

P 2435
PL ISSN 0324-833X

POLSKIE
TOWARZYSTWO
ANATOMICZNE

TOM 16-NR 3

1989 (269-346)

Postepy 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 KOROHOŁA,
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 egz. Ark. wyd. 6,5. Ark. druk. 5,0. Papier druk. sat. kl. III, 80g, 70 × 100 cm. Oddano do składania w maju 1989 r.
Podpisano do druku w grudniu 1989 r. Druk ukończono w grudniu 1989 r. Zam. 4203/89. Cena 240 zł.

Wrocławska Drukarnia Naukowa, Wrocław, ul. Lelewela 4

SOMATOSTATYNA: PRODUKCJA, WYDZIELANIE I DZIAŁANIE NA KOMÓRKI DOCELOWE, ZWŁASZCZA W UKŁADZIE POKARMOWYM

SOMATOSTATIN: PRODUCTION, SECRETION AND EFFECTS ON TARGET CELLS, ESPECIALLY IN ALIMENTARY TRACT

Zdzisław LEWICKI, Anna SULIKOWSKA, Rubens FIGURSKI, Wojciech KOCJASZ

Zakład Patofizjologii Komórki, Centrum Medyczne Kształcenia Podyplomowego w Warszawie

Streszczenie. Autorzy dokonują przeglądu literatury na temat biosyntezy i wydzielania somatostatyny, a także na temat wpływu wywieranego przez ten hormon na komórki docelowe. Specjalną uwagę zwrócono na niektóre funkcje regulacyjne somatostatyny na terenie układu pokarmowego. Przedstawiono również hipotezy odnoszące się do mechanizmów działania somatostatyny na poziomie komórkowym i molekularnym.

Summary. The authors review the literature on biosynthesis and secretion of somatostatin, as well as on some effects of the hormone on target cells. Special attention was paid to some problems of regulatory system hypotheses on the mechanism of action of somatostatin at the cellular and molecular levels.

W rozwoju wiedzy na temat hormonów produkowanych w układzie pokarmowym dokonał się w ostatnich latach ogromny postęp. Odkryto szereg komórek układu APUD i przy pomocy metod immunologicznych powiązano ich aktywność hormonalną z poszczególnymi peptydami. W tym zadziwiająco szybkim rozwoju wiedzy największe niespodzianki sprawiła somatostatyna, hormon wyizolowany po raz pierwszy z podwzgórza owcy przez Brazeau i wsp. w 1973 r. [4]. Jest to małocząsteczkowy hormon peptydowy, zbudowany z 14 aminokwasów. W trzustce i podwzgórzu może być wytwarzana także somatostatyna złożona z 28 aminokwasów [9, 40]. W szczegółowych badaniach okazało się, że sekwencja aminokwasowa hormonalnie czynnej cząsteczki somatostatyny jest taka sama u człowieka i wielu innych zwierząt [47]. Peptyd ten może występować w postaci łańcuchowej lub cyklicznej, która powstaje w trakcie przemiany potranslacyjnej.

Somatostatyna syntetyzowana jest w postaci większego prekursora i istnieje

Praca finansowana z programu CPBP 0.01.5. koordynowanego przez Instytut Biologii PAN.

je kilka pośrednich metabolitów na drodze wytwarzania somatostatyny [6, 14]. Prekursor, nazywany preprosomatostatyną składa się u człowieka i szczura ze 116 aminokwasów. Właściwy hormon jest fragmentem 14-aminokwasowym zlokalizowanym od C-końca cząsteczki. Od N-końca cząsteczki znajduje się peptyd (peptyd sygnałowy) zbudowany z 28 aminokwasów, zawierający znaczną ilość aminokwasów hydrofobowych, co jest charakterystyczne dla peptydów i białek wydzielanych z komórki. Pomiedzy nim a somatostatyną-14 znajduje się polipeptyd złożony z 78 aminokwasów, nazywany białkiem końcowym somatostatyny [14]. Po hydrolizie wiązania między aminokwasami 79 i 78 preprosomatostatyny powstaje prosomatostatyna składająca się z 92 aminokwasów, która może ulegać przemianom potranslacyjnym. Z niej powstaje na drodze proteolizy somatostatyna-14 bądź somatostatyna-28, przy czym obie formy cząsteczek powstają niezależnie od siebie [6, 14]. Mają one podobne działanie biologiczne, stwierdzono jednak, iż w trzustce somatostatyna-14 silniej hamuje uwalnianie glukagonu niż somatostatyna-28 [11].

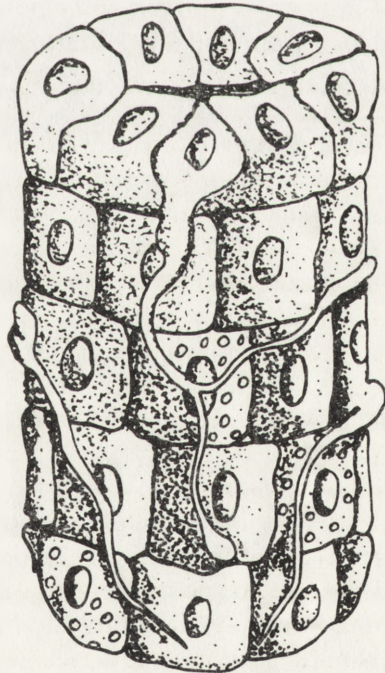
Struktura somatostatyny jest kodowana przez egzony, w których kolejność zasad została poznana dla genu człowieka [41] i szczura [12, 13].

Metody immunologiczne oparte na interakcji somatostatyny tkankowej z przeciwciałami (reakcje immunohistochemiczne oraz radioimmunologiczne), pozwoliły wykazać obecność komórek zawierających somatostatynę w układzie nerwowym i wielu innych narządach. W podwzgórzu komórki wykazujące dodatnie reakcje na obecność somatostatyny najliczniej występowały w wyniosłości pośrodkowej i w jądrze półksiężycowatym, ponadto stwierdzono obecność pojedynczych komórek somatostatynowych rozsianych w innych obszarach mózgowia [11]. Somatostatyna występuje nie tylko w ciałach neuronów, ale także we włóknach nerwowych centralnego układu nerwowego. Lokalizowana była przede wszystkim w zwojach rdzeniowych, rogach grzbietowych zwojów przedkręgowych, w zwojach kręzkowych i innych zwojach ciała [11]. Stwierdzono obecność somatostatyny w pęcherzykach zakończeń nerwowych nerwów obwodowych, z których była ona wyzwalana w odpowiedzi na depolaryzację włókna [11]. Niektóre komórki wykazujące immunoreaktywność somatostatyny zawierają także β -hydrolazę dopaminy, co wskazywałoby na magazynowanie peptydu i aminy w obrębie tego samego neuronu [15]. Somatostatynoergiczne włókna występują w pierwotnych nerwach czuciowych, nerwach siatkówki, nerwach błędnych, nerwach kulszowych, nerwach spłotu Auerbacha, nerwach otaczających tarczycę i splocie nerwowym tylnego płata przysadki mózgowej [11].

Komórki wydzielające somatostatynę znajdują się w wielu narządach ciała. W trzustce komórki D produkujące somatostatynę są przeważnie zlokalizowane na obrzeżach wysp Langerhansa, chociaż pewna ich część występuje w pobliżu komórek B, zajmujących bardziej centralne położenie [10]. Ponadto występuje ona także poza wysepkami, wśród komórek pęcherzykowych

trzustki [16]. Komórki D mają niekiedy długie dendrytyczne wypustki, zachowujące ścisłe połączenia z komórkami A, wydzielającymi glukagon, i z komórkami B, wydzielającymi insulinę [24]. Sugeruje to ich parakryne działanie na te komórki. Komórki D działają lokalnie na sąsiednie komórki dzięki obecności połączeń ścisłych między komórkami. Połączenia typu „gap” umożliwiają przechodzenie substancji z komórki do komórki, a zatem tak małe cząsteczki jak somatostatyna mogłyby przechodzić do komórki efektorowej bez wydostawania się do przestrzeni międzykomórkowych. Być może połączenia typu „przylegania” (tight junction) zmieniają się wraz ze zmianami aktywności wydzielniczej komórki, przez co mogą tworzyć się bariery, kierujące wydzielanie peptydów do określonych zespołów komórkowych w wysepkach trzustki [1]. Niekiedy wypustki komórek D sięgają do naczyń włosowatych. Pozwala to sądzić, iż część somatostatyny wydzielana jest tą drogą do łożyska naczyniowego, skąd działa na komórki odbiorcze na drodze endokrynej [11].

Komórki somatostatynowe rozproszone są wśród innych komórek nabłonkowych w żołądku, jelicie cienkim i grubym od dwunastnicy aż do odbytu. Najobficiej występują w części przedodźwiernikowej żołądka (u człowieka i szczura), w trzonie żołądka (u szczura), gdzie znajdują się przeważnie w przypadkowej części gruczołów śluzówki. Czasami spotykane są w innych ich częściach. W śluzówce trzonu żołądka komórki D na ogół nie sięgają



Ryc. 1. Schemat gruczołu błony śluzowej żołądka, ilustrujący położenie w nabłonku komórek D. Zwracają uwagę wypustki komórek D, sugerujące parakrynowe działanie somatostatyny.

Wg Larssona i wsp. [24]

swoim wierzchołkiem światła gruczołu oraz nie posiadają mikrokosmków, są typu „zamkniętego” [24]. W okolicy przedodźwiernikowej komórki D mają bardziej wydłużony, butelkowaty kształt i sięgają swoją pokrytą mikrokosmkami powierzchnią wierzchołkową światła gruczołu [25]. Komórki immunoreaktywne somatostatynowo mają długie wypustki komórkowe, rozprzestrzeniające się od nabłonka wzdłuż błony podstawowej gruczołów śluzówki żołądka w pobliże innych komórek. U szczura wykazano obecność takich wypustek w prawie każdej komórce D [24]. Wypustki te są długie, dość cienkie, czasami rozgałęziające się na dwa ramiona o ostrym zakończeniu (ryc. 1). Ich długość znacznie przekracza rozmiary ciała komórki. U człowieka wypustki takie są krótsze, grubsze, tępo zakończone. Czasami jednak ludzkie komórki D z okolicy przedodźwiernikowej wykazują typowy piramidalny kształt, podobnie do innych endokrynych komórek rozsianych między komórkami nabłonka [24]. U szczura wypustki komórek somatostatynowych w trzonie żołądka są raczej guzkowate i kończą się na sąsiednich komórkach [11].

Opisane wypustki zapewniają komórkom D możliwość ścisłego kontaktu z wieloma różnymi komórkami nabłonka gruczołów. Jednoczesne zadziałanie na skrawki przeciwciałami antysomatostatynowymi wykazało, że większość wypustek D w okolicy przedodźwiernikowej kończy się na komórkach G, a w trzonie żołądka na komórkach okładzinowych.

Stwierdzono również różne rodzaje kontaktu komórek somatostatynowych z innymi komórkami egzokrynnymi i endokrynnymi [24]. W jelicie cienkim i grubym komórki z immunoreaktywnością somatostatynową zachowują raczej typowy piramidalny kształt i, podobnie jak inne komórki endokryne, sięgają swoimi wierzchołkami pokrytymi mikrokosmkami światła jelita. Są one argentaffinowo i argyrofilowo ujemne. Rozproszone są w niższych częściach krypt wzdłuż błony podstawnej, chociaż czasami znajdowano je w nabłonku pokrywającym kosmki jelita cienkiego i jelito grube. Czasami komórki wykazujące immunoreaktywność somatostatynową występują w blaszce właściwej kosmków. Taka lokalizacja komórek neuroendokrynych została potwierdzona przez obserwacje w mikroskopie elektronowym [46]. Immunoreaktywne somatostatynowo komórki występują ponadto w tarczycy i łożysku (u ludzi), w grasicy, jajowodzie, jajniku i śliniankach (u szczura) [11].

Należy krótko wspomnieć, że komórki produkujące somatostatynę występują w guzach pochodzenia neuroendokrynowego. Są to guzy zawierające przede wszystkim komórki produkujące somatostatynę (*somatostatinoma*), albo guzy mieszane, w których oprócz komórek produkujących somatostatynę występują inne komórki endokrynowe [19, 33]. *Somatostatinoma* występują rzadko. Dotychczas guzy tego rodzaju stwierdzono w trzustce, w dwunastnicy i w przewodzie pęcherzykowym [19, 33]. U pacjentów z *somatostatinoma* umiejscowionymi w trzustce pojawia się biegunka tłuszczowa, dyspepsja, kamica żółciowa, cukrzyca insulinoniezależna i utrata masy ciała [22, 33].

Natomiast w przypadkach *somatostatinoma* w dwunastnicy objawy takie nie występują [19, 33]. Podstawą rozpoznania histopatologicznego jest dodatnia reakcja z surowicą antysomatostatynową. Charakterystyczne jest to, że nowotworowe komórki produkujące somatostatynę nie dają dodatniej reakcji Grimeliusa [19, 33]. Ze względu na tę właściwość oraz na gruczołową strukturę guza *somatostatinoma* może być mylnie rozpoznany jako *adenocarcinoma*. Komórki tego guza w dwunastnicy wykazują niektóre cechy zróżnicowanych enterocytów (posiadają mikrokosmki, siateczkę graniczną, glikokaliks) [33].

W związku z dyskusjami co do entodermalnego lub neurogennego pochodzenia komórek D istotna może być informacja, że komórki *somatostatinoma* zawierają neurofilamenty [33].

Według Patel i Reichlin [30] w żołądku i jelitach szczura znajduje się 70%, w mózgu 25% i w trzustce 5% somatostatyny występującej w organizmie tego zwierzęcia.

Podanie posiłku lub pobudzenie wydzielania kwasu solnego na drodze nerwowej powoduje nie tylko wzrost stężenia somatostatyny we krwi, ale także pojawienie się jej w soku żołądkowym, a następnie w soku trzustkowym u psa [49]. U człowieka zanotowano podobne zjawisko [50]. Natomiast w doświadczeniach na wyizolowanym żołądku u szczura somatostatyna wyzwalana była do naczyń krwionośnych [35]. Mechanizm przechodzenia somatostatyny do płynów trawiennych ani rola fizjologiczna tego zjawiska nie zostały wyjaśnione [47].

Somatostatyna działa przeważnie lokalnie, hamując uwalnianie licznych hormonów poprzez ograniczenie ich wydzielania w tym samym narządzie, w którym stwierdzono jej obecność. Odzwierciedleniem morfologicznym parakrynnego działania tego hormonu są wypustki produkujące somatostatynę. W mikroskopie elektronowym obserwowano charakterystyczne dla komórek D pęcherzyki wydzielnicze w tych wypustkach [24].

Wzrost stężenia somatostatyny we krwi po posiłku wskazuje na jej działanie endokryne na komórki odbiorcze, prawdopodobnie poprzez wiązanie się z receptorami na ich powierzchni. Receptory wrażliwe na somatostatynę opisano w błonie komórkowej komórek przysadki [25], w cytoplazmie komórek okładzinowych żołądka i komórek pęcherzykowych trzustki [34, 35, 40] oraz w błonie komórkowej komórek raka gruczołu krokowego [17].

Receptory dla somatostatyny wykryto także w komórkach D żołądka [6, 29]. Przypuszcza się, że receptory te uczestniczą w mechanizmie hamowania zwrotnego syntezy somatostatyny przez somatostatynę [36].

Pierwszym etapem w łańcuchu reakcji komórki docelowej na działanie hormonu peptydowego jest wiązanie się cząsteczek hormonu z właściwymi dla niego receptorami w błonie komórkowej. Następnie kompleks hormon-receptor oddziałuje wraz z innymi składnikami błony komórkowej, doprowadzając do powstania wewnątrz komórki tzw. informatora wtórnego, którym mogą

być np. jony wapnia lub cząsteczki cyklicznego AMP (cAMP). Ten fragment reakcji docelowej, zwany transdukcją, umożliwia przeniesienie sygnału przez błonę komórkową i jego wzmocnienie. Zmiana stężenia informatora wtórnego w cytoplazmie wywołuje następne reakcje biochemiczne w komórce, wśród których najważniejszymi są reakcje fosforylacji białek przez kinazy. Doprrowadza to do końcowego efektu fizjologicznego działania hormonu, efektu, jakim może być np. pobudzenie lub hamowanie wydzielania specyficznego produktu komórki docelowej. Złożone mechanizmy zostały dość dobrze poznane w odniesieniu do działania niektórych hormonów i neuromediatorów, lecz w dalszym ciągu brakuje wielu danych dotyczących tego zjawiska [3].

Somatostatyna jako ważny hormon regulujący wydzielanie wielu komórek jest intensywnie badana z punktu widzenia mechanizmów biochemicznych, wyzwalających specyficzną reakcję komórek docelowych na ten hormon. Stan wiedzy w tym zakresie jest dotychczas niezadowalający, a większość poglądów na mechanizm działania somatostatyny na poziomie komórkowym i molekularnym opiera się na fragmentarycznych obserwacjach i jest przedmiotem nie w pełni potwierdzonych hipotez.

Dotychczasowe badania wykazały, że somatostatyna wiąże się ze specyficznym dla niej receptorem w błonie komórkowej komórek docelowych [8, 31, 39, 44]. Wniosek ten jest oparty na badaniach kinetyki wiązania i powinowactwa somatostatyny do preparatów błony komórkowej i do całych komórek, oraz na badaniach wiązania zsyntetyzowanych związków o strukturze podobnej do somatostatyny [7, 44]. Wydaje się, że istnieją odrębne formy receptorów dla somatostatyny-14 i dla somatostatyny-28. Wydaje się również, że w różnych komórkach docelowych obecne są różne formy receptora dla somatostatyny-14 [31, 44]. Wykazano, że dla połączenia z receptorem istotna jest cykliczna struktura cząsteczki somatostatyny-14, oraz że część cząsteczki rozpoznawaną przez receptor stanowią aminokwasy 7 do 11 [44].

Większość informacji o receptorach dla somatostatyny pochodzi z badań linii komórkowej wyprowadzonej z guza części obwodowej przysadki szczura [39]. Komórki te są szczególnie bogate w ten receptor. Nie wiadomo jednak, czy wyniki tych badań można odnosić do innych prawidłowych komórek. Należy też podkreślić, że dotychczasowe badania nad receptorami dla somatostatyny miały charakter pośredni. Ustalono jednakże, że receptor ten jest glikoproteiną nie zawierającą podjednostek połączonych wiązaniami dwusiarczkowymi, a niektóre cząsteczki receptora zawierały końcowe reszty galaktosylowe. W błonie komórkowej przedniego płata przysadki szczura receptor dla somatostatyny-14 miał ciężar cząsteczkowy 88 000 [26], a badany przez Sakamoto i wsp. [38] receptor z komórek pęcherzykowych trzustki szczura był białkiem o ciężarze cząsteczkowym 92 000. Srikant i Patel [45] w badaniach błon komórkowych komórek pęcherzykowych trzustki szczura ustalili wiązanie somatostatyny-14 z trzema białkami o ciężarze cząsteczkowym 200 000,

80 000 i 70 000. Badania bezpośrednie, tj. badania wyizolowanych i oczyszczonych preparatów receptora nie zostały dotychczas zrobione.

Sztucznie syntetyzowane substancje o działaniu agonistycznym i antagonistycznym na receptory somatostatynowe, użyte do badania właściwości tych receptorów, w przyszłości będą zapewne używane jako leki korygujące zaburzenia wydzielania somatostatyny lub zaburzenia reakcji docelowych na ten hormon [7, 8, 31].

Wiele hormonów peptydowych wpływa na czynność komórek docelowych za pośrednictwem zmiany stężenia cyklicznego AMP w komórce, w wyniku oddziaływania kompleksu hormon-receptor na cyklazę adenylową umieszczoną po cytoplazmatycznej stronie błony komórkowej. Naturalne było przypuszczenie, że somatostatyna działa za pośrednictwem podobnego mechanizmu. Badania doświadczalne potwierdziły to przypuszczenie tylko częściowo [8, 31, 38, 44].

Ze względu na wpływ somatostatyny na stężenie cAMP w komórce docelowej wyróżnia się dwie sytuacje:

1. Hamowanie przez somatostatynę wydzielania podstawowego.
2. Hamowanie wydzielania pobudzonego przez inny hormon.

W przypadku 1 nie stwierdzono, aby hamujący wpływ somatostatyny na podstawowe wydzielanie hormonu wzrostu i prolaktyny przez komórki guza płata obwodowego przysadki był związany ze zmianą stężenia cAMP w komórce [38]. W przypadku 2, tj. hamowania przez somatostatynę wydzielania hormonu wzrostu lub prolaktyny pobudzonego przez VIP, stwierdzono zmniejszenie przez somatostatynę stężenia cAMP w komórce [38].

Inne wyniki uzyskał Dharmasathaphorn [8] badając wydzielanie chlorków przez nabłonek jelitowy *in vivo*. W jego układzie doświadczalnym somatostatyna nie hamowała wydzielania podstawowego, natomiast hamowanie wydzielania chlorków pobudzone przez teofilinę lub prostaglandynę PGE₁ nie było skorelowane ze zmianą stężenia cAMP.

Z przykładów przytoczonych powyżej wynika, że mechanizm zależny od cAMP jako informatora wtórnego działa tylko w niektórych komórkach i tylko w niektórych sytuacjach fizjologicznych lub doświadczalnych. Zatem musi istnieć także inny mechanizm transdukcji. Uważa się, że jest to mechanizm, w którym rolę informatora wtórnego odgrywają jony wapnia. Schönbrunn i wsp. [39] podają, że dla transdukcji sygnału zewnętrznego, jakim jest somatostatyna, w sygnał wewnątrzkomórkowy, jakim jest zmiana stężenia Ca²⁺, niezbędne są następujące składniki: receptor dla somatostatyny oraz tzw. białko regulatorowe wiążące nukleotydy guaninowe (białko Ni lub inaczej Gi) i kanał wapniowy. Połączenie somatostatyny z jej receptorem aktywuje białko Ni, które z kolei zmienia stan kanału wapniowego, powodując przejściowy spadek stężenia Ca²⁺ w komórce. Mechanizm ten odnosi się do hamowania wydzielania prolaktyny przez komórki przysadki pobudzone przez

VIP [39], a także do wydzielania kwasu solnego przez komórki okładzinowe żołądka [32].

Dowodem na udział białka Ni w mediowaniu odpowiedzi na somatostatynę było wykazanie, że toksyna z bakterii *Bordetella pertussis*, specyficznie blokująca działanie białka Ni w innych układach, znosi efekty działania somatostatyny na komórki docelowe [20]. Klasa białek Ni nie jest specyficzna dla mechanizmu transdukcyjnego somatostatyny. Białka te uczestniczą w przenoszeniu bardzo wielu sygnałów, jakimi są różne hormony peptydowe, czynniki wzrostu i neuromediatory. Wobec tego należy przyjąć, że specyficzność reakcji komórek na somatostatynę polega na specyficzności receptora.

Zbadanie mechanizmu przekazywania sygnału przez błonę komórkową i zidentyfikowanie wtórnego mediatora nie wyjaśnia jeszcze całości zjawiska odpowiedzi komórki docelowej na somatostatynę. Wtórny mediator (cAMP, jony wapnia) uczestniczy w zapoczątkowaniu następnych reakcji wewnątrz komórki. Wiadomo, że odpowiedź na hormony lepiej poznane niż somatostatyna wymaga aktywacji specyficznych kinaz, fosforylujących białka enzymatyczne, a wygaszenie reakcji na hormon może zachodzić dzięki działaniu odpowiednich fosfataz. Te mechanizmy, prawdopodobnie działające także w komórkach docelowych reagujących na somatostatynę, są dotychczas nie znane.

Działanie somatostatyny zostało przedstawione w tab. 1 wg Fenoglio i Kinga [11]. Jak widać, w przeważającej części wykazuje ona hamujący wpływ na uwalnianie znacznej liczby hormonów, hamuje wydzielanie wielu składników soków trawiennych. Obniża aktywność motoryczną żołądka i pęcherzyka żółciowego. Zmniejsza przepływ krwi w narządach jamy brzusznej. Hamuje absorpcję wielu związków. W centralnym układzie nerwowym hamuje aktywność neuronów, wywiera agonistyczne działanie na receptory opiatowe, hamuje uwalnianie acetylocholino. Ponadto stwierdzono jej wpływ obniżający zdolność płytek krwi do agregacji oraz wpływ na tworzenie kolonii przez limfocyty pobudzone fitohemaglutyniną.

Należy podkreślić, że efekty działania somatostatyny na narządy i komórki badano w doświadczeniach, w których stosowano egzogenną somatostatynę w różnych stężeniach. Prawdopodobne jest, że stężenia somatostatyny w doświadczeniach opisanych w literaturze były wyższe niż stężenia występujące w organizmie, a zatem że pewne efekty somatostatyny opisane w niniejszym artykule są efektami farmakologicznymi, a nie fizjologicznymi. Naturalne (fizjologiczne) stężenie somatostatyny w osoczu szczura wynosi ok. 0,16 ng/ml dla somatostatyny-14 i około 0,09 ng/ml dla somatostatyny-28 [48]. Jak dotychczas za mało jest danych, w jakich warunkach i w jakim zakresie zmienia się stężenie somatostatyny w płynach ustrojowych i tkankach w przebiegu naturalnych procesów fizjologicznych, i dopiero po wyjaśnieniu tej kwestii będzie można odróżnić efekty farmakologiczne od fizjologicznych

Tabela 1

Działanie somatostatyny

- | | |
|---|--|
| 1. Hamuje wydzielanie następujących hormonów: | |
| Hormon wzrostu | Glicentyna |
| TSH | Renina |
| Insulina | Kálcytonina |
| Glukagon | Gastryna |
| Wazoaktywny jelitowy peptyd | Cholecystokinina |
| Prolaktyna | Sekretyna |
| FSH | TRH |
| ACTH | |
| 2. Hamuje wydzielanie następujących związków: | |
| Kwas solny | Dwuwęglany trzustki |
| Pepsyna | Enzymy trzustki |
| Amylaza śliniankowa | Czynnik Castle'a |
| 3. Hamuje aktywność motoryczną | |
| Opróżnianie żołądka | Kurczenie pęcherzyka żółciowego |
| Odptyw żółci | Przepływ krwi w narządach jamy brzusznej |
| Skurcze zwieracza Oddiego | |
| 4. Hamuje absorpcję (transport) następujących związków: | |
| Glukoza | Trójglicerydy |
| Ksyloza | Jony, szczególnie Ca^{2+} |
| Aminokwasy | Woda w kanalikach nerkowych |
| 5. Działanie w centralnym układzie nerwowym: | |
| Hamuje aktywność neuronów w mózgu | Hamuje wydzielanie acetylocholińy |
| Wywiera agonistyczne działanie na receptory opiatowe | Wywołuje zmiany zachowania |
| 6. Inne działanie | |
| Wpływa na obniżenie agregacji płytek krwi | |
| Tworzenie kolonii przez limfocyty stymulowane fitohemaglutyniną | |

somatostatyny na komórki docelowe. Badania te są dodatkowo utrudnione przez zjawisko parasekrecji, w którym somatostatyna może być przekazywana bezpośrednio z komórki produkującej do odbiorczej.

Wydzielanie somatostatyny jest stymulowane przez wiele substancji, przede wszystkim przez hormony i neuromediatory oraz składniki pokarmu wymienione w tab. 2 [11].

Z kolei somatostatyna reguluje wydzielanie tych związków, co wskazuje na doniosłą rolę somatostatyny w mechanizmach wydzielania zwrotnego.

Wydzielanie somatostatyny w żołądku można wyzwolić podaniem posiłku lub pobudzeniem wydzielania kwasu solnego przez komórki okładzinowe [2, 40]. Dotychczas nie wyjaśniono, jakie mechanizmy powodują przechodzenie

Tabela 2

Czynniki wpływające na stymulację wydzielania somatostatyny

Pokarm	{ Glukoza Tłuszcze Białka }	pobudzają wydzielanie w trzonie żołądka i w trzustce
		{ Glukoza Białka }

Wprowadzenie kwasu do żołądka

Infuzja cholecystokininy, sekretyny, GIP

Zakwaszenie dwunastnicy

Wyzwalanie acetylocholinoły poprzez receptory cholinergiczne

Wydzielanie norepinefryny i dopaminy poprzez receptory adrenergiczne

Histamina

Insulina

Bombesyna

Sekretyna

Pentagastryna

Tolbutamid

somatostatyny do soków trawiennych. Być może źródłem hormonu w soku żołądkowym mogą być komórki D w bezpośrednim sąsiedztwie komórek okładzinowych w trzonie żołądka. Natomiast w soku trzustkowym hormon ten mógłby pochodzić z komórek D zlokalizowanych w części niewysepkowej trzustki. Pobudzająco na komórki D przewodu pokarmowego i trzustki oddziałują inne hormony: gastryna, sekretyna, wazoaktywny hormon jelitowy (VIP), żołądkowy peptyd hamujący (GIP), cholecystokinina, glukagon i insulina [5]. Do dziś nie wiadomo, czy wzajemne oddziaływanie hormonów przewodu pokarmowego odbywa się na drodze endokrynnej, czy też zachodzi na drodze parakrynnej. Nie jest także wyjaśniona rola autonomicznego układu nerwowego, chociaż wiadomo, że wydzielanie somatostatyny z układu trzewnego jest, co najmniej częściowo, modulowane przez układ cholinergiczny i adrenergiczny [30]. Nie wyjaśniono również wpływu nerwu błędnego na wydzielanie somatostatyny [47]. Ponadto wiadomo, że niektóre prostaglandyny mogą wpływać na uwalnianie somatostatyny z komórek D [27].

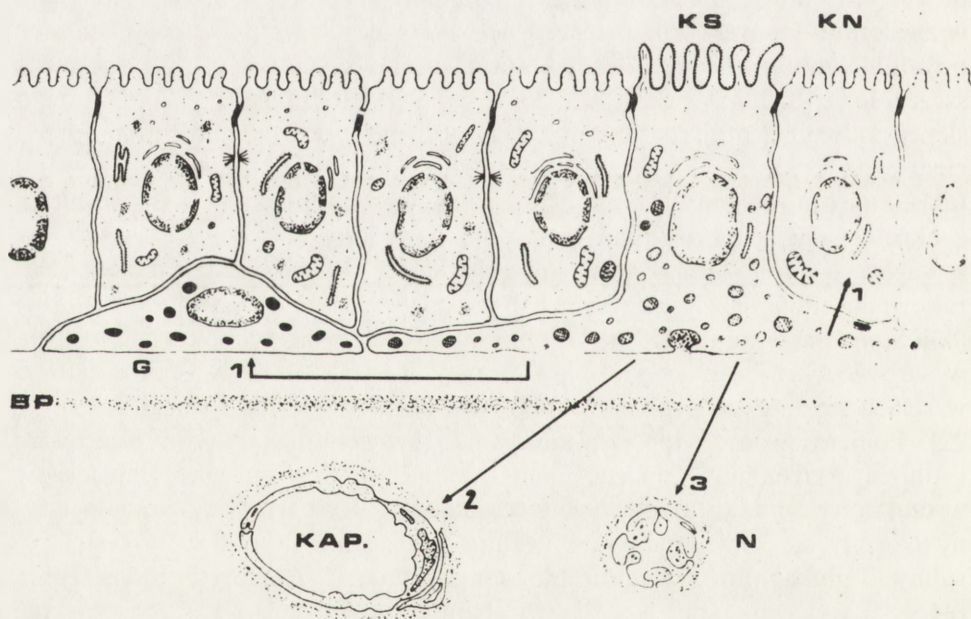
Liczne składniki pokarmowe oraz inne czynniki mogą wpływać na wydzielanie somatostatyny. W doświadczeniu na wyizolowanej i przepłukiwanej trzustce szczura wykazano, że glukoza i cAMP oddziałują synergistycznie na uwalnianie somatostatyny. Wskazuje to na możliwość współdziałania składników pokarmu z aktywacją cyklicznej adenylowej na drodze β -adrenergicznej oraz poprzez glukagon [7]. Somatostatyna odgrywa szczególną rolę w regulowaniu czynności przewodu pokarmowego. Wg Szafran i Sztefko [47] działanie

tego hormonu polega na modulowaniu wydzielania soków trawiennych zarówno poprzez bezpośredni wpływ na komórki biorące udział w wytwarzaniu tych soków, jak i poprzez działanie na inne komórki endokryne przewodu pokarmowego i trzustki. Wykazano na izolowanych gruczołach żołądkowych szczura, że somatostatyna hamuje wydzielanie kwasu solnego przez komórki okładzinowe, poprzez obniżenie poziomu cAMP. Somatostatyna ogranicza także wydzielanie pepsyny, choć nie stwierdzono jej wpływu na poziom cAMP w komórkach głównych w śluzówce żołądka [47]. Ponadto działając bezpośrednio na komórki pęcherzykowe trzustki, somatostatyna hamuje wydzielanie enzymów soku trzustkowego i dwuwęglanów [21, 22]. Somatostatyna wydzielona po posiłku lub podana do krwi powoduje zahamowanie wydzielania gastryny, sekretyny, GIP-u, glukagonu, enteroglukagonu, polipeptydu trzustkowego, insuliny, wpływając w ten sposób na regulację endokrynej i egzokrynej czynności wydzielniczej żołądka, jelit i trzustki, a także na czynności motoryczne przewodu pokarmowego, co prowadzi do obniżenia szybkości trawienia i ogranicza ilość wchłanianych substancji.

W ostatnich latach podjęto próby stosowania somatostatyny w leczeniu niektórych chorób u ludzi. Wstępne badania wykazały, że działa ona silnie w zwalczaniu opornych na cymetydynę, krwawiących wrzodów żołądka, choć powoduje wystąpienie gorączki jako objawu ubocznego [18, 23, 42]. Jednakże szczegółowe badania przeprowadzone na 543 pacjentach z zastosowaniem ślepej podwójnej próby wykazały brak istotnego efektu somatostatyny u pacjentów z krwawiącymi wrzodami żołądka [43]. Somatostatynę stosowano także z powodzeniem w leczeniu ostrego zapalenia trzustki [42]. U pacjentów z akromegalią somatostatyna hamowała nadmierne wydzielanie hormonów z guzów o typie: *insulinoma*, *glukagonoma*, *VIP-oma*, guzów z zespołem rakowiaka. Polepszała ona również glukostazę w cukrzycy insulinoniezależnej [43]. Somatostatyna jest szybko eliminowana z krążenia, a jej okres półtrwania w surowicy krwi u psa wynosi ok. 2 min., a u człowieka 1–3 min., dlatego w celach leczniczych niejednokrotnie stosowano ciągłą infuzję tego leku [18, 22]. Podjęto próby syntetyzowania analogów somatostatyny o silniejszym i dłuższym działaniu, podstawiając D-aminokwasy w miejsce L-izomerów w cząsteczce somatostatyny. Niektóre analogi D-Trp⁸ i D-Cys¹⁴ somatostatyny okazały się silniejszymi inhibitorami wydzielania hormonu wzrostu, insuliny i glukagonu niż naturalna somatostatyna. Analogi somatostatyny D-Cys¹⁴ wykazały silniejszy wpływ hamujący wydzielanie glukagonu niż insuliny. Jednakże próby uzyskania analogu somatostatyny przydatnego w leczeniu cukrzycy przebiegającej z hiperglukagonemią nie zostały dotychczas uwieńczone powodzeniem [22]. Godne uwagi jest to, że jeden z analogów somatostatyny oznaczony RC-160 (D-Phe-Cys-Tyr-D-Lys-Val-Cys-Trp-NH₂) hamował wzrost doświadczalnego raka gruczołu krokowego u szczurów. Pewne ostrzeżenie stanowi fakt, że somatostatyna stosowana u ludzi przez

dłuższy czas wywołuje niekorzystne objawy uboczne, takie jak zespół złego wchłaniania i nietolerancja glukozy [43].

Somatostatyna pełni prawdopodobnie kluczową rolę w wielu układach regulujących czynności organizmu. Wskazują na to obserwacje, że uwalnianie tego peptydu znajduje się pod kontrolą licznych hormonów i neuromediatorów, oraz że somatostatyna reguluje uwalnianie wielu substancji regulatorowych i wydzielin komórkowych. Oddziaływanie somatostatyny odbywać się może na drodze parakrynej — poprzez wpływ na komórki znajdujące się w sąsiedztwie komórek produkujących somatostatynę, endokrynej — za pośrednictwem hormonu przedostającego się do krążenia, neuroprzekąznikowej — poprzez modulację czynności zakończeń nerwowych (ryc. 2). Wraz z somatostatyną z komórek produkujących ten peptyd mogą być wydzielane także inne substancje regulujące metabolizm komórki: aminy biogenne, ATP, cykliczne nukleotydy i jony Ca^{2+} . Efekty biologiczne pobudzenia komórek produkujących somatostatynę są zatem bardzo złożone, zależą bowiem od działania nie tylko somatostatyny, lecz również innych substancji biologicznie



Ryc. 2. Schemat oddziaływania somatostatyny na różne struktury odźwiernika. Somatostatyna może oddziaływać parakrynowo (1) na komórki gastrynowe (G) i komórki nabłonka odźwiernika (KN), może poprzez przenikanie do naczyń krwionośnych (KAP) oddziaływać endokrynowo (2), a także pełnić funkcje neuroprzekąznika (3) wpływając na zakończenia nerwowe (N). Komórki wydzielające somatostatynę (KS) mają prawdopodobnie receptory, umieszczone w błonie komórkowej na biegunie szczytowym komórki, zdolne do reagowania z substancjami znajdującymi się w soku żołądkowym; połączenie tych substancji z receptorami pobudza wydzielanie hormonu

czynnych wydzielanych wraz z nią [11]. W mechanizmach regulujących związanych z działaniem somatostatyny biorą także udział substancje zawarte w świetle żołądka lub jelit. Substancje te poprzez związanie się z odpowiednimi receptorami na biegunie szczytowym komórek produkujących somatostatynę pobudzają wydzielanie tego peptydu i towarzyszących mu substancji. Działanie złożonych układów regulujących, w których uczestniczy somatostatyna, nie zostało jeszcze poznane w stopniu wystarczającym, trudno zatem ocenić, czy poznano już wszystkie funkcje tego hormonu.

LITERATURA

- [1] ARIMURA A., FISHBACK J. B., Somatostatin: regulation of secretion, *Neuroendocrinology* **33**, 246–256, 1981.
- [2] ARIMURA A., GROOT K., TAMINATO T., ERTAN K., AKDAMAR K., RYAN J., PIENTA K., VINIK A. J., Somatostatin in human pancreatic and gastric juice. *Peptides (Fayetteville)*, 2 suppl., **2**, 271–274, 1981.
- [3] BERRIDGE M. J., The molecular basic communication within the cells, *Scien. Amer.*, **253**, 142–151, 1985.
- [4] BRAZEAU P., VALE W., BURGUS R., LING N., BUCHTER M., RIVIER J., GIULLEMIN R., Hypothalamic polypeptide that inhibits the secretion of immunoreactive pituitary growth hormone, *Science*, **179**, 77–79, 1973.
- [5] CHIBA T., TAMINATO T., KADAWAKI S., INOUE Y., MORI K., SEINO Y., ABE H., CHINERA K., MATSUKURA S., FUJITA T., GOTA Y., Effects of various gastrointestinal peptides on gastric somatostatin release, *Endocrinology* **106**, 145–149, 1980.
- [6] CHIBA T., PARK J., YAMADA T., Biosynthesis of somatostatin in canine fundic D Cells, *J. Clin. Invest.* **81**, 282–287, 1988.
- [7] COY D. H., MURPHY W. A., LANCE V. A., HOCART S. J., SMIRAZ-DIAZ J., MEZO I., Somatostatin agonist- and antagonist-peptide control of growth hormone secretion, [w] *Somatostatin (Ed. Patol Y. C., Tonnenbaum G. S.)*, Plenum Press New York, 325–337, 1985.
- [8] DHARMSATHAPHORN K., Intestinal somatostatin function, [w] *Somatostatin (Ed. Patol Y. C., Tonnenbaum G. S.)*, Plenum Press, New York, 463–473, 1985.
- [9] DOCKREY G. J., Multiple molecular forms of hormones significance and methods of study, [w] *Gut Hormones (Ed. Bloom S. R., Polak J. M.)*, London, Churchill Livingstone, 43–56, 1981.
- [10] ERLANDSEN S. L., HEGRE O. P., PARSONS J. A., Mc EROY R. C., ELDE R. P., Pancreatic islet cell hormones. Distribution of cell types in the islet and evidence for presence of somatostatin and gastrin within D cell, *J. Histochem. Cytochem.*, **24**, 893–897, 1975.
- [11] FENOGLIO C. M., KING D. W., Somatostatin: an update, *Hum. Pathol.*, **14**, 475–479, 1983.
- [12] FUNCKES C. L., MINTH C. D., DESCHENES R., MAGAZIN M., TARIANINE M. A., SHEETS M., COLLIER K., WELTH H. L., ARON D. C., ROOS B. A., DIXON J. E., Cloning and characterization of a mRNA encoding rat preprosomatostatin, *J. Biol. Chem.* **258**, 8781–8787, 1983.
- [13] GOODMAN R., ARON D., ROOS B., Rat pre-prosomatostatin, *J. Biol. Chem.*, **258**, 5570–5573, 1983.

- [14] GOODMAN R. H., MONTMING M. R., LOW M. J., HABENER J. F., Biosynthesis of rat preprosomatostatin, [w] Somatostatin, (Ed. Patel Y. C., Tonnenbaum G. S.), Plenum Press, New York, 31–47, 1985.
- [15] HEKFELD T., ELFRIN L. G., ELDE R., NILLSON G., ARIMURA A., Occurrence of somatostatin-like immunoreactivity in some peripheral sympathetic noradrenergic neurons, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, **74**, 3587–3589, 1977.
- [16] HOLST J. J., KNUTHSEN S., JENSES S. L., FAHRENKRUG J., LARSSON L. J., NIELSEN O. V., Interrelation of nerves and hormones in stomach and pancreas, Scand. J. Gastroent., **18**, suppl., 82, 85–89, 1983.
- [17] KADAR T., REDDING T. W., BEN-DAWID M., SCHOLLY A. V., Receptors for prolactin, somatostatin, and luteinizing hormone — releasing hormone in experimental prostate cancer after treatment with analogs of luteinizing hormone — releasing hormone and somatostatin, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, **85**, 890–894, 1988.
- [18] KAYASSEK L., GYR K., KELLER U., STALDER G. A., WALL M., Somatostatin in peptic-ulcer haemorrhage, Lancet i, **19**, 844–846, 1980.
- [19] KOCK K. F., SANDERMANN J., A polypoid duodenal somatostatinoma, Scand. J. Gastroenterol. **23**, 100–102, 1988.
- [20] KOCH B. D., DORFLINGER L. J., SCHONBRUNN A., Pertussis toxin blocks both cyclic AMP-mediated and cyclic AMP-independent actions of somatostatin, J. Biol. Chem., **260**, 13138–13345, 1985.
- [21] KONTUREK S., Somatostatin and the gastrointestinal secretion, Scand J. Gastroent., **11**, 1–9, 1976.
- [22] KONTUREK S., Fizjologia układu trawiennego, PZWL Warszawa, 320–325, 1985.
- [23] KRAVETZ D., BOSCH J., TENES J., BRIUX J., RIMD A., RODES J., Comparison of intravenous somatostatin and vasopressin infusion in treatment of acute variceal haemorrhage, Hepatology, **4**, 442–446, 1984.
- [24] LARSSON L. J., GOTTERMAN N., De MAGISTRIS L., REHFELD J. F., SCHWARTZ T. W., Somatostatin cell processes as pathways for paracrine secretin, Science **205**, 1393–1395, 1979.
- [25] LEITNER J. W., RIFKIND R. M., MAMAN A., SUSSMAN K. E., Somatostatin binding to pituitary plasma membranes, Biochem. Biophys. Res. Commun., **87**, 919–927, 1979.
- [26] LEWIS L. D., WILLIAMS J. A., Structural characterization of the somatostatin receptor in rat anterior pituitary membranes, Endocrinol., **121**, 486–492, 1987.
- [27] LIGUMSKY M., GOTO V., DEBES H., YAMADA T., Prostaglandins mediate inhibition of gastric acid secretion by somatostatin in the rat, Science. **219**, 301–303, 1983.
- [28] NEER E. J., CLAPHAM D. E., Role of G protein subunits in transmembrane signalling, Nature, **333**, 129–134, 1988.
- [29] PARK J., CHIBA T., YAMADA T., Somatostatin receptor on canine fundic D-cells: evidence for autoregulation of gastric somatostatin. Gastroenterology, **90**, 1578, 1986 (Abstr.).
- [30] PATEL Y. C., REICHLIN S., Somatostatin in hypothalamus, extrahypothalamic brain and peripheral tissue of the rat, Endocrinology, **102**, 523–530, 1978.
- [31] PATEL Y. C., BAGUIRAN G., SRIKANT C. B., POSNER B. J., Quantitative in vivo autoradiographic localization of [¹²⁵I-Tyr¹¹] Somatostatin-14 and [Leu⁸, D-Trp²²⁻¹²⁵I-Tyr] Somatostatin-28 binding sites in rat brain, Endocrinology, **119**, 2262–2269, 1988.
- [32] PITTENGER G. L., VINIK A. I., HELDSINGER A. A., SEINO S., Regulation and actions of gastrointestinal somatostatin, [w] Somatostatin, (Ed. Patel Y. C., Tonnenbaum G. S.), Plenum Press, New York, 447–462, 1985.
- [33] RONALDI R., BEARZI I., Ampullary somatostatinoma. An immunohistochemical and ultrastructural study, Path. Res. Pract. **183**, 8–16, 1988.
- [34] REYL F., LEWIN M. J. M., Somatostatin is a potent activator of phosphoprotein

- phosphatases in the digestive tract, *Biochim. Biophys. Acta*, **675**, 297–300, 1981.
- [35] REYL F., LEWIN M. J. M., Intracellular receptor for somatostatin in gastric mucosal cells: decomposition and reconstitution of somatostatin-stimulated phosphoprotein phosphatase, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 978–982, 1982.
- [36] RICHARDSON S. B., TRENTÉ S., Inhibition of rat hypothalamic somatostatin release by somatostatin: evidence for somatostatin ultrashort loop feedback, *Endocrinology* **118**, 2076–2082, 1986.
- [37] SAFFOURI B., WEIR G. C., BITAR K. N., MAKHLOUF G. M., Gastrin and somatostatin secretion by perfused rat stomach: functional linkage of antral peptides, *Am. J. Physiol.*, **238**, G 495–501, 1980.
- [38] SAKAMOTO G., GOLDFINE I. D., WILLIAMS J. A., The somatostatin receptor on isolated pancreatic acinar cell plasma membranes, *J. Biol. Chem.*, **259**, 9623–9628, 1984.
- [39] SCHONBRUNN A., DORFLINGER L. I., KOCH B. D., Mechanisms of somatostatin action in pituitary cells, [w] *Somatostatin*, (Ed. Patel Y. C., Tonnenbaum G. S.), Plenum Press, New York, 305–324, 1985.
- [40] SCHUZDZIARRA V., Somatostatin – physiological and pathological aspects, *Scand. J. Gastroent.*, **18**, suppl. 82, 69–84, 1983.
- [41] SHEN L. P., PICTET R., RUTTER P., Human somatostatin I: sequence of the cDNA, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* **79**, 4575–4579, 1982.
- [42] SOCHA J., ROSIŃSKI A., BARRA E., CICHY W., CELIŃSKA-CEDRO D., RONDIO H., Somatostatin in the treatment of gastrointestinal diseases in children, *Mat. Med. Pol.* **20**, 6–11, 1988.
- [43] SOMMERVILLE K. W., HENRY D. A., DAVIES J. G., HINE K. R., HAWKEY C. J., LANGMAN M. J. S., Somatostatin in treatment of haematemesis and melaena, *Lancet*, 130–132, 1985.
- [44] SRIKANT C. B., PATEL Y. C., Somatostatin receptors. [w] *Somatostatin*, (Ed. Patel Y. C., Tonnenbaum G. S.), Plenum Press, New York, 291–304, 1985.
- [45] SRIKANT C. B., PATEL Y. C., Somatostatin receptors on rat pancreatic acinar cells, *J. Biol. Chem.*, **261**, 7690–7696, 1986.
- [46] STACHURA J., KAUSE W. J., IVEY K. J., Ultrastructure of endocrine-like cells in lamina propria of human gastric mucosa, *Gut*, **22**, 534–541, 1981.
- [47] SZAFRAN H., SZTEFKO H., Somatostatyna jako hormon regulujący działanie przewodu pokarmowego, *Endokrynologia Polska*, **32**, 125–138, 1984.
- [48] TANNENBAUM G. S., PATEL Y. C., On the fate of centrally administered somatostatin in the rat: massive hypersomatostatinemia resulting from leakage into the peripheral circulation has effects on growth hormone secretion and gluoregulation, *Endocrinology*, **118**, 2137–2143, 1986.
- [49] UVNAS-WALLENSTEN K., EFENDIC S., JOHANSSON C., SJODIN L., CRANWELL P., Effect of intraluminal pH on the release of somatostatin and gastrin into antrum, bulbar and ileal pouches of conscious dogs, *Acta Physiol. Scand.*, **110**, 391–400, 1980.
- [50] WISEN O., UVNAS-WALLENSTEN K., EFENDIC S., JOHANSSON C., Release of gastrin and somatostatin into the gastric lumen of healthy subjects and patients with duodenal ulcer and achlorhydride, *Acta Physiol. Scand.* **108**, 297–300, 1980.

Otrzymano: 10 października 1988

Przyjęto: 1 marca 1989

Adres autorów: ul. Marymoncka 99, 01–813 Warszawa

KONTROLA AKTYWNOŚCI LIMFOCYTU B W ROZWOJU HUMORALNEJ ODPOWIEDZI IMMUNOLOGICZNEJ

CONTROL OF THE B-CELL ACTIVITY IN THE DEVELOPMENT OF HUMORAL IMMUNE RESPONSE

Paweł KALIŃSKI

Zakład Histologii i Embriologii, Akademia Medyczna, Warszawa

Streszczenie. Pobudzenie limfocytu B, efektorowej komórki humoralnej odpowiedzi immunologicznej, jest procesem wymagającym udziału szeregu bodźców. Pierwotny sygnał w postaci związania antygeny przez błonowe immunoglobuliny (mlg) czyni komórkę wrażliwą na pomoc ze strony limfocytów Th. Sygnał pomocniczy, zawarty głównie w zestawie limfokin, wytwarzanych przez limfocyty Th, umożliwia rozpoczęcie serii podziałów i końcowe zróżnicowanie limfocytu B do wydzielającej przeciwciała komórki plazmatycznej. Wielostopniowa kontrola rozwoju limfocytu B przez antygen i szereg czynników pomocniczych umożliwia każdorazowo precyzyjne dostrojenie odpowiedzi humoralnej do aktualnych warunków immunizacji, dla zapewnienia najefektywniejszej w każdym przypadku i możliwie wysoko swoistej odpowiedzi.

W niniejszej pracy dokonano przeglądu współczesnych teorii opisujących proces pobudzenia komórki B i niektóre mechanizmy sterowania nią w trakcie rozwoju odpowiedzi humoralnej. Przedstawiany materiał nie obejmuje mechanizmów regulujących odpowiedź humoralną w procesach supresji i tolerancji.

Summary. The complex process of B lymphocyte activation requires several different stimuli. Antigenic stimulation renders the cell susceptible to help delivered by helper T lymphocytes (Th cells). Among helper factors, the most significant are T-cell soluble products — lymphokines. They facilitate the B-cell entry into the cell cycle, proliferation and final differentiation to antibody-secreting cells.

Existence of a number of helper factors makes it possible for the immune system to modify the humoral response parallelly to altering conditions of immunization. This provides the most efficient in any case, as well as highly specific, response. In this paper, some current models and theories that concern the B-cell activation and its final development to the antibody-secreting cell are reviewed.

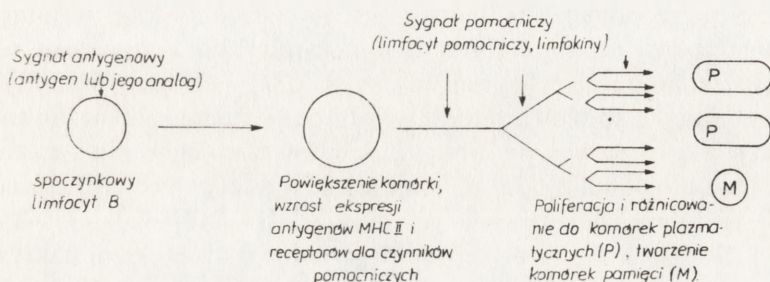
Pojawienie się w zdrowym organizmie czynnika rozpoznawanego jako obcy, a więc wtargnięcie drobnoustroju chorobotwórczego, transformacja nowotworowa, czy sztuczna immunizacja (przeszczep, doświadczalne podanie antygeny), powoduje aktywizację mechanizmów obronnych ustroju, ogół których określamy jako odpowiedź odpornościową (immunologiczną). Składową

odpowiedzi odpornościowej jest odpowiedź humoralna. Realizowana jest ona poprzez sekrecję przeciwciał (immunoglobulin) przez plazmocyty, będące końcową formą rozwojową limfocyту B. Rozwojem humoralnej odpowiedzi immunologicznej kieruje szereg czynników, zarówno pochodzących spoza organizmu, jak i wytwarzanych przez własny system odpornościowy.

Szczególną rolę na wszystkich etapach rozwoju odpowiedzi odgrywa antygen. Jako czynnik zapoczątkowujący odpowiedź aktywuje on te klony limfocytów B, które mogą go rozpoznawać i wytwarzać swoiste względem niego przeciwciała. Jest więc czynnikiem wstępnie decydującym o składzie klonalnym odpowiedzi. Na dalszych etapach antygen jest elementem zapewniającym swoistość antygenową kooperacji limfocytów T i B. Jego obecność na powierzchni limfocyту B umożliwia kontakt ze swoistym limfocytym Th, czego efektem jest przekazanie sygnału pomocniczego. Do rozpoznania antygeny przez limfocyt B dochodzi za pośrednictwem swoistych receptorów – błonowych immunoglobulin (mIg: z ang. membrane immunoglobulins). Część cząsteczki błonowej immunoglobuliny, o identycznej swoistości co przeciwciała wydzielane w fazie efektorowej odpowiedzi, różni się od nich C' końcowym, lipofilnym fragmentem łańcucha ciężkiego, umocowującym ją w błonie komórkowej.

Kontakt dziewiczego limfocyту B z antygenem nie wystarcza zwykle do rozpoczęcia cyklu podziałów. Wyjątkiem od tej reguły jest grupa poliklonalnych aktywatorów limfocytów B, jak np. lipopolisacharyd (LPS), zdolnych do zapoczątkowania odpowiedzi bez udziału dodatkowych bodźców. Substancje te określane są mianem antygenów grasiczoniezależnych typu pierwszego (przeł. [155]). Wydaje się jednak, że sposób działania tych substancji nie odpowiada fizjologicznemu rozwojowi odpowiedzi humoralnej, w którym niezbędny jest udział czynników pomocniczych. Ich źródłem jest populacja limfocytów pomocniczych Th (z ang. T helper). Wrażliwość na sygnały pomocnicze limfocyt B uzyskuje przez kontakt z antygenem. Przekazanie sygnału pomocniczego wymaga wspólnej swoistości antygenowej limfocytów T i B oraz obecności na powierzchni limfocyту B antygenów głównego kompleksu zgodności tkankowej klasy II (MHC II: z ang. major histocompatibility complex class II), rozpoznawanych przez limfocyt T jako własne. Czynniki pomocnicze uwalniane przez limfocyt T umożliwiają rozpoczęcie i utrzymanie serii podziałów oraz końcowe zróżnicowanie limfocyту B. Czynniki pomocnicze podzielono na czynniki wzrostowe limfocytów B (BCGF: z ang. B cell growth factors), powodujące namnażanie się antygenowo-swoistego klonu, oraz czynniki różnicowania (BCDF: z ang. B cell differentiation factors). Stymulujące końcowe dojrzewanie limfocytów B do komórek plazmatycznych i – ciągle niejednoznacznie określonych – komórek pamięci. Okazało się jednak, że większość czynników pomocniczych wykazuje w różnym stopniu obie te aktywności, zależnie od współwystępowania innych bodźców i stanu funkcjonalnego komórki.

Duża liczba poznanych czynników pomocniczych wydaje się odpowiadać możliwości pobudzenia limfocyty B na kilku alternatywnych drogach i poprowadzenia jego dalszego rozwoju w różnych kierunkach, w zależności od charakteru bodźca antygenowego i jego natężenia.



Ryc. 1. Współczesny model pobudzenia limfocyty B w rozwoju odpowiedzi humoralnej

I. POBUDZENIE ANTYGENOWE LIMFOCYTU B

W badaniach przekazywania przez błonowe immunoglobuliny używane są zwykle swoiście wiążące je przeciwciała (anty-IgM, anty-IgD) lub izolowane fragmenty $F(ab)_2$ tych przeciwciał. Związanie błonowych immunoglobulin przynosi szereg objawów pobudzenia komórki: jej powiększenie [74, 161, 233], nasilenie syntezy mRNA i wzrost liczby cząsteczek MHC klasy II w błonie komórkowej [157, 159], a także rozpoczęcie syntezy DNA i proliferację [22]. Podstawowym warunkiem efektywności przeciwciał anty-mIg jako aktywatorów limfocytów B jest zdolność do wytwarzania wielokrotnych krzyżowych wiązań pomiędzy cząsteczkami mIg (z ang. cross-linking) na powierzchni komórki [74]. Spotęgowanie właściwości mitogennych przeciwciał anty-mIg można uzyskać przez połączenie ich w struktury poliwalentne [74, 187]. Ponieważ wiązanie przez przeciwciała anty-mIg jest niezależne od swoistości błonowych immunoglobulin, następująca w jego wyniku aktywacja limfocytów B ma charakter poliklonalny.

Doświadczeń z użyciem przeciwciał anty-mIg *in vitro* nie można uważać za dokładne odzwierciedlenie pobudzenia antygenowego w żywym organizmie. Nawet najwyższymi dawkami antygeny nie udaje się zwykle uzyskać wszystkich efektów działania przeciwciał anty-mIg, jak np. proliferacji, co prawdopodobnie związane jest z niższą zdolnością do krzyżowego wiązania (cross-linking) mIg. Ponadto, przeciwciała nie powodujące aktywacji limfocytów B *in vitro* (z powodu niskiego powinowactwa lub niezdolności do krzyżowego wiązania mIg) mogą ją wywołać w żywym organizmie [74]. Prawdopodobnie

jest więc, iż dla zapoczątkowania odpowiedzi na antygen *in vivo*, przy udziale pomocniczych limfocytów T wystarcza niższy stopień krzyżowego wiązania mIg.

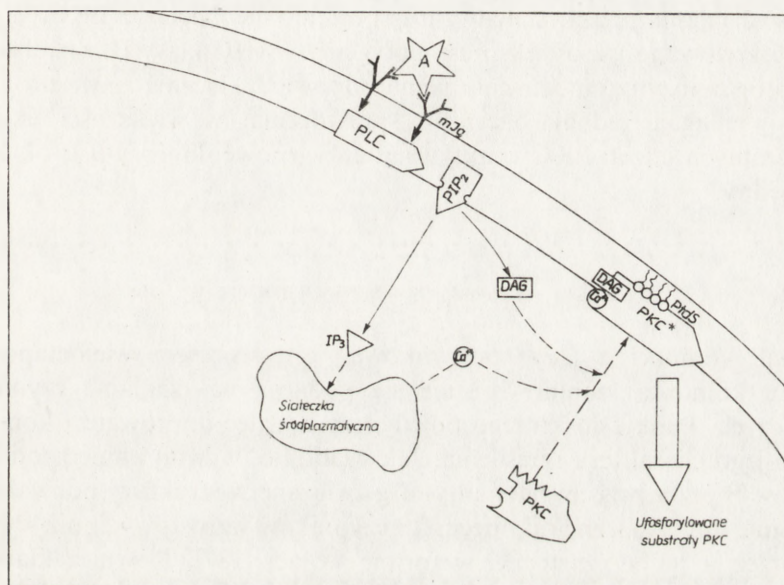
1.1. MECHANIZM PRZEKAZYWANIA SYGNAŁU PRZEZ BŁONOWE IMMUNOGLOBULINY

Równoległe z pobudzeniem przez przeciwciała anty-mIg, w limfocytach B wzrasta szybkość przemian fosfatydyloinozytoli [139]. Podniesienie poziomu głównego metabolitu diacyloglicerolu [przeł. 234] – kwasu fosfatydylowego – w komórkach stymulowanych anty-mIg bezpośrednio wskazało na udział fosfolipazy C (PLC: z ang. phospholipase C) w przekazywaniu sygnału przez błonowe immunoglobuliny [35]. Wydaje się, że w uaktywnieniu PLC zaangażowane jest, podobnie jak w pokrewnych układach [14, 210], białko G – wiążące GTP [72]. Istnieją jednak i przeciwne doniesienia [84]. Efektem uaktywnienia PLC jest rozpad obecnego w błonie limfocyta B dwufosforanu fosfatydyloinozytoli (PIP_2) z utworzeniem diacyloglicerolu (DAG) i trójfosforanu inozytoli (IP_3) [8, 84]. Dopuszcza się też możliwość udziału innych, w różnym stopniu ufosforylowanych pochodnych inozytoliowych [72]. Już śladowe ilości IP_3 są wystarczającym bodźcem do napływu do cytozolu jonów wapniowych [124]. Wzrost stężenia Ca^{2+} w cytozolu obserwowany jest jedynie w przypadku, gdy dochodzi do wielokrotnego krzyżowania mIg. Analogicznie jak dla pobudzenia komórki, monowalentne fragmenty Fab przeciwciał anty-mIg są nieefektywne [16]. Sprawdzone, że wzrost stężenia wapnia w cytozolu można uzyskać przez dostarczenie egzogennej PLC. Efekt ten jest blokowany przez substancje stabilizujące błonowe fosfolipidy [192]. Napływ wapnia nie jest związany ze wzrostem przepuszczalności błony komórkowej dla tego pierwiastka [16, 124]. Źródłem Ca^{2+} , uwalnianego w trakcie pobudzenia antygenowego, okazały się zbiorniki siateczki śródplazmatycznej [194].

Jony wapnia, jak i diacyloglicerol (DAG), są aktywatorami kinazy białkowej C (PKC), jednego z centralnych enzymów regulatorowych komórki, wykazując w tym działaniu silny synergizm [115, 145, 192, 235]. Wykazano, iż współdziałanie analogów diacyloglicerolu – estrów forboleu [172] – z podniesionym poziomem Ca^{2+} , uzyskiwanym przez podanie jonoforów wapniowych (jonomycyna, A23187), powoduje doblonowe przesunięcie PKC [120, 145], depolaryzację błony komórkowej oraz efekty pobudzenia antygenowego; nasilenie syntezy mRNA, wzrost ekspresji antygenów MHC II na powierzchni limfocyta B, jak również rozpoczęcie syntezy DNA [116].

Do maksymalnej aktywności PKC, poza DAG i Ca^{2+} , konieczny jest trzeci czynnik – błonowy fosfolipid [218], zidentyfikowany jako fosfatydyloseryna. Późniejsze prace uściśliły, że w aktywny kompleks w błonie komórkowej wchodzi – po jednej cząsteczce – PKC i specyficzny diacyloglicerol, jon wapniowy, oraz 4 cząsteczki fosfatydyloseryny [68, 82]. Przemieszczenie PKC

z cytozolu do błony komórkowej zachodzi już w ciągu 1–2 minut po związaniu błonowych przeciwciał. W czasie tym 80–90% aktywności PKC znika z cytozolu, pojawiając się w błonowej, rozpuszczalnej w detergencie frakcji nazwanej TSM (z ang. Triton soluble membrane) [26, 171]. Wkrótce po tym obserwowane jest przemieszczenie głównej puli enzymu do frakcji TIM (z ang. Triton insoluble membrane) [26]. Po ok. 60 minutach poziom PKC w cytozolu powraca do wartości początkowych [171].



Ryc. Mechanizm przekazywania sygnału przez błonowe immunoglobuliny (mIg). A – antygen lub jego analog; PLC – fosfolipaza C; PIP₂ – dwufosforan fosfatydyloinozytolu; IP₃ – trójfosforan inozytolu; DAG – diacyloglicerol; PtdS – fosfatydyloseryna; PKC – kinaza białkowa C; PKC* – forma aktywna PKC, połączona z błoną komórkową

Nie mamy dotychczas pełnego obrazu procesów zachodzących po uaktywnieniu PKC, prowadzących ku wyjściu limfocytu B z bazy spoczynkowej G₀. Rezultatem uaktywnienia PKC (zachodzącego po części przy udziale aktywowanych przez nią innych enzymów o charakterze kinaz tyrozynowych [170]) jest fosforylacja szeregu białek błonowych i cytozolowych. Wśród nich znajdują się najpewniej cząsteczki zaangażowane w błonowy transport jonów nieorganicznych [64, 198], czego skutkiem jest spadek potencjału transbłonowego i wzrost pH cytozolu [221, 160, 192].

Opisano stymulację ekspresji powierzchniowych immunoglobulin w komórkach pre-B, przez jonofor sodowy – monensin [204]. Z kolei, bloker transportu sodowego (amiloryd) hamuje tę odpowiedź w komórkach trakto-

wanych estrami forbolu [199]. Sugeruje to, iż napływ Na^+ jest znaczącym ogniwem pobudzenia komórki. Równolegle z pobudzeniem antygenowym komórki dochodzi do znacznego wzmożenia ekspresji szeregu onkogenów [208], w tym *c-myc* [125, 213], którego nasiloną transkrypcję notuje się w przebiegu wielu rozrostów nowotworowych limfocytów B [25, 140, 148, 201].

Niejasne jest, o ile istotne są inne, poza aktywacją PKC, drogi sygnalizacji przez błonowe immunoglobuliny. Doniesienia Monda i wsp. [157] sugerują możliwość działania przeciwciał anti-mIg pomimo nieobecności PKC. W sytuacji tej obserwowano wzrost ekspresji antygenów MHC klasy II, zaś obecność 8-merkaptoguanozyny umożliwiała pełną odpowiedź, łącznie z syntezą DNA. Dane te wymagają jednak baczego sprawdzenia: w większości układów doświadczalnych udział PKC w aktywacji antygenowej limfocytu B okazywał się niezbędny.

1.2. OKRES PRZEDREPLIKACYJNY LIMFOCYTU B

Wyjście komórki z fazy spoczynkowej jest procesem wieloetapowym, w którym komórka stopniowo staje się podatna na działanie czynników pomocniczych. Punkt, do którego pojedynczy bodziec doprowadza komórkę, zależy od jego charakteru i nasilenia. Jak wiadomo, wywoływanie proliferacji limfocytów B przez przeciwciała anti-mIg związane w struktury poliwalentne, jest znacznie mniej zależne od obecności czynników wzrostowych niż wywołanie jej przez te same cząsteczki w formie wolnej [187]. Również klasyczny antygen grasiczozależny trójnitrofenol (TNP) zaadsorbowany na stałym podłożu (poliakrylamid) wywołując może odpowiedź niezależną od czynników pomocniczych, o ile jego gęstość epitopowa przekroczy krytyczną wartość [188].

W przypadku przeciwciał w formie wolnej decyduje ich stężenie. W doświadczeniach Cambiera i Monroe już minimalne stężenia przeciwciał anti-IgM powodowały depolaryzację błony komórkowej i wzrost liczby cząsteczek MHC klasy II na jej powierzchni. Wejście w późną fazę G1 i S wymagało już jednak znacznie wyższych stężeń [22]. Podobne wyniki skłoniły DeFranco [45] do wyróżnienia w obrębie fazy przedreplikacyjnej podokresów: G1 α i G1 β , różniących się zapotrzebowaniem na koncentrację przeciwciał anti-mIg. Niskie stężenia przeprowadziły komórkę przez większą część fazy G1 α , pod koniec której dwunastogodzinny okres, oznaczony G1 α' konieczne było 5–50 razy wyższe stężenie. Przerwanie stymulacji w fazie G1 α prowadziło do zatrzymania rozwoju na etapie komórek dużych, o niskiej gęstości. Podjęcie rozwoju w cyklu komórkowym możliwe było nawet po kilkunastu godzinach, po wzroście koncentracji przeciwciał anti-mIg. Po ok. 32 godz. od rozpoczęcia

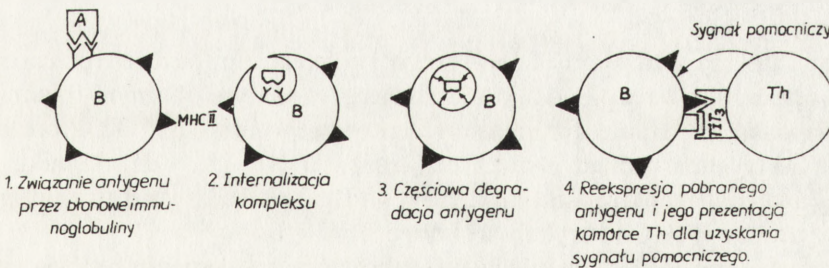
stymulacji komórki przechodziły w fazę $G1\beta$, w której intensywność pobudzenia receptora antygenowego przestawała być czynnikiem krytycznym. Po upływie kolejnych 10 godz. notowano rozpoczęcie syntezy DNA (faza S).

2. ROLA SYGNAŁÓW POMOCNICZYCH W AKTYWACJI LIMFOCYTU B

Swoistość antygenowa przekazania sygnału pomocniczego uzyskiwana jest poprzez swoistość interakcji komórki B z limfocytym Th. Najstarsza teoria tłumacząca to zjawisko – klasyczna teoria mostkowania – zakłada, że do zbliżenia między kooperującymi komórkami dochodzi przez układ: błonowe przeciwciało – antygen – receptor limfocyta T. Postulowano, że zakotwiczona w cytoplazmie komórki B cząsteczka immunoglobulinowa (mIg) rozpoznaje hapten, podczas gdy receptor limfocyta T wiąże nośnik. Obie te części, pozostając ze sobą w fizycznym związku, stanowiłyby w pełni immunogeny antygen, tworzący „mostek” między obiema komórkami. Obecnie wszakże model ten uległ poważnym modyfikacjom w związku z odkryciem zjawiska prezentacji antygeny przez limfocyty B [29].

2.1. PREZENTACJA ANTYGENU PRZEZ KOMÓRKI B

Połączenie błonowych immunoglobulin z antygenem jest sygnałem zapoczątkowującym proces grupowania powstałych kompleksów (patching) i gromadzenia ich na biegunach komórki (capping). Internalizacja powstałych zgrupowań umożliwia wewnątrzkomórkową obróbkę antygeny do postaci, która w kontekście cząsteczek MHC klasy II może być rozpoznana przez limfocyt Th.



Ryc. 3. Prezentacja antygeny przez limfocyt B

Limfocyty B są wysoce efektywne w prezentacji antygeny [29]. Należy to wiązać ze swoistością wychwyty antygeny, co zapewnia jego zagęszczenie na powierzchni komórki, wśród cząsteczek MHC klasy II. Limfocyty B mogą prezentować antygen także nieswoicie, z efektywnością niższą o 3–4 rzędy wielkości [104, 127, 223]. Prezentację przez limfocyty B można zablokować

substancjami lizosomotropowymi, jak np. chlorochina czy chlorek amonowy, blokującymi wewnątrzkomórkową degradację antygeny [127]. W sytuacji tej jednak nadal prezentowane mogą być krótkie fragmenty peptydowe.

Prezentacja antygeny przez limfocyty B jest wybitnie wrażliwa na promieniowanie. Już dawki 1000 radów silnie zmniejszają jej efektywność [223]. Zahamowanie prezentacji przez napromienienie limfocytów jest najsilniej zaznaczone w niskich stężeniach antygeny, co sugeruje, że blokowana jest głównie jej aktywna, zależna od błonowych immunoglobulin, składowa. Efektywność limfocytów B w prezentacji antygenowej wydaje się uwarunkowana, a przynajmniej znacznie nasilana, przez ich uprzednią aktywację [24, 109, 121, 135]. Wydaje się, że wystarcza tu pobudzenie limfocytu B przez antygen.

Prezentacja antygeny przez limfocyty B nie zawsze powoduje rozwój swoistego klonu Th. Część badaczy skłania się ku pogładowi, iż prezentacja limfocytarna efektywnie stymuluje limfocyty T jedynie przy ich wtórnym kontakcie z antygenem [77, 98]. W pierwotnym (z ang. priming) konieczny byłby udział makrofagów. W wielu pracach akcentowany był wymóg obecności tych ostatnich jako źródła interleukiny 1 (IL-1), bądź konieczność dostarczania IL-1, dla uzyskania proliferacji limfocytów T. Istnieją jednak dane świadczące o możliwości wytwarzania tej limfokiny (jako formy wolnej lub związanej z błoną komórkową) przez limfocyty B [4, 70], choć wymaga sprawdzenia, czy zjawisko to ma znaczenie w kooperacji T-B. Niezależnie od wpływu prezentacji antygeny przez limfocyty B na limfocyt Th niezmiennie towarzyszy jej przekazanie sygnału pomocniczego [122].

2.1.1 ROLA CZĄSTECZEK MHC KLASY II W KOOPERACJI T-B

Zjawisko rozpoznawania antygenowo swoistego limfocytu B przez odpowiadający mu limfocyt pomocniczy T zawiera, w naszym obecnym rozumieniu tego zjawiska, związanie kompleksu receptorowego limfocytu Th z prezentowanym antygenem połączonym z cząsteczką MHC klasy II. Wynika stąd potrzeba komplementarności limfocytów T i B w zakresie swoistości antygenowej i zjawisko MHC-restrykcji w kooperacji T-B.

Poza rolą cząsteczek MHC klasy II jako biernego elementu restrykcyjnego zarysowała się ostatnio możliwość pełnienia przez nie dodatkowej, „aktywnej” funkcji. Obecność przeciwciał wiążących molekuly MHC II w hodowlach limfocytów B hamuje proliferację za pomocą przeciwciał anti-mIg lub LPS [32, 63]. Związanie antygenów MHC klasy II może też dawać odpowiedź pozytywną, np. indukując różnicowanie stransformowanych komórek B do plazmocytów [181]. Podobnie aktywne są utrwalone glutaraldehydem limfocyty T swoiste względem allogenicznych cząsteczek MHC klasy II [10, 39].

Związanie przez nie obcych antygenów MHC klasy II modeluje połączenie receptora limfocytu Th z prezentowanym kompleksem MHC II/antygen na powierzchni własnego limfocytu B.

Na poziomie molekularnym związaniu antygenów MHC klasy II towarzyszy wzrost poziomu cAMP (widoczny już w ciągu 30 s) i dojazdowe przesunięcie PKC [23, 27]. Wzrost cAMP, przez hamowanie rozpadu PIP_2 [89] oraz obniżenie dostępności PKC w cytozolu [23, 26], tłumaczyłyby aktywność antyproliferacyjną przeciwciał anti-MHC II. Ustalenie, czy i o ile powyższe zjawiska mają znaczenie w rozwoju odpowiedzi humoralnej, nie jest jednak obecnie możliwe.

2.2 HUMORALNE CZYNNIKI POMOCNICZE W ROZWOJU HUMORALNEJ ODPOWIEDZI IMMUNOLOGICZNEJ

Podstawowe znaczenie w zjawisku przekazywania sygnału pomocniczego przypisywane jest substancjom humoralnym wydzielanym przez limfocyty Th – limfokinom. W hodowlach komórek B, prowadzonych w nieobecności limfocytów pomocniczych, współdziałają one z antygenem (lub jego analogiem), powodując rozpoczęcie i późniejsze podtrzymanie cyklu mitoz oraz produkcję przeciwciał. Odpowiednie stężenie limfokiny okazuje się niekiedy wystarczające do wywołania obu tych efektów *in vitro* w nieobecności antygeny [131, 132]. Limfokiny mogą zwiększać reaktywność limfocytów B na antygen i modyfikować przebieg odpowiedzi w zależności od jego charakteru.

Substancje pomocnicze dla limfocytów B wykazują najczęściej specyficzny wpływ także na inne elementy układu odpornościowego, co stanowi podstawę do zaliczenia ich do interleukin. Będąc antygenowo i MHC-nieswoiste, pozostają one aktywne u innych osobników tego samego gatunku, a w części przypadków, również w organizmach gatunkowo obcych. W chwili obecnej wydaje się, że system czynników pomocniczych w organizmach ssaków jest wysoce zachowawczy; pomiędzy układami mysim i ludzkim – najlepiej poznanymi – istnieje dużego stopnia analogia.

Swoistość antygenowa pomocy przekazywanej za pośrednictwem limfokin, uzyskiwana jest dzięki uwolnieniu ich podczas interakcji antygenowo zgodnych komórek B i T, tak że tylko w bezpośrednim sąsiedztwie osiągnęte jest dostateczne stężenie aktywnej substancji. Ostatnio Poo i wsp. [183] stwierdzili, że uwalnianie czynników pomocniczych w trakcie interakcji komórek T i B zachodzi tylko na niewielkim obszarze bezpośredniego kontaktu, co miałoby tu niewątpliwe znaczenie. Drugim mechanizmem uzyskiwania swoistości jest prawdopodobnie zmienna ekspresja receptorów dla czynników pomocniczych [21, 178], wskutek czego, nawet przy dostatecznej koncentracji limfokiny, reagują jedynie komórki będące na odpowiednim etapie pobudzenia.

2.2.1. INTERLEUKINA 4 (BCGF I, 20-kD BCGF, BSF-1, BCDF- γ , IgG1-INDUCTION FACTOR, TCGF-2, MCGF-2)

Interleukina 4 jest najdokładniej poznanym czynnikiem pomocniczym dla limfocytów B. Jej działanie jest wyjątkowo różnorodne, co odzwierciedla gama wymienionych aktywności przynależnych temu związkowi. Pierwotnie została opisana [91] jako BCGF I (z ang. B-cell growth factor p1); czynnik obecny w supernatancie hodowli linii tymocytarnej EL-4, współdziałający z przeciwciałami anti-mIg w indukowaniu proliferacji limfocytów B [75, 165, 175]. Podanie przeciwciał 11B11, wiążących IL-4, blokuje rozwój odpowiedzi na antygeny grasiczozależne [53], co wskazuje na kluczową rolę IL-4 w tym zakresie. IL-4 pobudza też spoczynkowe (małe, o wysokiej gęstości) limfocyty B, powodując 5–10-krotny wzrost gęstości antygenów MHC klasy II na ich powierzchni [173] i indukcję receptora dla własnej cząsteczki [178]. Fizjologicznie odpowiada to podwyższeniu wrażliwości na sygnał aktywujący: komórki prestymulowane interleukiną 4 szybciej o ok. 12 godz. wchodzi w fazę S cyklu komórkowego w odpowiedzi na podanie agonistów receptora antygenowego i kolejnej dawki IL-4 [179, 190, 191]. Ze wzrostem ilości antygenów MHC klasy II związane jest nasilenie tworzenia koniugatów T–B w obecności IL-4 [202]. Silnie zaznaczony jest wpływ IL-4 na różnicowanie limfocytów B. Jest on swoisty izotypowo. IL-4 kieruje komórki ku wytwarzaniu IgG1 i IgE, wydaje się też mieć udział w promowaniu syntezy IgA (zob. rozdz. 3.1.1.).

Interleukina 4 działa również na inne elementy układu odpornościowego; jest czynnikiem wzrostowym komórek tucznych (MCGF-2 z ang. mast cell growth factor) [81, 133, 163, 209], części limfocytów T (TCGF-2) [60, 75, 133, 163, 209] i tymocytów [239] oraz szeregu linii hemopoetycznych [75, 177]. Jest też jednym z czynników aktywujących makrofagi [40] i pobudzających rozwój cytotoksycznych limfocytów T [224].

U myszy receptor błonowy dla IL-4 (IL-4R) jest białkiem o masie cząsteczkowej ocenianej na 60 kD [21]. Jego połączenie z IL-4 nie wpływa na poziom cAMP, pochodnych fosfatydyloinozytolu ani wapnia [154, 108]. Mimo to prowadzi ono do fosforylacji szeregu białek komórkowych [108], których tożsamość ani rola biologiczna nie zostały dotychczas ustalone. Jest prawdopodobne, iż IL-4R ma charakter błonowej kinazy, podobnie jak receptory dla EDGF czy insuliny [21].

2.2.2. INTERLEUKINA 5 (BCGF-II, TRF-1, 50-kD-BCGF, IgA-INDUCING FACTOR, EDF/EoCSF)

Interleukina 5 jest jednym z TRF-ów (z ang. T-cell replacing factors), grupy czynników wzmagających produkcję przeciwciał przez pobudzone komórki B w hodowlach pozbawionych limfocytów T [2, 112, 141]. W przeciwieństwie do IL-4 pobudza wzrost komórek B prestymulowanych *in vivo* (komórki duże, o niskiej gęstości) [175, 195, 197], współstymuluje z siarczanem

dekstranu (DXS) poliklonalną proliferację limfocytów B [217], daje też efekt mitogeny w hodowlach linii limfoidalnej BCL₁ [175, 216]. Aktywność ta określona została jako BCGF II. IL-5 jest też czynnikiem stymulującym granulocyty kwasochłonne aktywności EDF (z ang. eosinophil differentiation factor) i ECSF (z ang. eosinophil colony stimulating factor) [54, 1.75, 203] oraz cytotoksycznych limfocytów T jako KHF (z ang. killer-helper factor) [220]. Daje to podstawę do zaliczenia jej do interleukin.

Różnice między aktywnościami BCGF I i BCGF II sugerują odmienny czasowo punkt działania IL-4 i IL-5. Interleukina 4 jest czynnikiem wymaganym w ciągu pierwszych godzin hodowli limfocytów B stymulowanych antygenem. Jako czynnik wzrostowy jest aktywna także przy podaniu uprzednim w stosunku do antygeny, nawet jeśli zostaje usunięta z hodowli przed jego dostarczeniem, natomiast podanie IL-4 z 12-godzinnym opóźnieniem ogranicza, a przy dłuższej zwłoce znosi, jej aktywność [191]. IL-5 nie działa na komórki spoczynkowe, nieaktywna jest również, w warunkach optymalnej efektywności IL-4, we współdziałaniu z przeciwciałami anti-mIg [217]. Silnie natomiast indukuje proliferację przy podaniu opóźnionym o 24 godziny w stosunku do przeciwciał anti-mIg [229]. Wydaje się więc, że jej aktywność przypada na dalsze etapy cyklu komórkowego. Potwierdza to jej współdziałanie z DXS, doprowadzającym limfocyty B do fazy G1 oraz aktywacja komórek BCL₁ (o metabolizmie odpowiadającym tej fazie).

Interesującą właściwością interleukiny 5, mogącą mieć znaczenie dla jej działania na komórki B, jest zdolność do indukcji receptora dla IL-2 (antygen Tac lub CD25) [83, 137]. Wrażliwość na IL-2 komórek B, stymulowanych anti-mIg, pojawia się po trzech dobach inkubacji w obecności IL-5 [229]. Podobne działanie wykazuje IL-5 w stosunku do limfocytów T oraz szeregu transformowanych linii limfoidalnych [110]. Co ciekawe, pojawienie się na powierzchni limfocytów B cząsteczek CD25 odpowiada spadkowi wrażliwości na IL-5 [229], czego znaczenie jest niejasne. Będąc czynnikiem różnicowania limfocytów B, interleukina 5 kieruje je w stronę wytwarzania IgA (zob. rozdz. 4.2.)

2.2.3. INTERLEUKINA 1

Najszerzej znana jest jako czynnik aktywujący limfocyty pomocnicze T, uwalniany przez makrofagi w trakcie prezentacji antygenowej. Wśród innych aktywności wyraźny jest wpływ IL-1 na limfocyty B. Wykazuje ona właściwości BCGF I (w układzie anti-mIg) i BCGF II (działanie na komórki traktowane DXS), w słabszym jednak stopniu niż IL-4 czy IL-5 [13, 56, 92]. Właściwości IL-1 jako czynnika wzrostu limfocytów B ulegają spotęgowaniu w obecności interleukiny 6 [230], IL-4 i IL-5 [13]. Opisano też aktywność IL-1 jako czynnika różnicowania limfocytów B [30, 105, 182]. Interesujące wydają się

doniesienia o wytwarzaniu IL-1 przez same limfocyty B [143,144], co mogłoby mieć znaczenie w procesie prezentacji przez nie antygeny [4, 70], tłumaczyłoby też różnice w ich wrażliwości na sygnały aktywujące, w zależności od koncentracji komórek w hodowli. Interleukina 1 jest silnym induktorem IL-6 [37], co może wpływać na obserwowany profil jej aktywności. Zarówno mysia, jak i ludzka IL-1 występują w dwu odmianach: α i β [180], w obu wypadkach wiązanych przez jeden receptor limfocyty B, o podobnym powinowactwie do każdej [142].

2.2.4. INTERLEUKINA 2

Główny czynnik wzrostowy limfocytów T (TCGF: z ang. T-cell growth factor) okazał się aktywny w indukowaniu proliferacji pobudzonych uprzednio komórek B. Po pierwszych eksperymentach, wskazujących na dużą rolę IL-2 w odpowiedzi humoralnej, wykazano, iż za część efektów działania IL-2 odpowiada pobudzenie obecnych w hodowli limfocytów T. Późniejsze badania, prowadzone na wysoko homogennych populacjach komórek B, dowiodły jednak roli działania bezpośredniego. Potwierdza to identyfikacja receptora dla IL-2 na powierzchni komórek B [166]. W testach prowadzonych *in vitro* IL-2 wzmagają zarówno proliferację i syntezę przeciwciał przez stransformowane komórki B [126], limfocyty B aktywowane anty-mIg [153, 169], jak i naturalnie preaktywowane *in vivo* [129].

2.2.5. INTERFERON- γ

Doniesienia o roli IFN- γ w odpowiedzi humoralnej są rozbieżne. W wielu układach doświadczalnych dochodzi do wzmożenia produkcji przeciwciał w obecności interferonu [18, 134, 168]. Opisano też jednak zjawiska przeciwnie [76], będące, być może, efektem ogólnego działania antyproliferacyjnego IFN i osłabienia żywotności komórek, jak i blokowania przezeń efektów działania interleukiny 4. Chociaż obecność IFN- γ w hodowli wzmagają ekspresję antygenów MHC klasy II na wielu komórkach, w tym także stransformowanych limfocytach B [173, 236], hamuje on wzrost liczby tych cząsteczek zachodzący w odpowiedzi na IL-4 [156]. Również zdolność IL-4 do współstymulacji namnażania się limfocytów B traktowanych przeciwciałami anty-mIg, oraz przyspieszenie wejścia w fazę S komórek stymulowanych IL-4 + anty-mIg, przez traktowanie ich uprzednio IL-4 jest wrażliwe na interferon [189, 196].

Częściej obserwowany jest pozytywny wpływ interferonu- γ na rozwój odpowiedzi humoralnej. Opisano aktywność IFN- γ jako BCGF I [44, 162]. Jako TRF, promuje on sekrecję przeciwciał w hodowlach pozbawionych lim-

focytów T [18, 207], chociaż były wysuwane wątpliwości, czy jest to działanie bezpośrednie [44]. Swoisty wpływ IFN- γ na różnicowanie limfocytów B omówiono w rozdz. 3.3.1.

2.2.6. INTERLEUKINA 6

Poza grupą wymienionych wyżej czynników pomocniczych, o jednoznacznie określonej tożsamości, opisano wiele innych substancji aktywnych w stosunku do limfocytów B. Do grupy tej należą niektóre elementy układu dopełniacza [55, 151, 186], 12kD-BCGF, istotny w układzie ludzkim [20, 149], czynniki powodujące proliferację nie pobudzonych antygenowo limfocytów B (BCAF: z ang. B-cell activating factor) [52, 131, 132, 200], neuroleukina [przepl. 79], czy substancje określone jako BCDF (z ang. B-cell differentiation factor) [87, 111]. Jedną z tych ostatnich, wyizolowaną z nadsącza linii limfoidalnej TCL-Na1, ujawniła odmienną od wcześniej poznanych limfokin i monokin sekwencję aminokwasową. Nowo zidentyfikowany czynnik, uprzednio opisywany jako BSF-2 (z ang. B-cell stimulatory factor-2) [88], interferon β 2 [205], czy białko 26kD [80], otrzymał nazwę interleukiny 6. Substancja ta doprowadza do wytwarzania przeciwciał przez pobudzone komórki B, nie wykazując wpływu na ich proliferację [86, 88, 184].

IL-6 jest jednak aktywna jako czynnik wzrostowy transformowanych komórek B [184]. Zainteresowanie budzi możliwość jej udziału w stymulacji wzrostu komórek białaczkowych jako HPGF (z ang. hybridoma/plasmocytoma growth factor [226, 227, 230]). IL-6 ma aktywność czynnika wzrostu limfocytów T [69, 90] oraz niektórych linii hemopoetycznych zależnych od interleukiny 3 [95]. Przyspiesza też dojrzewanie cytotoksycznych limfocytów T [219].

Powszechnie wiadomo, że zapotrzebowanie na czynniki wzrostowe hodowli limfocytów B zależy w pewnym stopniu od koncentracji komórek. Staje się to interesujące w obliczu doniesień o wytwarzaniu przez niektóre linie limfoidalne B, jak również normalne komórki B substancji wykazujących aktywności IL-1 czy BSF-1/BCGF [73, 107]. Wykazano przy tym, że mogą one być wykorzystywane jako autokrynne czynniki wzrostu [231].

Kilka lat temu del Guercio opisał produkt komórek B (nazwany interleukiną B) wzmagający produkcję przeciwciał *in vitro* [46] przez hamowanie ekspresji receptora dla fragmentu Fc przeciwciał (FcR) na limfocytach T i wydzielania czynników supresorowych [47, 48]. Tak więc, rysuje się możliwość modulowania odpowiedzi humoralnej przez same limfocyty B. Czy i w jakim stopniu jest ona wykorzystywana w warunkach fizjologicznych, pozostaje niewiadomą.

TABELA 1
Humoralne czynniki pomocnicze dla limfocyту B

	Czynnik wzrostu	Czynnik różnicowania	Inne aktywności
Interleukina 1	+ (aktywności BCGF I i BCGF II; słabiej wyrażone niż IL-4 i IL-5. Wykazuje synergizm z IL-4, IL-5, IL-6)	+	jest induktorem IL-6
Interleukina 2	+	+ (TRF)	
Interleukina 4	+ (BCGF I)	+ (swoisty izotypowo; wytwarzanie IgG1 i IgE)	wzmaga ekspresję IL-4R i antygenów MHC II na powierzchni komórek spoczynkowych; zwiększa wrażliwość na pobudzenie antygenowe.
Interleukina 5	+ (BCGF II)	+ (swoisty izotypowo; nasila wytwarzanie IgA)	wzmaga ekspresję IL-2R (CD25, Tac) i wrażliwość na IL-2
Interleukina 6	-? (jest czynnikiem wzrostu stransformowanych limfocytów B)	+	
Interferon- γ	+?	+ (swoisty izotypowo; nasila wytwarzanie IgG2a)	blokuje działanie IL-4 na wszystkich etapach rozwoju odpowiedzi humoralnej

2.3. ANTYPENOWO SWOISTE CZYNNIKI POMOCNICZE (ASHF: ANTIGEN-SPECIFIC HELPER FACTORS)

W początkach lat 70-tych Feldman [57 – 60], prowadząc hodowle izolowanych populacji limfocytów T i B (oddzielonych błoną o średnicy porów 1 μ), uzyskał wyniki sugerujące swoistość antygenową przynajmniej części z wytwarzanych czynników pomocniczych. Dane uzyskane w późniejszych latach wskazywały, że swoistość ta dotyczy nie tylko antygeny, lecz również cząstek MHC II, obecnych na powierzchni komórki B, będącej obiektem pomocy [3, 49, 150]. Charakter i rola antygenowo-swoistych czynników pomocniczych jest wciąż kontrowersyjna. Sugerowano, że mogą one odpowiadać wolnej formie receptora antygenowego limfocyту T, co wydaje się możliwe w świetle

doniesień o możliwości uwalniania z powierzchni komórki niektórych cząstek receptorowych, np. CD8 (wiążącej molekuly MHC klasy I) [67], czy receptora dla fragmentu Fc przeciwciał (zob. rozdz. 3.1.3).

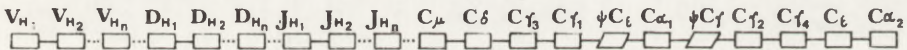
3. REGULACJA IZOTYPOWA ODPOWIEDZI HUMORALNEJ

Genom pojedynczej komórki prekursorowej limfocyту B zawiera pełną informację dla wszystkich wariantów części stałych obu łańcuchów immunoglobulinowych: ciężkiego (C_H) i lekkiego (C_L). W przebiegu ontogenezy komórki B każdy z fragmentów kodujących C_H , może zostać połączony z częścią zmienną łańcucha ciężkiego, czyli zrekombinowanym kompleksem V-D-J (ryc 4.) Zbliżona jest sytuacja pary C_L i kompleksu genów V-J, kodującego część zmienną łańcucha lekkiego [przełg. 71]. W cząsteczce immunoglobuliny część zmienna odpowiedzialna jest za wiązanie antygeny, określa więc swoistość przeciwciała. Część stała odpowiedzialna jest za wypełnianie funkcji efektorowych. Występowanie określonej części stałej w łańcuchu ciężkim (C_H) definiuje klasę (izotyp) przeciwciała.

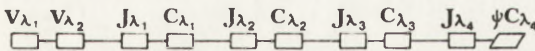
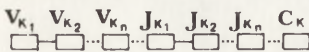
Poszczególne izotypy różnią się między sobą stopniem zdolności do uruchamiania mechanizmów efektorowych odpowiedzi, takich jak aktywacja dopełniacza, fagocytoza czy cytotoksyczność komórkowa zależna od przeciwi-

A.

łańcuch ciężki



łańcuch lekki



B.



Ryc. 4. Struktura genów dla immunoglobulin. A) immunoglobuliny człowieka. Część zmienną łańcucha ciężkiego kodują geny V, D, J. Połączenie kompleksu V-D-J z odpowiednim genem dla części stałej jest wzorcem dla syntezy łańcucha ciężkiego immunoglobulin (odpowiednio – IgM, IgD, IgG3, IgG1, IgA1, IgG2, IgG4, IgE, IgA2). Część zmienną łańcucha lekkiego kodowana jest przez geny V i J. Zrekombinowany kompleks V-J, w przypadku łańcucha κ może występować w połączeniu z jednym tylko genem dla $C\kappa$; w przypadku łańcucha λ istnieją 3 możliwości. $C\epsilon$, $C\gamma$, $C\lambda_4$ są pseudogenami; nie ulegają ekspresji. B) Geny kodujące łańcuch ciężki immunoglobulin myszy (odpowiednio – IgM, IgD, IgG3, IgG1, IgG2b, IgG2a, IgE, IgA)

ciał (ADCC: z ang. antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity). Różni je też zdolność przenikania do poszczególnych przedziałów organizmu [przeł. 19].

Zróznicowanie to umożliwia dobór najskuteczniejszych w każdym przypadku sposobów eliminacji z ustroju immunizującego czynnika, poprzez indywidualny dobór odpowiedniego izotypu.

W pierwotnej odpowiedzi humoralnej dominują przeciwciała klasy IgM. W miarę trwania immunizacji dochodzi do pojawienia się i innych klas, różnych, w zależności od charakteru czynnika wywołującego odpowiedź, drogi jego wniknięcia do organizmu i stanu, w jakim znajduje się układ odpornościowy gospodarza (współistniejące zakażenia, immunosupresja, wiek).

Tabela 2
Funkcje immunoglobulin człowieka. Według D. R. Burton [18]

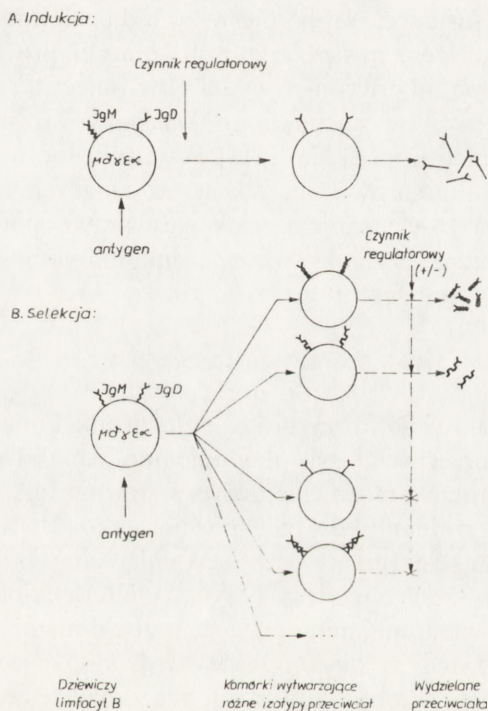
Izotyp	IgG1	IgG2	IgG3	IgG4	IgM	IgA1	IgA2	IgD	IgE
aktywacja dopełniacza: droga klasyczna	+	+ -	+	-	++	-	-	-	-
droga alternatywna	-	-	-	-	-	+ -	+ -	-	-
przenikanie przez łożysko	+	-	+	+ -	-	-	-	-	-
wiązanie przez: monocyty/makrofagi	+	-	+	+ -	?	+	+	-	+
granulocyty obojętnochłonne	+	-	+	+ -	-	+	+	-	-
limfocyty	+	-	+	+ -	?	+	+	+	+
komórki tuczne i granulocyty zasadochłonne	-	-	-	+	-	-	-	-	+
płytki krwi	+	-	+	+ -	-	-	-	-	+

3.1. WPŁYW LIMFOCYTÓW T NA PROFIL IZOTYPOWY ODPOWIEDZI HUMORALNEJ

W procesie zmiany izotypu (z ang. class-switching), zachodzącym w przebiegu odpowiedzi humoralnej, wyraźny jest udział limfocytów T [146]. Usunięcie ich z hodowli, jak i niedobór w organizmie, powoduje ograniczenie wydzielania innych od IgM klas przeciwciał [15, 43]. I odwrotnie: przetoczenie odpowiedniej populacji limfocytów T zwierzętom niezdolnym do wydzielania przeciwciał określonej klasy może spowodować rozpoczęcie ich syntezy [85].

W regulacji izotypowej odpowiedzi udział mają humoralne produkty limfocytów T. Świadczy o tym fakt, że w infekcjach pasożytniczych (w których odpowiedź na antygeny pasożyta realizowana jest w klasie IgE) odpowiedź na inne antygeny, podane równolegle, także zawężona jest do IgE.

Mechanizm zmiany izotypu odpowiedzi humoralnej nie jest do końca wyjaśniony. Proponowane są dwa modele tego zjawiska. Opierając się na zdolności poliklonalnych aktywatorów komórek B do indukcji przeciwciał wielu klas, zaproponowano teorię selekcyjną regulacji izotypowej (ryc. 5).



Ryc. 5. Dwa modele regulacji izotypowej odpowiedzi humoralnej. W modelu indukcyjnym czynnik regulatorowy wywiera specyficzny wpływ na limfocyty B powodując lub ułatwiając połączenie pożądanego genu dla części stałej ze zrekombinowanym kompleksem VDJ. Model selekcyjny zakłada działanie czynników regulatorowych na komórki, które uprzednio spontanicznie „przełączyły się” w kierunku wytwarzania określonego izotypu

Zgodnie z nią, element regulatorowy działałby na komórki, które wcześniej spontanicznie przełączyły się w kierunku wytwarzania przeciwciał pożądanego klasy, wzmagając ich żywotność i efektywność sekrecyjną. W wersji negatywnej tego modelu eliminowane byłyby komórki niewłaściwie przełączone.

Odmianą możliwością jest indukcja danego izotypu przez swoiste elementy regulatorowe (komórki, produkowane przez nie substancje humoralne).

Czynniki te, wpływając na limfocyty B, powodowałyby rekombinację pomiędzy fragmentem genomu, kodującym część zmienną łańcucha immunoglobulinowego, a wybranym genem dla części stałej. Model ten odpowiada najprawdopodobniej działaniu aktywnych w zakresie regulacji izotypowej limfokin. W przeciwieństwie do modeli selekcyjnych dopuszcza on możliwość specyficznego działania czynników regulatorowych na różnych poziomach cyklu rozwojowego limfocytu B, jak to ma miejsce w wypadku IL-4. Przesłanką, świadczącą na korzyść modelu indukcyjnego działania IL-4, jest spostrzeżenie, iż w wielu układach doświadczalnych modyfikuje ona profil izotypowy odpowiedzi pomimo usunięcia jej po pierwszych dniach hodowli, na kilkadziesiąt godzin przed pojawieniem się pierwszych komórek produkujących IgE czy IgG1 [212]. Podobnie interferon- γ wydaje się mieć tę samą, specyficzną aktywność regulatorową w stosunku do klasy wytwarzanego przeciwciała, niezależnie od momentu podania [211]. Ostatnio potwierdzono, że IL-4 podwyższa liczbę prekursorów komórek syntetyzujących IgE, nie wpływając na wielkość klonu [9]. Mechanizm selekcyjny prawdopodobnie odpowiada regulacji izotypu przez czynniki wiążące immunoglobuliny (IBF: z ang. immunoglobulin binding factors — zob. rozdz. 3.1.3.)

3.1.1. ROLA LIMFOKIN W ZJAWISKU CLASS-SWITCHING: INTERLEUKINA 5, INTERLEUKINA 4, INTERFERON- γ

Interleukina 5, jako TRF, przyspiesza dojrzewanie komórek B, powodując nasilenie produkcji przeciwciał. Nie obejmuje ono jednak wszystkich izotypów w tym samym stopniu. Wzmocnienie dotyczy głównie IgA, co usprawiedliwia nadanie substancji, zidentyfikowanej później jako IL-5, nazwy czynnika wzmagającego produkcję IgA (z ang. IgA-enhancing factor) [11, 35]. Jest prawdopodobne, że szczególna rola przypada interleukinie 5 w przewodzie pokarmowym. Jak wiadomo, immunizacja przez doustne podanie antygeny wywołuje silną odpowiedź w klasie IgA. Stwierdzono, że jednym z czynników, wywołujących ten efekt, a produkowanych przez mające cechy limfocytów Th 2 komórki kępek Peyera, może być interleukina 5 [167]. Interleukina 4 jest odpowiedzialna za wzmożenie produkcji IgG1 (BCDF γ , IgG1-induction factor) [99, 174, 206] oraz IgE [33, 34], przy czym wzrost IgE jest większy [33].

Znaczenie IL-4 dla wytwarzania IgE można wykazać *in vivo*. Narastanie poziomu IgE u myszy zainfekowanych *Nippostrongylus brasiliensis* jest hamowane przez przeciwciała wiążące IL-4 [62]. Interleukina 4 okazała się też wystarczającym bodźcem dla podjęcia produkcji IgE przez limfocyty B mysiego szczepu SJA/9 normalnie nie wytwarzającego tej klasy przeciwciał [5]. Interesującą właściwością interleukiny 4 jest indukcja receptora dla Fc ϵ [93] na powierzchni komórek B oraz nasilenie wytwarzania supresorowych czynników wiążących IgE [12], co może mieć znaczenie dla regulacji odpowiedzi realizowanej w tej klasie przeciwciał, chroniąc przed nadmiernym jej rozwojem.

Doniesienia o wpływie omawianej limfokiny na wytwarzanie IgA są rozbieżne, wydaje się jednak, że może ona w pewnym stopniu je wzmacniać, a przynajmniej potęgować efekty działania IL-5 w tym zakresie [35].

Wpływ IL-4 na różnicowanie limfocytów B hamowany jest przez kolejną limfokinę, mającą znaczenie dla izotypu generowanej odpowiedzi humoralnej – IFN- γ [34]. W doświadczeniach Snappera i Paula [211], prowadzonych *in vitro* na komórkach mysiego szczepu DBA/2, IFN- γ stymulował wzrost poziomu przeciwciał klasy IgG2a, jednocześnie silnie hamując wydzielanie IgG3, IgG1, IgG2b, oraz IgE, przy czym zahamowanie to nie było spowodowane obniżeniem żywotności komórek. (W tych samych warunkach IL-4 dawała wzrost IgG1, IgE, i spadek IgM, IgG3, IgG2a, IgG2b nawet w 90–95%). Podobne działanie IFN- γ obserwowano też *in vivo* [61].

Interesujące jest spostrzeżenie, że zarówno interleukina 4, jak i interferon- γ mogą wpływać na profil izotypowy odpowiedzi humoralnej, także przy podaniu uprzednim w stosunku do czynnika mitogennego (w międzyczasie usuwano czynnik różnicowania za pomocą przeciwciał monoklonalnych lub płuczac hodowle) [211, 212]. Stanowi to wyzwanie dla modelu zakładającego istnienie trzech niezależnych, następujących po sobie sygnałów, prowadzących do rozpoczęcia wytwarzania przeciwciał: antygeny, czynników wzrostowych i czynników różnicowania. Cambier [21], odnośnie do sygnalizacji przez cząsteczki MHC II, zasugerował, że sygnał dla różnicowania, przekazywany przez nie, może być w jakiś sposób „zapamiętywany” przez komórkę i ujawniany dopiero po przejściu cyklu podziałów. Pomimo trudności w określeniu charakteru owej pamięci, propozycja ta wydaje się atrakcyjna również dla interpretacji działania IL-4 i IFN- γ .

3.1.2. LIMFOCYTY POMOCNICZE: POPULACJE Th 1 i Th 2

Populacja limfocytów pomocniczych T jest niejednorodna pod względem cech fizjologicznych [97]. W 1986 r. Mossman, opierając się na zestawie produkowanych limfokin, podzielił populację Th u myszy na dwie grupy [164]. Dla komórek produkujących IL-2, IL-3 i interferon- γ zaproponował nazwę limfocytów pomocniczych pierwszego rodzaju (Th 1). Komórki wydzielające, w miejsce IL-2 i IFN- γ , interleukinę 4 określone zostały jako limfocyty pomocnicze rodzaju drugiego (Th 2) (do produktów tej populacji należy także interleukina 5 [28]). Th 1 i Th 2 wykazują odmienne zapotrzebowanie na czynniki wzrostowe. Limfocyty pomocnicze Th 1 mogą wykorzystywać w tym charakterze interleukinę 2. W grupie Th 2 rolę tę może dodatkowo pełnić interleukina 4 [123, 136], której aktywność jako czynnika wzrostowego limfocytów T już wcześniej była znana [60]. Przeciwność działania IFN- γ IL-4 obserwowana jest także wśród prekursorów limfocytów T. Aktywność IL-4, jako czynnika wzrostowego dla części tymocytów [239],

blokowana jest przez interferon [193]. W organizmie ludzkim nie występuje tak czysty rozdział. Duży procent limfocytów Th mogą wytwarzać IL-4 razem z IL-2 lub z IFN- γ , jednak i tu różnice funkcjonalne w zakresie regulacji izotypowej są wyraźne [138].

Interesujący był wynik porównania częstości występowania komórek każdego typu w grupach limfocytów Th o określonej swoistości. Wśród 200 klonów limfocytów Th swoistych względem obcogatunkowych erytrocytów nie znaleziono ani jednego należącego do populacji Th 2. Należały do niej natomiast wszystkie z badanych klonów, swoistych względem obcogatunkowej gammaglobuliny. Klony, swoście wiążące allogeniczne cząsteczki MHC klasy I, znajdowano w obydwu grupach [164].

Nie znana jest przyczyna dominacji, wśród klonów o danej swoistości, komórek należących do jednej lub drugiej grupy. W badaniach Abraham i Teale [221] zawężenie izotypowe odpowiedzi humoralnej w zakażeniu myszy przez *Mesocestoides corti* nie występowało, gdy do immunizacji używano pasożytów zabitych w sublimacie. Uzyskały wynik można tłumaczyć zmianą konfiguracji białek antygenowych *M. corti* przez użyty sublimat, tak że w każdym z przypadków były one rozpoznawane przez odmienne klony limfocytów pomocniczych. Możliwe jest jednak, iż był on skutkiem wpływu odmiennej od antygeny substancji, wytwarzanej przez organizm pasożyta, na komórki Th, tak że w zależności od warunków towarzyszących zetknięciu z antygenem, w odpowiedzi nań stymulowany był wzrost odmiennych populacji limfocytów pomocniczych wśród komórek o jednakowej swoistości.

Efektywność IL-4 jako czynnika wspomagającego wzrost komórek tucznych, przy doniesieniach o możliwości wytwarzania IL-4 samodzielnie przez te komórki [17], oraz stymulacja produkcji przeciwciał klasy IgE przez IL-4, w zestawieniu z powyższym, naświetla zasadniczą rolę interleukiny 4 i limfocytów Th 2 w zakażeniach organizmami pasożytniczymi zewnątrzkomórkowo. Można spekulować, że limfocyty pomocnicze pierwszego typu byłyby z kolei elementem ukierunkowującym układ odpornościowy na zwalczanie zmian dotyczących wnętrza komórki, jak infekcje wirusowe czy transformacja nowotworowa, przeciwko którym najskuteczniejsze okazują się mechanizmy odporności komórkowej. Znana jest aktywność interleukiny 2 i interferonu w obu przypadkach. Wzmaganie przez IFN- γ produkcji przeciwciał klasy IgG2a, wysoce efektywnej w ADCC [96, 113, 214], byłoby więc jednym z mechanizmów aktywności przeciwwirusowej i przeciwnowotworowej tego związku.

Autorzy różnią się w ocenie stosunku Th 1 do Th 2 w populacji limfocytów pomocniczych. Podawano częstość występowania limfocytów Th 2; od kilku do pięćdziesięciu procent. Jest prawdopodobne, że tak wielka rozbieżność odzwierciedla zmienność profilu populacji Th, w odpowiedzi na warunki

immunizacji, która to zmienność wydaje się konieczna dla sprawnej regulacji struktury izotypowej rozwijanej odpowiedzi humoralnej.

3.1.3. CZYNNIKI WIĄŻĄCE IMMUNOGLOBULINY

Blisko 15 lat temu ukazały się pierwsze prace Friedmana dotyczące wytwarzania przez limfocyty T izotypowo-swoistych czynników wiążących immunoglobuliny (IBF: z ang. immunoglobulin-binding factors) [65]. Substancje te, wytwarzane w odpowiedzi na pojawienie się określonej klasy przeciwciał [42], mogą hamować lub wzmacniać jej produkcję [114]. Do chwili obecnej opisano czynniki wiążące immunoglobuliny swoiste względem IgD [1], IgG [222, przegl. 66], IgA [152, 237] i IgE [przeł. 100]. Działają one bezpośrednio na komórkę B [215, 222], wzmagając lub hamując produkcję przeciwciał określonego izotypu. Uważa się, że IBF są wydzielniczą formą błonowych receptorów dla fragmentu Fc przeciwciał (FcR) [1, 94, 204].

Najszerzej poznany jest udział IBF w regulacji wytwarzania IgE. Opisano występowanie zarówno stymulujących, jak i hamujących czynników wiążących tę klasę immunoglobulin. Oba funkcjonalnie przeciwstawne typy IgE-BF są produktem jednego genu i mogą być wytwarzane przez jedną komórkę [204, 238]. Różnica funkcjonalna jest związana z odmiennym stopniem glikozylacji łańcucha polipeptydowego [238]. Za „przełączanie” limfocytu T dla wytwarzania każdego z nich, odpowiedzialne są czynniki regulujące stopień glikozylacji (GRF: z ang. glycosylation regulating factors); wzmagający GEF (z ang. glycosylation enhancing factor) i hamujący GIF (z ang. glycosylation inhibiting factor), wytwarzane również w obrębie populacji Th [102, 103, 114]. GEF został zidentyfikowany jako proteaza serynowa o cechach kallikreiny [101, 104]. GIF wykazuje antygenowe i funkcjonalne podobieństwo do lipomoduliny [225]. Wytwarzane w nieobecności czynników regulujących stopień glikozylacji IgE-BF nie wpływają na poziom produkcji IgE [103] (podobnie jak formy wewnątrzkomórkowe IgE-BF) [237]. Za ich sprofilowanie funkcjonalne odpowiada równowaga pomiędzy GEF a GIF; być może poprzez modulację aktywności fosfolipazy A₂ [101].

4. MODYFIKACJA SWOISTOŚCI PRZECIWCIAŁ W ROZWOJU ODPOWIEDZI HUMORALNEJ

Antygen, wybierając spośród dojrzałych klonów limfocytów B te, które mogą go rozpoznawać, wstępnie determinuje swoistość rozwijanej odpowiedzi. Okazuje się, że układ odpornościowy może wykorzystywać wzorzec antygenowy również w dalszych okresach rozwoju odpowiedzi dla zwiększenia powinowactwa wytwarzanych przeciwciał i zawężenia ich swoistości. Zjawisko wzrostu stałej wiązania antygen-przeciwciała, zachodzące w miarę trwania immunizacji, określane jest jako dojrzewanie odpowiedzi humoralnej. Współczesny

jego model przyjmuje istnienie dwu związanych z sobą procesów; ciągłego wytwarzania nowych konfiguracji miejsc wiążących (idiotypów) oraz selekcji klonów przydatnych dla układu odpornościowego. Znamy wiele mechanizmów wytwarzania nowych wariantów miejsc wiążących antygen w cząsteczce immunoglobuliny. Większość z nich dotyczy prekursorów limfocytu B. Przykładem jest tu zmienność rekombinacyjna, prowadząca do powstania klonów komórek, o nowych zestawieniach łańcuchów ciężkich i lekkich [przeł. 71].

Zmiany konfiguracji miejsc wiążących immunoglobuliny mogą też zachodzić na poziomie genomów dojrzałych limfocytów B, na drodze mutacji somatostajycznych [6, 41]. Częstość mutacji w obrębie genów VDJ, kodujących część ciężkiego łańcucha immunoglobulinowego odpowiedzialną za wiązanie antygeny, jest znacznie wyższa wśród komórek biorących udział w odpowiedzi na antygen niż w komórkach spoczynkowych. Jej częstotliwość sięga 10^{-3} / na parę zasad/ na pokolenie i jest o dwa rzędy wielkości wyższa niż w komórkach pre-B [31, 147]. Wzrost częstości mutacji somatycznych jest dostrzegany już w późnym okresie odpowiedzi pierwotnej, jednak znaczne przyspieszenie zjawiska obserwuje się w odpowiedzi wtórnej [31, 41]. Na etapie tym pojawiają się także nowe zestawienia V_H-V_L [6, 31, 41, 78]. Nawet pojedyncza zmiana aminokwasu w obszarze odpowiedzialnym za wiązanie antygeny doprowadzić może do zmiany powinowactwa, a nawet zmiany specyficzności przeciwciała [38]. Występowanie mutacji z częstością 10^{-3} na parę zasad na pokolenie daje obraz zmienności dokonującej się w tym mechanizmie.

W obszarze genu V istnieją regiony CDR określające specyficzność przeciwciała (z ang. compatibility determining regions) oraz leżące między nimi regiony szkieletowe FR (z ang. framework regions), odpowiedzialne za wzajemne położenie sekwencji CDR. Obserwowana gęstość mutacji punktowych jest znacznie większa na obszarach CDR niż w otaczających je sekwencjach FR [31, 41, 147]. Można to tłumaczyć istnieniem mechanizmów zwiększających poziom mutacji w tych regionach, lecz jak się wydaje, za zjawisko to może przynajmniej w części odpowiadać pozytywna selekcja komórek, które uzyskały „korzystniejsze” konfiguracje miejsc wiążących. Dodatkowo, istnienie selekcji potwierdza spostrzeżenie, że stosunek mutacji zmieniających kolejność aminokwasów do mutacji niemych (z ang. R/S ratio) jest znacznie wyższy w CDR niż w przyległych regionach FR [31], gdzie R/S zbliża się do oczekiwanego (na podstawie prawdopodobieństwa zajścia mutacji typu R).

W punktach łańcucha immunoglobulinowego szczególnie istotnych dla specyficzności antygenowej opisano w niektórych przypadkach konwergencję wśród nie spokrewnionych klonów. Dotyczyła ona zarówno jednakowych zmian zasad w określonych punktach łańcucha DNA, jak również identycznych podstawień aminokwasowych dokonywanych poprzez odmienne zmiany nukleotydów [41].

Powyższe obserwacje skłaniają do przyjęcia tezy, iż dotycząca przynajmniej części komórek B hiperzmiennność, poprzez pozytywną selekcję, jest wykorzystywana przez układ odpornościowy do podnoszenia specyficzności odpowiedzi humoralnej.

Opierając się na wynikach badań odpowiedzi na 2-fenylookszakolony, Berek i Milstein zaproponowali niedawno [7] interesujący model funkcjonalny układu odpornościowego: wnikający do organizmu czynnik antygenowo obcy napotyka, oprócz mechanizmów niespecyficznej odporności, pulę klonów komórek B, zdolnych do rozpoczęcia produkcji wiążących go przeciwciał. Większość z nich wytwarzałyby przeciwciała o szerokiej specyficzności, wiążące antygeny intruza na równi z szeregiem innych molekuł. Niedogodności wynikające ze słabego powinowactwa narastających odpowiedzi byłyby z nadwyżką kompensowane przez jej wysokie natężenie uzyskiwane w krótkim czasie. W miarę utrzymywania się immunizacji, do głosu dochodziłyby mechanizmy dojrzewania odpowiedzi, zawężające jej specyficzność. Klony raz pobudzone mogłyby następnie być użyte przeciwko innym antygenom, którą to możliwość wykazał Varga [228]. W zgodzie z tą propozycją wydają się doniesienia o występowaniu u zdrowych dawców przeciwciał o wielokrotnej niekiedy krzyżowej reaktywności [50, 185]. Spostrzeżenie, iż w surowicy mysich noworodków (co odpowiadałoby pierwotnemu brakowi czynnika zawężającego specyficzność), ich poziom jest znacząco wyższy niż u nieco starszych zwierząt [51], jest doskonale wytłumaczalne na bazie prezentowanego modelu. Mnogość czynników oddziałujących na limfocyt B, zarówno związanych z antygenem, pochodzących z zewnątrz organizmu, jak i czynników wytwarzanych przez własny układ odpornościowy, odzwierciedla precyzję, z jaką sterowany jest rozwój humoralnej odpowiedzi immunologicznej. Umożliwia ona uzyskanie odpowiedzi w formie najodpowiedniejszej dla każdego przypadku immunizacji, o wysokiej, rosnącej w czasie, swoistości.

LITERATURA

- [1] ADACHI M., ISHIZAKA K., IgD-binding factors from mouse T lymphocytes, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**: 7003–7007, 1986.
- [2] ALDERSON M. R., PIKE B. L., HARADA N., TOMINAGA A., TAKATSU K., NOSSAL G. J. V., Recombinant T cell replacing factor (interleukin 5) acts with antigen to promote the growth and differentiation of single hapten specific B cell, *J. Immunol.*, **139**: 2656–2660, 1987.
- [3] ANDERSSON J., MELCHERS F., T-cell-dependent activation of resting B cells: Requirement of both nonspecific unrestricted and antigen-specific Ia-restricted soluble factors, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**: 2497–2501, 1981.
- [4] STENZEL K. H., Human B lymphoblastoid cell lines provide an interleukin 1-like signal for mitogen-treated T lymphocytes via direct contact, *J. Immunol.*, **134**: 3876–3881, 1985.

- [5] AZUMA M., HIRANO T., MIYAJIMA H., WATANABE N., YAGITA, H., ENOMOTO S., FURUSAWA S., OVARY Z., KINASHI T., HONJO T., OKUMURA K., Regulation of murine IgE production in SJA/9 and nude mice. Potentiation of IgE production by recombinant interleukin 4, *J. Immunol.*, **139**: 2538–2544, 1987.
- [6] BEREK C., GRIFFITHS G. M., MILSTEIN C., Molecular events during maturation of the immune response to oxazolone, *Nature*, **316**: 412–418, 1985.
- [7] BEREK C., MILSTEIN C., Maturation drift and repertoire shift in the maturation of the immune response, *Immunol. Rev.*, **96**: 23–41, 1987.
- [8] BIJSTERBOSH M. K., MEDE J. C., TURNER G. A., KLAUS G. G. B., B lymphocytes receptors and polyphosphoinositide degradation, *Cell*, **41**: 999–1006, 1985.
- [9] BERGSTEDT-LINDQVIST S., MOON H. B., PERSSON U., MOLLER G., HEUSSER C., SEVERINSON E., Interleukin 4 instructs uncommitted B lymphocytes to switch to IgG1 and IgE, *Eur. J. Immunol.*, **18**: 1073–1077, 1988.
- [10] BISHOP B. A., HAUGHTON G., Induced differentiation of a transformed clone of Ly-1⁺ B cells by clonal T cells and antigen, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**: 7410–7414, 1986.
- [11] BOND M. W., SHRADER B., MOSMANN T. R., COFFMANN R. L., A mouse T cell product that enhances IgA production. II. physicochemical characterization, *J. Immunol.*, **139**: 3691–3696, 1987.
- [12] BONNEFOY J. Y., DEFRANCE T., PERONNE C., MENETRIER C., ROUSETT F., PENE J., DEVRIES J. E., BANCHEREAU J., Human recombinant interleukin 4 induces normal B cells to produce soluble CD23/IgE-binding factors, analogous to that spontaneously released by lymphoblastoid B cell line, *Eur. J. Immunol.*, **18**: 117–122, 1988.
- [13] BOOTH R. J., WATSON J. D., Interleukin 1 induces proliferation in two distinct subpopulations responsive to two different murine B cell growth factors, *J. Immunol.*, **133**: 1346–1349, 1985.
- [14] BRADFORD P. G., RUBIN R. P., Guanine nucleotide regulation of phospholipase C activity in permeabilized rabbit neutrophils. Inhibition by pertussis toxin and sensitization to submicromolar calcium concentrations, *Biochem. J.*, **239**: 97–102, 1986.
- [15] BRALEY MULLEN H., Regulatory role of T cells in IgG antibody formation and immune memory to type III pneumococcal polysaccharide, *J. Immunol.*, **113**: 1909–1920, 1974.
- [16] BRAUN J., SHA'AFI R. I., UNANUE E. R., Crosslinking by ligands to surface immunoglobulin triggers mobilization of intracellular 45 Ca in B lymphocytes., *J. Cell. Biol.*, **82**: 755–766, 1975.
- [17] BROWN M. A., PIERCE J. H., WATSON C. J., FALCO J., IHLE J. N., PAUL W. E., B cell stimulatory factor 1 (interleukin 4) mRNA is expressed by normal and transformed mast cells, *Blood*, **70**: 809–818, 1987.
- [18] BRUNSWICK M., LAKE P., Obligatory role of gamma interferon in T cell-dependent, antigen-specific murine B cell responses, *J. Exp. Med.*, **161**: 953–971, 1985.
- [19] BURTON D. R., Structure and function of antibodies, [w:] F. Calabi and M. S. Neuberger: *Molecular genetics of immunoglobulin*; Elsevier 1987.
- [20] CALLARD R. E., SMITH S. H., Interleukin 2 and low molecular weight B cell growth factor are T cell replacing factors for different subpopulations of human B cells, *Eur. J. Immunol.*, **18**: 1635–1638, 1988.
- [21] CAMBIER J. C., JUSTEMENT L. B., NEWELL M. K., CHEN Z. Z., HARRIS L. K., SANDOVAL V. M., KLEMSZ M. J., RANSOM J. T., Transmembrane signals and intracellular „second messengers” in the regulation of quiescent B-lymphocyte activation, *Immunol. Rev.* **95**: 37–57, 1987.
- [22] CAMBIER J. C., MONROE J. G., B cell activation. V. Differentiation signalling of B cell membrane depolarization, increased I-A expression, G0 to G1 transition thymidine uptake by anti IgM and anti IgD antibodies, *J. Immunol.*, **133**: 576–581, 1984.

- [23] CAMBIER J. C., NEWELL M. K., JUSTEMENT L. B., McGUIRE J. C., LEACH K. L., CHEN Z. Z., Ia binding ligands and cAMP stimulate nuclear translocation of PKC in B lymphocytes, *Nature*, **327**: 629–632, 1987.
- [24] CASTEN L. A., LAKEY E. K., JELACHICH M. L., MARGOLIASH E., PIERCE S. K., Anti-immunoglobulin augments the B-cell antigen-presentation function independently of internalization of receptor-antigen complex, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**: 5890–5894, 1985.
- [25] CITRI Y., BRAUN J., BALTIMORE D., Elevated *c-myc* expression and *c-myc* amplification in spontaneously occurring B lymphoid cell line, *J. Exp. Med.*, **165**: 1188–1194, 1987.
- [26] CHEN Z. Z., COGGESHAL K. M., CAMBIER J. C., Translocation of protein kinase C during membrane immunoglobulin-mediated transmembrane signalling in B lymphocytes, *J. Immunol.*, **136**: 2300–2304, 1986.
- [27] CHEN Z. Z., McGUIRE J. C., LEACH K. L., CAMBIER J. C., Transmembrane signalling through B-cell MHC class II molecules: Anti-Ia antibodies induce protein kinase C translocation to the nuclear envelope, *J. Immunol.*, **138**: 2345–2352, 1987.
- [28] CHERWINSKI H. M., SCHUMACHER J. H., BROWN K. D., MOSMANN T. R., Two types of mouse helper T cell clone. III. Further differences in lymphokine synthesis between Th 1 and Th 2 clones revealed by RNA hybridization, functionally monospecific bioassays, and monoclonal antibodies, *J. Exp. Med.*, **166**: 1229–1244, 1987.
- [29] CHESNUT R. W., GREY H. M., Studies on the capacity of B cells to serve as antigen presenting cells, *J. Immunol.*, **126**: 1075–1084, 1981.
- [30] CHIPUNKAR S., LANGHORNE J., KAUFFMAN S. H. E., Regulation of B cell growth and differentiation by murine recombinant IL-1, *J. Immunol.*, **137**: 3748–3752, 1986.
- [31] CLARKE S. H., HUPPI K., RUEZINSKY D., STAUDT L., GERHARD W., WEIGERT M., Inter- and intraclonal diversity in the antibody response to influenza hemagglutinin, *J. Exp. Med.*, **161**: 687–704, 1985.
- [32] CLEMENT L. T., TEDDER T. F., GARTLAND G. L., Antibodies reactive with class II antigens encoded for by the major histocompatibility complex inhibit human B cell activation, *J. Immunol.*, **136**: 2375–2381, 1986.
- [33] COFFMAN R. L., OHARA J., BOND M. W., CARTY J., ZLOTNIK A., PAUL W. E., B cell stimulatory factor-1 enhances the IgE response of lipopolysaccharide-activated B cells, *J. Immunol.*, **136**: 4538–4541, 1986.
- [34] COFFMAN R., CARTY J., A T cell activity that enhances polyclonal IgE production, and its inhibition by interferon γ , *J. Immunol.*, **136**: 949–954, 1986.
- [35] COFFMAN R. L., SHRADER B., CARTY J., MOSMANN T. R., BOND M. W., A mouse T cell product that preferentially enhances IgA production. I. Biologic characterization, *J. Immunol.*, **149**: 3685–3690, 1987.
- [36] COGGESHALL K. M., CAMBIER J. C., B cell activation. VIII. Membrane immunoglobulins transduce signals via activation of phosphatidylinositols hydrolysis, *J. Immunol.*, **133**: 3382–3386, 1984.
- [37] CONTENT J., DE WIT L., POUPART T., OPDENAKKER G., VAN DAMME J., BILLIAU A., Induction of a 26-kDa-protein mRNA in human cells treated with an interleukin-1-related leukocyte derived factor, *Eur. J. Biochem.*, **152**: 253–257, 1985.
- [38] COOK W. D., RUDIKOFF S., GIUSTI A. M., SCHARF M. D., Somatic mutation in a cultured mouse myeloma cells affects antigen binding, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**: 1240–1244, 1982.
- [39] CORLEY R. B., LOCASCIO N. J., OVNIC M., HAUGHTON G., Two separate functions of class II (Ia) molecules: T-cell stimulation and B-cell excitation, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82**: 516–520, 1985.
- [40] CRAWFORD R. M., FINBLOOM D. S., OHARA J., PAUL W. E., MELTZER H. S., B cell

- stimulatory factor 1 (interleukin 4) activates macrophages for increased tumoricidal activity and expression of Ia antigens, *J. Immunol.*, **139**: 135–141, 1987.
- [41] CUMANO A., RAJEWSKY K., Clonal recruitment and somatic mutation in the generation of immunological memory to the hapten NP, *EMBO J.*, **5**: 2459–2468, 1986.
- [42] DAERON M., NEAUPORT-SAUTEZ C., YODOI J., MONCUIT J., FRIDMAN W. H., Receptors for immunoglobulin isotypes (FcR) on murine T cells. II. Multiple FcR induction on hybridoma T cell clones, *Eur. J. Immunol.*, **15**: 668–674, 1985.
- [43] DAVIE J. M., PAUL W. E., Role of T lymphocytes in the humoral immune response. I. Proliferation of B lymphocytes in thymus-deprived mice, *J. Immunol.*, **113**: 1438–1445, 1974.
- [44] DEFRANCE T., AUBRY J. P., VANDERVLIT B., BONCHEREAU T., Human Interferon γ acts as B cell growth factor in the anti-IgM antibody costimulation assay but has no direct B cell differentiation activity, *J. Immunol.*, **137**: 3861–3867, 1986.
- [45] DEFRANCO A. L., RAVECHE E. S., PAUL W. E., Separate control of B lymphocyte early activation and proliferation in response to anti-IgM antibodies, *J. Immunol.*, **135**: 87–94, 1985.
- [46] DEL GUERCIO P., POIRER M-F., BRUGERE S., Regulatory function of Thy-1 negative cells. II. Spontaneous release of enhancing product by B cells cultured „in vitro”, *Cell. Immunol.*, **72**: 316–325, 1982.
- [47] DEL GUERCIO P., DEL GUERCIO M-F., FRIDMAN W. H., KATZ D. H., Inhibitory activity of interleukin B on the suppressor T cell hybrid T2D4, *J. Immunol.*, **138**: 3295–3299, 1987.
- [48] DEL GUERCIO P., ZANETTI M., DEL GUERCIO M. F., KATZ D. M., B lymphocyte regulation of the immune system. II. Inhibition of Fc receptor expression of lymphocytes by BEF, a lymphokine of B cell origin, *J. Immunol.*, **134**: 3926–3933, 1985.
- [49] DELOVITCH T. L., WATSON J., BATISTELLA R., HARRIS J. F., SHAW J., PEATKEAU V., In vitro analysis of allogeneic lymphocyte interaction. V. Identification and characterisation of two components of allogeneic effect factor, one of which displays H-2 restricted helper activity and the other B cell growth factor activity, *J. Exp. Med.* **153**: 107–128, 1981.
- [50] DIGHIRO G., LYMBERI P., GUILBERT B., TERNYNCK T., AVRAMEAS S., Natural autoantibodies constitute a substantial part of circulating immunoglobulins, *Annals of the New York Academy of Sciences*, **475**: 135–145, 1986.
- [51] DIGHIER G., LYMBERI P., HOLMBERG D., LUNDQUIST A., COUTINHO A., AVRAMEAS S., High frequency of natural autoantibodies in normal newborn mice, *J. Immunol.*, **134**: 765–771, 1985.
- [52] DIU A., GOUGEON M-L., MOREAU J-L., REINHERTZ E. L., THEZE J., Activation of resting human B cells by helper T-cell supernatant. Characterization of a human B cell activating factor, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**: 9140–9144, 1987.
- [53] DUBOIS P., STEIN P., ENNIST D., GREENBLATT D., MOSMANN T., HOWARD M., Requirement for BSF 1 in the induction of antigen-specific B cell proliferation by a thymus dependent antigen and carrier-reactive T cell line, *J. Immunol.*, **139**: 1927–1924, 1987.
- [54] ENOHKARA H., NAGASHIMA S., NOMA T., KAJITANI H., HAMAGUCHI H., SAITO K., FURUSAWA S., SHISHIDO H., HONJO T., Effect of human recombinant interleukin 5 and G-CSF on eosinophil colony formation, *Immunol. Lett.*, **18**: 73–76, 1988.
- [55] ERDEI A., MELCHERS F., SCHULZ T., DIERICH M., The action of human C3 in soluble or cross-linked form with resting and activated murine B lymphocytes, *Eur. J. Immunol.*, **15**: 184–188, 1985.
- [56] FALKOFF R. J. M., MURAGUCHI A., HONG J-X., BUTLER J. L., DINARELLO

- C. A., FAUCI A. S., The effects of interleukin 1 on human B cell activation and proliferation, *J. Immunol.*, **131**: 801–805, 1983.
- [57] FELDMANN M., BASTEN A., Cell interactions in the immune response in vitro. III. Specific collaboration across a cell impermeable membrane, *J. Exp. Med.*, **136**: 49–67, 1972.
- [58] FELDMANN M., BASTEN A., Cell interactions in the immune response in vivo. IV. Comparison of the effects of antigen-specific and allogeneic thymus-derived cell factors, *J. Exp. Med.*, **136**: 722–736, 1972.
- [59] FELDMANN M., Cell interactions in the immune response in vitro. V. specific collaboration via complex of antigen and thymus-derived immunoglobulin, *J. Exp. Med.*, **136**: 737–760, 1972.
- [60] FERNANDEZ-BOTRAN R., SANDERS V. M., OLIVER K. G., CHEN Y., KRAMMER P. H., UHR J. W., VITETTA E. S., Interleukin 4 mediates autocrine growth of helper T cells after antigenic stimulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**: 9689–9693, 1983.
- [61] FINKELMAN F. D., KATONA I. M., MOSMANN T. R., COFFMAN R. L., IFN γ regulates the isotypes of Ig secreted during in vivo humoral responses, *J. Immunol.*, **140**: 1022–1027, 1988.
- [62] FINKELMANN F. D., KATONA I. M., URBAN J. F., SNAPPER C. M., OHARA J., PAUL W. E., Suppression of in vivo polyclonal IgE responses by monoclonal antibody to the lymphokine B-cell stimulatory factor 1, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**: 9675–9678, 1986.
- [63] FORSGREN S., POBOR G., COUTINHO A., PIERRES M., Their role of I-A/E molecules in B lymphocyte activation 1. inhibition of lipopolisaccharide-induced responses by monoclonal antibodies, *J. Immunol.*, **133**: 2104–2110, 1984.
- [64] FOTEDAR R., SEVERINI A., HOLOWACHUK E. W., SHIOZAWA C. S., PATKEAU W., KAPLAN J. G., DIENER E., Activation of ion transport in B cells without induction of DNA synthesis or immunoglobulin gene transcription, *J. Immunol.*, **136**: 562–568, 1986.
- [65] FRIDMAN W. H., GOLSTEIN P., Immunoglobulin binding factors present on and produced by thymus-processed lymphocytes (T cells), *J. Immunol.*, **111**: 442–445, 1974.
- [66] FRIDMAN W. H., TEILLAUD J. L., AMIGORENA S., DEARON M., BLANK U., NEAUPORT-SAUTES C., The isotypic circuit: immunoglobulins, Fc receptors and immunoglobulin binding factors, *Int. Rev. Immunol.*, **2**: 221–240, 1987.
- [67] FUJIMOTO J., LEVY S., LEVY R., Spontaneous release of the Leu-2 (T8) molecule from human T cells *J. Exp. Med.*, **158**: 752–766, 1983.
- [68] GANONG B. R., LOOMIS C. R., HANNUN Y. A., BELL R. M., Specificity and mechanism of protein kinase C activation by *sn*-1,2, diacylglycerols, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**: 1184–1188, 1986.
- [69] GARMAN R. D., JACOBS K. A., CLARK S. C., RAULET D. M., B-cell stimulatory factor 2 (β_2 -interferon) functions as a second signal for interleukin 2 production by mature murine T cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**: 7629–7633, 1987.
- [70] GERRARD T. L., VOLKMAN D. J., IL-1-like activity in antigenpresenting human B-cell lines, *J. Immunol.*, **135**: 3217–3223, 1985.
- [71] GNIADECKI R., Molekularne podstawy syntezy immunoglobulin oraz receptora limfocytów T, *Post. Biol. Kom.*, (w druku).
- [72] GOLD M. R., JAKWAY J. P., DEFRANCO A., Involvement of a guanine nucleotide-binding component in membrane IgM-stimulated phosphoinositide breakdown, *J. Immunol.*, **139**: 3604–3613, 1987.
- [73] GORDON J., LEY S. C., MELAMED M. D., ENGLISH S. L., HUGHESJONES N. C., Immortalized B lymphocytes produce B-cell growth factor, *Nature*, **310**: 145–147, 1984.
- [74] GOROFF D. K., STALL A., MOND J. J., FINKELMAN F. D., In vitro and in vivo B lymphocyte-activating properties of monoclonal anti- δ antibodies. I. Determinants of B lymphocyte-activating properties, *J. Immunol.*, **136**: 2382–2392, 1986.

- [75] GRABSTEIN K., EISENMAN J., MOCHIZUKI D., SHANEBECK K., CONLON P., HOPP T., MARCH C., GILLIS S., Purification to homogeneity of B cell stimulating factor. A molecule that stimulates proliferation of multiple lymphokine-dependent cell lines, *J. Exp. Med.*, **163**: 1405-1414, 1986.
- [76] GRESSER I., DE MAEYER-GUIGNARD J., DE MAEYER E., Electrophoretically pure mouse interferon exerts multiple biological effects, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**: 5308-6312, 1979.
- [77] GREY H. M., CHESNUT R., Antigen processing and presentation to T cells, *Immunol. Today*, **6**: 101-106, 1985.
- [78] GRIFFITHS G. M., BEREK C., MILSTEIN C., Somatic mutation and the maturation of immune response to 2-phenyl oxazolone, *Nature*, **312**: 271-275, 1984.
- [79] GURNEY M. E., APATOFF B. B., SPEAR G. T., BAUMEL M-J., ANTEL J. P., BROWN-BANIA M., REDER A. T., Neuroleukin: A lymphokine product of lectin-stimulated T cells, *Science*, **234**: 574-581, 1986.
- [80] HAEGEMAN G., CONTENT J., VOLCHAERT G., DERYNCK R., TAVERNIER J., FIERS W., Structural analysis of the sequence coding for an inducible 26-kDa protein in human fibroblasts, *Eur. J. Biochem.*, **159**: 625-632, 1986.
- [81] HAMAGUCHI Y., KANAKURA Y., FUJITA J., TAKEDA S., NAHANO T., TARUI S., HONJO T., KITAMURA Y., Interleukin 4 is an essential factor for in vitro clonal growth of murine connective tissue-type mast cells, *J. Exp. Med.*, **165**: 268-273, 1987.
- [82] HANNUN Y. A., LOOMIS C. R., BELL R. M., Activation of protein kinase C by triton X-100 mixed micelles containing diacylglycerol and phosphatidylserine, *J. Biol. Chem.*, **260**: 10049-10043, 1985.
- [83] HARADA N., MATSUMOTO N., KOYAMA N., SHIMIZU A., HONJO T., TOMINAGA A., TAKATSU K., T cell replacing factor (interleukin 5) induces not only B-cell growth and differentiation of but also increases expression of interleukin 2 receptor on activated B cells, *Immunol. Lett.*, **15**: 205-215, 1987.
- [84] HARRIS L. K., CAMBIER J. C., B lymphocyte activation. Transmembrane signal transduction by membrane immunoglobulin in isolated cell membranes, *J. Immunol.*, **139**: 963-970, 1987.
- [85] HIRANO T., KUMAGAI Y., OKUMURA K., OVARY Z., Regulation of murine IgE production. Importance of not-yet-described T cell for IgE secretion demonstrated in SJA9 mice, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **80**: 3435-3438, 1983.
- [86] HIRANO T., TAGA T., NAKANO N., YOSUKAWA K., KASHIWAMURA S., SHIMIZU K., NAKAJIMA K., PYUN K. M., KISHIMOTO T., Purification to homogeneity and characterization of human B-cell differentiation factor (BCDF or BSFp-2), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82**: 5490-5494, 1985.
- [87] HIRANO T., TERANISHI T., LIN B., ONOUE K., Human helper T cell factor(s). IV. Demonstration of a human late-acting B-cell differentiation factor acting on *Staphylococcus aureus* Cowan I-stimulated B cells, *J. Immunol.*, **133**: 798-801, 1984.
- [88] HIRANO T., YASUKAWA K., HARADA M., TAGA T., WATANABE Y., MATSUDA T., KASHIWAMURA S., NAKAJIMA K., KOJAMA K., IWAMATSU A., TSUNASAWA S., SAKIJAMA F., MATSUI H., TAKAKURA Y., TANIGUCHI T., KISHIMOYO T., Complementary DNA for a novel human interleukin (BSF 2) that induces B lymphocytes to produce immunoglobulin, *Nature*, **324**: 73-76, 1986.
- [89] HOLTE H., TORJESEN P., BLOMHOFF H. K., RUUD E., FUNDERUD S., SMELAND E. B., Cyclic AMP has the ability to influence multiple events during B cell stimulation, *Eur. J. Immunol.*, **18**: 1351-1357, 1988.
- [90] HOUSSIAU F. A., COULIE P. G., OLIVE P., VAN SNICK J., Synergistic activation of human T cells by interleukin 1 and interleukin 6, *Eur. J. Immunol.*, **18**: 653-656, 1988.

- [91] HOWARD M., FARRAR J., HILFLIKER M., JOHNSON B., TAKATSU K., HAMAO-KA T., PAUL W. E., Identification of a T-cell-derived B cell growth factor distinct from interleukin 2, *J. Exp. Med.*, **155**: 914-923, 1982.
- [92] HOWARD M., MIZEL S. B., LACHMAN L., ANSEL J., JOHNSON D., PAUL W. E., Role of interleukin 1 in an anti-immunoglobulin induced B cell proliferation, *J. Exp. Med.*, **157**: 1529-1543, 1983.
- [93] HUDAK S. A., GOLLNICK S. O., CONRAD D. M., KEHRY M. R., Murine B cell stimulatory factor 1 (Interleukin 4) increases expression of the Fc receptor for IgE on mouse B cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**: 4606-4610, 1987.
- [94] HUFF T. F., YODOI J., UEDE T., ISHIZAKA K., Presence of antigenic determinant common to rat IgE potentiating factor, IgE suppressive factor and Fc_ε receptors on T and B lymphocytes, *J. Immunol.*, **132**: 406-412, 1984.
- [95] IKEBUCHI K., WONG G. G., CLARK S. C., IHLE J. N., HIRAI Y., OGAWA M., Interleukin 6 enhancement of interleukin 3-dependent proliferation of multipotential hemopoietic progenitors, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**: 9035-9039, 1987.
- [96] IMAI K., PELLEGRINO M. A., WILSON B. S., FERRONE S., Higher cytolytic efficiency of IgG 2a than of IgG 1 monoclonal antibody reacting with a spatially close determinant on a human high-molecular weight melanoma-associated antigen, *Cell. Immunol.*, **72**: 239-247, 1982.
- [97] IMPERIALE M. J., FAHERTY D. A., SPROVIERO J. F., ZAUDERER M., Functionally distinct helper T cells enriched under different culture conditions cooperate with different B cells, *J. Immunol.*, **129**: 1843-1848, 1982.
- [98] INABA K., STEINMAN R. H., Resting and sensitized T lymphocytes exhibit distinct stimulatory (antigen presenting cell) requirements for growth and lymphokine release, *J. Exp. Med.*, **160**: 1717-1735, 1984.
- [99] ISACKSON P. C., PURE E., VITETTA E. S., KRAMMER P. M., T_H cell-derived B cell differentiation factor(s). Effect on the isotype switch of murine B cells, *J. Exp. Med.*, **155**: 734-748, 1982.
- [100] ISHIZAKA K., Regulation of IgE synthesis, *Ann. Rev. Immunol.*, **2**: 159-182, 1984.
- [101] IWATA M., AKASAKI M., ISHIZAKA K., Modulation of the activity of IgE-binding factors. VI. The activation of phospholipase by glycosylation-enhancing factor, *J. Immunol.*, **133**: 1505-1512, 1984.
- [102] IWATA M., HUFF T.F., ISHIZAKA K., Modulation of the biological activity of IgE-binding factors. V. The role of glycosylation enhancing-factor and glycosylation-inhibiting factor in determining the nature of IgE-binding factors, *J. Immunol.*, **132**: 1286-1293, 1984.
- [103] IWATA M., HUFF T., UEDE T., MUNOZ J. J., ISHIZAKA K., Modulation of the biologic activities of IgE-binding factor. II. Physicochemical properties and cell sources of glycosylation-enhancing factor, *J. Immunol.*, **130**: 1802-1808, 1983.
- [104] IWATA M., MUNOZ J. J., ISHIZAKA K., Modulation of the biological activity of IgE-binding factors. IV. Identification of glycosylation-enhancing factor as a kallikreinlike enzyme, *J. Immunol.*, **131**: 1954-1961, 1983.
- [105] JANDL R. C., FLANAGAN R. G., SCHUR P. H., Interleukin-1 stimulation of human B-lymphoblast differentiation, *Clin. Immunol. Immunopathol.*, **46**: 115-121, 1988.
- [106] JARDIEU P., UEDE T., ISHIZAKA K., Presence of an antigenspecific T cell subset that forms IgE suppressive factor and IgD suppressive factor on antigenic stimulation, *J. Immunol.*, **135**: 922-927, 1985.
- [107] JURGENSEN C. H., AMBRUS JR. J. L., FAUCI A. S., Production of B cell growth factor by normal human B cells, *J. Immunol.*, **136**: 4542-4547, 1986.
- [108] JUSTEMENT L., CHEN Z., HARRIS L., RANSOM J., SANDOVAL V., SMITH C., RENNICK D., ROEHM N., CAMBIER J., BSF 1 induces membrane protein phosphoryla-

- tion but not phosphoinositide metabolism, Ca^{2+} mobilization, protein kinase C translocation, or membrane depolarization in resting murine B lymphocytes, *J. Immunol.*, **137**: 3664–3670, 1986.
- [109] KAKIUCHI, T., CHESNUT R. W., GREY. B cell as antigen-presenting cells: The requirement for B cell activation, *J. Immunol.*, **131**: 109–114, 1983.
- [110] KAWANO M., MATSUSHIMA K., MASUDA A., OPPENHEIM J. J., A major 50 kDa human B-cell growth factor II induces both Tac antigen expression and proliferation by several types of lymphocytes, *Cell. Immunol.*, **111**: 273–286, 1988.
- [111] KIKUTANI H., TAGA T., AKIRA S., KISHI H., MIKI Y., SAIKI O., YAMAMURA Y., KISHIMOTO T., Effect of B cell differentiation factor (BCDF) on biosynthesis and secretion of immunoglobulin molecules, *J. Immunol.*, **134**: 990–995, 1985.
- [112] KINASHI T., HARADA N., SEVERINSON E., TANABE T., SIDERAS P., KONISHI M., AZUMA C., TOMINAGA A., BERGSTEDT-LINDQUIST S., TAKAHASHI M., MATSUDA F., YAOITA Y., TAKATSU K., HONJO T., Cloning of complementary cDNA encoding T-cell replacing factor and identity with B cell growth factor II, *Nature*, **324**: 70–73, 1986.
- [113] KIPPS T. J., PARHAM P., PUNT J., HERZENBERG L. A., Importance of immunoglobulin isotype in human antibody-dependent, cell-mediated cytotoxicity directed by murine monoclonal antibodies, *J. Exp. Med.*, **161**: 1–17, 1985.
- [114] KISAKI T., LEUNG D. Y. M., JARDIEU P., GEHA R. S., ISHIZAKA K., Regulatory effects of human IgE-binding factors in the IgE synthesis by human and rat lymphocytes, *Eur. J. Immunol.*, **18**: 1663–1670, 1988.
- [115] KISHIMOTO A., TAKAI Y., KIKKAWA 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.
- [116] KLAUS G. G. B., O'GARRA A., BIJSTERBOCCH M. K., HOLMAN M., Activation and proliferation signals in mouse B cells. VII. Induction of DNA synthesis in B cells by a combination of calcium ionophores and phorbol myristate acetate, *Eur. J. Immunol.*, **16**: 92–97, 1986.
- [117] KOJIMA S., KAMIJO T., OVARY Z., Nonspecific enhancement of mouse antihapten antibody response: involvement of a T-cell subpopulation and its product for the proliferation, *Cell. Immunol.*, **50**: 327–339, 1980.
- [118] KOJIMA S., OVARY Z., Effect of *Nippostrongylus brasiliensis* on anti-hapten IgE antibody response in the mouse. I. Induction of carrier-specific helper cells, *Cell. Immunol.*, **15**: 274–286, 1975.
- [119] KOJIMA S., OVARY Z., Mechanism of potentiation of the IgE antibody response to a heterologous hapten-carrier conjugates, *Cell. Immunol.*, **15**: 274–286, 1975.
- [120] KRAFT A. S., ANDERSON W. B., Phorbol esters increase the amount of Ca^{2+} phospholipid-dependent protein kinase associated with plasma membrane, *Nature*, **301**: 621–623, 1983.
- [121] KRIEGER J. I., GRAMMER S. F., GREY H. M., CHESNUT R. W., Antigen presentation by splenic B cells: Resting B cells are ineffective, whereas activated B cells are effective accessory cells for T cell responses, *J. Immunol.*, **135**: 2937–2945, 1985.
- [122] KROWKA J. P., GUIDOS C., SINHA A., LEE K., DIENER E., PILARSKI L. M., Cooperative functional analysis of helper T lymphocyte responses to soluble and particulate antigens, *J. Immunol.*, **138**: 3114–3119, 1987.
- [123] KURT-JONES E. A., HAMBERG S., OHARA J., PAUL W. E., ABBAS A. K., Heterogeneity of helper/inducer T lymphocytes. I. Lymphokine production and lymphokine responsiveness, *J. Exp. Med.*, **166**: 1774–1787, 1987.
- [124] LABAER J., TSIEN R. Y., FAHEY K. A., DEFRANCO A. L., Stimulation of the antigen

- receptor on WEHI-231 B lymphoma cells results in a voltage-independent increase in cytoplasmic calcium, *J. Immunol.*, **137**: 1836-1844, 1986.
- [125] LACY J., SARKAR S. N., SUMMERS W. C., Induction of c-myc expression in human B lymphocytes by B-cell growth factor and anti-immunoglobulin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**: 1458-1462, 1986.
- [126] LANTZ O., GRILLOT-COURVALIN C., SCHMITT C., FERNAND J., BROUET J., Interleukin 2-induced proliferation of leukemia human B cells, *J. Exp. Med.*, **161**: 1225-1230, 1985.
- [127] LANZAVECCHIA A., Antigen-specific interaction between T and B cells, *Nature*, **314**: 537-539, 1985.
- [128] LARSSON E.-L., COUTINHO A., On the role of I-A antigens in lectin- and antigen-induced interleukin 2 production, *Eur. J. Immunol.*, **14**: 431-435, 1984.
- [129] LE THI BICH-THUY, FAUCI A. S., Direct effect of interleukin 2 on the differentiation of human B cells which have not been preactivated in vitro, *Eur. J. Immunol.*, **15**: 1075-1079, 1985.
- [130] LEBRUN P., SPIELBERG H. L., Concomitant immunoglobulin E and immunoglobulin G1 formation in *Nippostrongylus brasiliensis*-infected mice, *J. Immunol.*, **139**: 1459-1465, 1987.
- [131] LECLERCQ L., CAMBIER J. C., MISHAL Z., JULIUS M. H., THEZE J., Supernatant from a cloned helper T cell stimulates most small resting B cells to undergo I-A expression, blastogenesis, and progression through cell cycle, *J. Immunol.*, **136**: 539-545, 1986.
- [132] LECLERCQ L., BISMUTH G., THEZE J., Antigen-specific helper T-cell clone supernatant is sufficient to induce both polyclonal proliferation and differentiation of small resting B lymphocytes, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**: 6491-6495, 1984.
- [133] LEE F., YOKOTA T., OTSUKA T., MEYERSON P., VILLARET D., COFFMAN R., MOSMANN T., RENNICK D., ROEHM N., SMITH C., ZLOTNIK A., ARAI K., Isolation and characterization of a mouse interleukin cDNA clone that expresses B-cell stimulatory factor 1 activities and T-cell- and mast-cell-stimulating activities, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**: 2061-2065, 1986.
- [134] LEIBSON H. J., GEFFER M., ZLOTNIK A., MARRACK P., KUPPLER J. W., Role of γ -interferon in antibody-producing responses, *Nature*, **309**: 799-801, 1984.
- [135] LIANO D., ABBAS A. K., Antigen presentation by hapten-specific B lymphocytes. V. Requirements for activation of antigen-presenting B cells, *J. Immunol.*, **139**: 2562-2566, 1987.
- [136] LICHTMAN A. W., KURT-JONES E. A., ABBAS A. K., B-cell stimulatory factor 1 and not interleukin 2 is the autocrine growth factor for some helper T lymphocytes, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**: 824-827, 1987.
- [137] LOUGHAN M. S., TAKATSU K., HARADA N., NOSSAL G. J. V., T-cell replacing factor (interleukin 5) induces expression of interleukin 2 receptors on murine splenic B cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**: 5399-5403, 1987.
- [138] MAGGI E., DEL'PRETE G., MACCHIA D., PARRONCHI P., TIRI A., CHRETIEN I., RICCI M., ROMAGNANI S., Profiles of lymphokine activities and helper function for IgE in human T cell clones, *Eur. J. Immunol.*, **18**: 1045-1050, 1988.
- [139] MAINO V. C., HAYMAN M. J., CRUMPTON M. J., Relationship between enhanced turnover of phosphatidylinositol and lymphocyte activation by mitogen, *Biochem. J.*, **146**: 247-252, 1975.
- [140] MARCU K., MELCHERS F., MORSE H. C., POTTER M., Mechanisms in B-cell neoplasia, *Immunol. Today*, **7**: 249-253, 1986.
- [141] MATSUMOTO M., TOMINAGA A., HARADA N., TAKATSU K., Role of T cell-replacing factor (TRF) in the murine B cell differentiation: induction of increased levels of expression of secreted type IgM mRNA, *J. Immunol.*, **138**: 1826-1833, 1987.

- [142] MATSUSHIMA K., AKANOSHI T., YAMADA M., FURUTANI Y., OPPENHEIM J. J., Properties of a specific interleukin 1 (IL-1) receptors on human Epstein-Barr Virus-transformed B lymphocytes: identity of the receptor for IL-1 α and IL-1 β , *J. Immunol.*, **136**: 4496-4502, 1986.
- [143] MATSUSHIMA K., PROCOPIO A., ABE H., SCALA G., ORTALDO J. R., OPPENHEIM J. J., Production of interleukin 1 activity by normal human peripheral blood B lymphocytes, *J. Immunol.*, **135**: 1132-1136, 1985.
- [144] MATSUSHIMA K., TOSATO G., BENJAMIN D., OPPENHEIM J. J., B-cell-Derived interleukin 1-like Factor. II. Sources, effects, and biochemical properties, *Cell. Immunol.*, **94**: 418-426, 1985.
- [145] MAY JR. W. S., SAHYOUN N., WOLF M., CUATRECASAS P., Role of intracellular calcium mobilization in the regulation of protein kinase C-mediated membrane processes, *Nature*, **317**: 549-551, 1985.
- [146] MAYER L., POSNET D. N., KUNKEL H. G., Human malignant T cells capable of inducing an immunoglobulin class switch, *J. Exp. Med.*, **161**: 134-144, 1985.
- [147] MCKEAN D., HUPPI K., BELL M., STAUDT L., GERHARD W., WEIGERT M., Generation of the antibody diversity in immune response of BALB/c mice to influenza virus hemagglutinin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**: 3180-3184, 1981.
- [148] MCKORMACK J. E., PEPE V. H., KENT R. B., DEAN M., MARSHAKROTHSTEIN A., SONENSHEIN G. E., Specific regulation of c-myc oncogene expression in a murine B-cell lymphoma, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**: 5546-5550, 1984.
- [149] MEHTA S. R., CONRAD D., SANDLER R., MORGEN J., MONTAGNA R., MAIZEL A. L., Purification of human B cell growth factor, *J. Immunol.*, **135**: 3298-3302, 1985.
- [150] MELCHERS F., ANDERSSON J., LENHARDT W., SCHREIER M. H., H-2 unrestricted polyclonal maturation without proliferation of small B cells induced by antigen-activated T cell help factor, *Eur. J. Immunol.*, **10**: 679-685, 1980.
- [151] MELCHERS F., ERDEI A., SCHULZ T., DIERICH M. P., Growth control of activated, synchronized murine B cells by the C3d fragment of human complement, *Nature*, **317**: 264-267, 1985.
- [152] MILLET I., SAMARUT C., REVILLARD J. P., Class-specific suppression of human B cell maturation by IgA-binding factors, *Eur. J. Immunol.*, **18**: 545-550, 1988.
- [153] MINGARI M. C., GEROSA F., MORETTA A., ZUBLER R. H., MORETTA L., B cell growth factor activity of immunoaffinity-purified and recombinant interleukin 2, *Eur. J. Immunol.*, **15**: 193-196, 1985.
- [154] MIZUGUCHI J., BEAVEN M. H., OHARA J., PAUL W. E., BSF1 action on resting B-cells does not require elevation of inositol phospholipid metabolism or increased Ca²⁺, *J. Immunol.*, **137**: 2215-2219, 1986.
- [155] MOLLER G., T cell dependent and independent B cell activation, *Immunol. Rev.*, **99**, 1987.
- [156] MOND J. J., CARMAN J., SARMA C., OHARA J., FINKELMAN F. D., Interferon- γ suppresses B cell stimulatory factor (BSF-1) induction of class II MHC determinants on B cells, *J. Immunol.*, **137**: 3534-3537, 1986.
- [157] MOND J. J., FEUERSTEIN N., FINKELMAN F. D., HUANG F., HUANG K-P., DENNIS G., B lymphocyte activation mediated by anti-immunoglobulin antibody in the absence of protein kinase C, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**: 8588-8592, 1987.
- [158] MOND J. J., FINKELMAN F. D., SARMA C., OHARA J., SERRATE S., Recombinant interferon γ inhibits the B cell proliferative response stimulated by soluble but not by sepharose-bound anti-immunoglobulin antibody, *J. Immunol.*, **135**: 2513-2517, 1985.
- [159] MOND J. J., SEGHAL E., KUNZ J., FINKELMAN F. D., Increased expression of I-region-associated antigen (ia) on B cells after cross-linking of surface immunoglobulin, *J. Immunol.*, **127**: 881-888, 1981.

- [160] MONROE J. G., CAMBIER J. C., B cell activation. I. Anti-immunoglobulin-induced receptor cross-linking results in a decreased membrane potential of murine B lymphocytes, *J. Exp. Med.*, **157**: 2073–2086, 1983.
- [161] MONROE J. G., HAVRAN W. L., CAMBIER J. C., B lymphocyte activation: entry into cell cycle is accompanied by decreased expression of IgD but not IgM, *Eur. J. Immunol.*, **13**: 208–213, 1983.
- [162] MORIKAWA K., KUBAGAWA H., SUZUKI T., COOPER M. D., Recombinant interferon α , σ and γ enhance the proliferative response of human B cells, *J. Immunol.*, **139**: 761–766, 1987.
- [163] MOSMANN T. R., BOND M. W., COFFMAN R. L., OHARA J., PAUL W. E., T-cell and mast cell lines respond to B-cell stimulatory factor 1, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**: 5654–5658, 1986.
- [164] MOSMANN T. R., CHERWINSKI H., BOND M. W., GIEDLIN M. A., COFFMAN R. L., Two types of murine helper T cell clones. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins, *J. Immunol.*, **136**: 2348–2357, 1986.
- [165] MURAGUCHI A., KEHRL J. H., BUTLER J. L., FAUCI A. S., Sequential effects for cell cycle progression of resting human B cells after activation by anti-Ig, *J. Immunol.*, **132**: 176–180, 1984.
- [166] MURAGUCHI A., KEHRL J. H., LONGO D. L., VOLKMAN P.-J., SMITH K. H., FAUCI A. S., Interleukin 2 receptors on human B cells. Implications for the role of interleukin 2 in human B cell function, *J. Exp. Med.*, **161**: 181–197, 1985.
- [167] MURRAY P. D., MCKENZIE D. T., SWAIN S. L., KAGNOFF M. F., Interleukin 5 and 4 produced by Peyer's patch T cells selectively enhance immunoglobulin A expression, *J. Immunol.*, **139**: 2669–2674, 1987.
- [168] NAKAMURA M., MAUSER T., PEARSON G. D. R., DALEY M. J., GETTER M. L., Effect of IFN γ on the immune response in vivo and on gene expression in vitro, *Nature*, **302**: 381–382, 1984.
- [169] NAKANISHI K., MALEK T. R., SMITH K. A., HAMAOKA T., SHEWACH E. M., PAUL W. E., Both interleukin 2 and a second T-cell-derived factor in EL-4 supernatant have activity as differentiation factors in IgM synthesis, *J. Exp. Med.*, **160**: 1605–1621, 1984.
- [170] NEL A. E., NAVAILLES M., ROSBERGER D. F., LANDRETH G. E., GOLDSCHMIDT-CLERMONT P. J., BALDWIN G. J., GALBRAITH R. M., Phorbol ester induces tyrosine phosphorylation in normal and abnormal human B lymphocytes, *J. Immunol.*, **135**: 3448–3453, 1985.
- [171] A. E., WOOTEN M. W., LANDRETH G. E., GOLDSCHMIDT-CLERMONT P. J., STEVENSON H. C., MILLER P. G., GALBRAITH R. M., Translocation of phospholipid/ Ca^{++} -dependent protein kinase in B lymphocytes activated by phorbol ester or crosslinking of membrane immunoglobulins, *Biochem. J.*, **233**: 145–149, 1986.
- [172] NIEDEL J. F., KUHN L. J., VANDENBARK G. R., Phorbol esters copurifies with protein kinase C, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **80**: 36–40, 1983.
- [173] NOELLE R., KRAMMER P. H., OHARA J., UHR J. W., VITETTA E. S., Increased expression of Ia antigens on resting B cells: an additional role for B-cell growth factor, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**: 6149–6153, 1984.
- [174] NOMA Y., SIDERAS P., NAITO P., BERGSTEDT-LINDQUIST S., AZUMA C., SEVERINSON E., TANABE T., KINASHI T., MATSUDA F., Cloning of cDNA encoding the murine IgG1 induction factor by a novel strategy using SP6 promoter, *Nature*, **319**: 640–646, 1986.
- [175] O'GARRA A., WARREN D. J., HOLMAN M., POPHAM A. M., SANDERSON C.-J., KLAUS G. G. B., Interleukin 4 (B-cell growth factor II/eosinophil differentiation factor) is a mitogen and a differentiation factor for preactivated B lymphocytes, *Proc. Natl.*

- Acad. Sci. USA, **83**: 5528–5232, 1986.
- [176] OHARA J., LAHET S., INMAN J., PAUL W. E., Partial purification of murine B cell stimulatory factor (BSF)-1, *J. Immunol.*, **135**: 2518–2523, 1985.
- [177] OHARA J., PAUL W. E., Receptors for B-cell stimulatory factor-1 expressed on cells of haematopoietic lineage, *Nature*, **325**: 537–540, 1987.
- [178] OHARA J., PAUL W. E., Up-regulation of interleukin 4/B-cell stimulatory factor 1 receptor expression, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**: 8221–8225, 1988.
- [179] OLIVER K., NOELLE R. J., UHR J. W., KRAMMER P. H., VITETTA E. S., B-cell growth factor (B-cell growth factor 1 or B-cell stimulating factor, provisional 1) is a differentiation factor for resting B cells and may not induce cell growth, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**: 2465–2467, 1986.
- [180] OPPENHEIM J.-J., COVACS E. J., MATSUSHIMA K., DURUM S. K., There is more than one interleukin 1, *Immunol. Today*, **7**: 45–56, 1986.
- [181] PALACIOS R., MARTINEZ-MAZA O., GUY K., Monoclonal antibodies against HLADR antigens replace T helper cells in activation of B lymphocytes, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **80**: 3456–3460, 1983.
- [182] PIKE B., NOSSAL G. J. V., Interleukin 1 can act as a B-cell growth and differentiation factor, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82**: 8153–8157, 1985.
- [183] POO W.-J., CONRAD L., JANEWAY Jr. C. A., Receptor-directed focusing of lymphokine by helper T cells, *Nature*, **332**: 378–380, 1988.
- [184] POUPART P., VANDERBEELE P., CAYPHAS S., VAN SNICK J., HAEGEMAN G., KRUYSS V., FIERS W., CONTENT J., B cell growth modulating and differentiating activity of recombinant human 26-kD protein (BSF 2, HuIFN- β_2 , HPGF.), *EMBO J.*, **6**: 1219–1224, 1987.
- [185] PRABHAKAR B. S., SEAGUSA J., ONODERA T., NOTKINS A. L., Lymphocytes capable of making monoclonal autoantibodies that react with multiple organs are a common feature of the normal B cell repertoire, *J. Immunol.*, **133**: 2815–2817, 1984.
- [186] PRAZ F., RUUTH E., Growth-supporting activity of fragment Ba of the human alternative complement pathway for activated murine B lymphocytes, *J. Exp. Med.*, **163**: 1349–1354, 1986.
- [187] PURE E., VITETTA E., Induction of murine B cell proliferation by insolubilized anti-immunoglobulins, *J. Immunol.*, **125**: 1240–1242, 1980.
- [188] PURE E., VITETTA E. S., The murine B cell response to TNP-polyacrylamide beads: the relationship between epitope density of the antigen and the requirements for the T cell help and surface IgD, *J. Immunol.*, **125**: 420–427, 1980.
- [189] RABIN E. M., MOND J. J., OHARA J., PAUL W. E., Interferon γ inhibits the action of B cell stimulatory factor (BSF)-1 on resting B cells, *J. Immunol.*, **137**: 1573–1576, 1986.
- [190] RABIN E. M., MOND S. J., OHARA J., B cell stimulatory factor 1 (BSF 1) prepares resting B cells to enter S phase in response to anti-IgM and lipopolysaccharide, *J. Exp. Med.*, **164**: 517–531, 1986.
- [191] RABIN E. M., OHARA J., PAUL W. E., B-cell stimulatory factor 1 activates resting B cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82**: 2935–2939, 1985.
- [192] RANSOM J. T., CAMBIER J. C. B cell activation VII. Independent and synergistic effect of mobilized calcium and diacylglycerol on membrane potential and I-A expression, *J. Immunol.*, **136**: 66–72, 1986.
- [193] RANSOM J., FISHER M., MOSMAN T., YOKOTA T., DELUCA D., SCHUMACHER J., ZLOTNIK A., Interferon γ is produced by activated immature mouse thymocytes and inhibits the interleukin 4-induced proliferation of immature thymocytes. *J. Immunol.*, **139**: 4102–4108, 1987.
- [194] RANSOM J. T., HARRIS L. K., CAMBIER J. C., Anti-Ig induces release of inositol 1,4,5-

- triphosphate, which mediates mobilization of intracellular Ca^{++} stores in B lymphocytes, *J. Immunol.*, **137**: 708–714, 1986.
- [195] RASMUSSEN R., TAKATSU K., HARADA N., TAKAHASHI T., BOTTOMLY K., T cell-dependent hapten specific and polyclonal B cell responses require release of interleukin 5. *J. Immunol.*, **140**: 705–712, 1988.
- [196] REYNOLDS D. S., BOOM W. H., ABBAS A. K., Inhibition of B lymphocyte activation by interferon- γ , *J. Immunol.*, **139**: 767–773, 1987.
- [197] RICHARD Y., LEPRINCE C., DUGAS B., TRETON D., GALANAUD D., Reactivity of Leu-1⁺ tonsillar B cells to a high molecular weight B cell growth factor, *J. Immunol.*, **139**: 1563–1567, 1987.
- [198] ROSOFF P. M., CANTLEY L. C., Increasing the intracellular Na^{+} concentration induces differentiation in a pre-B lymphocyte cell line, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **80**: 7547–4750, 1984.
- [199] ROSOFF P. M., STEIN L. F., CANTLEY L. C., Phorbol esters induce differentiation in a pre-B-lymphocyte cell line by enhancing Na/H exchange. *J. Biol. Chem.*, **259**: 7056–7060, 1984.
- [200] ROTH C., MOREAU J. L., KORNER M., JANKOWIC D., THEZE J., Biochemical characterization and biological effects of partially purified B-cell activating factor (BCAF), *Eur. J. Immunol.*, **18**: 577–584, 1988.
- [201] SALWA J., Podstawy genetyczne indukcji nowotworów, *Post. Biol. Kom.*, **15**: 141–152, 1988.
- [202] SANDERS V. M., FERNANDEZ-BOTRAN R., UHR J. W., VITETTA E. S., Interleukin 4 enhances the ability of antigen-specific B cells to form conjugates with T cells, *J. Immunol.*, **139**: 2349–2354, 1987.
- [203] SANDERSON C. J., O'GARRA A., WARREN D. J., KLAUS G. G. B., Eosinophil differentiation factor also has B-cell growth factor activity: proposed name interleukin 4?, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**: 437–440, 1986.
- [204] SARFATI M., NUTMAN T. B., SUTER U., HOFSTETTER H., DELESPESE G., T cell derived IgE binding factors. II. Purification and characterization of IgE binding factors produced by human T cell leukemia/lymphoma virus-1-transformed T lymphocytes, *J. Immunol.*, **139**: 4055–4060, 1987.
- [205] SEGHAL P. B., MAY L. T., TAMM I., VILCEK C., Human β_2 interferon and B-cell differentiation factor (BSF-2) are identical, *Science*, **235**: 431–440, 1987.
- [206] SIDERAS P., BERGSTEDT-LINDQVIST S., SEVERINSON E., Partial biochemical characterization of IgG1-inducing factor, *Eur. J. Immunol.*, **15**: 593–598, 1985.
- [207] SIDMAN C. L., MARSHAL J. D., SHULTZ L. D., GRAY P. W., JOHNSON H. M., γ -interferon is one of several direct B-cell-maturing lymphokines, *Nature*, **309**: 801–804, 1984.
- [208] SMELAND E. B., BLOMHOFF H. K., OHLSSON R., DE LANGE DAVIES K., FUNDERUD S., BOYE E., Transcription of protooncogenes during stimulation of normal human B lymphocytes, *Eur. J. Immunol.*, **18**: 1847–1850, 1988.
- [209] SMITH C. A., RENNICK D. M., Characterization of murine lymphokine distinct from interleukin 2 and interleukin 3 (IL-3) possessing a T-cell growth activity and a mast cell growth factor activity that synergizes with IL-3, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**: 1857–1861, 1986.
- [210] SMITH C. D., COX C. C., SYNDERMAN R., Receptor-coupled activation of phosphoinositide-specific phospholipase C by an N protein, *Science*, **232**: 97–100, 1986.
- [211] SNAPPER C. M., PAUL W. E., Interferon γ and B cell stimulatory factor-1 reciprocally regulate Ig isotype production, *Science*, **236**: 944–947, 1987.
- [212] SNAPPER C. M., PAUL W. E., B cell stimulatory factor-1 (interleukin 4) prepares resting B cells to secrete IgG1 upon subsequent stimulation with bacterial lipopolysaccharide, *J. Immunol.*, **139**: 10–17, 1987.

- [213] SNOW E. C., FETHERSTONE J. D., ZIMMER S., Induction of the c-myc protooncogene after antigen binding to hapten-specific B cells. *J. Exp. Med.*, **164**: 249-253, 1986.
- [214] STEPLEWSKI Z., LUBECK M. P., KOPROWSKI H., Human macrophages armed with murine immunoglobulin G2a antibodies to tumours destroy human cancer cells. *Science*. **221**: 865-867, 1983.
- [215] SUEMURA M., YODOI J., HIRASHIMA M., ISHIZAKA K., Regulatory role of IgE-binding factors from rat T lymphocytes. I. Mechanisms of enhancement of IgE response by IgE-potentiating factor. *J. Immunol.*, **125**: 148-154, 1980.
- [216] SWAIN S. L., Role of BCGF II in the differentiation to antibody secretion of normal and tumour B cells. *J. Immunol.*, **134**: 3934-3943, 1985.
- [217] SWAIN S. L., HOWARD M., KAPPLER J., MARRACK P., WATSON J., BOOTH R., WETZEL G. D., DUTTON R. W., Evidence for two distinct classes of murine B cell growth factors with activities in different functional assays. *J. Exp. Med.*, **158**: 822-835, 1983.
- [218] TAKAI Y., KISHIMOTO A., IWASA Y., KAWAHARA Y., MORI T., NISHIZUKA Y., Calcium-dependent activation of a multifunctional protein kinase by membrane phospholipids. *J. Biol. Chem.*, **254**: 3692-3695, 1979.
- [219] TAKAI Y., WONG G. G., CLARK S. C., BURAKOFF S. J., HERRMANN S. H., B-cell stimulatory factor-2 is involved in the differentiation of cytotoxic T lymphocytes. *J. Immunol.*, **140**: 508-512, 1988.
- [220] TAKATSU K., KIKUCHI Y., TAKAHASHI T., HONJO T., MATSUMOTO M., HARADA N., YAMAGUCHI N., TOMINAGA A., A T-cell delivered B cell differentiation factor also induces cytotoxic T lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**: 4234-4238, 1987.
- [221] TEALE J. M., ABRAHAM K. M., The regulation of antibody class expression. *Immunol. Today*, **8**: 122-126, 1987.
- [222] TEILLAUD J. L., AMIGORENA S., MONCUIT J., SAUTES C., FRIDMAN W. H., Immunoglobulin G-binding factors (IgG-BF) inhibit IgG secretion by, as well as proliferation of, hybridoma B cells. *Immunol. Lett.*, **16**: 139-144, 1987.
- [223] TONY H-P., PARKER D. C., Major histocompatibility complex restricted polyclonal B cell responses resulting from helper T cell recognition of antiimmunoglobulin presented by small B lymphocytes. *J. Exp. Med.*, **161**: 223-231, 1985.
- [224] TRENN G., TAKAYAMA H., HU-LI J., PAUL W. E., SITKOWSKY M. V., B cell stimulatory factor 1 (IL 4) enhances the development of cytotoxic T cells from Lyt-2⁺ resting murine T lymphocytes. *J. Immunol.*, **140**: 1101-1106, 1988.
- [225] UEDE T., HIRATA F., HIRASHIMA M., ISHIZAKA K., Modulation of the biological activity of IgE-binding factors. I. Identification of glycosylation-inhibiting factor as a fragment of lipomodulin. *J. Immunol.*, **130**: 878-884, 1983.
- [226] VAN DAMME S., OPDENAKKER G., SIMPSON R. J., RUBIRA M. R., CAYPHAS S., VINK A., BILLIAU A., VAN SNICK J., Identification of the human 26-kD protein, interferon β 2 (IFN β 2) as a B cell hybridoma/plasmocytoma growth factor induced by interleukin 1 and tumor necrosis factor. *J. Exp. Med.*, **165**: 914-919, 1987.
- [227] VAN SNICK J., CAYPHAS S., SZIKORA J. P., RENAULD J. C., VAN ROOST E., BOON T., SIMPSON J., cDNA cloning of murine interleukin-HPI: homology with human interleukin-6. *Eur. J. Immunol.*, **18**: 193-197, 1988.
- [228] VARGA J. M., KONIGSBERG W. H., RICHARDS F. F., Immunoglobulin with multiple binding functions. Induction of single immunoglobulin species with structurally dissimilar haptens. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **70**: 3439-3445, 1973.
- [229] VAZQUEZ A., AUFFREDOU M-T., GERARY J-P., DELFRAISSY J-F., GALA-NAUD P., Sequential effect of a high molecular weight B cell growth factor and of interleukin 2 on activated human B cells. *J. Immunol.*, **139**: 2344-2348, 1987.
- [230] VINK A., COULIE P. G., WANTERS P., NORDAN R. P., VAN SNICK J., B cell growth

- and differentiation activity of interleukin-HP1 and related murine plasmocytoma growth factors. Synergy with interleukin 1, *Eur. J. Immunol.*, **18**: 607-612, 1988.
- [231] WAKASUGI H., RIMSKY L., MAHE Y., KAMEL A. M., FRADELLIZI D., TURSZ T., BERTOGGLIO J., Epstein-Barr virus-containing B-cell line produces an interleukin 1 that it uses as a growth factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **84**: 804-808, 1987.
- [232] WEYGAND C. M., GORONZY J., DALLMAN M. J., FATHMAN C. G., Administration of recombinant interleukin 2 in vivo induces a polyclonal IgM response, *J. Exp. Med.*, **163**: 1607-1612, 1986.
- [233] WEINER M. L., MOORHEAD J. W., CLAMAN H. N., Anti-immunoglobulin stimulation of murine lymphocytes. I. Age dependency of proliferative response, *J. Immunol.*, **116**: 1656-1661, 1976.
- [234] WIKIEŁ M., STROSZNAJDER J., Fosfolipidy inozytolowe, ich metabolizm i znaczenie w procesach przekazywania informacji, *Post. Biol. Kom.*, **15**: 1-22, 1988.
- [235] WOLF M., LEVINE III H., MAY JR W. S., CUATRECASAS P., SAHYOUN N., A model for intracellular translocation of protein kinase C involving synergism between Ca^{++} and phorbol esters, *Nature*, **317**: 546-549, 1985.
- [236] WONG G. H. W., CLARK-LEWIS I., MCKIM-BRESCHKIN J. L., HARRIS A. W., SHRADER J. W., Interferon- γ induces enhanced expression of Ia and H-2 antigens on B lymphoid, macrophage and myeloid cell lines, *J. Immunol.*, **131**: 788-793, 1983.
- [237] YODOI J., ADACHI M., NORO N., IgA-binding factors and Fc receptors for IgA: Comparative studies between IgA and IgE Fc receptor systems, *Int. Rev. Immunol.*, **2**: 117-143, 1987.
- [238] YODOI J., HIRASHIMA M., ISHIZAKA K., Regulatory role of IgE-binding factors from rat T lymphocytes. V. The carbohydrate moieties in IgE-potentiating factors and IgE-suppressive factors, *J. Immunol.*, **128**: 289-295, 1982.
- [239] ZLOTNIK A., RANSOM J., FRANK G., FISCHER M., HOWARD M., Interleukin 4 is a growth factor for activated thymocytes: Possible role in T-cell ontogeny, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **84**: 3856-3860, 1987.

Otrzymano: 13 września 1988

Przyjęto: 13 marca 1989

Adres autora: ul. Chalubińskiego 5, 02-004 Warszawa

WCZESNA EWOLUCJA KOMÓREK EUKARIOTYCZNYCH – FAKTY I HIPOTEZY

THE EARLY EVOLUTION OF EUKARYOTIC CELLS – FACTS AND HYPOTHESES

Leszek KUŹNICKI

Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN. Warszawa

Streszczenie. Najwcześniejsze, powszechnie uznane, ślady życia zostały znalezione w rogowcach z Warrawoona (Australia) o wieku 3,5 Ga (mld lat). Większość współczesnych autorów uważa, że pierwsze jednokomórkowe eukariota powstały około 1,5 Ga, jednakże niektóre diagnozy mikroskamieniałości sugerują możliwość pojawienia się pierwotniaków i drożdży w środkowym lub późnym archeanie (3,5–2,6 Ga). W rzeczywistości, dokumentacja paleontologiczna pytanie o czas eukariogenezy pozostawia otwarte. Zagadnienie powstania komórki eukariotycznej i problem pierwotnych królestw przyrody został przedstawiony w świetle: 1) badań nad odtwarzaniem filogenezy w oparciu o molekularną analizę powszechnie występujących małych podjednostek rRNA oraz 2) z perspektyw pojawienia się i roli cytoskieletu i regulowanych jonami Ca^{2+} systemów ruchowych.

Summary. The earliest generally accepted evidence of life has been found in cherts of the 3.5 Ga Warrawoona Group (Australia). According to the opinion of the majority authors the data for the origin of unicellular eukaryotes is 1.5 Ga, however, some diagnostic microfossils suggest that protist and yeast might have been in existence at Middle or Late Archean time (3.5–2.6 Ga). Paleontological documentation has still left open the question of a time of eukaryogenesis. The origin of the eukaryotic cell and the problem of primary kingdoms is discussed in the light of 1) molecular phylogenetic analysis of the universal small subunit rRNA and 2) appearance and role of the cytoskeleton and Ca^{2+} regulated motile systems.

Od drugiej połowy XIX w. tematyka powstania komórki eukariotycznej jest spleciona z problemem głównych podziałów przyrody żywej, tzn. wyróżnianiem królestw oraz związkami filogenetycznymi między tymi najwyższej rangi taksonami. Historię i rozwój badań w tym zakresie przedstawiono w polskojęzycznych artykułach [15, 16] z uwzględnieniem współczesnej dyskusji między zwolennikami endosymbiozy jako podstawowego mechanizmu eukariogenezy [14, 23, 24, 35] oraz rzecznikami stopniowego powstawania jądra i osłonki

Praca wykonana w ramach problemu CPBP-04.01.

jądrowej oraz mechanizmów mitozy w jakiejś linii prokariota [3, 4, 33]. Obecnie chciałbym skoncentrować się na nowych aspektach, które pojawiły się w piśmiennictwie w okresie ostatnich czterech lat i stały się głównymi problemami rozważań nad powstaniem eukariota i ich związkami rodowymi z prokariota.

1. SZKOŁA WOESEGO I JEJ WKŁAD DO FILOGENETYKI MOLEKULARNEJ

Do końca lat siedemdziesiątych hipotezy endosymbiotycznego pochodzenia eukariota, jak i poglądy zwolenników ewolucji stopniowej były równocenne, gdyż brak było obiektywnych kryteriów ich weryfikacji. Pierwszą zapowiedzią istotnego postępu na polu eukariogenezy była publikacja Woese i Fox z 1977 r. „Phylogenic structure of the procaryotic domain: the primary kingdoms” [37]. Autorzy dokonali rozbicia królestwa *Prokaryota* na dwa: *Archaeobacteria* i *Eubacteria* równocenne z królestwem *Eukaryota*. Woese i jego szkoła [36, 37, 38, 39] do metodyki molekularnych analiz filogenetycznych, zapoczątkowanych w połowie lat sześćdziesiątych przez Zuckerkandla i Paulinga, wnieśli istotne udoskonalenie. Polegało ono na skupieniu uwagi na 16S-rRNA i 5S-rRNA. Te małe podjednostki rybosomalnych kwasów rybonukleinowych okazały się wyjątkowo przydatne, gdyż występują u wszystkich żyjących współcześnie organizmów, a zmiany w ich sekwencjach nukleotydowych zachodziły wyjątkowo wolno.

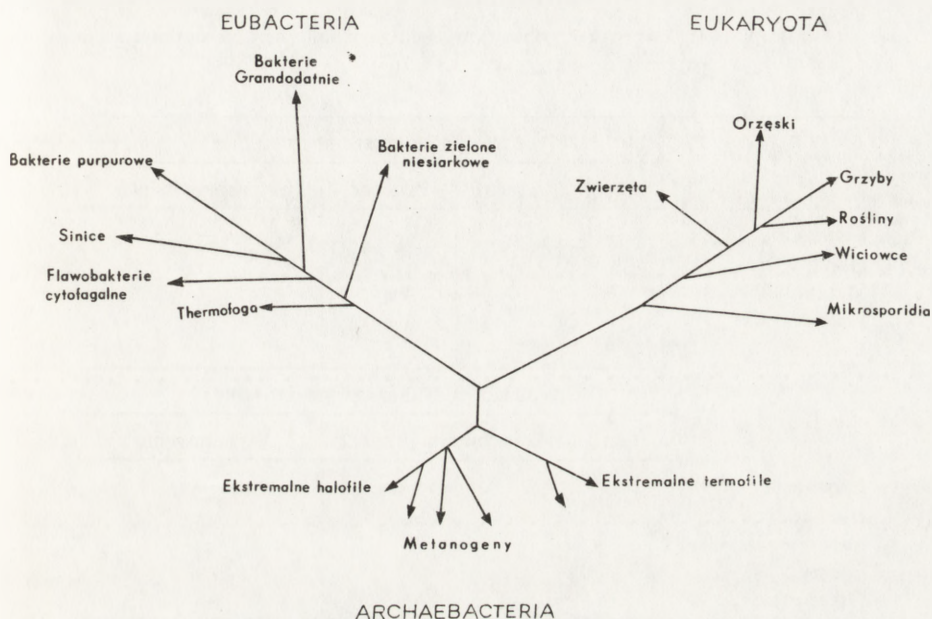
Dla zrozumienia pierwotnych związków rodowych szczególne znaczenie miało wyodrębnienie taksonu *Archaeobacteria* oraz opisanie trzech podstawowych podjednostek tego królestwa [37, 38], a mianowicie: 1) metanogenów, 2) ekstremalnych termofili i 3) ekstremalnych halofili. Metanogeny występują w beztlenowych osadach dennych, w komórkach pierwotniaczych, w przewodach pokarmowych owadów i ssaków i wszędzie tam, gdzie powstaje metan z molekularnego H_2 i CO_2 .

Ekstremalne termofile to mikroorganizmy zależne od siarki i jej związków. Niektóre gatunki z rodzajów *Sulfolobus*, *Thermoproteales* są mieszkańcami kwaśnych, gorących źródeł i ich optimum wzrostu znajduje się w granicach 80–100°C. Organizmy te charakteryzuje bądź metabolizm chemolitotroficzny, w którym CO_2 jest źródłem węgla, a elementarna siarka źródłem energii, albo też siarkowe oddychanie przy udziale CO_2 i siarkowodoru.

Ekstremalne halofile są bakteriami zamieszkującymi słone jeziora. Tolerują bardzo wysokie stężenie NaCl, a niektóre gatunki wywołują zjawisko proteolizy solonych ryb i solonego mięsa.

Woese [36] porównał 920 homologicznych nukleotydów 16S-rRNA z *Sulfolobus solfataricus*, *Methanococcus vannielli* i *Halobacterium valcanii* i doszedł do wniosku, że najbardziej pierwotnymi są ekstremalne termofile. Drzewo

rodowe budowane przez Woese i jego szkołę (rys. 1) jest pozbawione radix communis organismorum, nie ulega jednak wątpliwości, że Woese odrzuca endosymbiozę jako mechanizm prowadzący do powstania eukariota.



Ryc. 1. Pierwotne królestwa wg Woesego 1987 [36]

2. HIPOTEZA CZTERECH PIERWOTNYCH KRÓLESTW: *EOCYTA*, *EUKARYOTA*, *ARCHAEBACTERIA*, *PHOTOCYTA*

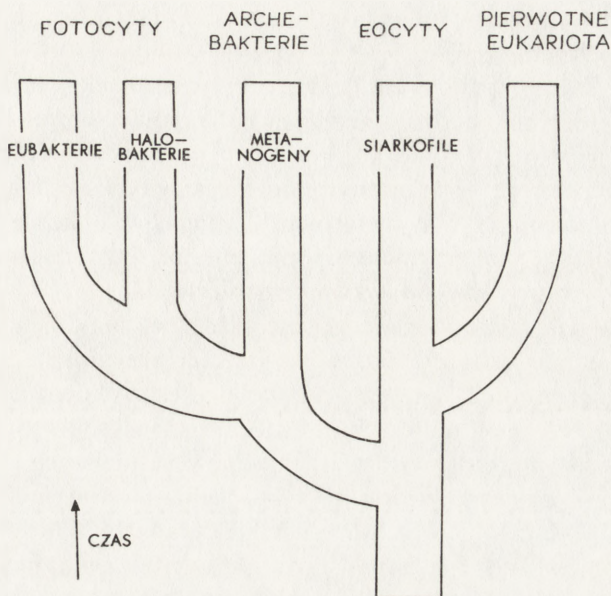
Wprowadzenie metod biologii molekularnej do ewolucjonizmu nadało dyskusjom wokół eukariogenezy i wyróżniania pierwotnych królestw większej konkretności, jednocześnie zapoczątkowało nowy etap kontrowersji i rozszerzyło zakres otwartych problemów. Np. według Lake i jego grupy [18, 19, 21] przekonanie o wspólnocie archebakterii jako taksonie reprezentującym odrębne królestwo, wyniknęło z artefaktów. Trzy główne grupy zaliczane do archebakterii: 1) halobakterie (ekstremalne halofile), 2) metanobakterie (metanogeny), 3) eocyty (ekstremalne termofile), reprezentują różne tempo zmian ewolucyjnych. W wyniku tego linie rozwojowe tzw. „szybkich zegarów” były traktowane tak samo, jak „wolnych zegarów” i stąd powstała idea królestwa *Archaeobacteria* jako taksonu jednorodnego i różnego od królestw *Eubacteria* i *Eukaryota*. Uwzględnienie w filogenetyce molekularnej trójwymiarowej struktury rybosomów pozwala na uniknięcie takich błędów [18, 19, 21] i ujawnia zupełnie inne od dotychczas postulowanych zależności. Halobakterie

są filogenetycznie bliskie eubakteriom, natomiast archebakterie zależne od siarki (eocyty) – eukariotom. Tab. 1 ilustruje pokrewieństwa wyprowadzone na podstawie budowy rybosomów.

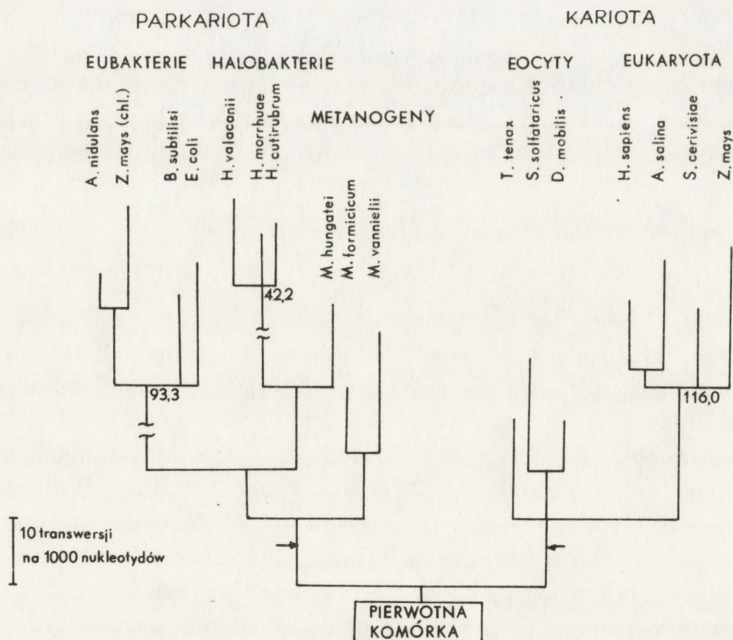
TABELA 1
Strukturalna charakterystyka rybosomów, wskazująca na przypuszczalne relacje filogenetyczne (z badań Lake'a i wsp. [wg 22])

Taksony	Małe podjednostki strukturalne			
	Cypeł	Garb	Przełęcz	Szczelina tarsowa
Eubakterie	–	–		–
Halobakterie	+	–	–	–
Metanobakterie	+	+/-	+	+
Eocyty	+	+	+	+
Eukariota	+	++	+	+
Duże podjednostki strukturalne				
	Garb	Wypełniona przełęcz	Wybrzuszenie	
Eubakterie	–	–	–	
Halobakterie	–	–	–	
Metanobakterie	+/-	–	+/-	
Eocyty	+	–	++	
Eukariota	+	+	+	

Wyniki te posłużyły do zakwestionowania podziału przyrody na trzy królestwa: *Archaeobacteria*, *Eubacteria* i *Eukaryota*. Na miejsce propozycji Woesego i Foxa [37] pojawiła się nowa hipoteza. Lake wyróżnił wśród nadkrólestwa Prokaryota trzy królestwa: 1) *Eocyta* (dawne ekstremalne termofile), *Archaeobacteria* i *Photocyta* (obejmujące eubakterie i halobakterie). Ten nowy podział odpowiadałby trzem, kolejnym w czasie, a jednocześnie przystosowawczo istotnym, innowacjom: 1) pozyskanie oddychania siarkowego – powstanie *Eocyta*, 2) metanogenezie – powstanie *Archaeobacteria*, 3) pozyskanie zdolności do fotosyntezy – powstanie *Photocyta* [18, 19, 21, 22, 26] (rys. 2). Ostatnio [20] Lake skoncentrował się na drogach powstania jądra jako najbardziej istotnego wydarzenia, prowadzącego do powstania eukariota. Niektóre organele, jak chloroplast i mitochondrion, to niewątpliwie przekształcone w toku ewolucji endosymbiotyczne fotocyty. Endosymbioza nie była jednak mechanizmem, który warunkował powstanie jądra. Lake, stosując tzw. algorytm niezmiennych szybkości zmian sekwencji nukleotydów rRNA (evolutionary parsimony), sugeruje, że eukariota wywodzą się od termofilnych eocytów [20]. Rysunek przedstawia zaproponowane ostatnio przez Lake [20] „monofiletyczne” drzewo rodowe istot żywych, złożone z dwóch również monofiletycznych nadkrólestw *Prokaryota* i *Eukaryota* (rys. 3). Nadkrólestwo



Ryc. 2. Pierwotne królestwa wg Lake'a 1986 [22]



Ryc. 3. Monofiletyczne nadkrólestwa Parkaryota i Karyota ustalone przez Lake'a (1988) na podstawie algorytmu stałego tempa zmian sekwencji nukleotydów w rRNA [20].

Parkaryota jest wyłącznie prokariotyczne, podczas gdy *Karyota* jest taksonem protoeukariotycznym.

Propozycja Lake'a [20] wskazuje na eocyty, czyli ekstremalne termofile, czerpiące energię z metabolizmu siarki, jako wspólnego przodka wszystkich organizmów (pierwotna komórka). Jest to pogląd zasadniczo różny od większości uznawanych w minionym półwieczu. Powszechnie sądzono, że pierwszymi organizmami były heterotrofy, żyjące w bulionie oceanicznym. Bulion stanowił dla nich zarówno źródło energii, jak też substrat złożony z powstałych prebiotycznie związków organicznych.

Sądzę, że w dziedzinie filogenetyki molekularnej znajdujemy się nadal na początkowym etapie badań, które w przyszłości przyniosą dalsze rewelacje. Punktem wyjścia hipotez Woesego i Lake'a jest przekonanie, że określone podjednostki rRNA, z uwagi na ich powszechność i wysoki stopień konserwatywności, są najlepszym źródłem odtwarzania najwcześniejszych etapów radiacji adaptatywnej. Wydaje się, że jest to tylko jedna, wśród możliwych, droga poznania przebiegu ewolucji na wczesnych jej etapach. Założenia Lake'a, że kształt rybosomów może być podstawą do wyróżnienia pierwotnych linii fyletycznych ma wiele ograniczeń i nie prowadzi do jednoznacznych rozstrzygnięć.

Np. budowa rybosomów *Methanococcus vannielli* jest typowa dla eocytów. W tej sytuacji problem, które ze znanych prokariotów naprawdę reprezentują formy prymitywne i jakie są ich rzeczywiste związki filogenetyczne z eukariota, pozostaje nadal otwarty. Wszystkie natomiast współczesne badania z zakresu filogenetyki molekularnej jednoznacznie sugerują, że eukariogeneza była procesem, który miał miejsce na bardzo wczesnych etapach ewolucji życia na Ziemi, a endosymbioza była późniejszym mechanizmem doskonalenia eukariota.

3. MIKROSKAMIENIAŁOŚCI, ICH DATOWANIE I INTERPRETACJA

Jest zastanawiające, że zarówno specjaliści od filogenetyki molekularnej i taksonomii prokariota [8, 18, 19, 20, 22, 27, 36], jak i Cavalier-Smith [3, 4, 5] i inni biolodzy, którzy analizują problem eukariogenezy z perspektywy budowy jądra [6, 25, 32], nie uwzględniają zupełnie danych z zakresu paleobiologii. Np. podczas IV Międzynarodowego Kongresu Biologii Komórki w Montrealu (1988) jedno z seminariów (S. 6) było poświęcone ewolucji komórek eukariotycznych, a inne (S. 11) dotyczyło komórkowej i przedkomórkowej ewolucji z perspektywy badań rRNA. Wg Cavalier-Smith [5] kluczowym procesem eukariogenezy było wykształcenie się chromosomów, osłonki jądrowej i rozwój mechanizmu mitozy. Procesy te miały mieć miejsce ok. 1,5 Ga (mld lat temu) i dokonać się równolegle u bliżej niesprecyzowanej Gram-

-dodatniej eubakterii, u której w wyniku mutacji pojawiły się glikoproteiny oraz białka tworzące szkielet komórkowy i warunkujące ruchy wewnątrzkomórkowe. Introny miały natomiast powstać wcześniej już u pierwotnych archebakterii, a proces ich „wstawienia” towarzyszył tworzeniu się białek cytoszkieletu [31].

Najstarsze skamieniałości, co do których nie ma wątpliwości, że są śladami organizmów, mają 3,5 Ga [30] i takie same datowania wskazują na obecność chlorofilu [26]. Wynika stąd wniosek, że w tym czasie istniał już z pewnością zróżnicowany ekosystem prokariota, złożony z hetero- i autotrofów wykorzystujących wodę jako źródło wodoru. Najstarsze skały mają 3,8 Ga i w nich również można dopatrzeć się śladów życia. Wielu paleontologów, podobnie jak Cavalier-Smith jest przekonanych o znacznie późniejszym powstaniu eukariota. W ostatnim 10-leciu znacznie zwiększyła się liczba opisanych skamielin, pochodzących z proterozoiku a nawet archeanu (4,6–2,5 Ga). Dało to asumpt do przypuszczeń o wczesnym pojawieniu się eukariota [1, 9, 10, 11, 30, 32]. Pflug [28, 29] sądzi, że materiał z formacji Isua z Grenlandii o wieku 3,8 Ga zawiera ślady komórek eukariota przypominających współczesne drożdże. Robbins i inni [30] wskazują na obecność zróżnicowanej populacji eukariota jedno- i wielokomórkowych we wczesnym proterozoiku.

Wszyscy, którzy pracują z przedkambryjskimi mikroskamieniałościami, wiedzą, że kryteria wyróżniania organizmów są arbitralne. Wielkość komórek nie może być tu żadnym pewnym kryterium. Najmniejsza komórka eukariotyczna o kształcie sferycznym może mieć 3,5 μ m, a struktury o takich średnicach występują w najstarszych pokładach osadowych. Jedynie ślady jądra lub innych wewnątrzkomórkowych struktur mogą stanowić wskazówkę śladu pozostawionego przez eukariota.

Paleontologia nie daje więc pewnych argumentów do dyskusji nad czasem eukariogenezy, ale wraz z danymi z zakresu filogenetyki molekularnej sugeruje raczej archean niż późniejsze epoki.

4. EUKARIOGENEZA. CZAS I WARUNEK JEJ PRZEBIEGU

Każda komórka eukariotyczna, nawet tak uproszczona jak *Pelomyxa palustris* bez mitochondriów i wielu innych organeli jest złożonym systemem. Jej podstawowe elementy to jądro, cytoplazma i zdolna do endocytozy błona zewnętrzna. Jądro zawiera genom i struktury związane z procesami transkrypcji. Cytoplazma to przestrzeń otaczająca jądro, rozbudowana dzięki szkieletowi komórkowemu, zawierająca aparat translacyjny, liczne organele komórkowe, wewnętrzny system błon oraz ziarnistości, jak glikogen, krople tłuszczu i inne. Rozdział między jądrem i cytoplazmą zapewnia osłonka jądrowa, zbudowana z dwóch błon o porowatej strukturze.

Nie tylko budowa komórki eukariotycznej i prokariotycznej to dwa

odrębne światy. Prokariota i eukariota różnią się od siebie sposobami wykorzystywania środowiska, strategiami ewolucyjnymi [2] oraz sposobami rozmnażania i mechanizmami ruchu. Regulowane zmianami stężenia jonów wapnia systemy tubulinowo-dyneinowe i aktomiozynowe występują jedynie u eukariota [15, 16, 17].

Podstawowe procesy związane z przebiegiem cyklu życiowego komórek eukariotycznych są regulowane zmianami stężenia jonów wapnia w obrębie macierzy komórkowej i jądra. Np. Ca^{2+} są sygnałem inicjującym mitozę. Przejściowy wzrost stężenia wolnych jonów Ca^{2+} warunkuje pęknięcie osłonki jądrowej i przejście od metafazy do anafazy, ruch chromosomów w anafazie i cytokinezę. Wszystkie regulowane jonami wapnia elementy aparatu mitotycznego są bardzo podobne do składników sarkoplazmatycznego retikulum i w obu wypadkach wysoce konserwatywne filogenetycznie [34].

Fakty te sugerują, że proces tworzenia jądra u przodków eukariota był stymulowany przez jony wapnia i związany z powstaniem grupy białek wiążących wapń, przede wszystkim z rodziny kalmoduliny. Większość eukariotów utrzymuje poziom Ca^{2+} w cytoplazmie w granicach 10^{-7} M. Odstępstwo od tego jest uważane za archaizm. Wykazują go drożdże, które mogą żyć w środowiskach o stężeniu jonów wapnia 10^{-9} M i takie samo stężenie utrzymywać w cytoplazmie. Kiedy stężenie zewnętrzne znacznie wzrośnie, również zmianie podlega stężenie wewnątrzkomórkowe, które może dochodzić do 10^{-3} M.

Ten nietypowy behawior wapniowy jest zdaniem Kaźmierczaka i Degensa reliktem odzwierciedlającym przystosowanie do drastycznych zmian w stężeniu jonów Ca^{2+} w pierwotnym środowisku przodków współczesnych drożdży [11]. Powstanie błony jądrowej mogło więc być przystosowawczą reakcją na zwiększenie stężenia jonów wapnia w środowisku i cytoplazmie. Membranizacja materiału genetycznego zapobiegała bowiem przyrostowi jonów wapnia w jądrze, zaś stały wzrost wielkości komórki ułatwiał ich buforowanie w cytoplazmie [7, 11, 12]. Za takim scenariuszem zmian przemawia hipoteza pierwotnego oceanu sodowego Kempa i Degensa [13].

Do 1985 r. uważano powszechnie, że pierwotny ocean był środowiskiem silnie redukującym, zawierającym między innymi jony Fe^{2+} , jednak nie różniącym się zawartością soli od współczesnej wody oceanicznej, której pH przy powierzchni wynosi 8,2, a stosunek jonów $\text{Mg}:\text{Ca}=5,22$. Kempe i Degens [13] wysunęli hipotezę, że głównym składnikiem pierwotnego oceanu był węglan sodu, a nie chlorek sodu. W związku z tym jego woda miała wysokie pH (9–11) i niskie stężenie jonów wapnia i magnezu. Modelami dla procesów termodynamicznych, kinetycznych i równowagi mas pierwotnego oceanu mogą być współczesne jeziora sodowe, a nie ocean [11, 12, 13].

Zmiany składu jonowego i pH oceanu miały prawdopodobnie następujący przebieg: przez pierwsze 700 mln lat historii Ziemi, tj. między 4,6 a 3,8 Ga, powstawał ocean sodowy. W tym czasie jego pH wzrosło z 8,7 do 10,4. Okres

3,8–1,0 Ga to stopniowe zmniejszanie stężenia jonów węglanowych, któremu towarzyszył powolny wzrost stężenia jonów wapniowych i magnezowych. Obecny skład i pH zostało ustalone w okresie 1,0–0,7 Ga, kiedy w czasie 300 mln lat nastąpił wzrost stężenia jonów Ca^{2+} z 10^{-5} do 10^{-2} M.

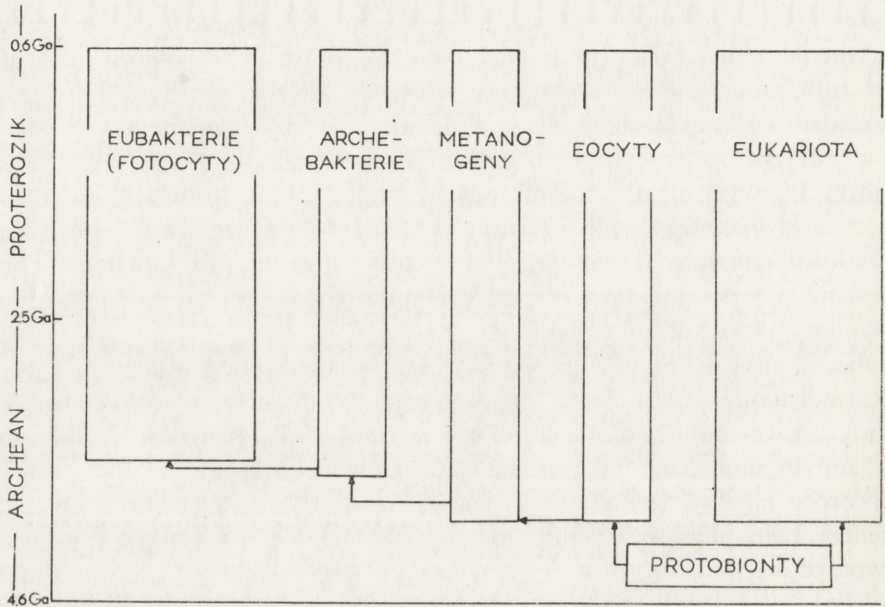
Regulacje wapniowe i białka wiążące wapń odegrały z pewnością wyjątkową rolę zarówno na wczesnych etapach eukariogenezy, jak i w okresie intensywnego rozwoju tkankowców. Trudno jednak jest się zgodzić z poglądem, że pierwotne eukariota to drożdże. Grzybom brak dwóch zasadniczych własności, które predestynowałyby je do roli pionierów eukariota. Organizmy zaliczane do królestwa *Fungi* nie mają systemu mikrotubularnego, w szczególności tubulinowo-dyneinowego oraz zdolności do fagocytozy. Drożdże są przykładem wtórnej redukcji od struktur micelarnych do pojedynczych komórek w związku ze specyficznym trybem życia, a nie modelem prymitywnej komórki. Pierwszymi eukariotami musiały być jakieś praprotista. Fundatorem królestwa *Protista* wg Cavalier-Smitha [4,5] miał być bezwiciowy, o uproszczonej budowie pierwotniak nie mający mitochondriów, aparatu Golgiego i chloroplastów, przypominający troficzną fazę mikrospory (*Microsporea*), powstały w wyniku przekształceń eubakterii.

Obecnie nikt nie może mieć wątpliwości, że eubakterie (fotocyty) są grupą prokariota najbardziej odległą filogenetycznie od eukariotów. Z kolei mikrosporidia są wewnątrzkomórkowymi pasożytami, które tym samym nie mogą być żadnym modelem dla ewolucji gatunków wolnożyjących.

Skoro uznajemy, że najbardziej znaczącym wydarzeniem w procesie eukariogenezy było powstanie jądra, to jest oczywiste, że równoległe musiał się wytworzyć mechanizm mitozy i cytokinezy, oparty o skurcz układu aktomiozynowego. Te zjawiska ruchowe, jak i aktywowana przez jony wapnia fuzja błon, ruchy pęcherzyków wewnątrzkomórkowych i przepływ cytoplazmy, lokomocja ameboidalna i za pośrednictwem wici, wymagają filamentów aktynowych, mikrotubuli, dyneiny, miozyny i całych rodzin białek wiążących wapń. Związki te (z wyjątkiem tubuliny) nie zostały wykryte u prokariotów i nie można nawet wskazać ich potencjalnych prekursorów. W całym królestwie (względnie nadkrólestwie) *Prokaryota* nie znaleziono śladów cytoszkieletu i jakichkolwiek tego rodzaju ruchów. Znajomość ultrastruktury i składu molekularnego współcześnie żyjących prokariota nie daje więc nawet poszlak do przypuszczeń, w jaki sposób mógł być zapoczątkowany proces powstania prymitywnych protista. Jednocześnie, od samego zarania, prokariota wykształciły znakomite strategie adaptacyjne, pozwalające na szybkie opanowanie każdej pojawiającej się w historii Ziemi niszy ekologicznej, tak abiotycznej, jak i biotycznej. Te przystosowania wykluczyły jednak możliwość ewoluowania w kierunku form wysoce uorganizowanych i wielokomórkowych. Wszystkie te fakty i założenia skłoniły mnie do wysunięcia hipotezy, że zróżnicowanie między prokariota a eukariota miało miejsce już na etapie protobiontów – samoodtwarzających się form autonomicznych [15, 16]. Prokariota,

które pojawiły się pierwsze, czy to jako ecycysty, czy inne bardziej pierwotne gatunki, mogły się przekształcić tylko w prokariota, a te dalej różnicować się, pozostając na tym samym prymitywnym poziomie organizacji komórki.

Jesteśmy jeszcze dalecy od teorii, która w sposób zadowalający szerokie kręgi biologów wyjaśniałaby relacje między prokariotami i eukariotami w początkowych okresach ewolucji życia na Ziemi. Załączony schemat (ryc. 4) jest w moim przekonaniu najbliższy aktualnemu stanowi wiedzy.



Ryc. 4. Schemat powstania eukariota wg hipotezy autora [15, 16]

LITERATURA

- [1] AWRAMIK S. M., The Pre-Phanerozoic fossil record. [w] Mineral deposits and the evolution of the biosphere (Dahlem Conference), red. H. D. Holland, M. Schidlowski, Berlin, Springer-Verlag, 1982, 67-82.
- [2] CARLILIE M., Prokaryotes and eukaryotes: strategies and successes, Trends Biochem. Sci., 4: 128-130, 1982.
- [3] CAVALIER-SMITH T., Cell compartmentation and the origin of eukaryote membranous organelles, [w] Endocytobiology, Endosymbiosis and Cell Biology, red. W. Schwemmler, H. E. A. Schenk, vol. 1, Walter de Gruyter, Berlin, New York 1980, 893-916.
- [4] CAVALIER-SMITH T., The origin and phylogeny of eukaryote cell, Soc. Gen. Microbiol. Symp., 32: 33-84, 1981.
- [5] CAVALIER-SMITH T., Origin of the cell nucleus, 4th Int. Congr. Cell Biol., Montreal, 14-19 August 1988, Abstracts 9, S6.1.

- [6] CORLISS J. O., The kingdom protista and its 45 phyla, *BioSystems*, **17**: 87–126, 1984.
- [7] DEGENS E. T., ITTEKKOT V., Ca^{2+} -stress, biological response and particle aggregation in the aquatic habitat, Netherlands J. Sea Res., **20**: 109–116, 1986.
- [8] FORTERRE P. P., Les archaebacteries: origine et evolution des lignées cellulaires procaryotes et eucaryotes, *Ann. Biol.*, **25**: 273–306, 1986.
- [9] KAŹMIERCZAK J., Devonian and modern relatives of the Precambrian Eosphaera: possible significance for the early eukaryotes, *Lethaia* **9**: 39–50, 1976.
- [10] KAŹMIERCZAK J., The eukaryotic nature of Eosphaera-like ferriferous structures from the Precambrian Ion Formation, Canada: A comparative study, *Precambrian Res.*, **9**: 1–22, 1979.
- [11] KAŹMIERCZAK J., DEGENS E. T., Calcium and the early eukaryotes, *Mitt. Geol.-Paläont. Inst. Univ. Hamburg*, **61**: 1–20, 1986.
- [12] KAŹMIERCZAK J., ITTEKKOT V., DEGENS E. T., Biocalcification through time: environmental challenge and cellular response, *Paläont. Z.*, **59**: 15–33, 1985.
- [13] KEMPE S., DEGENS E. T., An early soda ocean?, *Chem. Geol.*, **53**: 95–108, 1985.
- [14] KUNICKI-GOLDFINGER W. I. H., Evolution and endosymbiosis, [w] *Endocytobiology: Endosymbiosis and cell biology*, red. W. Schwemmler, H. E. A. Schenk, vol. 1, Walter de Gruyter, Berlin, New York 1980, 969–984.
- [15] KUŹNICKI L., Pochodzenie eukariota w aspekcie ewolucji cytoszkieletu i systemów ruchowych komórek, *Zeszyty Naukowe Univ. Jagiellońskiego*, 769, *Prace z zakresu biologii molekularnej*, **13**: 73–88, 1986.
- [16] KUŹNICKI L., Biologiczne sytemy ruchowe — ich geneza i występowanie, [w] *Komórka, jej budowa i ruch*, red. L. Kuźnicki, Wszechnica PAN, *Najnowsze Osiągnięcia Nauki, Ossolinium*, 1987, 239–267.
- [17] KUŹNICKI L., KUŹNICKI J., Speculation of evolution of mechanisms regulating actin and myosin interaction, *Acta Protozool.*, **18**: 91–107, 1979.
- [18] LAKE J. A., An alternative to archebacterial dogma, *Nature (London)*, **319**: 626, 1986.
- [19] LAKE J. A., Evolution of ribosome structures domains in archaebacteria, eubacteria, eocytes and eukaryotes, *Ann. Rev. Biochem.*, **54**: 507–530, 1986.
- [20] LAKE J. A., Origin of the eukaryotic nucleus determined by rate-invariant analysis of rRNA sequences, *Nature*, **331**: 184–186, 1988.
- [21] LAKE J. A., HENDERSON E., CLARK M. W., SCHEINMAN A., OAKES M. I., Mapping evolution with three dimensional ribosome structure, *Syst. Appl. Microbiol.*, **7**: 131–136, 1986.
- [22] LAST G. A., Musings on bacterial systematics: how many kingdoms of Life?, *ASM News*, **54**: 1, 22–26, 1988.
- [23] MARGULIS L., *Origin of eukaryotic cells*, Yale University Press, New Haven, 1970.
- [24] MARGULIS L., *Symbiosis in cell evolution: life and its environment on the early earth*, W. H. Freeman, San Francisco, 1981.
- [25] NANNEY D. L., The molecular diversity and evolutionary antiquity of the *Tetrahymena pyriformis* species complex, [w] *Progress in Protozool.*, Proc. VI Int. Congr. of Protozool., Special Vol. II of *Acta Protozool.*, 243–266, 1984.
- [26] OLSON J. M., PIERSON B. K., Photosynthesis 3.5 thousand milion years ago, *Photosynthesis Res.*, **9**: 251–259, 1986.
- [27] PENNY D., What was the first living cell?, *Nature*, **331**: 111–112, 1988.
- [28] PFLUG H. D., Early diversification of life in the Archean, *Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig.*, **C3**: 53–64, 1982.
- [29] PFLUG H. D., REITZ E., Earliest phytoplankton of eukaryotic affinity, *Naturwissenschaften*, **72**: 656–657, 1985.
- [30] ROBBINS E. I., PORTER K. G., HABERYAN K. A., Pellet microfossils: possible evidence for metazoan life in Early Proterozoic time. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82**: 5809–5813, 1985.

- [31] ROGERS J. H., Intron insertion in evolution, 4th Int. Congr. Cell Biol., Montreal, 14–19 August 1988, Abstracts 1988, 12, S11.2.
- [32] SCHOPF J. W., PACKER B. M., Early archeon (3.3 billion to 3.5 billion year old) microfossils from Warrawoona Group, Australia, *Science*, **237**: 70–73, 1987.
- [33] SCHWEMMLER W., Possible transitions from molecules to cells, *J. theor. Biol.*, **117**: 187–208, 1985.
- [34] SILVER R. B., Calcium regulation in mitosis, 4th Int. Cong. Cell Biol., Montreal, 14–19 August 1988, Abstracts 1988, 18, S23. 1.
- [35] TAYLOR F. J. R., Implications and extensions of the serial endosymbions theory of the origin of eukaryotes, *Taxon*, **23**: 229–258, 1974.
- [36] WOESE C. R., Bacterial evolution, *Microbiol. Rev.*, **51**: 221–271, 1987.
- [37] WOESE C. R., FOX G. E., Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdoms, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* **74**: 5088–5090, 1977.
- [38] WOESE C. R., OLSEN G. J., Archaeobacterial phylogeny: perspectives on the urkingdoms, *Syst. Appl. Microbiol.*, **7**: 161–177, 1986.
- [39] WOESE C. R., STACKEBRAND E., MACKE T. J., FOX G. E., A phylogenetic definition of the major eubacterial taxa. *Syst. Appl. Microbiol.*, **6**: 143–151, 1985.

Otrzymano: 29 marca 1989

Przyjęto: 10 kwietnia 1989

Adres autora: ul. Pasteura 3, 02–093 Warszawa

STRUMIEŃ CYTOPLAZMATYCZNY W CYKLU KOMÓRKOWYM *PARAMECIUM*, I. METODY OBSERWACJI

CYTOPLASMIC STREAMING IN CELL CYCLE OF *PARAMECIUM*. I. METHODS OF OBSERVATION

Marzena Maria ZAJĄCZKOWSKA

Zakład Biologii Komórki, Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego w Warszawie

Streszczenie. Orzęski z rodzaju *Paramecium* są bardzo dobrym modelem do badań wewnątrzkomórkowych przemieszczeń cytoplazmy. W artykule dyskutowana jest przydatność stosowanych dotychczas metod unieruchamiania orzęsków, ponieważ do obserwacji strumienia cytoplazmatycznego konieczna jest immobilizacja pływających osobników. Najszerzej opisana została najnowsza metoda unieruchamiania komórek *Paramecium*, która pozwala wykonać pomiary, unikając niedogodności metod dotychczas używanych. Oparta jest ona na naturalnej skłonności *P. bursaria*, szczególnie zaś dzielących się komórek i koniugujących par, do osiadania na podłożu szklanym. Pozwala ona na prawie ciągłą, a co najważniejsze długotrwałą obserwację oraz rejestrację zmian morfologicznych i dynamiki strumienia cytoplazmatycznego w różnych fazach cyklu życiowego.

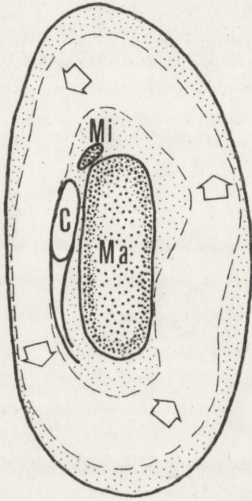
Summary. A very good model for studying cytoplasmic movements is *Paramecium*, however it vigorously swims what disturbs observations. The applicability of different immobilization methods to observations of cytoplasmic streaming in cell cycle is discussed. The novel immobilization method based on natural thigmotaxis of *P. bursaria* cells (first of all dividing cells and conjugating pairs) is described. It allows to avoid inconveniences of previously used immobilization methods and assure quite continuous and moreover long lasting observation and registration of morphological changes and dynamics of cytoplasmic streaming in different phases of cell cycle.

WPROWADZENIE

Ruchy cytoplazmy występują zarówno w komórkach roślinnych, jak i zwierzęcych, niezależnie od ich wielkości [1, 2, 17, 60, 65]. Ruchliwość cytoplazmy w formie przepływu jest bardzo istotna dla funkcjonowania komórek. Zapewnia ona bowiem kontakt reagujących ze sobą molekuł w takim tempie, które jest wymagane do zachodzenia procesów metabolicznych, a które mogłoby być zbyt powolne, gdyby jedynym sposobem przemiesz-

czania się cząstek była dyfuzja [60]. Sprawny transport wewnątrzkomórkowy zapewnia przemieszczenia organeli komórkowych i innych struktur w czasie całego życia komórki, a zwłaszcza w okresie różnicowania [3, 7, 35, 40, 43, 44, 56, 61].

U większości komórek ruchy cytoplazmy są powolne i pozornie chaotyczne, a stąd trudne do obserwacji. Aby móc badać przepływ cytoplazmy, trzeba dysponować obiektem wykazującym ściśle zdefiniowane i łatwe do śledzenia parametry tego ruchu. Warunek ten znakomicie spełnia orzęsek *Paramecium*, u którego strumień cytoplazmatyczny tworzy zamkniętą pętlę (cykloza) [43].



Ryc. 1 Schematyczny obraz komórki *Paramecium bursaria* w okresie międzypodziałowym. Liniami przerywanymi wyznaczono geometrię „kanału”, w którym płynie cytoplazma, a kierunek przepływu oznaczono strzałkami. Mi – mikronukleus, Ma – makronukleus, C – zagłębienie cytostomalne

Jak wykazano, prędkość ruchu cytoplazmy jest uzależniona od szeregu czynników egzogennych, z których najistotniejszymi są: temperatura otoczenia [32] oraz stężenie cząstek pokarmowych w środowisku [55, 57, 58, 59]. O ile czynniki te nie zmieniają się, to w komórkach interfazalnych *Paramecium* przez większość okresu międzypodziałowego prędkość i kierunek przepływu są stałe [44]. Stwierdzono natomiast zahamowanie ruchu cytoplazmy w komórkach dzielących się i koniugujących (*P. tetraurelia* [44, 48] i *P. bursaria* [27, 70]).

Ponieważ udokumentowana została zależność strumienia od cyklu komórkowego, interesujące jest prześledzenie dynamiki przemieszczeń cytoplazmy w różnych fazach cyklu życiowego komórki oraz w czasie koniugacji. Można oczekiwać, że zestawienie przebiegu zmian morfologicznych, jakim podlega komórka w fazie morfogenetycznej i popodziałowej [21], a także podczas koniugacji [64] ze zmianami parametrów strumienia cytoplazmatycznego, może przyczynić się do postępu w poszukiwaniach mechanizmu kontroli ruchu cytoplazmy. Brak bowiem dotychczas bezpośrednich danych wyjaśniających to zjawisko [45].

Aby przeprowadzić takie studia, niezbędna jest metoda, która pozwoliłaby na długotrwałe obserwacje komórek bez zakłócenia badanych procesów i która umożliwiłaby jednoczesne uwidocznienie zmian w komórce: w jej kształcie, długości, ułożeniu organeli wewnętrznych i przepływie cytoplazmy.

OBSERWACJA CYKLOZY

Strumień cytoplazmatyczny można obserwować za pomocą wskaźników ruchu cytoplazmy, jakimi są: mitochondria, nieosadzone trichocysty, kryształki oraz wodniczki pokarmowe. Przyjęto określać prędkość przepływu cytoplazmy, mierząc czas przemieszczania się kryształków o rozmiarach 1–3 μm , unoszonych strumieniem cytoplazmy na określonym odcinku [66]. Najprostszą metodą bezpośredniego pomiaru jest wyznaczanie czasu przepływu poszczególnych kryształków przy użyciu mikroskopu świetlnego ze skalą umieszczoną w okularze.

Wykorzystanie dwójłomności światła spolaryzowanego przez kryształki umożliwiło przy zastosowaniu mikroskopu polaryzacyjnego rejestrację fotograficzną toru poruszających się kryształków przy wydłużonym czasie naświetlania [46, 48]. Pomiar długości śladu pozwalał na określenie prędkości cytoplazmy unoszącej kryształki. Tą metodą przeprowadzono badania zachowania się cyklozy w czasie podziału komórkowego i koniugacji u *Paramecium tetraurelia* [48]. Metoda ta może jednak dać fałszywy obraz długości śladów pojedynczych kryształków. Dwójłomność związana jest bowiem z określonymi osiami kryształki, który obracając się, może być przez pewien moment niewidoczny i w ten sposób zaznaczyć ślad krótszy od rzeczywistego.

Rejestracja filmowa stała się znacznym udoskonaleniem metod badania ruchów cytoplazmy. Pozwoliła ona na przeprowadzenie analizy właściwości dynamicznych strumienia w różnych rejonach komórki w tym samym czasie [46, 51]. Do pomiarów tego typu stosowana była zmodyfikowana metoda Kamiyi [20] wykorzystywana uprzednio do pomiarów strumienia cytoplazmatycznego u śluzowca *Physarum polycephalum*.

Fotografia umożliwiła uwidocznienie cyklozy w całej komórce, tj. określenie, czy strumień występuje, czy też jest zatrzymany. Film natomiast daje możliwość dokładnego uwidocznienia geometrii „kanału”, którym płynie cytoplazma (na podstawie zmian kształtu dużych wodniczek pokarmowych, które wypełniają całe jego wnętrze). Dzięki filmowi można również zmierzyć prędkość cyklozy w różnych rejonach „kanału” i w warstwach współosiowych. Można także wyliczyć wydajność przepływu oraz wartość siły potrzebnej dla napędu strumienia [51]. Film pozwala także rejestrować zaburzenia przepływu pojedynczych kryształków [50].

Poważnym utrudnieniem obserwacji komórek *Paramecium* jest jednak ich ruchliwość. Osobniki stosunkowo szybko pływają, obracając się ponadto

wokół dłuższej osi komórki, co uniemożliwia śledzenie procesów zachodzących w jej wnętrzu. Stąd też konieczność unieruchamiania orzęsków w celu przeprowadzenia obserwacji strumienia cytoplazmatycznego.

METODY BADANIA CYKLOZY

Aby móc śledzić zmianę prędkości strumienia cytoplazmatycznego w czasie cyklu komórkowego u *Paramecium*, należy dysponować metodą unieruchamiania komórek, która pozwoliłaby na: 1) jak najmniejsze zaburzenia badanej fazy cyklu komórkowego (podziału bądź koniugacji), 2) ciągłą i długotrwałą obserwację tej fazy, 3) pomiary prędkości przepływu cytoplazmy w kolejnych jej stadiach.

Do immobilizacji komórek stosowano środowiska o zwiększonej lepkości, takie jak roztwory metylocelulozy [67, 68, 69] czy śluz z wiśni [34]. Wyższe niż 5% roztwory metylocelulozy są jednak toksyczne, natomiast niższe powodują utratę rzęsek, kiedy pierwotniaki przebywają w nich dłuższy czas [29]. Śluz wiśni zaburza obieg wodniczek pokarmowych [31]. W celu unieruchamiania orzęsków stosowano także alkohole: etylowy [52], który powoduje odrzęsienie komórek, propylowy i izopropylowy [13, 25, 26], które paraliżują pracę rzęsek oraz wodzian chloralu [28], odrzęsający komórki.

Najlepsze rezultaty uzyskuje się przy stosowaniu soli niklawych [49, 51]. Daje to możliwość obserwacji cyklozy w komórkach całkowicie unieruchomionych przez 30–45 min. Po upływie tego czasu komórki zaczynają się poruszać aż do całkowitej renormalizacji pływania [Sikora nie publikowane].

Do unieruchamiania komórek użyto także rozcieńczonych surowic odpornościowych względem antygenów powierzchniowych komórki, które powodują zlepianie się rzęsek *Paramecium* [30, 33, 44, 48]. Na sklejonych rzęskach osadzały się jednak cząstki zawiesiny ze środowiska, co utrudniało obserwację, a także było przeszkodą w rejestracji fotograficznej.

Dogodną metodą było również zakotwiczenie komórek karmionych cząstkami żelaza w polu magnetycznym o niskim natężeniu [42]. Komórki tak unieruchomione wykazywały jednak drgania, co utrudniało także śledzenie cyklozy.

W celu uniknięcia stosowania czynników chemicznych, być może mających zakłócający wpływ na strumień cytoplazmatyczny, wykorzystywano szereg metod mechanicznych, m.in. rotokompresor [61], w którym komórki uciskano, aby uniemożliwić im pływanie. Zniekształcało to jednak komórkę na tyle, że strumień był zakłócony lub całkiem zatrzymany.

W ostatnich latach stosowano także zakotwiczenie pierwotniaków dwiema szklanymi igłami [47]. Do pomiarów selekcionowano unieruchomione komórki o niezaburzonym strumieniu. Metoda ta jest jednak bardzo skomplikowana. Wymaga bowiem umieszczenia igieł w konkretnych punktach, tak aby nie

znalazły się one w przepływającej masie cytoplazmy, jak również w ten sposób, by nie uszkodziły zbyt wiele struktury wewnętrznej komórki.

Knowles [24] w doświadczeniach z mikroiniekcją w celu unieruchamiania pierwotniaków – dla precyzyjnego wprowadzenia mikroigieł – stosował „roztwór immobilizacyjny” złożony z roztworu Dryla i albuminy bydlęcej. Kersken i współpracownicy [22] zastosowali modyfikację tej metody: nie używali roztworu immobilizującego, a izolowali pierwotniaki do wiszących kropli środowiska. Komórki *Paramecium* następnie przyciskane były przy użyciu mikroigły do menisku kropli. Taka procedura powodowała jednak zaburzenia strumienia cytoplazmy, komórka była zbyt zniekształcona (uciśnięta). Zastosowano więc w celu unieruchamiania orzęsków surowicę przeciwko izolowanym rzęskom [22]. Metody te są jednak bardzo pracochłonne i wymagają specjalnego zestawu aparatury.

NAJNOWSZA METODA OBSERWACJI CYKLOZY W CYKLU KOMÓRKOWYM

Zadania, jakie powinna spełniać metoda unieruchamiania orzęsków, postawione na początku poprzedniego rozdziału, najlepiej chyba spełnia wprowadzona przez Krucińską i Sikorę metoda obserwacji osobników dzielących się i koniugujących par *P. bursaria* (prezentowana na XIV Zjeździe Polskiego Towarzystwa Zoologicznego w Szczecinie w 1987r.) [70]. W metodzie tej bardzo istotny jest dobór obiektu obserwacji. Gatunek *P. bursaria* okazał się najdogodniejszy zarówno ze względu na przydatność w badaniach cyklu komórkowego, jak i w obserwacjach samego przepływu cytoplazmy.

Paramecium było dotychczas obiektem wielu badań związanych z cyklem komórkowym [5, 6, 8–12, 18, 19, 21, 27, 53, 63, 64], szczególnie zaś licznych w ostatnich latach studiów dynamiki przekształceń cytoszkieletu w cyklu życiowym komórki. Pod względem zmian morfologicznych w komórce najobszerniej przebadany jest kompleks gatunków „aurelia” [6, 8, 9, 10, 53]. *P. bursaria* stanowi także doskonały obiekt do studiów cyklu życiowego, zarówno wegetatywnego, jak i generatywnego. Długi okres między kolejnymi podziałami (20–24 godz. w temp. 22–25°C) [18, 70] stwarza lepsze warunki do dokładnych badań cyklu komórkowego. Dla porównania czasy generacji innych pierwotniaków używanych do tego typu badań wynoszą w tych samych warunkach: *P. aurelia* – 5–6 godz., *P. caudatum* – 8 godz. [18]. Poszczególne fazy cyklu komórkowego u *P. bursaria* trwają dłużej niż u innych gatunków *Paramecium*. Na przykład określone procesy związane z podziałem [6, 21, 53] zachodzące u *P. aurelia* w ciągu 22 min., u *P. bursaria* trwają ponad godzinę [18, 70].

P. bursaria jest również bardzo dogodnym gatunkiem do badań nad koniugacją, gdyż charakteryzuje się dużą stałością typu płciowego [64]; u *P. bursaria* nie zanotowano także autogamii [64].

Obserwacje strumienia cytoplazmatycznego, rozpoczęte przez Wallengrena [54] i Nierensteina [38] na początku naszego stulecia, prowadzone były również głównie na grupie „aurelia”. Prace, w których materiałem doświadczalnym było *P. bursaria*, rozpoczęły się dopiero w 1979 r. [51]. Wydaje się jednak, że właśnie ten gatunek jest szczególnie dobrym modelem do badań ze względu na: 1) spłaszczony kształt komórki, co ułatwia obserwację jej wnętrza, 2) dużą prędkość przepływu cytoplazmy w porównaniu z innymi gatunkami (w temperaturze 25–27°C: *P. bursaria* – 5,4 μms^{-1} , *P. caudatum* – 3,4 μms^{-1} , *P. aurelia* – 2,5 μms^{-1} , *P. calkinsi* – 2,1 μms^{-1}) [66], co upraszcza uchwycenie i pomiary zmian szybkości strumienia cytoplazmatycznego.

Istotną przeszkodą z obserwacji strumienia cytoplazmy w komórkach *P. bursaria* są symbiontycznie związane z nimi *Chlorellae* [4, 36, 41, 64]. Są one równomiernie osadzone we wnętrzu komórki, stąd też istotnie utrudniają śledzenie przepływu cytoplazmy. Liczbę symbiontycznych glonów można wystarczająco ograniczyć, hodując komórki w ciemności [18, 62, 64]. Z hodowli prowadzonych w ciemności udaje się również izolować osobniki całkowicie pozbawione glonów [14, 18].

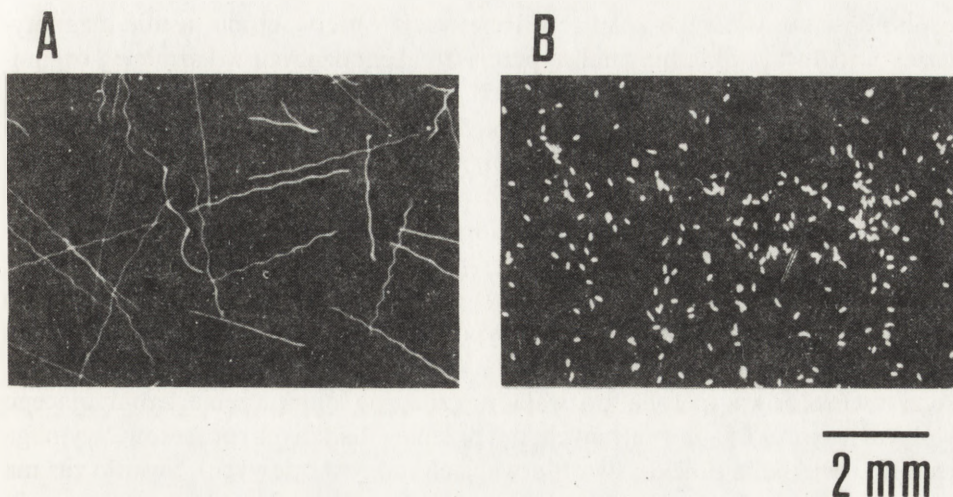
Nowa metoda oparta na naturalnej skłonności komórek *Paramecium* [23], szczególnie zaś podziałowców [63] oraz koniugujących par [70] do osiadania na podłożu stałym. Komórki *P. bursaria* po około 5 min. od umieszczenia ich na szklanych płytkach zaczynają wolniej pływać, a po około 15 min. ponad 60% osobników osiada nieruchomo na powierzchni płytki szklanej (tab. 1, ryc. 2).

Okresy, w których osiadłe komórki *P. bursaria* pozostają całkowicie nieruchome, mogą być przerywane okresami krótkotrwałego, powolnego „ślizgania się” na niewielkich odcinkach po powierzchni szkła. Stany bezruchu trwają nawet do kilkudziesięciu minut. Takie samo zachowanie się komórek stacjonarnych zarówno zdolnych do tworzenia par (mating-reactive), jak i niezdolnych do tworzenia par (mating non-reactive) obserwował Kitamura [23] na szalkach polistyrenowych. Odróżnia on jednak tigmataktyczne osiada-

TABELA 1
Procent osobników *Paramecium bursaria* osiadających na podłożu w zależności od czasu, jaki upłynął od ich umieszczenia na płytce szklanej oraz od fazy w cyklu życiowym

Faza cyklu życiowego	Czas (w min.)		
	5	15	45
Komórki dzielące się	5	89	98
Hodowla stacjonarna*	7	71	94
Hodowla logarytmiczna	11	60	87
Koniugujące pary	14	33	81

* – hodowla niezdolna do tworzenia par (mating non-reactive), prowadzona w ciemności.



Ryc. 2 Ślady torów ruchu komórek *Paramecium bursaria* po przeniesieniu ich na płytkę szklaną. Zdjęcia zrobione zostały w ciemnym polu przy czasie naświetlania 3 s w temp. pokojowej. Komórki pochodziły z hodowli stacjonarnej. A — 5 min. po przeniesieniu komórek na płytkę szklaną, B — po upływie 45 min. od umieszczenia ich na płytce

nie (thigmotaxis) *P. bursaria* na podłożu szklanym lub polistyrenowym od przywierania (attachment) do powierzchni polistyrenowych wykazywanego przez inne gatunki *Paramecium*. Przywieranie (attachment) do powierzchni polistyrenu można wywołać u *P. bursaria*, jedynie stosując substancje hydrofobowe [23] lub traktując komórki zdolne do łączenia się w pary trypsyną [23].

Spośród komórek *P. bursaria* pochodzących z hodowli w logarytmicznej fazie wzrostu najliczniej i na najdłuższe okresy osiadają osobniki dzielące się. Około 90% podziałowców osiada po 15 min. od momentu umieszczenia ich w małych kropkach środowiska na szkiełku podstawowym.

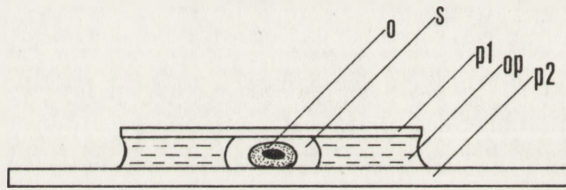
W omawianej metodzie małe kropelki środowiska (kultury) zawierające pojedyncze osobniki *P. bursaria* lub koniugujące pary umieszczane są na szkiełku podstawowym i następnie zalane olejem parafinowym. Po czym olej parafinowy nakrywany jest szkiełkiem przykrywkowym, co stwarza lepsze warunki optyczne do obserwacji.

Kropła, w której umieszczony jest orzęsek, staje się płaska. Jej grubość jest tak dobrana, aby mogła swobodnie przemieszczać się, natomiast by obroty wzdłuż dłuższej osi komórki były utrudnione (ryc. 3). Spłaszczony grzbieto-brzusznie osobniki *P. bursaria* doskonale nadają się do tego typu obserwacji. Komórki osiadają na powierzchni szkiełka podstawowego lub przykrywkowego.

Przy zastosowaniu różnych systemów optycznych można uwidocznić różne struktury oraz organele wewnątrz komórki. Możliwa jest obserwacja kilku

osobników w sąsiednich kroplach. Rejestracja obserwacji na taśmie magnetycznej umożliwia dokładną analizę przemian zachodzących w kształcie i organizacji wewnętrznej komórki w różnych jej rejonach równocześnie.

Nowa metoda obserwacji komórek *Paramecium*, umieszczonych w małych kroplach kultury, pozwala na długotrwałe (nawet kilkugodzinne) śledzenie zmian morfologicznych, zachodzących w czasie podziału komórkowego i koniugacji. Wykorzystanie naturalnej skłonności dzielących się komórek i koniugujących par do osiadania na powierzchni szklanej pozwoliło na ominięcie stosowania środków chemicznych czy mechanicznych wykorzystywanych do unieruchamiania komórek. Daje to wyjątkową możliwość obserwacji podziału komórkowego w prawie nie zakłóconych warunkach bytowania orzęsków. Aczkolwiek nowa metoda pozwala na znaczne ograniczenie zaburzającego wpływu czynników zewnętrznych na przebieg badanych procesów, wymaga jednak oświetlenia obiektu (w obserwacjach mikroskopowych). Światło zaś ma wpływ na zachowanie się całej komórki [15, 16, 37, 39, 64], konieczna jest wobec tego standaryzacja warunków oświetlenia.



Ryc. 3 Przekrój poprzeczny preparatu mikroskopowego do obserwacji przebiegu podziału komórkowego i koniugacji w osiadłych tigmotaktycznie komórkach *Paramecium bursaria* na podłożu szklanym. o — osobnik badany, op — olej parafinowy, s — środowisko, p1 — szkiełko nakrywkowe, p2 — szkiełko podstawowe (według Zajączkowskiej [70])

Opisana metoda umożliwia ciągle śledzenie przemian morfologicznych właściwych dla podziału komórkowego i koniugacji, ułatwia uwidocznienie zmian zachodzących zarówno na powierzchni komórki (zmian kształtu i długości komórki, tworzenie nowej gęby w czasie podziału komórkowego), jak i w jej wnętrzu (ruchy i zmiany kształtu jąder w czasie podziału komórkowego i koniugacji, dynamika cyklozy, tworzenie wodniczek pokarmowych). Zastosowanie jej pozwala na: 1) rozszerzenie wiadomości o podziale komórkowym i koniugacji uzyskanych dotychczas na materiale utrwalonym i barwionym [8, 21, 53]; 2) bezpośrednio ustalenie relacji między przemianami morfologicznymi a dynamiką strumienia cytoplazmatycznego.

LITERATURA

- [1] ALLEN N., ALLEN R. D., Cytoplasmic streaming in green plants, *Ann. Rev. Bioph. Bioeng.*, **7**: 497–526, 1978.
- [2] ALLEN R. D., ALLEN N., Cytoplasmic streaming in ameboid movement, *Ann. Rev. Bioph. Bioeng.*, **7**: 469–495, 1978.
- [3] AUFDERHEIDE K. J., Saltatory motility of uninserted trichocysts and mitochondria in *Paramecium tetraurelia*, *Science*, **198**: 299–300, 1977.
- [4] AYALA A., WEIS D. S., The effect of puromycin and cycloheximide on infection of algae-free *Paramecium bursaria* by symbiotic *Chlorellae*, *J. Protozool.*, **34**: (4), 377–381, 1987.
- [5] BEISSON J., ROSSIGNOL M., Movements and positioning of organelles in *Paramecium aurelia*, [w] *Molecular biology of nucleocytoplasmic relationships*, Elsevier Scientific Publishing Company – Printed in the Netherlands, 1975, 291–294.
- [6] BERGER J. D., The cell cycle and regulation of cell mass and macronuclear DNA content, [w] *Paramecium*, red. H.-D. Görtz, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, 1988, 97–119.
- [7] BERGER J. D., POLLOCK C., Kinetics of food vacuole accumulation and loss in *Paramecium tetraurelia*, *Trans. Am. Microsc. Soc.* **100**: 120–133, 1981.
- [8] COHEN J., Cytosquelette et relations cortex-noyaux chez la paramécie, teza doktorska, Université de Paris XI Centre d'Orsay, France, 1984.
- [9] COHEN J., ADOUTTE A., GRANDCHAMP S., HOUEBINE L.-M., BEISSON J., Immunocytochemical study of microtubular structures throughout the cell cycle of *Paramecium*, *Biol. Cell.*, **44**: 35–44, 1982.
- [10] COHEN J., BEISSON J., The cytoskeleton, [w] *Paramecium*, red. H.-D. Görtz, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, 1988, 363–392.
- [11] EHRET C. F., De HALLER G., Origin, development and maturation of organelles and organelle system of the cell surface in *Paramecium*, *J. Ultrastruct. Res.*, **6**: (Suppl.): 3–42, 1963.
- [12] GRAIN J., The cytoskeleton in Protists: Nature, structure, and Functions, *Int. Rev. Cytol.*, **104**: 153–249, 1986.
- [13] HOSOI T., Protoplasmic streaming in isolated pieces of *Paramecium*, *J. Facul. Asi.*, Sec. IV (Zool), **4**: 299–305, 1937.
- [14] IWATSUKI K., NAITOH Y., The role of symbiotic *Chlorella* in photoresponses of *Paramecium bursaria*, *Proc. Jap. Acad.*, B, **57**: 318–323, 1981.
- [15] —, Photoresponses in colorless *Paramecium*, *Experientia*, **38**: 1453–1454, 1982.
- [16] —, Behavioral responses in *Paramecium multimicronucleatum* to visible light, *Photochem. Photobiol.*, **37**: 415–419, 1983.
- [17] JACOBSON D. N., JOHNKE R. N., ADELMAN M. R., Studies on motility in *Physarum polycephalum*, [w] *Cell Motility B*, red. R. Goldman, T. Pollard, J. Rosenbaum, Cold Spring Harbor Confer. on Cell Proliferation, Cold Spring Harbor Lab., 1976, 749–769.
- [18] JUST E. von, Untersuchungen zur zeitlichen Ordnung der Syntheseleistungen in der Interphase von *Paramecium bursaria*, *Arch. Protistenk.*, **115**: 22–68, 1973.
- [19] JONES W. R., Oral morphogenesis during asexual reproduction in *Paramecium tetraurelia*, *Gent. Res.*, **27**: 187–204, 1976.
- [20] KAMIYA N., The rate of the protoplasmic flow in the myxomycete plasmodium, *Cytologia*, **15**: 194–204, 1950.
- [21] KANEDA M., HANSON E. D., Growth and morphogenetics events in the cell cycle of *Paramecium aurelia*, [w] *Paramecium*, a current survey, red. W. J. Wagtendonk, Elsevier Scientific Publishing Company, Amsterdam, London, New York, 1974, 219–262.
- [22] KERSKEN H., VILMART-SEUWEN J., MOMAYEZI M., PLATTNER H., Filamentous

- actin in *Paramecium* cells: mapping by phalloidin affinity labeling in vivo and in vitro, *J. Histochem. Cytochem.*, **34**: 443–454, 1986.
- [23] KITAMURA A., Attachment of mating reactive *Paramecium* to polystyrene surfaces: IV. Comparison of the adhesiveness among six species of the genus *Paramecium*, *Biol. Bull.*, **171**: 350–359, 1986.
- [24] KNOWLES J. K. C., An improved microinjection technique in *Paramecium aurelia*, *Exp. Cell Res.*, **88**: 79–87, 1974.
- [25] KOENUMA A., Study on cyclosis of *Paramecium*, *J. Shinshu Univ.*, **4**: 49–57, 1954.
- [26] —, The velocity distribution of the cyclosis in *Paramecium caudatum*, *Annotnes zool. jap.*, **36**: 66–71, 1963.
- [27] KRUCIŃSKA M., SIKORA J., Zmiany ruchliwości cytoplazmy i fagocytoza w dzielących się komórkach *Paramecium bursaria*, *Streszczenia referatów, XIV Zjazd Polskiego Towarzystwa Zoologicznego, Szczecin 1987*, 135.
- [28] KUŹNICKI L., Recovery in *Paramecium caudatum* immobilized by chloral-hydrate treatment, *Acta Protozool.*, **1**: 177–185, 1963.
- [29] —, Mechanisms of the motor responses of *Paramecium*, *Acta Protozool.*, **8**: 83–118, 1970.
- [30] KUŹNICKI L., SIKORA J., Cytoplasmic streaming within *Paramecium aurelia*, I. Movements of crystals after immobilization by antiserum, *Acta Protozool.*, **8**: 439–446, 1971.
- [31] —, The hypothesis of inverse relation between ciliary activity and cyclosis in *Paramecium*, *Acta Protozool.*, **11**: 243–250, 1972.
- [32] —, Cytoplasmic streaming within *Paramecium aurelia*, III. The effect of temperature on flow velocity, *Acta Protozool.*, **12**: 59–66, 1973.
- [33] KUŹNICKI L., SIKORA J., FABCZAK S., Cytoplasmic streaming within *Paramecium aurelia*. II. Cinematographic analysis of the course and reversible cessation of cyclosis, *Acta Protozool.*, **11**: 237–242, 1972.
- [34] LUBOCKA A., DEMBOWSKI J., Circulation of food vacuole in *Paramecium caudatum*, *Acta Biol. Expl.*, **15**: 19–25, 1950.
- [35] MAST S. O., The food vacuole in *Paramecium*, *Biol. Bull.*, **92**: 31–72, 1947.
- [36] MEIER R., LEFORT-TRAN M., POUPHILE M., REISSER W., WIESSNER W., Comparative freeze-fracture study of perialgal and digestive vacuoles in *Paramecium bursaria*, *J. Cell Sci.*, **71**: 121–140, 1984.
- [37] MATSUOKA T., SHIGENAKA Y., A possible mechanism of swimming acceleration induced by light stimulation in *Paramecium bursaria*, *Microbios*, **44**: 233–238, 1985.
- [38] NIRENSTEIN E., Beiträge zur Ernährungsphysiologie der Protisten, *Z. Allgem. Physiol.*, **5**: 435–510, 1905.
- [39] PADO R., Spectral activity of light and phototaxis in *Paramecium bursaria*, *Acta Protozool.*, **11**: 279–286, 1972.
- [40] PLATTNER H., WESTPHAL C., TIGGEMANN R., Cytoskeleton-secretory vesicle interaction during the docking of secretory vesicles at the cell membrane in *Paramecium tetraurelia* cells, *J. Cell Biol.*, **92**: 368–377, 1982.
- [41] REISSER W., Host-symbiont interaction in *Paramecium bursaria*: Physiological and morphological features and their evolutionary significance, *Ber. Dtsch. Bot. Ges.*, **94**: 557–563, 1981.
- [42] SIKORA J., A new method of locomotion arresting in some ciliates without ciliary immobilization, *Acta Protozool.*, **13**: 421–424, 1975.
- [43] —, Okrężny strumień cytoplazmatyczny w komórkach *Paramecium*. I. Ogólna charakterystyka, *Post. Biol. Kom.*, **8**: 37–43, 1981.
- [44] —, Okrężny strumień cytoplazmatyczny w komórce *Paramecium*. II. Właściwości dynamiczne, *Post. Biol. Kom.*, **8**: 45–64, 1981.

- [45] —, Okrężny strumień cytoplazmatyczny w komórce *Paramecium*. III. Wpływ czynników modyfikujących, *Post. Biol. Kom.*, **8**: 65–85, 1981.
- [46] —, Cytoplasmic streaming in *Paramecium*, *Protoplasma* **109**: 57–77, 1981.
- [47] SIKORA J., KUBALSKI A., WASIK A., KUŹNICKI J., The role of mechanical stimuli in the control of cytoplasmic streaming in *Paramecium bursaria*, *Post. Biol. Kom.*, **11**: 543–546, 1984.
- [48] SIKORA J., KUŹNICKI L., Cytoplasmic streaming within *Paramecium aurelia*, IV. Cyclosis during binary fission and conjugation, *Acta Protozool.*, **15**: 173–178, 1976.
- [49] SIKORA J., WASIK A., Cytoplasmic streaming within Ni^{2+} immobilized *Paramecium aurelia*, *Acta Protozool.*, **17**: 389–397, 1978.
- [50] SIKORA J., WASIK A., ALLEN R. D., The role of single particle saltations in *Paramecium* cytoplasmic streaming, *Acta Protozool.*, **18**: 201, 1979.
- [51] SIKORA J., WASIK A., BARANOWSKI Z., The estimation of velocity distribution profile of *Paramecium* cytoplasmic streaming, *Eur. J. Cell Biol.*, **19**: 184–188, 1979.
- [52] SONNEBORN T. M., *Methods in Paramecium research*, [w] *Methods of Cell Physiology*, **4**: Academic Press, New York 1970, 242–335.
- [53] TUCKER J. B., BEISSON J., ROCHE D. L. J., COHEN J., Microtubules and control of macronuclear „amitosis” in *Paramecium*, *J. Cell Sci.*, **44**: 135–151, 1980.
- [54] WALLENGREN H. F. S., Inanitionserscheinungen der Zelle, *Z. Allgem. Physiol.*, **1**: 67–128, 1902.
- [55] WASIK A., Effect of external agents on cytoplasmic streaming in *Paramecium*. I. Influence of carmine suspension, *Acta Protozool.*, **22**: 183–189, 1983.
- [56] —, Czy można regulować tempo fagocytozy u orzęsków?, *Post. Biol. Kom.*, **15**: 153–170, 1988.
- [57] WASIK A., SIKORA J., Effect of external agents on cytoplasmic streaming in *Paramecium*. II. Influence of media free of suspension, *Acta Protozool.*, **23**: 107–113, 1984.
- [58] —, Effect of external agents on cytoplasmic streaming in *Paramecium*, III. Influence of endocytosis cessation, *Acta Protozool.*, **23**: 115–121, 1984.
- [59] WASIK A., SIKORA J., KUŹNICKI L., Effects of different suspensions on phagocytosis and cytoplasmic streaming in *Paramecium bursaria*, *Post. Biol. Kom.*, **11**: 529–532, 1984.
- [60] WHEATLEY D. N., On the possible importance of intracellular circulation (a mini review), *Life Sciences*, **34**: (4): 299–307, 1985.
- [61] WICHTERMAN R., Cytogamy: A sexual process occurring in living joined pairs of *Paramecium caudatum* and its relation to other sexual phenomena, *J. Morphol.*, **66**: 423–451, 1940.
- [62] —, Conjugation and fate of exconjugants of zoochlorellae free *Paramecium bursaria*, *Anat. Roc.*, **87**: 50, 1943.
- [63] —, A method for obtaining abundant dividing stages of *Paramecium*, *Trans. Am. Microsc. Soc.*, **71**: 303–305, 1952.
- [64] —, *The biology of Paramecium*, drugie wydanie, Plenum Press, New York and London, 1986, 1–592.
- [65] WILLIAMSON R. E., Cytoplasmic streaming in *Chara*: a cell model activated by ATP and inhibited by cytochalazin B, *J. Cell Sci.*, **17**: 655–668, 1975.
- [66] YAMADA K., A comparative study on the cyclosis in *Paramecium*, *J. Sci. Hirosh. Univ., Ser. B, Div. 1*, **22**: 1–153, 1969.
- [67] —, Influence of specific SH-blocking reagent, p-chloro-mercuribenzoate on cyclosis in *Paramecium*, *J. Sci. Hirosh. Univ., Ser. B, Div. 1*, **23**: 1–15, 1970.
- [68] —, Effects of 2,4-dinitrophenol on cyclosis and vacuolar output of water in *Paramecium caudatum*, *J. Sci. Hirosh. Univ., Ser. B, Div. 1*, **25**: 243–257, 1974.

- [69] YAMASHITA Y., Effects of mechanical deformation and electric current on protoplasmic streaming in *Paramecium*, Zool. Mag., 73: 39-44, 1964.
- [70] Zajączkowska M. M., Cytoplasmic motility throughout the cell cycle in *Paramecium*. I. Changes of the cytoplasmic streaming during cell division, (w przygotowaniu).

Otrzymano: 21 września 1988

Przyjęto: 20 kwietnia 1989

Adres autorki: ul Pasteura 3, 02-097 Warszawa

INFORMACJE DLA AUTORÓW

POSTĘPY BIOLOGII KOMÓRKI drukują artykuły przeglądowe w języku polskim, omawiające najnowsze osiągnięcia w dziedzinie biologii komórki, nie publikowane dotąd w innych wydawnictwach. Autorzy odpowiadają za ścisłość podawanych informacji. Obowiązuje terminologia zgodna z polskim mianownictwem biologicznym, histologicznym, anatomicznym i embriologicznym.

Artykuły drukowane w POSTĘPACH BIOLOGII KOMÓRKI nie mogą być bez zgody Redakcji publikowane w innych periodykach.

Tekst pracy i wszystkie załączniki należy przesyłać w dwóch egzemplarzach. Objętość tekstu (bez rycin, tabel i literatury) nie powinna przekraczać 20 stron maszynopisu. Maszynopis powinien być pisany jednostronnie na papierze formatu A4 z podwójną interlinią i marginesem 4 cm po lewej stronie. Wszystkie strony powinny być kolejno numerowane. W tekście nie należy robić żadnych podkreśleń.

Pierwsza nie numerowana strona przeznaczona jest dla redakcji i powinna zawierać: imiona i nazwiska autorów oraz ich tytuły naukowe, adresy pracy i domowe wraz z telefonami, tytuł pracy w języku polskim i angielskim oraz liczbę stron maszynopisu, liczbę tabel i rycin. Na stronie tytułowej należy podać kolejno tytuł pracy w języku polskim i angielskim, imiona (w pełnym brzmieniu) i nazwiska autorów, nazwę zakładu naukowego, nazwisko i adres autora prowadzącego korespondencję, nazwisko i adres autora wysyłającego nadbitki, informację o dofinansowaniu pracy oraz skrót tytułu (do 40 znaków). Następną stroną powinna zawierać streszczenie (do 150 słów) oraz słowa kluczowe (3 do 10 słów zgodnych z terminami w *Medical Subject Headings* podanymi w *Index Medicus*, o ile słowa te są tam zawarte). Streszczenie i słowa kluczowe powinny być przedstawione także w języku angielskim. W tytule i streszczeniu stosować jedynie powszechnie przyjęte skróty, np. DNA.

Tekst artykułu rozpocząć od nowej strony. W tekście nie zamieszczać żadnych tabel, schematów lub rycin, lecz jedynie zaznaczenia ołówkiem na marginesie o ich lokalizacji (np. tab. 1, ryc. 1 itp.). Dla przejrzystości, tekst można podzielić na numerowane i tytułowane rozdziały (1, 2 itd.) i podrozdziały (1.1, 1.2 itd.) Od nowej strony należy podać spis literatury, podany w porządku alfabetycznym. Skróty nazw czasopism podawać według *Index Medicus* (listy czasopism publikowane są corocznie w numerze styczniowym). Powoływanie w tekście następuje przez podanie kolejnego numeru spisu literatury, np. (5). Spis literatury należy podać alfabetycznie wg wzoru:

1. Hnilica LS, McClure ME, Speltzberg TC. Histone biosynthesis and the cell cycle. In: Philips DMP, Schwartz E, eds. Histone and Nucleohistones. London, New York: Philips, Plenum Press, 1977, 60–64.
2. Sachsenmayer W, Remy U, Plattner R. Initiation of synchronous mitosis in *Physarum*. *Exptl Cell Res* 1980; 2: 41–48.

Tabele, opisy schematów i rycin dołączyć na oddzielnych kolejno numerowanych stronach. Schematy i rysunki mogą być wykonane w postaci nadającej się do reprodukcji lub przerysowania. Fotografie powinny być kontrastowe i wykonane na błyszczącym papierze. Wymiary poszczególnych rycin i schematów nie powinny przekraczać 125 × 190 mm. Jeżeli załączniki są zapożyczone z innych źródeł, należy podać ich pochodzenie. Wszystkie załączniki podpisać na odwrocie pierwszym nazwiskiem autora i oznaczeniem kierunku reprodukcji (np. góra).

Stosowane jednostki podawać w układzie SI.

Redakcja zastrzega sobie prawo dokonywania skrótów, uzgodnionych uprzednio z autorem.

Autor zobowiązany jest do zrobienia korekty autorskiej i zwrócenia jej w ciągu 3 dni. Koszty spowodowane zmianami tekstu w korekcie, poza poprawkami błędów drukarskich, ponosi Autor.

Artykuły honorowane są według ustalonych stawek, autorzy otrzymują bezpłatnie 25 odbitek.

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 PBK XIII Oddział w Warszawie nr 370044-1195-139-11. Wysyłka za granicę pocztą zwykłą jest droższa od prenumeraty krajowej o 50% dla zleceniodawców indywidualnych i o 100% dla zlecających instytucji i zakładów pracy.

Terminy przyjmowania 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

Z. LEWICKI, A. SULIKOWSKA, R. FIGURSKI, W. KOCJASZ, Somatostatyna: produkcja, wydzielanie i działanie na komórki docelowe, zwłaszcza w układzie pokarmowym	269
P. KALIŃSKI, Kontrola aktywności limfocyту B w rozwoju humoralnej odpowiedzi immunologicznej	285
L. KUŹNICKI, Wczesna ewolucja komórek eukariotycznych – fakty i hipotezy	323
M. M. ZAJĄCZKOWSKA, Strumień cytoplazmatyczny w cyklu komórkowym <i>Paramecium</i> . I. Metody obserwacji	335