKCJA TRIFOSFOINOZYTOLI I DIGLICERYDÓW JAKO PRZEKAŹNIKÓW INFORMACJI DRUGIEGO RZĘDU

Degradacja fosfolipidów inozytolowych doprowadza, w wyniku działania fosfodiesteraz, do powstania dwóch związków o charakterze przekazników drugiego rzędu, tj. inozytolotrifosforanu IP_3 (1,4,5) i diglicerydu. Inozytolotrifosforan IP_3 (1,4,5) uwalniany w czasie hydrolizy trifosfatydyloinozytolu może być odpowiedzialny za regulację wewnątrzkomórkowego stężenia jonów wapniowych. Do chwili obecnej nie jest jednak znany mechanizm tego procesu. Jest możliwe, że IP_3 działa na wewnątrzkomórkowe receptory i powoduje uwalnianie wapnia z endoplazmatycznego retikulum. Związek ten może hamować wychwyt wapnia, co również wpływa na rozmieszczenie tego jonu w komórce. Trifosfoinozytol-1,4,5 jest prawdopodobnie odpowiedzialny za kontrolę wewnątrzkomórkowego systemu buforującego wapń w warunkach spoczynkowych. Stały spoczynkowy poziom wapnia może być utrzymywany poprzez regulację poziomu IP_3 w cytoplazmie. Wykazano, że wewnątrzkomórkowa iniekcja IP_3 powoduje podobny efekt, jak stymulacja receptora muskarynowego [98] lub jak pobudzenie fotoreceptorów [20, 44]. Iniekcja IP_3 powoduje odwracalną hiperpolaryzację błon [123].

Uwalnianie wewnątrzkomórkowego wapnia jest gwałtowne i zachodzi, gdy stężenie IP_3 jest rzędu mikromoli. Opierając się na danych o ilości hydrolizowanego PIP_2 , obliczono, że poziom IP_3 mógłby osiągnąć stężenie $15 \mu M$ w ciągu 2 min. Tak wysokie stężenie IP_3 jednak nigdy nie występuje w warunkach *in vivo* i waha się od $0,1$ do $0,5 \mu M$. To zjawisko może być spowodowane wysoką aktywnością inozytolotrifosfatazy, której $t_{1/2}$ np. w hepatocytach wynosi 4 s [108].

Istnieją również komórki, jak np. ziarniste nadnercza, w których pobudzenie receptora powoduje wzrost poziomu IP_3 , bez wpływu na stężenie wapnia w komórce [59].

Diacyloglicerol jest drugim ważnym pośrednim produktem degradacji fosfoinozytydów. Gwałtowne i zwykle przejściowe nagromadzenie diglicerydów, związane bezpośrednio z pobudzeniem hydrolizy fosfoinozytydów, obserwowano w płytkach krwi [54, 101, 105], w trzustce [33], w przysadce mózgowej [84], w komórkach wątroby [116] oraz w komórkach tucznych [65]. Opierając się na analizie składu kwasów tłuszczo-

wych w diglicerydach, sugerowano, że diacyloglicerol pochodzi głównie z fosfoinozytydów. Niektóre badania wskazują, że tylko część nowo powstającego DG pochodzi z degradacji omawianych fosfatydyloinozytoli, reszta zaś z rozpadu innych lipidów [9, 64]. Zainteresowanie właściwościami diacyloglicerolu rozwinęło się w ciągu ostatnich lat. Wywołało je odkrycie kinazy białkowej C, zależnej od fosfolipidów, a pobudzonej przez DG [6, 89]. Początkowo uważano, że tylko diglicerydy zawierające nienasycony kwas tłuszczowy mogą aktywować kinazę białkową C [71]. Obecnie wiadomo, że niezależnie od rodzaju podstawników, digliceryd aktywuje kinazę białkową C [76], jeśli jest tylko izomerem snDG [22, 103]. Kinaza białkowa C w obecności diglicerydu zmienia swoje powinowactwo dla jonów wapnia ze stężeń milimolowych do mikromolowych [71, 112]. Diglicerydy powodują zmiany w błonie, które mogą umożliwić translokację kinazy białkowej C z cytosolu do błon.

Diacyloglicerid jest równocześnie substratem dla diglicerydowej lipazy [10, 101]. W wyniku hydrolizy diglicerydu przy udziale diglicerydowej lipazy następuje uwolnienie kwasu arachidonowego, który bardzo szybko metabolizowany jest przez cyklooksygenazę i lipooksydazy do prostaglandyn tromboksanów i leukotrienów lub ulega całkowitej peroksydacji. Metabolity kwasu arachidonowego mają istotne znaczenie dla komórki w procesie przekazywania informacji. Stwierdzono, że w płytkach krwi tromboksan A_2 może aktywować fosfolipazę A_2 , co powoduje dalsze uwalnianie kwasu arachidonowego i jego przemiany. Uwalnianie kwasu arachidonowego, związane z inicjacją procesu receptorowego, mobilizującego wapń, różni się od uwalniania kwasu arachidonowego z innych fosfolipidów, takich jak: fosfatydylocholina, fosfatydyloetanolamina oraz fosfatydyloinozytol w wyniku działania mało specyficznej fosfolipazy A_2 . Ten ostatni szlak wymaga prawdopodobnie wyższych stężeń jonów wapnia [17] i może zachodzić w komórkach poddanych maksymalnej stymulacji. Snider i wsp. [107] sugerują, że związane z receptorem uwalnianie kwasu arachidonowego z fosfolipidów inozytolowych może przebiegać bez zmian w poziomie wewnątrzkomórkowego wapnia. Uwalniany kwas arachidonowy wykorzystywany jest zaledwie w niewielkim procencie do syntezy eikozanoidów. Prawdopodobnie związane jest to z różną kompartmentacją enzymów odpowiedzialnych za uwalnianie kwasu arachidonowego i enzymów biorących udział w jego metabolizmie.

Nadtlenki powstające z kwasu arachidonowego aktywują cyklazę guanylową, co powoduje wzrost stężenia cGMP i dalsze uaktywnienie cyklu fosfolipidów inozytolowych. Niektóre zaś prostaglandyny, jak PGE_2 i PGI_2 , powodują zwiększanie poziomu cyklicznego AMP, co prowadzi do hamowania obrotu fosfolipidów inozytolowych [14].

VI. KINAZA BIAŁKOWA C

Kinaza białkowa C, odkryta w 1977 r., była badana szczegółowo przez japońskiego uczonego Yoshidę Nishizukę. Występowanie tego enzymu stwierdzono prawie we wszystkich tkankach ssaków i w innych eukariotycznych organizmach [72, 74, 79, 89, 94, 97, 113, 115, 129, 130]. W płytkach krwi, mózgu i niektórych mięśniach gładkich aktywność kinazy białkowej C jest kilkakrotnie wyższa od kinazy białkowej A, zależnej od cAMP. Istnienie kinazy białkowej C stwierdzono w cytosolu i frakcjach błonowych. W mózgu około 30% aktywności kinazy białkowej C związane jest z frakcją zakończeń synaptycznych [36, 74]. Kinaza ta zarówno związana z błoną, jak i cytosolowa wykazuje podobne właściwości kinetyczne i katalityczne [36]. Dla aktywacji kinazy białkowej C niezbędne są: 1,2-digliceryd, jony wapnia Ca^{2+} i fosfolipid błonowy. Podczas degradacji fosfolipidów inozytolowych powstający 1,2-digliceryd umożliwia połączenie się hydrofobowej domeny kinazy białkowej C z błoną. Prawdopodobnie kinaza tworzy czterocząłowy aktywny kompleks z fosfatydyloseryną, jonami wapnia oraz diglicerydem [6, 96] i w tej formie katalizuje fosforylację reszt serynowych i treoninowych specyficznych białek. Kancerogenne estry forbolu, których cząsteczki zbliżone są układem przestrzennym do cząsteczki diglicerydu, oraz syntetyczne diglicerydy aktywują również kinazę białkową C [6, 95].

VII. UDZIAŁ FOSFOINOZYTYDÓW W PROLIFERACJI KOMÓREK

Dringer i wsp. [40] w 1977 r. wskazali na udział fosfoinozytydów w procesie wzrostu komórek. Obecnie uważa się, że degradacja PIP_2 jest jednym z wcześniejszych zjawisk towarzyszących temu procesowi [53]. Dane potwierdzające znaczenie fosfolipidów inozytolowych w proliferacji pochodzą z badań nad rolą jonów wapnia, estrów forbolu i onkogenów w tym procesie. Udział jonów wapniowych w inicjacji proliferacji komórek stwierdzono na podstawie przejściowego wzrostu stężenia tych jonów podczas cyklu komórkowego [13, 88].

W niektórych fazach cyklu komórkowego wzrostowi jonów wapnia towarzyszy pobudzenie metabolizmu fosfolipidów inozytolowych [126]. Mimo usunięcia jonów Ca^{+2} ze środowiska zewnętrznego, stężenie Ca^{+2} nie ulega zmniejszeniu, co wskazuje na uwalnianie wapnia przez IP_3 z wewnątrzkomórkowych magazynów.

Badania wpływu estrów forbolu na metabolizm komórki dostarczyły kolejnych dowodów wskazujących na udział fosfolipidów inozytolowych w proliferacji. Zarówno estry forbolu, jak i diglicerydy, oprócz aktywacji

kinazy białkowej C, wpływają na wymianę jonów protonowych i sodowych, doprowadzając do wzrostu wewnątrzkomórkowego pH [32, 106]. Obniżenie stężenia jonów H^+ w komórce towarzyszy procesom różnicowania.

Inny kierunek badań, dotyczący roli onkogenów w proliferacji komórek, wskazuje na udział w tym procesie fosfolipidów inozytowych. Niektóre onkogeny (ros, src) kodują białko mające właściwości kinazy tyrozyny, kinazy fosfatydyloinozytolu i difosfosfatydyloinozytolu [81, 110]. Zaobserwowano również, że gen v-sis koduje białko zbliżone właściwościami do płytkowego czynnika wzrostu (PDGF). Białko to aktywuje metabolizm fosfolipidów inozytowych [35, 124].

VIII. UWAGI KOŃCOWE

Mimo dużej liczby prac opublikowanych oraz intensywnie prowadzonych badań nad metabolizmem fosfolipidów inozytowych i nad ich rolą w procesie przekazywania informacji, wiele pytań pozostaje bez odpowiedzi. Do chwili obecnej nie wiadomo, jak odbywa się aktywacja fosfodiesteraz degradujących polifosfatydyloinozytole zlokalizowane w wewnętrznej warstwie błony. Jakiego typu zmiany w błonie wpływają na dostępność substratów? Jaka jest funkcja i pochodzenie metabolitów takich jak 1,3,4 IP_3 i 1,3,4,5 IP_4 ? Ciągłe nie jest jasne, czy we wszystkich tkankach, w jaki sposób i w jakiej ilości 1,4,5-trifosfoinozytol spełnia rolę przekaźnika drugiego rzędu. Nie wyjaśnionym w pełni zagadnieniem pozostaje udział GTP i cGMP w tym procesie. Dalszych badań wymaga dokładne poznanie znaczenia fosfolipidów inozytowych w procesie nowotworzenia.

LITERATURA

- [1] ABDEL-LATIF A. A., Metabolism of phosphoinositides, [w] Handbook of Neurochemistry, red. Lajtha A., Plenum Publishing Corp. New York, vol. 3, 91-131, 1983.
- [2] — Calcium-mobilizing receptor, polyphosphoinositides and the generation of second messengers, Pharmacol. Reviews, 38 (3): 227-272, 1986.
- [3] AGRANOFF B. W., BRADLEY R. M., BRADY R. V., The enzymatic synthesis of inositol phosphatide, J. Biol. Chem., 223: 1077-1083, 1958.
- [4] AGRANOFF B. W., MURTHY P., SEGUIN E. B., Thrombin-induced phosphodiesteratic cleavage of phosphatidylinositol biphosphate in human platelets, J. Biol. Chem., 258: 2076-2078, 1983.

- [5] ANDERSON R. J., ROBERTS E. G., The chemistry of the lipids of turbercle bacilli. Concerning the composition of the phosphatide fraction isolated from the bovine type of turbercle bacilli, *J. Biol. Chem.*, **89**: 590-610, 1930.
- [6] ASHENDEL C. L., The phorbol ester receptor: a phospholipid-regulated protein kinase, *Biochim. Biophys. Acta*, **822**: 219-242, 1985.
- [7] ATHERTON R. S., HAWTHORNE J. N., The phosphoinositide inositolphosphohydrolase of guinea-pig intestinal mucosa, *Eur. J. Biochem.*, **4**: 68-75, 1968.
- [8] BAKER R. R., THOMPSON W., Positional distribution and turnover of fatty acids in phosphatidic acid, phosphoinositides, phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine in rat brain in vivo, *Biochim. Biophys. Acta*, **270**: 489-503, 1972.
- [9] BANSCHBACH M. W., GEISON R. L., HOKIN-NEAVERSON M., Acetylcholine increases the level of diglyceride in mouse pancreas, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **58**: 714-718, 1974.
- [10] BELL R. L., KENNERLY D. A., STANFORD N., MAJERUS P. W., Diglyceride lipase: a pathway for arachidonate release from human platelets, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**: 3238-3241, 1979.
- [11] BERRIDGE M. J., A novel cellular signaling system based on the integration of phospholipid and calcium metabolism, [w] Calcium and Cell Function, red. Cheung W. Y., Academic Press, New York, vol. 3, 1-36, 1982.
- [12] — Rapid accumulation of inositol triphosphate reveals that against hydrolyse polyphosphoinositides instead of phosphatidylinositol, *Biochem. J.*, **212**: 849-858, 1983.
- [13] — Inositol triphosphate and diacylglycerol as second messengers, *Biochem. J.*, **220**: 345-360, 1984.
- [14] — Cellular control through interactions between cyclic nucleotides and calcium, [w] Advances in Cyclic Nucleotide and Protein Phosphorylation Research, red. Greengard P. i wsp., Raven Press, New York, vol. 17, 329-335, 1984.
- [15] BERRIDGE M. J., DAWSON R. M. C., DOWNES C. P., HESLOP J. P., IRVINE R. F., Changes in the levels of inositol phosphates after agonist-dependent hydrolysis of membrane phosphoinositides, *Biochem. J.*, **212**: 473-482, 1983.
- [16] BERRIDGE M. J., IRVINE R. Inositol trisphosphate a novel second messenger in cellular signal transduction, *Nature*, **312**: 315-321, 1984.
- [17] BILLAH M. M., LAPETINA E. G., CUATRECASAS P., Phospholipase A₂ activity specific for phosphatidic acid, *J. Biol. Chem.*, **256**: 5399-5403, 1981.
- [18] BILLAH M. M., MICHELL R. H., Phosphatidylinositol metabolism in rat hepatocytes stimulated by glycogenolytic hormones, *Biochem. J.*, **182**: 661-668, 1979.
- [19] BROWN S. L., BROWN J. H., Muscarinic stimulation of phosphatidylinositol metabolism in atria, *Mol. Pharmacol.*, **24**: 351-356, 1983.
- [20] BROWN J. E., RUBIN L. J., GHALAYIMI A. J., TARVER A. P., IRVINE R. F., BERRIDGE M. J., ANDERSON R. E., Myo-inositol polyphosphate may be a messenger for visual excitation in limulus photoreceptors, *Nature*, **311**: 161-163, 1984.
- [21] BUCKLEY J. T., LEFEBVRE Y. A., HAWTHORNE J. N., Identification of an actively phosphorylated component of adrenal medulla chromaffin granules, *Biochim. Biophys. Acta*, **239**: 517-519, 1971.

- [22] CABOT M. C., JANKEN S., Structural and chemical specificity of diacylglycerols for protein kinase C activation, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **125**: 163-169, 1984.
- [23] COCKCROFT S., Does phosphatidylinositol breakdown control the Ca^{2+} gating mechanism?, *Trends Pharmacol. Sci.*, **2**: 340-342, 1981.
- [24] — Phosphatidylinositol metabolism in mast cells and neutrophils, *Cell Calcium*, **3**: 337-349, 1982.
- [25] — Polyphosphoinositide phosphodiesterase: regulation by a novel guanine nucleotide binding protein Gp, *TIBS*, **12**: 75-78, 1987.
- [26] COCKCROFT S., BENNETT J. P., GOMPERTS B. D., f-Met-Leu-Phe-induced phosphatidylinositol turnover in rabbit neutrophils is dependent on extracellular calcium, *FEBS Lett.*, **110**: 115-118, 1980.
- [27] — Stimulus-secretion coupling in rabbit neutrophils is not mediated by phosphatidylinositol breakdown, *Nature (London)*, **288**: 275-277, 1980.
- [28] COCKCROFT S., GOMPERTS B. D., Role of nucleotide binding protein in the activation of polyphosphoinositide phosphodiesterase, *Nature*, **314**: 534-536, 1985.
- [29] COLODZIN M., KENEDY E. P., Biosynthesis of diphosphoinositide in brain, *J. Biol. Chem.*, **240**: 3171-3180, 1965.
- [30] COOPER P. H., HAWTHORNE J. N., Phosphomonoesterase hydrolysis of polyphosphoinositides in rat kidney. Properties and subcellular localization of the enzyme system, *Biochem. J.*, **150**: 537-551, 1975.
- [31] CREBA J. A., DOWNES C. P., HAWKINS P. T., BREUSTER G., MICHELL R. H., KIRK C. J., Rapid breakdown of phosphatidylinositol 4-phosphate and phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate in rat hepatocytes stimulated by vasopressin and other Ca^{+2} mobilizing hormones, *Biochem. J.*, **212**: 733-747, 1983.
- [32] DEMEL R. A., SOMERHAJU P., WIRTZ K. W. A., Phosphatidylinositol transfer protein from bovine brain, [w] *Phospholipids in the Nervous System*, vol. 2, *Physiol. Roles*, red. L. A. Horrocks, Raven Press, New York, 61-69, 1985.
- [33] DICKER P., ROZENGURT E., Phorbol ester stimulation of Na influx and Na-K pump activity in swiss 3T3 cells, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **100**: 433-441, 1981.
- [34] DIXON J. F., HOKIN L. E., Secretagogue-stimulated phosphatidylinositol breakdown in the exocrine pancreas liberates arachidonic acid, stearic acid and glycerol by sequential actions of phospholipase C and diglycerol lipase, *J. Biol. Chem.*, **259**: 14418-14425, 1984.
- [35] DOOLITTLE R. F., HUNKAPILLER M. W., HOOD E. E., DEVARE S. G., ROBINS K. S., AARONSON S. A., ANTONIADES H. N., Siamian sarcome virus one gene, v-sis is derived from the gene (or genes) encoding a platelet derived growth factor, *Science*, **221**: 275-277, 1983.
- [36] DOWNES C. P., Agonist-stimulated phosphatidylinositol 4,5 bisphosphate metabolism in the nervous system, *Neurochem. Int.*, **9**: 211-230, 1986.
- [37] DOWNES C. P., MICHELL R. H., Phosphatidylinositol 4-phosphate and phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate; lipids in search of a function, *Cell Calcium*, **3**: 467-502, 1982.
- [38] DOWNES C. P., MUSSAT M. C., MICHELL R. M., The inositol trisphosphate phosphomonoesterase of the human erythrocyte membrane, *Biochem. J.*, **203**: 169-177, 1982.
- [39] DOWNES C. P., WUSTEMAN M. M., Breakdown of polyphosphoinositides and not phosphatidylinositol accounts for muscarinic agonist-stimulated ino-

- sitol phospholipid metabolism in rat parotid glands, *Biochem. J.*, **216**: 633-640, 1983.
- [40] DRINGER H., FRÜS R. R., Changes in phosphatidylinositol metabolism correlated to growth state of normal and rous sarcoma virus-transformed Japanese quail cells, *Cancer Res.*, **37**: 2978-2984, 1977.
- [41] DUREL J., SODD M. A., FRIEDEL R. O., Acetylcholine stimulation of the phosphodiesteratic clearance of guinea pig brain phosphoinositides, *Life Sci.*, **7**: 363-366, 1968.
- [42] EGAWA K., SACKTOR B., TAKENAWA T., Ca^{2+} dependent and Ca^{2+} independent degradation of phosphatidylinositol in rabbit vas deferens, *Biochem. J.*, **7**: 194; 129-136, 1981.
- [43] FARESE R. V., LARSON R. E., SABIR M., Ca^{2+} dependent and Ca^{2+} independent mechanisms for phosphatidylinositol hydrolysis and ^{32}P -labeling during cholinergic stimulation of rat submaxillary gland in vitro, *Arch. Biochem. Biophys.*, **219**: 204-208, 1982.
- [44] FEIN A., PAYNE R., CORSON D. W., BERRIDGE M. J., IRVINE R. F., Photoreceptor excitation and adaptation by inositol 1,4,5-trisphosphate, *Nature*, **311**: 157-160, 1984.
- [45] FISHER S. K., AGRANOFF B. W., Receptor activation and inositol lipid hydrolysis in neural tissues, *J. Neurochem.*, **48** (4): 999-1017.
- [46] FOLCH J., WOOLEY D. W., Inositol, a constituent of a brain phosphatide, *J. Biol. Chem.*, **142**: 963-964, 1942.
- [47] GILMAN A. G., G proteins and dual control of adenylate cyclase, *Cell*, **36**, 577-579, 1984.
- [48] GOMPERTS B. D., Involvement of guanine nucleotide-binding protein in the gating of Ca^{2+} by receptors, *Nature*, **306**: 64-66, 1983.
- [49] GRAY N. C. C., STRICKLAND K. P., A phospholipase A_2 purified from bovine brain microsomes which shows selectivity towards phosphatidylinositol (PI), [w] *Phospholipids in the Nervous System*, vol. 1 Metabolism, red. Horrocks L. A., Ansell G. B., Porcelatti G., Raven Press, 367, 1982.
- [50] HALLCHER L. M., SHERMAN W. R., The effect of lithium ion and other agents on the activity of myoinositol-1 phosphatase from bovine brain, *J. Biol. Chem.*, **255**, 10896-10901, 1980.
- [51] HANLEY M. R., LEE C. M., JONES L. M., MICHELL R. H., Similar effects of substance P and related peptides on salivation and on phosphatidylinositol turnover in rat salivary gland, *Molec. Pharmacol.*, **18**: 78-83, 1980.
- [52] HARWOOD J. L., HAWTHORNE J. N., Metabolism of the phosphoinositides in guinea pig brain synaptosomes, *J. Neurochem.*, **16**: 1377-1387, 1969.
- [53] HASEGAWA-SASAKI H., SASAKI T., Phytohemagglutinin induces rapid degradation of phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate and transient accumulation of phosphatidic acid and diacylglycerol in a human T lymphoblastoid cell line, *CERFCEM. Biochim. Biophys. Acta*, **754**: 305-314, 1983.
- [54] HASLAM R. J., DAVIDSON N. M. L., Potentiation by thrombin of the secretion of serotonin from permeabilized platelets equilibrated with Ca^{+2} buffers. Relationship to protein phosphorylation and diacylglycerol formation, *Biochem. J.*, **222**: 351-361, 1984.
- [55] HAUSER G., EICHBERG J., GONZALES-SASTRE F., Regional distribution of polyphosphoinositides in rat brain, *Biochim. Biophys. Acta*, **248**: 87-95, 1971.
- [56] HAWTHORNE J. N., Inositol phospholipids, [w] *New Comprehensive Bio-*

- chemistry, vol. 4, Phospholipids, red. Hawthorne J. N., Ansell G. B., Elsevier Biomedical Press, Amsterdam, New York, Oxford, 263-278, 1982.
- [57] — Polyphosphoinositide metabolism in excitable membranes, *Biosci. Rep.*, **3**: 887-904, 1983.
- [58] HAWTHORNE J. N., KAI M., Metabolism of phosphoinositides, [w] *Handbook of Neurochemistry*, red. Lajtha A., vol. 3, Plenum Press, New York, 491-508, 1970.
- [59] HAWTHORNE J. N., MOHSEN A., SWILEM F., Polyphosphoinositide responses to muscarinic stimuli, which do not mobilize calcium, *J. Neurochem.*, **44**: suppl. S3A, 1985.
- [60] HAWTHORNE J. N., WHITE D. A., Myo-inositol lipids, *Vitam. Horm. (New York)*, **33**: 529-573, 1975.
- [61] HIRATA F., AXELROD J., Concanavalin A stimulates phospholipid methylation and phosphatidylserine decarboxylation in rat mast cells, *Science*, **209**: 1082-1090, 1980.
- [62] HOKIN M. R., HOKIN M., Enzyme secretion and the incorporation of phosphorous 32 into phospholipids of pancreas slices, *J. Biol. Chem.*, **203**: 967-977, 1953.
- [63] HOLUB B. J., Specific formation of arachidonyl phosphatidylinositol from 1-acyl-sn-glycero-3-phosphorylinositol in rat liver, *Lipids*, **11**: 1-5, 1976.
- [64] HUGHES B. P., RYE K. A., PICKFORD L. B., BARRITT G. J., CHOLMERS A. H., A transient increase in diacylglycerols is associated with the action of vasopressin on hepatocytes, *Biochem. J.*, **222**: 535-540, 1984.
- [65] IGARSHI Y., KONDO Y., Acute effect of thyrotropin on phosphatidylinositol degradation and transient accumulation of diacylglycerol in isolated thyroid follicles, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **97**: 759-765, 1980.
- [66] IRVINE R. F., DAWSON R. M. C., The distribution of calcium dependent phosphatidylinositol phosphodiesterase in rat brain, *J. Neurochem.*, **31**: 1427-1434, 1978.
- [67] IRVINE R. F., LETEHER A. J., DAWSON R. M. C., Phosphoinositide-metabolizing enzymes in nervous tissue, [w] *Phospholipids in the Nervous System*, vol. 2, Physiological Roles, red. Horrocks L. A., Raven Press, New York, 145-154, 1985.
- [68] IRVINE R. F., LETEHER A. J., HESLOP J. P., BERRIDGE M. J., The inositol tris/tetrakisphosphate pathway-demonstration of Ins (1,4,5) (P₃ 3-kinase activity in animal tissues, *Nature*, **320**, 631-634, 1986.
- [69] JOLLES J., ZWIERS H., van DOUGEN C., SCHOTMAN P., WIRTZ K. W. A., GISPEN W. M., Modulation of brain polyphosphoinositide metabolism by ACTH-sensitive protein phosphorylation, *Nature*, **286**: 623-625, 1980.
- [70] JONES L. M., COCKCROFT S., MICHELL R. H., Stimulation of phosphatidylinositol turnover in various tissues by cholinergic, α_1 -adrenergic agonists by histamine and by caerulein, *Biochem. J.*, **182**, 669-676, 1979.
- [71] KISHIMOTO A., TAKAI Y., MORI T., KIKAWA U., NISHIZUKA Y., Activation of calcium and phospholipid-dependent protein kinase by diacylglycerol, its possible relation to phosphatidylinositol turnover, *J. Biol. Chem.*, **255**: 2273-2276, 1980.
- [72] KU Y., KISHIMOTO A. Y., OGAWA Y., KIMURA S., NISHIZUKA Y., A new possible regulatory system for protein phosphorylation in human peripheral lymphocytes. II. Possible relation to phosphatidylinositol turnover induced by mitogens, *J. Immunol.*, **127**: 1375-1379, 1981.

- [73] KUKITA M., HIRATA M., KOGA T., Requirement of Ca^{++} for the production and degradation of inositol 1,4,5-triphosphate in macrophages, *Biochim. Biophys. Acta*, **885**: 121-128, 1986.
- [74] KUO J. F., ANDERSSON R. G. G., WISE B. C., MACKERLOVA L., SALOMONSSON I., BRACKETT N. L., KATOH N., SHOJI M., WRENN R. W., Calcium dependent protein kinase: widespread occurrence in various tissues and phyla of the animal kingdom and comparison of effects of phospholipid, calmodulin, and trifluoperazine, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**: 7039-7043, 1980.
- [75] LAPETINA E. G., BANNO Y., NAKASHIMA S., TOHMATSU T., NOZAWA Y., GTP and GDP will stimulate platelet cytosolic phospholipase C independently of Ca^{+2} , *Biochem Biophys. Res. Commun.*, **140**: 728-734, 1986.
- [76] LAPETINA E. G., REEP B., GANONG B. R., BELL R. M., Exogenous sn-1,2 diacylglycerols containing saturated fatty acids function as bioregulators of protein kinase C in human platelets, *J. Biol. Chem.*, **260**: 1358-1361, 1985.
- [77] LEE T. C., HUGGINS G. G., Triphosphoinositide phosphomonoesterase in rat kidney cortex. I. General properties and subcellular localization, *Arch. Biochem. Biophys.*, **126**: 206-213, 1968.
- [78] LEWITZKI A., HELMREICH E. J. M., Hormone-receptor-adenylate cyclase interactions, *FEBS Lett.*, **101**: 213-219, 1979.
- [79] LING E., SAPIRSTEIN V., Phorbol ester stimulates the phosphorylation of rabbit erythrocyte band 4.1, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **120**: 291-298, 1984.
- [80] LOW M. G., CARROLL R. C., COX A. Ch., Characterization of multiple forms of phosphoinositide specific phospholipase C purified from human platelets, *Biochem. J.*, **237**: 139-145, 1986.
- [81] MACARA I. G., MARINETTI G. V., BALDUZZI P. C., Transforming protein of avian sarcoma virus UR₂ is associated with phosphatidylinositol kinase activity: possible role in tumorigenesis, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**: 2728-2732, 1984.
- [82] MAJERUS P. W., WILSON D. B., CONNOLLY T. M., BROSS T. E., NEUFELD J. E., Phosphoinositide turnover provides a link in stimulus response coupling, *TIBS*, April, 168-171, 1985.
- [83] MANNING R., SUN G. Y., Detergent effects on the phosphatidylinositol specific phospholipase C in rat brain synaptosomes, *J. Neurochem.*, **41**: 1735-1743, 1983.
- [84] MARTIN F. F. J., Thyrotropin-releasing hormone rapidly activates the phosphodiester hydrolysis of polyphosphoinositides in GH₃ pituitary cells, *J. Biol. Chem.*, **258**: 14816-14822, 1983.
- [85] MATO J. M., ALEMONY S., What is the function of phospholipid N-methylation, *Biochem. J.*, **213**: 1-10, 1983.
- [86] MAYR G. W., KOPPITZ B., Inositol 1,4,5-P₃ and inositol 1,4-P₂ are effectors of phosphofructokinase, aldolase and phosphogluconate dehydrogenase, *Biological Chemistry Hoppe-Seyler*, 17th FEBS Meeting, Berlin West, 362, 1986.
- [87] MICHELL R. H., Inositol phospholipids and cell surface receptor function, *Biochim. Biophys. Acta*, **415**: 81-147, 1975.
- [88] — Stimulated inositol lipid metabolism, *Cell Calcium* **3**: 285-294, 1982.
- [89] MINAKUCHI R., TAKAI Y., YU B., NISHIZUKA Y., Widespread occurrence of calcium-activated, phospholipid-dependent protein kinase in mammalian tissues, *J. Biochem.*, **89**: 1651-1654, 1981.

- [90] MOORE J. P., JOHNSON A., HESKETH T. R., SMITH G. A., METCALFE J. S., Calcium signals and phospholipid methylation in eukariotic cells, *Biochem. J.*, **221**: 675-684, 1984.
- [91] NAHORSKI S. R., KENDALL D. A., BATLY J., Receptors and phosphoinositide metabolism in the central nervous system, *Biochem. Pharmacol.*, **35**: 2447-2453, 1986.
- [92] NICOLETTI F., MEEK J. L., IADORDA M. J., CHUONG D. H., ROTH B. L., COSTA E., Coupling of inositol phospholipid metabolism with excitatory aminoacid recognition sites in rat hippocampus, *J. Neurochem.*, **46**: 40-50, 1986.
- [93] NISHIHARA M., KEENAN R., Inositol phospholipid levels of rat forebrain obtained by freeze-blowing method, *Biochim. Biophys. Acta*, **835**: 415-418, 1985.
- [94] NISHIZUKA Y., Three multifunctional protein kinase systems in transmembrane control, *Mol. Biol. Biochem. Biophys.*, **32**: 113-135, 1980.
- [95] — The role of protein kinase C in cell surface signal transduction and tumor promotion, *Nature*, **308**: 693-697, 1984.
- [96] — Protein kinase C., [w] *Enzymes* 74A, red. Krebs E. G., Academic Press, 1-43, 1985.
- [97] OGAWA Y., TAKAI Y., KAWAHARA Y., KIMURA S., NISHIZUKA Y., A new possible regulatory system for protein phosphorylation in human peripheral lymphocytes. II. Characterization of a calcium-activated phospholipid dependent protein kinase, *I. Immunol.*, **127**: 1369-1374, 1981.
- [98] ORON Y., DASCAL N., NADLER E., LUPU M., Inositol 1,4,5-trisphosphate mimics muscarinic response in xenopus oocytes, *Nature*, **313**: 141-143, 1985.
- [99] PAULUS H., KENEDY E. P., The enzymatic synthesis of inositol monophosphate, *J. Biol. Chem.*, **235**: 1303-1311, 1960.
- [100] POGGIOLI J., WEISS S. J., MCKINNEY J. S., PUTNEY J. W., Effects of antimycin A on receptor-activated calcium mobilization and phosphoinositide metabolism in rat parotid gland, *J. Molec. Pharmac.*, **23**: 71-77, 1983.
- [101] PRESCOTT S. M., MAJERUS P. W., Characterization of 1,2-diacylglycerol hydrolysis in human platelets, *J. Biol. Chem.*, **258**: 764-769, 1983.
- [102] PRPIĆ V., BLACKMORE P. V., EXTON J. H., Phosphatidylinositol breakdown induced by vasopressin and epinephrine in hepatocytes is calcium dependent, *J. Biol. Chem.*, **257**: 11323-11331, 1982.
- [103] RANDO R. R., YOUNG N., The stereospecific activation of protein kinase C. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **122**: 818-823, 1984.
- [104] RAO R. H., STRICKLAND K. P., On the solubility, stability and partial purification of CDP-diacyl-sn-glycerol: Inositol transferase from rat brain, *Biochim. Biophys. Acta*, **348**: 306-314, 1974.
- [105] RITTENHOUSE S. E., Inositol lipid metabolism in the responses of stimulated platelets, *Cell Calcium*, **3**: 311-322, 1982.
- [106] ROSOFF P. M., STEIN L. F., CANTLEY L. C., Phorbol esters induce differentiation in a pre- β -lymphocyte cell line by enhancing Na^+/H^+ exchange, *J. Biol. Chem.*, **259**: 7056-7060, 1984.
- [107] SNIDER R. M., MCKINNEY M., FORRAY C., RICHELSON E., Neurotransmitter receptors mediate cyclic GMP formation by involvement of arachidonic acid and lipooxygenase, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, **81**: 3905-3909, 1984.
- [108] STOREY D. J., SHEARS S. B., KIRK C. J., MICHELL R. M., Stepwise enzymatic dephosphorylation of inositol 1,4,5-trisphosphate to inositol in liver, *Nature*, **312**: 374-376, 1984.

- [109] STOSZNAJDER J., WIKIEL H., KELLEHR J. A., LEU V. S., SUN G. Y., Diacylglycerol kinase and lipase activities in rat brain subcellular fractions, *Neurochem. Int.*, **8** (2): 213-221, 1986.
- [110] SUGIMOTO Y., WHITMAN M., CONTLEY L. C., ERIKSON R. L., Evidence that the *Rous sarcoma* virus transforming gene product phosphorylates phosphatidylinositol and diacylglycerol, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, **81**: 2117-2121, 1984.
- [111] TAKAI Y., KIKKAWA V., KAIBUCHI K., NISHIZUKA Y., Membrane phospholipid metabolism and signal transduction for protein phosphorylation, [w] *Advances in Cyclic Nucleotide and Protein. Phosphorylation Research*, vol. 18, ed. Greengard P., Robinson G. A., Raven Press, New York, 119-158, 1984.
- [112] TAKAI Y., KISHIMOTO A., KIKKAWA U., MORI T., NISHIZUKA Y., Unsaturated diacylglycerol as a possible messenger for the activation of calcium-activated phospholipid-dependent protein kinase system, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **91**: 1218-1224, 1979.
- [113] TAKAI Y., KISHIMOTO A., KAWAHARA Y., MINAKUCHI R., SANO K., KIKKAWA U., MORI T., YU B., KAIBUCHI K., NISHIZUKA Y., Calcium and phosphatidylinositol turnover as signalling for transmembrane control of protein phosphorylation, *Adv. Cyclic Nucleotide Res.*, **14**: 301-313, 1981.
- [114] TAKENAWA T., EGAWA K., CDP-diglyceride: inositol transferase from rat liver, *J. Biol. Chem.*, **252**: 5419-5423, 1977.
- [115] TANIGAWA K., KUZUYA H., IMURA H., TANIGUCHI H., BABA S., TAKAI Y., NISHIZUKA Y., Calcium-activated, phospholipid-dependent protein kinase in rat pancreas islets of Langerhans, *FEBS Lett.*, **138**: 183-186, 1982.
- [116] THOMAS A. P., ALEXANDER J., WILLIAMSON J. R., Relationship between inositol polyphosphate production and the increase of cytosolic free Ca^{+2} induced by vasopressin in isolated hepatocytes, *J. Biol. Chem.*, **259**: 5574-5584, 1984.
- [117] THOMAS A. P., MARKS J. S., COLL K. E., WILLIAMSON I. R., Quantitation and early kinetics of inositol lipid changes induced by vasopressin in isolated and cultured hepatocytes, *J. Biol. Chem.*, **258**: 5716-5725, 1983.
- [118] UCHIDA T., ITO H., BAZUN B. J., ROTH G. S., TILBURN C. R., SACKTOR B., Alpha₁-adrenergic stimulation of phosphatidylinositol-phosphatidic acid turnover in rat parotid cells, *Mol. Pharmacol.*, **21**: 128-132, 1982.
- [119] UHING R. J., JIANG H., PRPIC V., EXTON J. H., Regulation of a liver plasma membrane phosphoinositide phosphodiesterase by guanine nucleotides and calcium, *FEBS Lett.*, **188**: 317-320, 1985.
- [120] UMA S., RAMAKRISHNAN C. V., Studies on polyphosphoinositides in developing rat brain, *J. of Neurochem.*, **40**, 4: 914-916, 1983.
- [121] VAN ROOIJEN L. A. A., ROSSOWSKA M., BAZAN N. G., Inhibition of phosphatidylinositol 4-phosphate kinase by its product phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate, *Biochim. Biophys. Res. Commun.*, **126**, 1: 150-155, 1985.
- [122] WALLACE N. A., FAIN J. N., Guanosine 5-0-thiotriphosphate stimulates phospholipase C activity in plasma membranes of rat hepatocytes, *J. Biol. Chem.*, **260**: 9527-9530, 1985.
- [123] WALOGA G., ANDERSON R. E., Effects of inositol 1,4,5-triphosphate injections into salamander rods, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **126**: 59-62, 1985.
- [124] WATERFIELD M. D., SCRACE G. T., WHITTLE N., STROOBANT P., JOHNSON A., WASTESON A., WESTERMAK B., HELDIN C. H., HUANG J. S., DEUEL T. F., Platelet-derived growth factor is structurally related to the

- putative transforming protein p-28-sis of simian sarcome virus, *Nature (London)*, **304**: 35-39, 1983.
- [125] WEISS S. J., MCKINNEY J. S., PUTNEY J. W. J., Receptor-mediated net breakdown of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate in parotid cells, *Biochem. J.*, **206**: 555-560, 1982.
- [126] WHITFIELD J. F., BOYTON A. L., MACMANUS J. P., RIXON R. H., SIKORSKA M., TSANG B., WALKER P. R., SWERENGA S. H. H., The roles of calcium and cyclic AMP in cell proliferation, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **339**: 216-240, 1980.
- [127] WILLIAMSON F. A., MORRE D. J., Distribution of phosphatidylinositol biosynthetic activities among cell fractions from rat liver, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **68**: 1201-1205, 1976.
- [128] WILSON D. B., CONNOLLY T. M., BROSS T. E., MAJERUS P. W., SHERMAN W. R., TYLER A. N., RUBIN L. J., BROWN J. E., Isolation and characterization of the inositol cyclic phosphate products of polyphosphoinositide cleavage by phospholipase C, physiological effects in permeabilized platelets and limulus photoreceptor cells, *J. Biol. Chem.*, **26**: 13496-13501, 1985.
- [129] WISE B. C., ANDERSON R. G. G., MACKERLOVA L., RAYNOR R. L., SOLOMONSSON I., KUO J. F., Ontogenic aspects of phospholipid-sensitive calcium-dependent protein kinase in guinea pig tissues, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **99**: 407-413, 1981.
- [130] ZABRENETZKY V. S., BRUCKWICK E., LOVENBERG W., Calcium stimulation of protein kinase C in the absence of added phospholipids, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **102**: 135-141, 1981.

Otrzymano: 23 marca 1987.

Przyjęto: 5 sierpnia 1987.

Adres autorów: ul. Dworkowa 3, 00-784 Warszawa.

ANNUAL REVIEW OF CELL BIOLOGY

VOLUME 1, 1985

- GEORGE E. PALADE, *Editor*
Yale University School of Medicine
- BRUCE M. ALBERTS, *Associate Editor*
University of California, San Francisco
- JAMES A. SPUDICH, *Associate Editor*
Stanford University

CONTENTS

ISBN 0-8243-3101-X

- RECEPTOR-MEDIATED ENDOCYTOSIS, *Joseph L. Goldstein, Michael S. Brown, Richard G. W. Anderson, David W. Russell, and Wolfgang J. Schneider*
- INTERMEDIATE FILAMENTS, *Peter M. Steinert and David A. D. Parry*
- MOLECULAR BIOLOGY OF FIBRONECTIN, *Richard Hynes*
- CELL MIGRATION IN THE VERTEBRATE EMBRYO, *Jean Paul Thiery, Jean Loup Duband, and Gordon C. Tucker*
- PROTEIN LOCALIZATION AND MEMBRANE TRAFFIC IN YEAST, *Randy Schekman*
- MICROTUBULE ORGANIZING CENTERS, *B. R. Brinkley*
- GENERATION OF POLARITY DURING *CAULOBACTER* CELL DIFFERENTIATION, *Lucille Shapiro*
- ORGANIZATION, CHEMISTRY, AND ASSEMBLY OF THE CYTOSKELETAL APPARATUS OF THE INTESTINAL BRUSH BORDER, *Mark S. Mooseker*
- CELL SURFACE POLARITY IN EPITHELIA, *Kai Simons and Stephen D. Fuller*
- CHROMOSOME SEGREGATION IN MITOSIS AND MEIOSIS, *Andrew W. Murray and Jack W. Szostak*
- ACETYLCHOLINE RECEPTOR STRUCTURE, FUNCTION, AND EVOLUTION, *Robert M. Stroud and Janet Finer-Moore*
- NONMUSCLE ACTIN-BINDING PROTEINS, *T. P. Stosel, C. Chaponnier, R. M. Ezzell, J. H. Hartwig, P. A. Janmey, D. J. Kwiatkowski, S. E. Lind, D. B. Smith, F. S. Southwick, H. L. Yin, K. S. Zaner*
- USING RECOMBINANT DNA TECHNIQUES TO STUDY PROTEIN TARGETING IN THE EUKARYOTIC CELL, *Henrik Garoff*
- PROGRESS IN UNRAVELING PATHWAYS OF GOLGI TRAFFIC, *Marilyn Gist Farquhar*
- BIOGENESIS OF PEROXISOMES, *P. B. Lazarow and Y. Fujiki*
- STABILIZING INFRASTRUCTURE OF CELL MEMBRANES, *V. T. Marchesi*
- SUBJECT INDEX

Published by:

Annual Reviews Inc.

A NONPROFIT SCIENTIFIC PUBLISHER

4139 EL CAMINO WAY • PALO ALTO, CALIFORNIA 94306-9981 • USA

<http://rcin.org.pl>

METABOLIZM CERULOPLAZMINY I JEJ BIOLOGICZNA ROLA W UTRZYMYWANIU HOMEOSTAZY ORGANIZMU

METABOLISM OF CERULOPLASMIN AND ITS BIOLOGICAL FUNCTION IN MAINTAINING OF HOMEOSTASIS IN THE ORGANISM

Sylwia BRONIEK i Grzegorz GRZYBOWSKI

Instytut Genetyki i Hodowli Zwierząt PAN, Zakład Immunogenetyki

Streszczenie. Ceruloplazmina (Cp) jest powszechnie występującym u kręgowców białkiem surowiczym zaangażowanym w metabolizm jonów miedzi (Cu). Ferrooksydaza jako enzym uczestniczy również w metabolizmie jonów żelaza (Fe). W ostatnim czasie zwrócono uwagę na możliwość zaangażowania metaloprotein w etiologii i terapii chorób infekcyjnych oraz neoplastycznych. W pracy przedstawiono najnowsze dane dotyczące genetycznej kontroli syntezy Cp i jej polimorfizmu genetycznego oraz ontogenetycznych aspektów poziomu Cp w organizmie. Szczególną uwagę zwrócono na rolę Cp jako centralnego molekularnego ogniwa metabolizmu jonów Cu i Fe oraz jej znaczenie dla zrozumienia mechanizmów zaangażowania metaloprotein w utrzymywaniu homeostazy organizmu.

Summary. Ceruloplasmin is the serum protein commonly found in vertebrates, playing an important role in their Cu ions metabolism. Moreover as an ferroxidase enzyme, ceruloplasmin takes part in the metabolism of Fe ions. Recently the possible role of metalloproteins in etiology and therapy of infections and neoplastic diseases is also suggested. The study presents the recent developments on genetic control of synthesis and genetic polymorphism of Cp as well as ontogenetic aspects of its level in the organism. Emphasized is a role of Cp as central element in Cu and Fe metabolism and its importance in understanding the mechanism of the role of metalloproteins in the maintaining of homeostasis in the organism.

Ceruloplazmina (Cp) jest powszechnie występującym u kręgowców białkiem surowiczym. Jej główną funkcją jest zaangażowanie w metabolizm jonów Cu i Fe. Chociaż poznano dotychczas wiele właściwości fizykochemicznych i biochemicznych Cp, to jednak jej włączenie w metabolizm organizmów żywych oraz właściwe funkcje biologiczne pozostają nadal przedmiotem wielu różnorodnych badań. Przyjmuje się, że Cp

pojawiła się w organizmach zwierzęcych na etapie ewolucyjnego przystosowania do tlenowych warunków życia, jako drugi, obok żelaza, element niezbędny w procesie oddychania komórkowego. Zakłada się, że presja ewolucyjna na powstanie kompleksów białko—miedź oraz białko—żelazo podyktowana była m.in. wysoką toksycznością wolnych jonów tych metali, a także stosunkowo słabą ich rozpuszczalnością w płynach biologicznych.

WŁAŚCIWOŚCI FIZYKOCHEMICZNE CERULOPLAZMINY

Pierwsza wzmianka o Cp, zwanej w momencie jej odkrycia niebieskim białkiem, pochodzi z 1944 r., kiedy to zwrócono uwagę na jej szczególne właściwości oksydacyjne [14]. Ceruloplazmina (Cp; syn.: ferrooksydaza I; Fe^{+2} oksydoreduktaza tlenu, EC 1.16.3.1.) jest α_2 -glikoproteiną wiążącą od 90 do 95% jonów miedzi (Cu) znajdujących się w osoczu krwi [37]. Częsteczka Cp pozbawiona jonów Cu określana jest jako apoceruloplazmina. Dane dotyczące masy cząsteczkowej Cp są rozbieżne, co może mieć związek ze specyfiką gatunkową białka, a równocześnie może być uzależnione od różnej metodyki izolacji i oczyszczania. Masa cząsteczkowa Cp jest u różnych gatunków zwierząt zbliżona [44]. Była ona przedmiotem wielu badań. W Polsce zagadnieniem tym zajmował się Zgirski [44]. U człowieka wynosi ona ok. 132 000 daltonów [37, 44], u świni 130 000 daltonów [44], u bydła 128 000 daltonów [44], a u szczura 128 000 daltonów [29]. Od wielu lat kontrowersję budzi sprawa podjednostkowej budowy cząsteczki Cp. W 1963 r. zasugerowano istnienie 8 podjednostek połączonych wiązaniami 2-siarczkowymi, z których każda zawierałaby 1 atom miedzi [24]. Obecnie przyjmuje się, że cząsteczka Cp ma 1-łańcuchową budowę i jest to cechą ogólną dla różnych gatunków ssaków [44]. Uważa się, że otrzymywane dotychczas podjednostki były w rzeczywistości fragmentami proteolitycznej degradacji cząsteczki, powstałymi w trakcie przechowywania próbek krwi lub podczas procedury izolowania.

W pojedynczym łańcuchu ludzkiej Cp wyróżnić można 3 domeny o masach 67 000, 50 000 i 19 000 daltonów [12, 37]. Łańcuch ludzkiej Cp składa się z 1046 aminokwasów o ustalonej sekwencji [37]. Częsteczka Cp przyłącza od 6 do 8 atomów Cu [14]. Według Vanngarda (literatura w [14]) wyróżnić można 3 rodzaje jonów miedzi w cząsteczce Cp:

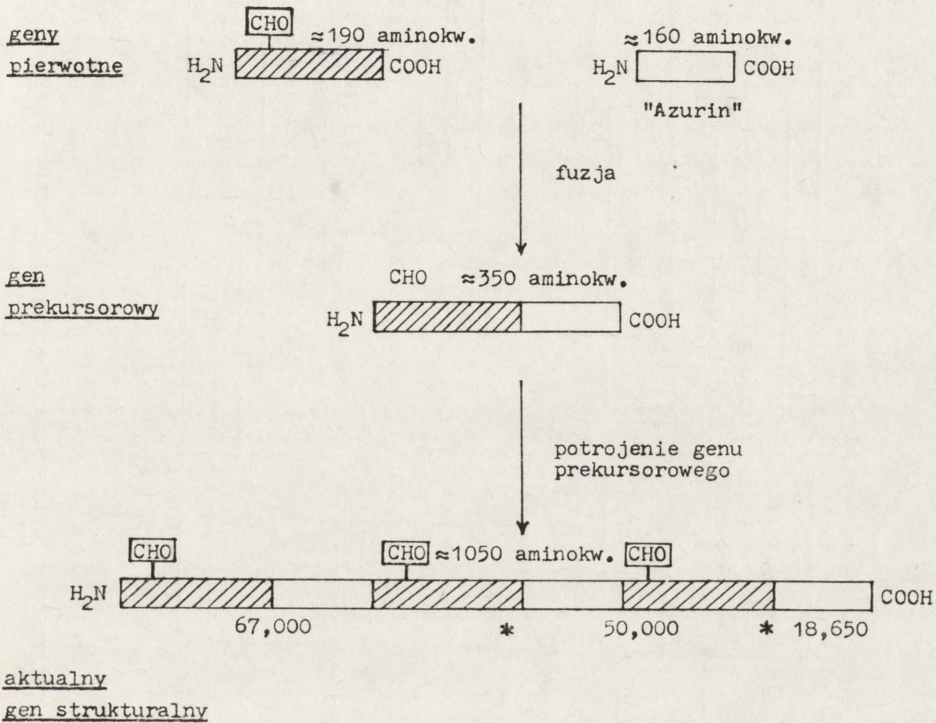
typ 1 — Cu^{+2} paramagnetyczny o maksimum absorpcji przy 610 nm, nadający niebieski kolor białku;

typ 2 — Cu^{+2} również paramagnetyczny, lecz bezbarwny;

typ 3 — Cu^{+2} nieparamagnetyczny, wykazujący absorpcję przy 330 nm.

SYNTEZA I WYDZIELANIE CERULOPLAZMINY

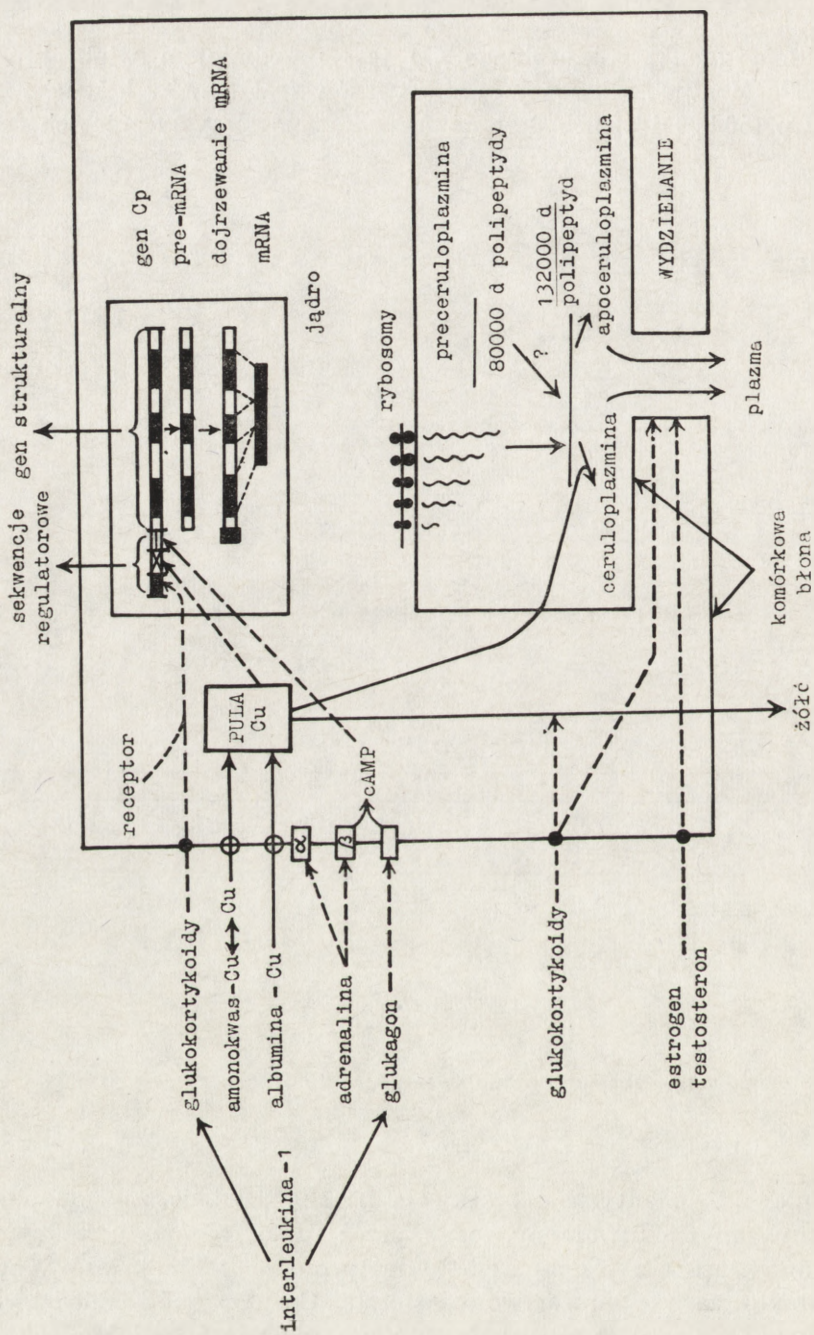
Ewolucja genu strukturalnego Cp jest przedmiotem wielu hipotez (ryc. 1). Porównując sekwencje aminokwasów fragmentów łańcucha cząsteczki Cp (50 000 i 19 000 daltonów), wykazano statystycznie ich ścisłą



* miejsca rozszczepień

Ryc. 1. Proponowany schemat ewolucji genu strukturalnego ceruloplazminy według Dwulet i wsp. [12]

homologię 43% identyczności sekwencji) [12]. Dlatego zakłada się, że pierwotny gen Cp utworzony został przez fuzję fragmentu kodującego 190 aminokwasów z fragmentem kodującym 160 aminokwasów, odpowiedzialnym za powinowactwo cząsteczki Cp do jonów miedzi, tzw. fragment „Azurin” [12]. Powstały gen prekursorowy, kodujący ok. 350 aminokwasów, uległ następnie potrojeniu, co nadało mu aktualną formę



Ryc. 2. Schemat parenchymalnej komórki wątroby oraz synteza i wydzielanie ceruloplazminy według Cousins [7]

genu strukturalnego kodującego około 1050 aminokwasów [37, 40]. Przyjmuje się, że ewolucyjne ukształtowanie genu strukturalnego Cp nastąpiło na etapie wykształcania przez kręgowce systemu naczyniowego oraz układu moczopłciowego dla zwielokrotnienia masy cząsteczkowej białka do co najmniej 60 000 daltonów i zabezpieczenia go w ten sposób przed wydaleniem poprzez nerki.

Synteza Cp zachodzi w parenchymalnych komórkach wątroby, na rybosomach siateczki śródplazmatycznej [7], (ryc. 2). Według Cousinsa każda z cząsteczek mRNA ulega translacji jednocześnie na 16-18 rybosomach. Cząsteczka Cp syntetyzowana jest jako prekursor o masie cząsteczkowej ok. 80 000 daltonów. Przybiera on ostateczną formę Cp o masie 132 000 daltonów [7]. Nieznane są jednak molekularne szczegóły tego procesu. Wiele czynników moduluje aktywację genu Cp, wpływając na intensywność syntezy białka (ryc. 2). Udowodniono m. in. wprzęgnięcie w ten proces glukokortykoidów, cyklicznego AMP (cAMP) i jonów miedzi. Również wydzielanie Cp jako pojedynczego łańcucha, zawierającego łańcuchy cukrowcowe, uwarunkowane jest wpływem glukokortykoidów, a także w mniejszym stopniu hormonów estrogennych i testosteronu. Analizując mechanizmy obserwowanej indukcji hormonalnej należy zwrócić uwagę na oczywistą zbieżność tych procesów z opisanym ostatnio u ludzi indukowaniem transkrypcji genu metalotioneiny przez glukokortykoidy i kadm (literatura w [35]). W przypadku genu struktury metalotioneiny (białko wiążące metale ciężkie w komórkach różnych organizmów eukariotycznych) zdołano fizycznie i funkcjonalnie oddzielić sekwencje DNA, warunkujące działanie glukokortykoidów i kadmu od sekwencji warunkujących inicjację transkrypcji. Opierając się na technikach inżynierii genetycznej udowodniono, że sekwencje te przyłączone w odległości przynajmniej 600 nukleotydów od heterologicznego promotora genu „tk”, niewrażliwego na działanie glukokortykoidów i kadmu, powodowały uwrażliwienie tego genu na działanie *in vivo* obu tych czynników. W omawianych badaniach po raz pierwszy wykazano eksperymentalnie, że w dystalnych regionach promotora genu komórek eukariotów istnieją sekwencje DNA wiążące *in vitro* receptor glukokortykoidów, których delecja znosi działanie *in vivo* glukokortykoidów na efektywność inicjacji transkrypcji, bez wpływu na prawidłowość tej inicjacji i podstawowy poziom transkrypcji oraz indukcję tej transkrypcji przez inne czynniki.

Brak jest dotychczas bezpośrednich molekularnych dowodów aktywacji genu Cp. Wydaje się jednak, że przykład genu metalotioneiny jest dobrym modelem strukturalnym i funkcjonalnym, wyjaśniającym indukowanie genu metaloprotein u eukariotów.

GENETYCZNY POLIMORFIZM CERULOPLAZMINY

Dziedziczną zmienność cech jakościowych, występującą w postaci nieciągłych różnic między fenotypami, określa się mianem genetycznego polimorfizmu. Genetyczne warianty białek identyfikowane są zwykle metodami elektroforetycznymi, a uwidoczniają się różnymi sposobami, np. poprzez barwienie histochemiczne, metodami enzymatycznymi, immunologicznymi itd.

Polimorficzną zmienność Cp w surowicy krwi wykazano zarówno u ludzi, jak i u wielu gatunków zwierząt udomowionych (tab. 1). Prze-

TABELA

Genetyczny polimorfizm ceruloplazminy u człowieka i u różnych gatunków zwierząt udomowionych

| Locus Cp | Liczba wariantów elektroforetycznych (alleli) | Liczba możliwych fenotypów genotypów) |
|-----------------------------|---|---------------------------------------|
| Człowiek | 3 | 6 |
| Bydło | 3 | 6 |
| Świnie | 2 | 3 |
| Konie | 2 | 3 |
| Psy | 2 | 3 |
| Zwierzęta futerkowe (norki) | 3 | 6 |
| Owce | monomorfizm | |
| Ptaki domowe (kaczki) | monomorfizm | |

jawia się ona występowaniem od 2 do 3 alleli kontrolowanych z jednego autosomalnego locus Cp. Na losowej próbie populacji różnicowanie to występuje w postaci odpowiednio od 3 do 6 fenotypów elektroforetycznych powstających z losowej kombinacji (segregacji) alleli Cp. Allele te nie pozostają względem siebie w jakimkolwiek związku dominowania lub recesywności. Są to tzw. allele kodominujące, stąd u danego osobnika fenotyp elektroforetyczny odzwierciedla wiernie genotyp, tj. skład alleli w locus Cp obydwu chromosomów homologicznych.

Przyjmuje się, że powodem występowania genetycznego polimorfizmu białek są mutacje punktowe typu tranzycji czy transwersji, polegające na zamianie jednej pary zasad DNA genu. W konsekwencji, w procesie translacji następuje podstawienie jednego aminokwasu w syntetyzowanym

łańcuchu, co — jak się przyjmuje — jest wystarczające do takiej zmiany fizykochemicznych właściwości białka (jego ładunku), iż ujawnić to można jako zmienione tempo migracji elektroforetycznej.

Jedyne, jak dotąd, informacje odnoszące się do molekularnych podstaw genetycznego polimorfizmu Cp dotyczą ludzi. Uzyskano je dzięki kompletnemu zsekwencjonowaniu w 1984 r. łańcucha Cp [37]. W łańcuchu ludzkiej Cp stwierdzono występowanie dwóch miejsc podstawienia aminokwasów. Występują one w domenach A_1 i A_1' i dotyczą pozycji 79 i 449, gdzie następować może zamiana lizyny na glicynę, co w konsekwencji może powodować zmianę ładunku cząsteczki. Stosunek liczbowy glicyny do lizyny dla obydwu wspomnianych miejsc podstawień szacowany jest na 20/80. Biorąc za podstawę ruchliwość elektroforetyczną wariantów ludzkiej Cp, z których CpB charakteryzuje się najwyższym ładunkiem i rozprzestrzenieniem w populacji, cytowani autorzy postulują, by obecność lizyny wiązać z wariantem CpB.

Wydaje się, że omawiane cechy pierwszorzędowej struktury Cp dobrze korespondują z obserwowanym w populacji ludzi występowaniem 3 alleli tego białka. Na podstawie uzyskanych wyników do przyjęcia byłoby założenie, że allelem typu dzikiego w locus Cp u ludzi jest allel CpB, który charakteryzowałby się obecnością lizyny w obydwu wyodrębnionych miejscach podstawień aminokwasów. Allele CpA i CpC byłyby jego mutantami, z których pierwszy powstałby w wyniku zamiany lizyny na glicynę w jednym z miejsc możliwego podstawienia, drugi zaś, spotykany niezwykle rzadko, charakteryzowałby się zastąpieniem lizyny przez glicynę w obydwu miejscach podstawienia.

Ewolucyjny sens występowania alternatywnych form genów, co w konsekwencji uwidacznia się występowaniem różnych wydań „tego samego białka”, jest przedmiotem wielu hipotez. W szczególności odnosi się to do postulowanej wyższości selekcyjnej lub neutralności przystosowawczej poszczególnych komponentów polimorfizmu, co wynikać miałyby ze zmiennej sprawności metabolicznej poszczególnych wariantów genetycznych białka. W odniesieniu do Cp brane są przede wszystkim pod uwagę potencjalne różnice w aktywności oksydacyjnej wariantów genetycznych.

W Polsce w przeprowadzonych do tej pory na dużą skalę badaniach tego zagadnienia u bydła [36] stwierdzono wysoce istotny wpływ polimorfizmu na aktywność oksydacyjną Cp osocza krwi. Najwyższą aktywność zanotowano u osobników o genotypach A/A i A/B, najniższą zaś u homozygot B/B. Wykazano ponadto, że aktywność oksydacyjna Cp charakteryzowała się statystycznie istotną dodatnią korelacją z poziomem miedzi w osoczu. Nie stwierdzono natomiast związku między aktywnością Cp i poziomem jonów Fe w osoczu.

CERULOPLAZMINA W ONTOGENEZIE U SSAKÓW

Zmienność poziomu Cp i jonów Cu została najlepiej poznana w ontogenezie człowieka i zwierząt modelowych. Synteza Cp u ludzi rozpoczyna się między 4 a 5 tygodniem ciąży w wątrobie płodowej [5]. W surowicy płodu Cp jest wykrywana od połowy 7 tygodnia, a od 27 tygodnia ciąży aż do urodzenia poziom Cp wzrasta [18]. Przy porodzie stężenie Cp w surowicy noworodka wynosi od 4,6 do 16,5 mg/100 ml, dla porównania stężenie Cp u dorosłego człowieka kształtuje się na poziomie 35 mg/100 ml surowicy [5]. Sugeruje się, że zmiany w poziomie jonów Cu i aktywności Cp w płynie owodniowym mogą być użytecznym wskaźnikiem szacowania wzrostu i rozwoju płodu. Mianowicie aktywność Cp w płynie owodniowym wykazuje znaczny wzrost od 20 do 30 tygodnia ciąży, a następnie obserwuje się jej istotny spadek [5]. Również od połowy ciąży aż do porodu obserwuje się tendencję spadkową poziomu jonów Cu [5].

Rola Cp i jonów Cu w procesach starzenia się organizmu pozostaje niewyjaśniona, dlatego problem ten jest przedmiotem wielu eksperymentów.

Wyniki badań Massie i wsp. [30] wskazują, że u zimbredowanych myszy poziom zarówno Cp, jak i ogólnej puli jonów Cu wzrasta z wiekiem. Uzyskane wyniki trudne są jednak do jednoznacznej interpretacji i właściwego zobiektywizowania. Obserwowane zmiany poziomu Cp i jonów Cu u starszych myszy mogą być spowodowane nasilającymi się wraz z wiekiem procesami katabolicznymi. Nie można równocześnie wykluczyć, że stwierdzone współzależności odzwierciedlają jedynie wzrost częstotliwości występowania trudnych do wykrycia przez eksperymentatora chorób degeneratywnych, pojawiających się u starszych osobników. W cytowanych badaniach stwierdzono ponadto, że obniżaniu wraz z wiekiem ulegał stosunek ogólnej puli jonów Cu do ceruloplazminy, co oznacza, że następował spadek poziomu jonów Cu nie związanych z Cp. Zakłada się, że obniżanie się wraz z wiekiem puli wolnych jonów Cu spowodowane jest zarówno wiązaniem ich przez Cp, jak i odkładaniem ich w różnych tkankach, np. mózg ([30], literatura). Analogiczne obserwacje, dotyczące współzależności poziomu Cp i jonów Cu w surowicy u ludzi w różnym wieku, są częstokroć rozbieżne i nie potwierdzają prawidłowości zarejestrowanych u zimbredowanych myszy. Na przykład Harman [20] i Herring [21] stwierdzili podwyższanie się wraz z wiekiem ludzi poziomu Cp i jonów Cu. Yunice [43] natomiast nie obserwował zmian poziomu Cp w surowicy ludzi, zanotował jedynie niewielki wzrost poziomu jonów Cu, lecz tylko w surowicy mężczyzn. Inni autorzy sugerują, że wraz z wiekiem występuje u ludzi spadek poziomu jonów Cu w surowicy ([30], literatura).

Generalnie uważa się, że rozbieżności wyników dotyczących zmiany poziomu Cp i jonów Cu u ludzi w różnym wieku spowodowane są zarówno niewielką liczbą próbek do badań, jak i trudnościami skompletowania reprezentatywnej próbki losowej, uwzględniającej jednorodność genetyczną i środowiskową osobników poddanych obserwacjom. Zasadność takiej interpretacji potwierdzałyby rezultaty dotyczące czynników środowiskowych, fizjologicznych i patologicznych, wpływających na zmiany poziomu Cp i jonów Cu w surowicy krwi. Do lepiej poznanych czynników warunkujących te zmiany zaliczyć można: ciężę, wysiłek fizyczny, palenie papierosów, chroniczną anemię, białaczkę, chorobę Hodgkina, deficyt żelaza, nadczynność tarczycy, zeszywniające zapalenie stawów, zawał mięśnia sercowego, miażdżycę, stwardnienie rozsiane, pelagrę, łuszczycę itd. ([30], literatura).

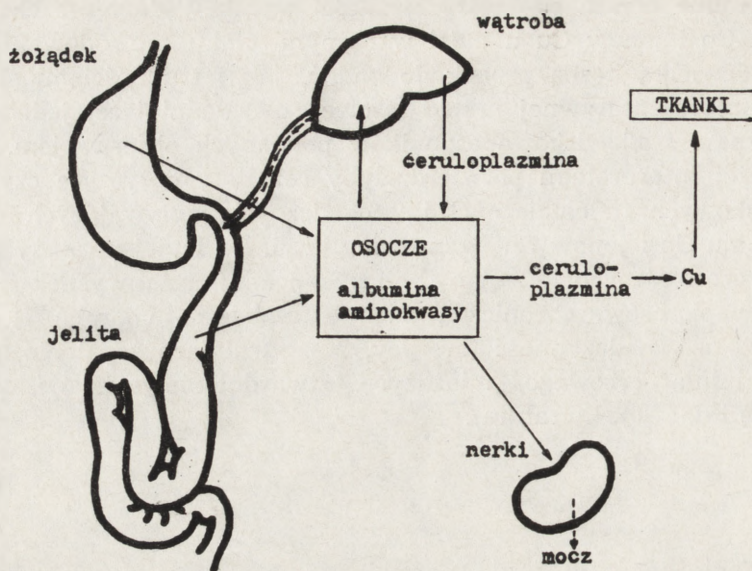
ZNACZENIE MIEDZI W ORGANIZMIE

Znaczenie jonów Cu dla normalnego wzrostu i rozwoju młodych organizmów oraz w utrzymaniu homeostazy wewnątrzustrojowej osobników dorosłych jest powszechnie akceptowane. Jony Cu są niezbędnym elementem wielu procesów życiowych, obejmujących m. in.: kształtowanie kośćca, rozwój systemu nerwowego i jego funkcjonowanie, pracę układu sercowo-naczyniowego, oddychanie komórkowe, biosyntezę prostaglandyn, metabolizm tkanki tłuszczowej itd. [38].

Ze względu na wysoką reaktywność jonów Cu, nadmierny ich poziom może upośledzać funkcje komórek. Jeżeli podaż jonów Cu przewyższa potrzeby fizjologiczne, to uruchamiane są wówczas mechanizmy adaptacyjne, zlokalizowane głównie w wątrobie oraz ścianie żołądka i jelita cienkiego u dorosłych zwierząt [13]. W jelicie cienkim u szczura wykazano np. istnienie dwóch frakcji białkowych (frakcja nisko- i wysokocząsteczkowa), wiążących jony Cu [23]. Działanie tych frakcji jest ściśle ukierunkowane. Pierwsza z nich wiąże jony Cu krążące w surowicy, natomiast druga magazynuje jony Cu zaabsorbowane z diety i wpływa na ich poziom w jelicie cienkim [23]. Sugeruje się, że w szczególności frakcja niskocząsteczkowa odpowiedzialna jest za mechanizm zapobiegający toksycznemu działaniu jonów Cu oraz utrzymuje stały ich poziom podczas szybkiego wzrostu i rozwoju organizmu.

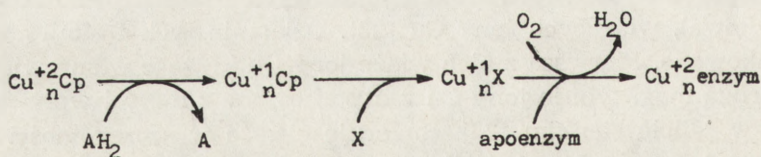
ROLA CERULOPLAZMINY W METABOLIZMIE JONÓW MIEDZI

Podstawowe aspekty metabolizmu jonów Cu u ssaków przedstawiono na ryc. 3. Jony Cu z diety absorbowane są z treści żołądka i jelita cienkiego. W postaci kompleksu z albuminą i prawdopodobnie aminokwa-



Ryc. 3. Metabolizm jonów miedzi

sami transportowane są do wątroby w celu magazynowania oraz syntezy Cp [7, 14]. Ceruloplasmina, jako główne białko surowicy kręgowców, transportujące jony Cu, jest najlepszym ich donatorem w biosyntezie oksydazy cytochromowej i innych enzymów mających w grupie prostetycznej jony Cu. Mechanizm umożliwiający uwalnianie jonów Cu z Cp w specyficznych miejscach komórek i włączanie ich do wewnątrzkomórkowych enzymów lub białek wiążących jony Cu przedstawiono na ryc. 4 [15]. Jeśli wspomniany proces zachodzi w błonach komórkowych, to jon Cu^{+1}



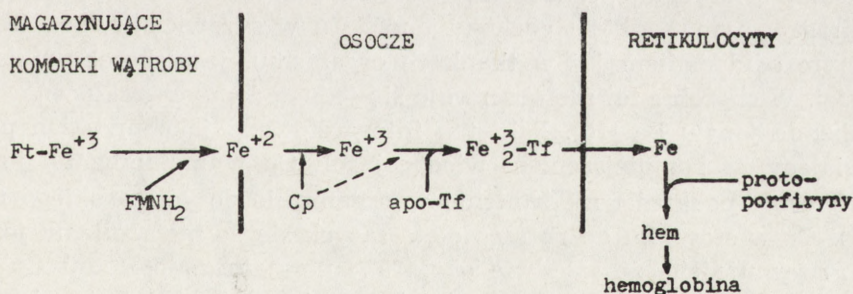
- X - międzykomórkowy receptor Cu^{+1}
n - liczba jonów Cu w cząsteczce Cp
 AH_2 - substrat redukujący

Ryc. 4. Przypuszczalny mechanizm uwalniania jonów Cu z ceruloplazminy i włączania ich do wewnątrzkomórkowych enzymów według Friedena [15]

przekazywany jest prawdopodobnie do międzykomórkowych akceptorów X. Jeżeli zaś Cp przechodzi do wnętrza komórki, to akceptor X może być zbędny w transporcie międzykomórkowym. W formie jonu Cu^{+1} miedź jest dodawana do apoenzymu, gdzie przy udziale O_2 tworzy holoenzym przybierając formę jonu Cu^{+2} . W omawianym procesie bezpośrednie włączanie do cząsteczki enzymu „stabilnego” jonu Cu^{+2} wydaje się mało prawdopodobne. Dlatego przyjmuje się istnienie przejściowej formy jonu Cu^{+1} , umożliwiającego zrealizowanie omawianego ciągu metabolicznego.

ROLA CERULOPLAZMINY W METABOLIZMIE JONÓW ŻELAZA

Współzależności w metabolizmie jonów Cu i Fe wykazano w wielu badaniach [11, 34, 41]. Wiadomo, że deficyt jonów Cu wywołany brakiem ich w diecie lub zaburzeniami syntezy Cp prowadzi do anemii u ludzi i zwierząt [34, 41]. Dlatego uważa się, że Cp stanowi centralne molekularne ogniwo metabolizmu jonów Cu i Fe. W mechanizmie tym funkcjonuje jako enzym ferooksydaza I [17, 28, 32, 40]. Choć właściwości Cp jako enzymu nie są jeszcze dokładnie poznane, to wiadomo jednak, że białko to bierze udział w utlenianiu jonów Fe^{+2} do Fe^{+3} . Ta duża aktywność utleniająca umożliwia uruchamianie jonów Fe z komórek wątroby i wbudowywanie ich w cząsteczkę transferyny (Tf). Na ryc. 5 przed-



- Cp - ceruloplazmina
- Ft - ferrytyna
- Tf - transferyna
- apo-Tf - apotransferyna

Ryc. 5. Etapy uwalniania jonów Fe z komórek wątroby do transferyny plazmy oraz transport ich retikulocytów dla syntezy hemu według Friedena [16]

stawiono mechanizm uwalniania jonów Fe z komórek wątroby i główną rolę Cp w tym procesie [16]. Jony Fe uwalniane są w wyniku redukcji ferrytyny w obecności bezpośredniego reduktora FMNH₂ i pośrednio NADH. Proces uwalniania jonów Fe⁺² i przekształcania w jony Fe⁺³, które wbudowywane są w cząsteczkę transferyny, kontroluje Cp [16]. Jony Fe związane z cząsteczkę Tf rozprowadzane są do komórek, przede wszystkim retikulocytów, gdzie wykorzystywane są do biosyntezy hemu. Williams [40] wskazuje na rozszerzone funkcje Cp w uruchamianiu jonów Fe. Jony Fe⁺², uwalniane z ferrytyny, wiązane są w specyficznych miejscach na błonach komórek retikuloendotelialnych. Cp i swoiste miejsca wiążące jony Fe oddziałują wzajemnie na siebie poprzez formę kompleksu Cp z jonem Fe⁺². Utlenianie jonów Fe⁺² i ich przenoszenie dokonuje się w wyniku wielu reakcji między czynnikami wiążącymi jony Fe.

Eksperymenty uzasadniające znaczenie Cp w metabolizmie jonów Cu i Fe oraz przedstawiające wzajemną korelację między nimi opisano w wielu pracach [28, 31, 32]. Jeśli np. u świni ma miejsce niedobór jonów Cu, to zmniejszenie puli jonów Fe w osoczu poprzedzone jest wyraźną redukcją poziomu Cp ([16], literatura). Podawana w małych dawkach Cp wywołuje ponowny wzrost poziomu jonów Fe w osoczu, czego nie obserwuje się przy podawaniu samych jonów Cu⁺², natomiast Cp szczura, która charakteryzuje się niezwykle niską aktywnością ferrooksydazową, nie wywołuje takiego efektu. Stąd można wnioskować, że poziom aktywności Cp jako ferrooksydazy zależny jest od gatunku zwierzęcia [16].

Jedną z najlepiej poznanych jednostek chorobowych, objawiających się drastycznym spadkiem poziomu jonów Cu w surowicy krwi, z jednoczesnym odkładaniem jej w tkankach organizmu, jest choroba Wilsona u ludzi. W chorobie tej nie obserwuje się jednak żadnych zakłóceń w metabolizmie jonów Fe [16]. Fakt ten interpretowano jako przykład przemawiający za pomniejszeniem wiodącej roli Cp w metabolizmie jonów Fe. Obecnie podkreśla się istnienie w organizmie dosyć wysokiego nadmiaru Cp w stosunku do potrzeb odnoszących się do metabolizmu jonów Fe. Przyjmuje się, że zaledwie około 5% normalnego poziomu Cp jest wystarczające do maksymalnego uruchomienia jonów Fe. Tak więc poziom Cp w surowicy musiałby obniżyć się do ekstremalnie niskich wartości, możliwych do wywołania jedynie doświadczalnie (np. przy dłuższym eliminowaniu Cu z diety), aby można było zaobserwować dostrzegalny efekt opóźnienia uruchamiania jonów Fe.

Nie wyklucza się możliwości istnienia również alternatywnych mechanizmów uwalniania jonów Fe. Wymienia się tu np. ferrooksydazę II, lecz szczegółowe aspekty jej zaangażowania w uruchamianiu jonów Fe są mniej znane niż ferrooksydazy I [14, 17, 40]. In vitro wyodrębniono wiele czynników, np.: cytryniany, dwuwęglany, fosforany, apotransfery-

nę, co do których sugeruje się mechanizm przyspieszający utlenianie jonów Fe^{+2} do Fe^{+3} , podobnie jak ma to miejsce przy udziale Cp [4].

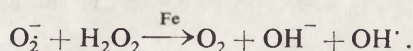
Biologiczna aktywność Cp nie ogranicza się jedynie do metabolizmu jonów Cu i Fe. Podkreśla się mianowicie aktywność oksydacyjną Cp, odnoszącą się do takich metabolitów organizmu, jak: biogenne aminy, adrenalina, serotonina, askorbiny i niektóre związki sulfhydrylowe [14, 38].

CERULOPLAZMINA JAKO BIAŁKO ALARMOWE W CHOROBYCH INFEKCYJNYCH I NEOPLASTYCZNYCH

Większość informacji dotyczących poziomu Cp w różnych stanach patologicznych odnosi się do ludzi i zwierząt modelowych. Cp jako białko ostrej fazy stanu zapalnego może być wskaźnikiem wielu chorób infekcyjnych i neoplastycznych. Przyjmuje się, że zmiany poziomu i aktywności Cp odzwierciedlają zaburzenia w metabolizmie organizmu. Istotny wzrost poziomu Cp obserwowano np. w niektórych ogólnoustrojowych chorobach u ludzi, takich jak pierwotnie postępujący gościec stawowy, toczeń rumieniowaty, a także w lokalnych stanach zapalnych, jak ścisza moczanowa czy reumatyczne stany zapalne [8, 9]. Ponadto wzrost poziomu Cp obserwowano w przewlekłym zapaleniu wątroby, marskości żółciowej [33], w infekcjach wirusowych, stresie [25] i wielu chorobach nowotworowych, np. chłoniaki, rak płuc itd. [2, 25, 27].

W eksperymentalnie wywoływanych stanach zapalnych wielokrotnie wskazywano na bardzo istotne podwyższenie poziomu Cp w surowicy. Taką tendencję obserwowano u różnych gatunków zwierząt niezależnie od tego, jakiego czynnika drażniącego używano do wywołania stanu zapalnego [3, 6, 10]. Wykazano, że w procesie leczenia środkami farmakologicznymi utrzymuje się podwyższony poziom Cp surowicy [10], co sugerowałoby istotną rolę Cp jako jednego z elementów mechanizmu obronnego przeciwko infekcji.

W uszkodzonych w wyniku stanu zapalnego tkankach wysięk zapalny zawiera fagocytyjące neutrofile i makrofagi, które uwalniają reaktywne formy tlenu, takie jak rodnik ponadtlenkowy (O^{-2}) i nadtlenek wodoru (H_2O_2). W reakcji Habera-Weissa ze związków tych w obecności soli Fe powstają wysokotoksyczne rodniki wodorotlenowe (OH^{\cdot}), które mogą uszkadzać wszystkie biocząsteczki ([42], literatura):



Zaangażowanie Cp w stanie zapalnym polegałoby m. in. na ochronie komórek gospodarza przed silnym toksycznym działaniem wspomnianych

wolnych rodników wodorotlenowych [19, 42]. Cp hamuje produkcję rodników OH^\cdot poprzez stałe utrzymywanie żelaza na stopniu utlenienia Fe^{+3} ([44], literatura). Biochemiczne aspekty ochronnej roli Cp omawiane są m. in. w pracy habilitacyjnej Zgirskiego [44] oraz w krótkiej pracy przeglądowej Kurdowskiej [26]. Regulacyjno-ochronne działanie Cp w stanie zapalnym znajduje odzwierciedlenie w zwiększonej syntezie tego białka w wątrobie i podwyższonym jego stężeniu w surowicy [8]. Postuluje się zatem, że białko to jest ważnym czynnikiem obronnym, przyczyniającym się do kontroli procesu zapalnego.

Z licznych prac wynika, że zwiększony poziom Cp w surowicy może być odzwierciedleniem toczącego się procesu nowotworowego. Udowodniono to m. in. na przykładzie raka płuc [2] i w chorobie Hodgkina [25, 27] u ludzi, w indukowaniu wirusem raka VX-2 u królików [39] oraz w indukowaniu 20-metylocholanem raka u szczurów [1]. Zaobserwowano, że przy farmakologicznym leczeniu nowotworów poziom Cp zmniejszał się, natomiast nawrotowi choroby towarzyszył istotny jego wzrost [25].

Interesujące wydają się próby zastosowania Cp w terapii nowotworowej. Wykazano na przykład, że ludzka Cp ma neutralizujący wpływ na toksohormonalną aktywność zasadowych białek izolowanych z komórek rakowych (Ehrlicha) [22]. Niezależnie od tego udowodniono bezpośrednio, antynowotworowe działanie ludzkiej Cp na implantowane komórki mysie mięsaka-180, co można tłumaczyć wspomnianym efektem neutralizowania toksohormonu wydzielanego przez komórki zmienione nowotworowo [22]. W wielu innych badaniach wykazano również znamieny wpływ Cp na zahamowanie wzrostu guzów nowotworowych różnych typów raka ([44], literatura). Wydaje się, że rezultaty te, chociaż wstępne, uzyskane na zwierzętach modelowych i odnoszące się jedynie do niektórych rodzajów nowotworów, są jednak dobrą inspiracją do szerszego zbadania możliwego wpływu Cp w terapii chorób neoplastycznych.

LITERATURA

- [1] ABREU L. A., ABREU R. R., Effect of cyclophosphamide on serum ceruloplasmin oxidase activity in sarcoma bearing rats, *Arch. Geschwulstforsch.*, **51**: 394-397, 1981.
- [2] ANDREWS G. S., Studies of plasma zinc, copper, caeruloplasmin, and growth hormone. With special reference to carcinoma of the bronchus, *J. Clin. Pathol.*, **32**: 325-333, 1979.
- [3] BIEGAŃSKI T., BLASIŃSKA M. Z., KUSCHE J., Determination of histaminase (diamine oxidase) activity by o-dianisine test interference of ceruloplasmin, *Agents and Actions*, **7**: 85-92, 1977.

- [4] CARVER F. J., FARB D. W., FRIEDEN E., The effect of albumin ceruloplasmin and other serum constituents on Fe(II) oxidation, *Biol. Tr. Elem. Res.*, **4**: 1-9, 1982.
- [5] CHAN W., RICHICHI J., GRIESMANN G. E., CUSHING W., KLING O. R., RENNERT O. M., Copper and ceruloplasmin activity in human amniotic fluid, *Am. J. Obstet. Gynecol.*, **138**: 257-259, 1980.
- [6] CONFORTI A., FRANCO L., MILANINO R., VELO G. P., Copper and ceruloplasmin (Cp) concentrations during the acute inflammatory process in the rat, *Agents and Actions*, **12**: 303-307, 1982.
- [7] COUSINS R. J., Absorption, transport, and hepatic metabolism of copper and zinc: Special reference to metallothionein and ceruloplasmin, *Phys. Rev.*, **65**: 238-307, 1985.
- [8] DENKO Ch. W., Protective role of ceruloplasmin in inflammation, *Agents and Actions*, **9**: 333-336, 1979.
- [9] DENKO CH. W., GABRIEL P., Serum proteins-transferrin, ceruloplasmin, albumin, α_1 -acid glycoprotein, α_1 -antitrypsin — in rheumatic disorders, *J. Rheumatol.*, **6**: 664-672, 1979.
- [10] DESHMUKH V. K., RAMAN P. H., DHULEY J. N., NAIK S. R., Role of ceruloplasmin in inflammation: increased serum ceruloplasmin levels during inflammatory conditions and its possible relationship with anti-inflammatory agents, *Pharmacol. Res. Communicat.*, **17**: 633-643, 1985.
- [11] DEUR C. J., STONE M. J., FRENKEL E. P., Trace metals in hematopoiesis, *Am. J. Hematol.*, **11**: 309-331, 1981.
- [12] DWULET F. E., PUTMAN F. W., Internal duplication and evolution of human ceruloplasmin, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **78**: 2805-2809, 1981.
- [13] EVANS G. W., Spurenelemente — Analytik, Umsatz, Bedarf Mangel und Toxicologie. Symposium in Bad Kissingen, Ed. E. Gladtko, G. Heimann, I. Eckert, Stuttgart 1977.
- [14] FRIEDEN E., HISIEH H. S., Ceruloplasmin: the copper transport protein with essential oxidase activity, [w] *Advances in enzymology and related areas of molecular biology*, Publ. by J. Wiley and Sons Inc., **44**: 187-235, 1976.
- [15] FRIEDEN E., Copper and iron metalloproteins, *TIBS*, 273-274, 1976.
- [16] — The copper connection, *Seminars in Hematology*, **20**: 114-117, 1983.
- [17] GARNIER A., TOSI L., STEINBUCH M., Ferroxidase II. The essential role of copper in enzymatic activity, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **98**: 66-71, 1981.
- [18] GITLIN D., BIASUCCI A., Development of γ G, γ A, γ N, β^{1c}/β^{1a} , C'1 esterase inhibitor, ceruloplasmin, transferrin, hemofuscin, hepatoglobulin, fibrinogen, plasminogen, α -1 antitrypsin, orosomucoid, β -lipoprotein, α -2 macroglobulin and prealbumin in the human conceptus, *J. Clin. Invest.*, **48**: 1433-1439, 1969.
- [19] GOLDSTEIN I. M., KAPLAN H. B., EDELSON H. S., WEISSMAN G., Ceruloplasmin: a scavenger of superoxide anion radicals, *J. Biol. Chem.*, **254**: 4040-4045, 1979.
- [20] HARMAN D., The free radical theory of aging: effect of age on serum copper levels, *J. Gerontol.*, **20**: 151-153, 1965.
- [21] HERRING W. B., LEAVELL B., PAIXAO L. M., YOE J. H., Trace metals in human plasma and red blood cells, *Amer. J. Clin. Nutr.*, **8**: 846-854, 1960.
- [22] ITOH O., TORIKAI T., SATOH, OKUMURA O., OSAWA T., Antitumor and toxohormone-neutralizing activities of human ceruloplasmin, *Gann*, **72**: 370-376, 1981.

- [23] JOHNSON W. T., EVANS G. W., Age-dependent variation of copper in tissue and proteins of neonatal rat small intestine, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **165**: 496-501, 1980.
- [24] KASPER C. B., DEUTSCH H. F., Physicochemical studies of human ceruloplasmin, *J. Biol. Chem.*, **238**: 2325-2339, 1963.
- [25] KOPRIVOVA H., DIENSTBIER Z., SAMEL M., FOLTYNOVA V., Ceruloplasmin in Hodgkin's disease, *Neoplasma*, **29**: 333-340, 1982.
- [26] KURDOWSKA A., BERETA J., Własności fizykochemiczne i funkcje biologiczne ceruloplazminy, *Zeszyty Naukowe Uniwersytetu Jagiellońskiego, Prace z Biologii Molekularnej*, **11**: 91-95, 1985.
- [27] LARSEN B., HERON I., THOROLING E. B., Elevated serum Cu in Hodgkin's disease and inhibitory effects of ceruloplasmin on lymphocyte response in vitro, *Europ. J. Cancer*, **16**: 415-421, 1980.
- [28] LEE G. R., NACHT S., LUKENS J. N., Iron metabolism in copper deficient swine, *J. Clin. Invest.*, **47**: 2058-2069, 1968.
- [29] MANOLIS A., COX D. W., Purification of rat ceruloplasmin: Characterization and comparison with human ceruloplasmin, *Preparative Biochemistry*, **10**: 121-132, 1980.
- [30] MASSIE H. R., COLACICCO J. R., AIELLO V. R., Changes with age in copper and ceruloplasmin in serum from humans and C 57BL/6J mice, *Age*, **2**: 97-101, 1979.
- [31] OWEN C. A., *Biochemical aspects of copper*, Noyes Publications, Park Ridge, New York 1982.
- [32] RAGAN H. A., NACHT S., LEE G. R., Effect ceruloplasmin on plasma iron in copper deficient swine, *Am. J. Physiol.*, **217**: 1320-1323, 1969.
- [33] RITLAND S., SKREDE S., JOHANSON O., A long-term follow-up study of the hepatic copper and serum ceruloplasmin concentrations in patients with chronic liver disease, *Scand. J. Gastroenterol.*, **17**: 545-551, 1982.
- [34] SHIMIZU M., Clinical results on the use of human ceruloplasmin in aplastic anemia, *Transfusion*, **19**: 742-748, 1979.
- [35] SOKÓŁ-MISIAK W., Sekwencje DNA niezbędne dla regulacji transkrypcji przez hormony glukokortykoidowe w komórkach eukariotycznych, *Postępy Biochemii*, **31**: 593-599, 1985.
- [36] STRAWIŃSKI J., Analiza zależności między polimorfizmem ceruloplazminy, jej aktywnością oksydacyjną oraz poziomem miedzi i żelaza w osoczu krwi u bydła, *Praca doktorska, ART, Olsztyn* 1979.
- [37] TAKAHASHI N., ORTEL T. L., PUTNAM F. W., Single-chain structure of human ceruloplasmin: The complete amino acid sequence of the whole molecule, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **81**: 390-394, 1984.
- [38] UNDERWOOD E. J., *Trace elements in human and animal nutrition*, Academic Press, New York 1977.
- [39] UNGAR-WARON H., GLUCKMAN A., TRAININ Z., The source of increased serum ceruloplasmin activity in rabbits bearing the VX-2 carcinoma, *J. Comp. Path.*, **92**: 331-336, 1982.
- [40] WILLIAMS D. M., LEE G. R., CARTWRIGHT G. E., Ferroxidase activity of rat ceruloplasmin, *Am. J. Phys.*, **227**: 1094-1097, 1974.
- [41] WILLIAMS D. M., KENNEDY F. S., GREEN B. G., Hepatic iron accumulation in copper deficient rats, *Brit. J. Nutr.*, **50**: 653-660, 1983.
- [42] WINYARD P., LUNEC J., BRAILSFORD S., BLAKE D., Action of free

radical generating systems upon the biological and immunological properties of caeruloplasmin, *Int. J. Biochem.*, **16**: 1273-1278, 1984.

- [43] YUNICE A. A., LINDEMAN R. D., CZERWIŃSKI A. W., CLARK M., Influence of age and sex on serum copper and ceruloplasmin levels, *J. Gerontol.*, **29**: 277-281, 1974.
- [44] ZGIRSKI A., Ceruloplazmina człowieka, świni i krowy. Stabilność i alternatywna droga działania, Praca habilitacyjna, Uniwersytet Łódzki, 1986.

Otrzymano: 13 marca 1987.

Przyjęto: 18 maja 1987.

Adres autorów: Jastrzębiec, 05-551 Mroków.

-
- GEORGE E. PALADE, *Editor*
Yale University School of Medicine
- BRUCE M. ALBERTS, *Associate Editor*
University of California, San Francisco
- JAMES A. SPUDICH, *Associate Editor*
Stanford University
-

CONTENTS

- ACTIVATION OF SEA URCHIN GAMETES, *James S. Trimmer and Victor D. Vacquier*
- CELL-MATRIX INTERACTIONS AND CELL ADHESION DURING DEVELOPMENT, *Peter Ekblom, Dietmar Vestweber, and Rolf Kemler*
- SPATIAL PROGRAMMING OF GENE EXPRESSION IN EARLY *DROSOPHILA* EMBRYOGENESIS, *Matthew P. Scott and Patrick H. O'Farrell*
- CELL ADHESION MOLECULES IN THE REGULATION OF ANIMAL FORM AND TISSUE PATTERN, *Gerald M. Edelman*
- CORE PARTICLE, FIBER, AND TRANSCRIPTIONALLY ACTIVE CHROMATIN STRUCTURE, *D. S. Pederson, F. Thoma, and R. T. Simpson*
- THE ROLE OF PROTEIN KINASE C IN TRANSMEMBRANE SIGNALLING, *Ushio Kikkawa and Yasutomi Nishizuka*
- PROTON-TRANSLOCATING ATPASES, *Qais Al-Awqati*
- REGION-SPECIFIC CELL ACTIVITIES IN AMPHIBIAN GASTRULATION, *John Gerhart and Ray Keller*
- T-CELL ACTIVATION, *H. Robson MacDonald and Markus Nabholz*
- ANCHORING AND BIOSYNTHESIS OF STALKED BRUSH BORDER MEMBRANE PROTEINS: Glycosidases and Peptidases of Enterocytes and Renal Tubuli, *Giorgio Semenza*
- COTRANSLATIONAL AND POSTTRANSLATIONAL PROTEIN TRANSLOCATION IN PROKARYOTIC SYSTEMS, *Catherine Lee and Jon Beckwith*
- THE DIRECTED MIGRATION OF EUKARYOTIC CELLS, *S. J. Singer and Abraham Kupfer*
- PROTEIN IMPORT INTO THE CELL NUCLEUS, *Colin Dingwall and Ronald A. Laskey*
- G PROTEINS: A FAMILY OF SIGNAL TRANSDUCERS. *Lubert Stryer and Henry R. Bourne*
- MICROTUBULE-ASSOCIATED PROTEINS, *J. B. Olmsted*
- STRUCTURE AND FUNCTION OF NUCLEAR AND CYTOPLASMIC RIBONUCLEOPROTEIN PARTICLES, *Gideon Dreyfuss*
- MECHANISM OF PROTEIN TRANSLOCATION ACROSS THE ENDOPLASMIC RETICULUM MEMBRANE, *Peter Walter and Vishwanath R. Lingappa*
- REGULATION OF THE SYNTHESIS AND ASSEMBLY OF CILIARY AND FLAGELLAR PROTEINS DURING REGENERATION, *Paul A. Lefebvre and Joel L. Rosenbaum*

INDEXES

NOWOTWORY EMBRYONALNE (TERATOCARCINOMA) JAKO MODEL DO BADAŃ RÓŻNICOWANIA ZARODKA *

TERATOCARCINOMA AS A MODEL SYSTEM FOR THE STUDY
OF EMBRYO CELL DIFFERENTIATION

Ewa T. MYSTKOWSKA

Pracownia Embriologii Doświadczalnej i Zakład Histologii i Embriologii,
Akademia Medyczna, Warszawa

Streszczenie: Przedstawiono powstawanie nowotworów embrionalnych (teratocarcinoma) myszy z komórek płciowych i komórek wczesnego zarodka, powstałego w wyniku zapłodnienia lub aktywacji partenogenetycznej oocyty. Przeanalizowano niektóre cechy zbliżające komórki macierzyste — embryonal carcinoma (EC) do komórek zarodka w okołimplantacyjnym stadium rozwoju. Scharakteryzowano potencję rozwojową komórek EC przejawiającą się w zdolności komórek EC niektórych linii do wzięcia udziału w rozwoju zarodkowym po wprowadzeniu do środowiska rozwijającego się zarodka.

Summary. The article presents formation of teratocarcinoma from germ cells, and the cells of early embryo, resulting from fertilization or parthenogenetic activation of oocyte. There have been analysed some characteristics linking stem cells of teratocarcinoma-embryonal carcinoma cells (EC) with embryo cells in periimplantation stage of development. The work gives characteristics of the development potential of EC cells revealed in the ability of EC cells of some lines to participate in embryo development after introducing EC cells into embryo environment.

WSTĘP

Nowotwory embrionalne — teratocarcinoma charakteryzują się obecnością puli niezróżnicowanych komórek — embryonal carcinoma (EC) oraz zróżnicowanych komórek i tkanek. Komórki EC odznaczają się dwoma podstawowymi cechami:

* Referat wygłoszony na XVI Konferencji Szkoleniowej z zakresu biologii komórki, 20 XI 1986 r.

wykazują zdolność do nieograniczonej proliferacji, co jest cechą specyficzną wszystkich nowotworów złośliwych;

są zdolne do różnicowania się w pochodne wszystkich trzech listków zarodkowych i mogą uczestniczyć w tworzeniu ciała osobnika normalnego po połączeniu z komórkami zarodka w przedimplantacyjnym stadium rozwoju.

Jeżeli w nowotworze nie ma komórek EC, to jest wtedy niezłośliwy i określa się go mianem teratoma. Komórki EC przypominają swoimi właściwościami morfologicznymi, biochemicznymi i fizjologicznymi komórki wczesnego zarodka. Komórki te różnicują się w sposób przypominający różnicowanie komórek zarodka we wczesnych etapach embriogenezy ssaków, dlatego w wielu laboratoriach są one wykorzystywane w badaniach embriologii eksperymentalnej [18, 20, 34, 35]. Równocześnie komórki EC mogą być wykorzystywane w badaniach rozwojowej regulacji złośliwego fenotypu [19].

POCHODZENIE KOMÓREK EMBRYONAL CARCINOMA

Znamy dwa źródła pochodzenia komórek EC: pierwotne komórki płciowe w jądrach płodowych oraz niezróżnicowane komórki zarodkowe.

POWSTAWANIE KOMÓREK EMBRYONAL CARCINOMA Z PIERWOTNYCH KOMÓREK PŁCIOWYCH

Nowotwory embrionalne mogą powstawać spontanicznie w jądrach płodowych u myszy w 12 dniu rozwoju [72]. W większości linii myszy teratocarcinoma jądrowe, spontaniczne występują rzadko, tylko w jednej linii 129/J przypadki guzów jądrowych zdarzają się z większą częstością, około 1% [69]. Częstość występowania nowotworów zwiększa się u myszy heterozygotycznych w odniesieniu do genu steel (Sl) lub w podliniach 129/J ter SV [76]. Wynika stąd, że predyspozycja do powstania spontanicznych nowotworów embrionalnych w jądrach jest u myszy uwarunkowana genetycznie. Jądrowe teratocarcinoma mogą być produkowane przez przeszczepienie płodowych gonad w miejsca ektopowe. Rozwój nowotworowy osiąga się tylko przeszczepiając gonady męskie, przeszczepione gonady z płodów żeńskich (presumptywne jajniki) nie dają początku nowotworom [73]. Tworzenie eksperymentalne nowotworów embrionalnych jest również uwarunkowane genetycznie, podobnie jak w przypadku teratocarcinoma spontanicznych, i ogranicza się do dwóch linii myszy 129/J i A/J. Stwierdzono, że w doświadczalnym tworzeniu tych nowotworów odgrywa rolę czynnik środowiskowy; tworze-

nie teratocarcinoma było obserwowane tylko wtedy, kiedy gonady płodowe były przeszczepiane w miejsca o obniżonej temperaturze w stosunku do całego ciała gospodarza, jak jądro lub ucho [74]. Powstawanie nowotworów embrionalnych zarówno spontaniczne, jak i indukowane eksperymentalnie jest ograniczone do 11-12 dnia rozwoju [71]. W trakcie normalnego rozwoju w jądrze (około 14 dnia rozwoju) pierwotne komórki płciowe rozpoczynają stadium spoczynkowe — stadium rozproszonej chromatyny, w którym pozostają aż do czasu rozpoczęcia mejozy, tj. do około 10 dnia po urodzeniu. W przypadku powstania nowotworów embrionalnych pierwotne komórki płciowe rozpoczynają proliferację jako komórki EC, bez przejścia etapu mejozy. Proliferacja komórek płciowych rozpoczyna się w paru punktach jądra. Powstają ośrodki dzielących się komórek niezróżnicowanych. Część z nich zaczyna się różnicować [71]. Tkanki zróżnicowane początkowo przypominają endodermę pierwotną wczesnego zarodka myszy, a w dalszym rozwoju pojawiają się tkanki charakterystyczne dla późniejszych etapów rozwoju zarodka i płodu.

POWSTAWANIE KOMÓREK EMBRYONAL CARCINOMA Z NIEZRÓZNICOWANYCH KOMÓREK ZARODKOWYCH

Teratocarcinoma mogą powstawać z niezróżnicowanych komórek zarodkowych — zarodków partenogenetycznych lub powstających w wyniku normalnego zapłodnienia. Znane są przypadki powstania nowotworów embrionalnych w jajnikach u ludzi i myszy. U myszy spontaniczne powstawanie tych nowotworów jest zjawiskiem równie rzadko występującym, jak powstawanie spontanicznych nowotworów jądrowych i ograniczonym genetycznie do jednej linii LT. W tej linii częściej niż w innych może nastąpić aktywacja partenogenetyczna oocytów, które zakończyły I podział mejotyczny [12] i które leżą w obrębie pęcherzyka jajnikowego [78]. Podobne pochodzenie teratocarcinoma jajnikowych z oocytów aktywowanych do rozwoju po zakończeniu I podziału mejotycznego stwierdził u kobiet Linder [29, 30]. Aktywowane partenogenetycznie oocyty rozwijają się podobnie jak normalny zarodek myszy, przechodząc bruzdkowanie, osiągają etap blastocysty, a następnie stadium rozwoju odpowiadające stadium 7 - 8-dniowego zarodka, w którym wyróżnić można ektodermę, mezodermę i endodermę. Po osiągnięciu tego etapu następuje dezorganizacja rozwoju i przekształcenie się tworów w nowotwór embrionalny [78].

Stevens [75] wykazał, że zarodki myszy przeszczepione w miejsca pozamaciczne mogą przekształcić się w teratocarcinoma. Powstanie nowotworów z przeszczepionych zarodków nie jest ograniczone genetycznie, ponadto zarówno zarodki żeńskie, jak i męskie mogą przekształcać

się w nowotwory embrionalne [68]. Powstanie eksperymentalnych nowotworów jest natomiast ograniczone przez stadium rozwoju przeszczepianych zarodków. Zdolność do przekształcania się w nowotwory embrionalne mają zarodki poczynając od stadium 3,5 dnia rozwoju, a kończąc na 7 dniu rozwoju [75]. Wczesny rozwój przeszczepionych zarodków przypomina rozwój spontanicznych nowotworów jajnikowych, ponieważ struktura przeszczepionego zarodka jest zdeorganizowana i powstają zróżnicowane tkanki charakterystyczne dla coraz bardziej zaawansowanych etapów rozwoju zarodkowego.

Diwan i Stevens [9] wykazali przez przeszczepianie izolowanych tkanek i zarodków 7-dniowych w miejsca pozamaciczne, że teratocarcinoma powstają z pierwotnej ektodermy zarodkowej cylindra zarodkowego. Można zastanawiać się, czy komórki EC nie powstają z pierwotnych komórek płciowych. Wydaje się, że jest to mało prawdopodobne. Dunn i Stevens [10] stwierdzili, że po przeszczepieniu 6-dniowych zarodków powstają nowotwory o kariotypie żeńskich i męskim, a jak wiadomo, po przeszczepieniu płodowych jajników nie powstają nowotwory embrionalne. Po przeszczepieniu zarodków starszych 8- i 9-dniowych w miejsca pozamaciczne nie uzyskuje się już rozwoju nowotworów. Badania pierwotnych komórek płciowych [48] wykazują, że komórki te pojawiają się w tylnej części smugi pierwotnej. Z doświadczeń Beddington [3], wynika, że ten rejon po przeszczepieniu w miejsca pozamaciczne nie wytwarza komórek EC. Zdolność do wytwarzania tych komórek jest zlokalizowana w przedniej części cylindra zarodkowego. Wydaje się wobec tego, że zarówno komórki EC, jak pierwotne komórki płciowe rozwijają się z komórek zarodkowej ektodermy, ale z różnych jej rejonów.

Ostatnio opracowano metodę otrzymywania komórek EC bezpośrednio z blastocyst eksplantowanych i hodowanych *in vitro* [13, 36]. Blastocysty muszą być jednak hodowane w obecności komórek odżywiających (feeder cells) [14]. Pozostaje niejasne, jaką rolę w powstaniu komórek EC pełnią komórki odżywiające, wiadomo jednak, że czynnik (i) w medium warunkowanym obecnością komórek odżywiających tzw. conditioned medium powoduje przewagę proliferacji nad różnicowaniem komórek [65, 59]. Wszystkie linie komórek EC dotychczas w ten sposób uzyskanych wykazują zdolność do różnicowania w warunkach *in vitro* i tworzenia teratocarcinoma *in vivo* [14].

WŁAŚCIWOŚCI KOMÓREK EMBRYONAL CARCINOMA

Teratocarcinoma myszy są guzami złośliwymi i charakteryzują się obecnością komórek pochodnych wszystkich trzech listków zarodkowych i komórek macierzystych — stem cells—niezróżnicowanych komórek EC.

Pojedyncza komórka EC może dać początek wszystkim zróżnicowanym typom komórek obserwowanych w nowotworach [28, 24]. Po przeszczepieniu rozizolowanych nowotworów zawierających komórki EC podskórnie w układzie syngenicznym można otrzymać przeszczepialną linię guzów litych [75]. Nowotwory mogą także występować w postaci wysiękowej po iniekcji dootrzewnowej komórek niezróżnicowanych, pobranych z guza litego [54]. Powstają twory zwane ciałami zarodkowymi (embryoid bodies) [70, 54]. Struktury te są tak nazwane, gdyż przypominają pewne stadia normalnego rozwoju zarodka. Ciała zarodkowe występują jako formy proste lub w postaci torbieli. Proste ciała zarodkowe stanowią lite twory składające się z puli niezróżnicowanych komórek otoczonych całkowicie przez zewnętrzną warstwę komórek przypominających komórki endodermalne. Twór ten przypomina węzeł zarodkowy blastocysty w okresie okołoimplantacyjnym, składający się z komórek ektodermy i endodermy pierwotnej, z tą jednak różnicą, że w prostych ciałach zarodkowych endoderma, która pokrywa pulę niezróżnicowanych komórek, ma charakter endodermy parietalnej, podczas gdy w zarodku jest to endoderma visceralna. Endoderma parietalna w zarodku wyścieła wewnątrz trofektodermy, wydzielając substancję tworzącą tzw. błonę Reicherta [55]. Przypuszczalnie ten typ endodermy otacza pulę niezróżnicowanych komórek w ciałach zarodkowych [34]. Różnice między zarodkiem a ciałem zarodkowym nie muszą być odzwierciedleniem głębszych wewnętrznych różnic. Po izolacji węzła zarodkowego z blastocysty i hodowli *in vitro* tworzy się naokoło ektodermy ciągłe pasmo komórek endodermalnych [60, 66], a niektóre z nich mogą być typu endodermy parietalnej [83].

Drugim typem ciał zarodkowych znajdujących w jamie otrzewnej są torbiele, które mają bardziej złożoną postać. Torbiele takie są wypełnione płynem i zawierają wiele zróżnicowanych typów komórek. Struktury te przypominają pochodne węzła zarodkowego, który uległ dezorganizacji w stadium 7-8 dnia rozwoju. Otoczone są również przez parietalną endoderme.

Hsu i Baskar [21] hodowali *in vitro* proste ciała zarodkowe z jamy otrzewnej i porównywali ich rozwój z rozwojem hodowanych *in vitro* blastocyst. Stwierdzono ściśle podobieństwo między wczesnym postimplantacyjnym rozwojem zarodka a tworzeniem się ciał zarodkowych w postaci torbieli z prostych ciał zarodkowych. Ogromne podobieństwo różnicowania się komórek EC i wczesnego zarodka wykazano ostatnio po pasażowaniu *in vivo* komórek EC linii izolowanej z guza OTT 6050 [86]. Stwierdzono, że w 35% ciał zarodkowych otrzymanych po pasażowaniu dootrzewnowym komórek tej linii powstaje jama otoczona przez wydłużone komórki układające się w postaci zarodkowej ektodermy, otoczo-

nych przez pasmo komórek endodermalnych. W niektórych szczególnie rozróżnionych ciałach zarodkowych część ektodermy tworzy region przypominający smugę pierwotną, z której oddzielają się komórki przypominające komórki mezodermy gromadzące się w przestrzeni między ektodermą i endodermą mającą charakter endodermy wisceralnej. Twór ten przypomina zarodek w stadium smugi pierwotnej. Fakt podobnego różnicowania się wskazuje na podobieństwo między pulą komórek niezróżnicowanych w ciałach zarodkowych i pluripotentnymi komórkami zarodka.

WŁAŚCIWOŚCI KOMÓREK EC W WARUNKACH HODOWLI IN VITRO

Pluripotentne komórki macierzyste mogą być izolowane albo z litych guzów, albo z guzów wysiękowych. Izolacja z guzów wysiękowych jest najłatwiejsza, ponieważ niezróżnicowane komórki stanowią większość całej populacji komórek i znana jest ich lokalizacja. Wykazano, że zdolność komórek EC do tworzenia zróżnicowanych guzów jest zachowana po ich klonowaniu i hodowli in vitro [26, 58]. Wyizolowano dotychczas wiele linii EC hodowanych in vitro [33, 18]. Komórki niektórych linii są pluripotentne i mogą różnicować się zarówno in vivo, jak in vitro w niemal każdy typ komórek pochodzących z trzech listków zarodkowych, podczas gdy komórki innych linii mają ograniczone zdolności do różnicowania i proliferując odtwarzają tylko komórki sobie podobne. Pierwsze nazywamy komórkami (liniami) pluripotentnymi, drugie zaś nullipotentnymi. Najlepiej znanym przykładem komórek nullipotentnych jest linia F9 opisana po raz pierwszy przez Bernstina i współautorów [4]. W pewnych warunkach komórki tej linii mogą różnicować się tworząc komórki endodermy [64].

Komórki EC mają małe rozmiary i morfologicznie przypominają komórki nabłonkowe. Komórki ściśle przylegają do siebie, ale można je rozdzielić przez pipetowanie. Komórki są morfologicznie niezróżnicowane [8] i wykazują aktywność fosfatazy zasadowej [4]. W mikroskopie elektronowym komórki EC mają mało cytoplazmy zawierającej małą liczbę organelli i nie wykazują obecności cząstek wirusowych. Duże jądro zawiera jedno lub dwa jąderka. Komórki EC hodowane in vitro w zawieszynie mają tendencję do tworzenia agregatów, które po pewnym czasie tworzą ciała zarodkowe przypominające zarodek we wczesnym etapie rozwoju [39, 31].

EMBRIONALNE ANTYGENY POWIERZCHNIOWE

Na powierzchni komórek EC znajdują się antygeny [11], które w większości przypadków są wspólne dla komórek EC i komórek zarodka we wczesnych etapach rozwoju zarodkowego. Antygeny te nie występują na

komórkach dorosłego osobnika i komórkach EC, które uległy różnicowaniu ([23, 16]: przegląd piśmiennictwa). Najbardziej znanym antygenem obecnym zarówno na komórkach zarodka, jak i komórkach EC jest antygen F9. Jest to antygen obecny na powierzchni wszystkich komórek EC dotychczas testowanych zarówno nullipotentnych, jak i pluripotentnych [2]. Na powierzchni komórek zarodka stwierdza się aktywność antygeny F9, począwszy od stadium zygoty, parę godzin po zapłodnieniu. Aktywność wzrasta w stadium 4 - 8 blastomerów i utrzymuje się na powierzchni komórek zarodka do 9 dnia rozwoju. Począwszy od 10 dnia rozwoju komórki zarodkowe nie wykazują już obecności antygeny F9 [2, 23]. Obecność antygeny F9 jest determinowana u myszy przez gen usytuowany w T-locus [1]. Istnieją dowody na to, że produkt lub produkty aktywności genu odpowiedzialnego za obecność antygeny F9 mogą odgrywać rolę we wczesnym rozwoju. Kemler i wsp. [27] stwierdzili, że tzw. fragmenty Fab króliczej immunoglobuliny anty F9 mogą odwracalnie hamować brudzkowanie zarodków i powstawanie blastocyst.

Antygen powierzchniowy PCC4 wykrywany jest na powierzchni komórek EC linii pluripotentnych i komórek węzła zarodkowego blastocysty [23]. Antygeny Forssmana i SSEA-1 (stage specific embryonic antygen-1) [88, 67] są wykrywane na powierzchni komórek EC większości linii. Zarówno antygen Forssmana, jak i antygen SSEA-1 są obecne na powierzchni komórek zarodka myszy w przedimplantacyjnym i okołimplantacyjnym stadium rozwoju [87, 67].

Na powierzchni komórek EC, oprócz antygenów, występują jeszcze inne znaczniki powierzchni komórek, które są wykrywane przy użyciu lektyn. Są one również wspólne dla komórek EC i komórek wczesnego zarodka [63].

INAKTYWACJA CHROMOSOMU X

W komórkach somatycznych osobnika żeńskiego ssaków jeden z dwóch chromosomów X jest genetycznie nieaktywny [32]. Inaktywacja chromosomu X, następująca w rozwoju zarodkowym, wiąże się z różnicowaniem komórkowym [46]. Proces ten występuje najwcześniej w trofektodermie — pierwszej różnicującej się w rozwoju tkance, następnie obejmuje pierwotną endoderme, a w końcu komórki ektodermy zarodkowej, co następuje około 6 dnia rozwoju myszy (przed utworzeniem smugi pierwotnej) [47, 56, 84]. Ponieważ inaktywacja chromosomu X wiąże się z procesem różnicowania komórek, należy więc spodziewać się, że niezróżnicowane komórki EC będą wykazywały aktywność genetyczną obu chromosomów X. Martin i wsp. [37] wykazali, że komórki EC wszystkich testowanych przez nich linii o kariotypie żeńskim wykazywały

aktywność obu chromosomów X₁ do momentu zróżnicowania, co powodowało inaktywację jednego z chromosomów. Opisano jedną linię genetycznie żeńskich komórek EC, wykazującą aktywność tylko jednego chromosomu X [40]. Różnice między liniami mogą być związane z różnicą w stadium rozwoju komórek prekursorowych EC w obu liniach używanych do doświadczeń. Komórki EC, w których były aktywne genetycznie oba chromosomy X [37], pochodziły ze spontanicznego nowotworu jajnikowego, podczas gdy linie komórkowe o aktywnym genetycznie tylko jednym chromosomie X [40] pochodziły z teratocarcinoma powstałego przez przeszczepienie 6,5-dniowego zarodka, w którym mogła już nastąpić inaktywacja chromosomu X.

ZDOLNOŚĆ KOMÓREK EC DO WZIĘCIA UDZIAŁU W ROZWOJU ZARODKOWYM

Komórki EC wprowadzone do środowiska rozwijającego się zarodka mogą zachowywać się jak normalne komórki zarodkowe i brać udział w embriogenezie. Łączenie komórek EC z komórkami zarodka dokonuje się podobnie jak łączenie dwóch genetycznie różnych zarodków dla utworzenia osobnika chimerowego. Są znane dwie metody otrzymywania chimer pochodzących z dwóch genetycznie różnych zarodków. Pierwsza polega na agregacji dwóch zarodków w stadium moruli [85, 41], druga zaś na mikrochirurgicznym wszczepieniu komórek EC do jamy blastocysty [17]. Powstałe chimerowe blastocysty mogą być przeszczepiane do macicy bioreczni w ciąży rzekomej (samicy, która została pokryta sterylnym samcem), gdzie rozwijać się mogą do urodzenia. Obie techniki były stosowane do łączenia komórek EC z komórkami zarodka i w wyniku licznych przeprowadzonych doświadczeń otrzymano chimery, w których ciele były reprezentowane zarówno komórki pochodzące z komórek EC, jak i z zarodka [5, 45, 52, 79, 80]. Komórki EC łączone z komórkami zarodka pochodziły z linii hodowanych *in vivo* oraz *in vitro* [53].

Pochodne komórek EC mogą brać udział w tworzeniu wszystkich tkanek osobnika chimerowego, a nawet tworzyć komórki tych narządów, których nigdy nie obserwowano w trakcie różnicowania komórek EC w nowotworach, tzn. wątroby, nerki i grasicy [77, 44]. Komórki EC dawały początek komórkom w pełni funkcjonalnym, tzn. syntetyzującym specyficzne dla danej tkanki produkty, np. immunoglobuliny, białka wątroby, hemoglobina [45], a także mogły dawać początek komórkom płciowym [81].

Próby otrzymywania osobników chimerowych były przeprowadzane w wielu laboratoriach z różną efektywnością, zależną od linii komórek

EC użytych do łączenia z zarodkiem. Do 1983 r. otrzymano 477 osobników chimerowych na 3076 przeszczepionych do bioreczeni blastocyst chimerowych, co stanowi 16% (za Papaioannou i Rossant [53]). Efektywność tych doświadczeń jest niska w porównaniu z efektywnością otrzymywania osobników chimerowych przez iniekcję węzła zarodkowego jednej blastocysty do jamy drugiej blastocysty. W eksperymentach tych otrzymuje się 90-100% chimer [50]. Rozwój osobników chimerowych, powstałych przez połączenie dwóch zarodków, jest na ogół normalny, podczas gdy osobniki powstałe przez kombinację zarodka z komórkami EC przeważnie wykazują wady rozwojowe i obecność nowotworów.

Różne linie komórek EC wykazują różne zdolności do włączania się w tok embriogenezy. Można wyróżnić kilka możliwych sposobów zachowania się komórek EC w środowisku zarodka.

1. Komórki EC nie uczestniczą w rozwoju i są eliminowane, np. linie R/5, F1/9, 1009 [53].

2. Zachowują swój złośliwy fenotyp, a więc zdolność do nieograniczonej proliferacji, bez zdolności do różnicowania. Powstałe osobniki mają nowotwory (np. linia C17) [51, 52].

3. Część komórek pochodnych EC zachowuje zdolność do nieograniczonej proliferacji, a część wykazuje zdolność do różnicowania. Powstają osobniki chimerowe z nowotworami (np. linia P19S18) [61].

4. Komórki EC pod wpływem środowiska zarodka uzyskują zdolność do różnicowania. Powstają osobniki chimerowe bez nowotworów (np. linie METT 1 i OTT6050) [22, 81].

Na uwagę zasługuje fakt, że komórki EC, które pod wpływem środowiska zarodka osiągnęły zdolność do różnicowania, pochodziły z linii hodowanych zarówno *in vivo*, jak i *in vitro*. Wśród otrzymanych normalnych osobników były chimery odznaczające się chimeryzmem komórek płciowych. Otrzymano je łącząc z zarodkiem komórki EC z linii METT 1, OTT6050 i LT72484-395. Pierwsza z linii była hodowana *in vitro*, a dwie następne były retransplantowane *in vivo* [22, 42, 44, 7].

Komórki EC niektórych linii po przeszczepieniu do zarodka nie poddają się działaniu środowiska zarodkowego i mogą zachować zdolność do nieograniczonej proliferacji. W większości linii są to przypadki rzadkie — około 20% analizowanych osobników chimerowych. Są jednak linie, w których częstość występowania osobników z nowotworami jest większa, np. po wprowadzeniu komórek EC linii C17 do blastocysty u 8 chimer na 13 otrzymanych występowały nowotwory. Częstość występowania nowotworów nie wiąże się z warunkami hodowli komórek EC użytych do tworzenia chimer. Nowotwory występują u osobników, u których komórki EC pochodziły z hodowli zarówno *in vitro*, jak i *in vivo*. Zdolność lub niezdolność do normalizacji złośliwego fenotypu wydaje się we-

wnętrzną właściwością poszczególnych linii komórek EC, co może wpływać z niezdolności tych komórek do właściwej odpowiedzi na działanie środowiska zarodkowego.

Nowotwory obserwowane u chimer zwykle składają się z komórek EC, albo oprócz komórek niezróżnicowanych występują zróżnicowane tkanki. Analiza enzymów w tkankach nowotworów wykazała obecność zarówno komórek pochodzących z EC, jak i z komórek zarodka. Wiadomo jednak, że komórki złośliwe, wchodzące w skład nowotworu, pochodzą z komórek pochodnych EC [22]. Prawie połowa zwierząt z nowotworami miała tkanki, w których pochodne komórek EC różnicowały się normalnie. Początkowo sądzono, że środowisko blastocysty może kontrolować czy powodować różnicowanie tylko określonej liczby komórek; jeżeli komórek jest więcej, wtedy mogą one wymykać się spod kontroli środowiska zarodka i utrzymują zdolność do nieograniczonej proliferacji [49]. Stwierdzono jednak, że po wprowadzeniu do blastocysty pojedynczej komórki EC może powstać osobnik wykazujący chimeryzm tkanek z rozwiniętym nowotworem, a więc pojedyncza komórka EC może dać początek zarówno populacji komórek normalnie różnicujących się, jak i populacji komórek złośliwych [61]. Świadczy to o tym, że powstanie osobnika chimerowego z nowotworem nie musi być wynikiem wprowadzenia do zarodka niejednorodnej populacji komórek EC. Pozostaje otwarte zagadnienie, czy nowotwór powstał z komórek, które nie poddały się normalizującemu wpływowi środowiska zarodka i zachowały swój złośliwy fenotyp przez okres rozwoju płodowego, czy też różnicowały się normalnie, a wtórnie wróciły do swego złośliwego fenotypu.

Powstanie osobnika wykazującego chimeryzm tkanek z nowotworem po wprowadzeniu jednej komórki EC do blastocysty wskazuje, że decyzja zachowania zdolności do nieograniczonej proliferacji lub rozpoczęcia różnicowania była podjęta nie wcześniej niż po jednym przynajmniej podziale komórki EC w obrębie blastocysty. Może to sugerować, że proces powrotu do fenotypu normalnego czy uzyskanie zdolności do różnicowania jest procesem trwającym przez pewien czas lub może nawet parę cykli komórkowych, przy czym z nieznanых powodów niektóre komórki mogą osiągać wcześniej zdolność do różnicowania, a inne później lub wcale. Aby uzyskać różnicowanie komórek EC pod wpływem chemicznego induktora, jakim jest kwas retinoidowy w warunkach *in vitro* [82], konieczne jest działanie tego induktora przez przynajmniej 48 h, tzn. więcej niż jeden cykl komórkowy [57]. Do określenia czasu potrzebnego na różnicowanie komórek EC pod wpływem środowiska zarodka wykonano następujące eksperymenty. Agregowano komórki EC z 8-blastomerym zarodkiem. Agregat komórek hodowano *in vitro*. Z powstałej chi-

merowej blastocysty izolowano węzeł zarodkowy po różnym czasie hodowli zarodka (od 2 do 4 dni hodowli *in vitro*). Węzeł zarodkowy hodowano w warunkach umożliwiających implantację *in vitro*. W miejscu implantacji oceniano częstość występowania miejsc charakteryzujących się rozrostem komórek EC [89]. Stwierdzono, że im dłuższy okres, w którym komórki EC były poddane działaniu komórek zarodkowych, tym rzadziej występowały zgrupowania komórek o złośliwym fenotypie. Po dwóch dniach hodowli zarodka, w miejscu implantacji izolowanego węzła zarodkowego zawsze dochodziło do rozrostu komórek nowotworowych, podczas gdy po 4-dniowej hodowli zarodka chimerowego komórki niezdolne do różnicowania pojawiały się tylko w 9% przypadków. Można wobec tego wysnuć wniosek, że regulacja złośliwego fenotypu zachodzi stopniowo i nie jednocześnie we wszystkich komórkach. W tej samej pracy stwierdzono, że komórki EC, które pod wpływem komórek zarodkowych straciły zdolność do nieograniczonej proliferacji i nabyły zdolności do różnicowania, zachowują pewne właściwości komórek nowotworowych, odznaczają się mianowicie szybszym tempem proliferacji niż komórki zarodka, co może świadczyć o niekompletnej regulacji złośliwego fenotypu [89].

W materiale chimer — płodów badanych w połowie ciąży, wiele osobników jest obarczonych wadami rozwojowymi. Wady rozwojowe są różne, począwszy od braku upostaciowanego zarodka poprzez wady cewy nerwowej aż do powstania osobnika morfologicznie normalnego, ale opóźnionego znacznie w rozwoju [61, 15]. Przy użyciu do tworzenia chimer komórek EC niektórych linii wady występują szczególnie często. Z 19 linii komórek EC przeszczepionych do zarodka, 9 nie dawało wad rozwojowych, ale 3 z nich nie włączało się w tok rozwoju zarodkowego, a 6 dawało bardzo niski procent chimeryzmu, który był obserwowany głównie w tkankach pozazarodkowych. Chimery powstałe po połączeniu z zarodkiem komórek EC pozostałych 10 linii miały wady rozwojowe. Na 1471 płodów znalezionych w połowie ciąży po przeszczepieniu blastocyst chimerowych 280 osobników było chimerami, z czego 157 (56%) płodów było opóźnionych w rozwoju lub z wadami rozwojowymi ([53]: przegląd piśmiennictwa). Częstość występowania nienormalności i ich stopień korelują w niektórych liniach z procentem chimeryzmu osobnika [15], ale w innych liniach duży udział komórek, pochodnych EC w ciele chimery, nie łączy się z powstawaniem wad rozwojowych [53]. Fuji i Martin [15] wykonały kontrolne badania rozwoju chimer powstałych przez połączenie zarodków w różnym stadium rozwoju, a więc agregowano morulę z morulą, morulę z węzłem zarodkowym i morulę z komórkami ektodermy zarodkowej. Okazało się, że im większa różnica w stadium rozwoju łączonych zarodków, tym większy procent chimer

z wadami rozwojowymi. Doświadczenia te mogą sugerować, że częste powstawanie chimer z wadami rozwojowymi wtedy, kiedy komórki EC pochodzą z jednej linii, a brak wad wtedy, kiedy pochodzą z innej linii, może wiązać się z różnicą w stadium rozwoju komórek prekursorowych obu tych linii. Oznaczać to może, że komórki EC, które po połączeniu z zarodkiem dają chimery bez wad rozwojowych, mogą rozwijać się z komórek prekursorowych mniej zaawansowanych w rozwoju niż komórki EC, które po kombinacji z zarodkiem dają osobniki z wadami.

RÓŻNICE W POTENCJI ROZWOJOWEJ KOMÓREK EC RÓŻNYCH LINII

Przytoczone dane sugerują, że różnice w potencji rozwojowej komórek EC różnych linii mogą wynikać z różnic w stopniu zaawansowania komórek prekursorowych poszczególnych linii EC, jeżeli przyjmiemy, że decyzja o rozpoczęciu niekontrolowanej proliferacji, bez możliwości różnicowania, może być podjęta przez komórki zarodka w różnym stadium rozwoju embrionalnego. Istnieją dane potwierdzające tę hipotezę. Cechą upodabniającą komórki EC większości linii do komórek pierwotnej ektodermy wężła zarodkowego jest zdolność do tworzenia pierwotnej endodermy na powierzchni agregatów komórek EC. Wiadomo, że w miarę postępującego rozwoju zarodka wygasa zdolność do odtwarzania endodermy pierwotnej przez komórki ektodermy pierwotnej [62]. Wiadomo również, że nie wszystkie linie pluripotenne komórek EC mają zdolność do tworzenia endodermy pierwotnej na powierzchni agregatów. Na przykład komórki linii PSA-1 tworzą z reguły endodermę pierwotną [38]. Linia ta pochodzi z 3,5-dniowego zarodka, podczas gdy komórki linii P19, pochodzącej z zarodka 7,5-dniowego, nie odtwarzają endodermy [25]. Danych przemawiających za istnieniem różnic w stopniu zaawansowania w rozwoju komórek prekursorowych różnych linii EC jest więcej. Komórki niektórych linii stopniem metylacji powtarzających się odcinków DNA przypominają komórki zarodka 7,5-dniowego, podczas gdy stopień metylacji DNA komórek innych linii jest taki sam jak w oocyocie ([62]: przegląd piśmiennictwa). Większość linii komórek EC myszy, podobnie jak komórki późnego wężła zarodkowego, nie jest zdolna do tworzenia trofektodermy; są jednak doniesienia o utworzeniu komórek trofoblastycznych olbrzymich przez jedną linię komórek EC [14]. Komórki EC linii P10 pochodzącej z zarodka 7,5-dniowego po przeszczepieniu do blastocysty nie kolonizują pochodnych pierwotnej endodermy w powstałych chimerach [62], podczas gdy komórki EC linii PSA 4, pochodzącej z 3,5-dniowej blastocysty, wchodzi w skład tkanek pochodnych pierwotnej endodermy [80]. Różne linie komórek EC charakteryzują się różną kompozycją strukturalnych lipidów błony cytoplazmatycznej [6]. Au-

torki pracy [6] sugerują, że linie komórek EC odznaczające się obecnością krótkich łańcuchów gangliozydowych, przypominają wcześniejsze stadium rozwoju zarodkowego, podczas gdy komórki EC o dłuższych łańcuchach gangliozydowych są zbliżone do komórek zarodka w późniejszych stadiach rozwoju.

Ten krótki przegląd właściwości komórek EC wskazuje, że chociaż w zarodku można wyróżnić wiele typów pluripotentnych, komórek, pozostaje ciągle niejasne, czy komórki EC można porównać do jakiegoś jednego szczególnego typu komórek zarodkowych, w określonym stadium rozwoju. Między komórkami EC i zarodka występują znaczne różnice, które mogą być jednak spowodowane przez działanie wtórne czynników takich jak warunki hodowli lub stopień normalności kariotypu. Komórki EC nie są zdolne do samodzielnego kontrolowania normalnego rozwoju po przeszczepieniu do pęcherzyka trofoblastycznego bez węzła zarodkowego [43], niektóre linie mają jednak zdolność do rozpoczęcia różnicowania i wzięcia udziału w embriogenezie w środowisku normalnego zarodka. Pluripotentne komórki zarodka charakteryzują się powtarzalnym wzorcem proliferacji i różnicowania w czasie rozwoju zarodkowego, podczas gdy komórki EC cechuje możliwość nieograniczonej proliferacji. Złośliwość komórek EC albo może być spowodowana autonomiczną niezdolnością tych komórek do różnicowania, albo ich proliferacja jest niezależna od egzogennych czynników (czynników wzrostu), które w normalnym rozwoju kontrolują stopień ekspansji populacyjnej. Spośród dwóch hipotez dotyczących pochodzenia komórek EC, pierwsza mówi, że pula komórek niezróżnicowanych powstaje w wyniku trwałej, ale odwracalnej zmiany w ekspresji genów w populacji normalnych pluripotentnych komórek. Takie „transformowane” komórki kontynuują proliferację w stanie niezróżnicowanym, ponieważ zaszły w nich nowotworowe zmiany redukują zdolność do odpowiedzi na normalny sygnał do różnicowania [43]. Druga hipoteza mówi, że komórki EC nie podlegają transformacji, lecz reprezentują wyselekcjonowaną grupę-populację całkowicie normalnych komórek zarodkowych, które są zaprogramowane do podziałów aż do momentu, kiedy otrzymają właściwy sygnał do różnicowania. Jeżeli komórki znajdują się w miejscu pozamacicznym, to sygnał ten nie jest wystarczający do kontynuacji normalnego rozwoju zarodkowego, wobec czego komórki tylko proliferują, bez możliwości różnicowania [36].

LITERATURA

- [1] ARTZT K., BENNET D., JACOB F., Primitive teratocarcinoma cells express a differentiation antigen specified by a gene at the T-locus in the mouse, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 71: 811-814, 1974.

- [2] ARTZT K., DUBOIS P., BENNET D., CONDAMINE H., BABINET C., JACOB F., Surface antigens common to mouse cleavage embryos and primitive teratocarcinoma cells in culture, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **70**: 2988-2992, 1973.
- [3] BEDDINGTON R. S. B., Histogenetic and neoplastic potential of different regions of the mouse embryonic egg cylinder, *J. Embryol. exp. Morph.*, **75**: 189-204, 1983.
- [4] BERNSTINE E. G., HOOPER M. L., GRANDCHAMP S., EPHRUSSI B., Alkaline phosphatase activity in mouse teratoma, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **70**: 3899-3903, 1973.
- [5] BRINSTER R. L., The effect of cells transferred into the mouse blastocyst on the subsequent development, *J. Exp. Med.*, **140**: 1049-1056, 1974.
- [6] COULON-MORELEC M. J., BUC-CARON M. H., Lipid patterns of embryonal carcinoma cell lines and their derivatives: changes with differentiation, *Develop. Biol.*, **83**: 278-290, 1981.
- [7] CRONMILLER C., MINTZ B., Karyotypic normalcy and quasi normalcy of developmentally totipotent mouse teratocarcinoma cells, *Develop. Biol.*, **67**: 465-477, 1978.
- [8] DAMJANOV I., SOLTER D., Experimental teratoma, *Curr. Top. Pathol.*, **59**: 69-130, 1974.
- [9] DIWAN S. B., STEVENS L. C., Development of teratomas from the ectoderm of mouse egg cylinders, *J. Natl. Cancer Inst.*, **57**: 937-942, 1976.
- [10] DUNN G. R., STEVENS L. C., Determination of sex of teratomas derived from early mouse embryos, *J. Natl. Cancer Inst.*, **44**: 99-102, 1970.
- [11] EDIDIN M., PATTHEY H. L., McGUIRE E. J. P., SHEFFIELD W. D., An antiserum to „embryoid body” tumor cells that reacts with normal mouse embryos, [w] Embryonic and fetal antigens in cancer (wyd. N. G. Anderson i J. H. Coggin, Jr), Oak Ridge, Tennessee: Oak Ridge National Laboratory, 239-248, 1971.
- [12] EPPIG J. J., KOZAK L. P., EICHER E. M., STEVENS L. C., Ovarian teratomas in mice are derived from oocytes that have completed the first meiotic division, [w] Genetic mosaics and chimeras in mammals (wyd. L. B. Russel), Plenum Press, New York, 33-37, 1978.
- [13] EVANS M. J., KAUFMAN M. H., Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos, *Nature (London)*, **292**: 154-156, 1981.
- [14] — Pluripotential cells grown directly from normal mouse embryos, *Cancer Surv.*, **2**: 185-207, 1983.
- [15] FUJI J. T., MARTIN G. R., Developmental potential of teratocarcinoma stem cells in utero following aggregation with cleavage-stage mouse embryos, *J. Embryol. exp. Morph.*, **74**: 79-96, 1983.
- [16] GACHELIN A., The cell surface antigens of mouse embryonal carcinoma cells, *Biochim. Biophys. Acta*, **516**: 27-60, 1978.
- [17] GARDNER R. L., Mouse chimeras obtained by the injection of cells into the blastocyst, *Nature*, **220**: 596-597, 1968.
- [18] GRAHAM C. F., Teratocarcinoma cells and normal mouse embryogenesis, [w] Concepts in mammalian embryogenesis (wyd. M. J. Sherman i C. F. Graham), MIT Press, Cambridge, 315-394, 1977.
- [19] HEATH J. K., Regulation of murine embryonal carcinoma cell proliferation and differentiation, *Cancer Surv.*, **2**: 141-164, 1983.
- [20] HOGAN B. L. M., Teratocarcinoma cells as a model for mammalian deve-

- lopment, [w] International review of biochemistry, biochemistry of cell differentiation II (wyd. J. Paul), University Park Press, Baltimore, 15: 333-376, 1977.
- [21] HSU Y. C., BASKAR J., Differentiation in vitro of normal mouse embryos and mouse embryonal carcinoma, *J. Natl. Cancer Inst.*, 53: 177-185, 1974.
- [22] ILLMENSEE K., MINTZ B., Totipotency and normal differentiation of single teratocarcinoma cells cloned by injection into blastocyst, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 73: 549-553, 1976.
- [23] JACOB F., Mouse teratocarcinoma and embryonic antigens, *Immunol. Rev.*, 33: 3-32, 1977.
- [24] JAMI J., RITZ E., Multipotentiality of single cells of transplantable teratocarcinomas derived from mouse embryo grafts, *J. Natl. Cancer Inst.*, 52: 1547-1552, 1974.
- [25] JONES-VILLENEUVE E. M. V., McBURNEY M. W., ROGERS K. A., KALNINS V. J., Retinoic acid induces embryonal carcinoma cells to differentiate into neurons and glial cells, *J. Cell Biol.*, 94: 253-262, 1982.
- [26] KAHAN B. W., EPHRUSSI B., Developmental potentialities of clonal in vivo cultures of mouse testicular teratoma, *J. Natl. Cancer Inst.*, 44: 1015-1036, 1970.
- [27] KEMLER R., BABINET C., EISEN H., JACOB F., Surface antigen in early differentiation, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 74: 4449-4452, 1977.
- [28] KLEINSMITH L. J., PIERCE B., Multipotentiality of single embryonal carcinoma cells, *Cancer Res.*, 24: 1544-1552, 1964.
- [29] LINDER D., Gene loss in human teratomas, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 63: 699-704, 1969.
- [30] LINDER D., POWER J., Further evidence for post-meiotic origin of teratomas in the human female, *Ann. Hum. Genet.*, 34: 21-30, 1970.
- [31] LOVELL-BADGE R. H., EVANS M. J., Changes in protein synthesis during differentiation of embryonal carcinoma cells and comparison with embryo cells, *J. Embryol. exp. Morph.*, 59: 187-206, 1980.
- [32] LYON M. F., X-chromosome inactivation and developmental patterns in mammals, *Biol. Rev.*, 47: 1-35, 1972.
- [33] MARTIN G. R., Teratocarcinoma as a model system for the study of embryogenesis and neoplasia, *Review, Cell*, 5: 229-243, 1975.
- [34] MARTIN G. R., Advantages and limitations of teratocarcinoma stem cells as a model of development, [w] *Development in mammals*, vol. 3 (wyd. M. H. Johnson), Amsterdam, New York, Oxford, 225-266, 1978.
- [35] — Teratocarcinomas and mammalian embryogenesis, *Science*, 209: 768-772, 1980.
- [36] — Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78: 7634-7638, 1981.
- [37] MARTIN G. R., EPSTEIN C. J., TRAVIS B., TUCKER G., YATZIV S., MARTIN D. W. M. Jr., CLIFT S., COHEN S., X-chromosome inactivation during differentiation of female teratocarcinoma stem cells in vitro, *Nature*, 271: 327-333, 1978.
- [38] MARTIN G. R., EVANS M. J., Differentiation of clonal lines of teratocarcinoma stem cells: Formation of embryoid bodies in vitro, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 72: 1441-1445, 1975.
- [39] MARTIN G. R., WILEY L. M., DAMJANOV I., The development of cystic

- embryoid bodies in vitro from clonal teratocarcinoma stem cells, *Develop. Biol.*, **61**: 230-244, 1977.
- [40] McBURNEY M.-W., ADAMSON E. D., Studies on the activity of the X-chromosome in female teratocarcinoma cells in culture, *Cell*, **9**: 57-70, 1976.
- [41] MINTZ B., Formation of genotypically mosaic mouse embryos, *Amer. Zool.*, **2**: 432, 1962.
- [42] MINTZ B., CRONMILLER C., METT-1: a karyotypically normal in vitro line of developmentally totipotent mouse teratocarcinoma cells, *Somatic Cell Genetics*, **7**: 489-505, 1981.
- [43] MINTZ B., FLEISCHMAN R. A., Teratocarcinoma and other neoplasms as developmental defects in gene expression, *Adv. Canc. Res.*, **34**: 211-278, 1981.
- [44] MINTZ B., ILLMENSEE K., Normal genetically mosaic mice produced from malignant teratocarcinoma cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **72**: 3585-3589, 1975.
- [45] MINTZ B., ILLMENSEE K., GEARHART J. D., Developmental and experimental potentialities of mouse teratocarcinoma cells from embryoid body cores, [w] *Teratomas and Differentiation* (wyd. M. I. Sherman, D. Solter), Academic Press, Inc., London, 59-82, 1975.
- [46] MONK M., A stem-line model for cellular and chromosomal differentiation, *Differentiation*, **19**: 71-76, 1981.
- [47] MONK M., HARPER M. I., Sequential X chromosome inactivation coupled with cellular differentiation in early mouse embryos, *Nature, London*, **281**: 311-313, 1979.
- [48] OŹDŹENSKI W., Observations on the origin of primordial germ cells in the mouse, *Zool. Pol.*, **17**: 65-78, 1967.
- [49] PAPAIOANNOU V. E., Interactions between mouse embryos and teratocarcinomas, [w] *Cell lineage, stem cells and cell determination*, INSERM Symposium No. 10 (wyd. N. LeDouarin), 141-155, 1979.
- [50] PAPAIOANNOU V. E., GARDNER R. L., Investigation of the lethal yellow A/A^y embryo using mouse chimaeras, *J. Embryol. exp. Morph.*, **52**: 153-163, 1979.
- [51] PAPAIOANNOU V. E., GARDNER R. L., McBURNEY M. W., BABINET C., EVANS M. J., Participation of cultured teratocarcinoma cells in mouse embryogenesis, *J. Embryol. exp. Morph.*, **44**: 93-104, 1978.
- [52] PAPAIOANNOU V. E., McBURNEY M. W., GARDNER R. L., EVANS M. J., Fate of teratocarcinoma cells injected into early mouse embryos, *Nature*, **258**: 70-73, 1975.
- [53] PAPAIOANNOU V. E., ROSSANT J., Effects of the embryonic environment on proliferation of embryonal carcinoma cells, *Cancer Surv.*, **2**: 165-183, 1983.
- [54] PIERCE G. B., DIXON F. J., Testicular teratomas. I. Demonstration of teratogenesis by metamorphosis of multipotential cells, *Cancer*, **12**: 573-583, 1959.
- [55] PIERCE G. B., Jr., MIDGLEY A. R. Jr., RAM J. S., FELDMAN J. D., Parietal yolk sac carcinoma: a clue to the histogenesis of Reichert's membrane of the mouse embryo, *Amer. J. Path.*, **41**: 549-566, 1962.
- [56] RASTAN S., Timing of X-chromosome inactivation in postimplantation mouse embryos, *J. Embryol. exp. Morph.*, **71**: 11-24, 1982.
- [57] REES A. R., ADAMSON E. D., GRAHAM C. F., Epidermal growth factor

- receptors increase during the differentiation of embryonal carcinoma cells, *Nature*, **281**: 309-411, 1979.
- [58] ROSENTHAL M. D., WISHNOW R. M., SATO G. H., In vitro growth and differentiation of clonal populations of multipotential mouse cells derived from a transplantable testicular teratocarcinoma, *J. Natl. Cancer Inst.*, **44**: 1001-1014, 1970.
- [59] ROSENSTRAUS M. J., STERMAN B., CARR A., BRAUD L., Fibroblast feeder layers inhibit differentiation of retinoic acid-treated embryonal carcinoma cells by increasing the probability of stem cell renewal, *Exp. Cell Res.*, **152**: 378-389, 1984.
- [60] ROSSANT J., Investigation of the determinative state of the mouse inner cell mass II. The fate of isolated inner cell masses transferred to the oviduct, *J. Embryol. exp. Morph.*, **33**: 991-1001, 1975.
- [61] ROSSANT J., McBURNEY M. W., The developmental potential of a euploid male teratocarcinoma cell line after blastocyst injection, *J. Embryol. exp. Morph.*, **70**: 99-112, 1982.
- [62] ROSSANT J., PAPAIOANNOU V. E., The relationship between embryonic, embryonal carcinoma and embryo derived stem cells, *Cell Differentiation*, **15**: 155-161, 1984.
- [63] SATO M., MURAMATSU T., Reactivity of five N-acetylgalactosamine recognizing lectins with preimplantation embryos, early postimplantation embryos and teratocarcinoma cells of the mouse, *Differentiation*, **29**: 29-38, 1985.
- [64] SHERMAN M. I., MILLER R. A., F9 embryonal carcinoma cells can differentiate into endoderm-like cells, *Develop. Biol.*, **63**: 27-34, 1978.
- [65] SMITH T. A., HOOPER M. L., Medium conditioned by feeder cells inhibits the differentiation of embryonal carcinoma cultures, *Exp. Cell Res.*, **145**: 458-462, 1983.
- [66] SOLTER D., KNOWLES B. B., Immunosurgery of mouse blastocyst, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **72**: 5099-5102, 1975.
- [67] — Monoclonal antibody defining a stage specific mouse embryonic antigen (SSEA-1), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **75**: 5565-5569, 1978.
- [68] SOLTER D., DOMINIS M., DAMJANOV I., Embryo derived teratocarcinoma: the role of strain and gender in the control of teratocarcinogenesis, *Int. J. Cancer*, **24**: 770-772, 1979.
- [69] STEVENS L. C., Studies on transplantable testicular teratomas of strain 129 mice, *J. Natl. Cancer Inst.*, **20**: 1257-1276, 1958.
- [70] — Embryology of testicular teratomas in strain 129 mice, *J. Natl. Cancer Inst.*, **23**: 1249-1295, 1959.
- [71] — Testicular teratomas in fetal mice, *J. Natl. Cancer Inst.*, **28**: 247-268, 1962.
- [72] — Experimental production of testicular teratomas in mice, *J. Natl. Cancer Inst.*, **52**: 654, 1964.
- [73] — Experimental production of testicular teratomas in mice of strain 129, A/He, and their F₁ hybrids, *J. Natl. Cancer Inst.*, **44**: 929-932, 1970a.
- [74] — Environmental influences on experimental teratogenesis in testes of mice, *J. Exp. Zool.*, **174**: 407-414, 1970b.
- [75] — The development of transplantable teratocarcinomas from intratesticular grafts of pre- and post-implantation mouse embryos, *Develop. Biol.*, **21**: 364-382, 1970c.
- [76] — A new inbred subline of mice (129/terSv) with a high incidence of spon-

- taneous congenital testicular teratomas, *J. Natl. Cancer Inst.*, **50**: 235-242, 1973.
- [77] STEVENS L. C., HUMMEL K. P., A description of spontaneous congenital testicular teratomas in strain 129 mice, *J. Natl. Cancer Inst.*, **18**: 719-721, 1957.
- [78] STEVENS L. C., VARNUM D. S., The development of teratomas from parthenogenetically activated ovarian mouse eggs, *Develop. Biol.*, **37**: 369-380, 1974.
- [79] STEWART C. L., Aggregation between teratocarcinoma cells and preimplantation mouse embryos, *J. Embryol. exp. Morph.*, **58**: 289-302, 1980.
- [80] — Formation of viable chimaeras by aggregation between teratocarcinomas and preimplantation mouse embryos, *J. Embryol. exp. Morph.*, **67**: 167-179, 1982.
- [81] STEWART T. A., MINTZ B., Successive generations of mice produced from an established culture line of euploid teratocarcinoma cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**: 6314-6318, 1981.
- [82] STRICKLAND S., MAHDAVI V., The induction of differentiation in teratocarcinoma stem cells by retinoic acid, *Cell*, **15**: 393-403, 1979.
- [83] STRICKLAND S., REICH E., SHERMAN M. L., Plasminogen activator in early embryogenesis: enzyme production by trophoblast and parietal endoderm, *Cell*, **9**: 231-240, 1976.
- [84] TAKACI N., SUGAWARA O., SASAKI M., Regional and temporal changes in the pattern of X-chromosome replication during the early postimplantation development of the female mouse, *Chromosoma*, **85**: 275-286, 1982.
- [85] TARKOWSKI A. K., Mouse chimaeras developed from fused eggs, *Nature*, **190**: 857-860, 1961.
- [86] UNO K., A correlation between the capacity of cavity formation and the subsequent differentiation of teratocarcinoma embryoid body line, *J. Embryol. exp. Morph.*, **69**: 127-140, 1982.
- [87] WILLISON K. R., KAROL R. A., SUZUKI A., KUNDU S. K., MARCUS D. M., Neutral glycolipids antigens as developmental markers of mouse teratocarcinoma and early embryos: an immunological and chemical analysis, *J. Immunol.*, **129**: 603-609, 1982.
- [88] WILLISON K. R., STERN P. L., Expression of a Forssman antigenic specificity in the preimplantation mouse embryo, *Cell*, **14**: 785-793, 1978.
- [89] XIE H. X., TAKEICHI M., OGOU S. I., OKADA T. S., A brief contact with early embryonic cells induces the differentiation of embryonal carcinoma cells, *Develop. Growth Differ.*, **24**: 513-520, 1982.

Otrzymano: 11 czerwca 1987.

Przyjęto: 28 czerwca 1987.

Adres autorki: ul. Chałubińskiego 5, 02-004 Warszawa.

RÓŻNORODNOŚĆ I WZAJEMNE ODDZIAŁYWANIE SUBPOPULACJI KOMÓREK NOWOTWOROWYCH

HETEROGENEITY AND TUMOUR SUBPOPULATION INTERACTIONS

Leon STRZAŁA

Zakład Immunologii Nowotworów, Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej
PAN

Streszczenie. W pracy przedstawiono aktualne poglądy na temat heterogenności komórek nowotworowych pod względem zdolności do przerzutowania, interakcji między ich subpopulacjami oraz niestabilności fenotypowej subpopulacji klonalnych. Przedstawiono koncepcję równowagi w heterogennej populacji komórek nowotworowych.

Summary. This article presents current topics on tumour cells metastatic heterogeneity, tumour subpopulation interactions and phenotypic instability of clonal subpopulations. Concept of equilibrium in heterogeneous tumour cells population is presented.

W wyniku badań ostatnich lat umacnia się pogląd, że nowotwór tworzą różne populacje komórek wykazujące znaczną heterogenność pod względem wielu cech biologicznych. Nawet jeżeli nowotwór wywodzi się z pojedynczej stransformowanej komórki, to populacja komórek nowotworowych będzie po pewnym czasie fenotypowo heterogenna, co oznacza, że dana cecha nie będzie jednakowo wyrażona we wszystkich komórkach populacji nowotworowej. To stwierdzenie wypiera długo panujący pogląd o nowotworze jako zbiorze identycznych, anarchicznie zachowujących się komórek, które wymknęły się spod kontroli gospodarza i namnażają się w sposób chaotyczny i niepohamowany. Założenie o homogenności komórek nowotworowych długo ciążyło na badaniach nad nowotworami, jak i na poszukiwaniu sposobów skutecznej terapii, mimo że pierwsze dane o heterogenności nowotworów pojawiły się już w czasach Virchowa [25]. Zjawisko heterogenności nie jest unikatowe dla nowotworów, występuje również w tkankach prawidłowych, jednakże

w mniejszym stopniu [47, 22]. W nowotworach heterogenność dotyczy takich cech jak: utkanie histologiczne, morfologia komórek, markery chromosomalne, antygeny powierzchniowe, skład glikoproteidów, glikolipidów, enzymów, wrażliwość na leki, wrażliwość na napromienianie i na mechanizmy odpornościowe gospodarza, zdolność do adhezji, inwazyjności czy wreszcie zdolność do przerzutowania [14, 42, 44]. W tej pracy omówimy ostatnią z wymienionych cech, gdyż stanowi ona jedną z głównych przyczyn niepowodzeń w leczeniu nowotworów [24].

PROGRESJA NOWOTWOROWA

Populacja komórek nowotworowych zmienia się w czasie i u danego osobnika jest różna w różnych stadiach choroby. Foulds [20] opisał to zjawisko jako progresję nowotworową, czyli nabywanie stałej, nieodwracalnej zmiany jakościowej w jednej lub więcej cechach nowotworu. Ewolucja nowotworu jest stopniowa i prowadzi do zwiększania jego autonomii. Pierwotną koncepcję Fouldsa rozwinął Nowell [45] zakładając, że proces progresji nowotworowej jest wynikiem nabywania przez komórki nowotworowe labilności genetycznej, co pozwala na ciągłą selekcję subpopulacji wariantowych.

Proliferacja komórki nowotworowej w jej unikatowym mikrośrodoisku prowadzi w konsekwencji do pojawienia się wariantów komórkowych wśród jej potomstwa. Ażeby przeżyć i proliferować w konkurencyjnej populacji innych komórek nowotworowych, warianty komórkowe muszą mieć przewagę nad pozostałymi komórkami nowotworu. Nieudane warianty komórkowe, np. silnie immunogenne lub bez receptorów dla czynników wzrostu będą niszczone przez mechanizmy obronne gospodarza lub utracą zdolność do odpowiedzi na sygnały mikrośrodowiska podtrzymujące wzrost i różnicowanie. Przeciwnie, warianty o cechach konkurencyjnych w porównaniu z sąsiadami mogą dać początek nowej subpopulacji, która ostatecznie może stać się dominującą. Zmiany w znaczeniu poszczególnych subpopulacji mogą w ciągu pewnego okresu prowadzić do wyodrębnienia subpopulacji o rozbieżnych właściwościach i o zwiększonej zdolności do przeżycia i utrzymania wzrostu [43]. Nowotwory w stadium zaawansowanej progresji mogą przedstawiać zadziwiającą mozaikę różnorodnych subpopulacji z prawie nieograniczoną zmiennością fenotypową.

Nie jest sprawą rozstrzygniętą, jakie mechanizmy są odpowiedzialne za generowanie heterogenności. Koncepcja progresji nowotworowej Fouldsa i Nowella opiera się na założeniu, że zmiany w cechach fenotypowych komórek nowotworowych spowodowane są przypadkowymi muta-

cjami somatycznymi, występującymi w związku ze zwiększoną niestabilnością genetyczną. Wraz z postępowaniem progresji nowotworowej powinna zwiększać się niestabilność genetyczna [20, 45]. Słuszność tego założenia potwierdzili doświadczalnie Cifone i Fidler [5]. Porównując linie nowotworowe wysoko i nisko przerzutujące, stwierdzili 3-7-krotny wzrost liczby spontanicznych mutacji w liniach wysoko przerzutujących w porównaniu z nisko przerzutującymi. Zwiększona liczba spontanicznych mutacji nie może być jednak jedyną przyczyną różnorodności fenotypowej obserwowanej w nowotworach. Odmiany fenotypowe występują bowiem ze znacznie wyższą częstotliwością, niż wynikałoby to z liczby spontanicznych mutacji [4, 23, 48]. Obserwuje się również drastyczne zmiany w fenotypie komórek nowotworowych, szczególnie w przypadku zdolności do przerzutowania, które trudno wyjaśnić zjawiskiem mutacji genetycznej [7, 32, 38].

W powstawaniu różnorodnych komórek nowotworowych mogą brać udział również zmiany epigenetyczne, powodujące zmianę w ekspresji genów, bez zmian w sekwencji DNA. Kerbel uzyskał dane wskazujące, że szybkie, niestabilne zmiany fenotypowe komórek nowotworowych mogą być związane z hypometylacją DNA. W czasie normalnego procesu różnicowania wiele genów wyłączanych jest przez metylację cytozyny w DNA, a włączanych przez demetylację [53]. Zmieniając stopień metylacji DNA poprzez zastosowanie analogu cytozyny, otrzymano gwałtowną zmianę fenotypową (utrata tumorogenności) w 80% badanych klonów nowotworowych. Zmiany te były niestabilne i kłony stopniowo wracały do fenotypu wyjściowego [30]. Inni autorzy wykazali, że zmiany w stopniu metylacji DNA komórek nowotworowych powodują indukcję fenotypu przerzutowego oraz zmiany we wrażliwości komórek na lizę przez cytotoksyczne limfocyty T [1, 46].

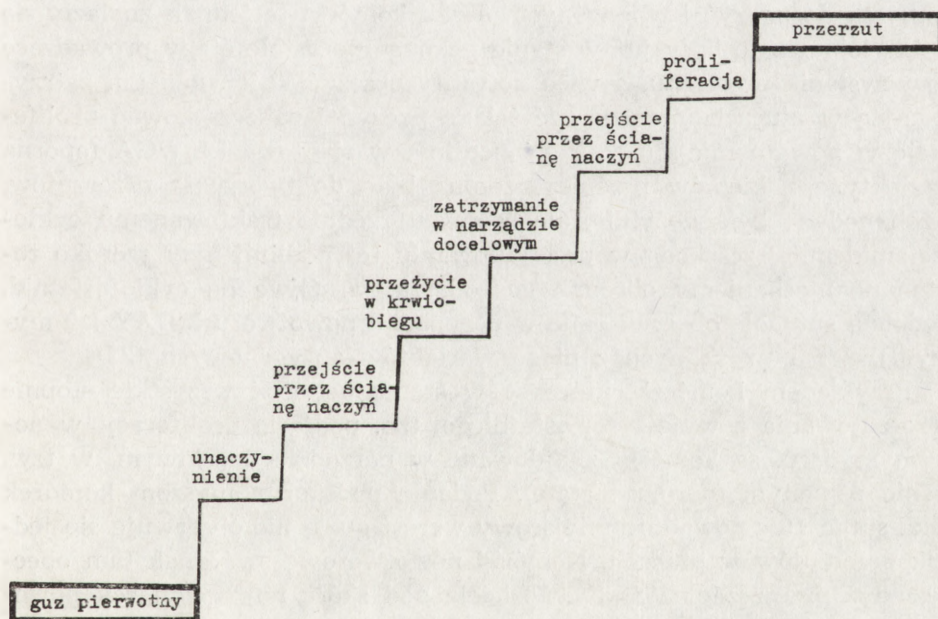
Schirmmacher zaproponował model powstawania heterogenności, w którym sygnały z mikrośrodowiska w postaci czynników rozpuszczalnych, kontaktu komórek z macierzą międzykomórkową czy kontaktu pomiędzy komórkami mogą aktywować programy genetyczne w komórkach nowotworowych, wywołując zmiany fenotypowe podobne do tych, jakie występują w czasie normalnego różnicowania [54]. W modelu tym rola czynników ustrojowych nie sprowadza się jedynie do selekcji, ale obejmuje również indukcję nowych odmian fenotypowych wśród komórek nowotworowych. Wyniki uzyskane przez Beatseliera i współpracowników zdają się wskazywać na taką możliwość [3]. Komórki mysiego chłoniaka BW 5145, podane dośledzionowo, nabywają zdolności do przerzutowania. Na powierzchni tych komórek występuje pierwotnie jedynie antygen Thy 1, brak natomiast antygenów Lyt 1 i Lyt 2, co może być związane z zatrzymaniem się komórek na pewnym etapie różnicowania limfocy-

tów T. Na komórkach przerzutów pojawia się oprócz antygeny Thy 1, antygen Lyt 1 nieobecny na linii wyjściowej. Wyjaśniając to zjawisko bierze się pod uwagę możliwość aktywacji „śpiących” genów w linii BW 5145 przez środowisko śledziony, co uwidacznia się ekspresją antygeny Lyt 1. Komórki uzyskują fenotyp bardziej zróżnicowanego limfocytu T i nabywają zdolności do przerzutowania.

Inny mechanizm może polegać na spontanicznej fuzji komórki nowotworowej z komórką prawidłową gospodarza. Nieprzerzutujące komórki plazmocytozy czy chłoniaka komórek T w wyniku fuzji *in vitro* z prawidłowymi limfocytami B czy aktywowanymi limfocytami T nabywały zdolności do przerzutowania [2, 3, 28, 31]. Na kilku modelach nowotworów doświadczalnych stwierdzono, że pojawianie się nowej cechy, zdolności do przerzutowania, spowodowane było spontaniczną fuzją *in vivo* komórki nowotworowej z komórkami gospodarza. Komórki izolowane z przerzutów miały oprócz antygenów powierzchniowych, charakterystycznych dla komórek nowotworowych, również antygeny gospodarza. Prace wskazujące na to, że komórki nowotworowe rosnące *in vivo* mogą ulegać fuzji z komórkami prawidłowymi gospodarza, pojawiały się już wcześniej, z tym że nie odnoszono tego zjawiska do wyjaśnienia heterogenności i progresji nowotworowej. Jedynie Goldenberg [21] sugerował, że tworzenie się przerzutów nowotworu ludzkiego rosnącego u chomika spowodowane było fuzją ludzkich komórek nowotworowych z prawidłowymi komórkami chomika. W literaturze pojawiają się również koncepcje tłumaczące niestabilność genetyczną komórek nowotworowych zmianami w sekwencjach niekodujących, które stanowiąc przeważającą część genomu, mogą być głównym celem kancerogenów. Zmiany w tych sekwencjach odpowiedzialne byłyby za zmniejszoną stabilność genomu, objawiającą się zwiększoną częstością przegrupowań genów strukturalnych i ich sekwencji regulacyjnych, co w konsekwencji prowadziło do powstawania wariantów fenotypowych [6]. W powstawaniu różnorodności komórek nowotworowych postuluje się również udział onkogenów oraz mechanizmów podobnych do tych, które biorą udział w tworzeniu różnorodności immunoglobulin [43, 44]. Tak więc powstawanie mozaiki fenotypowo różnych subpopulacji w nowotworze złośliwym można tłumaczyć wieloma mechanizmami. W czasie wzrostu progresywnego pod wpływem nacisków selekcyjnych zarówno naturalnych, jak i sztucznych (np. terapia) mozaika ta staje się dynamiczna i zmienna zarówno pod względem liczby, jak i natury tworzących ją subpopulacji. Wielość mechanizmów prowadzących do heterogenności może dodatkowo zwiększać różnorodność komórkową, gdyż progresja nowotworowa może podążać równolegle wieloma drogami, a nie według jednego stałego wzorca [51].

HETEROGENNOŚĆ KOMÓREK NOWOTWOROWYCH POD WZGLĘDEM ZDOLNOŚCI DO PRZERZUTOWANIA

Badania na kilku modelach doświadczalnych potwierdziły oryginalną obserwację Fidlera [11], że nowotwory złośliwe są heterogenne pod względem zdolności do przerzutowania. Fidler i Kripke [12] z zawiesiny komórek czerniaka K-1735 uzyskali kilkanaście klonów. Mimo że klony te pochodziły z pojedynczego nowotworu przerzutującego do płuc (średnio 33 przerzuty/mysz), to różniły się znacznie zdolnością do przerzutowania. 7 spośród nich dawało od 1 do 7 przerzutów/mysz, 4 klony od 20 do 90 przerzutów/mysz, a 5 klonów nie przerzutowało w ogóle. Brak zdolności do przerzutowania nie jest cechą bezwzględną i w nowotworze złośliwym obecne są subpopulacje aktualnie nieprzerzutujące, które jednak w sprzyjających warunkach mogą ujawnić tę zdolność. Wynika to ze złożoności wieloetapowego procesu przerzutowania (ryc. 1). Komór-



Ryc. 1. Podstawowe stopnie kaskady przerzutowania według [24], zmodyfikowane

ka, która nie jest w stanie pokonać chociaż jednego ze stopni, tzw. kaskady przerzutowania, nie jest w stanie utworzyć przerzutu [24]. Trudność w pokonaniu wszystkich bez wyjątku stopni przerzutowania sprawia, że jest ono procesem mało wydajnym [57]. Po dożylnym podaniu komórek nowotworu przerzutującego większość z nich ginie w ciągu 24 godz.,

przeżywa tylko 0,1% komórek, które następnie dają przerzuty [10]. W nowotworze złośliwym można więc wyróżnić dwie główne subpopulacje: zdecydowanie przeważającą ilościowo subpopulację nieprzerzutuującą oraz niewielką subpopulację przerzutującą, przy czym w skład subpopulacji nieprzerzutuującej wchodziłyby komórki, które są w stanie pokonać wiele stopni kaskady przerzutowania, lecz nie wszystkie.

Przykładem takiej sytuacji mogą być wyniki badań nad przerzutowaniem wariantów komórkowych uzyskanych z linii LL₂ raka płuc Lewis czy białaczki MDAY-D [9, 33]. Warianty komórkowe linii LL₂ odporne na 3 różne lektyny, po podaniu podskórnym komórek rosły w formie guza, nie tworząc przerzutów w płucach. Należały więc w linii wyjściowej do subpopulacji nieprzerzutuującej. Po podaniu dożylnym podlinia LL₂-AAA odporna na lektynę z *Aleuria Aurantia*, przerzutowała i to w stopniu większym niż linia macierzysta, natomiast 2 pozostałe podlinie nadal miały ograniczoną zdolność do tworzenia przerzutów. Oznacza to, że podlinia LL₂-AAA nie przerzutowała na skutek niemożności dotarcia komórek do naczyń krwionośnych. Jeżeli komórki te jednak znalazły się w krwiobiegu, to były już w stanie pokonać pozostałe etapy prowadzące do powstania przerzutu, a więc potrafiły przeżyć w krwiobiegu, zatrzymać się w płucach, przekroczyć ścianę naczyń i zapoczątkować proliferację w nowym miejscu. Z kolei podlinia wariantowa LL₂WGA (odporna na lektynę z kielków pszenicy) zdolna była do tworzenia przerzutów, jeżeli podana była dożylnie, ale biorcy uprzednio traktowanemu cyklofosfamidem. Przeszkodą w przerzutowaniu tej podlinii były szeroko rozumiane mechanizmy obronne gospodarza, wrażliwe na cyklofosfamid. Podobną sytuację obserwowano w przypadku nowotworu MDAY-D2 myszy DBA/2 i uzyskanych z niego wariantów antygenowych [33].

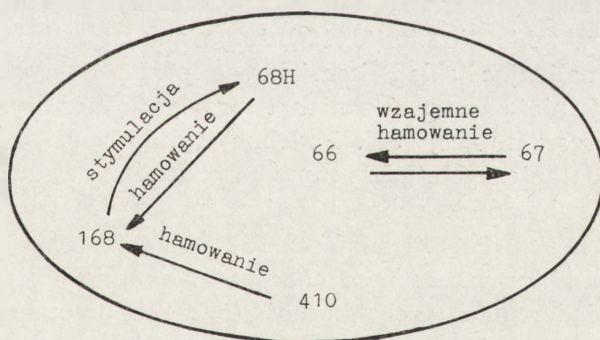
Przykładem komórek, które są w stanie pokonać wszystkie stopnie przerzutowania z wyjątkiem ostatniego, tzn. podjęcia proliferacji w nowym miejscu, są komórki znajdujące w narządzie docelowym, w tzw. stanie uspionym (dormant state). Podanie podskórne myszom komórek raka sutka 16/c powoduje miejscowy wzrost guza, nie obserwuje się jednak przerzutów w płucach. Komórki nowotworowe są jednak tam obecne, gdyż przeszczepienie płuc nosiciela pod skórę nowego biorcy powoduje pojawienie się guza [52].

INTERAKCJE MIĘDZY SUBPOPULACJAMI KOMÓREK NOWOTWOROWYCH

Fakt, że nowotwór jest heterogenny, nasuwa pytanie, czy tworzące go subpopulacje komórek o różnych cechach fenotypowych zachowują się jak autonomiczne jednostki, czy też wchodzi w interakcje, wpływa-

jąc wzajemnie na siebie. Gdyby składowe subpopulacje nowotworu były autonomiczne, to wolno namnażające się subpopulacje byłyby szybko przerastane. Ponieważ można z tego samego nowotworu wyizolować komórki znacznie różniące się tumorogেনnością, można więc założyć istnienie wewnątrznowotworowych mechanizmów homeostazy, pozwalających współistnieć szybko i wolno rosnącym subpopulacjom. To rozumowanie było podstawą dla Heppner i współpr. do stworzenia układu modelowego, pozwalającego badać oddziaływania między subpopulacjami komórek nowotworowych i w ten sposób wniknąć w „ekologię nowotworu” [26, 35]. Układ doświadczalny składał się z 5 subpopulacji otrzymanych z pojedynczego spontanicznego raka sutka samicy myszy BALB/cxC3H; 4 z nich izolowano z komórek guza pasażowanych in vitro, a piątą z przerzutu płucnego [8].

Interakcje wzrostowe badano podając komórki poszczególnych subpopulacji podskórnie w przeciwległe boki tej samej myszy. Porównując wzrost guzów rosnących w układzie obustronnym ze wzrostem jednostronnego przeszczepu każdej z subpopulacji oraz wzrostem dwóch przeszczepów tej samej subpopulacji, można było określić, czy obecność jednych komórek wpływa na wzrost drugich. Okazało się, że subpopulacje oznaczone 66 i 67 wzajemnie hamują swój wzrost, subpopulacja oznaczona 168 stymuluje wzrost 68H, natomiast subpopulacja 168 jest hamowana zarówno przez 410, jak i przez 68H [26, 35] (ryc. 2).



Ryc. 2. Interakcje między subpopulacjami komórek raka sutka, opracowane na podstawie [35, 26, 27]

Podobne zjawisko interakcji między subpopulacjami komórek nowotworowych może występować w przypadku hamowania wzrostu przerzutów przez guz pierwotny [34]. Stwierdzono również, że nietumorogenny klon czerniaka B16 hamuje tumorogенność innych klonów B16, jeżeli zmiesza się je razem przed podaniem do myszy [41].

Interakcje badano również *in vitro*, zakładając hodowle poszczególnych subpopulacji w formie hodowli jednowarstwowej na oddzielnych szkiełkach nakrywkowych. Szkiełka umieszczano następnie we wspólnej szalce Petriego i zalewano płynem hodowlanym. Subpopulacje 168 oraz 68 hamowały wzrost innych subpopulacji, natomiast pozostałe linie nie wykazywały żadnej aktywności [26, 27]. Aktywność hamującą można było przenieść za pomocą supernatantu znad hodowli komórek 168.

Interakcje dotyczyły również innych cech, jak wrażliwość na leki czy zdolność do przerzutowania. Stosując ten sam układ doświadczalny *in vivo*, stwierdzono, że obecność komórek subpopulacji 168 zwiększa wrażliwość na cyklofosfamid dosyć odpornej na ten lek linii 410. Odmienne niż przy interakcji wzrostowej *in vivo*, która odbywała się za pośrednictwem gospodarza, naświetlenie biorcy przed podaniem komórek nowotworowych nie znosiło zdolności subpopulacji 168 do zwiększania wrażliwości komórek 410 na cyklofosfamid. W doświadczeniach *in vitro*, w których badano wrażliwość na metotreksat czy tioguaninę, w niektórych kombinacjach subpopulacji interakcje zmieniające wrażliwość na lek zachodziły z udziałem rozpuszczalnego czynnika, w innych wymagany był bezpośredni kontakt między komórkami [26, 36, 37, 40].

Niezdolność komórek nowotworowych do pokonania wszystkich stopni kaskady przerzutowania może być kompensowana przez inny typ komórek nowotworowych. Podanie dożylnie mieszaniny komórek przerzutujących (410) z komórkami nieprzerzutującymi (67) powodowało wystąpienie przerzutów, mimo że komórki przerzutujące (410) obecne były w mieszaninie w takiej liczbie (1×10^4), że podane oddzielnie nie tworzyły przerzutów. Analizując skład komórkowy poszczególnych przerzutów stwierdzono również, że część z nich tworzyły wyłącznie komórki subpopulacji nieprzerzutującej [39]. Podobne wyniki uzyskano w układzie przerzutów spontanicznych, gdzie myszom obciążonym guzem przez podskórne podanie komórek subpopulacji nieprzerzutującej (168) podano dożylnie małą liczbę (1×10^4) komórek subpopulacji 410. U części myszy stwierdzono w kilku przerzutach obecność komórek linii nieprzerzutującej. W doświadczeniach tych obecność komórek przerzutujących umożliwiała komórkom nieprzerzutującym tworzenie przerzutów. Dlatego potencjał przerzutowy nowotworu nie może być opisany w sposób prosty jedynie przez obecność lub brak subpopulacji przerzutującej [39].

Biorąc pod uwagę pozostałe badane cechy, można stwierdzić, że właściwości nowotworu heterogennego nie są prostą sumą właściwości poszczególnych subpopulacji. Nowotwór heterogenny jest bowiem zbiorem subpopulacji komórek nowotworowych, które nie zachowują się jak autonomiczne jednostki, lecz wzajemnie na siebie oddziałują, tworząc całą złożoną sieć interakcji, zmieniających różne właściwości ko-

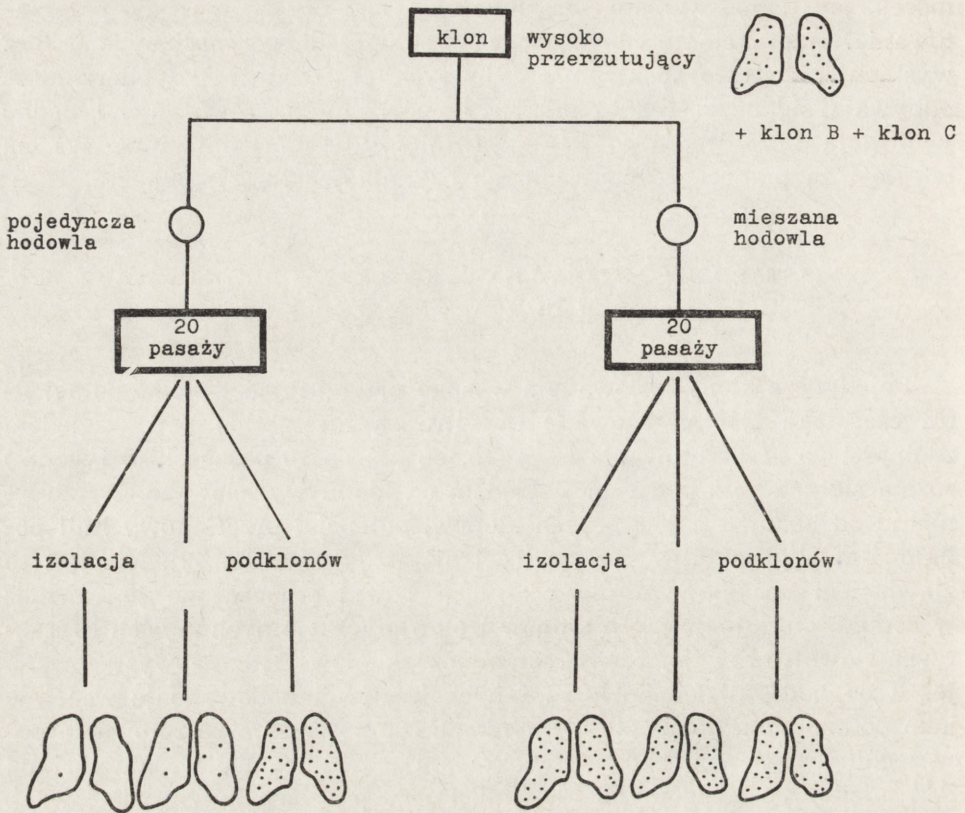
mórek, jak tempo wzrostu, wrażliwość na leki czy zdolność do przerzutowania. Interakcje te nie zachodzą według jednego mechanizmu, lecz występuje ich całe spektrum. W jednych pośredniczy gospodarz, inne odbywają się bezpośrednio między komórkami nowotworowymi, jedne wymagają bezpośredniego kontaktu między komórkami, inne zaś na odległość za pomocą rozpuszczalnych czynników [26, 27, 39].

NIESTABILNOŚĆ KLONALNA — KONCEPCJA RÓWNOWAGI W NOWOTWORACH

Pojedyncze klony izolowane z wysoko przerzutującej poliklonalnej linii czerniaka B16 pasażowane *in vitro* są niestabilne pod względem zdolności do przerzutowania i szybko, bo już po 10 pasażach (5 tygodni) różnią się znacznie pod tym względem od klonu wyjściowego. W odróżnieniu od hodowli pojedynczych klonów, potencjał przerzutowy linii poliklonalnej był stabilny przez więcej niż 60 pasaży [15, 49]. Nie jest to zjawiskiem unikatowym dla czerniaka B16 i stwierdzono je również w hodowlach pojedynczych klonów izolowanych z innych mysich i szczurzych nowotworów [5, 51]. Niestabilność klonów B16 nie występowała, jeżeli do hodowli dodano kilka innych klonów i hodowano je wspólnie jako poliklonalną populację. Utrzymanie zdolności do przerzutowania poszczególnych klonów badano wykorzystując różnice we wrażliwości na leki między poszczególnymi klonami. Po 20 pasażach *in vitro* izolowano z mieszaniny poszczególne klony i porównywano ich zdolność do przerzutowania z oryginalnym klonem o takiej samej oporności na lek. Potencjał przerzutowy klonów pasażowanych w mieszanej populacji był podobny do potencjału przerzutowego oryginalnych rodzicielskich klonów (ryc. 3).

Efekt stabilizacji powstający przez mieszanie klonów był swoisty dla komórek z tego samego nowotworu. Pojedyncze klony czerniaka B16, hodowane z klonami raka płuc Lewis czy włóknakiomięsaka 2237, wykazywały znaczną niestabilność fenotypową, szybko wytwarzając podklony o różnej zdolności do przerzutowania [49].

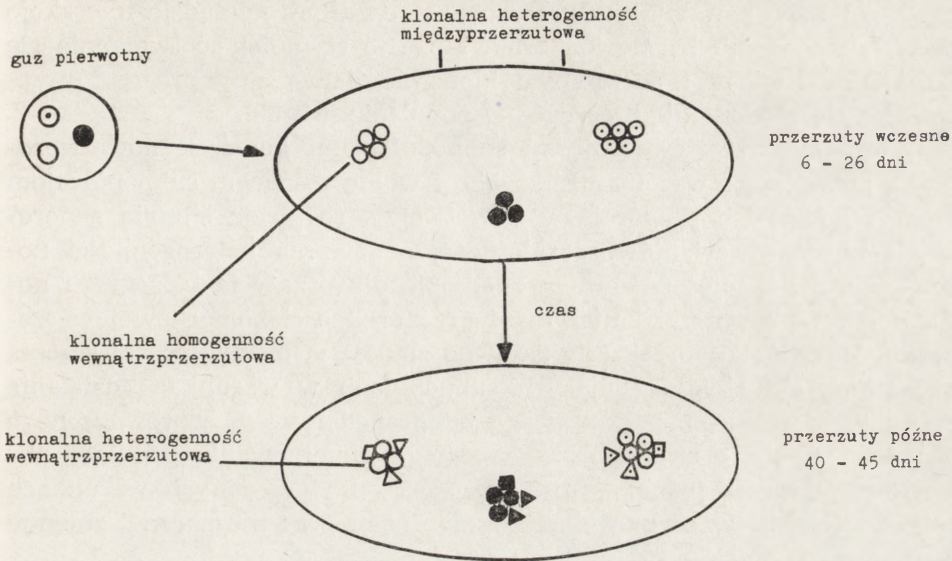
Zjawisko niestabilności fenotypu przerzutowego subpopulacji monoklonalnej występuje również *in vivo*. Większość spontanicznych przerzutów powstaje na skutek proliferacji pojedynczej komórki nowotworowej [55] tak, że większość przerzutów jest pochodzenia klonalnego. Wzrost pojedynczego przerzutu *in vivo* jest więc sytuacją podobną do rozrostu klonalnego *in vitro*. Powstaje w związku z tym pytanie, czy komórki pojedynczego klonalnego przerzutu są identyczne pod względem fenotypu przerzutowego, czy też podobnie jak przy wzroście pojedynczego



Ryc. 3. Niestabilność fenotypowa subpopulacji klonalnej i jej stabilizacja w wyniku interakcji między subpopulacjami według [49], zmodyfikowane

klonu *in vitro* szybko generują odmiany komórkowe o różnej zdolności do przerzutowania. Izolując klony z wczesnych przerzutów (6-25-dniowych) czerniaka B16 stwierdzono, że klony izolowane z tego samego przerzutu miały nieodróżnialny potencjał przerzutowy, co określono jako klonalną homogenność wewnątrzprzerutową (ryc. 4).

Wczesne przerzuty B16 składały się więc z komórek o jednakowym fenotypie przerzutowym, natomiast w miarę wzrostu z różnych przerzutów (40-45-dniowe) można było wyizolować z tego samego przerzutu 2 lub więcej subpopulacji klonalnych o różnej zdolności do przerzutowania — heterogenność wewnątrzprzerutowa [50]. Zjawisko niestabilności fenotypu przerzutowego klonu rosnącego w izolacji od innych klonów występuje więc zarówno *in vitro*, jak i *in vivo*. Możliwe, że dotyczy ono również innych cech, oprócz zdolności do przerzutowania. Talmadge i współpr. [56] wykazali, że w klonalnych przerzutach spontanicznych czerniaka K1735 pojawiają się wczesnie warianty komórkowe o różni-



Ryc. 4. Powstawanie heterogenności wewnątrzprzerzutowej w miarę wzrostu prze-
rzutu pochodzenia klonalnego, opracowane na podstawie [50, 56]

cowanym fenotypie przerzutowym, jak i zróżnicowanej wrażliwości na leki przeciwnowotworowe.

Stabilność fenotypowa poliklonalnych linii nowotworowych, jej brak w przypadku klonu rosnącego w izolacji oraz możliwość stabilizacji przez dodanie innych klonów z tego samego nowotworu sugerują występowanie w nowotworach poliklonalnych interakcji między składowymi subpopulacjami klonalnymi. W poliklonalnej populacji komórek nowotworowych wytwarza się stan równowagi, który ogranicza stopień tworzenia nowych wariantów komórkowych. Presja selekcyjna, zmniejszając różnorodność subpopulacji tworzących nowotwór poprzez eliminację subpopulacji nie przystosowanych, narusza równowagę między subpopulacjami klonalnymi. Jeżeli zmniejszenie różnorodności subpopulacji jest znaczne, to wówczas interakcje stabilizujące, utrzymujące stan równowagi, zanikają, co z kolei powoduje, że subpopulacje przeżywające wykazują znaczną niestabilność i szybko generują nowy zbiór wariantów o zróżnicowanych właściwościach. Wraz z upływem czasu nowo powstające warianty zatrzymują generowanie dalszych wariantów, osiągając stan równowagi, który trwa do następnej presji selekcyjnej [49, 51].

Brak efektu stabilizującego wystąpi również w przypadku izolacji pojedynczego klonu i hodowania go oddzielnie oraz w przypadku procesu przerzutowania. W guzie pierwotnym interakcje między heterogennymi składowymi subpopulacjami klonalnymi zapewniają stabilność fenoty-

pową. W nowo powstającym przerzucie w odległym narządzie interakcje będą osłabione lub będzie ich brak. Może to stymulować tworzenie się nowych wariantów i początkowo klonalnie homogeny przerzut przekształca się w klonalnie heterogenną populację [51, 56].

Interakcje wzrostowe między subpopulacjami komórek nowotworowych, pozwalające współistnieć szybko i wolno rosnącym subpopulacjom oraz zachować ich proporcje w nowotworze, regulacja stopnia generowania nowych wariantów w zależności od stopnia heterogenności nowotworu, mogą mieć zasadnicze znaczenie dla przeżycia i progresji nowotworu. Wytworzenie i utrzymanie różnorodności komórkowej w szerokim, lecz stabilnym zakresie zarówno zmniejsza możliwość zniszczenia wszystkich aktualnie istniejących subpopulacji w warunkach działania czynnika niszczącego, pochodzącego od gospodarza czy wprowadzonego podczas leczenia, a równocześnie zapobiega zdominowaniu populacji nowotworowej przez jedną, „super przystosowaną” w danych warunkach subpopulację, która szybko uległaby eliminacji przy nieznaczącej zmianie warunków środowiska [51].

Wyniki badań ostatnich lat, wykazujące heterogenność komórek nowotworowych, oddziaływanie między ich subpopulacjami oraz wskazujące na możliwość współpracy między komórkami w procesie przerzutowania czy regulację stopnia tworzenia nowych wariantów komórkowych, rysują nowy obraz nowotworu, który przeczy anarchiczności progresji nowotworowej. Ukazują one nowotwór złośliwy jako zorganizowaną społeczność komórek rządzących się swoimi prawami. Pozwalają zrozumieć stopień trudności, jaki trzeba pokonać, chcąc uzyskać sukces w leczeniu nowotworów. Wskazują na potrzebę stworzenia nowych strategii leczenia, które byłyby w stanie obejść problem tworzenia i utrzymywania heterogenności i w konsekwencji oporności na leczenie.

Prototypy takich programów terapii pojawiają się już zarówno w badaniach doświadczalnych, jak i w klinice. W praktyce klinicznej zaobserwowano lepszą skuteczność terapii wielolekowej oraz kombinowanej, polegającej na stosowaniu chemioterapii, radioterapii czy immunoterapii oprócz interwencji chirurgicznej. Poste [51] sugeruje opierając się na koncepcji równowagi maksymalne skrócenie czasu między poszczególnymi fazami terapii tak, aby zniszczyć nie tylko te komórki, które przeżyły pierwszą fazę leczenia, ale i nowo powstałe warianty. Za prototypy terapii pozwalających obejść heterogenność nowotworów może służyć wprowadzenie przez Fidlera aktywowanych makrofagów do niszczenia komórek nowotworowych oraz zastosowanie przez Folkmana [29], heparyny i hydrokortyzonu do hamowania procesu unaczynienia nowotworu. Zaletą pierwszego sposobu jest to, że aktywowane makrofagi, nie niszcząc komórek prawidłowych, zabijają komórki nowotworowe, niezależnie od

ich właściwości, tj. obecności antygenów H-2, antygenów towarzyszących nowotworom, antygenów wirusów onkogennych, fazy cyklu komórkowego, oporności na limfocyty T, komórki NK czy leki oraz zdolności do przerzutowania [13, 16]. W związku z tym, w odróżnieniu od limfocytów T czy komórek NK, na które stosunkowo łatwo jest uzyskać oporność, wielokrotne podawanie aktywowanych makrofagów nie prowadzi do powstania oporności [17]. Drugi sposób oparty jest na koncepcji przyjmującej, że progresywny wzrost nowotworu jest zależny od angiogenezy [19]. Hamując tworzenie naczyń uniemożliwia się rozrost nowotworu oraz rozsiew. Folkman i współpr. [18], stosując kombinację heparyny i hydrokortyzonu, uzyskiwali hamowanie angiogenezy i całkowitą regresję wielu zaawansowanych nowotworów łącznie z ludzkimi pasażowanymi u myszy nude. W odróżnieniu od innych form terapii, w tej celem niszczone przez lek są nie komórki nowotworowe, lecz komórki prawidłowe gospodarza, tj. komórki śródbłonna nowych włóściń. Heterogenność nowotworu nie odgrywa tu roli, podobnie jak przy poprzednio opisanym terapii.

Jest możliwe, że dalsze badania wykażą ograniczenia tych programów leczenia i spotka je los podobny do innych, które już wielokrotnie pojawiały się w literaturze i w początkowej fazie były obiecujące. Istotne jest jednak to, że ukazują one możliwość tworzenia strategii terapeutycznych, pozwalających obejść heterogenność i powstawanie oporności na leczenie.

PODZIĘKOWANIA

Dziękuję serdecznie prof. drowi Czesławowi Radzikowskiemu i drowi Januszowi Rakowi za uwagi dotyczące tekstu niniejszej pracy oraz mgr Ewie Ziolo za wykonanie rysunków.

LITERATURA

- [1] ALTEVOGT P., HOEGEN P., SCHIRRMACHER V., Immunoresistant metastatic tumor variants can re-express their tumor antigen after treatment with DNA methylation-inhibiting agents, *Int. J. Cancer*, **38**: 707-711, 1986.
- [2] BAETSELIER P., ROOS E., BRYL L., REMELS L., GOBERT M., DEKEL D., SEGAL S., FELDMAN M., Nonmetastatic cells acquire metastatic properties following somatic hybridization with normal cells, *Cancer Metastasis Rev.*, **3**: 5-24, 1984.
- [3] BAETSELIER P., ROOS E., BRYL L., REMELS L., FELDMAN M., Generation of metastatic cells via somatic cell fusion: A possible mechanism for

- tumor progression in vivo, [w] *Biochemistry and molecular genetics of cancer metastasis*, wyd. Lapis K., Liotta L., Rabson A., Martinus Nijhoff Publ., Boston, 185-199, 1986.
- [4] BOSSLET K., SCHIRRMACHER V., High frequency generation of new immunoresistant variants during metastasis of a clone murine tumor line, *Int. J. Cancer*, **29**: 195-202, 1982.
 - [5] CIFONE M. A., FIDLER I. J., Increasing metastatic potential is associated with increasing genetic instability of clones isolated from murine neoplasms, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **78**: 6949-6952, 1981.
 - [6] CHORAŻY M., Sequence rearrangements and genome instability: a possible step in carcinogenesis, *J. Canc. Res. Clin. Oncol.*, **109**: 159-172, 1985.
 - [7] DENNIS J., DONAGHUE M., FLORIAN M., KERBEL R. R., Apparent reversion of stable in vitro genetic markers detected in tumour cells from spontaneous metastases, *Nature*, **296**: 242-245, 1981.
 - [8] DEXTER D. L., KOWALSKI H. M., BLAZAR B. A., FLIGIEL Z., VOGEL R., HEPPNER G. H., Heterogeneity of tumor cells from a single mouse mammary tumor, *Cancer Res.*, **38**: 3174-3181, 1978.
 - [9] DUŚ D., DEBRAY H., STRZAŁA L., RAK J., KUŚNIERCZYK H., MONTREUIL J., RADZIKOWSKI C., Lectin resistant variants of mouse Lewis lung carcinoma cells. I. Selection and in vivo properties, *oddano do druku* 1987.
 - [10] FIDLER I. J., Metastasis. Quantitative analysis of distribution and fate of tumor emboli labeled with 5-(¹²⁵J) iodo-2 deoxyuridine, *J. Natl. Cancer Inst.*, **45**: 773-779, 1970.
 - [11] — Selection of successive tumor lines for metastasis, *Nature*, **242**: 148-149, 1973.
 - [12] FIDLER I. J., KRIPKE M. L., Metastasis results from pre-existing variant cells within a malignant tumor, *Science*, **197**: 893-895, 1977.
 - [13] FIDLER I. J., Recognition and destruction of target cells by tumoricidal macrophages, *Isr. J. Med. Sci.*, **14**: 177-191, 1978.
 - [14] FIDLER I. J., HART I. R., Biological diversity in metastatic neoplasma: origins and implications, *Science*, **217**: 990-1003, 1982.
 - [15] — The development of biological diversity and metastatic potential in malignant neoplasms, *Oncodevelopmental Biol. Med.*, **4**: 161-176, 1982.
 - [16] FIDLER I. J., POSTE C., Macrophage mediated destruction of malignant tumor cells and new strategies for therapy of metastatic disease, *Springer Semin. Immunopathol.*, **5**: 161-174, 1982.
 - [17] FOGLER W. E., FIDLER I. J., Nonselective destruction of murine neoplastic cell by syngeneic tumorocidal macrophages, *Cancer Res.*, **45**: 14-18, 1985.
 - [18] FOLKMAN J., LANGER R. L., LINHARDT R. J., HANDELSCHILD C., TAYLOR S., Angiogenesis inhibition and tumor regression caused by heparin or a heparin fragment in the presence of cortisone, *Science*, **221**: 719-725, 1983.
 - [19] FOLKMAN J., Tumor angiogenesis, *Adv. Cancer Res.*, **43**: 175-203, 1985.
 - [20] FOULDS L., *Neoplastic development*, Academic Press, New York 1975.
 - [21] GOLDENBERG D. M., PAVIA R. A., TSAO M. C., In vivo hybridization of human tumor and normal hamster cells, *Nature*, **250**: 649-651, 1974.
 - [22] GRIFFIN J. E., ALLMAN D. R., DURANT J. L., WILSON J. D., Variation in steroid 5-reductase activity in cloned skin fibroblasts, *J. Biol. Chem.*, **256**: 3662-3666, 1981.
 - [23] HARRIS J. F., CHAMBERS A. F., HILL R. P., LING V., Metastatic variants

- are generated spontaneously at a high rate in mouse KHT tumor, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **79**: 5547-5551, 1982.
- [24] HART I. R., FIDLER I. J., The implications of tumor heterogeneity for studies on the biology and therapy of cancer metastasis, *Biochim. Biophys. Acta*, **651**: 37-50, 1981.
- [25] HENSON D. E., Heterogeneity in tumors, *Arch. Pathol. Lab. Med.*, **106**: 596-598, 1982.
- [26] HEPPNER G. H., Tumor subpopulation interactions, [w] Tumor cell heterogeneity, wyd. Owens A. H., Coffey B. S., Baylin S., Academic Press, New York, 225-235, 1982.
- [27] HEPPNER G. H., MILLER B. E., MILLER F. R., Tumor subpopulations interactions in neoplasma, *Biochim. Biophys. Acta*, **695**: 215-226, 1983.
- [28] KERBEL R. S., LAGARDE A. E., DENNIS J. W., DONAGHUE T. P., Spontaneous fusion in vivo between normal and tumor cells: possible contribution to tumor progression and metastasis studied with lectin-resistant tumor, *Mol. Cell Biol.*, **3**: 523-538, 1983.
- [29] KERBEL R. S., Prototypes of new therapies to combat the problems of tumor cell heterogeneity and the development of resistant variants in the treatment of cancer metastases, *Accomplishments Oncology*, **1**: 200-210, 1986.
- [30] KERBEL R. S., FROST P., LITEPLE R., CARLOW D. A., ELLIOTT B. E., Possible epigenetic mechanisms of tumor progression: induction of high-frequency heritable but phenotypically unstable changes in the tumorigenic and metastatic properties of tumor cell populations by 5-azacytidine treatment, *J. Cellul. Physiol. Suppl.*, **3**: 87-97, 1984.
- [31] LAGARDE A., Sporadic somatic fusion between MDAY-D2 murine tumor cells and DBA/2 host cells: role in metastasis, *Int. J. Canc.*, **37**: 905-910, 1986.
- [32] LING V., CHAMBERS A. F., HARRIS J. F., HILL R. R., Dynamic heterogeneity and metastasis, *J. Cellul. Physiol. Suppl.*, **3**: 99-103, 1984.
- [33] LITEPLO R., FROST P., DONAGHUE T. P., KERBEL R. S., Characterization of in vitro immunoselected variants from highly metastatic murine tumor for alterations in malignant behavior in vivo, *Int. J. Cancer*, **33**: 669-675, 1984.
- [34] MILAS L., HUNTER N., MASON K., WITHERS H. R., Immunological resistance to pulmonary metastases in C3Hf/bu mice bearing syngeneic fibrosarcoma of different sizes, *Cancer Res.*, **34**: 61-71, 1974.
- [35] MILLER B. E., MILLER F. R., LEITH J., HEPPNER G. H., Growth interaction in vivo between tumor subpopulations derived from a single mouse mammary tumor, *Cancer Res.*, **40**: 3977-3981, 1980.
- [36] MILLER B. E., MILLER F. R., HEPPNER G. H., Interactions between tumor subpopulations affecting their sensitivity to antineoplastic agents cyclophosphamide and metotrexate, *Cancer Res.*, **41**: 4378-4381, 1981.
- [37] MILLER B. E., McINERNEY D., JACKSON D., MILLER F. R., Metabolic cooperation between mouse mammary tumor subpopulations in threedimensional collagen gel cultures, *Cancer Res.*, **26**: 89-93, 1986.
- [38] MILLER F. R., MILLER B. E., HEPPNER G. H., Characterization of metastatic heterogeneity among subpopulations of a single mouse mammary tumor: heterogeneity in phenotypic stability, *Invasion Metastasis*, **3**: 22-31, 1983.

- [39] MILLER F. R., Tumor subpopulation interactions in metastasis, *Invasion Metastasis*, **3**: 234-242, 1983.
- [40] MILLER F. R., MILLER B. E., HEPPNER G. H., Subpopulation interactions in drug resistance, metastasis, and tumor progression, *Colloque INSERM*, **137**: 69-74, 1986.
- [41] NEWCOMB E. W., SILVERSTEIN S. C., SILAGI S., Malignant mouse melanoma cells do not form tumors when mixed with cells of a non malignant subclone: relationship between plasminogen activator expression by tumor cells and the host immune response, *J. Cell Physiol.*, **95**: 169-177, 1978.
- [42] NICOLSON G. L., Cancer metastasis: Organ colonization and the cell-surface properties of malignant cells, *Biochim. Biophys. Acta*, **695**: 113-176, 1982.
- [43] — Generation of phenotypic diversity and progression in metastatic tumor cells, *Cancer Metastasis Rev.*, **3**: 25-42, 1984.
- [44] — Tumor progression, oncogens and evolution of metastatic phenotypic diversity, *Clin. Expl. Metastasis*, **2**: 85-105, 1984.
- [45] NOWELL P. C., The clonal evolution of tumor cell populations, *Science*, **194**: 23-28, 1976.
- [46] OLSSON L., FORCHHAMMER J., Induction of the metastatic phenotype in a mouse tumor model by 5-azacytidine and characterization of an antigen associated with metastatic activity, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **81**: 3389-3393, 1984.
- [47] PETERSON J. A., BARTHOLOMEW J. C., STAMPFER M., CERIANI R. L., Analysis of expression of human mammary epithelial antigens in normal and malignant breast cells at the single cell level by flow cytofluorimetry, *Exp. Cell Biol.*, **49**: 1-14, 1981.
- [48] PETERSON J. A., CERIANI R. L., BLANK E. W., OSVALDO L., Comparison of rate of phenotypic variability in surface antigen expression in normal and cancerous breast epithelial cells, *Cancer Res.*, **43**: 4291-4296, 1983.
- [49] POSTE G., DOLL J., FIDLER I. J., Interaction between clonal subpopulations affects the stability of the metastatic phenotype in polyclonal populations of B16 melanoma cells, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **78**: 6226-6230, 1981.
- [50] POSTE G., TZENG J., DOLL J., GREIG R., RIEMAN D., ZEIDMAN I., Evolution of tumor cell heterogeneity during progressive growth of individual lung metastases, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **79**: 6974-6978, 1982.
- [51] POSTE G., GREIG R., The experimental and clinical implications of cellular heterogeneity in malignant tumors, *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, **106**: 159-170, 1983.
- [52] RAK J., KUŚNIERCZYK H., STRZĄDAŁA L., RADZIKOWSKI C., Transplantable mouse 16/c mammary adenocarcinoma as a model in experimental cancer therapy. I. Kinetics of growth and spread, *Arch. Immunol. Ther. Exp.*, 1987 (w druku).
- [53] RIGGS A. D., JONES P. A., 5-methylcytosine, gene regulation, and cancer, *Adv. Cancer Res.*, **40**: 1-25, 1983.
- [54] SCHIRRMACHER V., Cancer metastasis: Experimental approaches, theoretical concepts, and impacts for treatment strategies, *Adv. Cancer Res.*, **43**: 1-64, 1985.
- [55] TALMADGE J. E., WOLMAN S. R., FIDLER I. J., Evidence for clonal origin of spontaneous metastases, *Science*, **217**: 361-363, 1982.
- [56] TALMADGE J. E., BENEDICT K., MADSEN J., FIDLER I. J., Development

of biological diversity and susceptibility to chemotherapy in murine cancer metastases, *Cancer Res.*, **44**: 3801-3805, 1984.

- [57] WEISS L., Metastatic inefficiency, [w] *Tumor invasion and metastasis*, wyd. Liotta L. A., Hart I. R., Martinus Nijhoff Publ., Hague, 81-99, 1982.

Otrzymano: 15 czerwca 1987.

Przyjęto: 5 sierpnia 1987.

Adres autora: ul. Czerska 12, 53-114 Wrocław.

Annual Review of Cell Biology

Volume 3, November 1987

Editor: George E. Palade

Associate Editors: Bruce M. Alberts, James A. Spudich.

CONTENTS (Planned contents, subject to change.)

- **mRNA Processing in Mitochondria**, *B. Dujon*
- **Replication of Plasmids Derived from Bovine Papilloma Virus Type 1 and Epstein-Barr Virus in Cells in Culture**, *Joan Mecsas and Bill Sugden*
- **Constitutive and Regulated Secretion**, *Teresa Lynn Burgess and Regis B. Kelly*
- **Cell Adhesion in Morphogenesis**, *David R. McClay and Charles A. Ettensohn*
- **Ubiquitin-Mediated Pathways for Intracellular Proteolysis**, *Martin Rechsteiner*
- **Growth and Differentiation in the Haemopoietic System**, *T. M. Dexter and E. Spooner*
- **Oligosaccharide Signalling in Plant Cells**, *Clarence A. Ryan*
- **Cell Surface Receptors for Extracellular Matrix Molecules**, *Clayton A. Buck and Alan F. Horwitz*
- **Cell Transformation by the Viral src Oncogene**, *Richard Jove and Hidesaburo Hanafusa*
- **Laminin and Other Basement Membrane Components**, *George R. Martin and Rupert Timpl*
- **Early Events in the Mammalian Fertilization Pathway**, *Paul M. Wassarman*
- **Molecular Aspects of B-Lymphocyte Activation**, *Anthony L. DeFranco*
- **Generation of Protein Isoform Diversity by Alternate Splicing: Mechanistic and Biological Implications**, *Athena Andreadis, Maria E. Gallego, and Bernardo Nadal-Ginard*
- **Growth Factor Regulation of Normal and Abnormal Growth**, *Thomas F. Deuel*
- **Structure and Chemistry of Gap Junctions: Their Role in Development**, *Norton B. Gilula*
- **Myosin**, *James A. Spudich*
- **Indexes: Subject Index; Cumulative Indexes of Contributing Authors and Chapter Titles, Volumes 1-3**

NAJĄDRZE SSAKÓW. I. BUDOWA I ROZWÓJ NAJĄDRZA *

EPIDIDYMIS OF MAMMALS. I. STRUCTURE AND DEVELOPMENT
OF EPIDIDYMIS

Lidia RÓŻEWICKA i Maria LASZCZYŃSKA

Zakład Histologii i Embriologii, Pomorska Akademia Medyczna, Szczecin

Streszczenie: Przedstawiono aktualne wiadomości na temat budowy najądrza u kilku gatunków zwierząt i człowieka. Omówiono morfologię i ultrastrukturę komórek urzęsionych i nieurzęsionych kanalików odprowadzających, a także komórek głównych, podstawnych, wąskich, szczytowych, jasnych oraz wewnątrz nabłonkowych limfocytów i makrofagów nabłonka przewodu najądrza. Przedstawiono rozwój najądrza oraz rolę androgenów w procesie różnicowania się tego narządu i jego komórek.

Summary: Actual information on the structure of epididymis in individual species of animals and man has been presented. The discussed morphology and ultrastructure have covered the ciliated and nonciliated cells of efferent ductules as well as the principal, basal, narrow, apical and light cells and also intraepithelial lymphocytes and macrophages in the epithelium of ductus epididymis. The development of epididymis and the role of androgens in this process and also the role of these hormones played in differentiation of cells in this organ have been presented.

WPROWADZENIE

Plemniki opuszczające jądro nie są w pełni dojrzałymi komórkami rozrodczymi. Nie wykazują jeszcze ruchu postępowego i nie są zdolne do zapłodnienia komórki jajowej. Najądrze jest narządem, którego funkcją jest wytwarzanie dla nich odpowiedniego środowiska do dojrzewania i przeżywania. Pierwszy z tych procesów ma miejsce w głowie najądrza, drugi natomiast w trzonie i ogonie. Te ostatnie odcinki są jedno-

* Praca wykonana w ramach problemu CPBP 05.06.1.2.3.

częście magazynem plemników. Wiele substancji syntetyzowanych przez komórki nabłonkowe kanalików odprowadzających i przewodu najądrza lub pobieranych przez nie z krwi ma stymulujący wpływ na ruchliwość plemników, w procesie dojrzewania wiąże się z ich powierzchnią, a także warunkuje prawidłową ich przeżywalność w czasie magazynowania.

Badania ostatnich lat przyniosły wiele nowych informacji związanych z funkcją komórek nabłonkowych najądrza i z procesem dojrzewania plemników. Zainteresowanie tym odcinkiem układu płciowego wynika z dwóch przyczyn: niepłodności związanej z mało dotąd docenianymi zaburzeniami dojrzewania plemników w najądrzu oraz z prób zahamowania dojrzewania plemników w najądrzu w celu uzyskania antykoncepcji.

Mało jest prac poruszających tematykę najądrza i zagadnień związanych z jego funkcją. Opracowanie niniejsze jest próbą przedstawienia podstawowych wiadomości o tym narządzie. Niektóre zagadnienia z powodu obszerności materiału z konieczności potraktowane zostały skrótowo.

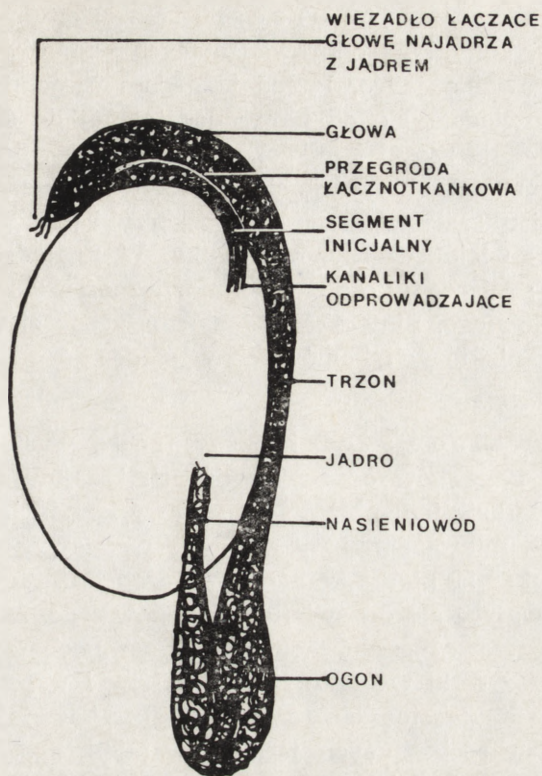
BUDOWA ANATOMICZNA

Najądrze przylega do grzbietowo bocznej powierzchni jądra i jest połączone z siecią jądra (rete testis) kanalikami odprowadzającymi (ductuli efferentes). U niektórych zwierząt, np. królika [30] i buhaja [19], występuje między siecią jądra a kanalikami odprowadzającymi dodatkowo zewnątrzjądrowa sieć kanalików (extratesticular rete testis).

Anatomicznie najądrze dzieli się na głowę (caput), trzon (corpus) i ogon (cauda) [15, 27, 30] (ryc. 1). Kanaliki odprowadzające uchodzą do przewodu najądrza w głowie tego narządu. U człowieka [27] jest ich 8-12 i same stanowią dużą część głowy. U szczura [24, 43] i chomika [15] dochodzą one do początkowego odcinka głowy najądrza.

U wielu gatunków przednia część głowy przedzielona jest niecałkowicie łącznotkankową przegrodą, a w najbardziej przednim odcinku połączona jest z jądrem za pomocą cienkiego „wiązadła” [39] (ryc. 1). Pozostałą część najądrza, poza kanalikami odprowadzającymi, stanowi pojedynczy, długi i mocno skręcony przewód najądrza (ductus epididymis). Długość jego po wyprostowaniu wynosi u człowieka 4-5 m [11, 41]. Liczne pętle tego przewodu podtrzymuje tkanka łączna, a szczególnie licznie występujące tu włókna kolagenowe.

U człowieka i różnych gatunków zwierząt opisywane są szczegółowe podziały najądrza na odcinki i strefy w zależności od ich morfologicznej budowy i funkcji. Holstein [26] wyróżnia aż 8 stref w najądrzu człowie-



Ryc. 1. Schemat budowy najądrza

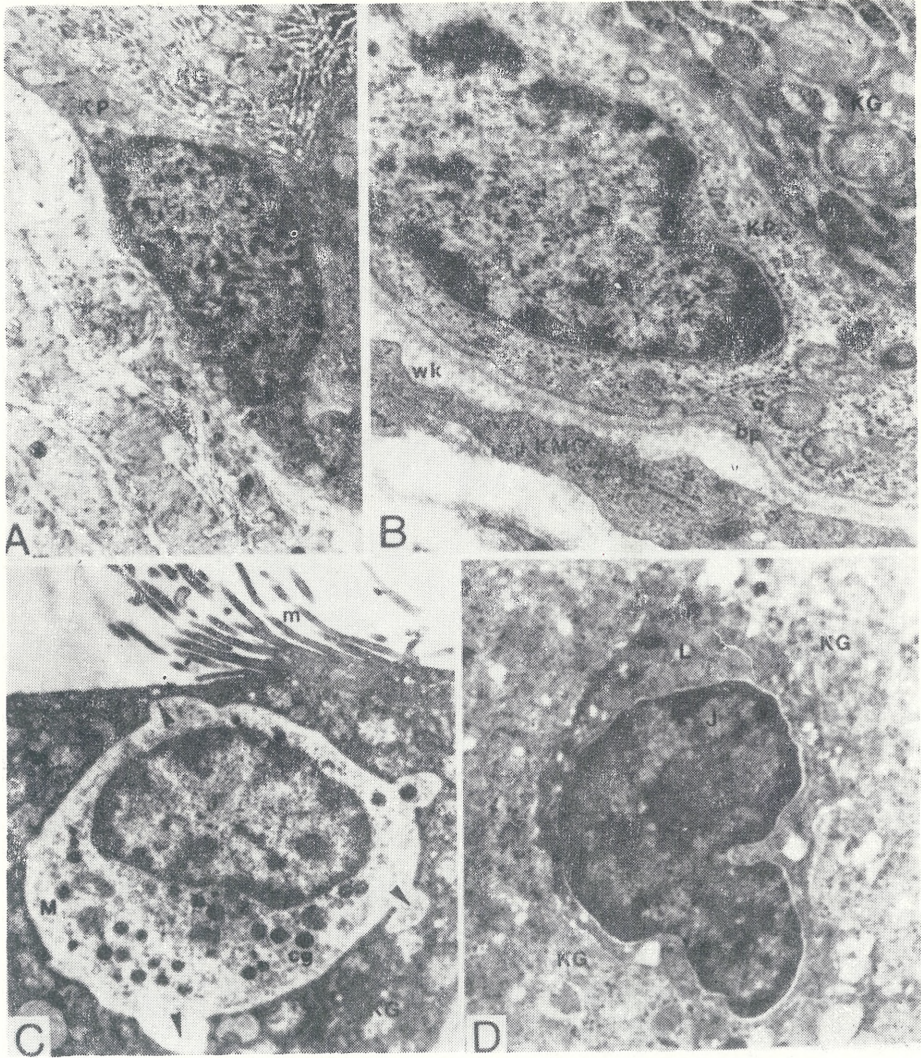
ka. U królika Nicander [37] oraz Jones i wsp. [30] również wyróżniają 8 odcinków. U świnki morskiej [22, 28] najądrze dzieli się na 7 stref, a u buhaja, barana, ogiera [38] i szczura [43] na 6.

Z cytowanych tu prac wynika, że najądrze mimo swojej niepozornej wielkości jest narządem bardzo zróżnicowanym morfologicznie.

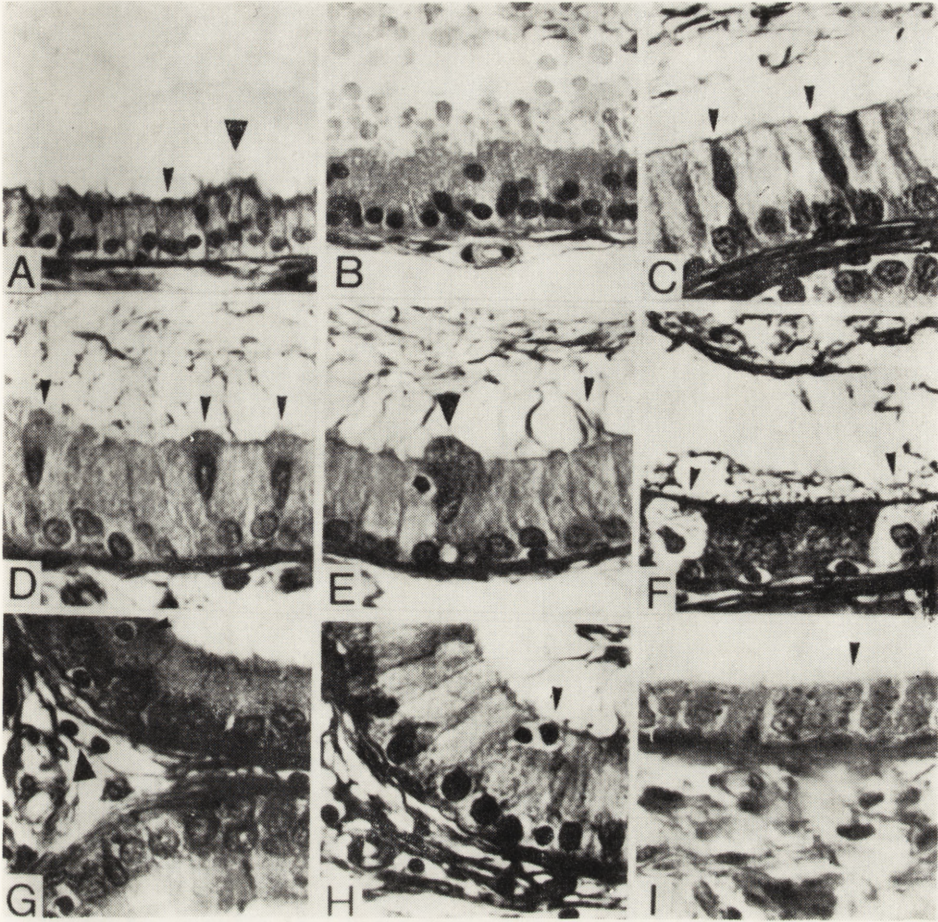
BUDOWA MORFOLOGICZNA

KANALIKI ODPROWADZAJĄCE

Kanaliki odprowadzające dzielą się na dwa odcinki: proksymalny i dystalny. Ściana ich zbudowana jest z walcowatego nabłonka, błony podstawnej i komórek mięśniowych gładkich, tworzących 1 lub 2 pokłady. W nabłonku wyróżnia się 4 typy komórek: walcowate urzęsione i nieurzęsione, podstawne i wewnątrz nabłonkowe limfocyty.

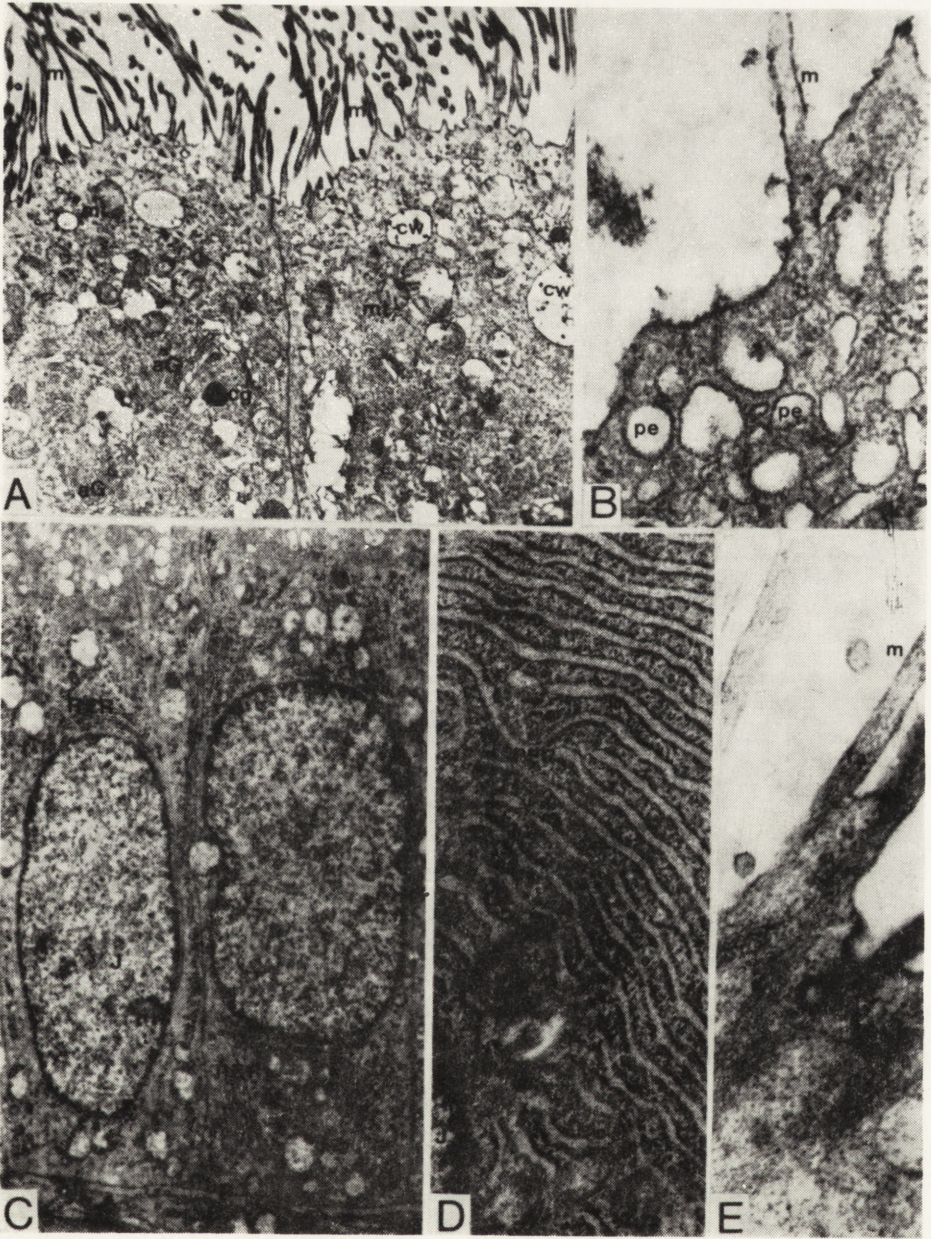


Ryc. 4. Komórki podstawne, makrofag i limfocyt nabłonka głowy najądrza szczura. A — Fragment środkowej części komórki podstawnej; KP — komórka podstawna, KG — komórka główna, J — jądro komórki podstawnej. Powiększenie 7500 \times . B — Fragment komórki podstawnej; KP — komórka podstawna, J — jądro komórki podstawnej, bp — błona podstawna, wk — włókna kolagenowe, KMG — komórka mięśniowa gładka, KG — komórka główna. Powiększenie 30 000 \times . C — Makrofag w szczytowej części nabłonka głowy najądrza; M — makrofag, J — jądro makrofaga, cg — ciała gęste (strzałki — pseudopodia), KG — komórka główna, m — mikrokosmki komórki głównej. Powiększenie 6000 \times . D — Limfocyt w nabłonku głowy najądrza; L — limfocyt, J — jądro limfocyty, KG — komórka główna. Powiększenie 6800 \times

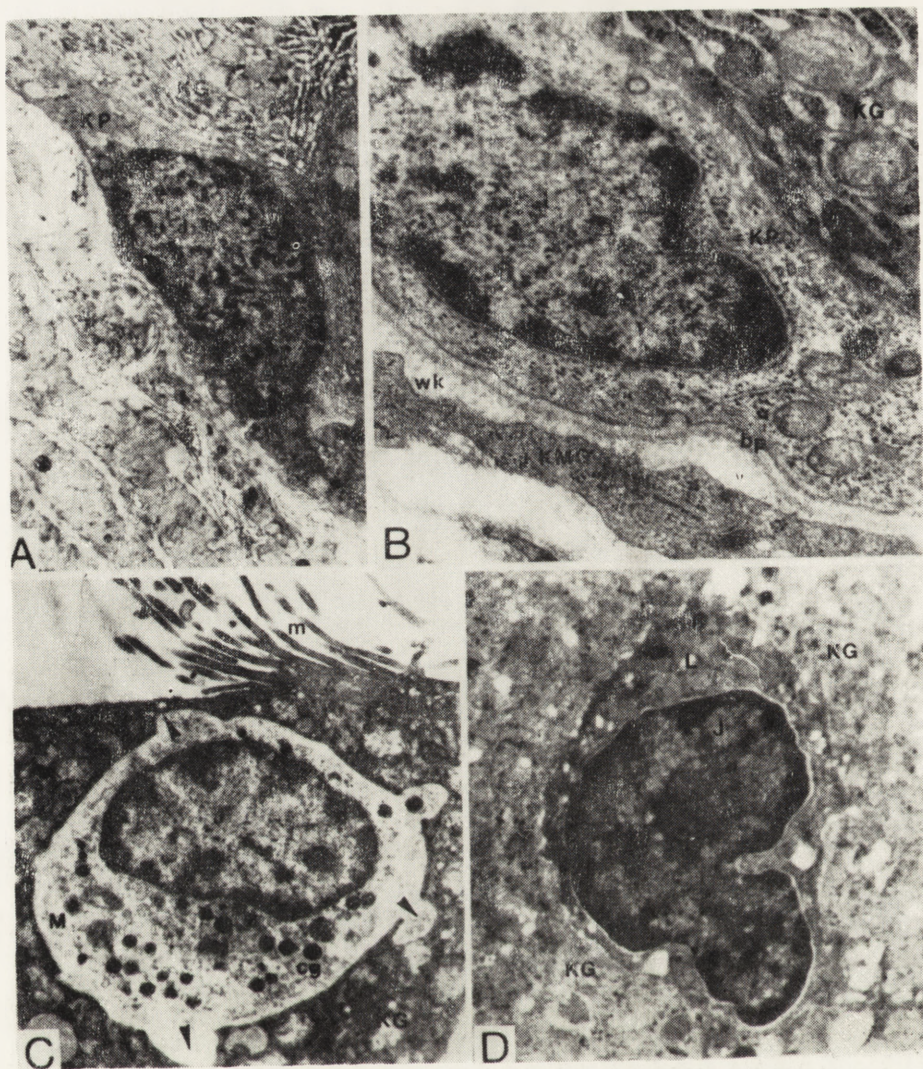


Ryc. 2. Komórki nabłonka kanalików odprowadzających i przewodu najądrza szczu-
 ra. A — nabłonek części proksymalnej kanalików odprowadzających. Komórki
 urzęsione (duża strzałka), komórki nieurzęsione (mała strzałka). HE. Powiększenie
 430 \times . B — Nabłonek części dystalnej kanalików odprowadzających. Komórki
 z cytoplazmatycznymi uwypukleniami i kulista, kwasochłonna wydzielina w świetle.
 HE. Powiększenie 680 \times C — Nabłonek segmentu inicjalnego przewodu najądrza.
 Komórki główne i komórki wąskie (strzałki). PAS. Powiększenie 680 \times . D —
 Komórki główne i komórki szczytowe (strzałki) nabłonka głowy najądrza. PAS.
 Powiększenie 680 \times . E — Komórka szczytowa wypełniona wydzieliną (duża strzałka).
 Wysokie stereocilia na powierzchni komórek głównych nabłonka głowy najądrza
 (mała strzałka). PAS. Powiększenie 680 \times . F — Komórki główne i komórki
 jasne (strzałki) w nabłonku ogona najądrza. PAS. Powiększenie 680 \times . G —
 Wewnątrz nabłonkowe limfocyty (małe strzałki) w nabłonku ogona najądrza oraz
 limfocyty okołokanalikowej tkanki łącznej (duża strzałka). PAS. Powiększenie
 680 \times . H — Limfocyt i makrofag (strzałka) w nabłonku głowy najądrza. PAS.
 Powiększenie 680 \times . I — Sześcienny nabłonek dystalnej części ogona najądrza.
 Krótkie stereocilia (strzałka). PAS. Powiększenie 680 \times

Ryc. 3. Komórki główne nabłonka głowy najądrza szczura. A — Szczytowa część dwóch komórek głównych; m — mikrokosmki, mt — mitochondria, cw — ciała wielowakuolarne, cg — ciała gęste, aG — aparat Golgiego. Powiększenie 7500 ×. B — Fragment szczytowej części komórki głównej; m — mikrokosmki, pe — pęcherzyki endocytarne. Powiększenie 60 000 ×. C — Przypodstawna część dwóch komórek głównych; RER — siateczka endoplazmatyczna ziarnista, J — jądro komórkowe, bp — błona podstawna. Powiększenie 6000 ×. D — Fragment przyjądrowej części komórki głównej; RER — siateczka endoplazmatyczna ziarnista, mt — mitochondria, J — jądro komórkowe. Powiększenie 22 500 ×. E — Fragment szczytowej części komórki głównej; m — mikrokosmki, fa — filamenty aktynowe. Powiększenie 45 000 ×



Ryc. 3



Ryc. 4. Komórki podstawne, makrofag i limfocyt nabłonka głowy najadrza szczura. A — Fragment środkowej części komórki podstawnej; KP — komórka podstawna, KG — komórka główna, J — jądro komórki podstawnej. Powiększenie 7500 \times . B — Fragment komórki podstawnej; KP — komórka podstawna, J — jądro komórki podstawnej, bp — błona podstawna, wk — włókna kolagenowe, KMG — komórka mięśniowa gładka, KG — komórka główna. Powiększenie 30 000 \times . C — Makrofag w szczytowej części nabłonka głowy najadrza; M — makrofag, J — jądro makrofaga, cg — ciała gęste (strzałki — pseudopodia), KG — komórka główna, m — mikrokosmki komórki głównej. Powiększenie 6000 \times . D — Limfocyt w nabłonku głowy najadrza; L — limfocyt, J — jądro limfocytu, KG — komórka główna. Powiększenie 6800 \times

Zbudowany jest z walcowatego nabłonka leżącego na błonie podstawnej i z tzw. okołokanalikowej ściany, w której skład wchodzi komórki mięśniowe gładkie, włókna kolagenowe i sprężyste [35].

W nabłonku przewodu najądrza wyróżnia się 6 typów komórek: główne, podstawne, wąskie, szczytowe, jasne oraz wewnątrz nabłonkowe limfocyty i makrofagi [1, 2, 15, 19, 24, 43, 49, 51, 55]. Komórki te są różnie rozmieszczone u poszczególnych gatunków zwierząt i człowieka w głowie, trzonie i ogonie najądrza. Obserwuje się również morfologiczne i ultrastrukturalne podobieństwo tych komórek u poszczególnych gatunków zwierząt i człowieka [15, 19, 22, 29, 30, 43, 53].

K o m ó r k i g ł ó w n e występują we wszystkich odcinkach przewodu najądrza u człowieka i zwierząt i są najliczniej występującymi komórkami w nabłonku [13, 15, 19, 24, 27, 28, 30]. Zajmują całą jego wysokość i są najwyższe w segmencie początkowym, a najniższe w ogonie najądrza [15, 18, 19, 28, 43] (ryc. 2C i 2I). Na powierzchni mają mikrokosmki zwane stereocyliami (ryc. 3A), które są wysokie w głowie, a niskie w ogonie najądrza (ryc. 2E i 2I). Badania w ME wykazały, że zawierają one podłużnie przebiegające pęczki filamentów aktynowych o średnicy 5-6 nm, które wnikają do cytoplazmy szczytowej części komórki (ryc. 3E). W apikalnej części komórki występują małe pęcherzyki endocytarne oraz wielopęcherzykowe ciała [8, 15, 19, 29, 30] (ryc. 3A i 3B). Jądro o dużej zawartości euchromatyny leży poniżej środkowej części komórki (ryc. 3C), a ponad nim występuje dobrze wykształcony aparat Golgiego i liczne ciała gęste, zawierające heterogenny materiał [14, 15, 30]. Niektórzy autorzy nazywają te ostatnie ciałkami lizosomopodobnymi [15]. Siateczka endoplazmatyczna ziarnista występuje głównie w bazalnej części komórki, a także w okolicy okołojądrowej [15] (ryc. 3C i 3D). W sąsiedztwie jej spotyka się również wolne rybosomy i polisomy oraz liczne mitochondria [14, 40]. U niektórych zwierząt obserwuje się w okolicy aparatu Golgiego krople lipidowe otoczone cysternami gładkiej siateczki endoplazmatycznej oraz, szczególnie w ogonie najądrza, różnej wielkości ciała mielinowe [30].

K o m ó r k i p o d s t a w n e występują we wszystkich odcinkach przewodu najądrza u człowieka i wielu gatunków zwierząt [13, 15, 19, 24, 27, 28, 30]. Są bardzo liczne w trzonie najądrza buhaja [19], a u człowieka [27], królika [30], chomika [15] i świnki morskiej [28] jest ich niewiele. Leżą na błonie podstawnej i nie dochodzą do światła kanalika. Są zwykle wciśnięte między podstawy komórek głównych. Owalne jądro o dużej zawartości heterochromatyny zajmuje większą część obszaru komórki. Otoczone jest jasną cytoplazmą ubogą w organele komórkowe (ryc. 4A i 4B). Aparat Golgiego występuje od strony kontaktu komórki

podstawnej z komórką główną [19, 50]. U niektórych zwierząt w komórkach tych występują krople lipidowe [19], a także filamenty aktynowe i pęcherzyki pinocytarne [16].

Komórki wąskie opisane zostały u szczura [50] i chomika [15] w odcinku początkowym głowy najądrza. Występuje tu ich niewiele. Są nieco zwężone u podstawy i rozszerzone w kierunku światła kanału. Mają wydłużone jądro zlokalizowane w szczytowej części komórki (ryc. 2C). Cytoplazma ich wykazuje dużą gęstość elektronową. W podjądrowej części komórki występuje duża liczba mitochondriów, a w szczytowej części wiele jasnych wakuoli [50].

Komórki szczytowe u szczura obserwuje się w głowie najądrza [43, 50], u buhaja w głowie i trzonie [19], a u świnki morskiej w odcinku początkowym i w proksymalnej części ogona najądrza [28]. Występuje ich niewiele i są wciśnięte między komórki główne. W mikroskopie świetlnym nie obserwuje się zdecydowanego połączenia z błoną podstawną [43]. Komórki te charakteryzują się rozszerzoną częścią szczytową, która od strony światła kanału ma wygląd rozplaszczonej kopułki. Pozostała część komórki jest długa i wąska. Owalne jądro zlokalizowane jest w środkowej lub górnej części komórki (ryc. 2D). U szczura komórki te obładowane są często PAS-dodatnią wydzieliną (ryc. 2E). W ME obserwuje się w ponadjądrowej części cytoplazmy dużą liczbę mitochondriów [19] i dobrze wykształcony aparat Golgiego. Dobrze rozwinięta jest również siateczka ziarnista i gładka, a w szczytowej cytoplazmie występuje zmienna liczba drobnych wakuoli.

Komórki jasne opisane zostały u szczura [24, 43, 50], chomika [15] i świnki morskiej [13]. U szczura niewiele ich stwierdza się w głowie i trzonie, a najliczniej występują w ogonie [5, 43]. Leżą na błonie podstawnej i dochodzą do światła przewodu. Na powierzchni mają nieliczne mikrokosmki, a jądro leży poniżej środkowej części komórki (ryc. 2F). Ultrastruktura komórek jasnych jest zróżnicowana w zależności od odcinka przewodu najądrza. U chomika [15] w głowie i trzonie najądrza jest szczególnie dobrze rozwinięta siateczka endoplazmatyczna ziarnista z długimi, szerokimi cysternami. Szczytowa część komórki prawie w całości wypełniona jest małymi jasnymi pęcherzykami i cewkowatymi wgłębieniami powierzchni komórki. Głębiej w cytoplazmie występują duże, jasne wakuole, a w okolicy okołojądrowej spotyka się liczne średnio gęste ciała podobne do lizosomów. Między tymi strukturami występują dość liczne mitochondria [15, 20], które oprócz grzebieni lamelarnych mają również grzebienie o charakterze cewek [50].

Wewnątrz nabłonkowe limfocyty i makrofagi występują na różnych wysokościach nabłonka wszystkich odcinków przewodu

najądrza u człowieka i większości badanych zwierząt [12, 13, 15, 19, 24, 27, 28, 43, 53]. Wewnątrz nabłonkowe limfocyty zostały po raz pierwszy opisane przez Reida i Clelanda [43] i nazwane „hallo cells”, ponieważ mają silnie barwiące się jądro otoczone wąską obwódką jasnej cytoplazmy (ryc. 2G). Badania Ritchie i wsp. [45] wykazały, że u człowieka prawie wszystkie wewnątrz nabłonkowe limfocyty są limfocytami T i większość z nich należy do subpopulacji limfocytów supresorowych lub cytotoksycznych (suppressor/cytotoxic) $T8^+$. W okołokanalikowej tkance łącznej przeważają natomiast limfocyty pomocnicze lub pobudzające (helper/inducer) $T4^+$. Limfocyty $T8^+$ uczestniczą w mechanizmie ograniczającym rozwój odpowiedzi immunologicznej na autoantygeny plemników, zwłaszcza gdy bariera krwi — jądro jest niewydolna. Poza tym biorą udział w ograniczaniu różnicowania się limfocytów B i produkcji specyficznych przeciwciał przeciwko antygenom występującym w świetle przewodu najądrza i mogą być powodem migracji limfocytów B do pobliskich węzłów chłonnych. W wyniku tego bardzo mało limfocytów B występuje w obrębie najądrza. Limfocyty $T8^+$ przez swą funkcję supresorową mogą pośredniczyć lokalnie w interakcji z innymi limfocytami T i makrofagami.

U człowieka dużo limfocytów występuje w nabłonku ogona najądrza, a ich liczba wydaje się zależeć od wieku. Więcej ich występuje u osobników starszych, a szczególnie dużo obserwuje się w tych okolicach najądrza, gdzie zachodzą procesy spermiofagii. Wewnątrz nabłonkowym limfocytom towarzyszą często makrofagi (ryc. 2H). Występują zwykle w bliskim sąsiedztwie. Oddziela je od siebie bardzo wąska przestrzeń, a na zwróconych do siebie powierzchniach nie występują żadne kompleksowe połączenia między nimi [53]. Limfocyty w ME charakteryzują się dużym jądrem zawierającym zbite masy heterochromatyny. Otaczająca jądro cytoplazma uboga jest w organelle komórkowe (ryc. 4D). Obserwuje się w niej mitochondria, wolne rybosomy lub polisomy, słabo rozwinięty aparat Golgiego i siateczkę endoplazmatyczną ziarnistą oraz pojedyncze elektronowo gęste ziarna.

Wewnątrz nabłonkowe makrofagi w ME charakteryzują się kulistym lub owalnym jądrem, na którego obwodzie występuje warstwa elektronowo gęstej chromatyny. W przeciwieństwie do małej liczby struktur komórkowych występujących w cytoplazmie limfocytów, elektronowo jasna cytoplazma makrofagów zawiera dużą różnorodność organeli komórkowych. Występują w niej mitochondria, dobrze rozbudowana siateczka ziarnista i gładka, a przede wszystkim liczne, heterogenne, elektronowo gęste ciała lizosomalne i wakuole przyjętego materiału do trawienia. Powierzchnia komórki wykazuje pewną nieregularność i formuje wiele wypustek cytoplazmatycznych (ryc. 4C).

Poza nabłonkiem w skład ściany kanału najądrza wchodzi komórki

mięśniowe gładkie. U człowieka [3, 35], a także u szczurów okołokanalikowa ściana (ryc. 4A i 4B) utworzona jest z 3 rodzajów komórek mięśniowych gładkich, wykazujących ultrastrukturalny polimorfizm: jasne (light cells — LC), ciemne (dark cells — DC) i duże mięśniowe gładkie (smooth muscle cells — SMC). Między tymi komórkami stwierdza się obecność włókien kolagenowych (ryc. 4B) i sprężystych [35]. Liczba pokładów komórek mięśniowych gładkich zmienia się w zależności od odcinka najądrza. U szczura [16] i człowieka [35] w głowie, trzonie i ogonie najądrza LC i DC układają się okrężnie i tworzą tzw. pas wewnętrzny. W dystalnej części trzonu i ogonie najądrza, oprócz okrężnie przebiegającego pasa wewnętrznego, występuje za nim podłużnie przebiegający pas zewnętrzny zbudowany z SMC [16, 35].

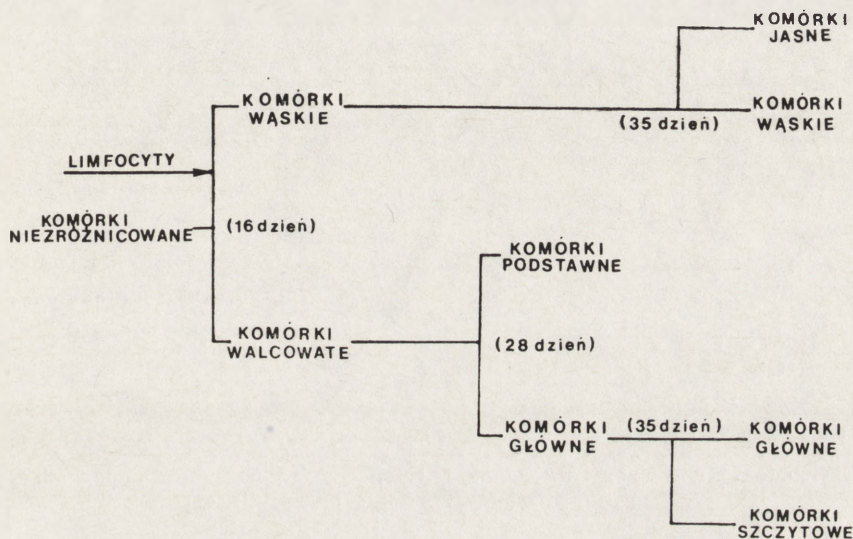
U człowieka [36] liczba warstw LC i DC, ułożonych naprzemiennie w pasie wewnętrznym, wzrasta od 4 lub 5 w głowie najądrza do 6 lub nawet więcej w trzonie. W trzonie najądrza pojawia się również dodatkowo niekompletny jeszcze pas zewnętrzny utworzony z SMC. W ogonie najądrza warstwa mięśniowa pasa zewnętrznego znacznie grubieje i SMC są dominującym typem w tej części przewodu najądrza. Grubość pokładów komórek pasa wewnętrznego ulega natomiast znacznej redukcji.

ROZWÓJ I RÓŻNICOWANIE KOMÓREK NAJĄDRZA

U ludzkich płodów męskich najądrze powstaje około 8-10 tygodnia z pranercza. W rozwoju embrionalnym człowieka przeważająca część pranercza ulega zanikowi. Ze środkowego odcinka tego narządu zachowuje się tylko kilkanaście kanalików nefronów, które leżą w najbliższym sąsiedztwie rozwijającej się gonady. Ulegają one również częściowej regresji. Procesowi temu podlegają przede wszystkim ciała nefronów. Pozostałe odcinki kanalików w 4 miesiącu wrastają we wnękę jądra i łączą się z kanalikami sieci jądra. W ten sposób jądro zyskuje 8-15 przewodników wyprowadzających, uchodzących do przewodu pranercza. W dalszym etapie rozwoju przewodniki wyprowadzające wydłużają się i uzyskują kręty przebieg [17]. Wyścielające je komórki różnicują się na urzęsione i nieurzęsione. Przewodniki odprowadzające swoim dystalnym końcem wpadają do początkowego odcinka przewodu pranercza. Odcinek ten znacznie się wydłuża i przyjmuje mocno kręty przebieg, tworząc przewód najądrza. Końcowy odcinek tego przewodu, biegnący ku zatoce moczowo-płciowej, przekształca się w nasieniowód.

Z początkowo nie zróżnicowanych komórek wyścielających przewód najądrza wykształcają się komórki główne i podstawne. Następnie do

nabłonka napływają limfocyty i makrofagi. Sun i Flickinger [50] wykazali, że u szczura w okresie poporodowym w różnicowaniu komórek przewodu najądrza wyróżnić można 3 okresy: komórek nie zróżnicowanych (1-15 dzień), różnicowania komórek (16-44 dzień) oraz wzrostu komórek (45-94 dzień). Rodzaje komórek powstających w tych okresach przedstawia ryc. 5.

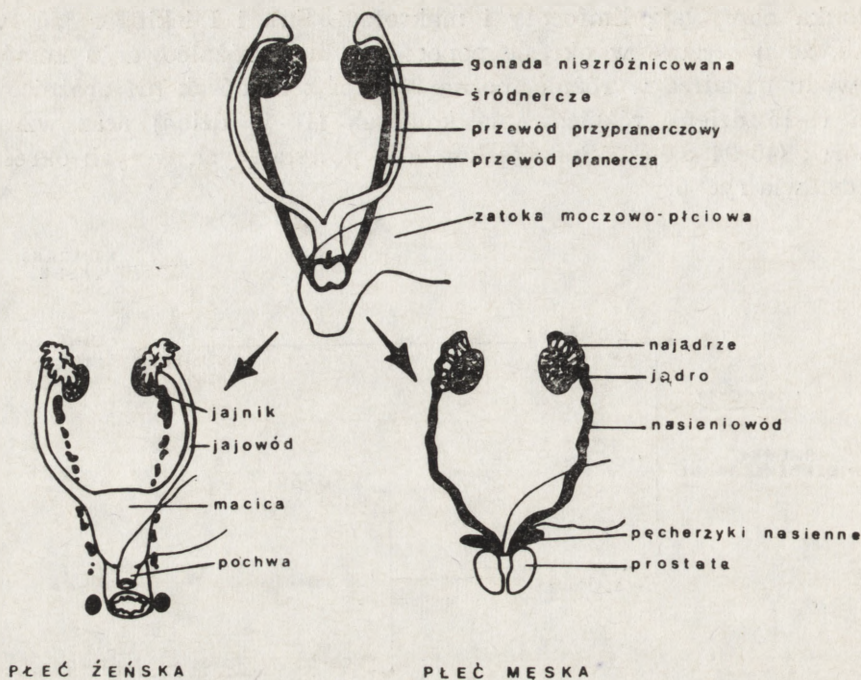


Ryc. 5. Schemat różnicowania się komórek nabłonka najądrza szczura w okresie poporodowym według Suna i Flickingera [50]

Rozwój najądrza zależny jest od obecności gonad. Do 40 dnia życia płodowego człowieka, kiedy zarodki obu płci rozwijają się w jednakowy sposób, u płodów obu płci obecne są zarówno przewody przypranerczowe, jak i przewody pranercza [54] (ryc. 6). Różnicowanie narządów płciowych w kierunku męskim indukowane jest hormonami pochodzącymi z jąder płodu i jest efektem działania czynnika anty-Müllerowskiego, zwanego też hormonem anty-Müllerowskim, testosteronu (T) i dwuhydrotestosteronu (DHT) [4, 10, 23, 54].

Badania ostatnich lat wykazały, że hormon anty-Müllerowski jest glikoproteidem wydzielanym przez komórki podporowe jądra. Wywiera on swoje działanie w bardzo krótkim i wczesnym okresie — u płodów ludzkich przed 8 tygodniem ciąży. Działa miejscowo i powoduje zanik przewodów przypranerczowych, nie pozwalając rozwinąć się jajowodom i macicy [31, 32, 42].

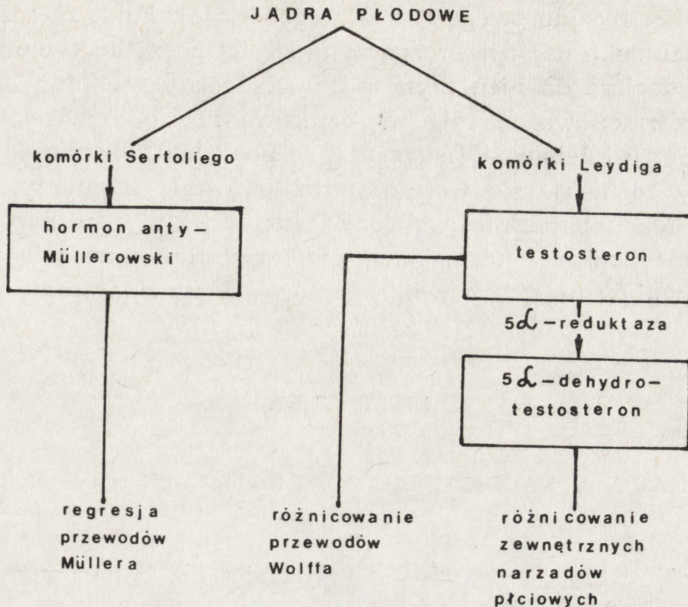
Testosteron wydzielany jest przez komórki śródmiąższowe płodowego jądra. Stymuluje przemianę przewodów pranercza w wewnętrzne narządy



Ryc. 6. Schemat ilustrujący różnicowanie wewnętrznych narządów płciowych u płodu ludzkiego według Griffina i Wilsona [23]

płciowe — najądrze, nasieniowód i pęcherzyki nasienne [10, 48, 54]. Szczyt jego działania przypada u człowieka około 84 dnia życia płodowego [44]. W rozwoju przewodów pranercza podstawowe znaczenie ma jednak nie testosteron krążący we krwi, lecz działający miejscowo na drodze dyfuzji z pobliskich gonad [4].

DHT powoduje zróżnicowanie zatoki moczowo-płciowej w kierunku męskim i indukuje powstanie prostaty i zewnętrznych narządów płciowych. Odbywa się to w nieco późniejszym okresie niż powstawanie wewnętrznych narządów płciowych [10, 48, 54]. DHT powstaje z T przeniesionego przez krew do okolic, w których różnicują się te narządy. Konwersja T do DHT odbywa się w tkankach pod wpływem 5α -reduktazy [10, 23] (ryc. 7). Zatem zarówno rozwój przewodów pranercza, jak i zewnętrznych narządów płciowych odbywa się pod wpływem hormonów androgennych. Interesujący jest fakt, że działanie tych hormonów w stosunku do przewodów pranercza jest wywierane jedynie miejscowo [4]. W przypadku jednostronnej kastracji we wczesnym okresie płodowym, drugie jądro ma zdolność maskulinizowania całej zatoki moczowo-płciowej i zewnętrznych narządów płciowych, natomiast przewód pranercza stymuluje tylko po swojej stronie. Fakt ten można wytłumaczyć tym,



Ryc. 7. Wpływ hormonów wydzielanych przez jądra płodowe na różnicowanie wewnętrznych i zewnętrznych narządów płciowych

że hormony różnicujące płeć działają w bardzo wczesnym okresie płodowym jedynie na drodze dyfuzji i dlatego działanie ich ograniczone jest do małej przestrzeni. Zewnętrzne narządy płciowe natomiast powstają w późniejszym okresie, kiedy substancje różnicujące płeć przenoszone są przez krew [4].

Różnicowanie komórek w przewodzie najądrza wydaje się również procesem zależnym od androgenów. Sugerują to badania przeprowadzone na szczurach [7, 50]. Bezpośrednio po porodzie na najądrze mogą wywierać wpływ tylko androgeny występujące w osoczu krwi, ponieważ w tym okresie nie ma jeszcze w świetle przewodu najądrza płynu kanalikowego [56]. Döhler i Wuttke [9] donoszą, że u nowo narodzonych szczurów poziom androgenów w osoczu jest wysoki. Androgeny mogą być odpowiedzialne za wzrost najądrza w tym okresie (okres komórek niezróżnicowanych). Wykazano, że w tym samym czasie androgeny wywierają mitogenne działanie w prostatie i w pęcherzykach nasiennych [52]. Poziom androgenów wzrasta w okresie różnicowania (16-44 dzień), a stężenie T we krwi jest najwyższe w 25 dniu po urodzeniu [9, 33, 34, 36]. Jest to okres najintensywniejszego rozwoju najądrza u szczura [50], stąd można przypuszczać, że T może wywierać wpływ na różnicowanie się komórek w tym narządzie. Potwierdzeniem działania androgenów na komórki nabłonkowe przewodu najądrza w tym okresie jest obecność

w nich białka receptorowego dla androgenów [6]. Fakt, że różnicowanie komórek nabłonka najądrza rozpoczyna się na początku trzeciego tygodnia, kiedy dociera do nich płyn z jądra, sugeruje, że płyn kanalikowy odgrywa również ważną rolę w różnicowaniu się komórek przewodu najądrza. Setty i Jehan [47] sugerują, że powodem, dla którego segment początkowy różnicuje się wcześniej niż pozostałe segmenty, jest fakt, że odcinek ten najwcześniej wchodzi w kontakt z płynem napływającym z jądra, który oprócz androgenów zawiera jeszcze inne substancje mogące mieć wpływ na różnicowanie komórek w tym narządzie.

LITERATURA

- [1] ABOU-HAILA A., FAIN-MAUREL M. A., Regional differences of the proximal part of mouse epididymis. Morphological and histochemical characterization, *Anat. Rec.*, **209**: 197-208, 1984.
- [2] — Postnatal differentiation of the enzymatic activity of the mouse epididymis, *Int. J. Androl.*, **8**: 441-458, 1985.
- [3] BAUMGARTEN H. G., HOLSTEIN A. F., ROSENGREEN E., Arrangement, ultrastructure and adrenergic innervation of smooth musculature of the ductuli efferentes, ductus epididymis and ductus deferens of man, *Z. Zellforsch., mikrosk. Anat.* **120**: 37-79, 1971.
- [4] BOCZKOWSKI K., *Determinacja i różnicowanie płci*, PWN, Warszawa 1983, 98-111.
- [5] BROWN D., MONTESANO R., Membrane specialization in the rat epididymis. II. Clear cells, *Anat. Rec.*, **201**: 477-483, 1981.
- [6] CALANDRA R. S., PODESTA E. J., RIVAROLA M. A., BLAQUIER J. A., Tissue androgens and androphilic proteins in rat epididymis during sexual development, *Steroids*, **24**: 507-518, 1974.
- [7] DELONGEAS J. L., GELLY J. L., Differentiation of the rat epididymis after withdrawal of androgen, *Cell Tissue Res.*, **241**: 657-662, 1985.
- [8] DJAKIEW D., BAYERS S. W., DYM M., Receptor-mediated endocytosis of alpha₂-macroglobulin and transferrin in rat caput epididymal epithelial cells in vitro, *Biol. Reprod.*, **31**: 1073-1085, 1984.
- [9] DÖHLER K. D., WUTTKE W., Changes with age in levels in serum gonadotropins, prolactin and gonadal steroids in prepubertal male and female rats, *Endocrinology*, **97**: 898-907, 1975.
- [10] DÖHLER K. D., The special case of hormonal imprinting, the neonatal influence of sex, *Experientia*, **42**: 759-769, 1986.
- [11] DYM M., The male reproductive system, [w] *Histology*, red. Weiss L., Greep R. O., McGraw Hill Book Company USA, 1977, 979-1038.
- [12] DYM M., ROMRELL L. J., Intraepithelial lymphocytes in the male reproductive tract of rats and rhesus monkeys, *J. Reprod. Fert.*, **42**: 1-7 1975.
- [13] FLICKINGER C. J., Regional differences in synthesis, intracellular transport, and secretion of protein in the mouse epididymis, *Biol. Reprod.*, **25**: 871-883, 1981.
- [14] — Radioautographic analysis of the secretory pathway for glycoproteins in

- principal cells of the mouse epididymis exposed to [³H] fucose, *Biol. Reprod.*, **32**: 377-389, 1985.
- [15] FLICKINGER C. J., HOWARDS S. S., ENGLISH H. F., Ultrastructural differences in efferent ducts and several regions of the epididymis of the hamster, *Am. J. Anat.*, **152**: 557-586, 1978.
- [16] FRANCAVILLA S., de MARTINO C., SCORZA BARCELLONA P., NATALI P. G., Ultrastructural and immunohistochemical studies of rat epididymis, *Cell Tissue Res.*, **233**: 523-537, 1983.
- [17] GODLEWSKI E., HILLER S., *Embriologia zwierząt kręgowych. Część szcze-gółowa*, PZWL, Warszawa 1956, 163-235.
- [18] GOYAL H. O., Appendix epididymis and aberrant ductules of the bull. Light microscopic und ultrastructural study, *Acta Anat.*, **117**: 321-330, 1983.
- [19] — Morphology of the bovine epididymis, *Am. J. Anat.*, **172**: 155-172, 1985.
- [20] GOYAL H. O., HRUDKA F., Ductuli efferentes of the bull. A morphological, experimental and developmental study, *Andrologia*, **13**: 292-306, 1981.
- [21] GRAY B. W., BROWN B. G., GANJAM V. K., WHITESIDES J. F., Effect of deprival of rete testis fluid on the morphology of efferent ductules, *Biol. Reprod.*, **29**: 525-534, 1983.
- [22] GREENBERG J., FORSSMANN W. G., Studies of guinea pig epididymis, I. Ultrastructure and quantitative morphology of the principal cells, *Anat. Embryol.*, **168**: 173-194, 1983.
- [23] GRIFFIN J. E., WILSON J. D., The syndromes of androgen resistance, *N. Eng. J. Med.*, **302**: 198-209, 1980.
- [24] HAMILTON D. W., Structure and function of epithelium lining the ductuli efferentes, ductus epididymis, and ductus deferens in the rat, [w] *Handbook of physiology*, Vol. 5, Section 7, red. Greep R. O. Astwood F. B., Amer. Physiol. Soc. Washington 1975, 259-301.
- [25] HERMO L., MORALES C., Endocytosis in nonciliated epithelial cells of the ductuli efferentes in the rat, *Am. J. Anat.*, **171**: 59-74, 1984.
- [26] HOLSTEIN A. F., Morphologische Studien an Nebenhoden des Menschen, [w] *Zwanglose Abhandlungen aus dem Gebiet der normalen und pathologischen Anatomie*, red. Bargmann W., Doerr W., Georg Thieme Verlag, Stuttgart 1969, 1-91.
- [27] — Structure of the human epididymis, [w] *Human semen and fertility regulation in men*, red. Hafez E. S. E., The C. V. Mosby Company, Saint Louis 1976, 23-30.
- [28] HOFFER A. P., GREENBERG J., The structure of the epididymis, efferent ductules and ductus deferens of the guinea pig: A light microscope study, *Anat. Rec.*, **190**: 659-678, 1978.
- [29] HOFFER A. P., HAMILTON D. W., FAWCETT D. W., The ultrastructure of the principal cells and intraepithelial leucocytes in the initial segment of the rat epididymis, *Anat. Rec.*, **175**: 169-202, 1973.
- [30] JONES R., HAMILTON D. W., FAWCETT D. W., Morphology of the epithelium of the extratesticular rete testis, ductuli efferentes and ductus epididymis of the adult male rabbit, *Am. J. Anat.*, **156**: 373-400, 1979.
- [31] JOSSO N. S., PICARD J. Y., TRAN D., The antimüllerian hormone, *Rec. Prog. Horm. Res.*, **33**: 117-167, 1976.
- [32] — A new testicular glycoprotein: antimüllerian hormone, [w] *Testicular development, structure and function*, red. Steinberger E., Steinberger A., Raven Press, New York 1980, 21-32.

- [33] KNORR D. W., VANHA-PERTTULA T., LIPSETT M. B., Structure and function of rat testis through pubescence, *Endocrinology*, **86**: 1298-1304, 1970.
- [34] LEE V. W. K., de KRETSEK D. M., HUDSON B., WANG C., Variations in serum FSH, LH and testosterone levels in male rats from birth to sexual maturity, *J. Reprod. Fert.*, **42**: 121-126, 1975.
- [35] LOPEZ M. L., BREUCKER H., Ultrastructure of the lamina propria of the human ductuli efferentes and ductus epididymis, *Andrologia*, **18**: 133-146, 1986.
- [36] MAYACHI Y., NIESCHLANG E., LIPSETT M. B., The secretion of gonadotropin and testosterone by the neonatal male rat, *Endocrinology*, **92**: 1-5, 1973.
- [37] NICANDER L., On the regional histology and cytochemistry of the ductus epididymis in rabbits, *Acta Morph. Neerl. Scand.*, **1**: 99-118, 1957.
- [38] — Studies on the regional histology and cytochemistry of the ductus epididymis of stallions, rams and bulls, *Acta Morph. Neerl. Scand.*, **1**: 337-362, 1958.
- [39] NICANDER L., OSMAN D. I., PLØEN L., BUGGE H. P., KVISGAARD K. N., Early effects of efferent ductule ligation on the proximal segment of the rat epididymis, *Int. J. Androl.*, **6**: 91-102, 1983.
- [40] PAULSON H. L., BAYERS S. W., DYM M., Morphometric analysis of coated pits and vesicles in the proximal and distal caput epididymis, *Biol. Reprod.*, **32**: 191-202, 1985.
- [41] PAWLIKOWSKI T., KARASEK M., PAWLIKOWSKI M., *Podręcznik histologii*, PZWL, Warszawa 1981, 337-353.
- [42] PICARD J. Y., TRAN D., JOSSO N., Biosynthesis of labelled anti-Müllerian hormone by fetal testes: evidence for the glycoprotein nature of the hormone and for its disulfidebonded structure, *Mol. Cell Endocrinol.*, **12**: 17-30, 1978.
- [43] REID B. L., CLELAND K. W., The structure and function of the epididymis. I. The histology of the rat epididymis, *Aust. J. Zool.*, **5**: 223-246, 1957.
- [44] REYES F. J., BORODITSKY R. S., WINTER S. D., FAIMAN D., Studies on human sexual development. II. Fetal and maternal serum gonadotropin and sex steroid concentrations, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **38**: 612-617, 1974.
- [45] RITCHIE A. W. S., HARGREAVE T. B., JAMES K., CHISHOLM G. D., Intra-epithelial lymphocytes in the normal epididymis. A mechanism for tolerance to sperm auto-antigenes, *Brit. J. Urol.*, **56**: 79-83, 1984.
- [46] RÓŻEWICKA L., KAMIŃSKA B., LASZCZYŃSKA M., KAWIAK J., Isolation technique and identification of epithelial cells from efferent ductules of the rat epididymis, *Folia Histochem. Cytobiol.*, **23**: 201-208, 1985.
- [47] SETTY B. S., JEHAN Q., Functional maturation of the epididymis in the rat, *J. Reprod. Fert.*, **49**: 317-322, 1977.
- [48] SIITERI P. K., WILSON J. D., Testosterone formation and metabolism during male sexual differentiation in the human embryo, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **38**: 113-125, 1974.
- [49] SORANZO L., DADOUNE J. P., FAIN-MAUREL M. A., La segmentation du canal épididymaire chez la souris. Etude ultrastructurale, *Reprod. Nutr. Develop.*, **22**: 999-1012, 1982.
- [50] SUN E. L., FLICKINGER C. J., Development of cell types and of regional differences in the postnatal rat epididymis, *Am. J. Anat.*, **154**: 27-56, 1979.
- [51] — Morphological characteristic of cells with apical nuclei in the initial segment of the adult rat epididymis, *Anat. Rec.*, **196**: 285-293, 1980.
- [52] TUOHIMAA P., NIEMI M., The effect of testosterone on cell renewal and mitotic cycles in sex accessory glands of castrated mice, *Acta Endocrinol.*, **58**: 696-704, 1968.

- [53] WANG Y. F., HOLSTEIN A. F., Intraepithelial lymphocytes and macrophages in the human epididymis, *Cell Tissue Res.*, **233**: 517-521, 1983.
- [54] WILSON J. D., Sexual differentiation, *Ann. Rev. Physiol.*, **40**: 279-306, 1978.
- [55] YAMAOKA I., YAMAMOTO K., URABE N., NAGATANI Y., Osmium-impregnation patterns of the Golgi complex in the epididymal epithelial cells of castrated and testosterone-injected mice, *J. Cell Sci.*, **59**: 71-79, 1983.
- [56] VITALE R., FAWCETT D. W., DYM M., The normal development of the blood-testis barrier and the effects of clomiphene and estrogen treatment, *Anat. Rec.*, **176**: 333-344, 1973.

Otrzymano: 14 lipca 1987.

Przyjęto: 30 września 1987.

Adres autorów: Al. Powstańców Wlkp. 72, 70-111 Szczecin.

NAJĄDRZE SSAKÓW. II. FUNKCJA NAJĄDRZA *

EPIDIDYMIS OF MAMMALS. II. FUNCTION OF EPIDIDYMIS

Lidia RÓŻEWICKA i Maria LASZCZYŃSKA

Zakład Histologii i Embriologii, Pomorska Akademia Medyczna, Szczecin

Streszczenie. Przedstawiono aktualne poglądy na wydzielniczą i resorpcyjną funkcję komórek nabłonkowych najądrza i udział ich w procesie dojrzewania plemników. Omówiono główne zmiany strukturalne plemników w czasie ich wędrówki przez najądrze. Wykazano na podstawie wyników badań wielu autorów, że czynnikami kontrolującymi proces dojrzewania plemników w najądrzu są androgeny oraz że estrogeny i progesteron regulują niektóre czynności w tym narządzie. Omówiono transport plemników przez najądrze i czynniki regulujące ten proces, a także zjawisko fagocytozy plemników.

Summary. The actual viewpoints that are presented refer to the secretory and resorptive function of the epithelial cells in epididymis, as well as to their participation in spermatozoa maturation process. Principal structural changes of spermatozoa at the time they pass through epididymis are discussed. Relying on the results of investigations by a number of authors, it has been shown that androgens are the factors that control the spermatozoa maturation process in epididymis and that estrogens as well as progesterone regulate certain actions in this organ. The transport of spermatozoa across epididymis, the factors regulating this process and the phenomenon of spermatozoa phagocytosis are discussed too.

Morfologicznej odmienności poszczególnych części najądrza odpowiada czynnościowe zróżnicowanie tego narządu. Dwie czynnościowo różne funkcje — dojrzewanie plemników w głowie najądrza i magazynowanie ich w ogonie tego narządu i nasieniowodzie, odbywają się przy współudziale komórek nabłonkowych przewodu, które wytwarzają odpowiednie środowisko sprzyjające tym procesom.

Plemniki opuszczające jądro są zawieszane w płynie produkowanym przez kanaliki nasienne. Płyn ten spełnia ważną rolę w transporcie komórek rozrodczych do najądrza. Stanowi on specyficzne mikrośrodowisko

* Praca wykonana w ramach problemu CPBP 05.06.1.2.3.

zapewniające przeżywalność niedojrzałym jeszcze plemnikom. Skład płynu zmienia się podczas wędrówki plemników z kanalików nasiennych poprzez sieć jądra, kanaliki odprowadzające i przewód najądrza [3, 75, 86, 107, 127, 136]. To zmieniające się, ale zawsze specyficzne dla danego odcinka mikrośrodowisko, regulowane jest sekrecyjną i resorpcyjną aktywnością komórek nabłonkowych wyścielających drogę wędrówki plemników. Regulacja ta dotyczy składu jonowego, pH, zawartości małych cząsteczek organicznych i białek [63, 69, 86, 137].

Badania Levina i wsp. [91], Jesse i wsp. [78] oraz Turnera i wsp. [140] dowiodły, że w płynie najądrza, od głowy do ogona, następuje stopniowa utrata sodu na korzyść wzrostu stężenia potasu. W głowie najądrza wydzielane są również do płynu najądrzowego jony wodorowe, przez co pH płynu w głowie staje się lekko kwaśne i wynosi 6,4, w porównaniu z płynem kanalików nasiennych jądra, wynoszącym 7,31 [90, 91]. W ogonie najądrza pH płynu wynosi 6,85, ponieważ jony wodorowe są reabsorbowane [91]. Koskimies i wsp. [86] wykazali również, że w płynie najądrza brak jest kilku białek charakterystycznych dla płynu sieci jądra, pojawiają się natomiast inne białka specyficzne tylko dla płynu najądrza.

FUNKCJA SEKRECYJNA KOMÓREK NABŁONKOWYCH NAJĄDRZA

Procesy sekrecyjne są najintensywniejsze w głowie i początkowym odcinku trzonu najądrza [16, 88, 89, 98, 107, 141], a komórkami najbardziej zaangażowanymi w procesy wydzielnicze są komórki główne [53, 55, 88]. Wydzielają one do światła przewodu wiele substancji białkowych, z których większość stanowią glikoproteiny. Uzyskały one różne nazwy po ich izolacji za pomocą odmiennych metod stosowanych przez poszczególne grupy badaczy u różnych gatunków [16-19, 22, 26, 54, 60, 97, 112, 120]. Cameo i Blaquier [25] określili elektroforetycznie na żelu poliakrylamidowym migrację białek wydzielanych przez komórki nabłonka najądrza szczura. Białka te migrowały szybciej niż albumina i oznaczono je B, C, D i E. Późniejsze badania wykazały również obecność białek F i G [17].

Niezależnie od tych badań Lea i wsp. [88, 89] wyizolowali i oczyścili kwaśną glikoproteinę najądrzową (acidic epididymal glycoprotein — AEG), wydzielaną głównie w głowie i trzonie najądrza. Wydzielana do światła przewodu, pokrywa powierzchnię plemników. Późniejsze badania wykazały, że AEG może nieznacznie wpływać na ruchliwość plemników [112]. Nie jest to jednak efekt specyficzny tego białka.

Cameo i wsp. [26] wykazali, że białko DE jest również glikoproteiną

produkowaną w głowie i trzonie najądrza. Za pomocą reakcji immunohistochemicznej zlokalizowano to białko na plazmolemie pokrywającej wklęsłą powierzchnię główki i boczne powierzchnie okolicy postakrosomalnej plemnika. Po kapacytacji i reakcji akrosomalnej pozostałości tego białka stwierdza się w okolicy postakrosomalnej główki plemnika, w której białko to może brać udział w tworzeniu lub aktywacji postulowanego receptora plemnikowego dla zona pellucida [22, 26].

Opisane przez Brooksa [16] oraz Brooksa i Tivera [22] białka D i E rozpoznawane są tym samym przeciwciałem. Jednak według cytowanych autorów, synteza białka D ma miejsce w głowie, a białka E — w trzonie i proksymalnej części ogona najądrza.

Wydaje się, że opisane tu białka są tą samą glikoproteina, mają bowiem podobne właściwości i podobny skład reszt cukrowcowych [26].

Jones i Brown [80] wykazali dwie inne proteiny zlokalizowane na główce i wstawce plemników, bardzo podobne do białek B i C opisanych przez Brooksa i Tivera [22] oraz Brooksa i wsp. [21]. Faye i wsp. [51] z kolei wyodrębnili sialoproteiny na powierzchni plemników, a Kohane i wsp. [84, 85] tzw. specyficzne najądrzowe białko (specific epididymal protein). Jeszcze inne białko opisane zostało przez Wonga i wsp. [148] i nazwane 32 K. Jest ono bardzo podobne w swych właściwościach do AEG.

Większość wydzielanych przez komórki nabłonkowe najądrza glikoprotein stanowi bądź białka receptorowe, bądź wiąże się z powierzchnią plemników i tworzy na ich powierzchni charakterystyczną powłoczkę (surface coat) [52, 89, 149]. Powłoczka ta chroni plemniki przed aglutynacją, przedwczesną reakcją akrosomalną i fagocytozą w żeńskich drogach rodnych. Plemniki zrzucają ją dopiero w procesie kapacytacji.

Glikoproteiny powłoczki plemników badano za pomocą reakcji ze specyficznymi lektynami dla różnych mono- i oligosacharydów i stwierdzono, że skład glikoprotein na powierzchni plemników zmienia się w czasie ich dojrzewania w najądrzu [4, 6, 52, 132, 149].

Innym białkiem wydzielanym przez najądrze, a prawdopodobnie i jądro jest „forward motility protein” — białko inicjujące ruch postępowy plemników [2]. Glikoproteina ta o masie 37 500 wiąże się do plemników w głowie najądrza, gdzie plemniki zyskują dla niej specyficzne receptory. „Forward motility protein” jest inhibitorem enzymu fosfodwuesterazy, przez co utrzymuje wysokie stężenie cAMP w plemnikach. Według Hoskinsa i wsp. [73] oraz Acotta i wsp. [2], za inicjację ruchu postępowego plemników w najądrzu odpowiedzialny jest wzrost stężenia cAMP w plemnikach w wyniku wiązania przez nie specyficznych glikoprotein — inhibitorów fosfodwuesteraz.

Występuje jeszcze wiele innych czynników inicjujących ruch postę-

powy plemników. Należy do nich przede wszystkim wzrost stężenia jonów wapnia w plemnikach, które po połączeniu z białkiem regulatorowym kalmoduliną, są głównym inicjatorem ruchliwości i procesów metabolicznych w tych gametach [73, 112, 130].

Oprócz wymienionych tu białek komórki najądrza wydzielają do światła przewodu jeszcze wiele innych substancji koniecznych do dojrzewania plemników. Niektóre z nich, jak karnitynę, pobierają z krwi [27]. Karnityna i jej pochodna acetylokarnityna są akumulowane w plemnikach i wpływają na ruchliwość i oddychanie dojrzewających plemników. Biorą udział w utlenianiu kwasów tłuszczowych i wytwarzaniu energii dla zachowania ruchliwości plemników [27, 69]. Plemniki z ogona najądrza wykazują wyższy poziom karnityny i acetylokarnityny aniżeli plemniki z głowy najądrza [20, 28].

Inną substancją wydzielaną przez komórki najądrza jest glicerylofosfocholina. Jest ona syntetyzowana w komórkach nabłonkowych i wydzielana w większej ilości w głowie aniżeli w ogonie najądrza. Jest źródłem kwasów tłuszczowych koniecznych do metabolizmu plemników w czasie ich wędrówki przez najądrze [20, 63, 69].

Komórki najądrza wydzielają również do światła przewodu inozytol, który mogą pobierać z krwi, jak również syntetyzować z glukozy. W komórkach tych stwierdzono obecność enzymów uczestniczących w tej syntezie. Inozytol w procesie dojrzewania plemników wbudowywany jest w fosfolipidy ich błon komórkowych [69, 122].

FUNKCJA RESORPCYJNA KOMÓREK NABŁONKOWYCH NAJĄDRZA

Wydzielina w komórkach nabłonkowych najądrza produkowana jest w dużej ilości. Glikoproteiny, które nie związały się z powierzchnią plemników, zostają zresorbowane w ogonie najądrza. W resorpcji, oprócz komórek głównych, biorą udział również komórki podstawne, szczytowe, wąskie i jasne [4, 5, 100, 138]. Największą aktywność resorpcyjną mają komórki kanalików odprowadzających i segmentu początkowego oraz komórki ogona najądrza [7, 35, 43, 91, 100, 111]. W pierwszych resorbowane jest 50% i więcej wody z płynu napływającego z jądra [35, 43], w ogonie najądrza natomiast resorbowana jest zbędna wydzielina najądrzowa.

W badaniach *in vitro* wykazano [42], że w komórkach nabłonkowych najądrza mogą zachodzić 3 rodzaje endocytozy, będące odpowiednikiem procesów resorpcyjnych *in vivo*. Są to: endocytoza płynnej fazy, endocytoza adsorpcyjna i endocytoza związana z receptorem. Endocytoza płynnej fazy jest niespecyficzna. Dzięki niej białka i inne składniki prze-

chodzą wraz z wodą do kaweoli, a następnie w postaci pęcherzyków przenoszone są do lizosomów, gdzie następuje ich degradacja. Ten rodzaj endocytozy występuje w kanalikach odprowadzających [101] i w przewodzie najądrza [100]. Endocytoza związana z receptorem ma miejsce głównie w komórkach przewodu najądrza. W ME obserwuje się pod powierzchnią komórek, od strony światła przewodu, liczne pęcherzyki związane z klatryną (coated pits i coated vesicles).

FUNKCJA KOMÓREK PODSTAWNYCH SZCZYTOWYCH, WĄSKICH I JASNYCH

Jak wynika z przedstawionych tu faktów, większość wydzielin produkowanych w najądrzu wytwarzana jest w komórkach głównych. Dyskusyjna jest ciągle rola pozostałych typów komórek: podstawnych, szczytowych, wąskich i jasnych. Nieduża ich liczba utrudnia izolację i badania *in vitro*.

Komórki podstawne biorą udział w resorpcji substancji ze światła przewodu najądrza. Według Arya i wsp. [4] mogą one pobierać z komórek głównych zresorbowany materiał w celu jego końcowego trawienia. Sinowatz [128] wykazał w komórkach podstawnych aktywność wielu enzymów hydrolitycznych.

Komórki jasne, szczególnie licznie występujące w ogonie najądrza, wykazują również zdolności absorpcyjne, większe aniżeli przylegające do nich komórki główne [99, 100]. Absorbują one substancje zawarte w świetle przewodu najądrza, pochodzące z nadwyżki wydzielanych glikoprotein, a także krople cytoplazmatyczne dojrzewających plemników [5]. Komórki te w dystalnej części głowy wykazują również funkcję sekrecyjną [4]. W komórkach jasnych Cohen i wsp. [32] wykazali histochemicznie obecność anhidrazy węglanowej. Wykazują one również wysoką aktywność dehydrogenazy glukozo-6-fosforanowej, zlokalizowanej w bardzo licznych w tych komórkach mitochondriach [1].

W komórkach szczytowych głowy najądrza również zachodzą procesy absorpcyjne [100]. Podobnie jak w komórkach jasnych, wykryto w nich histochemicznie obecność anhidrazy węglanowej [32] i wysoką aktywność dehydrogenazy glukozo-6-fosforanowej [1]. Badania Cohena i wsp. [32] sugerują zależność między aktywnością anhidrazy węglanowej w tych komórkach a zakwaszeniem lub alkalizacją płynu kanalikowego. Goyal [62] natomiast obserwował sporadycznie w tych komórkach degenerujące główki plemników.

Komórki wąskie, występujące w odcinku inicjalnym głowy najądrza, wykazują, podobnie jak pozostałe typy komórek, funkcje absorpcyjne [5].

NIEKTÓRE ZMIANY W PLEMNIKACH W PROCESIE ICH DOJRZEWANIA

W czasie wędrówki plemników przez najądrze zachodzi w nich wiele zmian biochemicznych, strukturalnych i czynnościowych, określanых zwykle jako „dojrzewanie plemników”. Efektem ich jest uzyskanie przez plemniki zdolności do ruchu postępowego i zapłodnienia komórki jajowej.

Zagadnienia związane z przemianami biochemicznymi plemników w procesie ich dojrzewania są różnorodne, rozległe i złożone. Dotyczą różnej aktywności glikolitycznej [126, 142, 144] i zapotrzebowania na energię [144, 145] plemników dojrzewających i już dojrzałych, magazynowanych w ogonie najądrza i w nasieniowodzie, zmian w składzie fosfolipidów i kwasów tłuszczowych, budujących struktury plemnika [79, 109, 126, 142], uwalniania kwasu arachidonowego, stanowiącego substrat do produkcji prostaglandyn w najądrzu [109, 143] i wiele innych przemian. Z procesami tymi związane jest pojawienie się lub zahamowanie aktywności wielu enzymów i inhibitorów. Omówienie tych zagadnień nie mieści się jednak w ramach tej pracy.

Zmiany strukturalne dotyczą zarówno główki, jak i wstki plemników. U wielu gatunków zwierząt w procesie dojrzewania plemników zmienia się struktura morfologiczna akrosomu. Przyjmuje on w najądrzu kształt i wielkość charakterystyczną dla danego gatunku [12, 13, 50]. Zróżnicowanie morfologiczne plemników ssaków wyraża się bowiem w największym stopniu różnorodnością kształtów i wielkością akrosomów [81]. Badania de Vries i wsp. [147] wykazały ponadto, że brak akrozyny w segmencie równikowym akrosomu plemników z najądrza i obecność jej w tym rejonie w plemnikach z ejakulatu jest częścią procesu dojrzewania plemników. Akrozyna bierze udział w trawieniu zona pellucida, co pozwala plemnikom spenetrować ostatnią przeszkodę, jaką napotykają na drodze do cytoplazmy komórki jajowej. Późniejsze pojawienie się tego enzymu w rejonie równikowym akrosomu wiąże się prawdopodobnie z późniejszym jego uwalnianiem w reakcji akrosomalnej, po hialuronidazie, która działa pierwsza i trawi substancje spajające komórki wieńca promienistego.

W czasie wędrówki plemników z głowy do ogona najądrza i do nasieniowodu następuje ostateczna kondensacja chromatyny jąder plemników. Proces ten odbywa się głównie poprzez utlenianie grup sulfhydrylowych cysteiny do wiązań dwusiarczkowych. Według Pellicciari i wsp. [110], liczba grup sulfhydrylowych w chromatynie jąder plemników myszy z głowy, trzonu i ogona najądrza oraz nasieniowodu wynosi kolejno 50, 15, 5 i 3%. Spadek liczby tych grup spowodowany jest stopniowym utlenianiem ich do wiązań dwusiarczkowych.

Badania własne dostarczyły informacji potwierdzających i poszerzających te doniesienia. Zastosowanie cytofotometrycznych pomiarów DNA i analizy komputerowej obrazu jąder plemników pozwoliło stwierdzić, że w czasie wędrówki plemników z głowy do ogona najądrza wraz z zawartością chromatyny wzrasta również jej homogenność, a zmniejsza się powierzchnia jąder i jego obwód [123].

W białkach strukturalnych witki plemnika zachodzi podobny proces utleniania grup sulfhydrylowych do wiązań dwusiarczkowych. Jest on połączony z uwalnianiem cynku z plemników [82]. Pojawienie się tych wiązań powoduje większą sztywność witki plemnika, co według Calvina i Bedforda [23] związane jest z uzyskaniem przez nie ruchliwości. Wiązania dwusiarczkowe wchodzi w skład podobnych do keratyn białek błony zewnętrznej mitochondriów, włókien gęstych i otoczki włóknistej [24].

W miarę jak plemniki przechodzą z głowy najądrza do ogona, liczba wiązań dwusiarczkowych wzrasta w największym stopniu w białkach otoczki włóknistej i błony zewnętrznej mitochondriów, której wzmocnienie wynika prawdopodobnie z konieczności odpowiedniej adaptacji rejonu wstawki narażonego na silne deformacje podczas ruchu witki [81].

We włóknach gęstych proces utleniania grup sulfhydrylowych do wiązań dwusiarczkowych nie jest tak znaczny. Niepełny rozwój wiązań dwusiarczkowych powoduje, że włókna te są mniej sztywne, a zatem bardziej elastyczne i nie hamują ruchów witki [8, 9].

ROLA ANDROGENÓW, ESTROGENÓW I PROGESTERONU W NAJĄDRZU

Czynnikami kontrolującymi proces dojrzewania plemników w najądrzu są androgeny. W obecności androgenów następuje w głowie najądrza dojrzewanie plemników, a odpowiednie stężenie tych hormonów w trzonie i ogonie najądrza oraz w nasieniowodzie warunkuje prawidłową ich przeżywalność.

Czas przebywania plemników w najądrzu, w celu uzyskania zdolności do zapłodnienia, różni się nieco u poszczególnych gatunków zwierząt i wynosi przeciętnie 7-14 dni, a u człowieka 10-14 dni. Również odcinek najądrza, który osiągnąć muszą plemniki, by stać się zdolnymi do zapłodnienia, jest różny u poszczególnych gatunków. U szczura plemniki stają się zdolne do zapłodnienia, gdy osiągną bliższą część ogona najądrza. Tracą ją 3 dni po kastracji i 4 dni po hypofizektomii. Podanie 2 mg/kg/dzień propionianu testosteronu zapobiega efektom spowodowanym kastracją lub hypofizektomią [47]. Przy niedoborze androgenów pojawiają się w najądrzu morfologicznie niedojrzałe plemniki [15].

Androgeny mogą działać na plemniki bezpośrednio lub pośrednio

poprzez komórki nabłonka najądrza. Wiele danych świadczy o tym, że jest to głównie wpływ pośredni. Plemniki szczurów, którym podawano trytowany testosteron, znakowane były bardzo słabo w porównaniu z tkanką najądrza [cyt. za [47]]. Androgeny natomiast stymulują komórki nabłonkowe do czynności sekrecyjnych [14, 25, 57, 60, 88, 89], a wydzieliny wytwarzane z kolei w komórkach i substancje pobierane przez nie z krwi przyczyniają się do dojrzewania plemników i ich przeżywania [17-19, 22, 27, 28, 141]. Najądrze otrzymuje androgeny z 3 źródeł. Płyn niosący plemniki z jądra do najądrza zawiera testosteron (T). Transportowany tą drogą T związany jest z białkiem wiążącym androgeny (androgen binding protein — ABP). ABP jest więc nośnikiem androgenów z jądra do najądrza, a los tego białka w najądrzu może być różny. ABP w świetle najądrza może uwalniać niesione androgeny i tracić zdolność wiązania bez wchodzenia do komórek nabłonkowych. Kompleks ABP—androgen może być w całości absorbowany przez komórki nabłonkowe proksymalnej części najądrza. Androgeny uwalniane są wtedy w komórkach, a ABP degradowane jest przez enzymy lizosomalne. Wreszcie ABP, po wejściu do cytoplazmy komórki nabłonkowej, może pełnić wewnątrzkomórkową funkcję transportującą i przekazywać androgeny receptorom cytoplazmatycznym, które przenoszą je do jąder komórkowych [56]. Według oznaczeń Ganjama i Amanna [57], płyn z rete testis buhaja niosący plemniki z jąder do najądrza zawiera 33 ± 3 ng/ml T.

Drugą pulę androgenów otrzymuje najądrze z krwi. Hormony te wchodzą do najądrza poprzez komórki nabłonkowe drogą dyfuzji ułatwionej [139].

Trzecią możliwość sugerują badania Hamiltona i Fawcetta [64]. Autorzy ci podają, że komórki nabłonkowe przewodu najądrza chomika mogą same syntetyzować niewielkie ilości T. Syntetyzują również cholesterol. Podając szczurom znakowany $1\text{-}^{14}\text{C}$ -octan stwierdzili wbudowywanie jego do cholesterolu i T wzdłuż całej długości najądrza i nasieniowodu, w różnej ilości w poszczególnych segmentach. Jednak niecały znakowany cholesterol zostaje zużyty do syntezy androgenów. Część jego jest prawdopodobnie zużywana do odnowy błon komórkowych. Badaniami histochemicznymi i biochemicznymi wykazano, że enzymy biorące udział w sterydogenezie są obecne w komórkach najądrza i mogą powodować przejście pregnenolonu i progesteronu do następnych etapów sterydogenezy [59, 74].

Głównym androgenem najądrza jest dwuhydrotosteron (DHT). Ma on bardziej efektywny wpływ na utrzymanie zdolności do zapłodnienia plemników niż T [94]. Komórki nabłonkowe przewodu najądrza mają wysoką aktywność 5α -reduktazy — enzymu, który powoduje przejście T do DHT [44, 121, 124]. DHT może w najądrzu przechodzić dalej do

5 α -androstan-3 α , 17 β -diolu (3 α -diol), a u niektórych gatunków też do 5 α -androstan-3 β , 17 β -diolu (3 β -diol) [57].

Androgeny występują w różnym stężeniu w płynie najądrza i w komórkach, w zależności od części najądrza. Na przykład stężenie 5- α DHT jest wyższe w głowie najądrza szczura niż w ogonie. Z całkowitej ilości DHT w głowie 30,2 ng/g tkanki, 20,5 ng/g tkanki jest zlokalizowane w płynie najądrza, a pozostała część w komórkach, podczas gdy z całkowitej ilości 8,6 ng/g tkanki tego hormonu w ogonie najądrza, 2,8ng/g tkanki występuje w płynie, a 5,8 ng/g tkanki w komórkach. Ilość T obecna w głowie i ogonie najądrza szczura wynosi 1-2 ng/g tkanki. W płynie kanalików odprowadzających koncentracja T jest wysoka, 28,8 ng/ml, a DHT znacznie niższa, 1,9 ng/ml. Dane te wskazują, że płyn, w którym zanurzone są plemniki w jądrze i najądrzu, zawiera wysokie stężenie androgenów i że w miarę przesuwania się płynu z jądra i dalej poprzez najądrze występuje zmiana stosunku T do DHT [146].

Istnieją dowody, że DHT jako główny metabolit T ma podstawowe znaczenie w procesie dojrzewania plemników w najądrzu. Badania prowadzone przez wielu autorów wykazały, że DHT i 3 α -diol są głównymi metabolitami T w najądrzu szczurów *in vivo* [10, 45, 46, 118]. Stosunek DHT do 3 α -diolu był znacznie wyższy w płynie (5,1 : 1) niż w pozostałej zhomogenizowanej tkance najądrza (2,6 : 1). Fakt, że koncentracja DHT jest wyższa w płynie, przemawia za tym, że DHT przechodzi z komórek do światła przewodu. Według Backa [10], DHT jest ważny dla inicjacji wewnątrzkomórkowych procesów w komórkach najądrza i pełni również rolę aktywnego androgenu w świetle przewodu. Potwierdzeniem bezpośredniego wpływu androgenów na komórki nabłonkowe najądrza jest obecność w nich specyficznych receptorów dla T i DHT. Wykazano, że (³H)T i (³H)DHT podany dożylnie kastrowanym szczurom lokalizuje się w jądrach komórek nabłonkowych. Radioaktywność związana jest z dużymi cząsteczkami ekstraktu jąder komórkowych, które sedymentują w gradiencie gęstości sacharozy przy 3,5 S [14].

Godny podkreślenia jest fakt, że łączenie się (³H)T z receptorem jądrowym *in vitro* jest ograniczone. Przy niskim stężeniu (³H)T w środowisku, 75-92% znakowanego T przechodzi w połączony z receptorem DHT i stan ten nie ulega zmianie, kiedy stężenie (³H)T w środowisku ulega zwiększeniu. Świadczy to o tym, że głównie DHT wiąże się z receptorem komórek nabłonkowych najądrza [14]. Potwierdzeniem są wyniki badań *in vitro*, w których stwierdzono, że DHT zlokalizowany w jądrach komórek nabłonkowych najądrza związany jest z kontrolą syntezy białek [14, 57] i że synteza ta nie może odbywać się bez androgenów [21, 25, 60, 97, 99].

Podanie szczurom antyandrogenu — octanu cyproteronu powoduje,

że komórki najądrza nie pobierają androgenów. Spowodowane jest to kompetycyjnym wiązaniem antyhormonu z receptorem i niemożliwością przeniesienia utworzonego kompleksu octan cyproteronu — receptor do jąder komórkowych [134]. Stwierdzono, że octan cyproteronu podany szczurom podskórnie lub wszczepiony w silastikowych kapsułkach hamuje zdolność do zapłodnienia plemników [131]. Zatem w obecności androgenów komórki najądrza, przez swą zdolność do wydzielania i absorpcji, utrzymują stałe środowisko w świetle przewodu najądrza, korzystne dla dojrzewania i przeżywania plemników.

Przeprowadzono również wiele badań, których celem było określenie funkcji estrogenów w najądrzu i identyfikacja receptorów dla tych hormonów w tym narządzie [37-39, 67]. Interesujących danych dostarczyły tu prace Schleichera i wsp. [125], którzy badali wiązanie estradiolu (^3H) E_2 i DHT (^3H)DHT w najądrzu myszy. Wiązanie (^3H)DHT do jąder komórek głównych nabłonka przewodu było wysokie w głowie najądrza, niskie w trzonie i znowu wysokie w ogonie, podczas gdy znakowany (^3H) E_2 wiązał się najsilniej z jądrami komórek głównych w kanalikach odprowadzających, silnie z komórkami głównymi w głowie najądrza, a w trzonie i ogonie wiązanie było niskie lub zgoła nieobecne. Komórki szczytowe w głowie najądrza i komórki jasne w trzonie i ogonie wykazywały silne wiązanie (^3H) E_2 , a znacznie słabsze (^3H)DHT. To różne nasilenie wiązania (^3H)DHT i (^3H) E_2 w poszczególnych odcinkach najądrza i typach komórek sugeruje, że te dwa hormony pełnią odmienną funkcję zarówno w topograficznie różnych odcinkach najądrza, jak i w poszczególnych typach komórek. Komórki szczytowe i jasne były bowiem silnie znakowane (^3H) E_2 . Oba typy komórek mają właściwości sekrecyjne i absorpcyjne [87], a po kastracji nie stwierdzono zmian w ich ultrastrukturze.

Funkcja estrogenów w najądrzu nie jest zupełnie jasna. Estrogeny są znanymi antyandrogenami. Hamują zarówno wydzielanie gonadotropin przez przysadkę [131], jak i działanie tych hormonów na jądro [131, 133]. Inhibują również efekty działania testosteronu w najądrzu [93]. Tindall i wsp. [135] wykazali, że 17β -estradiol hamuje w 58% wiązanie (^3H)T do cytozolu, a w 95% do jąder komórek przewodu najądrza kastrowanych szczurów, podczas gdy octan cyproteronu hamuje wiązanie tego androgenu odpowiednio w 38 i 83%. 17β -estradiol znosi również wiązanie (^3H)DHT z receptorem jądrowym komórek najądrza i zmienia metabolizm (^3H)T, zmniejszając jego konwersję do (^3H)DHT, podczas gdy octan cyproteronu w badaniach autorów nie wykazywał wpływu na metabolizm T. Dane te sugerują, że 17β -estradiol wywiera w najądrzu bardziej inhibujący efekt niż octan cyproteronu.

Jenkins i wsp. [77] donoszą, że estrogeny mają wpływ na skład jo-

nowy płynu najądrza. Podanie walerianianu estradiolu samcom szczurów zwiększa zawartość Na i chlorków, a zmniejsza stężenie P, S, Ca i Mg w płynie głowy najądrza, natomiast w płynie ogona wzrasta tylko stężenie chlorków, a koncentracja pozostałych jonów nie ulega zmianie. Walerianian estradiolu nie wywiera wpływu na skład płynu kanalików nasiennych i osocza krwi szczurów, zatem w głowie najądrza, gdzie następuje dojrzewanie plemników, zmiany w składzie jonowym płynu najądrza, po podaniu tego estrogeny, są największe.

Trudno wnioskować, na podstawie dostępnych wyników badań, czy walerianian estradiolu wpływa bezpośrednio na komórki lub czynniki regulujące skład jonowy płynu najądrza, czy też zmiany w składzie jonowym płynu są wynikiem jego antyandrogennego działania. Jakkolwiek byłby jednak mechanizm działania estrogenów w najądrzu, biologiczna rola badanych jonów w komórkach, w tym również w plemnikach, jest duża. Udział ich w transporcie komórkowym (Na), metabolizmie energetycznym (P), ruchliwości plemników (Ca) oraz fakt, że są one kofaktorami enzymów (Mg) i składnikami białek strukturalnych (S), ma niewątpliwie duże znaczenie w procesie dojrzewania plemników.

Mamy również doniesienia, że plemniki z ejakulatu mogą metabolizować estradiol do estronu [119]. W ludzkich plemnikach estradiol wiązany jest do plazmolemy, w największej ilości we wstawce, w mniejszej w główce i witec [29]. Plemniki wiążą również progesteron i testosteron [30]. Sposób, w jaki związane z błoną komórkową sterydy przemieszczane są do wnętrza plemnika, nie jest znany. Metabolizowanie estradiolu przez plemniki ma być może znaczenie w żeńskich drogach rodnych, gdzie estrogeny wpływają na migrację ludzkich plemników przez śluz szyjkowy [83].

W najądrzu stwierdza się również obecność progesteronu. W płynie ogona najądrza buhaja, według oznaczeń Ganjama i Amanna [57], występuje $7,4 \pm 0,7$ ng/ml progesteronu, podczas gdy stężenie androgenów wynosi: DHT — $20,3 \pm 1,1$ ng/ml, 3β -diolu — $6,5 \pm 0,4$ ng/ml, 3α -diolu — $4,02 \pm 0,2$ ng/ml, a T — $11,46 \pm 0,71$ ng/ml. Autorzy ci podają, że progesteron występuje w największym stężeniu w tych odcinkach najądrza buhaja, gdzie ma miejsce magazynowanie już dojrzałych plemników.

Inne badania dowiodły, że plemniki izolowane z ogona najądrza kastrowanych chomików utrzymują zdolność do zapłodnienia, kiedy znajdują się w środowisku bogatym w progesteron i DHT lub 3α -diol [92]. Dlatego przypuszcza się, że progesteron utrzymuje żywotność dojrzałych plemników zmagazynowanych w ogonie najądrza.

Danzo i Eller [36] wykazali w badaniach *in vitro* z użyciem skrawków najądrzy kastrowanych królików, że progesteron hamuje konwersję T do DHT i $3\alpha(3\beta)$ -dioli. Całkowite zahamowanie syntezy DHT i $3\alpha(3\beta)$ -

-dioli w środowisku w obecności progesteronu spowodowane jest prawdopodobnie jego hamującym wpływem na aktywność 5α -reduktazy, enzymu koniecznego do konwersji T do DHT. Jest również możliwe, że progesteron hamuje aktywność dehydrogenazy $3\alpha(3\beta)$ -hydroksysterydowej katalizującej przejście DHT do $3\alpha(3\beta)$ -dioli.

Wykazano, że zarówno progesteron, jak i estrogeny wchodzą do najądrza z krwi poprzez błonę podstawną komórek przewodu najądrza na zasadzie dyfuzji ułatwionej [74, 139].

Z przedstawionych tu badań wielu autorów wynika, że plemniki w świetle przewodu najądrza zanurzone są w płynie bogatym w sterydy i że w poszczególnych częściach najądrza skład oraz stężenie tych hormonów są różne, ale stałe i odpowiednie do funkcji, którą spełniają w procesie dojrzewania i przeżywania plemników. Jest prawdopodobne, że hamujący wpływ estrogenów na produkcję androgenów oraz progesteronu na aktywność enzymów biorących udział w sterydogenezie androgenów zapewnia określone i optymalne stężenie T oraz DHT, niezbędne do stymulacji procesów toczących się w najądrzu.

Badania Pierrepointa i wsp. [41, 115 - 117] sugerują również, że najądrze pełni nadrzędną rolę w stosunku do gruczołów dodatkowych i że istnieje możliwość przekazywania hormonów z najądrza do prostaty i pęcherzyków nasiennych poprzez żyłę nasieniowodową oraz przez nasieniowód. Prawidłowy poziom androgenów w najądrzu warunkuje i utrzymuje funkcjonalną aktywność gruczołów dodatkowych [117]. W nieobecności najądrzy stwierdzono zmniejszenie liczby receptorów jądrowych dla androgenów w komórkach prostaty i wzrost liczby receptorów niezajętych [114].

TRANSPORT PLEMNIKÓW PRZEZ NAJĄDRZE

Uwalniane z komórek podporowych plemniki transportowane są do najądrza razem z płynem wytwarzanym w jądrze. W transporcie plemników w jądrze dużą rolę odgrywają skurcze miofibroblastów kanalików nasiennych i osłonki białawej jądra, które są m. in. efektem działania prostaglandyn [40, 58, 65]. Gdy $\text{PGF}_{2\alpha}$ pobudza skurcze miofibroblastów i osłonki, PGE_2 hamuje wielkość i częstość skurczu miofibroblastów, a PGE_1 wykazuje takie działanie w stosunku do osłonki białawej [49, 66].

Transport plemników przez najądrze jest wynikiem skurczu ściany przewodu najądrza i wewnątrzkanalikowego ciśnienia. U wielu gatunków zwierząt najądrze ma unerwienie autonomiczne — adrenergiczne i cho-

linergiczne, chociaż liczba jednych i drugich włókien nerwowych może być różna w poszczególnych częściach najądrza [48, 106]. Szczególnie bogate unerwienie ma ogon najądrza i nasieniowód. Stwierdza się tu przewagę unerwienia współczulnego, a liczba neuronów adrenergicznych jest duża i wzrasta w miarę jak zwiększa się pokład komórek mięśniowych gładkich [105, 129]. Według Baumgartena i wsp. [11] włókna nerwowe układu autonomicznego, szczególnie jednak włókna adrenergiczne, pełnią tu ważną rolę w inicjacji nagłego i silnego skurczu ogona najądrza i nasieniowodu podczas wyrzutu plemników w czasie ejakulacji. Potwierdzeniem bogatego unerwienia tych odcinków jest ich duża wrażliwość na leki adrenergiczne [31, 113].

Odcinek najądrza, od kanalików krętych jądra do środkowej części trzonu, jest natomiast u wielu zwierząt mało unerwiony lub w ogóle nie ma zakończeń nerwowych. Sjöstrand [129] i Norberg [105] badając rozmieszczenie neuronów adrenergicznych w najądrzu stwierdzili, że w głowie najądrza neurony te rozmieszczone są bardzo rzadko, a włókna nerwowe nie dochodzą do ściany przewodu, tylko kończą się na naczyniach krwionośnych. Badania Cosentino i wsp. [34], przeprowadzone na izolowanej głowie najądrza szczura, wykazały, że w skurczach głowy najądrza biorą udział, podobnie jak w osłonce jądra, prostaglandyny. Gdy $\text{PGF}_{2\alpha}$ zwiększa kurczliwość głowy najądrza, PGE_2 obniża ją. Obecność obu tych prostaglandyn stwierdza się również w ogonie najądrza i w nasieniowodzie. Jednoczesne oznaczenia tych substancji w jądrze, głowie najądrza, ogonie i nasieniowodzie umożliwiło porównanie ich stężeń w poszczególnych częściach układu płciowego. Badania takie przeprowadzone przez Cosentino i wsp. [34] wykazały, że PG występują w bardzo niskim stężeniu w jądrze, bardzo wysokim w nasieniowodzie, a stężenie w najądrzu ma wartości pośrednie. W regulacji skurczów ściany ogona najądrza biorą również udział hormony tylnego płata przysadki mózgowej — wazopresyna i oksytocyna [68, 76, 96]. Wszystkie te czynniki rozpoczynają i utrzymują falę perystaltyczną, która ma zasadnicze znaczenie w transporcie plemników przez najądrze.

Zaobserwowano, że kiedy fala skurczowa przesuwa się w kierunku ogona najądrza, w miejscu skurczu zmniejsza się średnica kanału najądrza, a plemniki wraz z płynem najądrza przesuwane są w kierunku odwrotnym. W czasie rozkurczu zawartość kanału przepływa z powrotem, ale już w kierunku zgodnym z perystaltyką. Niemalże znaczenie w tym procesie mają zagięcia przewodu najądrza. Stanowią one mechaniczną zaporę, przez co w czasie skurczu wytwarza się dodatkowe ciśnienie, które w czasie rozkurczu wypycha zawartość tej części kanału w kierunku zgodnym z falą perystaltyczną [34].

FAGOCYTOZA PLEMNIKÓW

Chociaż środowisko ogona najądrza i nasieniowodu jest korzystne dla plemników, nie zachowują one jednak przez czas nieokreślony swojej żywotności. Po dłuższej przerwie w ejakulacjach plemniki tracą najpierw zdolność do zapłodnienia, potem ruchliwość i w końcu zostają sfagocytowane. Stare plemniki są eliminowane z układu płciowego w regularnych odstępach czasu. Starzenie się plemników w najądrzu powoduje utratę zdolności do zapłodnienia w ciągu 20 dni u królika, 26 dni u świnki morskiej i 20 dni u szczura, podczas gdy ruchliwość plemników zachowana jest u tych zwierząt znacznie dłużej, odpowiednio przez 40, 53 i 42 dni (cyt. za [47]).

Fagocytoza plemników odbywa się w wielu miejscach męskiego układu płciowego: w jądrze [72], sieci jądra [61, 72], najądrzu [61, 70, 71, 95, 108] i nasieniowodzie [33, 102]. W najądrzu biorą w niej udział komórki nabłonkowe przewodu najądrza i wewnątrz nabłonkowe makrofagi [61, 71, 72, 95], które mogą w pewnych warunkach opuszczać nabłonek, wchodzić do światła kanału i fagocytować plemniki [61, 71, 72]. Znaczną aktywność fagocytarną wykazują komórki nabłonkowe ogona najądrza [95], a szczególnie silną komórki nabłonka nasieniowodu [102]. W mikroskopie elektronowym obserwuje się w cytoplazmie tych ostatnich organel komórkowych plemników i fragmenty witek, leżące bądź luźno w cytoplazmie, bądź w dużych, otoczonych błoną wakuolach widocznych wyraźnie w mikroskopie świetlnym. Plemniki „pobierane” są przez komórki nabłonkowe w różny sposób. Badania Murakami i wsp. [102] przeprowadzone w nabłonku nasieniowodu kota za pomocą mikroskopu elektronowego transmisyjnego i skaningowego wykazały, że plemniki pobierane są przez komórki najczęściej w pozycji pionowej główką albo witeką, rzadziej częścią środkową, i że komórki nabłonkowe tworzą wypustki apikalnej cytoplazmy, pokryte plazmolemą. Wypustki te jakby wprowadzają plemniki do wnętrza komórki. Jedna komórka nabłonkowa może fagocytować dwa lub więcej plemników.

Badania przeprowadzone u myszy z defektem w garniturze chromosomalnym jąder plemników wykazały, że aktywność fagocytarna komórek nabłonkowych i wewnątrz kanałowych makrofagów jest w tym przypadku bardzo duża [95]. Ciągłe jednak nie jest jasne, jak komórki nabłonkowe czy makrofagi odróżniają stare lub uszkodzone plemniki od prawidłowych. Badania *in vitro* nie dostarczyły tu spodziewanych rezultatów. Makrofagi otrzewnej myszy fagocytowały plemniki zarówno żywe, jak i martwe, pochodzące od tej samej myszy, jak i myszy innego szczepu, a także plemniki innego gatunku. Stwierdzono jednak znaczny spadek fagocytozy, kiedy za pomocą hipotonicznego buforu uszkodzono bło-

nę komórkową plemników [104]. Prawdopodobnie uszkodzona błona komórkowa plemnika traci struktury, które rozpoznawane są przez komórki fagocytujące.

Wydaje się, że aktywność fagocytarna komórek nabłonkowych i makrofagów nie jest ograniczona tylko do fagocytozy plemników, lecz ma znacznie szerszy zasięg. Wynika to z badań Murakami i wsp. [103], którzy po wprowadzeniu lateksu do nasieniowodu kota stwierdzili, że fagocytowany jest on również przez komórki nabłonkowe i makrofagi. Zatem komórki te nie są wybiórczo nastawione na fagocytozę plemników, ale mogą unieczynniać też inny obcy materiał, oczyszczając w ten sposób światło nasieniowodu.

Przedstawione wiadomości dotyczące morfologii i funkcji najądrza dowodzą, że wydzielanie w komórkach nabłonkowych i odpowiednie stężenie hormonów androgennych, estrogenów i progesteronu w tym narządzie mają podstawowe znaczenie w dojrzewaniu i przeżywaniu plemników. Te procesy, jak i możliwość eliminowania starych i uszkodzonych komórek rozrodczych w najądrzu, świadczą o randze i znaczeniu tego odcinka układu płciowego w procesie męskiej płodności.

LITERATURA

- [1] ABOU-HAILA A., FAIN-MAUREL M. A., Postnatal differentiation of the enzymatic activity of the mouse epididymis, *Int. J. Androl.*, **8**: 441-458, 1985.
- [2] ACOTT T. S., HOSKINS D. D., Bovine sperm forward motility protein, *J. Biol. Chem.*, **253**: 6744-6750, 1978.
- [3] AMANN R. P., KILLIAN G. J., BENTON A. W., Differences in the electrophoretic characteristics of bovine rete testis fluid and plasma from the cauda epididymis, *J. Reprod. Fert.*, **35**: 321-330, 1973.
- [4] ARYA M., VANHA-PERTTULA T., Lectin-binding pattern of bull testis and epididymis, *J. Androl.*, **6**: 230-242, 1985.
- [5] — Postnatal development of lectin-binding pattern in the rat testis and epididymis, *Acta Anat.*, **127**: 100-109, 1986.
- [6] — Comparison of lectin-staining pattern in testis and epididymis of gerbil, guinea pig, mouse and nutria, *Am. J. Anat.*, **175**: 449-469, 1986.
- [7] ATTRAMADAL A., BARDIN C. W., GUNSALUS G. L., MUSTO N. A., HANSSON V., Immunocytochemical localization of androgen-binding protein in rat Sertoli and epididymal cells, *Biol. Reprod.*, **25**: 983-988, 1981.
- [8] BACCETTI B., PALLINI V., BURRINI A. G., The accessory fibres of the sperm tail. II. Their role in binding zinc in mammals and cephalopods, *J. Ultrastr. Res.*, **54**: 261-275, 1976.
- [9] — The accessory fibres of the sperm tail. III. High-sulfur and low-sulfur components in mammals and cephalopods, *J. Ultrastr. Res.*, **57**: 289-308, 1976.
- [10] BACK D. J., The presence of metabolites of ^3H -testosterone in the lumen of cauda epididymis of rat, *Steroids*, **25**: 413-420, 1975.

- [11] BAUMGARTEN H. G., HOLSTEIN A. F., ROSENGREN E., Arrangement, ultrastructure and adrenergic innervation of smooth musculature of the ductuli efferentes, ductus epididymis and ductus deferens of man, *Z. Zellforsch. mikrosk. Anat.*, **120**: 37-79, 1971.
- [12] BEDFORD J. M., Maturation, transport, and fate of spermatozoa in the epididymis, [w] *Handbook of physiology*. Vol. 5, Section 7, ed. Greep R. O., Astwood E. B., Amer. Physiol. Soc., Washington 1975, 303-317.
- [13] BEDFORD J. M., NICANDER L., Ultrastructural changes in the acrosome and sperm membranes during maturation of spermatozoa in the testis and epididymis of the rabbit and monkey, *J. Anat.*, **108**: 527-544, 1971.
- [14] BLAQUIER J. A., CALANDRA R. S., Intranuclear receptor for androgens in rat epididymis, *Endocrinology*, **93**: 51-60, 1973.
- [15] BLAQUIER J. A., CAMEO M. S., BURGOS M. H., The role of androgens in the maturation of epididymal spermatozoa in the guinea-pig, *Endocrinology*, **90**: 839-842, 1972.
- [16] BROOKS D. E., Purification of rat epididymal proteins D and E, demonstration of shared immunological determinants, and identification of regional synthesis and secretion, *Int. J. Androl.*, **5**: 513-524, 1982.
- [17] — Selective binding of specific rat epididymal secretory proteins to spermatozoa and erythrocytes, *Gamete Res.*, **4**: 367-376, 1983.
- [18] — Protein secretion by the rat epididymis can be selectively modified in vitro by local anesthetics, glucose deprivation, dinitrophenol, ouabain and ionophores, *J. Androl.*, **5**: 351-360, 1984.
- [19] — Characterization of a 22K Da protein with widespread tissue distribution but which is uniquely present in secretion of the testis and epididymis and on the surface of spermatozoa, *Biochim. Biophys. Acta*, **841**: 59-70, 1985.
- [20] BROOKS D. E., HAMILTON D. W., MALLEK A. H., Carnitine and glycerylphosphorylcholine in the reproductive tract of the male rat, *J. Reprod. Fert.*, **36**: 141-160, 1974.
- [21] BROOKS D. E., MEANS A. R., WRIGHT E. J., SINGH S. P., TIVER K. K., Molecular cloning of the cDNA for two major androgen-dependent secretory proteins of 18.5 kilodaltons synthesized by the rat epididymis, *J. Biol. Chem.*, **26**: 4956-4961, 1986.
- [22] BROOKS D. E., TIVER K., Localization of epididymal secretory proteins on rat spermatozoa, *J. Reprod. Fert.*, **69**: 651-657, 1983.
- [23] CALVIN H. I., BEDFORD J. M., Formation of disulphide bonds in the nucleus and accessory structures of mammalian spermatozoa during maturation in the epididymis, *J. Reprod. Fert. Suppl.*, **13**: 65-75, 1971.
- [24] CALVIN H. I., YU C. C., BEDFORD J. M., Effects of epididymal maturation, zinc (II) and copper (II) on the reactive sulfhydryl content of structural elements in rat spermatozoa, *Exp. Cell Res.*, **81**: 333-341, 1973.
- [25] CAMEO M. S., BLAQUIER J. A., Androgen-controlled specific proteins in rat epididymis, *J. Endocr.*, **69**: 47-55, 1976.
- [26] CAMEO M. S., CUASNICÚ P. S., GARBERI J. C., GONZALES ECHEVERRIA F., KOHANE A., PIAZZA A., PIÑEIRO L., BLAQUIER J. A., Some studies on secretory epididymal proteins and their possible relation to sperm maturation, [w] *Molecular basic and clinical implications*, ed. D'Agata R., Lipsett M. B., Polosa P., van der Molen H. J., Raven Press, New York 1983, 27-35.
- [27] CASILLAS E. R., ERICKSON B. J., Studies on carnitine synthesis in the rat epididymis, *J. Reprod. Fert.*, **44**: 287-291, 1975.

- [28] CASILLAS E. R., VILLALOBOS P., GONZALES R., Distribution of carnitine and acylcarnitine in the hamster epididymis and in epididymal spermatozoa during maturation, *J. Reprod. Fert.*, **72**: 197-201, 1984.
- [29] CHENG C. Y., BOETTCHER B., ROSE R. J., KAY D. J., TINNEBERG H. R., The binding of sex steroids to human spermatozoa. An autoradiographic study, *Int. J. Androl.*, **4**: 1-17, 1981.
- [30] CHENG C. Y., ROSE R. J., BOETTCHER B., The binding of oestradiol-17 beta to human spermatozoa — an electron microscope autoradiographic study, *Int. J. Androl.*, **4**: 304-313, 1981.
- [31] CHINOY N. J., CHINOY M. R., Infertility induced by prostaglandins in albino rats by adrenergic block in the vas deferens, *Int. J. Fertil.*, **26**: 1-7, 1981.
- [32] COHEN J. P., HOFFER A. P., ROSEN S., Carbonic anhydrase localization in the epididymis and testis of the rat: Histochemical and biochemical analysis, *Biol. Reprod.*, **14**: 339-346, 1976.
- [33] COOPER T. G., HAMILTON D. W., Observation on destruction of spermatozoa in the cauda epididymis and proximal vas deferens of non seasonal male animals, *Am. J. Anat.*, **149**: 93-110, 1977.
- [34] COSENTINO M. J., TAKIHARA H., BURHOP J. W., COCKETT A. T. K., Regulation of rat caput epididymis contractility by prostaglandins, *J. Androl.*, **5**: 216-222, 1984.
- [35] CRABO B., Studies on the composition of epididymal content in bulls and boars, *Acta Vet. Scand.*, Suppl., **5**: 1-94, 1965.
- [36] DANZO B. J., ELLER B. C., The effects of various steroids on testosterone metabolism by the sexually mature rabbit epididymis, *Steroids*, **44**: 435-445, 1984.
- [37] DANZO B. J., ELLER B. C., HENDRY W. J. III, Identification of cytoplasmic estrogen receptors in the accessory sex organs of the rabbit and their comparison to the cytoplasmic estrogen receptor in the epididymis, *Molec. Cell Endocr.*, **33**: 197-209, 1983.
- [38] DANZO B. J., ELLER B. C., JUDY L. A., TRAUTMAN J. R., ORGEBIN-CRIST M. C., Estradiol binding in cytosol from epididymides of immature rabbits, *Molec. Cell Endocr.*, **2**: 91-105, 1975.
- [39] DANZO B. J., SUTTON W., ELLER B. C., Analysis of [³H] estradiol binding to nuclei prepared from epididymides of sexually immature intact rabbits, *Molec. Cell Endocr.*, **9**: 291-301, 1978.
- [40] DAVIS J. R., HORWITZ A. M., Response of the rabbit isolated testicular capsule and hypothermic and hyperthermic temperatures to norepinephrine, acetylcholine and prostaglandin F_{2α}, *Andrologia*, **1**: 453-460, 1979.
- [41] DHABUWALA C. B., ROBERTS E. E., PIERREPOINT C. G., The radiographic demonstration of the dynamic transfer of radio-opaque material from the deferential vein to the prostate in the dog, *Invest. Urol.*, **15**: 346-347, 1977.
- [42] DJAKIEW D., BYERS S. W., DYM M., Receptor-mediated endocytosis of alfa₂-macroglobulin and transferrin in rat caput epididymal epithelial cells in vitro, *Biol. Reprod.*, **31**: 1073-1085, 1984.
- [43] DJAKIEW D., JONES R. C., Sperm maturation, fluid transport, and secretion and absorption of protein in the epididymis of the echidna, *Tachyglossus aculeatus*, *J. Reprod. Fert.*, **68**: 445-456, 1983.
- [44] DJØSELAND O., BRUCHOWSKY N., RENNIE P. S., OTAL N., HØGLO S., 5α-reductase activity in stroma and epithelium of rat prostate and epididymis. A contribution to elucidation of the mechanism for development of

- hyperplastic growth of prostatic tissue, *Acta Endocrinol.*, **103**: 273-281, 1983.
- [45] DJØSELAND O., HANSSON V., HAUGHEN H. N., Androgen metabolism by rat epididymis. 1. Metabolic conversion of [³H] testosterone in vitro, *Steroids*, **21**: 773-783, 1973.
- [46] — Androgen metabolism by rat epididymis. 2. Metabolic conversion of [³H] testosterone in vitro, *Steroids*, **23**: 397-410, 1974.
- [47] DYSON A. L. M. B., ORGEBIN-GRIST M. C., Effect of hypophysectomy, castration and androgen replacement upon the fertilizing ability of rat epididymal spermatozoa, *Endocrinology*, **93**: 391-402, 1973.
- [48] ELBADAWI A., SCHENK E. A., The distribution of cholinergic and adrenergic nerves in the mammalian epididymis. A comparative histochemical study, *Am. J. Anat.*, **121**: 1-13, 1967.
- [49] FARR C. H., ELLIS L. C., In vitro contractility of rat seminiferous tubules in response to prostaglandins, cyclic GMP, testosterone and 2,4-dibromoacetophenone, *J. Reprod. Fert.*, **58**: 37-44, 1980.
- [50] FAWCETT D. W., PHILLIPS D. H., Observations on the release of spermatozoa and on changes in the head during passage through the epididymis, *J. Reprod. Fert. Suppl.*, **6**: 405-418, 1969.
- [51] FAYE J. C., DUGUET L., MAZZUCA M., BAYARD R., Purification, radioimmunoassay and immunohistochemical localization of glycoprotein produced by the rat epididymis, *Biol. Reprod.*, **23**: 423-432, 1980.
- [52] FLECHON J. E., Ultrastructural and cytochemical analysis of the plasma membrane of mammalian sperm during epididymal maturation, *Prog. Reprod. Biol.*, **8**: 90-99, 1981.
- [53] FLICKINGER C. J., Radioautographic analysis of the secretory pathway for glycoproteins in principal cells of the mouse epididymis exposed to [³H] fucose, *Biol. Reprod.*, **32**: 377-389, 1985.
- [54] FLICKINGER C. J., HERR J. C., ERTL K. E., Identification and isolation of epididymal luminal proteins of the mouse, *J. Androl.*, **7**: 163-168, 1986.
- [55] FLICKINGER C. J., WILSON K. M., GRAY H. D., The secretory pathway in the mouse epididymis as shown by electron microscope radioautography of principal cells exposed to monensin, *Anat. Rec.*, **210**: 435-448, 1984.
- [56] FRENCH F. S., RITZEN E. M., A high-affinity androgen-binding protein (ABP) in rat testis: Evidence for secretion into efferent duct fluid and absorption by epididymis, *Endocrinology*, **93**: 88-95, 1973.
- [57] GANJAM V. K., AMANN R. P., Steroids in fluids and sperm entering and leaving bovine epididymis, epididymal tissue, and accessory sex gland secretions, *Endocrinology*, **99**: 1618-1630, 1976.
- [58] GEROZISSIS K., DRAY F., Selective and age-dependent changes of prostaglandin E₂ in the epididymis and vas deferens of the rat, *J. Reprod. Fert.*, **50**: 113-119, 1977.
- [59] GLOYNA R. E., WILSON J. D., A comparative study of the conversion of testosterone to 17 β -hydroxy-5 α androstan 3-one (dihydrotestosterone) by prostate and epididymis, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **29**: 970-977, 1969.
- [60] GONZÁLEZ ECHEVERRÍA F. M., CUASNICÚ P. S., BLAQUIER J. A., Identification of androgen-dependent glycoproteins in the hamster epididymis and their association with spermatozoa, *J. Reprod. Fert.*, **64**: 1-7, 1982.
- [61] GOYAL H. O., Light microscopic and ultrastructural evidence of epithelial phagocytosis of sperm in the rete testis and ductuli efferentes in the bull, *Am. J. Vet. Res.*, **43**: 785-790, 1982.

- [62] — Morphology of the bovine epididymis, *Am. J. Anat.*, **172**: 155-172, 1985.
- [63] HAMILTON D. W., Structure and function of epithelium lining the ductuli efferentes, ductus epididymis, and ductus deferens in the rat, [w] *Handbook of physiology*, Vol. 5, Section 7, red. Greep R. O., Astwood E. B., Amer. Physiol. Soc., Washington 1975, 259-301.
- [64] HAMILTON D. W., FAWCETT D. W., In vitro synthesis of cholesterol and testosterone from acetate by rat epididymis and vas deferens, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **133**: 693-695, 1970.
- [65] HARGROVE J. L., MacINDOE J. H., ELLIS L. C., Testicular contractile cells and sperm transport, *Fert. Steril.*, **28**: 1146-1157, 1977.
- [66] HARGROVE J. L., SEELEY R. R., ELLIS L. C., Rabbit testicular contractions: bimotile interaction of prostaglandin E₁ with other agonists, *Am. J. Physiol.*, **228**: 810-814, 1975.
- [67] HENDRY W. J., ELLER B. C., ORGEBIN-CRIST M. C., DANZO B. J., Hormonal effects on the estrogen receptor system in the epididymis and accessory sex organs of sexually immature rabbits, *J. Steroid Biochem.*, **23**: 39-49, 1985.
- [68] HIB J., The in vivo effects of oxytocin and vasopressin on spontaneous contractility of the rat epididymis, *Int. J. Fert.*, **22**: 63-64, 1977.
- [69] HINTON B. T., The epididymal microenvironment, *Invest. Urol.*, **18**: 1-10, 1980.
- [70] HOFFER A. P., HAMILTON D. W., Phagocytosis of sperm by the epithelial cells in ductuli efferentes of experimental rats, *Anat. Rec.*, **178**: 376-377, 1974.
- [71] HOFFER A. P., HAMILTON D. W., FAWCETT D. W., Phagocytosis of spermatozoa by the epithelial cells of the ductuli efferentes after epididymal obstruction in the rat, *J. Reprod. Fert.*, **44**: 1-9, 1975.
- [72] HOLSTEIN A. F., Spermiphagy in the seminiferous tubules and excurrent ducts of the testis in rhesus monkey and man, *Andrologia*, **10**: 331-352, 1978.
- [73] HOSKINS D. D., BRANDT H., ACOTT T. S., Initiation of sperm motility in the mammalian epididymis, *Fed. Proc.*, **37**: 2534-2542, 1978.
- [74] INANO H., MACHINO A., TAMAOKI B., In vitro metabolism of steroid hormones by cell free homogenates of epididymides of adult rats, *Endocrinology*, **84**: 997-1003, 1969.
- [75] JAAKKOLA U. M., Regional variations in transport of the luminal contents of the rat epididymis in vivo, *J. Reprod. Fert.*, **68**: 465-470, 1983.
- [76] JAAKKOLA U. M., TALO A., Effects of oxytocin and vasopressin on electrical and mechanical activity of the rat epididymis in vitro, *J. Reprod. Fertil.*, **63**: 47-51, 1981.
- [77] JENKINS A. D., LECHENE C. P., HOWARDS S. S., The effect of estrogen administration in vivo on the elemental composition of the intraluminal fluids of the seminiferous tubules, rete testis and epididymis of the rat, *J. Androl.*, **4**: 272-275, 1983.
- [78] JESSE S. J., HOWARDS S. S., A survey of sperm, potassium and sodium concentrations in the tubular fluid of the hamster epididymis, *Biol. Reprod.*, **15**: 626-631, 1976.
- [79] JOHNSON L. A., PURSEL V. G., GERRITS R. J., Total phospholipid and phospholipid fatty acids of ejaculated and epididymal semen and seminal vesicle fluids of boars, *J. Animal Sci.*, **35**: 398-403, 1972.
- [80] JONES R., BROWN C. R., Association of epididymal secretory proteins show-

- ing α -lactalbumin-like activity with the plasma membrane of rat spermatozoa, *Biochem. J.*, **206**: 161-164, 1982.
- [81] KACZMARSKI F., *Ultrastruktura plemnika ssaka*, *Post. Biol. Kom.*, **5**: 301-319, 1978.
- [82] KAMIŃSKA B., RÓZEWICKA L., DOMINIAK B., MIELNICKA E., MIKULSKA D., Zinc content in epididymal spermatozoa of metoclopramide-treated rats, *Andrologia*, **19**: 677-683, 1987.
- [83] KESSERN-KOSS E., Influence of various hormonal contraceptives on sperm migration in vivo, *Fert. Steril.*, **22**: 584-603, 1971.
- [84] KOHANE A. C., CAMEO M. S., PIÑEIRO L., GARBERI J. C., BLAQUIER J. A., Distribution and site of production of specific proteins in rat epididymis, *Biol. Reprod.*, **23**: 181-187, 1980.
- [85] KOHANE A. G., GARBERI J. C., CAMEO M. S., BLAQUIER J. A., Quantitative determination of specific proteins in rat epididymis, *J. Steroid Biochem.*, **11**: 671-674, 1979.
- [86] KOSKIMIES A. J., KORMANO M., Proteins in fluids from different segments of the rat epididymis, *J. Reprod. Fert.*, **43**: 345-348, 1975.
- [87] KUMAR T. C., PRAKASH A., PRASAD M. R. N., Ultrastructure of clear cell lining the epididymal lumen of the rat, *Anat. Anz.*, **147**: 220-230, 1980.
- [88] LEA O. A., FRENCH F. S., Characterization of an acidic epididymal glycoprotein secreted by principal cells of the rat epididymis, *Biochim. Biophys. Acta*, **688**: 370-376, 1981.
- [89] LEA O. A., PETRUSZ P., FRENCH F. S., Purification and localization of acidic epididymal glycoprotein (AEG): a sperm coating protein secreted by the rat epididymis, *Int. J. Androl. Suppl.*, **2**: 592-607, 1978.
- [90] LEVINE N., KELLY H., Measurement of pH in rat epididymis in vivo, *J. Reprod. Fert.*, **52**: 333-335, 1978.
- [91] LEVINE N., MARSH D. J., Micropuncture studies and the electrochemical aspects of fluid and electrolyte transport in individual seminiferous tubules, the epididymis and the vas deferens in rat, *J. Physiol.*, **213**: 557-570, 1971.
- [92] LUBICZ-NAWROCKI C. M., The effect of metabolites of testosterone on the viability of hamster epididymal spermatozoa, *J. Endocrinol.*, **58**: 193-198, 1973.
- [93] — The inhibition of fertilizing ability of epididymal spermatozoa by the administration of oestradiol benzoate to testosterone-maintained hypophysectomized or castrated hamsters, *J. Endocrinol.*, **61**: 133-138, 1974.
- [94] — The effects of metabolites of testosterone on the development of fertilizing ability of spermatozoa in the epididymis of castrated hamsters, *J. Exp. Zool.*, **197**: 89-96, 1976.
- [95] MALORNI W., de MARTINO C., CAPANNA, E., Ultrastructural features of epididymal spermatophagy in subfertile chromosomally derived mice, *Arch. Androl.*, **13**: 289-297, 1984.
- [96] MELIN P., Effects in vivo of neurohypophysial hormones on the contractile activity of accessory sex organs in male rabbits, *J. Reprod. Fert.*, **22**: 283-292, 1970.
- [97] MONGKOLSIRIKIEAT S., CHULAVATNATOL M., Phosphorylated secretory proteins from rat epididymis and their androgenic control, *J. Reprod. Fert.*, **72**: 423-428, 1984.
- [98] MOORE H. D. M., Localization of specific glycoproteins secreted by the rabbit and hamster epididymis, *Biol. Reprod.*, **22**: 705-718, 1980.

- [99] MOORE H. D. M., BEDFORD J. M., Androgen-dependence of rat epididymal epithelial cells: Changes in ultrastructure and protein uptake following short-term castration, *Anat. Rec.*, **187**: 659-660, 1977.
- [100] — The differential absorptive activity of epithelial cells of the rat epididymis before and after castration, *Anat. Rec.*, **193**: 313-328, 1979.
- [101] MORALES C., HERMO L., Demonstration of fluid-phase endocytosis in epithelial cells of the male reproductive system by means of horse-radish peroxidase-colloidal gold complex, *Cell Tissue Res.*, **230**: 503-510, 1983.
- [102] MURAKAMI M., NISHIDA T., IWANAGA S., SHIROMOTO M., Scanning and transmission electron microscopic evidence of epithelial phagocytosis of spermatozoa in the terminal region of the vas deferens of the cat, *Experientia*, **40**: 958-960, 1984.
- [103] MURAKAMI M., SWANAGA S., NISHIDA T., AIBA T., Phagocytosis of latex beads by the epithelial cells in the terminal region of the vas deferens of the cat: SEM and TEM study, *Andrologia*, **16**: 548-553, 1984.
- [104] NECHALA L., HRUDKA F., Spermiphagy in vitro, *Arch. Androl.*, **13**: 245-260, 1984.
- [105] NORBERG K. A., RISLEY P. L., UNGERSTEDT U., Adrenergic innervation of the male reproductive ducts in some animals. I. The distribution of adrenergic nerves, *Z. Zellforsch.*, **76**: 278-286, 1967.
- [106] NOUHOUAYI Y., NEGULESCO I., Données histochimiques et ultrastructurales sur l'innervation adrénergique et cholinergique de l'épididyme chez la souris, *Acta Anat.*, **128**: 23-26, 1987.
- [107] OLSON G. E., HINTON B. T., Regional differences in luminal fluid polypeptides of the rat testis and epididymis revealed by two-dimensional gel electrophoresis, *J. Androl.*, **6**: 20-34, 1985.
- [108] PAUFLER S. K., FOOTE R. H., Sperm retention and resorption in sexually active rabbits with epididymal ligatures, *Proc. Soc. Biol. Med.*, **131**: 1179-1183, 1969.
- [109] PAULOS A., VOGLMAYR J. K., WHITE I. G., Phospholipid changes in spermatozoa during passage through the genital tract of the bull, *Biochim. Biophys. Acta*, **306**: 194-202, 1973.
- [110] PELLICCIARI C., HOSOKAWA Y., FUKUDA M., MANFREDI ROMANI NI M. G., Cytofluorometric study of nuclear sulphhydryl and disulphide groups during sperm maturation in the mouse, *J. Reprod. Fert.*, **68**: 371-376, 1983.
- [111] PELLINIEMI L., DYM M., GUNSALUS G. L., MUSTO N. A., BARDIN C. W., FAWCETT D. W., Immunological localization of androgen-binding protein in the male rat reproductive tract, *Endocrinology*, **108**: 925-931, 1981.
- [112] PHOLPRAMOL C., LEA O. A., BURROW P. V., DOTT H. M., SETCHELL B. P., The effect of acidic epididymal glycoprotein (AEG) and some other proteins on the motility of rat epididymal spermatozoa, *Int. J. Androl.*, **6**: 240-248, 1983.
- [113] PHOLPRAMOL C., TRIPHROM N., Effects of cholinergic and adrenergic drugs on intraluminal pressures and contractility of the rat testis and epididymis in vivo, *J. Reprod. Fert.*, **71**: 181-188, 1984.
- [114] PIERREPOINT C. G., DAVIES P., A study of the androgenic function of the epididymis, *J. Steroid Biochem.*, **20**: 1105-1111, 1984.
- [115] PIERREPOINT C. G., DAVIES P., JOHN B. M., A direct control of the prostate and seminal vesicles via the vas deferens, *J. Steroid Biochem.*, **5**: 383, 1974.

- [116] PIERREPOINT C. G., DAVIES P., MILLINGTON D., JOHN B. M., Evidence that the deferential vein acts as a local transport system for androgen in the dog and the rat, *J. Reprod. Fert.*, **43**: 293-303, 1975.
- [117] PIERREPOINT C. G., DAVIES P., WILSON D. W., The role of epididymis and ductus deferens in the direct and unilateral control of the prostate and seminal vesicles of the rat, *J. Reprod. Fert.*, **41**: 413-423, 1974.
- [118] PUJAL A., BAYARD F., LOUVET J. P., BOULAND C., Testosterone and dihydrotestosterone concentrations in plasma, epididymal tissues and seminal fluid of adult rats, *Endocrinology*, **98**: 111-113, 1976.
- [119] RAJALAKSHMI M., SEHGAL A., PRUTHI J. S., ANAND KUMAR T. C., Steroid metabolism by monkey and human spermatozoa, *Steroids*, **4**: 587-595, 1983.
- [120] RIFKIN J. M., OLSON G. E., Characterization of maturation dependent extrinsic proteins of the rat sperm surface, *J. Cell Biol.*, **100**: 1582-1591, 1985.
- [121] ROBAIRE B., EWING L. L., ZIRKIN R. B., IRBY D. C., Steroid Δ^4 -5 α -reductase and 5 α -hydroxysteroid dehydrogenase in the rat epididymis, *Endocrinology*, **101**: 1379-1390, 1977.
- [122] ROBINSON R., FRITZ I. B., Myoinositol biosynthesis by Sertoli cells and levels of mioinositol biosynthetic enzymes in testis and epididymis, *Can. J. Biochem.*, **57**: 962-967, 1979.
- [123] RÓŻEWICKA L., LASZCZYŃSKA M., Computer image analysis of spermatozoa from testis as well as caput and cauda of rat's epididymis, *Folia Histochem. Cytobiol.*, **22**: 224-225, 1984.
- [124] SCHEER H., ROBAIRE B., Subcellular distribution of steroid Δ^4 -5 α -reductase and 3 α -hydroxysteroid dehydrogenase in the rat epididymis during sexual maturation, *Biol. Reprod.*, **29**: 1-10, 1983.
- [125] SCHLEICHER G., DREWS U., STUMPF W. E., SAR M., Differential distribution of dihydrotestosterone and estradiol binding sites in the epididymis of the mouse, *Histochemistry*, **81**: 139-147, 1984.
- [126] SCOTT T. W., VOGLMAYR J. K., SETCHELL B. P., Lipid composition and metabolism in testicular and ejaculated ram spermatozoa, *Biochem. J.*, **102**: 456-461, 1967.
- [127] SETCHELL B. P., DAVIES R. V., GLADWELL R. T., HINTON B. T., MAIN S. J., PILSWORTH L., WAITES G. M. H., The movement of fluid in the seminiferous tubules and rete testis, *Ann. Biol. Anim. Biochim. Biophys.*, **18**: 623-632, 1978.
- [128] SINOWATZ F., Ultrastrukturelle und enzymhистоchemische Untersuchungen am Ductus epididymidis des Rindes, *Adv. Vet. Med.*, **32**, 1-99, 1981.
- [129] SJÖSTRAND N. O., The adrenergic innervation of the vas deferens and the accessory male genital glands, *Acta Physiol. Scand. Suppl.*, **257**: 1-4, 1965.
- [130] ŚLIWA L., Regulacja ruchliwości plemników ssaków, *Kosmos*, **3**: 289-294, 1984.
- [131] STEINBECK H., MEHRING M., NEUMANN F., Comparison of the effects of cyproterone, cyproterone acetate and oestradiol on testicular function, accessory sexual glands and fertility in a long-term study in rats, *J. Reprod. Fert.*, **26**: 65-76, 1971.
- [132] SUSKO-PARRISH J. S., HAMMERSTEDT R. H., SENGER P. L., Binding of

- ¹²⁵I-succinylated concanavalin A to bovine spermatozoa, *Biol. Reprod.*, **32**: 129-136, 1985.
- [133] TCHOLAKIAN R. K., CHOWDHURY M., CHOWDHURY A. K., Recovery of testicular and pituitary functions in adult male rats after cessation of short and long-term estradiol treatment., *Biol. Reprod.*, **19**: 431-438, 1978.
- [134] TEZÓN J. G., VAZQUER M. H., BLAQUIER J. A., Androgen-controlled sub-cellular distribution of its receptor in the rat epididymis: 5 α -dihydrotestosterone-induced translocation is blocked by antiandrogens, *Endocrinology*, **6**: 2039-2045, 1982.
- [135] TINDALL D. J., FRENCH F. S., NAYFEH S. N., Estradiol-17 β inhibition of androgen uptake, metabolism and binding in epididymis of adult male rats in vivo: A comparison with cyproterone acetate, *Steroids*, **37**: 257-268, 1981.
- [136] TUCK R. R., SETCHELL B. P., WAITES G. M. H., YOUNG J. A., The composition of fluid collected by micropuncture and catheterization from the seminiferous tubules and rete testis of rats, *Pfluegers Arch. ges. Physiol.*, **318**: 225-243, 1970.
- [137] TURNER T. T., On the epididymis and its function, *Invest. Urol.*, **16**: 311-321, 1979.
- [138] — Resorption versus secretion in the rat epididymis, *J. Reprod. Fert.*, **72**: 509-514, 1984.
- [139] TURNER T. T., COCHRAN R. C., HOWARDS S. S., Transfer of steroids across the hamster blood testis and blood epididymal barriers, *Biol. Reprod.*, **25**: 342-348, 1981.
- [140] TURNER T. T., HARTMANN P. K., HOWARDS S. S., In vivo sodium, potassium and sperm concentrations in the rat epididymis, *Fertil. Steril.*, **28**: 191-194, 1977.
- [141] VERON R. B., MULLER C. H., HERR J. C., FEUCHTER F. A., EDDY E. M., Epididymal secretion of mouse sperm surface component recognized by a monoclonal antibody, *Biol. Reprod.*, **26**: 523-535, 1982.
- [142] VOGLMAYR J. K., The effect of testosterone and related steroids on the oxidative and glycolytic activity and on lipid synthesis of testicular and ejaculated bull spermatozoa, *Acta Endocrinol.*, **68**: 793-804, 1971.
- [143] — Prostaglandin P_{2x} concentration in genital tract secretions of dairy bulls, *Prostaglandins*, **4**: 673-678, 1973.
- [144] — Metabolic changes in spermatozoa during epididymal transit, [w] *Handbook of physiology*, Vol. 5, Section 7, red. Greep R. O., Astwood E. B., Amer. Physiol. Soc. Washington 1975, 437-451.
- [145] VOGLMAYR J. K., WHITE I. G., QUINN P. J., A comparison of adenosine triphosphatase activity in testicular and ejaculated spermatozoa of the ram, *Biol. Reprod.*, **1**: 121-129, 1969.
- [146] VREEBURG J. T. M., Distribution of testosterone and 5 α -dihydrotestosterone in rat epididymis and their concentrations in efferent duct fluid, *J. Endocr.*, **67**: 203-210, 1975.
- [147] de VRIES J. W. A., WILLEMSSEN R., GENZE H. J., Immunocytochemical localization of acrosin and hyaluronidase in epididymal and ejaculated porcine spermatozoa, *Eur. J. Cell Biol.*, **37**: 81-88, 1985.
- [148] WONG P. Y. D., TSANG A. Y. F., Studies on the binding of a 32K rat epididymal protein to rat epididymal spermatozoa, *Biol. Reprod.*, **27**: 1239-1246, 1982.

- [149] YOUNG L. G., GOULD K. G., HINTON B. T., Lectin binding sites on the plasma membrane of epididymal and ejaculated chimpanzee sperm, *Gamete Res.*, **14**: 75-87, 1986.

Otrzymano: 14 lipca 1987.

Przyjęto: 30 września 1987.

Adres autorek: A. Powstańców Wlkp. 72, 70-111 Szczecin.

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 zlecających indywidualnych i o 100% dla zlecających instytucji i zakładów pracy.

Terminy przyjmowania prenumeraty 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

| | | |
|----|--|----|
| T. | WIKIEL, J. STROSZNAJDER, Fosfolipidy inozytowe, ich metabolizm i znaczenie w procesie przekazywania informacji | 1 |
| S. | BRONIEK, G. GRZYBOWSKI, Metabolizm ceruloplazminy i jej biologiczna rola w utrzymaniu homeostazy organizmu | 23 |
| E. | T. MYSTKOWSKA, Nowotwory embrionalne (teratocarcinoma) jako model do badań różnicowania zarodka | 41 |
| L. | STRZAŁAŁA, Różnorodność i wzajemne oddziaływanie subpopulacji komórek nowotworowych | 59 |
| L. | RÓŻEWICKA, M. LASZCZYŃSKA, Najądrze ssaków. I. Budowa i rozwój najądrza | 77 |
| L. | RÓŻEWICKA, M. LASZCZYŃSKA, Najądrze ssaków. II. Funkcja najądrza | 93 |