

P2435
PL ISSN 0324-833X

POLSKIE
TOWARZYSTWO
ANATOMICZNE

Postępy Biologii Kłmórki

TOM 19-NR 3'92
(185–276)



Kwartalnik Polskiego Towarzystwa Anatomicznego wydawany z pomocą finansową Polskiej Akademii Nauk

Redaguje Kolegium:

Szczepan BILIŃSKI, Jerzy KAWIAK, Maciej KAWALEC, Wincenty KILARSKI,
Jan MICHEJDA, Maria OLSZEWSKA, Maciej ZABEL

Rada Redakcyjna:

Zofia OSUCHOWSKA – przewodnicząca, Mieczysław CHORAŻY, Leszek CIECIURA,
Antoni HORST, Aleksander KOJ, Włodzimierz KOROHODA, Leszek KUŹNICKI,
Olgierd NARKIEWICZ, Aleksandra PRZEŁĘCKA, Aleksandra STOJAŁOWSKA,
Lech WOJTCZAK

*Adres Redakcji: Centrum Medyczne Kształcenia Podyplomowego ul. Marymoncka 99,
01-813 Warszawa*

Fundacja •Rozwój SGGW-AR•

Ark. wyd. 8,7 Ark. druk. 5,75 Oddano do składu w maju 1992 r. Podpisano do druku w lipcu 1992 r. Druk ukończono w sierpniu 1992 r.

■ W tym zeszycie • Postępów Biologii Komórki •

- Regulacja krwiotworzenia w dalszym ciągu jest przedmiotem wielu badań. Niedawno odkryto czynnik wzrostowy komórek macierzystych (ang. *stem cell factor*) produkowany w szpiku kostnym przez komórki fibroblastoidalne. Czynniki wzrostowe komórek macierzystych uważa się za ważny regulator, który wraz z innymi cytokinami wpływa na proliferację i różnicowanie komórek hemopoetycznych. Komórkowy receptor dla czynnika wzrostowego komórek macierzystych określany jako c-kit jest opisany w artykule na stronach 187–204.
- Aktualny stan wiedzy na temat regulacji endokrynowej, para- i auto-krynowej w gonadzie męskiej przedstawiono na stronach 205–220. Postępy biochemicznych metod immunocytochemicznych, a także rozwój technik *in vitro* pozwoliły na znacznie głębsze spojrzenie na to złożone zagadnienie.
- Cytometria przepływowa jest jedną z nowoczesnych technik badania populacji komórek. Jest stosowana do rozwiązywania problemów biologii komórki, jak i praktycznych problemów lekarskich. Przykłady wykorzystania tej techniki omówiono na stronach 239–256.
- Obecnie znany jest gen najczęstszej choroby autosomalnej recesywnej, rasy białej – mukowiscydozy. O białkowym produkcie tego genu, próbach terapii genowej i podstawach nowoczesnej diagnostyki można przeczytać na stronach 265–275.

ROLA RECEPTORA C-KIT I JEGO LIGANDU W REGULACJI PROCESÓW KRWIOTWORZENIA U CZŁOWIEKA

ROLE OF THE C-KIT RECEPTOR AND ITS LIGAND IN REGULATION OF HUMAN HEMATOPOIESIS

Mariusz Z. RATAJCZAK, Selina M. LUGER, Alan M. GEWIRTZ

Pracownia Hematologii Molekularnej Zakładu Patologii Uniwersytetu Pensylwania, Filadelfia

Streszczenie. Receptor c-kit należy do grupy receptorów powierzchniowych komórki mających aktywność kinazy tyrozynowej. Występuje on m.in. na wczesnych komórkach układu krwiotwórczego w szpiku kostnym. Szereg obserwacji doświadczalnych wskazuje na jego kluczową rolę w regulacji krwiotworzenia. Niedawno udało się zidentyfikować ligand stymulujący komórki poprzez receptor c-kit. Ligand ten został nazwany czynnikiem wzrostowym komórek macierzystych (ang. *stem cell factor* – SCF). Produkowany jest w szpiku kostnym przez komórki fibroblastoidalne. Przyjmuje się, że jest on jednym z kluczowych składników mikrośrodowiska krwiotwórczego szpiku kostnego i współdziała z innymi cytokinami na wczesnych etapach mielopozy regulując proliferację i różnicowanie komórek hemopoetycznych. Bezpośrednie dane doświadczalne wskazują, że spośród ludzkich komórek krwiotwórczych, komórki ukierunkowane układu czerwono krwinkowego wydają się być najbardziej wrażliwe na ewentualne zaburzenia w transdukcji sygnału poprzez receptor c-kit.

Summary. The c-kit protooncogene encodes a tyrosine kinase receptor which is expressed on many types of human cells, including ~4 % of bone marrow mononuclear cells. Data is accumulating about the role of the kit receptor in the development of human hemopoietic progenitors at different levels of maturation and commitment. It is known that the kit receptor is stimulated by the growth hormone known in literature as stem cell factor (SCF), mast cell growth factor (MGF) or Steel factor (SF). This ligand is produced in a membrane bound and soluble form by bone marrow stromal cells and seems to be an important component of the marrow hemopoietic microenvironment. It acts on pre-CFU and CFU cells in combination with other cytokines and synergistically enhances the clonal growth of myeloid progenitors. Using the oligodeoxynucleotide antisense strategy we were able to demonstrate that the development and proliferation of human erythropoietic progenitors seems to be extremely sensitive to abrogation of the c-kit protooncogene, even when the cells are not stimulated in culture with SCF. Inhibition of CFU-GM colony formation by normal bone marrow cells has been seen only when SCF was used in cultures as a costimulator. The kit receptor is also important in proliferation of malignant hemopoietic cells and according to our results, CFU-GM from patients with myeloproliferative disorders (CML – Chronic Myelocytic Leukemia, PV – Polycythemia vera) seem to be extremely sensitive to kit receptor depletion.

Wykaz skrótów stosowanych w pracy. AIDS (*Aquired Immunodeficiency Syndrome*) – zespół nabytego upośledzenia immunologicznego; bFGF (*Basic Fibroblast Growth Factor*) – czynnik wzrostowy fibroblastów; BFU-E (*Burst Forming Unit of Erythrocytes*) – wczesna komórka układu czerwonekrwinkowego tworząca in vitro 14 dnia hodowli duże kolonie erytroidalne; CFU-E (*Colony Forming Unit of Erythrocytes*) – bardziej zróżnicowana od BFU-E komórka układu czerwonekrwinkowego tworząca in vitro 7 dnia hodowli małe kolonie erytroidalne; CFU-GM (*Colony Forming Unit of Granulocyto-Macrophages*) – wczesna komórka układu granulocytowo-makrofagowego tworząca in vitro 11 dnia hodowli kolonie granulocytowo-makrofagowe; CFU-Meg (*Colony Forming Unit of Megacaryocytes*) – wczesna komórka układu megakariocytarnego tworząca 11 dnia hodowli in vitro kolonie megakariocytarne; CFU-MIX (*Colony Forming Unit of Mixed Lineages*) – jedna z wcześniejszych komórek układu krwiotwórczego tworząca 15 dnia hodowli in vitro kolonie składające się z krwinek czerwonych, granulocytów, makrofagów i megakariocytów; CSF-1 (*Colony Stimulating Factor-1*) – makrofagopoetyna; EGF (*Epidermal Growth Factor*) – czynnik wzrostowy pochodzenia nabłonkowego; EPO – erytropoetyna; MGSA (*Melanocyte Growth Stimulating Activity*) – czynnik stymulujący wzrost melanocytów; PDGF (*Platelet Derived Growth Factor*) – czynnik wzrostowy pochodzenia płytkowego; GM-CSF (*Granulocyto-Macrophages Colony Stimulating Factor*) – granulocytowo-makrofagopoetyna; IL-3 – interleukina 3; KL – ligand receptora c-kit; TNF (*Tumor Necrosis Factor*) – czynnik powodujący martwicę nowotworu.

WSTĘP

Protoonkogen c-kit koduje receptor komórkowy mający aktywność kinazy tyrozynowej. Receptor ten wykazuje podobieństwo strukturalne do receptora makrofagopoetynowego (CSF-1R) oraz receptora płytkowego czynnika wzrostowego (PDGFR) [19, 71]. Wraz z nimi zaliczany jest wg Ullricha do grupy III receptorów tyrozynowych [86]. Receptor c-kit ulega ekspresji m.in. w: mózgu, płucach, gonadach, wątrobie, skórze, grasicy, węzłach chłonnych, śledzionie [71] oraz w szpiku kostnym [73], w którym odgrywa istotną rolę w regulacji wzrostu i różnicowania komórek krwiotwórczych. Uważa się, że od prawidłowej jego funkcji zależy żywotność i zdolność proliferacji wczesnych komórek układu krwiotwórczego [59]. Na komórki bardziej dojrzałe sygnał receptora c-kit oddziałuje w sposób synergistyczny wspólnie z sygnałami pochodzącymi z receptorów innych cytokin. Ostatnio udało się zidentyfikować czynnik wzrostowy będący ligandem receptora c-kit [28, 46, 55, 93, 94, 96, 97]. Nosi on różne nazwy i znany jest w literaturze jako: czynnik komórek macierzystych (ang. *stem cell factor*) [55, 96, 97], czynnik wzrostowy komórek tucznych (ang. *mastocyte growth factor*) [28] lub ligand receptora c-kit (ang. *kit ligand*) [46, 93]. W niniejszej pracy przyjmiemy to ostatnie określenie.

U myszy opisano szereg mutacji obejmujących zarówno gen kodujący receptor c-kit (locus *w*) jak i jego ligand (locus *sl*) [77]. Zwierzęta dotknięte powyższymi schorzeniami wykazują przede wszystkim zaburzenia rozwojowe komórek melanocytynych powłok skórnych przejawiające się fenotypowo bielactwem sierści u homozygot i plamistymi odbarwieniami u heterozygot. Najcięższe formy mutacji w loci: *w* i *sl* wywierają również wpływ na komórki rozrodcze i krwiotwórcze. Efektem tych zaburzeń jest bezpłodność, anemia makrocytarna i niedobór komórek tucznych [34, 77]. Pomimo że zmiany dotyczące układu czerwonekrwinkowego i mastocytów są najbardziej nasilone, opublikowano również dane świadczące o zaburzeniach w obrębie innych linii komórkowych układu krwiotwórczego [49, 76, 92]. Ostatnio udało się zidentyfikować szczep szczurów mających mutację genu kodującego receptor c-kit [63, 83]. Podobnie jak myszy, szczurze mutanty wykazują bielactwo sierści, objawy anemii makrocytarnej i brak komórek tucznych.

Dane, uzyskane z badań układu krwiotwórczego gryzoni dotkniętych mutacjami w loci: *w* i *sl*, pozwalają przypuszczać, że receptor c-kit powinien pełnić analogicznie również istotną rolę w hemopoezie u ludzi. Jak wiadomo, receptor c-kit występuje na wczesnych komórkach układu krwiotwórczego człowieka [9, 20, 73], a jego ligand jest produkowany przez komórki tworzące podścielisko krwiotwórcze w szpiku kostnym [5, 41]. Nagromadzone w ostatnim czasie bezpośrednie dane eksperymentalne potwierdzają ważną rolę układu: c-kit receptor - kit ligand podczas fizjologicznej, jak i patologicznej proliferacji komórek krwiotwórczych [17, 21, 67, 73].

Ostatnio wykazano, że niektóre z przypadków tzw. zespołu Piebalda u ludzi są wynikiem mutacji w obrębie genu kodującego receptor c-kit [33, 35]. Opisani osobnicy będący heterozygotami odnośnie zmutowanego genu wykazują plamiste odbarwienia powłok skórnych i włosów będące wynikiem zaburzeń w rozwoju i migracji melanocytów. Jak dotąd jednak nie stwierdzono u nich zaburzeń w obrębie układu krwiotwórczego. Interpretując te dane należy pamiętać, że u gryzoni tylko najcięższe formy mutacji i zwykle w postaci homozygotycznej objawiają się defektami ze strony hemopoezy [30]. Niekiedy w celu stwierdzenia zaburzeń w lżejszych postaciach mutacji, jak np.: u myszy W^{44J}/W^{44J} , niezbędne jest wykonanie specjalnych testów czynnościowych [12]. Można więc przyjąć, że opisane dotychczas heterozygotyczne postacie mutacji c-kit u chorych z zespołem Piebalda są prawdopodobnie "zbyt słabe", aby przejawić się diagnostycznie zmianami w układzie krwiotwórczym. Nie można również wykluczyć, że najcięższe postacie takich mutacji u ludzi są bezwzględnie letalne, a dotknięte nimi płody giną wewnątrzmacicznie. Innymi zespołami podejrzanymi o zaburzenia funkcji receptora c-kit lub jego ligandu są: anemia Diamonda-Blackfana i zespół Waarburga [35, 66]. W przypadku obu zaburzeń nie stwierdzono jednak narazie u chorych zmian strukturalnych w obrębie odpowiednich genów [1, 11].

Zakładając, że do tej pory u ludzi nie udało się jeszcze zidentyfikować najcięższych postaci mutacji w obrębie genów kodujących receptor c-kit i jego ligand, podjęto różne strategie badań doświadczalnych mające wyjaśnić rolę receptora c-kit w ludzkiej hemopoezie.

Badania te polegają z jednej strony na bezpośrednim badaniu wpływu ligandu receptora c-kit na dojrzewanie i wzrost klonalny komórek ludzkiego szpiku w hodowlach prowadzonych *in vitro* [14, 17, 21, 29]. Z drugiej strony próbuje się zaburzyć czynność receptora c-kit w testach *in vitro* za pomocą odpowiednich przeciwciał blokujących [8, 22, 67] lub wyłączając ekspresję samego genu na poziomie rybosomalnej translacji jego mRNA za pomocą oligodeoksynukleotydów mających budowę antysensową [25, 73]. Należy również nadmienić, że w przypadku zwierząt doświadczalnych, w tym z grupy naczelnych, podjęto pierwsze próby mające ocenić wpływ podawanego *in vivo* ligandu receptora c-kit na czynność układu krwiotwórczego [6, 85].

Celem pracy jest omówienie danych literaturowych i badań własnych dotyczących roli receptora c-kit w procesie fizjologicznego i patologicznego krwiotworzenia.

PODSTAWY MOLEKULARNE EKSPRESJI RECEPTORA C-KIT

Gen kodujący receptor c-kit mieści się u człowieka na długim ramieniu chromosomu 4 w segmencie 11–12 (4q 11–12) [95] w bezpośrednim sąsiedztwie genu dla receptora typu AA płytkowego czynnika wzrostowego (PDGF) [45]. Na tym samym ramieniu mieszczą się

również geny kodujące niektóre cytokiny i czynniki wzrostowe ważne w regulacji proliferacji komórek m.in. geny dla: nabłonkowego czynnika wzrostowego (EGF), czynnika wzrostowego fibroblastów (bFGF), interleukiny 2 (IL-2), interleukiny 8 (IL-8), czynnika płytkowego 4 (PF 4) i czynnika stymulującego wzrost melanocytów (MGSA) [7].

Gen kodujący receptor c-kit składa się z 23 eksonów [95]. W regulacji ekspresji tego genu w ludzkich komórkach hemopoetycznych odgrywa istotną rolę interleukina 4 (IL-4) [80]. Cytokina ta zmniejsza ekspresję receptora na komórkach zdrowego szpiku, jak i na blastach białaczkowych. Wszystkie inne testowane do tej pory cytokiny i czynniki wzrostowe (interleukiny od 1 do 9 włącznie, makrofago-, granulocyto-, makrofago-granulocytopoetyny, jak interferon- alfa i TNF - beta) nie zmniejszają ekspresji tego receptora na powierzchni ludzkich komórek hemopoetycznych. Z badań własnych wynika, że ekspresja c-kit w komórkach zdrowego szpiku jest zależna od aktywności metabolicznej samych komórek [73]. Jest ona słaba w komórkach głodzonych i przechowywanych w 4°C. W 2 godziny po stymulacji komórek surowicą, IL-3 i EpO obserwowaliśmy wzrost ekspresji receptora c-kit, który w 24 godziny po ekspozycji osiągał szczyt [73].

Zgromadzono już pierwsze dane doświadczalne dotyczące molekularnej regulacji transkrypcji tego genu na poziomie chromosomalnego DNA. Z badań tych wynika, że cis regulatorowe elementy promotora znajdują się na wysokości od -37 do -560 par zasad od miejsca inicjacji transkrypcji [48]. Analiza sekwencyjna powyższego fragmentu promotora genu c-kit uwidoczniła obecność sekwencji DNA wiążących białko GATA-1. Białko to, jak wiadomo, jest jednym z białek regulujących transkrypcję DNA i pełni ważną rolę w transkrypcji m.in.: genu kodującego receptor erytropoetynowy, jak i genów odpowiedzialnych za syntezę łańcuchów globinowych [27, 31]. Mysie komórki embrionalne mające mutacje genu kodującego GATA-1 różnicują się w kierunku wszystkich linii mielopoetycznych z wyjątkiem krwinek czerwonych [69]. Dalszych badań wymaga oczywiście wyjaśnienie, na ile w GATA-1 zmutowanych komórkach embrjonalnych zaburzenia erytropoezy wynikają bezpośrednio z zaburzeń w ekspresji genów dla receptora erytropoetynowego i globiny, a ile z zaburzeń w ekspresji samego receptora c-kit.

Z badań własnych wynika, że w regulacji transkrypcji protoonkogenu c-kit odgrywa kluczową rolę również inne białko wiążące się z DNA – białko c-myb [73]. Eliminując ekspresję genu c-myb na poziomie translacji rybosomalnej jego mRNA za pomocą swoistych antysensów udało się nam zahamować w komórkach spoczynkowych ludzkiego szpiku kostnego wzrost ekspresji receptora c-kit stymulowany przez surowice, IL-3 i EpO. Z danych literaturowych wiadomo z kolei, że myszy transgeniczne mające mutacje w obrębie genu c-myb nie są zdolne do życia pozamacicznego i fenotypowo przypominają zwierzęta z wrodzoną mutacją receptora c-kit [61]. Badania sekwencyjne genu c-kit ujawniły ostatnio w 1 intronie genu tuż przed początkiem 2 eksonu obecność dwóch sekwencji w chromosomalnym DNA wiążących c-myb (Vandenbark informacja ustna). Tak więc rozpoczęta transkrypcja 1 z 23 eksonów przed rozpoczęciem transkrypcji 2 eksonu może być regulowana w tym miejscu przez białko c-myb. Poparcie tej hipotezy wymaga dalszych badań przy użyciu takich metod, jak: *gel shift*, *footprinting*, badania wykorzystujące mutagenezę tego fragmentu DNA, jak i badania typu *run on*.

Produktem transkrypcji genu c-kit jest mRNA wielkości ~5,5 kb. Zawiera on informacje służące do syntezy łańcucha polipeptydowego składającego się z 976 aminokwasów [95]. Łańcuch ten tworzy białko receptorowe o ciężarze cząsteczkowym ~145 kd. Można w nim wyróżnić domeny: zewnątrzkomórkową, śródbłonową i wewnątrzkomórkową. Domena

zewnątrzkomórkowa receptora zbudowana jest z 497 aminokwasów i poprzedzona jest 23-aminokwasowym odcinkiem hydrofilowym. Część zewnątrzkomórkowa receptora składa się z 5 immunoglobulinowo podobnych fragmentów, szeregu miejsc ulegających N-glikolizacji oraz wewnątrzcząsteczkowych mostków dwusiarczkowych [54]. Część śródbłonowa zbudowana jest z 23 aminokwasów i łączy domenę zewnątrzkomórkową z 433-aminokwasowym odcinkiem wewnątrzkomórkowym receptora. Ten ostatni wykazuje aktywność enzymatyczną kinazy tyrozynowej i zawiera struktury niezbędne w procesach: generacji, kontroli i modulacji sygnału przewodzonego do wnętrza komórki. W domenie wewnątrzkomórkowej receptora wyróżnia się 77-aminokwasowy hydrofilny odcinek rozdzielający ją na fragment wiążący ATP (lizyna w pozycji 613) i miejsce ulegające autofosforylacji (tyrozyna w pozycji 623) w wyniku reakcji katalizowanej przez wewnątrzcząsteczkową kinazę tyrozynową [71]. Miejsce ulegające autofosforylacji tworzy miejsca przyłączające domeny SH-2 tych białek wewnątrzkomórkowych, które biorą udział w transdukcji sygnału poprzez receptor [23]. Z kolei fosforylacja reszty tyrozynowej w pozycji 936 odgrywa prawdopodobnie ważną rolę w hamowaniu czynności receptora.

Ostatnio opisano w komórkach ludzkiej erytroleukemii (ang. *HEL*) drugą izoformę receptora [74]. Jest ona wynikiem odmiennego "splajcingu" fragmentu pre-mRNA kodowanego przez 9 ekson. Wynikiem tego jest białko receptorowe pozbawione w domenie zewnątrzkomórkowej krótkiego fragmentu cztero-aminokwasowego (Gly - Asn - Asn - Lys). Okazało się, że geny obydwu izoform transfekowane i uaktywnione w komórkach COS-1 małpiej nerki kodują białka wykazujące różnice w transdukcji sygnału. Krótsza forma receptora pozbawiona powyższego, bogatego w asparaginę odcinka czteroaminokwasowego wykazywała w przeciwieństwie do dłuższej konstytucyjną właściwość niewielkiego stale utrzymującego się stanu autofosforylacji.

PODSTAWY MOLEKULARNE EKSPRESJI LIGANDU RECEPTORA C-KIT

Jak wspomniano, wyizolowano już i sklonowano gen kodujący ligand receptora c-kit. Mieści się on u człowieka na długim ramieniu chromosomu 12 w segmencie 22–24 (12q 22–24) [3]. Gen ten składa się z 8 eksonów i koduje mRNA wielkości ~6,5 kb. Produktem translacji mRNA jest łańcuch peptydowy, który po zsyntetyzowaniu umieszczany jest na powierzchni komórki. W wyniku trawienia proteolitycznego ligand jest uwalniany z błony do środowiska zewnątrzkomórkowego [32, 55]. Gen kodujący ligand receptora c-kit ulega ekspresji m.in: w komórkach podścieliska szpiku kostnego. W regulacji jego ekspresji istotną rolę odgrywa hydrokortyzon [53]. Fakt ten może częściowo tłumaczyć zapotrzebowanie długoterminowych hodowli szpiku w modelu Dextera na ten hormon. Mechanizm ten może mieć również pewne znaczenie podczas pobudzenia mielopoezy, które obserwuje się w klinice u chorych leczonych sterydami. Wyjaśnienia wymaga natomiast udział w tym procesie białka NF-GMa, które jak wiadomo aktywuje transkrypcję niektórych cytokin w komórkach fibroblastoidalnych szpiku kostnego [79]. Wiadomo natomiast, że interleukina-1 i TNF alfa w dawkach, w których zwiększają w tych komórkach syntezę innych cytokin, hamują syntezę ligandu receptora c-kit [5]. Obserwacja ta może częściowo tłumaczyć znane w patologii

zjawisko polegające na zahamowaniu hemopoetyzy w przewlekłych stanach zapalnych. Jak wiadomo, IL-1 i TNF alfa należą do głównych mediatorów humoralnych tych stanów.

Okazało się, obok komórek fibroblastoidalnych podścieliska krwiotwórczego ligand receptora c-kit może być również syntetyzowany w szpiku kostnym przez komórki endotelialne naczyń krwionośnych [41]. Obecność jego stwierdzono również w komórkach Sertoliego gonad męskich [82] oraz w niektórych komórkach nowotworowych, jak np.: komórkach raka owśianokomórkowego płuc [84], czerniaka złośliwego (własne dane niepublikowane), w blastach niektórych linii komórkowych ostrych białaczek mieloblastycznych [70], a także komórkach ludzkiej białaczki T limfocytarnej - Jurkat (własne dane niepublikowane). Ponieważ niektóre z wymienionych nowotworów mają jednocześnie na powierzchni receptor c-kit, można przypuszczać, że podlegają one mechanizmom autokrynnej stymulacji wzrostu poprzez sygnał transdukowany przez receptor c-kit i jego ligand [84].

Wykorzystując czułą technikę RT-PCR (ang. *reverse transcriptase-polymerase chain reaction*) służącą do badania wewnątrzkomórkowego mRNA, udało się nam wykazać ekspresję ligandu receptora c-kit w niedojrzałych wczesnych komórkach szpiku ludzkiego mających antygen CD 34 [72]. Ponieważ komórki te zawierają jednocześnie receptor c-kit, nie można wykluczyć, że na bardzo wczesnych etapach różnicowania hemopoetyzy ludzka również zależna jest od autokrynnej interakcji c-kit receptor - kit ligand. Komórki te później w trakcie dojrzewania tracą prawdopodobnie zdolność syntezy ligandu receptora c-kit i zależne są od jego parakrynnej syntezy przez komórki podścieliska krwiotwórczego.

Na uwagę zasługują wyniki, które uzyskano badając tzw. mysie embrionalne komórki macierzyste (ang. *embryonic stem cells*). Komórki te, jak wiadomo, mogą się różnicować w kierunku wczesnych komórek hemopoetycznych i tworzyć w hodowlach półpłynnych kolonie krwiotwórcze. Okazało się, że komórki te na bardzo wczesnym etapie różnicowania mają mRNA zarówno dla receptora c-kit, jak i jego ligandu [78]. Trudno jeszcze powiedzieć, w jakim stopniu jest to ewentualne "odzwierciedlenie" "fizjologicznego" mechanizmu autokrynnej stymulacji na wczesnych etapach hemopoetyzy. Należy nadmienić, że w przypadku myszy opublikowano już dane przemawiające za istotną rolę mechanizmów polegających na autokrynnej stymulacji w fizjologicznej proliferacji bardzo wczesnych komórek układu hemopoetycznego. U zwierząt tych stwierdzono, że w regulacji erytropoetyzy istotną rolę odgrywa autokrynną interakcja erytropoetyny i jej receptora we wczesnych komórkach układu czerwonekrwinkowego [43], a w przypadku granulocyto-makrofago-poetyzy analogiczna interakcja granulocyto-makrofago-poetyny (ang. GM-CSF) ze swoistym receptorem w komórkach ukierunkowanych tej linii [68]. Prowadzone przez nasz zespół badania mają wyjaśnić, czy na wczesnych etapach regulacji ludzkiej erytropoetyzy odgrywa istotną rolę mechanizm autokrynnej stymulacji receptora c-kit przez jego ligand.

Jak wynika z danych własnych, w regulacji ekspresji ligandu c-kit w komórkach CD34 istotną rolę odgrywa białko c-myb oraz sygnał pochodzący bezpośrednio z receptora c-kit [72]. Sytuacja ta przypomina autostymulację limfocytów T poprzez interleukinę 2 (IL-2) i jej receptor [88]. W wyniku autostymulacji receptora dla IL-2 limfocyty T zwiększają autokrynną syntezę jego ligandu, czyli IL-2.

Badania strukturalne ligandu receptora c-kit wykazały obecność dwóch jego izoform: krótszej i dłuższej. Jest to wynik odmiennego "splajcingu" pre-mRNA tego genu w obrębie fragmentu kodowanego przez 6 ekson [3, 32, 55]. Ekson ten koduje odcinek 28-aminokwasowy, w którego obrębie umieszczony po syntezie na powierzchni komórki ligand jest trawiony enzymatycznie. Trawienie to umożliwia jego uwolnienie do środowiska zewnętrznego.

go. Krótsza izoforma ligandu nie ma odpowiednich sekwencji aminokwasowych, nie może więc być uwalniana enzymatycznie z powierzchni komórki i jest trwale związana z błoną. Forma wydzielana na zewnątrz występuje w postaci dwóch niekowalencyjnie związanych cząsteczek tworzących dimer [13]. Obydwie postaci wykazują podobny wpływ *in vitro* na proliferację komórek ludzkiego szpiku. Dalszych badań wymaga wyjaśnienie, jaka jest różnica w ich działaniu *in vivo* oraz która z postaci ulega ekspresji w komórkach CD34.

MECHANIZM MOLEKULARNY STYMULACJI RECEPTORA C-KIT PRZEZ LIGAND

Interakcja receptora c-kit z jego ligandem pociąga za sobą dimeryzację cząsteczek receptora i następującą w jej wyniku autofosforylację [86]. Do utworzonych w ten sposób w odcinku wewnątrzkomórkowym receptora reszt fosforanowych przyłączają się poprzez domeny SH-2 białka, które biorą bezpośredni udział w transdukcji sygnału [23]. Należy nadmienić, że większość tych białek uczestniczy również w procesach transdukcji sygnału poprzez inne receptory mające aktywność kinazy tyrozynowej. Najlepiej poznane z nich to: kinaza 3'fosfatydyloinozytoli, fosfolipaza C-gamma 1 i kinaza raf-1 [42, 52, 74, 75]. Białkiem, które jest wybiórczo związane z transdukcją sygnału poprzez receptor c-kit i tym samym może odpowiadać za obserwowane unikalne efekty biologiczne pobudzenia tego receptora, jest proteina – vav [62]. Białko to ma zdolność wiązania do chromosomalnego DNA i zostało pierwotnie zidentyfikowane jako jeden z protoonkogenów ulegający wybiórczej ekspresji w komórkach układu krwiotwórczego [50]. Innym zasługującym na uwagę białkiem regulującym procesy transkrypcji, które ulega głównie ekspresji w tych komórkach, w których jednocześnie stwierdza się obecność receptora c-kit, jest białko SCL [40].

Nie znaleziono do tej pory przekonujących dowodów molekularnych świadczących o udziale w transdukcji sygnału poprzez receptor c-kit białka ras [42, 52, 75]. Jak wiadomo, białko to jest ważne w generowaniu sygnału przez inne receptory obdarzone aktywnością kinazy tyrozynowej [86]. Wyniki badań własnych potwierdzają brak udziału białka ras w transdukcji sygnału poprzez receptor c-kit. W wykonanych doświadczeniach hamowaliśmy ekspresję protoonkogenu ras za pomocą swoistych antysensów. Okazało się, że zahamowanie to nie wpływało na upośledzenie wzrostu *in vitro* kolonii erytroidalnych tworzonych przez komórki szpiku stymulowane ligandem receptora c-kit i erytropoetyną.

EKSPRESJA RECEPTORA C-KIT W ZDROWYCH I PATOLOGICZNYCH KOMÓRKACH KRWIOTWÓRCZYCH

Receptor c-kit występuje na powierzchni 1–4% ludzkich komórek jednojądrowych szpiku kostnego [67]. Obliczono, że przeciętnie na jednej komórce szpiku kostnego występuje ok. 1000 cząsteczek receptora. Liczba ta jest zbliżona do liczby receptorów dla IL-3 lub GM-CSFu [67]. Używając przeciwciała monoklonalnego – YB5.B8. skierowanego przeciw receptorowi c-kit oraz przeciwciał rozpoznających antygeny wczesnych komórek układu krwiotwórczego (CD34, CD33), komórki jednojądrowe szpiku kostnego podzielono na 3 grupy [9]:

- 1) c-kit+/CD34+/CD33- zawierająca komórki prekursorowe komórek tworzących kolonie hemopoetyczne w hodowlach in vitro (pre-CFU),
- 2) c-kit+/CD34+/CD33+ zawierająca komórki tworzące kolonie hemopoetyczne (CFU),
- 3) c-kit+/CD34-/CD33+ zawierająca dojrzewające komórki tuczne.

Odsetek komórek jednojądrowych szpiku kostnego, które zawierają jednocześnie antygen CD34+ i receptor c-kit, sięga ok. 75%. Oznacza to, że obydwa antygeny znajdują się na pokrywających się, lecz nie identycznych populacjach komórek szpiku. Uważa się, że komórki, które mają antygen CD34 i wykazują brak receptora c-kit, należą prawdopodobnie do wczesnych komórek układu limfocytarnego [9].

Używając innego przeciwciała monoklonalnego (SR-1) skierowanego przeciwko receptorowi c-kit stwierdzono, że występuje on głównie na wczesnych komórkach układu erytropoetycznego – od BFU-E poprzez CFU-E do proerytroblastu włącznie [20, 67]. Wykazano, że komórki mające antygen c-kit wykazują równocześnie inne antygeny typowe dla wczesnych komórek układu czerwokrwinkowego. Na komórkach tych stwierdza się m.in. wysoką ekspresję antygenów CD34, DR, CD38, Ep-1 przy niskiej ekspresji antygeny CD33 [67]. Okazało się, że rosnące in vitro duże i słabo hemoglobinizowane kolonie czerwokrwinkowe składające się z proerytroblastów i erytroblastów zasadochłonnych zawierają 25 razy więcej cząsteczek receptora niż kolonie mniejsze, dobrze hemoglobinizowane, utworzone głównie przez erytroblasty [20]. Za pomocą przeciwciała monoklonalnego SR-1 wykazano również obecność receptora c-kit na powierzchni komórek ukierunkowanych układu granulocyto-makrofagalnego (CFU-GM) [20].

Inna grupa badaczy używając do identyfikacji wczesnych komórek szpiku kostnego przeciwciał rozpoznających antygeny CD 34 i CD 38 znalazła, że receptor c-kit na powierzchni ma dwa razy więcej komórek CD34+CD38- (50%) niż CD34+CD38+ (25%) [90]. Pierwsza grupa komórek zawiera duże, zasadochłonne komórki o morfologii blastu, które są morfologicznie i czynnościowo mniej dojrzałe od komórek drugiej grupy. Wskazuje to na fakt, że c-kit ulega ekspresji na komórkach bardzo młodych i ekspresja ta zmniejsza się stopniowo wraz z procesem dojrzewania.

Ponieważ, jak wspomniano, receptor c-kit występuje na komórkach CD34+/CD33-/CD38-, nasuwa się pytanie, czy występuje on również na komórkach macierzystych układu krwiotwórczego. Jak wiadomo, jedną z właściwości komórek macierzystych szpiku jest m.in. zdolność do inicjowania długoterminowych hodowli szpiku w modelu Dextera. Pytanie to jest o tyle ważne, że znana jest zależność komórek szpiku w warunkach długoterminowych hodowli in vitro od bezpośredniego wpływu komórek podścieliska. Jak wiadomo, komórki te produkują ligand receptora c-kit. Być może okaże się, że stymuluje on bezpośrednio receptor c-kit na powierzchni komórek macierzystych?

Mało wyjaśniona jest do tej pory rola receptora c-kit w limfopoezie. Jak wiadomo, na powierzchni dojrzałych limfocytów nie stwierdza się jego obecności. Wiadomo natomiast, że u myszy ligand receptora c-kit zwiększa synergistycznie z IL-7 in vitro wzrost limfocytów pre-B [58].

Receptor c-kit występuje również na powierzchni megakariocytów i płytek krwi [39]. Przypuszcza się, że w tych ostatnich może odgrywać pewną rolę w regulacji procesu agregacji [18].

Jednocześnie gromadzą się dane dotyczące ekspresji i roli receptora c-kit podczas transformacji nowotworowej komórek układu krwiotwórczego [4, 73, 89]. Stwierdzono, że receptor ten występuje na blastach 50–70% pacjentów chorych na ostre postacie białaczek

mieloblastycznych [47, 89]. W niektórych przypadkach ostrych białaczek zidentyfikowano zaburzenia strukturalne w obrębie samego genu [26]. Nie potwierdziły się jednak wcześniejsze sugestie, zakładające, że ekspresja receptora c-kit może mieć pewne znaczenie rokownicze dotyczące przeżycia w tej grupie chorych [81, 89]. Z badań własnych wynika, że receptor c-kit ulega również nadmiernej ekspresji na komórkach pobranych od chorych na pewne postacie zespołów mieloproliferacyjnych, jak m.in. na przewlekłą białaczkę szpikową i czerwienicę prawdziwą [73]. Z drugiej strony wiadomo, że blasty chorych na przewlekłą białaczkę szpikową są niezwykle wrażliwe na stymulację KL [38]. Wiadomo również, że liczba komórek mających ten receptor zwiększa się podczas fazy odnowy układu krwiotwórczego u pacjentów poddanych chemioterapii [15]. Ekspresję receptora c-kit znaleziono również u 65% chorych na ostrą białaczkę B limfoblastyczną w przypadkach, gdy mieli oni na powierzchni blastów antygen mieloidalny (MY+) [87].

Receptor c-kit występuje również na pewnych hemopoetycznych liniach nowotworowych, m.in.: na niektórych liniach erytroblastycznych, takich jak: HEL, LAMA, TF-1, MB-02, OCIM1, OCIM2, JK-1 i megakarioblastycznych: M07E, CMK [4, 20, 51]. Ekspresja receptora c-kit na komórkach innych linii mieloidalnych jest znacznie niższa [51]. Ciekawym spostrzeżeniem jest, że ekspresję receptora c-kit znaleźliśmy również w ludzkiej linii nowotworowej pochodzącej z limfocytów T - Jurkat.

ROLA RECEPTORA C-KIT I JEGO LIGANDU W HEMOPOEZIE CZŁOWIEKA

Jak wiadomo, nie udało się do tej pory wyizolować ludzkich krwiotwórczych komórek macierzystych. Komórki takie zgodnie z definicją powinny mieć przede wszystkim nieograniczoną zdolność samoodnawiania. Informacje o ich istnieniu uzyskujemy z badań pośrednich m.in. na podstawie zdolności rekonstruowania hemopoety u biorców przeszczepów krwiotwórczych czy też zdolności inicjowania długoterminowych hodowli szpiku w modelu Dextera. W związku z powyższym nie rozstrzygnięto jeszcze, czy na komórkach macierzystych człowieka występuje receptor c-kit. Dane uzyskane na myszach wskazują jednak, że receptor c-kit odgrywa ważną rolę w proliferacji komórek wcześniejszych niż te, na które działają inne znane cytokiny [14, 17, 24]. Stąd istnieją więc pewne uzasadnione podstawy do nazywania ligandu receptora c-kit czynnikiem komórek macierzystych [59].

Stymulując *in vitro* komórki ludzkiego szpiku ligandem receptora c-kit (KL) stwierdzono, że działa on na wysoce niedojrzałe komórki CD34+ nie mające markerów poszczególnych linii krwiotwórczych – lin- (ang. *lineage negative*). Stwierdzono, że KL stymuluje bardziej komórki CD34+lin- (preCFU) niż CD34+lin+ (CFU) [14]. Wynika stąd, że KL oddziałuje na komórki wcześniejsze (pre-CFU) niż te, które są już gotowe do wzrostu klonalnego *in vitro* (CFU). Preinkubacja komórek CD34+lin- z KL przed założeniem hodowli w półpłynnym medium zwiększała znacznie ich klonogenność.

Na uwagę zasługują wyniki, które uzyskano badając wpływ KL na bardzo wczesne komórki ludzkiego szpiku o profilu antygenowym CD34+DR-CD15- [17]. Okazało się, że KL znacznie zwiększa ich przeżywalność w warunkach hodowli długoterminowych. Równocześnie obserwowano pozytywny wpływ tego czynnika na klonogenność tych komórek *in vitro*.

KL wraz z IL-3 i GM-CSF zwiększał znacznie ich zdolność do tworzenia olbrzymich, 28-dniowych kolonii.

Wykazano również, że KL bardziej niż IL-3 zwiększa ograniczoną zdolność CFU-Mix pochodzących z krwi pępowinowej i krwi obwodowej do tworzenia kolonii wtórnych *in vitro*. Jest to dodatkowy pośredni dowód na to, że KL działa na wcześniejsze komórki niż IL-3 [85].

Przyjmuje się, że głównym zadaniem KL jest zwiększenie odpowiedzi proliferacyjnej komórek tworzących kolonie krwiotwórcze (CFU) na inne czynniki wzrostowe [21]. W badaniach *in vitro* stwierdzono bowiem, że KL działa synergistycznie z innymi czynnikami wzrostowymi zwiększając liczbę i wielkość kolonii wielu linii krwiotwórczych. Stwierdzono, że KL już w niewielkich stężeniach jest silnym kostymulatorem erytropoetyny w pobudzaniu wzrostu kolonii erytroidalnych tworzonych przez BFU-E i CFU-Mix. Okazało się, że KL w połączeniu z EpO stymuluje komórki szpiku do wzrostu większej liczby kolonii erytroidalnych niż EpO + IL-3 czy też EpO + GM-CSF. KL nie stymuluje sam jako taki wzrostu kolonii granulocyto-makrofagowych (CFU-GM), lecz zwiększa ich liczbę działając łącznie z GM-CSF i IL-3. W tym samym badaniu nie stwierdzono jednak, aby KL zwiększał liczbę kolonii czysto granulocytowych (G-CFU) w kostymulacji z granulocytopoetyną (G-CSF) [21]. KL zwiększa również liczbę i wielkość kolonii megakariocytarnych tworzonych przez CFU-Meg i BFU-Meg [18]. W niektórych ustalonych liniach megakariocytarnych KL może stymulować syntezę pewnych cytokin, takich jak: IL-1, IL-2 i IL-6 [10].

Pragnąc uzyskać bezpośrednie dane dotyczące roli receptora c-kit w regulacji ludzkiej hemopoezy, postanowiliśmy znieść ekspresję genu kodującego receptor w komórkach szpiku za pomocą syntetycznych oligodeksynukleotydów skierowanych przeciwko mRNA tego genu [73]. Wykorzystując powyższą strategię mogliśmy skutecznie zahamować w komórkach hemopoetycznych rybosomalną translację mRNA dla c-kit i pozbawić je w ten sposób możliwości syntezy białka tworzącego receptor [72, 73]. Komórki po inkubacji z odpowiednim oligodeksynukleotydem umieszczano w półpłynnym środowisku hodowlanym obserwując następnie ich zdolność do tworzenia kolonii krwiotwórczych należących do różnych linii hemopoetycznych. Należy nadmienić, że do zakładanych hodowli komórkowych, w których hamowano syntezę receptora c-kit, nie dodawano jako czynnika stymulującego jego ligandu.

W wykonanych badaniach okazało się, że zahamowanie ekspresji receptora c-kit w ludzkich komórkach szpiku kostnego prowadziło do upośledzenia wzrostu klonalnego kolonii erytroidalnych nie wpływając jednocześnie na wzrost kolonii granulocyto-makrofagowych. W przeprowadzonych doświadczeniach obserwowaliśmy bowiem głównie zahamowanie wzrostu komponenty erytroidalnej w koloniach tworzonych przez CFU-Mix. Jednocześnie obserwowaliśmy 70-procentowe zahamowanie wzrostu kolonii erytroidalnych tworzonych przez BFU-E po stymulacji IL-3 + EpO oraz zahamowanie tworzenia kolonii czerwono krwinkowych tworzonych przez bardziej dojrzałe już CFU-E stymulowane EpO. W równoległych doświadczeniach, wyłączając ekspresję receptora c-kit w klonowanych *in vitro* komórkach nie stwierdzaliśmy zahamowania wzrostu kolonii granulocyto-makrofagowych stymulowanych IL-3 + GM-CSF, a także kolonii megakariocytarnych stymulowanych IL-3 + IL-6.

Badania te prowadzą do dwóch ważnych wniosków.

- Pierwszego, że komórki tworzące kolonie erytroidalne *in vitro* (BFU-E, CFU-E) w przeciwieństwie do innych (CFU-GM, CFU-G, CFU-M, CFU-Meg) są niezwykle wrażliwe na zaburzenia w ekspresji receptora c-kit nawet wtedy, gdy nie są *in vitro* stymulowane ligandem tego receptora.

- Drugim wnioskiem jest spostrzeżenie, że w normalnym ludzkim szpiku kostnym istnieją komórki ukierunkowane układu czerwonerwinkowego, w których IL-3 może w pewnym stopniu rekompensować brak receptora c-kit. Należy jednak nadmienić, że kolonie erytroidalne tworzone przez BFU-E po stymulacji przez IL-3 i EpO, w których zahamowano ekspresję receptora c-kit, były znacznie mniejsze. Wykazywały jednak prawidłową hemoglobinizację. Stosunek hemoglobiny płodowej HbF do hemoglobiny dojrzałej HbA pozostawał stały. Może to oznaczać, że receptor c-kit nie bierze bezpośredniego udziału w procesie hemoglobinizacji komórek układu czerwonerwinkowego.

Istnieją dwa najbardziej prawdopodobne tłumaczenia upośledzonego wzrostu kolonii erytroidalnych w hodowlach komórek, którym wyłączono ekspresję receptora c-kit i których nie stymulowano ligandem.

- Pierwsze, że w surowicy lub albuminie wchodzącej w skład medium hodowlanego znajdowały się śladowe stężenia ligandu receptora c-kit, wystarczające do stymulacji bardziej wrażliwych na jego działanie komórek prekursorowych linii erytropoetycznej.

- Drugie, iż same komórki prekursorowe układu czerwonerwinkowego hodowane in vitro są zdolne do autokrynej syntezy ligandu.

Jak wspomniano powyżej, istotnie w komórkach CD34+ udało się nam uzyskać sygnał ekspresji ligandu receptora c-kit [72].

Zbliżone wyniki do naszych uzyskano w badaniach, w których funkcje receptora c-kit blokowano za pomocą swoistego przeciwciała. Blokując w ten sposób receptor hamowano wzrost ok. 70% BFU-E w hodowlach komórek szpiku stymulowanych EpO i IL-3 [67]. Należy jednak nadmienić, że przeciwciało to nie upośledzało proliferacji in vitro bardziej dojrzałych już CFU-E stymulowanych samą EpO [20].

Dalszych badań wymaga wyjaśnienie roli receptora c-kit w patogenezie rozrostów nowotworowych układu krwiotwórczego. Wyłączając ekspresję tego receptora w blastach uzyskanych od chorych na ostre białaczki mielo- i limfoblastyczne za pomocą swoistych antysensów, nie udało się nam zahamować znacząco wzrostu in vitro komórek tych nowotworów [73]. Z danych literaturowych wynika jednak, że proliferacja niektórych ludzkich linii nowotworowych uzyskanych od chorych na ostre białaczki szpikowe, takie jak np. MO7E, zależna jest od stymulacji ich ligandem receptora c-kit [51]. W komórkach niektórych linii stwierdzono nawet możliwość syntezy ligandu [70], która może przemawiać za autokrynną stymulacją ich wzrostu nowotworowego poprzez receptor c-kit.

Odmienne wyniki uzyskaliśmy natomiast u chorych na przewlekłą białaczkę szpikową i czerwienicę prawdziwą [73]. Eksponując komórki pobrane od tych chorych wobec antysensów dla receptora c-kit udało się nam u 50% chorych na przewlekłą białaczkę szpikową i 100% chorych na czerwienicę prawdziwą zahamować in vitro wzrost kolonii granulocytowo-makrofagowych. Jak wspomniano, w komórkach pochodzących od tych chorych dochodzi do nadmiernej ekspresji receptora c-kit. Z badań in vitro wiadomo również, że komórki te są niezwykle wrażliwe in vitro na stymulację ligandem receptora c-kit [38]. Na uwagę zasługuje również fakt opisanego zespołu mielodysplastycznego będącego wynikiem braku długiego ramienia 4 chromosomu (4q-syndrom). Zespół ten doprowadził do tzw. ostrej białaczki komórek macierzystych (ang. *stem cell leukemia*) [15].

Dyskutowany jest również ewentualny udział receptora c-kit i jego ligandu w etiopatogenezie niektórych wrodzonych anemii, np. tzw. anemii czysto-czerwonerwinkowej Diamanda-Blackfana [1, 11, 66]. Wiadomo, że w niektórych przypadkach tego schorzenia pobrane od chorych i hodowane in vitro BFU-E odpowiadają na stymulację ligandem receptora c-kit [2,

11]. Uważa się, że w tej grupie pacjentów ligand receptora c-kit przywraca zmniejszoną wrażliwość wczesnych komórek układu czerwonekrwinkowego na erytropoetynę [11]. Jak jednak wspomniano, u pacjentów dotkniętych tym schorzeniem nie stwierdzono do tej pory zmian strukturalnych w obrębie genów kodujących receptor i ligand [66]. Nie można wykluczyć jednak, że defekt warunkujący to schorzenie leży dystalnie od receptora np. na poziomie drugich przekaźników sygnału. Gdy rozważa się możliwość udziału zaburzeń w transdukcji sygnału poprzez receptor c-kit w etiopatogenezie zespołu Diamonda-Blackfana, pojawia się jednak wątpliwość, dlaczego chorzy dotknięci tym schorzeniem nie wykazują tak typowych dla mutacji w loci w i sl zaburzeń melanopoezy [33, 35].

MOŻLIWOŚCI WYKORZYSTANIA LIGANDU RECEPTORA C-KIT W KLINICE. DALSZY KIERUNKI BADAŃ

Dzięki postępom technologii molekularnej ligand receptora c-kit jest obecnie otrzymywany w postaci rekombinowanego białka. Rozważa się wiele możliwości jego praktycznego wykorzystania w klinice. Po pierwsze po opracowaniu odpowiednich protokołów terapeutycznych mógłby on znaleźć zastosowanie wspólnie z innymi cytokinami *in vivo* w próbach stymulacji odnowy układu krwiotwórczego u chorych leczonych wysokimi dawkami chemioterapii. Takie same zastosowanie mógłby znaleźć w przypadku chorych leczonych przeszczepieniami szpiku kostnego. Pierwsze napawające optymizmem obserwacje dotyczą małej grupy naczelników [6]. U zwierząt tych terapia ligandem receptora c-kit zwiększała we krwi obwodowej wartość hematokrytu oraz liczbę granulocytów i monocytów. Jednocześnie w szpiku kostnym obserwowano wzrost liczby komórek tworzących kolonie erytro- i granulopoetyczne. Rozważa się również możliwość wykorzystania ligandu receptora c-kit w leczeniu cytopenii związanych z infekcją wirusem HIV [60]. Z badań przeprowadzonych *in vitro* wynika bowiem, że może on zwiększać u tych chorych klonogenność komórek tworzących kolonie hemopoetyczne. Okazało się również, że jednocześnie zmniejsza on wrażliwość wczesnych komórek erytropoetycznych (BFU-E) na toksyczny, jatrogeny wpływ stosowanej w leczeniu AIDS zidovudyny [60].

Rekombinowany ligand receptora c-kit mógłby znaleźć również zastosowanie w leczeniu tych niektórych przypadków anemii czysto-czerwonekrwinkowej Diamonda-Blackfana, w których przywraca wrażliwość komórek BFU-E na erytropoetynę [1, 11, 66]. Być może znajdzie on również zastosowanie lecznicze w przypadkach nabytych aplazji szpiku i zespołach mielodysplastycznych. Z badań uzyskanych w hodowlach *in vitro* wiadomo, że u niektórych chorych komórki tworzące kolonie odpowiadają na stymulację tym czynnikiem wzrostowym [37].

Ostatnio okazało się, że ligand receptora c-kit zwiększa wydajność transfekcji, czyli włączania do materiału genetycznego komórek egzogennych odcinków DNA [64]. Obserwacja ta może mieć znaczenie dla optymalizacji metod terapii genowej.

Z kolei wspomniana strategia blokowania receptora c-kit swoistymi antysensami mogłaby znaleźć praktyczne zastosowanie w zahamowaniu patologicznego wzrostu komórek w przypadkach zespołów mieloproliferacyjnych zależnych od sygnału receptora c-kit, jak np. w przewlekłej białaczce szpikowej lub czerwienicy prawdziwej [73].

Podsumowując rolę, jaką pełni układ receptor c-kit - kit ligand w układzie krwiotwórczym, należy wspomnieć, że w ostatnim czasie opisano dwa zbliżone budową do receptora c-kit receptory mające wewnątrzcząsteczkową aktywność kinazy tyrozynowej: flk-1 i flk-2 [56,57]. Obydwa ulegają ekspresji na komórkach krwiotwórczych. Nie wiadomo jeszcze, jak ważny jest ich udział w regulacji procesów krwiotworzenia.

Rozpatrując zaburzenia czynności receptorów dla czynników wzrostowych należy pamiętać, że defekty niektórych z nich mogą ulegać kompensacji poprzez prawidłową czynność innych. Myszy mające najcięższe formy mutacji receptora c-kit, jak i myszy niezdolne do prawidłowej syntezy jego ligandu mogą żyć pomimo ciężkich niedoborów w układzie krwiotwórczym [91]. U zwierząt tych wykazano, że IL-3 podawana w infuzji in vivo lub dodawana do komórek szpiku hodowanych in vitro może w pewnym stopniu kompensować defekt receptora c-kit [36, 65].

Z badań własnych wynika również, że pomimo całkowitej eliminacji ekspresji receptora c-kit wczesne komórki układu czerwono-krwinkowego są jeszcze zdolne do tworzenia in vitro kolonii erytroidalnych po stymulacji EpO i IL-3. Kolonie takie są wprawdzie mniejsze i mniej liczne, lecz za to prawidłowo hemoglobinizowane.

Im więcej uzyskujemy informacji dotyczących funkcji receptora c-kit, tym więcej pojawia się nowych pytań. Czy receptor c-kit jest obecny na powierzchni komórek, które mają wzór antygenowy CD34+, lin-, THY1+? Komórki te zostały ostatnio opisane z sugestią, że stanowią populację komórek macierzystych szpiku [44]. Jak wytłumaczyć jednoczesną ekspresję receptora c-kit i jego ligandu w komórkach CD34+ szpiku kostnego? Czy na pewnym etapie erytropoezy możliwy jest autokrywny wzrost wczesnych komórek tej linii krwiotwórczej? Które z białek pełniących rolę drugich przekaźników informacji okażą się swoiste w procesie transdukcji sygnału w tym układzie receptorowym? Czy postać ligandu receptora c-kit związana z błoną komórkową może również sama pełnić rolę receptora? Jak ważny jest z kolei udział receptora c-kit w procesach adhezji komórek w układzie krwiotwórczym? [16]

Niebywały postęp biologii molekularnej, który przeżywamy w ostatnich latach, pozwolił na rozwiązywanie zagadki podłoża molekularnego patomechanizmu mysich mutacji w loci w i sl. Dostarczył również szereg danych dotyczących roli receptora c-kit i jego ligandu w fizjologicznej i patologicznej hemopoezie u człowieka. Wiele wskazuje na to, że czeka nas jeszcze wiele niespodzianek. Jak daleko zajdziemy w kierunku rozwiązania zagadki krwiotworzenia badając ten układ transdukcji sygnału w układzie krwiotwórczym okażą najbliższe lata.

LITERATURA

- [1] ABKOWITZ JL, BROUDY VC, BENNETT LG, ZSEBO KM, MARTIN FH. Absence of abnormalities of c-kit or its ligand in two patients with Diamond-Blackfan anemia. *Blood* 1992; 79: 25-28.
- [2] ABKOWITZ JL, SABO KM, NAKAMOTO B, BLAU CA, MARTIN FH, ZSEBO KM, PAPAYANNOPOULOU T. Diamond-Blackfan anemia: In vitro response of erythroid progenitors to the ligand for c-kit. *Blood* 1991; 78: 2198-2202.
- [3] ANDERSON DM, WILLIAMS DE, TUSHINSKI R, GIMPEL S, EISENMAN J, CANNIZZARO LA, ARONSON M, CROCE CM, HUEBNER K, COSMAN D, LYMAN SD. Alternative splicing of mRNAs encoding human mast cell growth factor and localization of the gene to chromosome 12q22-q24. *Cell Growth & Differentiation* 1991; 2: 373-378.

- [4] ANDRE C, d'AURIOL L, LACOMBE C, GISSELBRECHT S, GALIBERT F. C-kit mRNA expression in human and murine hematopoietic cell lines. *Oncogene* 1989; **4**: 1047-1049.
- [5] ANDREWS DF, BIANCO JA, MORAN DA, SINGER JW. Inflammatory cytokines and pentoxifyline (PTX) affect kit ligand (KL) expression by marrow stromal cells (MSC). *Blood* 78 Suppl 1991; **1**: 303a.
- [6] ANDREWS RG, KNITTER GH, BARTELMIZ SH, LANGLEY KE, FARRAR D, HENDREN RW, APPELBAUM FR, BERNSTEIN ID, ZSEBO KLM. Recombinant human stem cell factor, a c-kit ligand, stimulates hematopoiesis in primates. *Blood* 1991; **78**: 1975-1980.
- [7] ARAI K, LEE F, MIYAJIMA A, MIYATAKE S, ARAI N, YOKOTA T. Cytokines: coordinators of immune and inflammatory responses. *Annu Rev Biochem* 1990; **59**: 783-836.
- [8] ASHMAN LK, CAMBARERI AC, EGLINTON JM. A monoclonal antibody that inhibits the action of GM-CSF on normal but not leukemia progenitors. *Leuk Res* 1990; **14**: 637-644.
- [9] ASHMAN LK, CAMBARERI AC, TO L, LEVINSKY RL, JUTTNER ChA. Expression of the YB5.B8. antigen (c-kit proto-oncogene product) in normal human bone marrow. *Blood* 1991; **78**: 30-37.
- [10] AVRAHAM H, VANNIER E, COWLEY S, JIANG S, CHI S, DINARELLO ChA, ZSEBO KM, GROOPMAN JE. Effects of the stem cell factor, c-kit ligand, on human megakaryocytic cells. *Blood* 1992; **79**: 365-371.
- [11] BAGNARA GP, ZAULI G, VITALE L, ROSITO P, VECCHI V, PADOUCI G, AVANZI GC, RAMENGGHI V, TIMEUS F, GABUTTI V. In vitro growth and regulation of bone marrow enriched CD34+ hematopoietic progenitors in Diamond-Blackfan anemia. *Blood* 1991; **78**: 2203-2210.
- [12] BARKER JE, GREER J, BACONS, COMPTON ST. Temporal replacement of donor erythrocytes and leukocytes in nonanemic W44J/W44J and severely anemic W/Wv mice. *Blood* 1991; **78**: 1432-1437.
- [13] BAZAN JF. Genetic and structural homology of stem cell factor and macrophage colony-stimulating factor. *Cell* 1991; **65**: 9-10.
- [14] BERNSTEIN ID, ANDREWS RG, ZSEBO KM. Recombinant human stem cell factor enhances the formation of colonies by CD34+ and CD34+lin- cells, and the generation of colony-forming cell progeny from CD34+lin- cells cultured with interleukin-3, granulocyte colony-stimulating factor, or granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Blood* 1991; **77**: 2316-2321.
- [15] BERRETI A, LEV S, BASSOUS L, CHEMLA M, LEITNER O, GIVOL D, YARDEN Y. Expression of the stem cell factor, c-kit, in normal and leukemic patients: enhanced expression post-chemotherapy and over-expression in an aggressive stem cell leukemia. *Blood* 78 Suppl 1991; **1**: 373a.
- [16] BLUME-JENSEN P, CLAESON-WELSH L, SIEGBAHN A, ZSEBO KM, WESTERMARK B, HELDIN CH. Activation of the human c-kit product by ligand induced dimerization mediates circular actin reorganization and chemotaxis. *EMBO J* 1991; **10**: 4121-4128.
- [17] BRANDT J, BRIDDELL RA, SROUR EF, LEEMHUIS TB, HOFFMAN R. Role of c-kit ligand in the expansion of human hematopoietic progenitor cells. *Blood* 1992; **79**: 634-641.
- [18] BRIDDELL RA, BRUNO E, COOPER RJ, BRANDT JE, HOFFMAN R. Effect of c-kit ligand on in vitro human megakaryocytopoiesis. *Blood* 1991; **78**: 2854-2859.
- [19] BRIZZI MF, AVANZI GC, PEGORARO L. Hematopoietic growth factor receptors. *Int J Cell Clon* 1991; **9**: 274-300.
- [20] BROUDY VC, LIN N, ZSEBO KM, BIRKETT NC, SMITH KA, BERNSTEIN ID, PAPAYANNOPOULOU T. Isolation and characterization of a monoclonal antibody that recognizes the human c-kit receptor. *Blood* 1991; **79**: 338-346.
- [21] BROXMEYER HE, COOPER S, LU L, HAGVE G, ANDERSON D, COSMAN D, LYMAN SD, WILLIAMS DE. Effect of murine mast cell growth factor (c-kit proto-oncogene ligand) on colony formation by human marrow hematopoietic progenitor cells. *Blood* 1991; **77**: 2142-2149.
- [22] CAMBARERI AC, ASHMAN LK, COLE SR, LYONS AB. A monoclonal antibody to a human mast cell/myeloid leukemia-specific antigen binds to normal hematopoietic progenitor cells and inhibits colony formation in vitro. *Leuk Res* 1988; **12**: 929-939.
- [23] CANTLEY LC, AUGER KR, CARPENTER Ch, DUCKWORTH B, GRAZIANI A, KAPPELLER R, SOLTOFF S. Oncogenes and signal transduction. *Cell* 1991; **64**: 281-302.
- [24] CAROW CE, HAGOC G, COOPER SH, WILLIAMS DE, BROXMEYER HE. Mast cell growth factor (c-kit ligand) supports the growth of human multipotential progenitor cells with a high replating potential. *Blood* 1991; **78**: 2216-2221.
- [25] CATLETT JP, LEFTWICH JA, WESTIN EH, GRANT S, HUFF TF. C-kit expression by CD34+ bone marrow progenitors and inhibition of response to recombinant human interleukin-3 following exposure to c-kit antisense oligonucleotides. *Blood* 1991; **78**: 3186-3191.
- [26] CHENG G, TITLEY P, MINDEN M, AYE MT, McCULLOCH EA. Structural alterations of the c-kit proto-oncogene in patients with acute myelogenous leukemia. *Int J Cell Cloning* 1991; **9**: 349.

- [27] CHIBA T, IKAWA Y, TODOKORO K. GATA-1 transactivates erythropoietin receptor gene, and erythropoietin receptor - mediated signals enhance GATA-1 gene expression. *Nucleic Acids Res* 1991; **19**: 3813-3818.
- [28] COPELAND NG, GILBERT DJ, CHO BC, DONOVAN PJ, JENKINS NA, COSMAN D, ANDERSON D, LYMAN SD, WILLIAMS DE. Mast cell growth factor maps near the steel locus on mouse chromosome 10 and is deleted in a number of steel alleles. *Cell* 1990; **63**: 175-183.
- [29] DAI CH, KRANTZ SB, ZSEBO KM. Human burst-forming units-erythroid need direct interaction with stem cell factor for further development. *Blood* 1991; **78**: 2493-2497.
- [30] DEBREUIL P, ROTTAPPEL R, REITH AD, FORRESTER L, BERNSTEIN A. The mouse W/c-kit locus. *Ann NY Acad Sci* 1990; **599**: 58-65.
- [31] EVANS T, FELSENFELD G, REITMAN M. Control of globin gene transcription. *Annu Rev Cell Biol* 1990; **6**: 95-124.
- [32] FLANAGAN JG, CHAN DC, LEDER Ph. Transmembrane form of the kit ligand growth factor is determined by alternative splicing and is missing in the Sld mutant. *Cell* 1991; **64**: 1025-1035.
- [33] FLEISCHMAN RA, SALTMAN DL, STASTNY V, ZNEIMER S. Deletion of the c-kit protooncogene in the human developmental defect piebald trait. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; **88**: 10885-10889.
- [34] GEISLER EN, RUSSEL ES. Analysis of the hematopoietic effects of new dominant spotting (W) mutations of the mouse. I. Influence upon hematopoietic stem cells. *Exp Hematol* 1983; **11**: 452-456.
- [35] GIEBEL LB, SPRITZ RA. Mutation of the KIT (mast/stem cell growth factor receptor) protooncogene in human piebaldism. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; **88**: 8696-8699.
- [36] GOLDWASSER E, PECH N, IHLE J. Interleukin-3 can compensate for the deficiency in erythroid burst-forming cells in anemic mice of genotype W/Wv. *Exp Hematol* 1990; **18**: 936-939.
- [37] GOSELINK HM, WILLIAMS DE, FIBBE WE, WESSELS H, HERION JC, WILLEMZE R, FALKENBURG JHF. Hematopoietic progenitor cells (HPC) from patients with myelodysplastic syndromes (MDS) strongly respond to the c-kit receptor ligand mast cell growth factor (MGF). *Blood* 78 Suppl 1991; **1**: 36a.
- [38] GOSELINK HM, WILLIAMS DE, TIBBE WE, WILLEMZE R, FALKENBURG JHF. Mast cell growth factor (MGF) is a potent stimulator of normal and chronic myeloid leukemic (CML) progenitor cells, and a weak stimulator of differentiated acute myeloid leukemic (AML) precursors cells. *Exp Hematol* 1991; **19**: 529.
- [39] GRABAREK J, LEVINE JD, GROOPMAN JE, ZSEBO KM, AVRAHAM H. Human stem cell factor (c-kit ligand) modulates platelet aggregation. *Blood* 78 Suppl 1991; **1**: 151a.
- [40] GREEN AR, SALVARIS E, BEGLEY CG. Erythroid expression of the "helix-loop-helix" gene, SCL. *Oncogene* 1991; **6**: 475-479.
- [41] HEINRICH M, BAND L, DOOLER D, FREED AC, EGRIE J, PETERS S, RATHBUN K, WILLKINSON B. Constitutive expression of steel factor (SF) by human vascular endothelial cells. *Blood* 78 Suppl 1991; **1**: 22a.
- [42] HERBST R, LAMMERS R, SCHLESSINGER J, ULLRICH A. Substrate phosphorylation specificity of the human c-kit receptor tyrosine kinase. *J Biol Chem* 1991; **266**: 19903-19916.
- [43] HERMINE O, BERU N, PECH N, GOLDWASSER E. An autocrine role for erythropoietin in mouse hematopoietic cell differentiation. *Blood* 1991; **78**: 2253-2260.
- [44] HOOPER C. Of stem cells and snake oil. *J NIH Res* 1992; **4**: 21-23.
- [45] HSIEH CL, NAVANKASATTUSAS S, ESCOBEDO JA, WILLIAMS LT, FRANCKE U. Chromosomal localization of the gene for AA - type platelet derived growth factor receptor (PDGFRA) in humans and mice. *Cytogenet Cell Genet* 1991; **56**: 160-163.
- [46] HUANG E, NOCKA K, BEIER DR, CHU TY, BUCK J, LAHM HW, WELLNER D, LEDER P, BESMER P. The hematopoietic growth factor KL is encoded by the Sl locus and is the ligand of the c-kit receptor, the gene product of the W locus. *Cell* 1990; **63**: 225-233.
- [47] IKEDA H, KANAKURA Y, TAMAKI T, KURIU A, KITAYAMA H, ISHIKAWA J, KANAYAMA Y, YONEZAWA T, TARUI S, GRIFFIN JD. Expression and functional role of the proto-oncogene c-kit in acute myeloblastic leukemia cells. *Blood* 1991; **78**: 2962-2968.
- [48] JOHNSON HM, de CASTRO CM, KAUFMAN RE, VANDENBARK GR. Identification of possible cell specific promoter elements in the human c-kit protooncogene. *Blood* 78 Suppl 1991; **1**: 340a.
- [49] KACZMAREK L, RATAJCZAK MZ, WIKTOR-JĘDRZEJCZAK W. Postirradiation recovery of haemopoiesis in steel mutant mice. *Int J Radiat Biol* 1988; **53**: 703-708.
- [50] KATZAV S, MARTIN-ZANCA D, BARBACID M. Vav, a novel human oncogene derived from a locus ubiquitously expressed in hematopoietic cells. *EMBO J* 1989; **8**: 2283-2290.
- [51] KURIU A, IKEDA H, KANAKURA Y, GRIFFIN JD, DRUKER B, YAGURA H, KITAYAMA H, ISHIKAWA J, NISHIURA T, KANAYAMA Y, YONEZAWA T, TANII S. Proliferation of human myeloid leukemia cell line associated with the tyrosine-phosphorylation and activation of the proto-oncogene c-kit product. *Blood* 1991; **78**: 2834-2840.

- [52] LEV S, GIROLD, YARDEN Y. A specific combination of substrates is involved in signal transduction by the kit-encoded receptor. *EMBO J* 1991; **10**: 647-654.
- [53] LINENBERGER LM, BROUDY VC, MARTIN FH, JACOBSEN FW, BENNETT LG, ABKOWITZ JL. Stem cell growth factor (SCF) production by human marrow fibroblasts. *Blood* 78 Suppl 1991; **1**: 374a.
- [54] MAJUMDER S, BROWN K, QUI F, BESMER P. C-kit protein, a transmembrane kinase: identification in tissues and characterization. *Moll Cell Biol* 1988; **8**: 4896-4903.
- [55] MARTIN FH, SUGGS SV, LANGLEY KE, LU HS, TING J, OKINO KH, MORRIS CF, McNIECE IK, JACOBSEN FW, MENDIAZ EA, BIRKETT NC, SMITH KA, JOHNSON MJ, PARKER VP, FLORES JC, PATEL AC, FISHER EF, ERJAVEC HO, HERRERA ChJ, WYPYCH J, SACHDEV RK, POPE JA, LESLIE I, WEN D, LIN Ch, CUPPLES RL, ZSEBO KM. Primary structure and functional expression of rat abd human stem cell factor DNAs. *Cell* 1990; **63**: 203-211.
- [56] MATTHEWS W, JORDAN CT, GAVIN M, JENKINS NA, COPELAND NG, LEMISCHKA IR. A receptor tyrosine kinase cDNA isolated from a population of enriched primitive hematopoietic cells and exhibiting close genetic linkage to c-kit. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; **88**: 9026-9030.
- [57] MATTHEWS W, JORDAN CT, WIEGAND GW, PARDOLL D, LEMISCHKA JR. A receptor tyrosine kinase specific to hematopoietic stem and progenitor cell-enriched populations. *Cell* 1991; **65**: 1143-1152.
- [58] McNIECE IK, LANGLEY KE, ZSEBO KM. The role of recombinant stem cell factor in early B cell development. *J Immunol* 1991; **146**: 3785-3790.
- [59] McNIECE IK, ZSEBO KM. Authors response. *Exp Hematol* 1991; **19**: 998-999.
- [60] MILES SA, LEE K, HUTLIN L, ZSEBO KM, MITSUYASU RT. Potential use of human stem cell factor as adjunctive therapy for human immunodeficiency virus-related cytopenias. *Blood* 1991; **78**: 3200-3208.
- [61] MUCENSKI ML, McLAIN K, KIER AB, SWERDLOW SH, SCHWEINER CM, MILLER TA, PIETRYGA DW, SCOTT WJ, POTTER SS. A functional c-myc gene is required for normal murine fetal hepatic hematopoiesis. *Cell* 1991; **65**: 677-689.
- [62] MUI A, ALAI M, CUTLER R, BUSTELO X, BARBACID M, KRYSAL G. Steel factor stimulates the tyrosine phosphorylation of vav in both murine and human hemopoietic cell lines. *Blood* 78 Suppl 1991; **1**: 161a.
- [63] NIWA Y, KASUGAI T, OHNO K, MORIMOTO M, YAMAZAKI M, DOHMAE K, NISHIMUNE Y, KONDO K, KITAMURA Y. Anemia and mast cell depletion in mutant rats that are homozygous at "White Spotting (WS)" locus. *Blood* 1991; **78**: 1936-1941.
- [64] NOLTA JA, WEINTHAL J, CROOKS GM, CHALLITA PM, WILLIAMS DE, OVERELL RW, KOHN DB. Effects of mast cell growth factor (MGF) on retroviral vector - mediated gene transfer into primitive hematopoietic progenitors. *Blood* 78 Suppl 1991; **1**: 374a.
- [65] ODY Ch, KINDLER V, VASSALLI P. Interleukin-3 perfusion of W/W^v mice allows the development of macroscopic hematopoietic spleen colonies and restores cutaneous mast cell number. *J Exp Med* 1990; **172**: 403-406.
- [66] OLIVIERI NF, GRUNBERGER T, BEN-DAVID Y, NG J, WILLIAMS DE, LYMAN S, ANDERSON DM, AXELRAD AA, CORREA P, BERNSTEIN A, FREEDMAN MH. Diamond-Blackfan anemia: Heterogenous response of hematopoietic progenitor cells in vitro to the protein product of the steel locus. *Blood* 1991; **78**: 2211-2215.
- [67] PAPA-YANOPOULOU T, BICE M, BROUDY VC, ZSEBO KM. Isolation of c-kit receptor expressing cells from bone marrow, peripheral blood, and fetal liver: functional properties and composite antigenic profile. *Blood* 1991; **78**: 1403-1412.
- [68] PECH N, HERMINE O, BERU N, GOLDWASSER E. Further study of the autocrine regulation of hemopoiesis. *Blood* 78 Suppl 1991; **1**: 313a.
- [69] PEVNY L, SIMON MC, ROBERTSON E, KLEIN WH, TSAI S, D'AGATI V, ORKIN SH, CONSTANTIN F. Erythroid differentiation in chimaeric mice blocked by a targeted mutation in the gene for transcription factor GATA-1. *Nature* 1991; **349**: 257-260.
- [70] PIETSCH T, KYAS V, STEFFENS V, HADAM MR, LUDWIG WD, ZSEBO KM, WELTE K. Effects of human stem cell factor (c-kit ligand) on proliferation of myeloid leukemia cells: heterogeneity in response and synergy with other hematopoietic growth factors. *Blood* 78 Suppl 1991; **1**: 172a.
- [71] QIU F, PRABIR R, BROWN K, BARKER PE, JHANWAR S, RUDDLE FH, BESMER P. Primary structure of c-kit: relationship with the CSF-1/PDGF receptor kinase family - oncogenic activation of v-kit involves deletion of extracellular domain and C terminus. *EMBO J* 1988; **7**: 1003-1011.
- [72] RATAJCZAK MZ, GEWIRTZ AM. Regulation and function of the c-kit protooncogene in normal human hematopoiesis. *Blood* 78 Suppl 1991; **1**: 161a.
- [73] RATAJCZAK MZ, LUGER SM, DeRIEL K, ABRAHM J, CALABRETTA B, GEWIRTZ AM. Role of the kit protooncogene in normal and malignant human hematopoiesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; **89**.

- [74] REITH AD, ELLIS Ch, LYMAN SD, ANDERSON BM, WILLIAMS DE, BERNSTEIN A, PAWSON T. Signal transduction by normal isoforms and W mutant variants of the kit receptor tyrosine kinase. *EMBO J* 1991; **10**: 2451–2459.
- [75] ROTTAPPEL P, REEDIJK M, WILLIAMS DE, LYMAN SD, ANDERSON DM, PAWSON T, BERNSTEIN A. The Steel/W transduction pathway: kit autophosphorylation and its association with a unique subset of cytoplasmic signaling proteins is induced by the steel factor. *Moll Cell Biol* 1991; **11**: 3043–3051.
- [76] RUSCETTI FW, BOGGS DR, TOROK BJ, BOGGS SS. Reduced blood and marrow neutrophils and granulocytic colony-forming cells in Sl/Sld mice. *Proc Soc Exp Biol Med* 1976; **152**: 398–403.
- [77] RUSSEL ES. Hereditary anemias of the mouse: A review for geneticists. *Adv Genet* 1979; **20**: 357–459.
- [78] SCHMITT RM, BRUYNS E, SNODGRASS HR. Hematopoietic development of embryonic stem cells in vitro: cytokine and receptor gene expression. *Genes & Development* 1991; **5**: 728–740.
- [79] SHANON MF, PELL LM, LENARDO MJ, KUCEK ES, OCCHIODORO FS, DUNN SM, VADAS MA. A novel tumor necrosis factor-responsive transcription factor which recognizes a regulatory element in hemopoietic growth factor genes. *Moll Cell Biol* 1990; **10**: 2950–2959.
- [80] SILLATER Ch, STROBL H, BEVEC D, ASHMAN LK, BUTTERFIELD JH, LECHNER K, MAURER D, BETTELHEIM P, VALENT P. IL-4 regulates c-kit proto-oncogene product expression in human mast and myeloid progenitor cells. *J Immunol* 1991; **147**: 4224–4228.
- [81] SMITH FO, BRODY VC, LAMPKIN BC, VERSTEEG C, BUCKLEY JD, OPIE T, WOODS WG, HAMMOND GD, BERNSTEIN ID. Cell surface expression of the c-kit receptor by childhood acute myeloid leukemia (AML) cells lacks prognostic significance. *Blood* 78 Suppl 1991; **1**: 460a.
- [82] TAJIMA Y, ONOUE H, KITAMURA Y, NISHIMUNE Y. Biologically active kit ligand growth factor is produced by mouse Sertoli cells and its defective in Sld mutant mice. *Development* 1991; **113**: 1031–1035.
- [83] TSUJIMURA T, HIROTA S, NOMURA S, NIWA Y, YAMAZAKI M, TONO T, MORII E, KIM H, KONDO K, NISHIMUNE Y, KITAMURA Y. Characterization of Ws mutant allele of rats: A 12-base deletion in tyrosine kinase domain of c-kit gene. *Blood* 1991; **78**: 1942–1946.
- [84] TURNER AM, MARTIN FH, JACOBSEN FW, BENNETT LG, ZSEBO KM, BROUDY VC. Human solid tumor cell lines produce SCF and display c-kit receptor. *Blood* 78 Suppl 1991; **1**: 374a.
- [85] ULICH TR, del CASTILLO J, McNIECE IK, YI ES, ALZONA CP, YIN S, ZSEBO KM. Stem cell factor in combination with granulocyte colony-stimulating factor (CSF) or granulocyte-macrophage CSF synergistically increases granulopoiesis in vivo. *Blood* 1991; **78**: 1954–1962.
- [86] ULLRICH A, SCHLESSINGER J. Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity. *Cell* 1990; **61**: 203–212.
- [87] UMIEL T, PATTENGALE P, WEINBERG KI. Simultaneous expression of IL-7 receptor (IL7R) and c-kit mRNA in myeloid antigen-positive (MY+) B-lineage ALL. *Blood* 78 Suppl 1991; **1**: 271a.
- [88] WALDMANN TA. The multi-subunit interleukin - 2 receptor. *Annu Rev Biochem* 1989; **58**: 875–911.
- [89] WANG Ch, CURTIS JE, GEISSLER JE, McCULLOCH EA, MINDEN MD. The expression of the proto-oncogene c-kit in the blast cells of acute myeloblastic leukemia. *Leukemia* 1989; **3**: 699–702.
- [90] WEISS M, YETZ-ALDAPE J, CROSIER PS, NATHAN DG, SIEFF CA. Committed hematopoietic progenitors of human bone marrow are restricted to the CD38+34+ fraction whereas c-kit expression is greatest in CD38-34+ cells. *Blood* 78 Suppl 1991; **1**: 161a.
- [91] WIKTOR-JĘDRZEJCZAK W, KACZMAREK L. A backcross method to prevent prenatal death of steel mutant mice. *J Hered* 1984; **75**: 73.
- [92] WIKTOR-JĘDRZEJCZAK W, RATAJCZAK MZ. Eosinophilic granulocyte deficiency in mice mutant in *sl* and *w* loci. *Experientia* 1985; **41**: 1596–1598.
- [93] WILLIAMS DE, EISENMAN J, BAIRD A, RAUCH Ch, VANNESS K, MARCH CJ, PARK LS, MARTIN U, MOCHIZUKI DY, BOSWELL HC, BURGESS GS, COSMAN D, LYMAN SD. Identification of a ligand for the c-kit proto-oncogene. *Cell* 1990; **63**: 167–174.
- [94] WITTE ON. Steel locus defines new multipotent growth factor. *Cell* 1990; **63**: 5–6.
- [95] YARDEN Y, KUANG WJ, YANG-FENG T, COUSSENS L, MUNEMITSU S, DULL TJ, CHEN E, SCHLESSINGER J, FRANCKE U, ULLRICH A. Human proto-oncogene c-kit: a new cell surface receptor tyrosine kinase for an unidentified ligand. *EMBO J* 1987; **6**: 3341–3851.
- [96] ZSEBO KM, WILLIAMS DA, GEISSLER EN, BROUDY VC, MARTIN FH, ATKINS HL, HSU R, BIRKETT NC, OKINO KH, MURDOCH DC, JACOBSEN FW, LANGLEY KE, SMITH KA, TAKEISHI T, CATTANACH BM, GALLI SJ, SUGGS SV. Stem cell factor is encoded at the Sl locus of the mouse and is the ligand for the c-kit tyrosine kinase receptor. *Cell* 1990; **63**: 213–224.

- [97] ZSEBO KM, WYPYCH J, McNIECE IK, LU HS, SMITH KA, KARKARE SB, SACHDEV RK, YUSCHENKOFF VN, BIRKETT NC, WILLIAMS LR, SATYAGAL VN, TUNG W, BOSSELMAN RA, MENDIAS EA, LANGLEY KE. Identification, purification, and biological characterization of hematopoietic stem cell factor from buffalo rat liver-conditioned medium. *Cell* 1990; **63**: 195–201.

Otrzymano: 15 lutego 1992 r.

Przyjęto: 20 marca 1992 r.

Adres autorów: Pennsylvania, Filadelfia, PA 19 104 USA

WSPÓŁCZESNE POGLĄDY NA INTERAKCJE MIĘDZYKOMÓRKOWE W GONADZIE MĘSKIEJ SSAKÓW*

INTERCELLULAR COMMUNICATION IN MAMMALIAN TESTIS – A REVIEW

Barbara BILIŃSKA

Pracownia Endokrynologii Zwierząt i Hodowli Tkanki, Zakład Fizjologii Zwierząt,
Instytut Zoologii, Uniwersytet Jagielloński, Kraków

Streszczenie. Postęp metod biochemicznych, immunocytochemicznych, badania w mikroskopie elektronowym, a także rozwój technik *in vitro* pozwalają na analizę poszczególnych typów komórek w gonadzie męskiej. Wzajemne oddziaływania hormonalne między tymi komórkami stanowią przedmiot badań ostatnich lat. Poza regulacją endokrynową istnieje para- i autokrynowe oddziaływanie między komórkami jądra, a wciąż odkrywane nowe czynniki (czynniki) nazwane są para- i autoregulatorami. Celem artykułu jest przedstawienie aktualnego stanu wiedzy na temat interakcji hormonalnych między komórkami Sertoliego, komórkami Leydiga, komórkami mioidalnymi i rozrodczymi, które optymalizują funkcję jądra.

Słowa kluczowe: jądro, komórki Sertoliego, komórki Leydiga, komórki mioidalne, komórki rozrodcze, regulacja endokrynowa, parakrynowa, autokrynowa.

Summary. Recent progress in biochemical and immunocytochemical methods, electron microscopic investigations and new culture techniques allow to analyze various types of testicular cells. The control of Sertoli, Leydig, myoid and germ cells appeared to be modulated by numerous growth factors and para- or autocrine regulators arising within the testis. The purpose of this review is to present recent state of knowledge concerning central as well as local hormonal regulations of testicular cell function. Special attention was paid to the role of cell interactions in the secretory activity of the testis.

Key words: testis, Sertoli cells, Leydig cells, myoid cells, germ cells, endocrine, paracrine, autocrine regulation.

Wykaz skrótów: LH – hormon luteinizujący (lutropina), FSH – hormon dojrzewania pęcherzyka (folitropina), LH-RH – hormon uwalniający LH, FSH-RH – hormon uwalniający FSH, GnRH – gonadoliberyna (hormon uwalniający gonadotropiny), PRL – prolaktyna, TSH – tyreotropina, ACTH – kortykotropina, CRH – hormon uwalniający

*W artykule zostały wykorzystane czasopisma i wydawnictwa książkowe zakupione dzięki: 1) World Health Organization – SMA Grant, Special Programme of Research, Development and Research Training in Human Reproduction, 2) CPBP 05.06.1.2.2. ART - Olsztyn, 3) Z-12/91 KBN Warszawa.

kortykotropinę, MSH – melanotropina, ABP – białko wiążące androgeny, TGF – transformujący czynnik wzrostu, EGF – epidermalny czynnik wzrostu, IGF – insulinowy czynnik wzrostu, IL-1 – interleukina jądrowa, LTB₄ – leukotrien B₄, MIH – substancja hamująca rozwój przewodów Müllera (*Müllerian inhibiting hormone*), AVT – arginino-wazotocyna, AVP – arginino-wazopresyna, POMC – pro-opiomelanokortyna, PA – aktywator plazminogenu, P-mod-S – substancja wydzielana przez komórki mioidalne (*peritubular*), modulująca funkcję komórek Sertoliego, ANF – *atrial natriuretic factor*, rAP-II – *atriopeptin* typ II.

WSTĘP

Zdolność komórek do interakcji i wzajemnego komunikowania się jest niezwykle istotną cechą układów biologicznych. Już w 1878 r. Claude Bernard zauważył, że środowisko wewnętrzne organizmu, tkanki, komórki stanowi system kontrolujący ich wzrost, rozwój i utrzymanie prawidłowej funkcji. Wiedza dotycząca omawianego zagadnienia rozwija się bardzo dynamicznie. W ostatnich latach szczególnie intensywne są badania molekularnego podłoża interakcji międzykomórkowych w czasie embriogenezy i organogenezy [38]. Jest oczywiste, iż komunikacja międzykomórkowa zachodzi na rozmaitych poziomach. Jednym z nich jest regulacja hormonalna, która polega na:

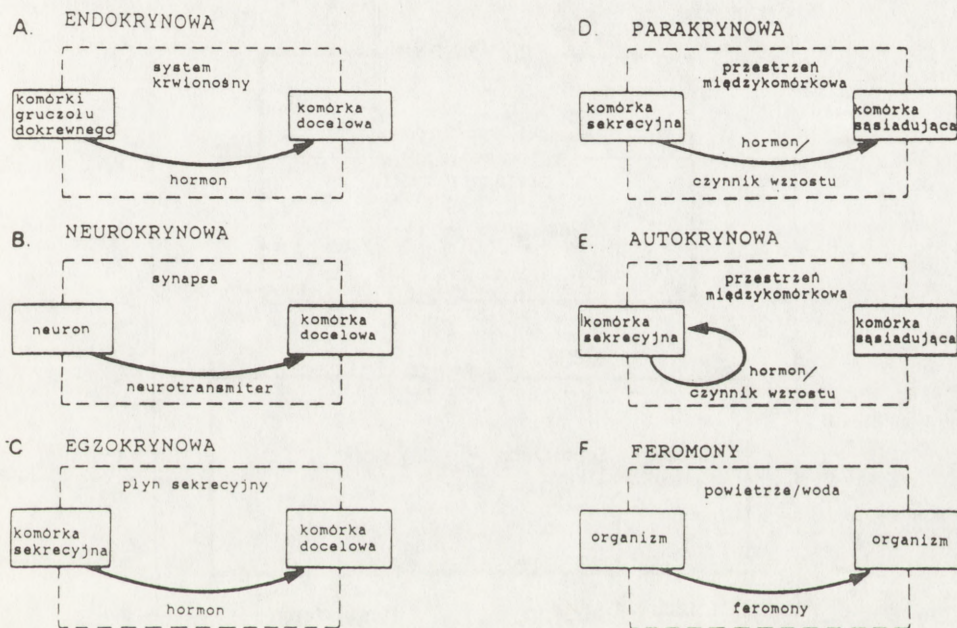
- (a) syntezie przekaźnika sygnału przez komórkę sekrecyjną ,
- (b) uwolnieniu jego cząsteczki do wspólnego środowiska oraz
- (c) wiązaniu go ze specyficznym receptorem w komórce docelowej .

Ostatnio wyodrębniono różne systemy hormonalnej komunikacji międzykomórkowej (rys. 1). W klasycznym układzie działa regulacja endokrynowa (A), gdzie komórka wydzielająca stanowi część gruczołu dokrewnego, zaś hormon, czyli sygnał dla komórki docelowej jest przenoszony drogą krwi. Dla układu nerwowego natomiast charakterystyczna jest regulacja neurokrynowa (B), w której z komórki nerwowej uwalniany jest neurotransmitter stanowiący przekaźnik sygnału wysyłany do komórki docelowej. W regulacji egzokrynowej (C) środowiskiem jest np. sok żołądkowy, a interakcja dotyczy rozmaitych komórek sekrecyjnych żołądka. Ponadto istnieje regulacja parakrynowa (D), gdzie produkt sekrecji oddziałuje na komórkę sąsiadującą lub autokrynowa (E), kiedy komórka pozostaje pod wpływem czynnika, który sama produkuje. Wreszcie ostatnim typem hormonalnych interakcji międzykomórkowych to oddziaływanie feromonów przenoszonych w środowisku wodnym lub w powietrzu (F) [53].

W gonadzie męskiej mechanizmy regulacyjne są szczególnie złożone z dużą możliwością samosterowania opartego głównie na ujemnych sprzężeniach zwrotnych (rys. 2). W tym wielopoziomowym systemie ważną rolę odgrywają neurony podwzgórza, ponieważ sekrecyjna czynność neuronów wytwarzających LH-RH i FSH-RH, czyli GnRH (gonadoliberynę – czynnik uwalniający gonadotropiny), podlega regulacji przez obecne w podwzgórzu neurony noradrenergiczne, dopaminoergiczne, serotoninoergiczne, somatostatynoergiczne, opioergiczne, endorfinoergiczne, enkefalinoergiczne, SP-ergiczne i inne [57, 58]. Z kolei, czynność neuronów syntetyzujących i wydzielających GnRH wpływa na uwalnianie hormonów z przysadki mózgowej, a także kontrolowana jest przez poziom hormonów steroidowych we krwi.

Rozpatrując regulację centralną (ośrodkową) i lokalną, w obrębie gonady, należy pamiętać, że opierają się one na współdziałaniu czynności układu nerwowego i hormonów bądź substancji aktywnych biologicznie. Pomimo że lokalna regulacja w obrębie gonady obejmuje

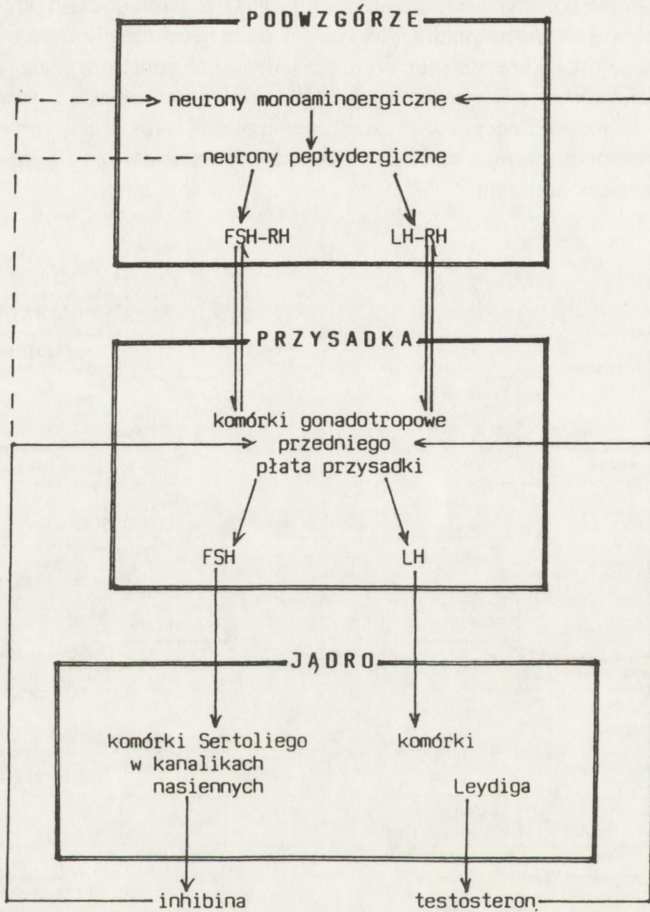
wiele mechanizmów o dużym stopniu autonomii, istnieje jednak ściśle powiązanie czynnościowe z zachowaną wyraźnie nadrzędną rolą ośrodkowego układu nerwowego. Regulacja nerwowa działa szybko i precyzyjnie, wymaga jednak utrzymania w stałej gotowości wielu milionów neuronów wraz z ich licznymi wypustkami. Stan gotowości czynnościowej polega na utrzymaniu różnicy potencjałów między powierzchnią włókna nerwowego, a jego wnętrzem. Zadanie to spełnia pompa sodowo-potasowa w procesie bardzo dla organizmu kosztownym, bowiem energochłonnym.



Rys. 1. Różne typy hormonalnej interakcji międzykomórkowej [53]

Regulacja hormonalna natomiast odbywa się poprzez krew, niejako przy okazji, a więc bez kosztów energetycznych. Jest to jednak proces wolny, uwarunkowany czynnością wielu przekaźników. Czas dotarcia cząsteczki hormonu do narządu docelowego jest wielokrotnie dłuższy niż w przypadku przesłania poleceń drogą nerwową; wymaga ponadto obecności specyficznych receptorów błonowych i cytoplazmatycznych [49].

Mechanizmy centralnej regulacji czynności jąder były i są przedmiotem wielu badań [1, 8, 11, 12, 22, 88, 94], mechanizmy lokalne natomiast są obiektem doświadczeń naukowych ostatnich lat i wciąż przybywa informacji dotyczących wzajemnych interakcji międzykomórkowych w jądrze [23, 52, 73, 79, 80, 81, 83, 86]. W ostatnim dziesięcioleciu endokrynologia została zrewolucjonizowana przez wykrycie dodatkowych czynników (regulatorów), które regulują wzrost i różnicowanie, a nie są hormonami. Czynniki te lub regulatory działają często lokalnie na komórki sąsiadujące (regulatory parakrynowe) lub na komórki je produkujące (regulatory autokrynowe). Należy zaznaczyć, że regulatory są czynnikami modulującymi



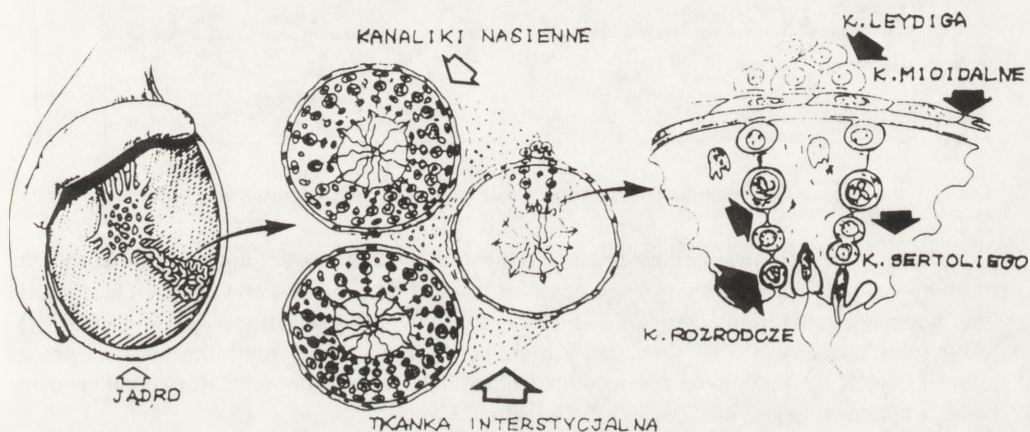
Rys. 2. Oś podwzgórze-przysadka-jądro

funkcję komórek drogą wiązania się ze specyficznymi receptorami obecnymi w danej komórce [99]. Przykładem hormonu działającego na różnych drogach jest testosteron, który w drodze endokrynowej odpowiada na pulsacyjne wydzielanie LH [38] parakrynowej, oddziałuje na komórki rozrodcze i Sertoliego aktywując polimerazę RNA [50] i syntezę białka wiążącego androgeny (ABP) [35] oraz jako regulator autokrynowy działa na komórki Leydiga, które go produkują [21].

Zasadniczymi funkcjami gonady męskiej jest wytwarzanie plemników oraz produkcja hormonów steroidowych. Jądro ssaków składa się z dwóch anatomicznie wydzielonych części: kanalików nasiennych zawierających komórki Sertoliego i komórki rozrodcze w różnym stadium rozwoju oraz tkanki interstycjalnej z komórkami Leydiga odpowiedzialnymi za produkcję androgenów (rys. 3). Kluczowa rola, jaką pełnią komórki Sertoliego w lokalnej regulacji czynności jądra, uwarunkowana jest specyficznym ułożeniem tych komórek w gonadzie męskiej. Są one związane z parakrynową regulacją procesu spermatogenezy, para-

krynową kontrolą funkcji komórek mioidalnych i komórek Leydiga, podlegając równocześnie działaniu para- i autoregulatorów [56, 99].

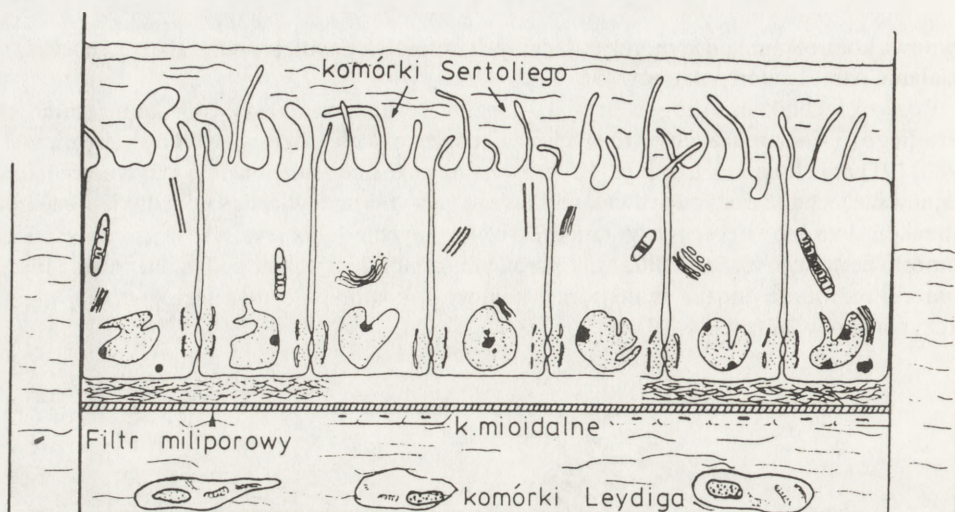
Rozwój technik *in vitro*, stwarzający możliwość hodowania czystych kultur komórek Sertoliego [33], rozrodczych (w różnych stadiach ich rozwoju), okołokanalikowych (mioidalnych) [91] oraz komórek Leydiga [12] pozwala na poznanie funkcjonalnej aktywności jądra. Najnowsze techniki z użyciem dwukomorowego naczynia hodowlanego umożliwiają badania interakcji dwu lub więcej typów komórek izolowanych z jądra (rys. 4). W komorze takiej komórki Sertoliego rosną na filtrze miliporowym, komórki mioidalne pod powierzchnią filtru, komórki rozrodcze dodane są do górnej komory, a komórki Leydiga leżą w dolnej części naczynia hodowlanego [36, 43, 44].



Rys. 3. Schemat budowy jądra [99]

WZAJEMNE ODDZIAŁYWANIE KOMÓREK SERTOLIEGO I ROZRODCZYCH

W kanaliku nasiennym komórki Sertoliego towarzyszą komórkom rozrodczym i stanowią jedyne niegametogeniczne elementy nabłonka plemnikotwórczego. Komórki te spoczywają na blaszce podstawnej i charakteryzują się licznymi wypustkami, między które wnikają komórki rozrodcze. W wyniku wytworzenia przez sąsiadujące ze sobą komórki Sertoliego połączeń zamykających ściśle powstają dwa ściśle odizolowane przedziały: przypodstawny i przyśrodkowy (adluminalny), dzięki którym skład chemiczny środowiska w przedziale przyśrodkowym różni się znacznie od składu chemicznego osocza (rys. 5). Tak więc, komórki Sertoliego odpowiadają za formowanie bariery krew-jądro, której biologiczna rola jest bardzo ważna dla prawidłowego przebiegu spermatogenezy. Ponadto komórki te są docelowymi dla FSH hormonu działającego w drodze endokrynowej, odpowiedzialnego za utrzymanie procesu spermatogenezy [3, 34, 102]. Podlegają także wpływowi glukagonu i tyreotropiny (TSH) (rys. 6) [27]. Poza tym poprzez produkcję szeregu białek modulują funkcję komórek rozrodczych. I tak, białka, transferyna i ceruloplazmina są zaangażowane w transport żelaza i miedzi z osocza do przedziału przyśrodkowego w kanaliku nasiennym [89, 90, 104]. Mleczany,



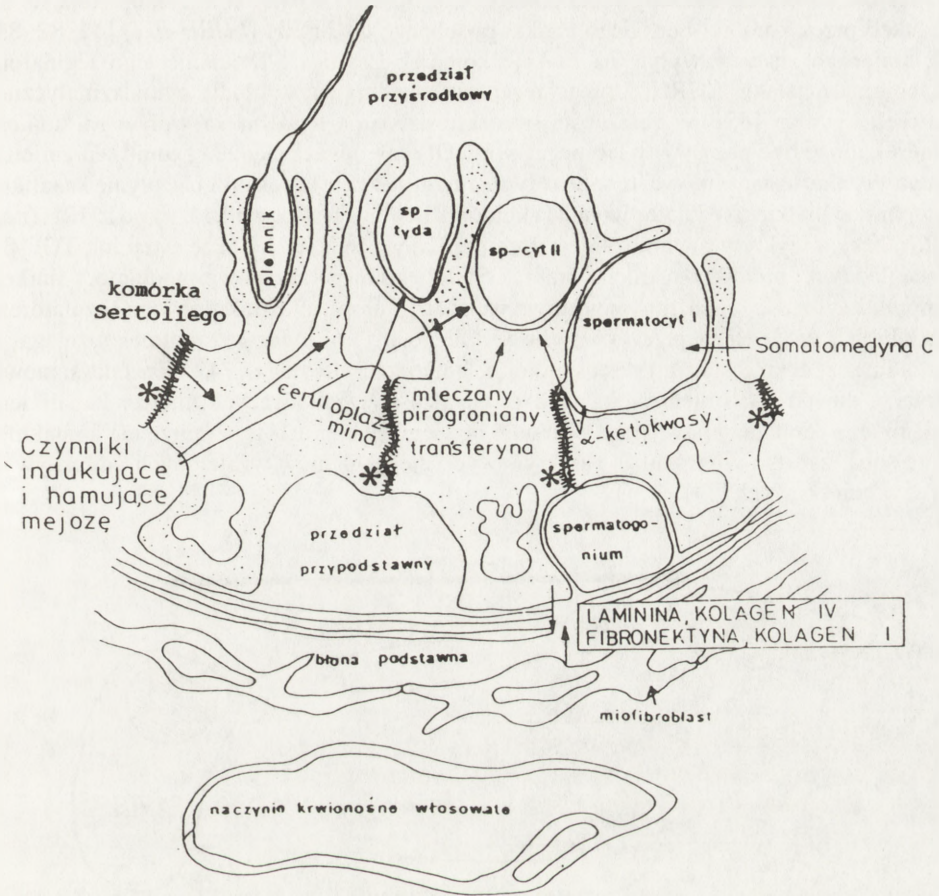
Rys. 4. Schemat dwukomorowego naczynia do prowadzenia hodowli różnych typów komórek izolowanych z jądra [36]

pirogroniany i α -ketokwasy są niezbędne do prawidłowego wzrostu i dojrzewania komórek rozrodczych [45]. Komórki Sertoliego odpowiadają na drodze parakrynowej na wiele czynników wzrostu: transformujący (TGF- α i TGF- β) [75, 97, 105], insulinowy (IGF-I i IGF-II) [100] i epidermalny (EGF) [4]. Część z nich, jak TGF- β , IGF-I, produkowane jest przez komórki Sertoliego, stanowiąc tym samym dla innych komórek jądra regulatory parakrynowe bądź są autokrynowymi dla komórek Sertoliego [15].

EGF i inne białka wpływają na tempo mitoz niezbędnych w czasie zmieniających się stadiów cyklu nabłonka plemnikotwórczego [4]. Białko wiążące witaminę A jest czynnikiem o podstawowym znaczeniu w utrzymaniu prawidłowego procesu spermatogenezy [31, 72].

IGF-I, zwany inaczej somatomedyną C działa na mejozytyczne spermatocyty oraz reguluje syntezę DNA [15, 100]. Jądrowa interleukina (IL-1) stymuluje wzrost komórek rozrodczych [46], natomiast IGF-II wpływa na ich metabolizm [71]. Istotnym z punktu widzenia organogenezy jest MIH – substancja białkowa, zwana hormonem powodującym regresję przewodów Müllera, syntetyzowana przez płodowe i perinatalne komórki Sertoliego [25]. Autokrynowo komórki Sertoliego działają produkując adenozyne, która hamuje ich odpowiedź na FSH [60]. Także prostaglandyny są ich autokrynowym regulatorem [20]. Wiadomo też, że czynnościowa aktywność komórek Sertoliego może być modulowana przez komórki rozrodcze wnikające między wypustki cytoplazmatyczne komórek Sertoliego. I tak, sekrecja białka wiążącego androgeny (ABP) jest stymulowana w obecności pachytenowych spermatocytów przylegających do komórek Sertoliego [24]. Z kolei gdy komórki rozrodcze ulegają uszkodzeniu, obserwuje się spadek funkcji komórek Sertoliego wyrażający się obniżeniem poziomu estradiolu [51] oraz spadkiem syntezy RNA [76].

Na koniec należy zaznaczyć, że cytoarchitektura kanalika i ułożenie komórek Sertoliego względem komórek rozrodczych w różnych stadiach rozwoju stanowi jeden z najlepszych przykładów interakcji komórek w obrębie narządu, a rozwinięcie specyficznych połączeń międzykomórkowych świadczy o silnych oddziaływaniach pomiędzy sąsiadującymi komórkami [56, 78].

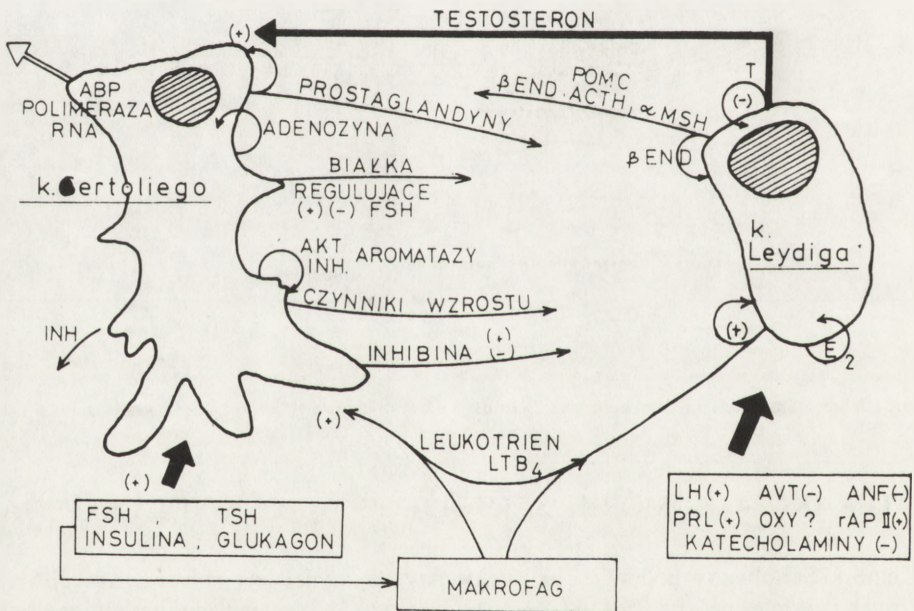


Rys. 5. Schemat interakcji między komórkami Sertoliego a komórkami rozrodczymi [13]; x – połączenia ściśle zamykające

INTERAKCJA KOMÓRKI SERTOLIEGO – KOMÓRKI LEYDIGA

Komórki Sertoliego w hodowli są niezwykle aktywne, wydzielają ponad 80 różnych białek zależnych i niezależnych od FSH [69, 84, 101]. Jednym z nich, mającym kluczowe znaczenie w kontroli funkcji kanalika nasiennego jest białko wiążące androgeny (ABP) [37, 44]. Jego sekrecja jest stymulowana zarówno przez FSH, jak i testosteron produkowany przez komórki Leydiga. Białko to jest w 20% wydzielane do krwi, a w 80% do płynu kanalikowego, powodując polaryzację komórek Sertoliego [43]. Należy pamiętać, że właśnie testosteron jest głównym regulatorem parakrynowym funkcji komórek Sertoliego i autokrynowym dla komórek Leydiga (rys. 6) [19, 77].

Ponadto wzajemne oddziaływania pomiędzy obydwoma typami komórek opierają się na produkcji przez komórki Sertoliego białka podobnego do LHRH (*LHRH-like*) [42, 82, 83, 87], mającego znaczny wpływ na funkcję komórek Leydiga. Działanie tego regulatora przypomina działanie LHRH, którego receptory znajdują się w błonie cytoplazmatycznej komórek Leydiga [85]. W zależności od czasu działania tego białka wpływ na funkcję komórek może być pozytywny lub negatywny. Obecnie uważa się, że czynnik ten zmienia przepuszczalność naczyń, regulując tym samym stężenie testosteronu w płynie kanalikowym. Innym białkiem regulatorowym dla komórek Leydiga jest czynnik różny od LHRH (*non LHRH-like*), a wykryty równocześnie z wyżej opisanym [67, 107]. Także estradiol, TGF- β i prostaglandyny, produkty sekrecji komórek Sertoliego to parakrynowe modulatory funkcji komórek Leydiga [51, 96]. Innym ważnym wewnątrzjądrowym, parakrynowym regulatorem jest inhibina wydzielana przez komórki Sertoliego [41, 63]. Jej heterodimer wzmacnia, a homodimer redukuje sekrecję testosteronu w komórkach Leydiga [74]. Ten fakt stanowił pierwszy dowód na istnienie lokalnych mechanizmów zachodzących między kanalikiem nasiennym a tkanką interstycjalną. Wiadomo bowiem, że komórki te w jądrze nie kontaktują się ze sobą; zaczęto więc szukać parakrynowych mechanizmów wzajemnych oddziaływań międzykomórkowych [84].



Rys. 6. Schemat oddziaływań między komórkami Sertoliego a komórkami Leydiga: INH – inhibina, ANF – atrial natriuretic factor, rAPII – atriopeptin typ II

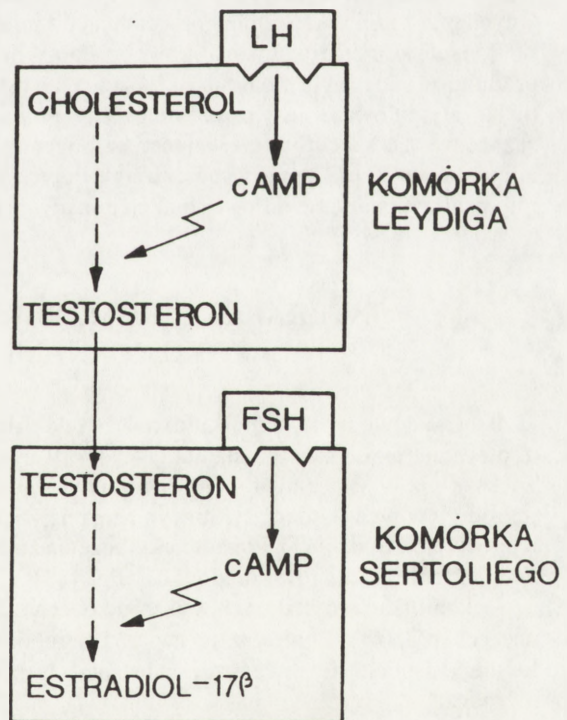
Prolaktyna (PRL) to hormon pełniący endokrynową rolę w funkcji komórek Leydiga, prowadzący do wzrostu ilości receptorów LH i aktywności aromatazy – enzymu niezbędnego do przekształcania testosteronu w estradiol [66]. To ostatnie zjawisko zachodzi w komórkach Sertoliego, a współdziałanie obu typów komórek zostało opisane jako teoria zależności

"dwóch gonadotropin-dwóch komórek" (rys. 7) [26]. Czynniki wzrostu, które są parakrynowymi regulatorami dla wszystkich typów komórek [6], w znacznym stopniu modulują także funkcję komórek Leydiga. TGF- β [55, 96] oraz IGF-I [54, 61] regulują proces steroidogenezy. Ten ostatni czynnik wraz z interleukiną jądrową (IL-1) działa jako regulator autokrynowy hamując sekrecję testosteronu w komórkach Leydiga [16, 17].

Następnym parakrynowym regulatorem funkcji komórek Leydiga to system renino-angiotensynowy, obniżający steroidogenezę poprzez wiązanie się ze specyficznymi receptorami obecnymi w komórkach Leydiga [47]. W komórkach tych, izolowanych z dorosłych szczurów wykazano także miejsca wiążące dla białek atrialnych, pod których wpływem wzrasta produkcja testosteronu [32].

Komórki Leydiga mają również receptory arginino-wazotocynowe (AVT), arginino-wazopresynowe (AVP) i oksytocyny, co pozwala im na odpowiedź na działanie hormonów podwzgórzowych. Hormony te powodują spadek biosyntezy testosteronu stymulowanej przez LH, oksytocyna natomiast powoduje wzrost akumulacji testosteronu w komórkach Leydiga [58, 64, 103].

Katecholaminy [2], interferony α i γ [65] oraz serotonina [18] są negatywnymi regulatorami funkcji komórek Leydiga. Poza tym że komórki Leydiga są zdolne do odpowiedzi na regulację parakrynową, same także produkują szereg czynników białkowych. Hormon uwalniający kortykotropinę (CRH) [108] i β -endorfina [62] stanowią przykłady autokrynowych regulatorów komórek Leydiga. Obecnie uzyskane dowody wskazują, że komunikacja między komórkami Leydiga i kanalikami odbywa się również przez związki opiatowe (pochodne pro-enkefalinowych białek). I tak, pochodne pro-opiomelanokortyny (POMC), których obecność stwierdzono w przednim i środkowym płacie przysadki mózgowej, zostały także opisane jako produkty sekrecji komórek Leydiga [5]. Działają one w drodze parakrynowej, wiadomo bowiem, że ACTH i α -MSH [14] podnoszą poziom cAMP w komórkach Sertoliego, a β -endorfina redukuje ten poziom i hamuje stymulowaną przez FSH akumulację cAMP [28, 29, 30, 62]. Podsumowując badania nad regulacją hormonalną funkcji komórek Leydiga, można stwierdzić, że regulacja ta jest procesem wieloczynnikowym, skoro produkcja i uwalnianie testosteronu podlega działaniu tak wielu auto- i parakrynowych regulatorów, które optymalizują funkcję jąder [73, 81].



Rys. 7. Model "dwie gonadotropiny - dwie komórki" [26]

INTERAKCJA KOMÓREK SERTOLIEGO, MIOIDALNYCH, CZYLI OKOŁOKANALIKOWYCH I KOMÓREK LEYDIGA

Komórki Sertoliego wraz z mioidalnymi syntetyzują białka substancji międzykomórkowej (*extracellular matrix*), która formuje blaszkę podstawną kanalika [3]. Fibronektyna, kolagen typu I i IV oraz proteoglikany są produkowane przez komórki mioidalne kanalika, natomiast laminina, a także kolagen typu IV i proteoglikany przez komórki Sertoliego [92, 93]. Kooperacja obu typów komórek odgrywa doniosłą rolę w utrzymaniu odpowiedniej struktury kanalika, a co za tym idzie w regulacji procesu spermatogenezy (rys. 5). Fakt ten stanowi kluczowe zjawisko w odtwarzaniu się substancji międzykomórkowej i kontroli zmian w barierze krew-jądro, potrzebnej do przemieszczenia się spermatocytów do przedziału przyśrodkowego [106]. Ponadto należy dodać, że oksytocyna produkowana przez komórki Leydiga działa na komórki okołokanalikowe powodując ich ściśnięcie, zespolenie ich warstwy, napędzając tym samym uwolnione plemniki do sieci jądra (rys. 8) [70].

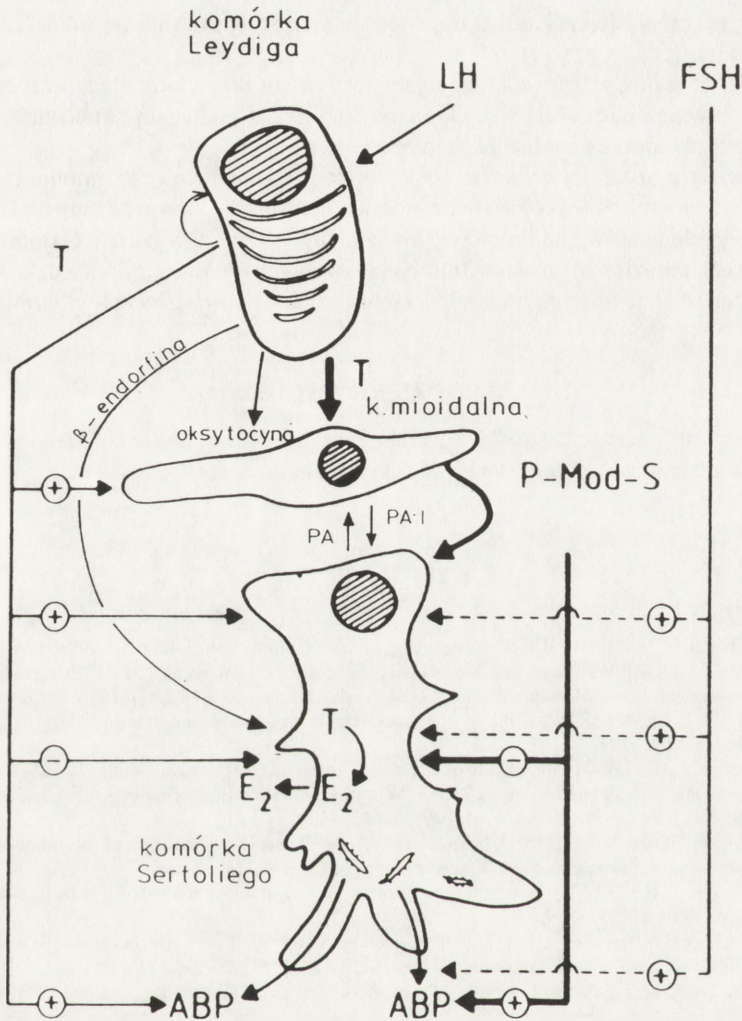
Dalsze wzajemne oddziaływanie polega na sekrecji aktywatora plazminogenu (PA) wydzielanego przez komórki Sertoliego zależnie od poziomu FSH. Mioidalne komórki natomiast produkują inhibitor aktywatora plazminogenu (PA-I), który limituje aktywność wyżej opisanego białka i pełni regulacyjną rolę w modulowaniu specyficznej aktywności proteaz wydzielanych przez komórki Sertoliego sąsiadujące z mioidalnymi [39].

Ponadto komórki okołokanalikowe działają w drodze parakrynowej na komórki Sertoliego, produkując substancję modulującą funkcje tych ostatnich (P-mod S) [40, 93]. Produkcja tego białka stymulowana jest przez androgeny produkowane w komórkach Leydiga. Należy zaznaczyć, że specyficzne receptory androgenów zostały wykryte właśnie w komórkach mioidalnych [95]. Opisane współdziałanie dotyczy trzech typów komórek jądra i pełni istotną rolę w utrzymaniu prawidłowej funkcji gonady męskiej.

INTERAKCJA KOMÓREK ROZRODCZYCH Z KOMÓRKAMI LEYDIGA

Istnieją dowody, że komórki rozrodcze oddziałują na komórki Leydiga, bowiem komórki te otoczone przez kanaliki stadium VII i VIII cyklu nabłonka plemnikotwórczego są dużo większe niż w sąsiedztwie komórek innych stadiów [8, 10]. Wiadomo także, że komórki rozrodcze w tych stadiach cyklu wymagają największej ilości testosteronu do prawidłowego ich rozwoju i funkcji [7]. Ponadto uszkodzenie komórek rozrodczych wydaje się wpływać na zmniejszenie rozmiarów komórek Leydiga [68].

W komórkach rozrodczych wykazano obecność białek POMC-pochodnych i proenkefalinowych [28, 48]. Ponieważ te związki regulują funkcję komórek Sertoliego i komórek Leydiga, istnieje możliwość, że substancje te mają podobne działanie także na komórki rozrodcze.



Rys. 8. Schemat oddziaływań para- i autokrynych między komórkami Sertoliego, komórkami mioidalnymi a komórkami Leydiga: PA – aktywator plazminogenu, PA-I – inhibitor aktywatora plazminogenu, T – testosteron, E₂ – estradiol

MAKROFAGI A FUNKCJA JĄDRA

Produkcja interleukiny jądrowej (IL-1) przez makrofagi jest wynikiem ich aktywacji przez różne czynniki stymulujące uwalnianie do tkanki interstycjalnej [59]. Funkcja IL-1 jest wieloraka, m.in. pod jej wpływem następuje wzrost sekrecji prostaglandyn, zaangażowanych w regulację parakrynową funkcji komórek Sertoliego. Aktywacja jądrowej IL-1 regulowana jest przez LH, poprzez mechanizmy niezależne od testosteronu [9]. Leukotrien B₄ (LTB₄), produkowany przede wszystkim przez makrofagi leżące w tkance interstycjalnej, także przez

komórki Leydiga, a nawet Sertoliego powoduje wzrost stymulowanej przez LH produkcji testosteronu (rys. 5).

Poza makrofagami, w tkance interstycjalnej leżą komórki endotelialne, limfocyty i fibroblasty, które również oddziałują wzajemnie na siebie oraz podlegają parakrynowej regulacji przez produkty komórek kanalika nasiennego [98].

Dynamiczny w ostatniej dekadzie postęp metod biochemicznych, immunocytochemicznych oraz badania w mikroskopie elektronowym pozwalają na prowadzenie dalszych badań nad integracją elementów endokrynowych i gametogenicznych w jądrze. Natomiast techniki hodowli tkanek umożliwiają badanie funkcji izolowanych typów komórek z dala od procesów zachodzących w niejednorodnym strukturalnie i czynnościowo gruczole dokrewnym, jakim jest jądro.

PODZIĘKOWANIE

Składam bardzo serdeczne podziękowanie Pani Profesor dr hab. Stanisławie Stokłosowej za przeczytanie manuskryptu i cenne uwagi krytyczne.

LITERATURA

- [1] AMMANN RP, SCHANBACHER BD. Physiology of male reproduction. *J Anim Sci* 1983; **57** suppl 2: 380–403.
- [2] ANAKWE O, MOGER WH. Catecholamine stimulation of androgen production by rat Leydig cells. Interactions with luteinizing hormone and luteinizing hormone-releasing hormone. *Biol Reprod* 1986; **35**: 806–814.
- [3] ANTHONY CT, SKINNER MK. Actions of extracellular matrix of Sertoli cell morphology and function. *Biol Reprod* 1989; **40**: 691–703.
- [4] ASCOLI M, SEGALOFF DL. Regulation of luteinizing hormone receptors and actions in MA-10 Leydig tumor cells by epidermal growth factor. [w:] Cell to Cell Communication in Endocrinology, Piva F, Bardin CW, Forti G, Motta M [red.], Raven Press, New York 1988; 49: 129–139.
- [5] BARDIN CW, MORRIS PL, CHEN CL, BOITANI C, KRIEGER DT. The action of pro-opiomelanocortin-derived peptides on testicular cells. *Ann NY Acad Sci* 1987; **512**: 308–314.
- [6] BELLEVÉ AR, ZHENG W. Growth factors as autocrine and paracrine modulators of male gonadal functions. *J Reprod Fertil* 1989; **85**: 771–779.
- [7] BERGH A. Local differences in Leydig cell morphology in the adult rat testis: evidence for a local control of Leydig cells by adjacent seminiferous tubules. *Int J Androl* 1982; **5**: 325–334.
- [8] BERGH A. Paracrine regulation of Leydig cells by the seminiferous tubules. *Int J Androl* 1983; **6**: 57–66.
- [9] BERGH A. Effect of cryptorchidism on the morphology of testicular macrophages: evidence for a Leydig cell-macrophage interaction. *Int J Androl* 1985; **8**: 86–94.
- [10] BERGH A. Development of stage specific paracrine regulation of Leydig cells by seminiferous tubules. *Int J Androl* 1985; **8**: 80–85.
- [11] BILIŃSKA B. Rola komórek Leydiga w funkcji rozrodczej samca. *Biul Inf ART* 1988; **25**: 20–39.
- [12] BILIŃSKA B. Regulacja hormonalna funkcji komórek Leydiga in vitro. *Endokrynologia Polska* 1990; suppl 4 Prace habilitacyjne: 1–57.
- [13] BIELAŃSKA-OSUCHOWSKA Z, SYSA PS. Komórki podporowe (Sertoliego) kanalików nasiennych ssaków. *Post Biol Kom* 1980; **7**: 305–339.
- [14] BOITANI C, MATHER JP, BARDIN CW. Stimulation of adenosine 3',5'-monophosphate production in rat Sertoli cells by α -melanotropin-stimulating hormone (α -MSH) and desacetyl α MSH. *Endocrinology* 1986; **118**: 1513–1518.
- [15] CAILLEAU J, VERMEIRE S, VERHOEVEN G. Independent control of the production of insulin-like growth factor I and its binding protein by cultured testicular cells. *Mol Cell Endocrinol* 1990; **69**: 79–84.
- [16] CALKINS JH, SIGEL MM, NANKIN HR, LIN T. Interleukin-1 inhibits Leydig cell steroidogenesis in primary culture. *Endocrinology* 1988; **123**: 1605–1610.

- [17] CALKINS JH, GUO H, SIGEL MM, LIN T. Differential effects of recombinant interleukin-1 α and β on Leydig cell function. *Biochem Biophys Res Commun* 1990; **167**: 548–554.
- [18] CAMPOS MB, VITALE ML, RITTA MN, CHIOCCHIO SR, CALANDRA RS. Involvement of serotonin in testicular androgen production. 5th European Workshop on Molecular and Cellular Endocrinology of the Testis, Brighton UK, 1988; Abstract B16.
- [19] CARREAU S, PAPAPOPOULOS V, DROSDOWSKY MA. Stimulation of adult rat Leydig cell aromatase activity by a Sertoli cell factor. *Endocrinology* 1988; **123**: 1103–1109.
- [20] COOPER DR, CARPENTER MP. Sertoli cell prostaglandin synthesis. *Biochem J* 1987; **241**: 847–855.
- [21] DARNEY KJ jr, EVING LL. Autoregulation of testosterone secretion in perfused rat testes. *Endocrinology* 1981; **109**: 993–995.
- [22] DE KRETZER DM, KERR JB. The cytology of the testis. [w:] *The Physiology of Reproduction*, Knobil E, Neill JD [red.] Raven Press New York, 1988; 20: 837–863.
- [23] DEMOULIN A, FRENCHIMONT P. Paracrine regulation of testicular function. *Acta Urol Belg* 1989; **57**: 47–58.
- [24] DJAKIEW D, DYM M. Pachytene spermatocyte proteins influence Sertoli cell function. *Biol Reprod* 1988; **39**: 1193–1198.
- [25] DONAHOE PK, BUDZIK GP, TRELSTAD R, MUDGETT-HUNTER M, FULLER A jr, HUTSON JM, IKAWA H, HAYASHI A, MACLAUGHLIN D. Müllerian-inhibiting substance: An update. *Rec Prog Horm Res* 1982; **38**: 279–330.
- [26] DORRINGTON JH, FRITZ IB, ARMSTRONG DT. Control of testicular estrogen synthesis. *Biol Reprod* 1978; **18**: 55–64.
- [27] EIKVAR L, LEVY FO, ATTRAMADAL H, JUTTE NHPM, FROYSA H, TUERMYR SM, HANSSON V. Glucagon-stimulated cyclic AMP production and formation of estradiol in Sertoli cell cultures from immature rats. *Mol Cell Endocrinol* 1985; **39**: 107–114.
- [28] ENGLEHARDT RP, SAINT-POL P, TRAMU G, LEONARDELLI J. Immunohistochemical localization of enkephalin like peptides during testicular development in rats. *Arch Androl* 1986; **17**: 49–56.
- [29] FABBRI A, DUFAUM. Hormonal regulation of beta-endorfin in the testis. *J Steroid Biochem* 1988; **30**: 347–359.
- [30] FABBRI A, KNOX G, BUCZKO E, DUFAU ML. Beta-endorfin production by the fetal Leydig cell: regulation and implications for paracrine control of Sertoli cell function. *Endocrinology* 1988; **122**: 749–761.
- [31] FETTEROLF PM, SKINNER MK. Sertoli cells produce vitamin binding proteins. *Ann NY Acad Sci* 1987; **513**: 480–486.
- [32] FORESTA C, MIONI R, CARETTO A. Special binding and steroidogenic effects of atrial natriuretic factor (ANF) in Leydig cells of rats. *Arch Androl* 1987; **19**: 253–259.
- [33] GALDIERI M, ZIPARO E, PALOMBI F, RUSSO MA, STEFANINI MJ. Pure Sertoli cell cultures: a new model for the study of somatic-germ interactions. *J Androl* 1981; **2**: 249–255.
- [34] GROOTEGOED JA, DEN BOER PJ, MACKENBACH P. Sertoli cell-germ communication. *Ann NY Acad Sci* 1989; **564**: 232–253.
- [35] GUNSALUS GL, LORREA F, MUSTO RR, BECKER RR, MATHER JP, BARDIN CW. Androgen binding protein as a marker of Sertoli cell function. *J Steroid Biochem* 1981; **15**: 99–106.
- [36] HADLEY MA, DJAKIEW D, BYERS SW, DYM M. Polarized secretion of androgen-binding protein and transferrin by Sertoli cells grown in a bicameral culture system. *Endocrinology* 1987; **120**: 1097–1106.
- [37] HAGENÄS L, RITZEN EM, PLOEN L, HANSSON V, FRENCH FS, NEYFEH SN. Sertoli cell origin of testicular androgen-binding protein (ABP). *Mol Cell Endocrinol* 1975; **2**: 339–345.
- [38] HEINDEL JJ, TREINEN KA. Physiology of the male reproductive system: endocrine, paracrine and autocrine regulation. *Toxicol Pathol* 1989; **17**: 411–445.
- [39] HETTLE JA, BALEKIJAN E, TUNG PS, FRITZ IB. Rat testicular cells in culture secrete an inhibitor of plasminogen activity. *Biol Reprod* 1988; **38**: 359–371.
- [40] HOLMES SD, LIPSHULTZ LI, SMITH RG. Regulation of transferrin secretion by human Sertoli cells cultured in the presence or absence of human peritubular cells. *J Clin Endocrinol Metab* 1984; **59**: 1058–1067.
- [41] HSUEH AJW, DAHL KD, VAUGHAN J, TUCKER E, RIVIER J, BARDIN CW, VALE W. Heterodimers and homodimers of inhibin subunits have different paracrine action in the modulation of luteinizing hormone-stimulated androgen biosynthesis. *Proc Natl Acad Sci* 1987; **84**: 5082–5086.
- [42] JANECKI A, JAKUBOWIAK A, ŁUKASZYK A. Stimulatory effect of Sertoli cell secretory products on testosterone secretion by purified Leydig cells in primary culture. *Mol Cell Endocrinol* 1985; **235**–243.
- [43] JANECKI A, STEINBERGER A. Polarized Sertoli cell functions in a new two-compartment culture system. *J Androl* 1986; **7**: 69–75.
- [44] JANECKI A, STEINBERGER A. Bipolar secretion of androgen-binding protein and transferrin by Sertoli cells cultured in a two-compartment culture chamber. *Endocrinology* 1987; **120**: 291–298.

- [45] JUTTE NHPM, JANSEN R, GROOTGOED JA, ROMMERTS FFG, VAN DER MOLEN HJ. FSH stimulation of the production of pyruvate and lactate by rat Sertoli cells may be involved in hormonal regulation of spermatogenesis. *J Reprod Fertil* 1983; **68**: 219–224.
- [46] KHAN SA, SODER O, SYED V, GUSTAFSSON K, LINDH M, RITZEN EM. The rat produces large amounts of an interleukin-1-like factor. *Int J Androl* 1987; **10**: 495–501.
- [47] KHANUM A, DUFAU ML. Angiotensin II receptors and inhibitory actions in Leydig cells. *J Biol Chem* 1988; **263**: 5070–5074.
- [48] KILPATRICK D, BORLAND K, JIN D. Differential expression of opioid peptide genes by testicular germ cells and somatic cells. *Proc Natl Acad Sci* 1987; **84**: 5695–5774.
- [49] KRZYMOWSKI T. Nerwowo-hormonalna regulacja czynności jąder. *Biul Inf ART-Olsztyn* 1988; **25**: 9–20.
- [50] LAMB DJ, TSAI YH, STEINBERGER A, SANBORN BM. Sertoli cell nuclear transcriptional activity: Stimulation by follicle stimulating hormone and testosterone. *Endocrinology* 1981; **108**: 1020–1026.
- [51] LE MAGUERESSE B, JEGOU B. Possible involvement of germ cells in the regulation of oestradiol-17 β and ABP secretion by immature rat Sertoli cells (in vitro studies). *Biochem Biophys Res Commun* 1986; **141**: 861–865.
- [52] LE MAGUERESSE B, JEGOU B. Paracrine control of immature Sertoli cells by adult germ cells, in the rat (in vitro study). Cell-cell interactions within the testis. *Mol Cell Endocrinol* 1988; **58**: 65–71.
- [53] LE ROTH D, ROBERTS CT jr, WILSON G-L, DELAHUNTY G, ROTH J. Evolutionary origins of intercellular communication: implications for mammalian endocrinology. [w:] Cell to Cell Communication in Endocrinology. Piva F, Bardin CW, Forti G, Motta M. [red.] Raven Press, New York, 1988; 49: 1–11.
- [54] LIN T, VINSON N, TERRACIO L. Characterization of insulin and insulin-like growth factor I of purified Leydig cells and their role in steroidogenesis in primary culture: A comparative study. *Endocrinology* 1986; **119**: 1641–1647.
- [55] LIN T, BLAISDELL J, HASKELL JF. Transforming growth factor-B inhibits Leydig cell steroidogenesis in primary culture. *Biochem Biophys Res Commun* 1987; **146**: 387–394.
- [56] ŁUKASZYK A. Regulacyjna rola komórek podporowych Sertoliego w czynności gonady męskiej. *Biul Inf ART-Olsztyn* 1988; **25**: 20–39.
- [57] MAIS V, MELIS GB, GAMBACCIANI M, PAOLETTI AM, ANTINORI D, FIORETTI P. Gonadotropin-releasing hormone stimulates intrapituitary paracrine interactions: in vivo and in vitro evidence. [w:] Cell to Cell Communication in Endocrinology. Piva F, Bardin CW, Forti G, Motta M. [red.] Raven Press, New York, 1988; 49: 65–79.
- [58] MEIDAN R, HSUEH AJW. Identification and characterization of arginine vasopressin receptors in the rat testis. *Endocrinology* 1985; **116**: 416–423.
- [59] MILLER SC, BOWMAN BM, ROWLAND HC. Structure, cytochemistry, endocytic activity and immunoglobulin (FC) receptors of rat testicular interstitial tissue macrophages. *Amer J Anat* 1983; **168**: 1–13.
- [60] MONACO L, DEMANNO DA, MARTIN MW, CONTI M. Adenosine inhibition of the hormonal response in the Sertoli cell is reversed by pertussis-toxin. *Endocrinology* 1988; **122**: 2692–2698.
- [61] MORERA AM, CHAUVIN MA, DE PERETTI E, BINOUX M, BENAHMED M. Somatomedin C/insulin-like growth factor 1: an intratesticular differentiative factor of Leydig cells? *Horm Res* 1987; **28**: 50–57.
- [62] MORRIS PL, VALE WW, BARDIN CW. β -endorphin regulation of FSH-stimulated inhibin production is a component of a short loop system in rats. *Biochem Biophys Res Commun* 1987; **148**: 1513–1519.
- [63] MORRIS PL, VALE WW, CAPPEL S, BARDIN CW. Inhibin production by primary Sertoli cell-enriched cultures: regulation by follicle stimulating hormone, androgens, and epidermal growth factor. *Endocrinology* 1988; **122**: 717–723.
- [64] NICHOLSIN HD, SWANN RW, BURFORD GD, WATHES DC, PORTER DG, PICKERING BT. Identification of oxytocin and vasopressin in the testis and in adrenal tissue. *Regul Pept* 1983; **8**: 141–146.
- [65] ORAVA M. Comparison of the inhibitory effects of alpha and gamma interferons on testosterone production in porcine Leydig cells. 5th European Workshop on Molecular and Cellular Endocrinology of the Testis, Brighton UK 1988; Abstract B17.
- [66] PAPADOPOULOS V, DROSDOVSKY MA, CARREAU S. In vitro effects of prolactin and dexamethasone on rat Leydig cell aromatase activity. *Andrologia* 1986; **1**: 79–83.
- [67] PAPADOPOULOS V, KAMTCHOUING P, DROSDOVSKY MA, HOCHEREAU DE REVIERS MT, CARREAU S. Adult rat Sertoli cells secrete a factor or factors which modulate Leydig cell function. *Endocrinology* 1987; **114**: 459–467.
- [68] PARVINEN M, VIHKO KK, TOPPARI J. Cell interactions during the seminiferous epithelial cycle. *Int Rev Cytology* 1986; **104**: 115–151.

- [69] PERRARD-SAPORI MH, CHATELAIN PC, ROGEMOND N, SAEZ JM. Modulation of Leydig cell functions by culture with Sertoli cells or with Sertoli cell-conditioned medium: effect of insulin, somatomedin-C and FSH. *Mol Cell Endocrinol* 1987; **50**: 193–198.
- [70] PICKERING BT, AYAD VJ, BIRKETT SD, GILBERT CL, GULDENAAR SEF, NICHOLSON HD, WORLEY RTS, WATHES DC. Neurohypophysial peptides in the gonads: are they real and do they have a function? *Reprod Fertil Dev* 1990; **2**: 245–257.
- [71] POLLANEN P, SODER O, PARVINEN M. Interleukin-1 alpha stimulation of spermatogonial proliferation in vivo. *Reprod Fertil Dev* 1989; **1**: 85–99.
- [72] PORTER SB, ONG DE, CHYTIL F, ORGEBIN-CRIST M-C. Localization of cellular retinol-binding protein and cellular retinoic acid binding protein in the rat testes and epididymis. *J Androl* 1985; **6**: 197–212.
- [73] RISBRIDGER GP, DE KRETZER DM. Paracrine regulation of the testis. [w]: Burger H, de Kretzer DM [red], *The Testis*, Raven Press Ltd, New York 1989; 255–288.
- [74] RISBRIDGER GP, CLEMENTS J, ROBERTSON DM, DRUMMOND AE, MUIR J, BERGER HG, DE KRETZER DM. Immuno- and bioactive inhibin and inhibin alpha subunit expression in rat Leydig cell cultures. *Mol Cell Endocrinol* 1989; **66**: 119–128.
- [75] RITZEN EM. Chemical messengers between Sertoli cells and neighboring cells. *J Steroid Biochem* 1983; **19**: 499–506.
- [76] RIVAROLA MA, SANCHEZ P, SAEZ JM. Inhibition of RNA and DNA synthesis in Sertoli cells by co-culture with spermatogenic cells. *Int J Androl* 1986; **9**: 424–428.
- [77] ROBERTS KP, GRISWOLD MD. Characterization of rat transferrin receptor cDNA: the regulation of transferrin receptor mRNA in testes and in Sertoli cells in culture. *Mol Endocrinol* 1990; **4**: 531–537.
- [78] RUSSEL L. Sertoli-germ cell interactions: A review. *Gamete Res* 1980; **3**: 99–112.
- [79] SAEZ JM, TABONE E, PERRARD-SAPORI MH, RIVAROLA MA. Paracrine role of Sertoli cells. *Med Biol* 1985; **63**: 225–236.
- [80] SAEZ JM, PERRARD-SAPORI MH, CHATELAIN PG, TABONE E, RIVAROLA MA. Paracrine regulation of testicular function. *J Steroid Biochem* 1987; **27**: 317–329.
- [81] SAEZ JM, AVALLET O, NAVILLE D, PERRARD-SAPORI MH, CHATELAIN PG. Sertoli-Leydig cell communications. *Ann NY Acad Sci* 1989; **564**: 210–232.
- [82] SAINT-POL PS, HERMAND E, TRAMUG G. Paracrine factors in adult rat testis gonadotropin control of opioids and LHRH-like peptide. *Andrologia* 1988; **20**: 173–179.
- [83] SHARPE RM, FRASER HM, COOPER I, ROMMERTS FF. Sertoli-Leydig cell communication via an LHRH-like factor. *Nature* 1981; **290**: 785–788.
- [84] SHARPE RM. Intratesticular factors controlling testicular function. *Biol Reprod* 1984; **30**: 29–34.
- [85] SHARPE RM. Intratesticular regulation of testosterone secretion: comparison of the effects and interactions of hCG, an LHRH agonist and testicular interstitial fluid on Leydig cell testosterone secretion in vitro. *Mol Cell Endocrinol* 1985; **41**: 247–253.
- [86] SHARPE RM. Paracrine control of testis. *Clin Endocrinol Metab* 1986; **15**: 185–203.
- [87] SHARPE RM, COOPER I. Comparison of the effects on purified Leydig cells four hormones (oxytocin, vasopressin, opiates and LHRH) with suggested paracrine role in the testis. *J Endocrinol* 1987; **113**: 89–102.
- [88] SHARPE RM. Endocrinology and paracrinology of the testes. [w]: Physiology and Toxicology of Male Reproduction, Lamb JC, Foster PMD [red.]. Acad Press, San Diego, California 1988; 71–99.
- [89] SKINNER MK, GRISWOLD MD. Sertoli cells synthesize and secrete a transferrin-like protein. *J Biol Chem* 1980; **255**: 9523–9527.
- [90] SKINNER MK, GRISWOLD MD. Sertoli cells synthesize and secrete ceruloplasmin-like protein. *Biol Reprod* 1983; **28**: 1225–1229.
- [91] SKINNER MK, TUNG PS, FRITZ IB. Cooperativity between Sertoli cells and testicular peritubular cells in the production and deposition of extracellular matrix components. *J Cell Biol* 1985; **100**: 1941–1947.
- [92] SKINNER MK, FRITZ IB. Structural characterization of proteoglycans produced by testicular peritubular cells and Sertoli cells. *J Biol Chem* 1985; **260**: 11874–11879.
- [93] SKINNER MK, FRITZ IB. Testicular peritubular cells secrete a protein under androgen control that modulates Sertoli cell functions. *Proc Natl Acad Sci* 1985; **82**: 114–118.
- [94] SKINNER MK. Cell-cell interactions in the testis. *Ann NY Acad Sci* 1987; **513**: 158–183.
- [95] SKINNER MK, FETTEROLF PM, ANTHONY CT. Purification of a paracrine factor, P-Mod-S, produced by testicular peritubular cells that modulates Sertoli cell function. *J Biol Chem* 1988; **263**: 2884–2890.
- [96] SKINNER MK, TAKACS K, COFFEY RJ. Cellular localization of transforming growth factor-alpha gene expression and action in the seminiferous tubule: peritubular cell-Sertoli cell interactions. *Endocrinology* 1989; **124**: 845–851.

- [97] SKINNER MK, MOSES HL. Transforming growth factor-beta gene expression and action in the seminiferous tubule: peritubular cell-Sertoli cell interactions. *Mol Endocrinology* 1989; **3**: 625-632.
- [98] SKINNER MK. Mesenchymal (stromal) -epithelial interactions in the testis and ovary which regulate gonadal function. *Reprod Fertil Dev* 1990; **2**: 237-243.
- [99] SKINNER MK. Cell-cell interactions in the testis. *Endocrine Rev* 1991; **12**: 45-77.
- [100] SMITH EP, SUOBODA ME, VAN WYK JJ, KIERSZENBAUM AL, TRES LL. Partial characterization of somatomedin-like peptide from the medium of cultured rat Sertoli cells. *Endocrinology* 1987; **120**: 186-193.
- [101] STEINBERGER A, HEINDEL JJ, LINDSEY JN, ELKINGTON JSH, SANBORN BM, STEINBERGER E. Isolation and culture of FSH responsive Sertoli cell. *Endocr Res Commun* 1975; **2**: 261-268.
- [102] STEFANINI M, RUSSO MA, FILIPPINI A, CANIPARI R, PALOMBI F, BERTALOT G, DI BONITO P, ZIPARO E. Role of cell interactions within the seminiferous epithelium in the regulation of spermatogenesis. [w]: Cell to Cell Communication in Endocrinology. Piva F, Bardin CW, Forti G, Motta M. [red.] Raven Press, New York 1988; **49**: 105-119.
- [103] TAHRI-JOUTEI A, POINTIS G. Time-related effects of arginine vasopressin on steroidogenesis in cultured mouse Leydig cells. *J Reprod Fert* 1988; **82**: 247-253.
- [104] TOEBOSH AMW, KROOS MJ, GROOTEGOED JA. Transport of transferrin-bound iron into rat Sertoli cells and spermatids. *Int J Androl* 1987; **10**: 753-764.
- [105] TRES LL, SMITH EP, VAN WYK JJ, KIERSZENBAUM AL. Immunoreactive sites and accumulation of somatomedin-C in rat Sertoli-spermatogenic cell-coculture. *Expl Cell Res* 1986; **162**: 33-39.
- [106] TUNG PS, FRITZ IB. Cell-substratum and cell-cell interactions promote testicular myoid cell histotypic expression in vitro. *Dev Biol* 1986; **115**: 155-170.
- [107] VERHOEVEN G, CAILLEAU J. A Leydig cell stimulatory factor produced by human testicular tubules. *Mol Cell Endocrinol* 1987; **49**: 137-143.
- [108] YOON DJ, SKLAR C, DAVID R. Presence of immunoreactive corticotropin-releasing factor in rat testis. *Endocrinology* 1988; **122**: 759-761.

Otrzymano: 20.01.1992 r.

Przyjęto: 12.02.1992 r.

Adres autorki: ul. Karasia 6, 30-060 Kraków.

STRUKTURA I FUNKCJA PĘCHERZYKÓW JAJNIKOWYCH SSAKÓW*

THE STRUCTURE AND FUNCTION OF OVARIAN FOLLICLES OF MAMMALS

Maria SZOŁTYS

Pracownia Endokrynologii Zwierząt i Hodowli Tkanek, Zakład Fizjologii Zwierząt,
Instytut Zoologii, Uniwersytet Jagielloński, Kraków

Streszczenie. Folikulogeneza rozpoczyna się zwykle w jajnikach płodowych, w których oocyty zostają otoczone przez komórki, będące prekursorami warstwy ziarnistej. Dalszy rozwój pęcherzyków charakteryzuje się szybkim wzrostem oocyty, wytwarzaniem osłonki przejrzystej, intensywną proliferacją komórek ziarnistych i formowaniem się osłonki pęcherzyka. Pojawienie się w pęcherzyku jamki oznacza koniec szybkiego wzrostu oocyty i rozpoczęcie intensywnej syntezy estradiolu, w której uwidacznia się interakcja komórek osłonki wewnętrznej i komórek ziarnistych. Przedowulacyjny wyrzut przysadkowego LH stymuluje produkcję progesteronu, a także procesy prowadzące do wznowienia mejozy i owulacji. Z puli pęcherzyków zaczynających wzrost owuluje bardzo niewiele, a reszta ulega atrezji. Na proces selekcji pęcherzyków przeznaczonych do owulacji mają wpływ przede wszystkim gonadotropiny i steroidy, jak również wiele innych obecnych w pęcherzyku czynników.

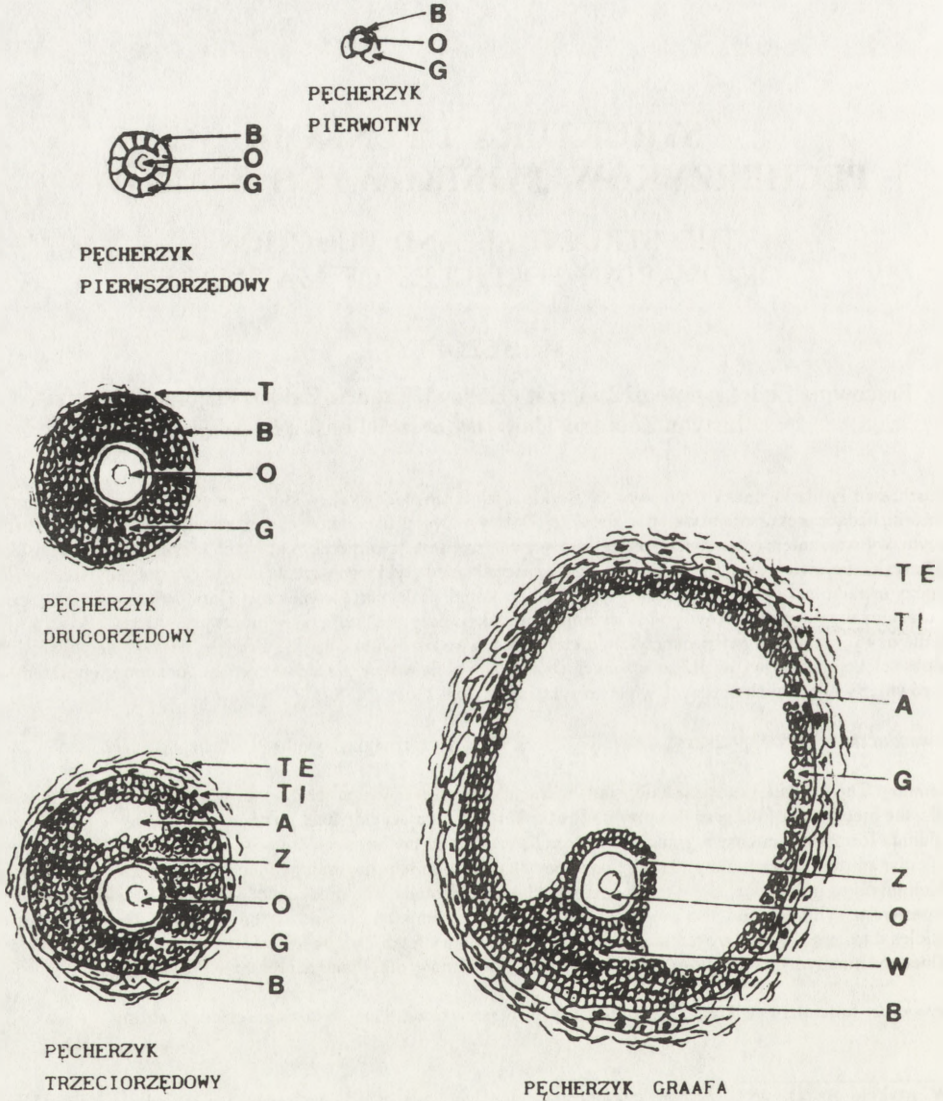
Słowa kluczowe: rozwój pęcherzyka, steroidogeneza, wznowienie mejozy, owulacja, selekcja, atrezja.

Summary. The folliculogenesis usually starts in the fetal ovaries in which the oocytes become surrounded by a few cells, the precursors of the granulosa layer. The further follicular development involves a rapid oocyte growth, zona pellucida formation, intensive granulosa cell proliferation and the arrangement of theca layer. The appearance of follicular antrum indicates the end of the rapid oocyte growth and the beginning of the substantial estradiol synthesis which involves interaction of the theca interna and granulosa cells. The preovulatory pituitary LH surge stimulates progesterone synthesis and also processes leading to the resumption of meiosis and ovulation. Only a few of the follicles starting to growth are ovulable while the rest become atretic. The process of selection of ovulable follicles is influenced mainly by gonadotropins and steroids as well as many other factors present in the follicle.

Key words: follicular development, steroidogenesis, meiosis resumption, ovulation, selection, atresia.

*W artykule zostały wykorzystane czasopisma i wydawnictwa książkowe zakupione dzięki: 1) World Health Organization – SMA Grant, Special Programme of Research, Development and Research Training in Human Reproduction, 2) C.P.B.P. 05. 06. 1.2.7. ART - Olsztyn, 3) Z-12/91 KBN Warszawa.

Pęcherzyk jajnikowy jest bardzo dynamiczną strukturą. W czasie swojego rozwoju stwarza on odpowiednie środowisko do wzrostu i dojrzewania oocytu. Rozwój pęcherzyka został podzielony na kolejne stadia. Najważniejsze z nich przedstawia rysunek 1.



Rys. 1. Najważniejsze stadia rozwoju pęcherzyka: o – oocyt, G – komórki ziarniste, B – błona podstawna, T – komórki osłonki, TE – komórki osłonki zewnętrznej, TI – komórki osłonki wewnętrznej, Z – osłonka przejrzysta oocytu, W – wżgórek jajonośny, A – jamka

ROZWÓJ PĘCHERZYKÓW

PĘCHERZYKI PIERWOTNE

Pęcherzyki zaczynają się tworzyć w jajnikach w okresie życia zarodkowego lub wkrótce po urodzeniu, a czas, w którym ten proces przebiega, jest ściśle określony dla danego gatunku. Początek folikulogenezy determinowany jest pojawieniem się w jajniku oocytów, stanowią one bowiem centra, wokół których gromadzą się i rozwijają pozostałe komponenty pęcherzyków [8]. Prekursorami oocytów są komórki prapłciowe, które przywędrowują do zawiązków gonad z endodermy pęcherzyka żółtkowego. Zarówno w czasie tej wędrówki, jak i po zasiedleniu gonad komórki prapłciowe intensywnie się mnożą. Kiedy już wiadomo, że gonady rozwijają się w kierunku żeńskim, komórki płciowe określa się mianem oogonii. W momencie rozpoczęcia mejozy oogonia przekształcają się w oocyty [6]. Do tej pory niewiele wiadomo o mechanizmach zarówno indukowania mejozy, jak i szybkiego zahamowania tego procesu w diplotenie pierwszego podziału redukcyjnego, kończącego się dekondensacją chromosomów i utworzeniem pęcherzyka zarodkowego. Są sugestie, że komórki jajnika, pochodzące ze śródnerczy i tworzące sieć jajnika (*rete ovarii*), uwalniają substancję indukującą mejozę [14], natomiast komórki, które przywędrowują, aby otoczyć oocyty, produkują inhibitory mejozy [17]. Pochodzenie tych ostatnich komórek, będących prekursorami warstwy ziarnistej, jest nadal kontrowersyjne. Przypuszcza się, że pochodzą one z nabłonka powierzchniowego, z sieci jajnika lub komórek mezenchymalnych [2, 14, 57]. Kilka z nich otacza oocyt płaską i niekompletną warstwą, wokół której wytwarza się błona podstawna. Powstała w ten sposób struktura nosi nazwę nierosnącego pęcherzyka lub pęcherzyka pierwotnego (rys. 1). Pęcherzyki te mogą przetrwać w jajniku wiele lat bez dalszego rozwoju, jednakże część z nich zaczyna wzrastać wkrótce po powstaniu. Nie rozwijają się one jednak do stadium pęcherzyka Graafa, bowiem wcześniej ulegają atrezji. Dopiero kiedy samica osiąga dojrzałość płciową, w każdym cyklu pewna charakterystyczna dla danego gatunku ilość dochodzi do stadium pęcherzyka przedowulacyjnego i owuluje.

PĘCHERZYKI PIERWSZORZĘDOWE I DRUGORZĘDOWE

Bodźcem stymulującym nie rosące pęcherzyki do dalszego rozwoju są najprawdopodobniej gonadotropiny [14, 17]. Wiadomo również, że występująca u starszych samic redukcja populacji pęcherzyków pierwotnych prowadzi do zmniejszenia ilości pęcherzyków zaczynających wzrost [44]. Jedną z pierwszych oznak wzrostu jest powiększenie się zarówno oocytu, jak i komórek ziarnistych oraz zmiana kształtu tych ostatnich z płaskich na kuboidalne (rys. 1). Następnie komórki ziarniste dzielą się intensywnie, tworząc wokół oocytu warstwę ziarnistą. Jednocześnie między oocytem a komórkami ziarnistymi bezpośrednio go otaczającymi pojawiają się glikoproteinowe komponenty osłonki przejrzystej. Białka osłonki przejrzystej wykryto już w oocytach pęcherzyków pierwotnych i uważa się, że przynajmniej do stadium pęcherzyka drugorzędowego osłonka jest wytworem oocytu. U królika w późniejszych stadiach rozwoju pęcherzyka komponenty osłonki zlokalizowano również w komórkach ziarnistych otaczających oocyt, jakkolwiek nie wykluczono możliwości, że znalazły się w tych komórkach w drodze endocytozy lub w wyniku fagocytozy [89]. Badania przeprowadzone na chomikach dowiodły, że osłonka przejrzysta u tych zwierząt jest wytworem oocytu [42].

Już wokół błony podstawnej pęcherzyka pierwszorzędowego zaczyna się formować koncentryczna osłonka pęcherzyka. Tworzą ją komórki podobne do fibroblastów, pochodzące ze zdolnych do proliferacji i różnicowania się komórek mezenchymalnych stromy jajnika [23]. Wnikające w późniejszym okresie naczynia krwionośne zapoczątkowują różnicowanie się osłonki na zbudowaną głównie z komórek steroidogennych osłonkę wewnętrzną i łącznotkankową osłonkę zewnętrzną. Różnicowanie warstwy wewnętrznej zaczyna się od środka i biegnie w kierunku błony podstawnej, a pierwszymi oznakami tego procesu jest pojawienie się receptorów LH i aktywnych enzymów steroidogennych [23].

PEČHERZYKI TRZECIORZĘDOWE

Pęcherzyki trzeciorzędowe są już pęcherzykami antralnymi (rys. 1). We wczesnych pęcherzykach trzeciorzędowych między komórkami ziarnistymi tworzą się liczne, wypełnione płynem szczeliny, które w końcu łączą się ze sobą, tworząc stale powiększającą się jamkę. Płyn pęcherzykowy jest zarówno wytworem komórek ziarnistych, jak i przesączeniem z osocza. Zawiera on bardzo liczne związki, w tym glikozaaminoglikany, aminokwasy, białka (także enzymy), cukry, sole, hormony i czynniki, o których będzie jeszcze mowa później. Skład płynu zmienia się. Na przykład w miarę dojrzewania pęcherzyka rośnie w nim poziom estrogenów [74], a zmniejsza się zawartość siarczanu chondroityny i heparanosiarczanu [43].

Gromadzący się w jamce płyn spycha na obwód pęcherzyka oocyt wraz z otaczającymi go komórkami ziarnistymi. Jest to okres różnicowania się komórek ziarnistych i formowania wzgórka jajonośnego. Komórki ziarniste bezpośrednio otaczające oocyt utworzą wieniec promienisty, połączony rodzajem mostka z komórkami ziarnistymi tworzącymi ścianę pęcherzyka (rys. 1). Komórki ściany przylegające do błony podstawnej przybierają kształt kolumnowaty, co w starszych pęcherzykach doprowadzi do powstania tzw. pseudostratyfikacji warstwy ziarnistej, będącej jedną z cech rozpoznawczych nieatretycznych pęcherzyków [88].

Pojawienie się jamki kończy również okres wielkiego wzrostu oocytu, w czasie którego zwiększa on wielokrotnie swą objętość (np. u myszy 70–100-krotnie). Później oocyt rośnie już niewiele. W czasie wielkiego wzrostu oocytu zwiększa się objętość jego jądra, a jeszcze bardziej cytoplazmy. W dużym, pęcherzykowatym jądrze zachodzi intensywna synteza różnych rodzajów RNA, a w cytoplazmie produkowane są przede wszystkim białka. W cytoplazmie wzrasta ilość mitochondriów oraz zmienia się ich kształt. Przybiera również strukturę tworzących siateczkę śródplazmatyczną. Pojawiają się równoległe ułożone błony z porami, tzw. błony pierścieniowane (*anulatae lamellae*), a także koncentryczne błony. Jest coraz więcej rybosomów [6, 87]. Przejawem aktywności aparatu Golgiego jest pojawienie się ziaren korowych, zawierających przede wszystkim glikoproteiny, jak również produkcja glikoprotein osłonki przejrzystej. Te ostatnie oznacza się jako: ZP_1 , ZP_2 i ZP_3 . Zarówno ziarna korowe, jak i osłonka przejrzysta odgrywają rolę dopiero przy zapłodnieniu, głównie w powstawaniu bloku polispermii. Glikoproteiny ZP_3 wykazują aktywność receptorową w stosunku do plemników i są też one induktorami reakcji akrosomalnej [6, 16, 58, 87]. Na podstawie wyników licznych badań Cran [16] sugeruje, że w czasie zapłodnienia zawartość ziaren korowych, uwolniona do przestrzeni okołoołótkowej, działa na osłonkę, zmieniając jej zdolność wiązania plemników i indukując też proteolizę ZP_2 . Zmiany te hamują przechodzenie następnym plemników przez osłonkę. Osłonka przejrzysta najprawdopodobniej odgrywa też rolę ochronną do czasu "wyklucia" się zarodka [58]. Ta tak ważna w okresie poowulacyjnym struktura stanowi jednak w pęcherzyku rodzaj bariery między oocytem a komórkami ziarni-

stymi. Jednakże w miarę powstawania jest ona penetrowana przez wypustki komórek ziarnistych i mikrokosmki oocytu. W miejscach styku tych dwóch rodzajów komórek powstają desmosomy i coraz liczniejsze złącza szczelinowe, które umożliwiają szybki przepływ metabolitów do oocytu, w tym prekursorów kwasów rybonukleinowych i niektórych aminokwasów. Sama osłonka jest także przepuszczalna dla wielu substancji nawet o stosunkowo dużych cząsteczkach [6].

Złącza szczelinowe powstają również między komórkami ziarnistymi, a ich ilość zwiększa się szybko w miarę wzrostu pęcherzyka. W dużych pęcherzykach antralnych mogą one zajmować nawet 30% powierzchni komórek [2]. Dzięki nim komórki połączone są rodzajem kanałów zapewniających transport substancji. Taki sprawny system połączeń jest niezmiernie ważny ze względu na to, że warstwa ziarnista jest pozbawiona naczyń krwionośnych. Otaczająca ją błona podstawna stanowi dodatkową barierę oddzielającą ją od naczyń krwionośnych osłonki. Amorficzna błona podstawna, zbudowana z lamininy, kolagenu, fibronektyny i proteoglikanów, traktowana jest przez jednych autorów jako struktura półprzepuszczalna, a przez innych uważana jest za barierę między krwią a wnętrzem pęcherzyka, wybiórczo przepuszczającą tylko pewne związki [43, 66].

W pęcherzykach trzeciorzędowych przebiega też końcowe różnicowanie się jego osłonki. Powstała w wyniku tego procesu osłonka zewnętrzna zbudowana jest z fibroblastów, komórek kurczliwych i naczyń krwionośnych. Wszystkie te komponenty poprzęplatanie są licznymi włóknami kolagenowymi. W osłonce wewnętrznej dominują komórki wydzielnicze o ultrastrukturze typowej dla komórek steroidogennych (gładka siateczka śródplazmatyczna, mitochondria z rurkowatymi grzebieniami, krople lipidowe). Osłonka wewnętrzna ma także elementy tkanki łącznej i jest bardzo bogata ukrwiona [43].

Małe pęcherzyki antralne syntetyzują wzrastające ilości estradiolu. W syntezie tej zaangażowane są zarówno komórki osłonki produkujące głównie androgeny, jak i komórki ziamiste, w których przebiegają tylko końcowe etapy syntezy estradiolu (tzw. aromatyzacja) [25, 28, 46, 67]. Osłonka wewnętrzna także może produkować pewną ilość estradiolu – różną u różnych zwierząt [31, 33, 70]. Ultrastruktura komórek ziarnistych wskazuje w tym czasie głównie na syntezę białek, mają one bowiem mitochondria lamelarne i dużo elementów szorstkiej siateczki śródplazmatycznej [7, 17, 26]. Związane jest to z produkcją różnych niesteroidowych składników płynu pęcherzykowego. Produkowany przez pęcherzyk estradiol jest niezmiernie ważny dla jego dalszego rozwoju. Stymuluje on mitozy, powstawanie złączy szczelinowych, tworzenie się jamki, powstawanie własnych receptorów, jak i receptorów hormonów gonadotropowych [1, 17, 62]. Proces syntezy estrogenów został dokładniej opisany w rozdziale poświęconym syntezie steroidów.

PĘCZERZYKI GRAAFA

Dalszemu rozwojowi pęcherzyków towarzyszy szybkie powiększanie się jamki, spowodowane przybywaniem płynu pęcherzykowego. Widoczne jest też dalsze różnicowanie się warstwy ziarnistej. Proces ten prowadzi do wykształcenia się w pęcherzyku przedowulacyjnym co najmniej dwóch subpopulacji komórek, rozpoznawanych nawet przez monoklonalne przeciwciała [22] i dających się rozdzielić w gradiencie stężeń [38]. Jedną z nich tworzą wspomniane już komórki o wydłużonym kształcie, które wspierają się na błonie podstawnej, a nazywane są komórkami muralnymi. Druga subpopulacja komórek, charakteryzujących się bardziej okrągłym kształtem i luźniejszym rozmieszczeniem, otacza jamkę i tworzy warstwę

antralną. Temu morfologicznemu zróżnicowaniu odpowiada też zróżnicowanie funkcjonalne: w warstwie muralnej jest więcej enzymów biorących udział w steroidogenezie, tutaj też głównie rozmieszczone są receptory LH [2, 53, 62, 77, 84, 93]. Amsterdam [2] sugeruje, że strukturą indukującą różnicowanie się warstwy ziarnistej jest błona podstawna. Dlatego też przylegające do niej komórki muralne są bardziej wyspecjalizowane.

W miarę wzrostu pęcherzyk produkuje i uwalnia do krwi coraz więcej estradiolu [33, 74]. W okresie przedowulacyjnym bardzo wysoki już poziom estradiolu powoduje uwolnienie z przysadki fali LH. Z kolei LH zapoczątkowuje szereg takich przedowulacyjnych procesów, jak: zmiana kierunku steroidogenezy, wznowienie mejozy czy tworzenie się stigm.

Zmiana kierunku steroidogenezy związana jest z zahamowaniem syntezy estradiolu i rozpoczęciem produkcji progesteronu. Progesteron bierze udział w procesach prowadzących do aktywacji enzymów proteolitycznych rozkładających ścianę pęcherzyka [64] i jest on także potrzebny do prawidłowego przebiegu mejozy [50]. Progesteron syntetyzowany jest zarówno przez komórki osłonki wewnętrznej, jak i warstwy ziarnistej [30, 63]. Zmiana funkcji komórek ziarnistych znajduje odzwierciedlenie w reorganizacji ich ultrastruktury, polegającej na szybkim pojawieniu się dużej ilości komponentów typowych dla komórek steroidogennych [7, 26, 43]. Zmiany te są bardziej wyraźne w warstwie muralnej. Po fali LH obserwuje się jeszcze inne procesy związane z postępującą lutenizacją pęcherzyka. Błona podstawna ulega w wielu miejscach fragmentacji, w awaskularnej do tej pory warstwie ziarnistej zaczynają się tworzyć naczyńca, a komórki osłonki wewnętrznej ulegają hipertrofii [26, 43, 55, 75].

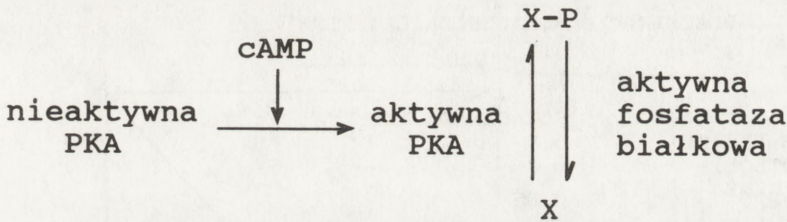
WZNOWIENIE PROCESU MEJOZY

Dojrzewanie oocytu prowadzi do rozdzielenia par homologicznych chromosomów, eliminowania połowy z nich przez utworzenie ciałka kierunkowego i powstania zdolnego do zapłodnienia oocytu. Towarzyszą mu zmiany we wzgórku jajonośnym. Bogate w kwas hialuronowy glikozaaminoglikany zaczynają wypełniać przestrzenie między oddalającymi się od siebie i zmieniającymi kształt komórkami wzgórka. Zjawisko to nosi nazwę ekspansji wzgórka [21].

Proces wznowienia mejozy budził zainteresowanie badaczy od dawna. Już od z górą 50 lat wiadomo, że izolowane z antralnych pęcherzyków oocyty mogą dojrzewać spontanicznie w warunkach *in vitro* [59]. *In vivo* do czasu przedowulacyjnego wyrzutu LH wznowienie mejozy jest hamowane przez czynniki produkowane w pęcherzyku. Obecnie wiadomo, że wiele związków może działać supresyjnie na dojrzewanie oocytu. Za najważniejsze z nich uważa się grupę polipeptydów określaną jako OMI (*Oocyte Meiosis Inhibitors*) i cAMP. OMI wywierają swoje hamujące działanie za pośrednictwem komórek wzgórka. Komórki wzgórka najprawdopodobniej przetwarzają je we właściwe inhibitory, względnie OMI stymulują w nich (być może łącząc się z receptorami komórek wzgórka) syntezę właściwych inhibitorów, przedostających się do oocytu. Fala LH hamuje tworzenie się inhibitorów, względnie ich wnikanie do oocytu na skutek zaniku złączy szczelinowych między komórkami wzgórka a oocytem [79]. Jednakże czas zanikania tych połączeń jest bardzo kontrowersyjny. Z przeprowadzonych badań wynika, że u jednych zwierząt dzieje się to przed, a u innych po wznowieniu mejozy [18, 21, 52, 79]. Larsen sugeruje, że po fali LH nawet istniejące złącza mogą być już niefunkcjonalne [41].

Wiadomo również, że wznowienie mejozy może być hamowane przez wysoki poziom cAMP w oocycie i że głównym źródłem tego związku są komórki ziarniste (bogaty przegląd literatury zamieszczają Thibault [79] i Dekel [18]). Hipotetyczny mechanizm inhibującego

działania cAMP przedstawiono na rysunku 2. Po wyrzuceniu LH ilość cAMP w oocyście spada i mejoza zostaje wznowiona. Mechanizm spadku poziomu cAMP zaproponował Dekel [18] opierając się na badaniach Larsena [41], z których wynikało, że złącza szczelinowe między komórkami wzgórka a warstwą ziarnistą tworzącą ścianę pęcherzyka zanikają przed wznowieniem mejozy. Jeżeli jednak, jak sądzi Dekel, komórki wzgórka jajonośnego stanowią przede wszystkim rodzaj kanałów do transportowania inhibitora, wystarczy zanikanie złącza między ścianą pęcherzyka a wzgórkami, aby cAMP nie przechodził do oocytu i nie hamował procesu mejozy.



Rys. 2. Zmodyfikowany model hamowania i przedowulacyjnego wznowienia mejozy, zamieszczony w publikacji Wassermanna [87]: model ten zakłada, że fosfoproteina X-P hamuje proces mejozy, a jej defosforylowana forma X doprowadza do wznowienia mejozy; proteina X jest fosforylowana przez zależną od cAMP kinazę białkową (PKA), a fosfoproteina X-P jest defosforylowana przez fosfatazę fosfoproteinową; aktywność tych dwóch enzymów determinuje poziom X-P i X w oocyście; wznowienie mejozy jest zapoczątkowane przez obniżenie poziomu cAMP w oocyście; efektem tego jest spadek aktywności PKA, defosforylacja X-P i zwiększenie ilości X

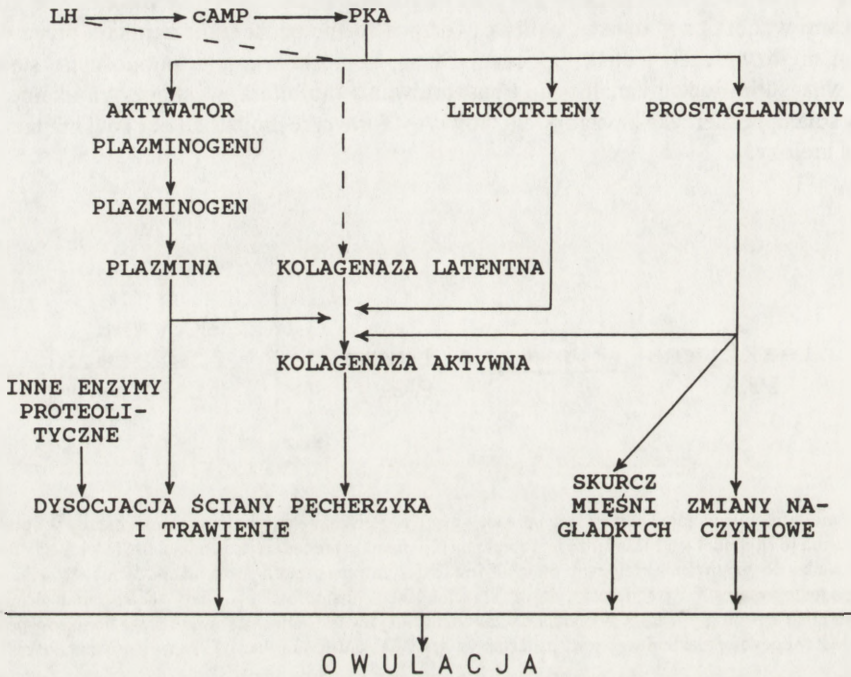
U niższych kręgowców (ryby, płazy) związkami, z których pomocą LH indukuje wznowienie mejozy, są progestageny [36, 45, 54]. Działają one najprawdopodobniej przez obniżenie poziomu cAMP w oocyście. U ssaków mejoza także jest wznowiana w czasie wysokiego poziomu progesteronu [71, 75], a odpowiedni poziom steroidów potrzebny jest do prawidłowego przebiegu mejozy [50]. Obecnie trwają badania nad udowodnieniem roli progesteronu w indukowaniu mejozy u ssaków [86, 94].

Jednocześnie z dojrzewaniem oocytu w pęcherzyku przebiegają procesy prowadzące do powstania stigm i owulacji. Oba te procesy są synchronizowane stymulacyjnym działaniem LH i dzięki temu w momencie wytworzenia się stigm dojrzały oocyt, u większości zwierząt w metafazie drugiego podziału redukcyjnego, opuszcza pęcherzyk.

MECHANIZM OWULACJI

Aby zamknięty wewnątrz pęcherzyka oocyt mógł owulować, wszystkie warstwy, budujące ściany pęcherzyka (warstwa ziarnista, błona podstawna, osłonka wewnętrzna i zewnętrzna) i przykrywające go w miejscu, w którym przedowulacyjny pęcherzyk wystaje nad powierzchnię jajnika i w którym tworzy się stigma (błona biaława, blaszka podstawna i nabłonek powierzchniowy), muszą ulec zniszczeniu. W skład większości tych warstw wchodzi kolagen. Jego włókna przeplatają osłonkę zewnętrzną i błonę białawą, jest on też częścią składową błony podstawnej i blaszki podstawnej [43]. Procesy, prowadzące do proteolitycznego rozkładu włókien kolagenowych tworzących rodzaj białkowego szkieletu pęcherzyka, stanowią więc ważny element przedstawianych dziś modeli mechanizmu owulacji, choć uwzględniają one

też udział wielu innych czynników [43, 51, 76, 92]. Rysunek 3 przedstawia jeden z takich modeli, skonstruowany przez Moriokę i wsp. [51] na podstawie wyników wielu badań.



Rys.3. Hipotetyczny model ważniejszych procesów w czasie owulacji (zmodyfikowany schemat z pracy Moriki i wsp. [51]): PKA – kinaza białkowa zależna od cAMP

Wiadomo, że proces owulacji jest inicjowany przez uwolnienie przysadkowego LH. Mediatorem działania LH w wielu biochemicznych przemianach jest cAMP. cAMP przez zależne od niego kinazy białkowe stymuluje syntezę prostaglandyn, leukotrienów i aktywatora plazminogenu. Substratem dla aktywatora plazminogenu jest plazminogen, który pochodzi z krwi i jest obecny w płynie pęcherzykowym. Aktywator plazminogenu przekształca plazminogen w plazminę, która jest enzymem uczynniającym nieaktywną kolagenazę. Aktywna kolagenaza razem z innymi enzymami trawi ścianę pęcherzyka. Synteza kolagenazy jest prawdopodobnie stymulowana bezpośrednio przez LH w takich komponentach pęcherzyka, jak: fibroblasty, nabłonek powierzchniowy czy makrofagi.

Uważa się, że procesy prowadzące do uaktywnienia enzymów proteolitycznych są stymulowane również przez steroidy, a zwłaszcza progesteron, jednakże mechanizm tej stymulacji nie został jeszcze zbadany [40, 64, 81].

Ostatnio Cajander [15] przeprowadził immunohistochemiczne badania nad lokalizacją aktywatora plazminogenu w przedowulacyjnych pęcherzykach szczurów. W miarę zbliżania się owulacji reakcja pojawiała się najpierw w osłonce wewnętrznej, warstwie ziarnistej i wzgórku jajonośnym, a następnie w osłonce zewnętrznej i błonie białawej przykrywającej pęcherzyk.

Do bardzo ważnych w procesie owulacji związków należą również prostaglandyny. Ich ilość wzrasta po fali LH i można nimi indukować owulację [11, 43, 82, 91]. Ich rola nie została jeszcze jednoznacznie określona, ale najprawdopodobniej aktywują one kolagenazę (rys. 3).

Wiadomo również, że prostaglandyny stymulują skurcze jajnika i wywołują zmiany w naczyniach, manifestujące się ich rozszerzeniem i zwiększoną przepuszczalnością. Przedowulacyjne zmiany naczyniowe badali Kitai i wsp. [39] u królików. Zastosowali oni metodę mikrokorozyjną, dzięki której otrzymywali odlewy naczyń przedowulacyjnych pęcherzyków. Autorzy ci obserwowali najpierw rozszerzenie, a zarazem spłaszczenie naczyń, a potem pojawienie się ubytków w naczyniach części apikalnej pęcherzyka. Badania te wyjaśniają, dlaczego miejsce pęknięcia pęcherzyka widoczne jest wcześniej jako blady, pozbawiony krążenia obszar. Hipotezę mechanizmu powstania takiego awaskularnego miejsca podali Bjersing i Cajander [9]. Sądzą oni, że szybkie powiększanie się pęcherzyka w okresie przedowulacyjnym, spowodowane gromadzeniem się płynu pęcherzykowego, może prowadzić do rozciągania jednych naczyń, a ścieśniania innych, zwłaszcza tych położonych w części apikalnej i ograniczonych sztywną błoną białawą. Rezultatem tego jest zmniejszenie dopływu krwi w części apikalnej. Brak tlenu i składników odżywczych, a zwiększona ilość metabolitów prowadzi do wyciekania enzymów lizosomalnych i trawienia komórek. Zmiany morfologiczne w czasie tworzenia się stigmaty zostały wyczerpująco opisane [9, 13, 47, 56, 76, 78] i wiadomo, że są to zmiany degeneracyjne, w wyniku których komórki obumierają lub odrywają się od ściany pęcherzyka. Równocześnie przebiega proteolityczny rozkład utkania kolagenowego.

Omawiając krążenie w przedowulacyjnym pęcherzyku warto wspomnieć, że rozszerzeniu naczyń towarzyszy zwiększenie ich przepuszczalności, prowadzące do wyciekania komórek krwi [39]. Obserwuje się również obrzęk pęcherzyka. Espey [24] porównuje procesy toczące się w przedowulacyjnym pęcherzyku do stanu zapalnego, wywołanego głównie działaniem prostaglandyn i histaminy. Według tego autora owulacja jest wynikiem stanu zapalnego pęcherzyka.

Obecnie uważa się, że czynnikiem wspomagającym owulację jest także skurcz mięśni gładkich, prowadzący do obkurczania się podstawy pęcherzyka [65]. Skurcz podstawy powoduje wypychanie pęcherzyka na powierzchnię jajnika i rozciąganie jego części apikalnej, osłabionej już działaniem enzymów proteolitycznych. Obkurczanie podstawy pęcherzyka musi być równoważone rozciąganiem jego ściany wystającej nad powierzchnię jajnika, ponieważ wiadomo, że ciśnienie wewnątrz pęcherzyka przed owulacją nie wzrasta [10, 65, 75].

Po owulacji pęcherzyk przekształca się w ciało żółte, a oocyt dostaje się do jajowodu, gdzie może nastąpić jego zapłodnienie i pierwsze podziały.

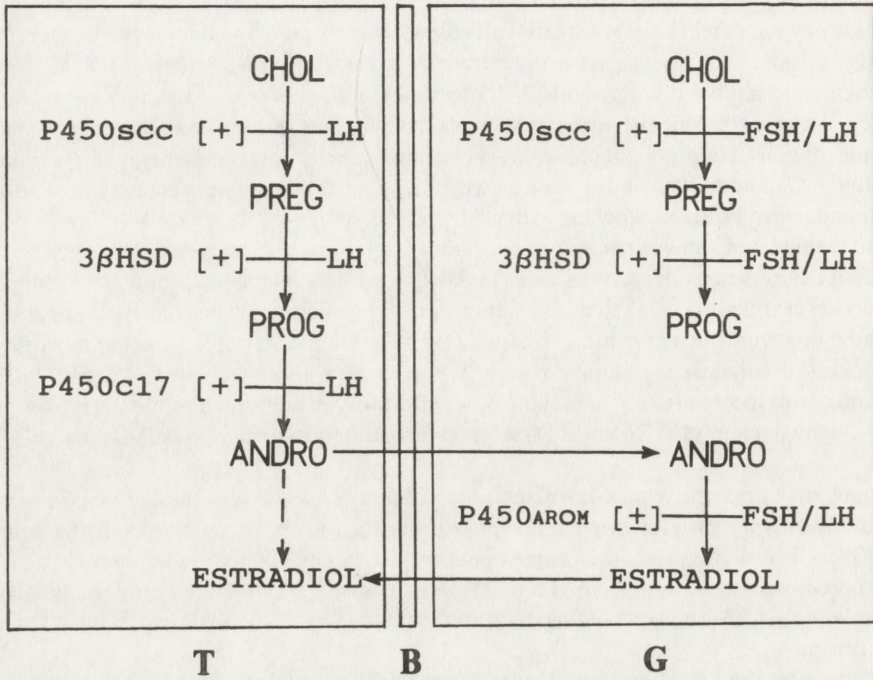
SYNTEZA STEROIDÓW

Ze względu na syntezę hormonów steroidowych rozwój pęcherzyka można podzielić na trzy etapy.

- W pierwszym z nich, trwającym do czasu wyróżnicowania się osłonki wewnętrznej, czyli do stadium wczesnego pęcherzyka trzeciorzędowego, pęcherzyk syntetyzuje niewielkie ilości steroidów. Jest to okres wielkiego wzrostu oocytu, w czasie którego funkcją części somatycz-

nej pęcherzyka jest przede wszystkim wspomaganie procesów przebiegających w oocyście [12].

• W drugim etapie pęcherzyk produkuje głównie estrogeny, w tym tak ważny dla jego prawidłowego rozwoju estradiol (rys. 4).



Rys. 4. Drogi syntezy pęcherzykowych steroidów; zmodyfikowany schemat zamieszczony w pracy Irelanda [37]); [+] oznacza stymulację, a [-] supresję aktywności enzymów przez FSH lub LH; CHOL – cholesterol; PREG – pregnenolon; PROG – progesteron; ANDRO – androgeny; P450 – oksydazy cytochromowe: P450_{scc} odszczepiają łańcuch boczny cholesterolu; P450_{c17} aktywują przejście progestagenów w androgeny; P450_{AROM} powodują przejście androgenów w estrogeny, a konwersja ta jest związana z aromatyzacją pierścienia A; 3βHSD – dehydrogenaza Δ^5 -3β-hydroksysteroidowa; T – komórka osłonki wewnętrznej, G – komórka ziarnista, B – błona podstawna

Prekursorem steroidów jest cholesterol, który może być produkowany przez komórki steroidogenne z octanu. Najczęściej jednak źródłem cholesterolu są lipoproteiny niskiej i wysokiej gęstości, dostarczane do pęcherzyka z krwią [48, 61, 72]. W komórkach osłonki wewnętrznej z cholesterolu powstaje pregnenolon, dalej progesteron i androgeny, które u niektórych zwierząt są końcowym produktem syntezy tych komórek [33]. Androgeny przechodzą następnie przez błonę podstawną do komórek ziarnistych, zawierających czynny system aromataz i są przez nie aromatyzowane do estrogenów. Tak więc synteza estrogenów jest wynikiem interakcji komórek osłonki wewnętrznej i warstwy ziarnistej, w tym przede wszystkim jej części muralnej [25, 28, 33, 34, 46, 67]. U wielu zwierząt również komórki osłonki wewnętrznej mają czynny system aromataz i mogą w różnym stopniu przyczyniać się do syntezy estrogenów [31, 33, 70]. Powstające w pęcherzyku steroidy modulują dalszą

syntezę hormonów. Szczegółowe informacje na ten temat zawierają publikacje 1, 27, 33, 68 i 75.

Reakcje związane z przejściem cholesterolu w pregnenolon przebiegają w mitochondriach, a wszystkie dalsze przemiany w gładkiej siateczce śródplazmatycznej. Większość tych reakcji zachodzi przy udziale oksydaz cytochromowych z grupy P450, zaznaczonych na rysunku 4. Do nielicznych wyjątków należy np. przemiana pregnenolonu w progesteron, aktywowana przez dehydrogenazę Δ^5 - 3β -hydroksysterydową (Δ^5 - 3β -HSDH).

Komórki osłonki wewnętrznej mają receptory LH i synteza steroidów jest w nich stymulowana przez LH [23, 33]. W komórkach warstwy ziarnistej znajdują się receptory FSH, a w dużych pęcherzykach antralnych pojawiają się także receptory LH, które zlokalizowane są przede wszystkim w części muralnej tej warstwy [2]. Tak więc proces aromatyzacji stymulowany jest początkowo przez FSH, a w dużych pęcherzykach przez obie gonadotropiny: FSH i LH [29, 33]. W tym czasie w komórkach ziarnistych przebiega głównie aromatyzacja, a ich ultrastruktura jest typowa dla komórek syntetyzujących białka [7, 17, 26].

Równolegle ze wzrostem pęcherzyka zwiększa się też ilość produkowanych estrogenów, co w końcu doprowadza do uwolnienia przedowulacyjnej fali przysadkowego LH [33].

• Trzeci, krótki przedowulacyjny etap charakteryzuje się intensywną, stymulowaną falą LH syntezą pęcherzykowego progesteronu z jednoczesnym dramatycznym spadkiem produkcji androgenów i estrogenów [33, 73, 74, 75]. Do tej pory nie wyjaśniono przyczyny supresji syntezy estrogenów i nie stwierdzono, czy zmiana kierunku steroidogenezy spowodowana jest spadkiem aktywności aromatazy, czy też brakiem androgenów, które mogą być aromatyzowane do estrogenów [33]. Badania aktywności Δ^5 - 3β -HSDH wykazały, że synteza progesteronu przebiega zarówno w komórkach osłonki wewnętrznej, jak i w komórkach ziarnistych [53, 77, 88]. Potwierdzają to hodowle *in vitro* obu izolowanych komponentów pęcherzyków [30, 60, 63]. Komórki ziarniste dopiero w tym przedowulacyjnym okresie wykazują ultrastrukturę komórek steroidogennych [26, 43].

PROCES SELEKCJI I ATREZJI

Z pęcherzyków rozpoczynających wzrost owuluje bardzo niewiele. Reszta stanowiąca 75% do 99,9% ulega atrezji na różnych etapach rozwoju. Przebieg procesu atrezji zależy od stadium rozwoju pęcherzyka, w którym zaczyna się ten proces degeneracji, od gatunku zwierzęcia, a także od wielu nie zbadanych dotychczas czynników. Zjawisko atrezji nie jest jeszcze dobrze poznane i do tej pory nie ustalono nawet, jak długo trwa całkowita dezintegracja pęcherzyka.

Pierwsze oznaki atrezji widoczne są w oocytach i warstwie ziarnistej. Cytoplazma degenerującego w fazie wzrostu oocytu może stać się kwasochłonna, osłonka jądrowa pofałdowana, a osłonka przejrzysta jest często penetrowana przez komórki, które najprawdopodobniej są komórkami ziarnistymi. W oocytach, które ukończyły fazę wzrostu, obserwuje się często figury mejotyczne (zjawisko tzw. pseudodojrzenia), podziały partenogenetyczne, fragmentację i lizę. Warstwa ziarnista zawiera zwykle mniej komórek (zmniejsza się ilość mitoz), a wiele z nich ma pyknotyczne jądra. W dalszych stadiach atrezji zanika błona podstawna, warstwa ziarnista jest infiltrowana przez leukocyty i komórki ziarniste są fagocytowane lub następuje ich liza. Komórki osłonki wewnętrznej ulegają hipertrofii i przekształcają się w tzw.

wtórne komórki interstycjalne lub tworzą struktury podobne do ciała żółtego, w środku których widoczne są resztki oocytów [23, 57].

Już od dawna prowadzone są badania nad czynnikami decydującymi o selekcji pęcherzyków predestynowanych do owulacji, czyli pęcherzyków dominujących. Stwierdzono, że do prawidłowego rozwoju pęcherzyków potrzebne są przede wszystkim działające w odpowiednim czasie i stężeniu gonadotropiny i steroidy. Poza tym komórki pęcherzyka muszą mieć receptory tych hormonów. W początkowym okresie rozwoju pęcherzyka bardzo ważną rolę odgrywa estradiol i FSH [62, 69]. Estradiol stymuluje powstanie własnych receptorów, dzięki którym może działać w pęcherzyku w drodze auto- i parakrynowej. Uwolniony do krwi reguluje w drodze sprzężeń zwrotnych, obejmujących też podwzgórze, sekrecję gonadotropin z przysadki. Jednocześnie estradiol stymuluje syntezę receptorów FSH w komórkach ziarnistych, a razem z FSH indukuje system aromataz. Z kolei FSH stymuluje aktywność tych enzymów, co prowadzi do zwiększenia syntezy estradiolu. W dużych pęcherzykach aktywność aromataz w warstwie ziarnistej jest stymulowana działaniem FSH i LH. Receptory LH powstają na skutek synergistycznego działania FSH i estradiolu. Indukowanie i stymulowanie systemu aromataz jest niezmiernie ważne dla syntezy odpowiednich ilości estradiolu, odgrywającego decydującą rolę w rozwoju pęcherzyka. Wiadomo, że pęcherzyki dominujące produkują więcej estradiolu niż pęcherzyki atretyczne [19, 37, 85]. Zbyt mała aktywność aromataz prowadzi do zwiększenia ilości osłonkowych androgenów, które przechodzą przez błonę podstawną do komórek ziarnistych i łącząc się z receptorami włączają niezbadany jeszcze mechanizm, prowadzący do obumierania tych komórek i w konsekwencji oocytu. Z drugiej strony androgeny są hormonami, które pośrednio, jako substrat do aromatyzacji, są niezbędne do stymulowania rozwoju pęcherzyka. Gdy jest ich za mało, pęcherzyk syntetyzuje też za mało estradiolu i jego warstwa ziarnista i oocyt obumierają. Tak więc androgeny są związkami, które mogą przesądzać o dalszym losie pęcherzyka [23]. W zdrowych pęcherzykach ilość syntetyzowanych androgenów jest najprawdopodobniej regulowana na zasadzie lokalnego sprzężenia zwrotnego przez estradiol, który przechodzi do komórek osłonki i hamuje syntezę zbyt dużych ilości tych hormonów [33].

W procesie selekcji pęcherzyków niezmiernie ważny jest występujący w każdym cyklu płciowym wzrost poziomu gonadotropin, a także stadium rozwoju, w którym znajduje się pęcherzyk w tym właśnie czasie. Baird [3] porównuje okres wyższego poziomu gonadotropin do furtki, przez którą przechodzą tylko uprzywilejowane pęcherzyki, będące w odpowiednim stadium rozwoju, pozwalającym na skorzystanie z działania FSH, przede wszystkim jako hormonu stymulującego system aromataz. Długość podwyższonego poziomu FSH (inaczej mówiąc "szerokość furtki") warunkuje charakterystyczną dla danego gatunku ilość dominujących pęcherzyków. Atrzejji ulegają te pęcherzyki, których stadium rozwojowe nie jest zsynchronizowane z hormonalnym profilem cyklu płciowego. Uważa się również, że pęcherzyki dominujące mogą uwalniać czynniki atretogene [37]. Z badań przeprowadzonych przez Hirshfield [35] wynika, że najwięcej pęcherzyków degeneruje we wczesnej fazie antralnej. Jak podkreśla autorka, jest to faza intensywnego różnicowania się pęcherzyka, a wiele związanych z tym procesów wymaga stymulującego działania FSH. O kluczowej roli gonadotropin w rozwoju pęcherzyka świadczy także przedowulacyjny wyrzut LH determinujący dojrzewanie oocytu i owulację. W świetle powyższych danych zupełnie słuszne wydaje się uznanie hormonów gonadotropowych i steroidowych za makroregulatory rozwoju pęcherzyka. Jednakże coraz częściej podkreśla się, że na proces selekcji mają wpływ także inne obecne w pęcherzyku czynniki. Działanie niektórych z nich zostało omówione poniżej.

NIESTEROIDOWE CZYNNIKI REGULUJĄCE ROZWÓJ PĘCHERZYKA

Ostatnie badania przynoszą coraz więcej danych na temat niesteroidowych czynników, syntetyzowanych przez lub obecnych w pęcherzyku, a regulujących funkcję jajników, w tym i pęcherzyków. Czynnikiem tych jest bardzo dużo. W wielu wypadkach ich działanie nie zostało jeszcze dobrze poznane, stąd w literaturze można znaleźć sprzeczne doniesienia na temat ich funkcji. Czynniki te zostały podzielone na pewne grupy.

CZYNNIKI WZROSTU

Wspólną ich cechą jest stymulowanie mitoz. Ich działanie może być szczególnie ważne w początkowej fazie rozwoju pęcherzyka, jakkolwiek brak dokładnych danych o powiązaniu tych czynników ze wzrostem i rozwojem pęcherzyka [23]. Poszczególne czynniki wzrostu wywierają także inne, często niekorzystne dla pęcherzyka działania. Nabłonkowy czynnik wzrostu (EGF) hamuje funkcje stymulowane działaniem FSH (np. działa supresyjnie na aktywność aromatazy) i może doprowadzić do atrezji pęcherzyka [4, 20, 80]. Blokują on także działanie LH w komórkach osłonki wewnętrznej, najprawdopodobniej doprowadzając do utraty receptorów LH. Insulinopodobny czynnik wzrostu (IGF-I) jest identyfikowany z somatomedyną C. Jest on syntetyzowany w komórkach ziarnistych i działa stymulująco na syntezę steroidów zarówno w komórkach ziarnistych, jak i osłonkowych. Zwiększa on też ilość receptorów LH [5, 23]. Fibroblastyczny czynnik wzrostu (FGF) jest obecny w komórkach ziarnistych i działa supresyjnie na aktywność aromatyzacji, obniżając w ten sposób ilość syntetyzowanego estradiolu. Hamuje także powstawanie receptorów LH w komórkach ziarnistych [49, 80]. Przejawia on także aktywność angiogeniczną, charakterystyczną dla czynników angiogenicznych. Wspólnie z nimi odgrywa ważną rolę w rozwoju naczyń krwionośnych w czasie różnicowania się pęcherzyka, a także w procesie przekształcania się pęcherzyka w ciało żółte [5, 80].

GONADOLIBERYNA (GnRH)

Kojarzy się ją zwykle z podwzgórzem, ale najprawdopodobniej jest ona syntetyzowana także w jajniku i jest obecna w pęcherzyku [23, 80]. W początkowych stadiach rozwoju pęcherzyka GnRH wywiera wpływ hamujący, inhibując steroidogenezę i tworzenie receptorów LH. Natomiast w przedowulacyjnych pęcherzykach stymuluje syntezę progesteronu. Wykazano również jej indukujące działanie na wznowienie mejozy i na proces owulacji [2, 32, 80].

PROTEINY GONAD

Proteiny te modulujące sekrecję przysadkowego FSH zostały wyczerpująco opisane przez Yinga [90]. Inhibina i folikulostatyna działają supresyjnie na uwalnianie FSH i stymulują sekrecję progesteronu przy równoczesnym hamowaniu produkcji estradiolu. Inhibina ponadto hamuje wznowienie mejozy. Aktywina wzmacnia sekrecję FSH z przysadki, obniża syntezę progesteronu, a stymuluje syntezę estradiolu.

REGULATORY LUTEINIZACJI

Inhibitor luteinizacji (LI), obecny w dużych ilościach w płynie z małych pęcherzyków, zapobiega procesowi luteinizacji. W miarę rozwoju pęcherzyków maleje w nich aktywność inhibitora luteinizacji, a wzrasta aktywność stymulatora luteinizacji (SL). Ten ostatni znajduje się w dużej ilości w płynie z dużych pęcherzyków, w których stymuluje proces luteinizacji, w tym syntezę progesteronu [80].

INHIBITORY WIĄZANIA GONADOTROPIN

Inhibitor wiązania FSH (FSH-BI) działa supresyjnie na wiązanie FSH przez komórki ziarniste i tym samym indukuje proces atrezji pęcherzyka. Analogiczny inhibitor wiązania LH jest obecny przede wszystkim w ciałkach żółtych (bogaty przegląd literatury zamieszcza Tsafriri [80]).

PRODUKTY TYPOWE DLA KOMÓREK NERWOWYCH

Osobną grupę stanowią związki, znane jako produkty typowe dla komórek nerwowych, a syntetyzowane także przez komórki jajnika, jak na przykład katecholaminy, oksytocyna czy wazopresyna. Związki te mogą również modulować funkcję pęcherzyka [23, 68, 80].

Ważną rolę w pęcherzyku odgrywiają prostaglandyny, które oprócz wspomnianego już udziału w procesie owulacji mogą działać jako regulatory steroidogenezy [1, 68].

Istnieje jeszcze wiele innych niesteroidowych związków, których wpływ na funkcję jajnika został już udowodniony lub jest dopiero badany.

PODZIĘKOWANIE

Składam bardzo serdeczne podziękowanie Pani Profesor Stanisławie Stokłosowej za przeczytanie manuskryptu i Jej cenne krytyczne uwagi.

LITERATURA

- [1] AINSWORTH L, TSANG BK, DOWNEY BR, MARCUS GJ. The synthesis and action of steroids and prostaglandins during follicular maturation in the pig. *J Reprod Fert* 1990; Suppl 40: 137–150.
- [2] AMSTERDAM A, ROTMENSCH S. Structure-function relationship during granulosa cell differentiation. *Endocrine Rev* 1987; 8: 309–337.
- [3] BAIRD DT. The model for follicular selection and ovulation: lessons from superovulation. *J Steroid Biochem* 1987; 27: 15–23.
- [4] BENDELL JJ, DORRINGTON JH. Epidermal growth factor influences growth and differentiation of rat granulosa cells. *Endocrinology* 1990; 127: 533–540.
- [5] BICSAK TA, HSUEH AJ. Cell to cell communication in the ovary. [w] Piva F, Bardin CW, Forti G, Motta M, (red) Cell to Cell Communication in Endocrinology. New York: Raven Press 1988: 167–180.
- [6] BIEŁAŃSKA-OSUCHOWSKA Z. Oogeneza u ssaków. [w] Wierzbowski S, (red.) Podstawy Embriologii Stosowanej. Materiały Seminarium organizowanego przez Komitet Biologii Rozrodu Zwierząt Użytkowych PAN oraz Instytut Zootechniki. Kraków 1987: 1–17.
- [7] BJERKMAN N. A study on the ultrastructure of the granulosa cells of the rat ovary. *Acta Anat* 1962; 51: 125–147.

- [8] BJERSING L. Maturation, morphology and endocrine function of the ovarian follicle. *Adv Exp Med Biol* 1983; **147**: 1–15.
- [9] BJERSING L, CAJANDER S. Ovulation and the mechanisms of follicle rupture. I. Light microscopic changes in rabbit ovarian follicles prior to induced ovulation. *Cell Tiss Res* 1974; **149**: 287–300.
- [10] BLANDAU RJ, RUMERY RE. Measurements of intrafollicular pressure in ovulatory and preovulatory follicles of the rat. *Fert Steril* 1963; **4**: 330–341.
- [11] BROWN CG, POLYSTER NL. Studies on ovarian prostaglandin production in relation to ovulation in the rat. *J Reprod Fert* 1984; **72**: 407–414.
- [12] BUCCIONE R, CECCONI S, TATONE C, MANGIA F, COLONNA R. Follicle cell regulation of mammalian oocyte growth. *J Exp Zool* 1987; **242**: 351–354.
- [13] BYSKOW AG. Ultrastructural studies on the preovulatory follicle in the mouse ovary. *Z Zellforsch* 1969; **100**: 285–299.
- [14] BYSKOV AG, HOYER PE. Embriology of mammalian gonads. [w] Knobil E, Neil J (red.) *The Physiology of Reproduction*. New York: Raven Press Ltd 1988: 265–302.
- [15] CAJANDER SB. Perioovulatory changes in the ovary. Morphology and expression of tissue-type plasminogen activator. [w] *Development in Ultrastructure of Reproduction*. Alan R. Liss, Inc. 1989: 91–101.
- [16] CRAN DG. Cortical granules during oocyte maturation and fertilization. *J Reprod Fert* 1989; Suppl **38**: 49–62.
- [17] CRAN DG, MOOR RM. The development of oocytes and ovarian follicles of mammals. *Sci Prog Oxf* 1980; **66**: 371–383.
- [18] DEKEL N. Spatial relationship of follicular cells in the control of meiosis. *Prog Clin Biol Res* 1988; **267**: 87–101.
- [19] DiZERGA GS, HODGEN GD. Folliculogenesis in the primate ovarian cycle. *Endocrine Rev* 1981; **2**: 27–48.
- [20] DORRINGTON JH, BENDELL JJ, LOBB DK. Aromatase activity in granulosa cells: regulation by growth factors. *Steroids* 1987; **50**: 411–421.
- [21] EPPIG JJ. The relationship between cumulus cell-oocyte coupling, oocyte meiotic maturation, and cumulus expansion. *Develop Biol* 1982; **89**: 268–272.
- [22] ERIKSON GF, HOFEDITZ C, UNGER M, ALLEN R, DULBECCO R. A monoclonal antibody to a mammary cell line recognizes two distinct subtypes of ovarian granulosa cells. *Endocrinology* 1985; **117**: 1490–1499.
- [23] ERIKSON GF, MAGOFFIN DA, DYER CA, HOFEDITZ C. The ovarian androgen producing cells: A review of structure/function relationship. *Endocrine Rev* 1985; **6**: 371–399.
- [24] ESPEY LL. Ovulation as an inflammatory reaction – a hypothesis. *Biol Reprod* 1980; **22**: 73–106.
- [25] FALCK B. Site of production of estrogen in the rat ovary as studied in micro-transplants. *Acta Physiol Scand* 1959 Suppl **163**; **47**: 1–25.
- [26] FLETCHER WH, EVERETT JW. Ultrastructural organization of rat granulosa cells on the day of proestrus. *Anat Rec* 1973; **175**: 320a.
- [27] FORTUNE JE. Bovine theca and granulosa cells interact to promote androgen and progesterin production. *Biol Reprod* 1981; **24**, Suppl **1**, Abstr **33**.
- [28] FORTUNE JE, ARMSTRONG DT. Hormone control of 17 β -estradiol biosynthesis in proestrus rat follicles: estradiol production by isolated theca versus granulosa. *Endocrinology* 1978; **102**: 227–235.
- [29] FORTUNE JE, HILBERT JL. Estradiol secretion by granulosa cells from rats with four- or five-day estrous cycles: the development of responses to follicle-stimulating hormone versus luteinizing hormone. *Endocrinology* 1986; **118**: 2395–2401.
- [30] HAMBERGER L, HILLENSJO T, AHREN K. Steroidogenesis in isolated cells of preovulatory rat follicles. *Endocrinology* 1978; **103**: 771–777.
- [31] HANEY AF, SCHOMBERG DW. Estrogen and progesterone production by developing porcine follicles in vitro: evidence for estrogen formation by theca. *Endocrinology* 1981; **109**: 971–977.
- [32] HILLENSJO T, LeMAIRE WJ. Gonadotropin releasing hormone agonist stimulates meiotic maturation of follicle enclosed rat oocytes in vitro. *Nature* 1980; **287**: 145–146.
- [33] HILLIER SG. Sex steroid metabolism and follicular development in the ovary. [w] Clarke JR (red.) *Oxford Reviews of Reproductive Biology*. Oxford Univ Press 1985; **7**: 168–222.
- [34] HILLIER SG, REICHERT LE jr, VAN HALL EV. Control of preovulatory follicular estrogen biosynthesis in the human ovary. *J Clin Endocr Metab* 1981; **52**: 847–856.
- [35] HIRSHFIELD AN. Size-frequency of atresia in cycling rats. *Biol Reprod* 1988; **38**: 1181–1188.
- [36] IMBARAJ RM, HAIDER S. In vitro effectiveness of estradiol-17 β , androgens, corticosteroids, progesterone, and other pregnane derivatives on germinal vesicle breakdown in oocytes of the exotic common carp *Cyprinus carpio* (L.). *Indian J Exp Biol* 1988; **26**: 583–585.
- [37] IRELAND JJ. Control of follicular growth and development. *J Reprod Fert* 1987; Suppl **34**: 39–54.

- [38] KASSON BG, MEIDAN R, DAVOREN JB, HSUEH AJ. Identification of subpopulations of rat granulosa cells: sedimentation properties and hormonal responsiveness. *Endocrinology* 1985; **117**: 1027–1034.
- [39] KITAI H, YOSHIMURA Y, WRIGHT K, SANTULLI R, WALLACH EE. Microvasculature of preovulatory follicles: comparison of in situ and in vitro perfused rabbit ovaries following stimulation of ovulation. *Am J Obstet Gynecol* 1985; **152**: 889–895.
- [40] KOHDA H, MORI T, EZAKI Y, NISHIMURA T, KAMBEGAWA A. A progesterone-dependent step in ovulation induced by human chorionic gonadotrophin in immature rats primed with pregnant mare serum gonadotrophin. *J Endocr* 1980; **87**: 105–107.
- [41] LARSEN WJ, WERT SE, BRUNNER GD. Differential modulation of rat follicle cell gap junction population at ovulation. *Develop Biol* 1987; **122**: 61–71.
- [42] LEVEILLE MC, ROBERTS KD, CHEVALIER S, CHAPDELAINE A, BLEAU G. Formation of the hamster zona pellucida in relation to ovarian differentiation and follicular growth. *J Reprod Fert* 1987; **79**: 173–183.
- [43] LIPNER H. Mechanism of ovulation. [w] Knobil E, Neil J (red.) *The Physiology of Reproduction*. New York: Raven Press Ltd 1988; 447–488.
- [44] LUNENFELD B, KRAIEM Z, ESHKOL A. The function of the growing follicle. *J Reprod Fert* 1975; **45**: 567–574.
- [45] MALLER JL. Interaction of steroid with the cyclic nucleotide system in amphibian oocytes. *Adv Nucleotide Res* 1983; **15**: 295–336.
- [46] MARKIS A, RYAN KJ. Progesterone, androstenedione, testosterone, estrone and estradiol synthesis in hamster ovarian follicle cells. *Endocrinology* 1975; **96**: 694–703.
- [47] MARTIN GG, TALBOT P. Formation of the rupture site in preovulatory hamster follicles: morphological and morphometric analysis of thinning of the granulosa and thecal layers. *Gamete Res* 1987; **17**: 303.
- [48] MILLER WL. Molecular biology of steroid hormone synthesis. *Endocrine Rev* 1988; **9**: 295–318.
- [49] MONDSCHHEIN JS, SCHOMBERG DW. Growth factors modulate gonadotropin receptor induction in granulosa cell cultures. *Science* 1981; **211**: 1179–1180.
- [50] MOOR RM, POLGE C, WILLADSEN SM. Effect of follicular steroids on the maturation and fertilization of mammalian oocytes. *J Embryol Exp Morph* 1980; **56**: 319–335.
- [51] MORIOKA N, ZHU C, BRÄNNSTRÖM M, WOESSNER JF, LeMAIRE WJ. Mechanisms of mammalian ovulation. [w] *Development of Preimplantation Embryos and their Environment*. Alan R. Liss, Inc. 1989: 65–85.
- [52] MOTLIK J, FULKA J, FLECHON JE. Changes in intracellular coupling between pig oocytes and cumulus cells during maturation in vivo and in vitro. *J Reprod Fert* 1986; **76**: 31–37.
- [53] NOWORYTA B, SZOŁTYS M. Dynamics of the Δ^5 -3 β -hydroxysteroid dehydrogenase activity in rat follicular granulosa cells during proestrus. *Bull Acad Pol Sci CL V Ser Sci Biol* 1975; **23**: 65–69.
- [54] OZON R. Regulation of *Xenopus* oocyte meiotic maturation. [w] Nunez JE, Denton RM (red.) *Hormone Cell Regulation*. Amsterdam Elsevier Biomedical Press 1983; **17**: 287–298.
- [55] PALOTIE A, PELTONEN L, FOIDART J, RAJANIEMI H. Immunohistochemical localization of basement membrane components and interstitial collagen types in preovulatory rat ovarian follicles. *Collagen Rel Res* 1984; **4**: 279–287.
- [56] PARR EL. Histological examination of the rat ovarian follicle wall prior to ovulation. *Biol Reprod* 1974; **11**: 483–503.
- [57] PETERS H, McNATTY KP (red.) *The ovary*. London, Toronto, Sydney, New York: Granada Publishing 1980.
- [58] PHILLIPS DM. Structure and function of the zona pellucida. [w] Familiari G, Makabe S, Motta PM (red.) *Ultrastructure of the Ovary*. Kluwer Academic Publishers 1991: 63–72.
- [59] PINCUS G, ENZMANN EV. The comparative behavior of mammalian egg in vivo and in vitro. I. The activation of ovarian eggs. *J Exp Med* 1935; **62**: 665–675.
- [60] QUIRK SM, HILBERT IL, FORTUNE JE. Progesterone secretion by granulosa cells from rats with four- or five-day estrous cycles: the development of responses to follicle-stimulating hormone, luteinizing hormone, and testosterone. *Endocrinology* 1986; **118**: 2402–2410.
- [61] RAIKAMUR K, CONTUR RIL, MURPHY BD. Binding of high density lipoproteins to luteal membrane: the role of prolactin, luteinizing hormone and circulating lipoproteins. *Biol Reprod* 1985; **32**: 546–555.
- [62] RICHARDS JS. Actions and interactions of pituitary and ovarian hormones on follicular cell differentiation. *Physiol Rev* 1980; **60**: 51–89.
- [63] RICHARDS JS, HEDIN L, CASTON L. Differentiation of rat ovarian thecal cells: evidence for functional luteinization. *Endocrinology* 1986; **118**: 1660–1668.
- [64] RONDELL P. Follicular processes in ovulation. *Fed Proc* 1970; **29**: 1875–1906.
- [65] SCHROEDER PC, TALBOT P. Ovulation in the animal Kingdom: a review with the emphasis on the role of contractile processes. Review article. *Gamete Res* 1985; **11**: 191–221.

- [66] SHALGI R, KREICER P, RIMON A, PINTO M, SOFERMAN N. Proteins in human follicular fluid: the blood-follicle barrier. *Fert Steril* 1973; **24**: 429-434.
- [67] SHORT RV. Steroids in the follicular fluid and the corpus luteum. A "two cell type" theory of ovarian steroid synthesis. *J Endocr* 1962; **24**: 59-63.
- [68] STOKŁOSOWA S. The interaction of follicular cells and steroidogenic activity of the ovary. *Acta Physiol Pol* 1989; **40**: 35-52.
- [69] STOKŁOSOWA S. Czynniki indukujące różnicowanie komórek jajnika. *Zesz Nauk UJ, Prace Biol Mol* 1990; **18**: 137-147.
- [70] STOKŁOSOWA S, GREGORASZCZUK E, CHANNING CP. Estrogen and progesterone secretion by isolated cultured porcine thecal and granulosa cells. *Biol Reprod* 1982; **26**: 943-952.
- [71] STOKŁOSOWA S, SZOŁTYŚ M. Hormonal dynamics in the preovulatory ovarian follicle and the oocyte in rat during proestrus. *Ann Biol Anim Bioch Biophys* 1978; **18**(2B): 503-509.
- [72] STRAUSS III JF, PAAVOŁA LG, NESTLER JE, SATO EA, SILAVIN SL. Lipoprotein cholesterol uptake and metabolism in ovarian cells. [w] Toft DO, Ryan RF (red.) Proceedings of the Fifth Ovarian Workshop. Champaign: Illinois 1985: 275.
- [73] SZOŁTYŚ M. Progestagen dynamics in preovulatory follicles of rats. *J Reprod Fert* 1976; **48**: 397-398.
- [74] SZOŁTYŚ M. Oestrogens and progestagens in rat ovarian follicles during the oestrous cycle. *J Reprod Fert* 1981; **63**: 221-224.
- [75] SZOŁTYŚ M. Owulacja i superowulacja u szczurów w aspekcie morfologicznym i hormonalnym. *Endokrynologia Polska* 1990; Suppl **4**: 57-126.
- [76] TABAROWSKI Z. Mechanizmy odpowiedzialne za pęknięcie pęcherzyka jajnikowego ssaków. *Przegląd Zool* 1989; **1**: 51-62.
- [77] TABAROWSKI Z, SZOŁTYŚ M. Histochemical localization of Δ^5 - β -HSDH activity in preovulatory rat follicles. *Folia Histochem Cytobiol* 1987; **25**: 149-154.
- [78] TALBOT P, MARTING G, ASHBY H. Formation of the rupture site in preovulatory hamster and mouse follicles: loss of the surface epithelium. *Gamete Res* 1987; **17**: 287-302.
- [79] THIBAUT C, SZÖLLÖSI D, GERARD M. Mammalian oocyte maturation. *Reprod Nutr Develop* 1987; **27**: 865-896.
- [80] TSAFRIRI A. Local nonsteroidal regulators of ovarian function. [w] Knobil E, Neil J, (red.) The Physiology of Reproduction. New York: Raven Press Ltd 1988: 527-565.
- [81] TSAFRIRI A, ABISOGUN AO, REICH R. Steroids and follicular rupture at ovulation. *J Steroid Biochem* 1987; **27**: 359-363.
- [82] TSAFRIRI A, LINDNER HR, ZOR U, LAMPRECHT SA. Physiological role of prostaglandins in the induction of ovulation. *Prostaglandins* 1972; **2**: 1-10.
- [83] TSUJIMOTO D, KATAYAMA K, TOJO S, MIZOGUTI H. Scanning electron microscopic studies on stigmas in rat ovaries. *Acta Obstet Gynecol Scand* 1982; **61**: 269-273.
- [84] ULLENBROEK JThJ, RICHARDS JS. Ovarian follicular development during the rat estrous cycle: gonadotropin receptors and follicular responsiveness. *J Reprod* 1979; **20**: 1159-1165.
- [85] ULLENBROEK JThJ, WOUTERSEN PJA, SCHOOT P. Atresia of preovulatory follicles: gonadotropin binding and steroidogenic activity. *Biol Reprod* 1980; **23**: 219-229.
- [86] VANDERHYDEN BC, ARMSTRONG DT. Effects of gonadotropins and granulosa cell secretions on the maturation and fertilization of rat oocytes in vitro. *Mol Reprod Develop* 1990; **26**: 337-346.
- [87] WASSERMAN P. The mammalian ovum. [w] Knobil E, Neil J (red.) The Physiology of Reproduction. New York: Raven Press Ltd 1988: 69-102.
- [88] WEISZ J, ZOLLER LC. Quantitative cytochemistry in the study of regional specialization of the membrana granulosa of the ovulable type of follicle. [w] Pattison JR, Bittensky L, Chayen J (red.) Quantitative Cytochemistry and its Application. London and New York: Academic Press 1979: 269-283.
- [89] WOLGEMUTH DJ, CELNZA J, BUNDMAN DS, DUNBAR BS. Formation of the rabbit zona pellucida and its relationship to ovarian follicular development. *Develop Biol* 1984; **106**: 1-14.
- [90] YING SY. Inhibins, activins, and follistatins: gonadal proteins modulating the secretion of follicle-stimulating hormone. *Endocrine Rev* 1988; **9**: 267-293.
- [91] YOSHIMURA Y, DHARMARAJAN AM, GIPS S, ADAHI T, HOSOI Y, ATLAS SJ, WALLACH EE. Effects of prostacyclin on ovulation and microvasculature of the in vitro perfused rabbit ovary. *Am J Obstet Gynecol* 1988; **159**: 977-982.
- [92] YOSHIMURA Y, WALLACH EE. Studies of the mechanism(s) of mammalian ovulation. *Fert Steril* 1987; **47**: 22-34.

- [93] ZOLLER LC, WEISZ J. Identification of cytochrome P-450, and its distribution in the membrana granulosa of the preovulatory follicle using quantitative cytochemistry. *Endocrinology* 1978; **103**: 310–313.
- [94] XSHANG A, ARMSTRONG DT. Effect of follicle-stimulating hormone and ovarian steroids during in vitro meiotic maturation on fertilization of rat oocytes. *Gamete Res* 1989; **23**: 267–277.

Otrzymano: 20 lutego 1992 r.

Przyjęto: 17 marca 1992 r.

Adres autorki: 30-060 Kraków, ul. Ingardena 6.

CYTOMETRIA PRZEPEŁYWOWA W BADANIACH KOMÓREK I NIEKTÓRE JEJ ZASTOSOWANIA LEKARSKIE*

FLOW CYTOMETRY AND ITS APPLICATION IN CELL BIOLOGY AND SOME MEDICAL PROBLEMS

Jerzy KAWIAK, Janusz S. SKIERSKI

Zakład Cytofizjologii Centrum Medycznego Kształcenia Podyplomowego oraz Pracownia
Biofarmacji Instytutu Leków, Warszawa

Streszczenie. Cytometrię przepływową wykorzystuje się do pomiaru ugięcia i rozproszenia światła oraz do wzbudzenia fluorescencji oddzielnie dla każdej komórki. Jest możliwe mierzenie wielu tysięcy komórek w ciągu minuty pod warunkiem, że mamy do dyspozycji dobry do tego celu komputer. Wybrane komórki można też fizycznie rozdzielać (sortować). W tym przeglądzie opisana jest zasada działania cytometrów oraz wiele przykładów wykorzystania cytometrii przepływowej w poznawaniu biologii komórki i w rozwiązywaniu niektórych problemów lekarskich.

Summary. Flow cytometry is used to measure forward and side scattered light as well as fluorescence for each cell, separately. Thousands of cells may be measured within one minute if proper computer is available. Some predetermined cells may be physically separated (sorted) as well. In the review we describe basic information on cytometers, and use of flow cytometry in description of cell biology and solution of some medical problems.

PODSTAWY CYTOMETRII PRZEPEŁYWOWEJ

Cytometria przepływowa jest sposobem określania liczebności subpopulacji komórek. Cytometrią przepływową można oceniać cechy morfologiczne badanych komórek, jak i ilość związanego przez ich struktury barwnika. To z kolei pozwala wnioskować o zawartości w komórce określonych substancji, np. DNA, RNA, białek, determinant antygenowych, a także o stanie fizjologicznym komórki.

*Artykuł został przygotowany do publikacji w czasopiśmie "Medycyna 2000" i za zgodą obu redakcji w formie nieco zmienionej i pod zmienionym tytułem jest publikowany w "Postęпах Biologii Komórki".

Zasada działania cytometru przepływowego jest zbliżona do działania mikroskopu fluorescencyjnego, wyposażonego w układ spektrofotometryczny. Pierwowzorem dzisiejszych cytometrów można nazwać urządzenie skonstruowane przez Kamensky'ego w 1965 roku [39, 40, 41]. Cytometr przepływowy powstał przez wprowadzenie kanału przepływowego do mikroskopu, w miejsce preparatu. Kanałem tym, w strumieniu cieczy formowanym siłami hydrodynamicznymi płyną badane komórki (cząstki). Istotnym warunkiem konstrukcyjnym jest zachowanie laminarnego przepływu i dostatecznie niskiego stężenia komórek, aby płynęły one pojedynczo, w tej samej koncentrycznej warstwie cieczy, dokładnie w środku kanału. Wiązka światła, najczęściej niebieskiego lub ultrafioletowego oświetla przepływające komórki. Światło to podlega ugięciu i rozproszeniu na komórkach oraz wzbudza fluorescencję, jeżeli komórki były uprzednio zabarwione odpowiednimi barwnikami fluoryzującymi. Światło ugięte i rozproszone oraz światło fluorescencji po zebraniu przez odpowiedni układ optyczny i filtry zaporowe trafia do detektorów (np. fotopowielaczy). Każda komórka przepływająca przez strumień światła może więc mieć zmierzonych i zarejestrowanych kilka parametrów: ugięcie światła na jej brzegach (*forward scatter*), rozproszenie światła na jej strukturach wewnątrzkomórkowych i błonie komórkowej (*side scatter*) oraz natężenie fluorescencji jednego lub kilku barwników fluorescencyjnych. Liczba mierzonych parametrów zależy od stopnia rozbudowania przyrządu (minimalne wyposażenie obejmuje jeden kanał fluorescencyjny). Dwa pierwsze parametry wyżej wymienione służą do opisanie morfologii komórek i nie zależą od ich barwienia. Do opisanego wyżej układu optycznego dodane są systemy automatyki i sterowania oraz mikrokomputer służący do zbierania i przetwarzania danych. Całe urządzenie pozwala na pomiar fluorescencji oraz cech morfologicznych komórek z praktyczną prędkością ok. 100 komórek na sekundę. W rozsądnym więc czasie – rzędu 5 minut – można zmierzyć cechy morfologiczne i fluorescencję 20 000–30 000 komórek. Pozwala to osiągnąć wysoką dokładność i bardzo mały rozrzut wyników przy minimalnym nakładzie pracy – co jest nieosiągalne innymi metodami [52].

Zaletą cytometrii jest możliwość wykonania wielu pomiarów każdej z bardzo wielu komórek tak, że pomiary te można dobrze opracować statystycznie. Nie otrzymuje się wartości średniej, jak w pomiarach biochemicznych, ale oddzielną wartość pomiaru dla każdej komórki. Komórki też można potem fizycznie rozdzielać (sortować). Główną niedogodnością jest konieczność użycia zawiesziny cząstek, przez co traci się informację o budowie tkanki i wzajemnym ułożeniu komórek. Również mierzony parametr dotyczy całej cząstki (komórki), a nie jego rozmieszczenia wewnątrz komórki.

Dobór zastosowanego barwnika fluorescencyjnego (fluorochromu) zależy od tego, jaki składnik komórki chcemy badać. I tak – do barwienia kwasów nukleinowych (rys. 1), szczególnie DNA, stosuje się zwykle 4',6-dwuamidyno-2-fenylindol (DAPI), oranż akrydyny (AO), jodek propidium (PI), bromek etydyne (EB), Hoechst 33258 i inne [16, 42]. Białka wiążą się niespecyficznie z sulforodaminą, a wiele dostępnych na rynku przeciwciał znakuje się tioizocyjanianem fluoresceiny (FITC) albo fykoerytryną (PE). Aktywność mitochondriów można badać przy pomocy wychwytywania przez nie rodaminy 123 [62]. Z wyżej wymienionych barwników do rutynowego oznaczania zawartości DNA szczególnie użyteczny jest DAPI, pozwala bowiem na proste barwienie zarówno żywych, jak i utrwalonych w alkoholu komórek. Ponadto barwnik ten pozwala na uzyskanie bardzo wysokiej rozdzielczości pomiaru [70]. Drugim bardzo cennym, choć kapryśnym w użyciu, barwnikiem jest oranż akrydyny [14, 15]. Po wytrawieniu RNA jednoniciowy DNA po kwaśnej denaturacji fluoryzuje czerwono, metachromatycznie, podczas gdy dwuniciowy, niezdenaturowany DNA – zielono. Wyko-

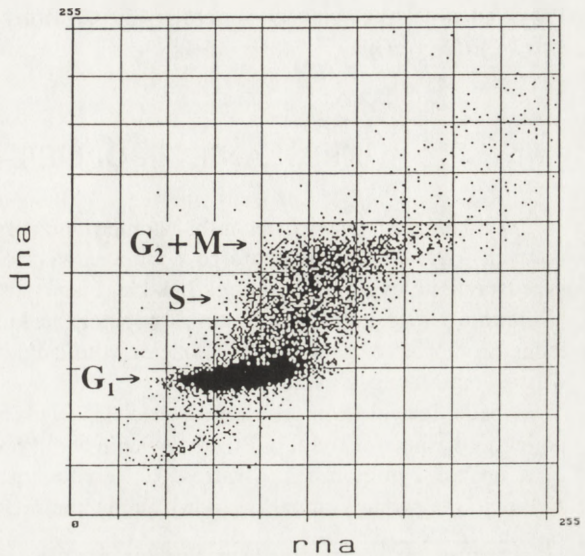
rzystuje się również różną wrażliwość chromatyny na denaturację w zależności od fazy cyklu komórkowego, co pozwala np. na odróżnianie komórek w mitozie od komórek w fazie G_2 , a więc na obliczenie indeksu mitotycznego [14].

Do wzbudzenia fluorescencji potrzebne jest odpowiednio silne źródło światła. Stosuje się tu bądź lasery [74], bądź wysokociśnieniowe lampy rtęciowe typu np. HBO-100. Z wielu typów laserów zwykle wykorzystuje się lasery argonowe emitujące światło o długości fali 488 nm, kryptonowe bądź helowo-neonowe. Dużym problemem jest zasilanie i chłodzenie laserów. Lasery dużej mocy optycznej, rzędu 5W – wymagają zasilania energią elektryczną o mocy kilkunastu kilowatów i przepływu wody chłodzącej kilkunastu litrów na minutę, co stwarza określone problemy techniczno-eksploatacyjne. Zaletą tych laserów jest jednak duża intensywność światła i wiele linii emisyjnych o użytecznym natężeniu. Z drugiej strony lasery małej mocy mogą być chłodzone powietrzem, ale użyteczna jest tylko niebiesko-zielona linia emisyjna 488 nm, co znacznie ogranicza wybór możliwych do zastosowania fluorochromów. Tych wad nie ma lampa rtęciowa, która jest źródłem światła od nadfioletu do czerwieni. Wyboru odpowiedniej długości fali światła wzbudzającego dokonuje się przez zmianę zestawu filtrów. Poważną wadą lampy rtęciowej jest niska stabilność łuku utrudniająca niekiedy w znacznym stopniu pomiary oraz jej niewielka trwałość.

Konstrukcja kanału, przez który płyną komórki i wchodzi w wiązkę światła wzbudzającego, decyduje o parametrach przyrządu. Jest ona pochodną przyjętej koncepcji optycznej, liczby mierzonych parametrów, rodzaju źródła światła itp. Jednym z często spotykanych typów kanału jest kanał o oświetleniu epiluminescencyjnym – wiązka światła wzbudzającego pada przez obiektyw immersyjny o możliwie dużej aperturze numerycznej, a światło fluorescencji wraca tym samym obiektywem i przez układ światłodzielący oraz zestaw filtrów pasmowych pada na detektory.

W cytometrach z laserowym źródłem światła kanał ma często kwarcowy, cylindryczny fragment oświetlony z boku skupioną wiązką lasera lub laserów. Od ścianek kanału odchodzą np. światłowody przenosząc światło fluorescencji, rozproszenia w przód lub rozproszenia wsteczne itd. Z optycznego punktu widzenia system ten jest prostszy i sprawniejszy od epiluminescencji, choć bardziej kosztowny.

Niektóre cytometry umożliwiają rozdzielanie przepływającej zawiesiny komórkowej na frakcje w zależności np. od natężenia światła fluorescencji. Powszechnie stosowaną obecnie metodą sortowania jest ładowanie elektrostatyczne jednokomórkowych kropelek zawiesiny



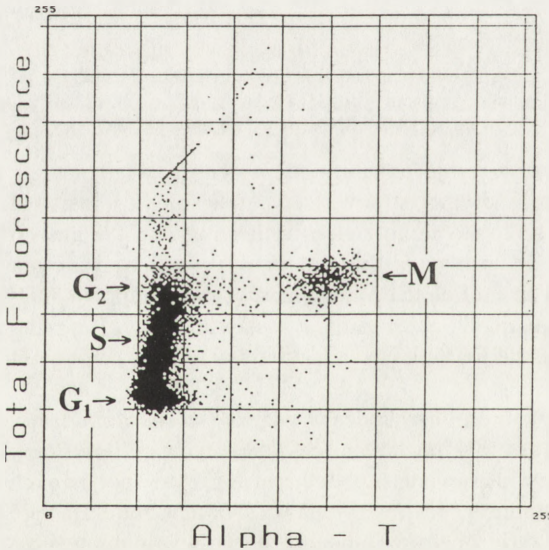
Rys. 1. Cytoqram komórek białaczki ludzkiej HL-60; każdy punkt cytogramu odpowiada jednej komórce o określonej zawartości DNA i RNA (barwienie oranżem akrydyny)

[36] i odchylenie ich w odpowiednio ukształtowanym i sterowanym polu elektrycznym. Przykładem tak działającego sortera jest FACS firmy Becton-Dickinson (*Fluorescence Activated Cell Sorter*).

OKREŚLANIE PROLIFERACJI KOMÓREK

Przykładem zastosowań techniki cytometrii przepływowej jest oznaczanie kwasów nukleinowych – DNA i RNA w komórce, co można wiązać z cyklem komórkowym. Na rysunku 1 przedstawiono cytogram komórek ludzkiej białaczki HL-60. Cytogramem nazywamy obraz na ekranie oscyloskopu lub monitora komputera, na którym każda świecąca kropka odpowiada jednej komórce (cząstce), a jej położenie w układzie współrzędnych jest proporcjonalne do wartości mierzonego parametru.

W badaniu cyklu komórkowego często stosowaną metodą jest oznaczanie zawartości DNA po jego kwaśnej denaturacji. Przedstawienie wyników po barwieniu oranżem akrydyny (rys. 2) w postaci cytogramu α_T (wartość α_T jest to stosunek czerwonej fluorescencji do sumy natężeń czerwonej i zielonej) umożliwia odróżnienie komórek w mitozie od komórek w fazie G_2 .

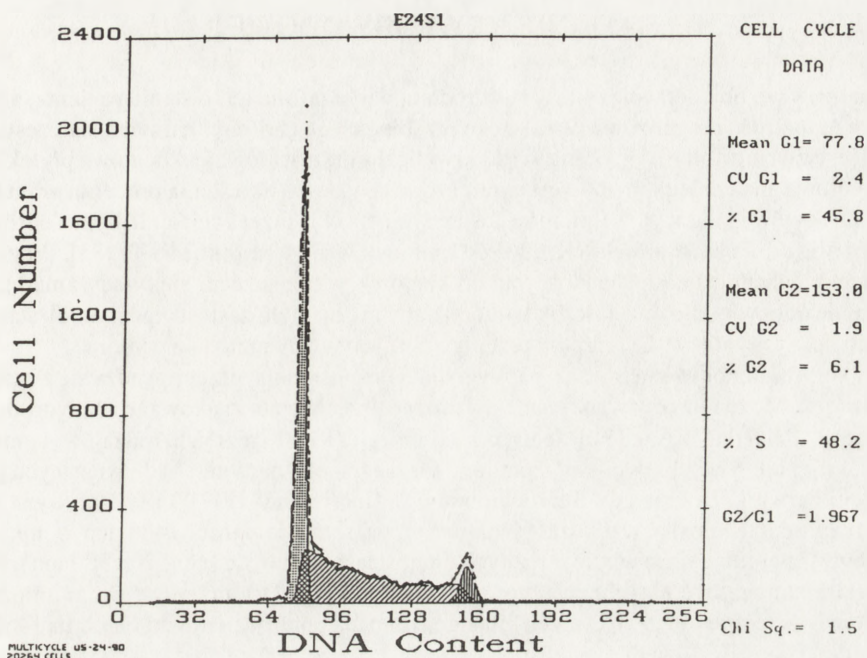


Rys. 2. Cytogram α_T komórek białaczki HL-60; zależność całkowitej fluorescencji od wartości α_T ; wartość α_T definiuje się jako stosunek natężenia czerwonej fluorescencji do sumy natężeń czerwonej i zielonej fluorescencji (barwienie oranżem akrydyny po trawieniu RNA-za i po kwaśnej denaturacji DNA); jednoniciowy, zdenaturowany DNA fluoreskuje czerwono, dwuniciowy (natywny) DNA – zielono

Przy pomocy odpowiednich programów komputerowych możliwe jest takie przekształcenie cytogramów, aby uzyskać histogramy np. zawartości DNA. Na rysunku 3 przedstawiono typowy histogram DNA dla populacji komórek HL-60, rosnącej w fazie logarytmicznej. Obliczenie odsetka komórek w poszczególnych fazach cyklu jest możliwe, choć wymaga zastosowania wysoce skomplikowanych programów komputerowych, szczególnie w przypadku badania populacji o zaburzonym wzroście lub charakteryzujących się zmienną w czasie ploidalnością [17]. Na rysunku 3 przedstawiono również wyniki analizy komputerowej przy pomocy programu MULTICYCLE.

Eksperyment statmokinetyczny polega na podaniu do hodowli substancji, np. winblastyny, blokującej komórki w fazie M i pomiarze liczby komórek w mitozie (indeksu mitotycznego) w różnym czasie po podaniu substancji blokującej. Wykreślając na papierze logarytmicznym indeks mitotyczny w

funkcji czasu otrzymujemy linię prostą, z której nachylenia można obliczyć czas podwojenia (*doubling time, generation time*) populacji komórkowej. W podobny sposób można obliczyć



Rys. 3. Typowy histogram zawartości DNA: pierwszy szczyt (pole kratkowane) odpowiada komórkom w fazie G₁, drugi szczyt (kreski pionowe) – komórkom w fazie G₂ i M; pole (kreski skośne) pomiędzy szczytami odpowiada komórkom w fazie S cyklu komórkowego (komórki białaczki HL-60, analiza histogramu dokonana przy pomocy programu MULTICYCLE)

czasy trwania poszczególnych faz cyklu oraz oceniać zmiany wywołane działaniem różnych czynników – np. leków [7, 8, 13, 44, 71, 72, 77].

W pracowni hodowli komórkowych lub tkankowych możemy, szczególnie przy barwieniu DAPI-sulforodaminą i AO, śledzić stan hodowli. Przy rutynowej kontroli zawartości DNA, stwierdzenie nagłego pogorszenia się rozdzielczości histogramu DNA nasuwa podejrzenie zakażenia hodowli mykoplazmą. W farmakologii i onkologii doświadczalnej znalazło zastosowanie badanie cytotoksyczności leków na poziomie cyklu komórkowego oraz badanie leków cytostatycznych pod kątem ich działania na cykl oraz klonogenność komórek normalnych i nowotworowych [34, 59]. Wykorzystuje się te metody do badania *in vitro* wpływu na komórki człowieka nowych, dotąd nie stosowanych leków bądź do oceny sposobu działania leków już wprowadzonych do lecznictwa [19, 20, 21, 37, 66, 79].

Należy wspomnieć o dostępności różnych przeciwciał monoklonalnych znakowanych takimi barwnikami, jak FITC i PE, co umożliwia badanie determinant antygenów powierzchniowych bądź śródkomórkowych komórek normalnych i nowotworowych. Monoklonalne przeciwciało Ki-67 jest wskaźnikiem proliferacji komórek; wiąże się z antygenem jądrowym, którego nie ma w komórkach niepobudzonych [6, 27].

BADANIE KRWI OBWODOWEJ

Analiza krwi obwodowej (żyłnej) jest źródłem wielu informacji o stanie pacjenta, a także czasem umożliwia prognozowanie dalszego przebiegu jego choroby. Jednym z najczęstszych badań jest tzw. morfologia, tj. ocena w 1 μ l krwi liczby erytrocytów, leukocytów i płytek krwi. Szczegółowa analiza leukocytów jest ograniczona zwykle do określenia procentu granulocytów, limfocytów i monocytów, mimo że dostępnymi obecnie przeciwciałami można odróżnić limfocyty B od T i od komórek NK, a wśród limfocytów T – komórki Th i Ts [33]. Procedury immunocytochemiczne można stosować do komórek w rozmazach, ale wtedy żmudne jest policzenie odpowiednio dużej liczby komórek, aby można było zastosować metody statystyczne do oceny wyników. Cytometria przepływowa jest wtedy metodą z wyboru.

Reakcję immunocytochemiczną, najwygodniej bezpośrednio, przeprowadza się z zawiesiną komórek. Można użyć równocześnie dwa różne przeciwciała znakowane różnymi fluorochromami dla jednoczesnego liczenia co najmniej czterech różnych rodzajów komórek: takich, które nie wiążą barwników, komórek wiążących oba barwniki bądź wiążących jeden lub drugi barwnik. Dobrze gdy fluorochromami są fluoresceina (FITC) i fykoerytryna (PE), gdyż barwniki te można wzbudzać światłem o tej samej długości (488 nm – np. laser argonowy), a emitują one światło o różnych długościach (odpowiednio 520 i 580 nm). Jeżeli komórki nie mogą być natychmiast wprowadzone do cytometru przepływowego, można je pozostawić w temperaturze 4°C przez kilka godzin bądź po utrwaleniu do tygodnia [46].

OKREŚLENIE STANU UKŁADU IMMUNOLOGICZNEGO

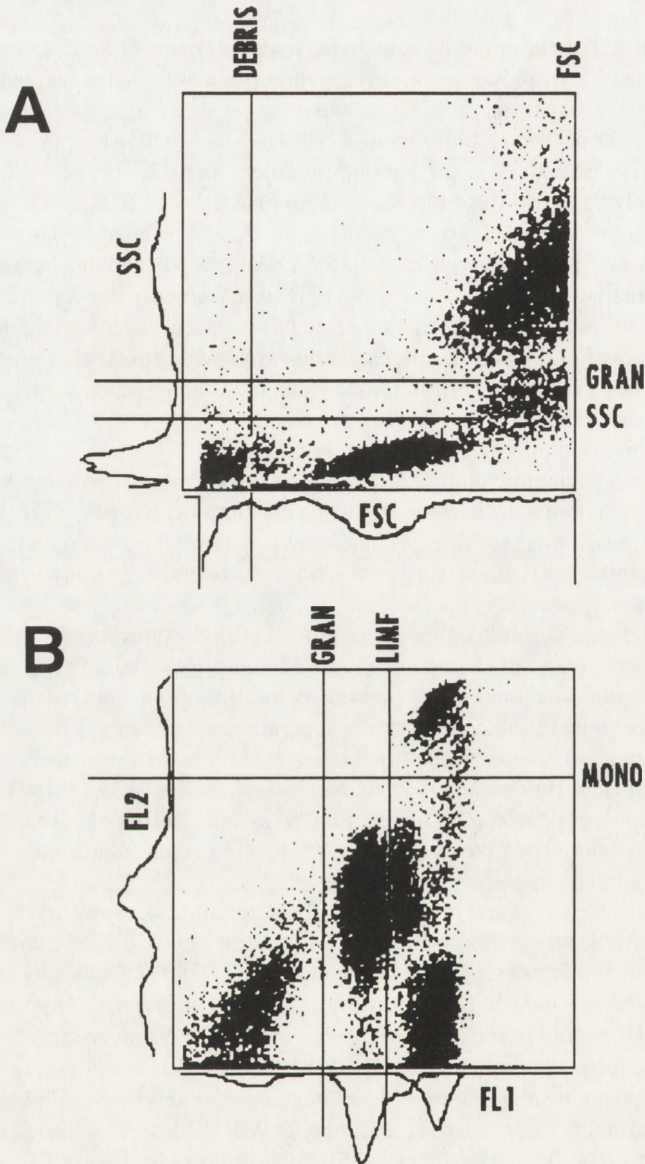
Określenie fenotypu leukocytów krwi i komórek szpiku umożliwia monitorowanie stanu układu immunologicznego w trakcie choroby i leczenia pacjenta [33, 50]. W tym celu można oddzielić komórki mononuklearne wirowaniem na Ficolu z uropoliną przed reakcją immunocytochemiczną. Dokładną selekcję wybranych subpopulacji leukocytów wykonuje się elektronicznie podczas analizy zarejestrowanych w cytometrze komórek. Tym sposobem łatwo można odróżnić małe i "bezziarniste" limfocyty od dużych, z większą liczbą "ziarnistości" monocytów i od pośredniej wielkości granulocytów o dużej "ziarnistości". Jak już wspomniano, wielkość komórek określa się rozproszeniem światła w osi jego wiązki (*forward scatter*), a "ziarnistość" jest mierzona rozproszeniem światła pod kątem 90° (*side scatter*). Każdą z grup komórek wydziela się elektronicznie i dalej analizuje, jakie przeciwciała (fluorochromy) zostały związane przez komórkę dla dokładniejszego jej opisu (rys. 4 i 5).

Tymi sposobami można ustalić, jak obniża się liczba limfocytów Th, jak zmienia się liczba komórek Ts oraz NK podczas leczenia chorego na nowotwór cytostatykami [9, 50]. Ważne jest bowiem, aby nie stosować na ślepo dużych dawek cytostatyków, jak to jest przyjęte w nowoczesnym leczeniu nowotworów. Podobnie napromienianie nowotworów, nawet miejscowe, wpływa na stan układu immunologicznego pacjenta. Jest też oczywiste, że intensywne leczenie białaczki np. przeszczepem szpiku wymaga dokładnego monitorowania odtwarzania układu hematologicznego i odpornościowego pacjenta [48]. Podobnie, ustalono długotrwałe przebywanie w organizmie limfocytów pobranych z okolicy nowotworu i namnożonych *in vitro* (komórki LAK), a potem podanych adoptywnie w celu leczenia przerzutów [1].

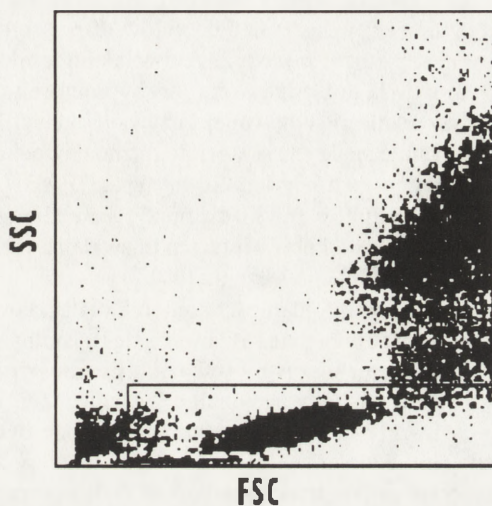
Monitorowanie układu immunologicznego pacjenta jest również konieczne przy allogenicznym przeszczepach narządów: nerek, serca, szpiku, trzustki, kiedy stosuje się leki immunosupresyjne, np. cyklosporynę A (CsA). Jednym z jej działań jest zdolność hamowania wczesnych przejawów aktywacji limfocytów T. Hamowana jest transkrypcja genów limfokin, np. IL-2, IL-3, IFN γ , jednak CsA nie hamuje produkcji GM-CSF w odpowiedzi na sygnał inicjowany oddziaływaniem antygeny z receptorem limfocyty T [10, 23]. Ten wpływ CsA na komórki T powoduje wtórne efekty w limfocytach B, makrofagach i innych komórkach, zależne od produktów aktywowanych limfocytów T. W innych badaniach poziom limfocytów T CD4 $^{+}$, CD8 $^{+}$ oraz HLA-DR $^{+}$ kontrolowano cytometrią przepływową podczas prób zapobiegania odrzuceniu "późnego" przeszczepu nerek podawaniem przeciwciał monoklonalnych [58]. Działanie leków immunosupresyjnych powinno być więc dokładnie monitorowane, aby nie wyrządzić szkody pacjentowi, ale utrzymać układ immunologiczny w optymalnym stanie, by nie nastąpiło odrzucenie przeszczepionego narządu.

Odnowę układu immunologicznego po przeszczepie szpiku badano wielokrotnie [64, 65]. Przekonano się, że u pacjentów po przeszczepieniu szpiku brak jest zrównoważonej repopulacji komórek T [5], natomiast wcześniej pojawiają się komórki NK [48, 55] oraz limfocyty B o niezwyklej ekspresji antygenów powierzchniowych [4]. U 8/10 pacjentów wkrótce po przeszczepieniu szpiku [48] zauważono, że w ich krwi utrzymuje się podwyższona względna i bezwzględna liczba limfocytów T CD8 $^{+}$ oraz obniżona liczba komórek CD4 $^{+}$. Powoduje to odwrócenie normalnego stosunku komórek pomocniczych do supresorowych we krwi osób z przeszczepami allogenicznymi i autogenicznymi. Można więc sądzić, że supresja immunologiczna jest częścią procesu rekonstrukcji przeszczepionego szpiku. Stan ten nie wraca do stanu prawidłowego nawet po 2 latach od przeszczepienia szpiku. Do 30 dni po przeszczepie limfocyty T fenotypowo "pomocnicze" nie są jednak zdolne do aktywności pomocniczej w stosunku do limfocytów B w testach *in vitro*. Normalny poziom IgG i IgM w osoczu pojawia się u pacjentów dopiero po 4–6 miesiącach. Powyższy opis ilustruje złożone zmiany zachodzące we krwi u pacjentów po przeszczepieniu szpiku. U różnych osób zmiany te mogą różnie przebiegać i stąd istnieje potrzeba ich śledzenia.

Przykładem zakaźnego schorzenia wirusowego szczególnie skierowanego na układ immunologiczny jest AIDS, gdy wirus wybiórczo atakuje limfocyty T CD4 $^{+}$. Podczas progresji choroby stopniowo zmniejsza się liczba limfocytów T CD4 $^{+}$ [32]. CD4 jest bowiem receptorem o dużym powinowactwie do białka gp120 otoczki ludzkiego wirusa upośledzenia immunologicznego (HIV – *human immunodeficiency virus*) [45]. W niezakażonych komórkach, CD4 wiąże monomorficzną domenę na MHC klasy II komórki prezentującej antygen (APC) umożliwiając rozpoznanie antygeny przez limfocyt T i jego aktywację. Białko wirusa gp120 ma sekwencję aminokwasów zbliżoną do domeny MHC klasy II i stąd, podobnie jak ta domena, białko gp120 aktywuje limfocyt T [35]. Spoczynkowe limfocyty T CD4 $^{+}$ jak również monocyty i makrofagi mające słabą ekspresję CD4 [67] mogą być rezerwuarem wirusa HIV-1 u zakażonych osób [12]. W trakcie prób leczenia tego ciężkiego schorzenia powinno się śledzić stan chorego określanie jego subpopulacji komórek CD4 $^{+}$ we krwi.



Rys. 4. Przykład analizy leukocytów krwi osoby zdrowej: A – opis morfologiczny komórek, FSC – *forward scatter* = wartość ugięcia światła proporcjonalna do wielkości komórki, SSC – *side scatter* = wartość rozproszenia światła opisująca strukturę komórki, jej "ziarnistość"; program komputerowy wykreśla histogramy FSC i SSC (widoczne u dołu i z lewej strony wykresu) i na tej podstawie oddziela linią pionową nie-komórki (*debris*) od skupienia limfocytów (u dołu wykresu) oraz liniami poziomymi limfocyty (SSC) od monocytów (skupienie komórek z prawej u dołu) i monocytów od granulocytów (GRAN – skupienie komórek z prawej w środku i u góry); B – opis fluorescencji komórek po działaniu na nie przeciwciałami HLe-1 (antyCD45-FITC) wiążącymi się ze wszystkimi leukocytami oraz Leu M3 (antyCD14-PE) wiążącymi się z monocytami/makrofagami; program komputerowy wykreśla histogramy fluorescencji (FL1 dla fluoresceiny oraz FL2 dla ficyocerytryny) i na tej podstawie oddziela monocyty (linia pozioma MONO), granulocyty od nie-komórek (linia pionowa GRAN) i limfocyty od granulocytów (tylko częściowo, linia pionowa LIMF)

A**B**

% Limf	33
% Mono	8
% Gran	59

Leu M3



HLe-1

W oknie:

% Limf	84
% Mono	1
% Gran	3
% Debris	13
% Limf razem	95

Rys. 5. Te same leukocyty krwi co na rys. 4: A – na wykresie "oknem" wydzielono do analizy limfocyty; fluorescencję komórek w obrębie "okna" przedstawia część rysunku B; na wykresie pozostały głównie limfocyty wiążące przeciwciało HLe-1, co świadczy o poprawnym ustawieniu "okna"; z prawej strony wykresu B jest procent różnych cząstek w obrębie "okna" (w oknie:), a po lewej stronie jest odczytany z wykresu na rys. 4B procent różnych leukocytów w badanej próbce krwi

ROZPOZNAWANIE I PROGNOZOWANIE PRZEBIEGU SCHORZEŃ NOWOTWOROWYCH

Cytometr przepływowy można wykorzystać do celów diagnostycznych. W białaczkach analizuje się komórki krwi i szpiku znakując je przeciwciałami monoklonalnymi [25, 26], a cytometr przepływowy umożliwia dokładną ocenę liczby komórek o cechach nowotworowych. Na przykład, w powszechnie akceptowanej i używanej klasyfikacji ostrych białaczek szpikowych (AML) wykorzystuje się kryteria morfologiczne i cytochemiczne ustalone przez tzw. współpracującą grupę francusko-amerykańsko-brytyjską (FAB) [54]. AML są fenotypowo heterogenną grupą schorzeń już w chwili diagnozy, a możliwość odróżniania w tych warunkach komórek białaczkowych od prawidłowych pozwala na wykrycie komórek nowotworowych pozostających ewentualnie po leczeniu [69].

W klinice onkologicznej badanie ploidalności komórek białaczkowych lub guzów litych, szczególnie pęcherza moczowego i raka płuc [61] uważa się za istotny wskaźnik prognostyczny [2, 3, 31, 51, 53, 57, 75]. Za niekorzystny wskaźnik prognostyczny [49] uważa się też względną oporność nowotworu na konwencjonalne leczenie, tzw. oporność wielolekową (*multidrug resistance* – MDR) [24]. Powodem oporności może być zawodowe narażenie osoby na chemiczne mutageny bądź uprzednie już leczenie chorego. Wywołana u zwierząt oporność wiąże się z ekspresją na powierzchni komórek białka o masie cząsteczkowej 170–180 kDa nazwanego glikoproteiną – P. Wyższy poziom tego białka w komórkach białaczki jest sprzężony z obecnością na nich antygenu CD34, chociaż oba białka uważa się za niezależne czynniki prognostyczne [30]. Antygen CD34 na komórkach białaczkowych opornych ma gęstość około 10-krotnie wyższą niż na komórkach prawidłowych [69], stąd można te komórki odróżnić cytometrią przepływową. Ekspresję genu oporności wielolekowej można stwierdzić badaniem obecności w komórkach mRNA tego genu łańcuchową reakcją polimerazy RNA (PCR) bądź testem czynnościowym przy użyciu cytometru przepływowego [30].

Cytometria przepływowa jest też wykorzystywana w prognozowaniu przebiegu białaczek np. w ALL komórek T [73].

MONITOROWANIE PRZEBIEGU LECZENIA ZAKAŻEŃ

W przypadkach masowego zakażenia bakteryjnego (*sepsis*) spowodowanego np. przebiegiem przewodu pokarmowego następują duże zmiany w komórkach obronnych. Monocyty krwi tracą np. obecny na ich powierzchni antygen HLA-DR, co jest wskaźnikiem funkcjonalnej niewydolności tych komórek (zmiany możliwości prezentacji antygenu, tworzenia nad-tlenków, wydzielania cytokin). Zjawisko to nazwano "paraliżem immunologicznym" [76]. Krytycznym parametrem w tym stanie jest ekspresja antygenu HLA-DR na monocytach mniejsza niż 20% wartości prawidłowej, co można śledzić cytometrią przepływową. Są sugestie, aby w takich przypadkach prowadzić leczenie pacjenta interferonem gamma i GM-CSF, które normalizują zaburzone funkcje monocytów i ekspresję HLA-DR.

ZMIANY KOMÓREK UKŁADU IMMUNOLOGICZNEGO W NARZĄDACH

W przewlekłym schorzeniu centralnego układu nerwowego – *sclerosis multiplex* – występują liczne, duże nacieki limfocytów T i makrofagów oraz demielinizacja. Uważa się, że proces zapalny w tym schorzeniu inicjują autoreaktywne limfocyty T skierowane przeciwko białkom mieliny, głównie zasadowemu białku mieliny (*myelin basic protein* – MBP) [78].

Zapalenie reumatoidalne stawów jest schorzeniem autoimmunizacyjnym, którego jednym z objawów jest długotrwałe zapalenie stawów. Nacieki komórek jednojądrzastych błony maziowej doprowadzają do zniszczenia chrząstki stawowej i otaczających staw tkanek. Chociaż patogenеза tego schorzenia nie jest znana, ważną rolę w inicjacji schorzenia przypisuje się limfocytom T skierowanym przeciw własnym antygenom. Zapalenie reumatoidalne ma związek z allelami genów MHC klasy II DR4 i DR1. W tym schorzeniu czasem obserwuje się obecność oligoklonalnych, aktywowanych limfocytów T CD4⁺ w błonach maziowych i otaczających tkankach, co pozwala sugerować oddziaływanie antygenów MHC klasy II z receptorem limfocyty T o łańcuchach α i β ($\alpha\beta$ TCR). Zgodnie z tymi przypuszczeniami stwierdzono, że częstość limfocytów T z TCR V β 14⁺ jest większa w płynie stawowym zajętych stawów niż we krwi obwodowej pacjenta [56], co może być wskazówką diagnostyczną i prognostyczną dającą się ustalić metodami cytometrii przepływowej.

Znanym zjawiskiem jest mniejsza wielkość grasicy u zwierząt noszących nowotwory [63, 68]. Przekonano się, że wzrost nowotworu może wywoływać istotne zmiany subpopulacji tymocytów w grasicy [43], co prawdopodobnie nie pozostaje bez wpływu na subpopulacje limfocytów we krwi i funkcje obronne organizmu przeciw nowotworowi. Nowotwór wywiera ten wpływ przez uwalnianie do krążenia dotąd bliżej niepoznanych substancji dyfundujących przez filtry 0,2 μ m. Dokładne śledzenie zmian subpopulacji limfocytów we krwi u pacjentów z nowotworem mogłoby być wskazówką prognostyczną.

BADANIE FUNKCJI KOMÓREK

Oprócz możliwości badania "stanu morfologicznego" układu immunologicznego przez opisanie zmian subpopulacji komórek tego układu, można ocenić czynności tych komórek, co przedstawiono w tabeli I. Również w tych badaniach cytometr przepływowy jest narzędziem bardzo pomocnym, ułatwiającym analizę wyników. *In vitro* bada się zwykle cytotoksyczne właściwości limfocytów pacjenta oraz zdolność limfocytów (komórek) pacjenta do odpowiedzi proliferacją na lektyny, przeciwciała monoklonalne albo określone komórki w układzie allo- bądź autologicznym. W pierwszym przypadku testuje się aktywność cytotoksyczną komórek NK w stosunku do znakowanych chromem-51 komórek docelowych – allogenicznych linii komórkowych, albo cytotoksyczne własności limfocytów T w stosunku do innych allo- bądź autologicznych komórek docelowych. W przypadku drugim czyta się wynik pobudzeniem proliferacji komórek, zwykle wykorzystując test włączania H³-tymidyny do komórek.

W badaniach własności cytotoksycznych komórek układu immunologicznego można radioaktywny chrom-51 zastąpić barwnikami fluorescencyjnymi wnikającymi tylko do komór-

rek martwych, np. bromkiem etydydy albo jodkiem propidium [22, 38]. Są to testy analogiczne do testu z błękitem trypanu, powszechnie wykorzystywanym do opisanienia liczby komórek martwych; w testach tych zakłada się, że komórki z uszkodzoną plazmolemą przepuszczalną dla barwników są martwe. Sposobem wykrywania komórek żywych jest użycie dwuocianu fluoresceiny [60]. Jest on gromadzony w żywych komórkach i tam hydrolizowany do wolnej fluoresceiny przez esterazy. Polarna fluoresceina nie może przenikać przez nieuszkodzoną błonę komórki i stąd komórka żywa "świeci", podczas gdy martwa nie może gromadzić barwnika.

Znakowane fluorochromami komórki martwe bądź żywe można analizować cytometrem przepływowym [11, 38] celem ustalenia w testach *in vitro* cytotoxycywności ludzkich komórek układu immunologicznego. Takie wyniki interpretuje się w terminach zdolności układu immunologicznego pacjenta do obrony (test funkcjonalny).

Cytometrem przepływowym można dokładnie określić

stan komórek w cyklu komórkowym [10, 11, 47], jak o tym wspomniano. Daje się więc zastąpić manipulacje z radioaktywnym trytem (H^3 -tymidyną) stosowanym do wyznaczania komórek w fazie S cyklu, badaniem włączania do DNA nieradioaktywnej bromodezoksyrydyny (BrdUrd) i późniejszego wykrywania monoklonalnym przeciwciałem obecnej w jądrze BrdUrd reakcją immunocytochemiczną [18, 29]. Wyznakowane BrdUrd komórki można równocześnie znakować przeciwciałem, które w heterogennej mieszaninie komórek pozwala wyniki włączania BrdUrd odnosić tylko do określonego rodzaju komórek, np. limfocytów T. Do analizy wystarcza podobna liczba komórek jak w standardowych badaniach tego rodzaju.

Komórki nowotworowe melanoma, które nie mają ekspresji MHC klasy I, można zmienić transfekując je plazmidem zawierającym geny antygenów zgodności tkankowej [28]. Produkt tak wprowadzonego genu może zmienić wiele własności fenotypowych komórek nowotworowych. Mechanizmy tych zmian nie są znane, ale ich obecność może być interesująca dla onkologa poszukującego zmian fenotypowych komórki nowotworowej, które czyniłyby ją bardziej immunogenną.

TABELA I. Parametry komórkowe, które można mierzyć cytometrem przepływowym wg [43]

Strukturalne	Czynnościowe
wielkość	stan redoks
"ziarnistość" (ogólna struktura)	żywność
zawartość barwnika	potencjał błonowy
antygeny powierzchniowe	ładunek powierzchniowy
wiązanie lektyn	transport przez błonę komórkową
zawartość białek	pH wewnątrz komórki
zawartość DNA	receptory powierzchniowe
zawartość RNA	aktywność enzymu
budowa chromatyny	endocytoza

PODSUMOWANIE

Cytometria przepływowa jest wspaniałą nowoczesną metodą o ogromnych, przez wielu niedocenianych możliwościach. Na przeszkodzie jej szerokiego stosowania stoi jednak zarówno wysoka cena aparatów wahająca się między kilkudziesięcioma tysiącami i kilkuset tysiącami dolarów oraz wiedza i doświadczenie osoby prowadzącej badania. To ostatnie

decyduje o właściwej obsłudze niektórych typów cytometrów oraz umiejętności krytycznej interpretacji wyników.

LITERATURA

- [1] ALEXANDER RB, ROSENBERG SA. Adoptively transferred tumor-infiltrating lymphocytes can cure established metastatic tumor in mice and persist long-term in vivo as functional memory T lymphocytes. *J Immunotherapy* 1991; **10**: 389–397.
- [2] ANDREEF M. Flow cytometry of leukemia. [w] Melamed MR, Lindmo T, Mendelsohn ML [red] *Flow Cytometry and Sorting*. New York: Wiley-Liss Inc 1990: 697–724.
- [3] ANDREEF M. Flow cytometry of lymphoma. [w] Melamed MR, Lindmo T, Mendelsohn ML [red] *Flow Cytometry and Sorting*. New York: Wiley-Liss Inc 1990: 725–744.
- [4] ANTIN J, AULT K, RAPPEPORT J, SMITH B. B lymphocyte reconstitution after human bone marrow transplantation. *J Clin Invest* 1987; **80**: 325–332.
- [5] ATKINSON K, HANSEN J, STORB R, GOEHLE S, GOLDSTEIN G, THOMAS E. T cell subpopulations identified by monoclonal antibodies after human marrow transplantation. I. Helper-inducer and cytotoxic-suppressor subsets. *Blood* 1982; **59**: 1292–1298.
- [6] BAISCH H, GERDES J. Identification of proliferating cells by Ki-67 antibody. [w] Darzynkiewicz Z, Crissman HA [red] *Methods in Cell Biology*. Volume 33 - Flow Cytometry. San Diego, New York, Boston, London, Sydney, Tokyo, Toronto: Academic Press 1990: 217–226.
- [7] BARFOD H, BARFOD NM. Cell-production rates estimated by the use of vincristine sulphate and flow cytometry. I. An in vitro study using murine tumour cell lines. *Cell Tissue Kinet* 1980; **13**: 1–8.
- [8] BARFOD H, BARFOD NM. Cell-production rates estimated by the use of vincristine sulphate and flow cytometry. II. Correlation between the cell-production rates of ageing ascites tumours and the number of S phase tumour cells. *Cell Tissue Kinet* 1980; **13**: 9–19.
- [9] BARLOGIE B, RABER MN, SCHAUMAN J, JOHNSON TS, DREWENKO B, SCHWARZENDRUBER DE, GÖHDE W, ANDREEF M, FREIREICH E. Flow cytometry in clinical cancer research. *Cancer Res* 1983; **43**: 3982–3997.
- [10] BICKEL M, TSUDA H, AMSTAD P, EVEQUOZ V, MERGENHAGEN SE, WAHL SM, PLUZNICK DH. Differential regulation of colony-stimulating factors and interleukin-2 production by cyclosporin A. *Proc Natl Acad Sci US* 1987; **84**: 3274–3277.
- [11] BOHMER RM. Two-step cell-death kinetics in vitro during cis-platinum, hydroxyurea and mitomycin incubation. *Cell Tissue Kinet* 1984; **17**: 593–600.
- [12] BUKRINSKY MI, STANWICK TL, DEMPSEY MP, STEVENSON M. Quiescent T lymphocytes as an inducible virus reservoir in HIV-1 infection. *Science* 1991; **254**: 423–427.
- [13] DARŻYNKIEWICZ Z, TRAGANOS F, KIMMEL M. [w] Gray JW, Darzynkiewicz Z [red] *Techniques in cell cycle analysis*. Clifton, New Jersey: Humana Press 1986: 291–336.
- [14] DARŻYNKIEWICZ Z. Acid-induced denaturation of DNA in situ as a probe of chromatin structure. [w] Darzynkiewicz Z, Crissman HA [red.] *Methods in Cell Biology*. Volume 33 - Flow Cytometry. San Diego, New York, Boston, London, Sydney, Tokyo, Toronto: Academic Press 1990: 337–352.
- [15] DARŻYNKIEWICZ Z. Differential staining of DNA and RNA in intact cells and isolated cell nuclei with acridine orange. [w] Darzynkiewicz Z, Crissman HA [red] *Methods in Cell Biology*. Volume 33 - Flow Cytometry. San Diego, New York, Boston, London, Sydney, Tokyo, Toronto: Academic Press 1990: 285–298.
- [16] DARŻYNKIEWICZ Z, TRAGANOS F, KAPUŚCIŃSKI J, STAIANO-COICO L, MELAMED MR. Accessibility of DNA in situ to various fluorochromes: relationship to chromatin changes during erythroid differentiation of Friend leukemia cells. *Cytometry* 1984; **5**: 355–363.
- [17] DEAN PN. Data processing. [w] Melamed MR, Lindmo T, Mendelsohn ML [red] *Flow Cytometry and Sorting*. New York: Wiley-Liss Inc 1990: 415–444.
- [18] DEAN PN, DOLBEARE F, GRATZNER H, RICE GC, GRAY JW. Cell cycle analysis using a monoclonal antibody to BrdUrd. *Cell Tissue Kinet* 1984; **17**: 427–436.
- [19] DEL BINO G, LASSOTA P, DARŻYNKIEWICZ Z. The S-phase cytotoxicity of camptothecin. *Exp Cell Res* 1991; **193**: 27–35.

- [20] DEL BINO G, SKIERSKI JS, DARŻYNKIEWICZ Z. Diverse effects of camptothecin, an inhibitor of topoisomerase I, on the cell cycle of lymphocytic (L1210, MOLT-4) and myelogenous (HL-60, KG1) leukemic cells. *Cancer Res* 1990; **50**: 5746–5750.
- [21] DEL BINO G, SKIERSKI JS, DARŻYNKIEWICZ Z. The concentration-dependent diversity of effects of DNA topoisomerase I and II inhibitors on the cell cycle of HL-60 cells. *Exp Cell Res* 1991; **195**: 485–491.
- [22] EDIDIN M. A rapid, quantitative fluorescence assay for cell damage by cytotoxic antibodies. *J Immunol* 1970; **104**: 1303–1306.
- [23] EMMEL EA, VERWEIJ CL, DURAND DB, HIGGINS KM, LACY E, CRABTREE GR. Cyclosporin A specifically inhibits function of nuclear proteins involved in T cell activation. *Science* 1989; **246**: 1617–1620.
- [24] ENDICOLT JA, LING V. The biochemistry of P-glycoprotein-mediated multidrug resistance. *Annu Rev Biochem* 1989; **58**: 137.
- [25] FREEDMAN AS, NADLER LM. Cell surface markers in hematologic malignant. *Semin Oncol* 1987; **14**: 193–221.
- [26] FOON KA, TODD RF. Immunologic classification of leukemia and lymphoma. *Blood* 1986; **68**: 1–31.
- [27] GERDES J, LEMKE H, BALACH HM, BACKER HH, SCHWAB U, STEIN HJ. Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. *J Immunol* 1984; **133**: 1710–1715.
- [28] GORELIK E, JAY G, KIM M, HEARING VJ, DELEO A, MCCOY TM. Effects of H-2K^b gene on expression of melanoma-associated antigen and lectin-binding sites on BL 6 melanoma cells. *Cancer Res* 1991; **51**: 5212–5218.
- [29] GRATZNER HG. Monoclonal antibody to 5-bromo- and 5-iododeoxyuridine: a new reagent for detection of DNA replication. *Science* 1982; **218**: 474–475.
- [30] HABER DA. Multidrug resistance (MDR1) in leukemia: Is it time to test? *Blood* 1992; **79**: 295–298.
- [31] HATA Y, ISHIZU H, OHMORI K, HAMADA H, SASAKI F, UCHINO J, INONE K, NAITOH H, FUJITA M, KOBAYASHI T, YOKOYAMA S. Flow cytometric analysis of the nuclear DNA content of hepatoblastoma. *Cancer* 1991; **68**: 2566–2570.
- [32] HO DD, POMERANTZ RJ, KAPLAN JC. Pathogenesis of infection with human immunodeficiency virus. *N Engl J Med* 1987; **317**: 278–286.
- [33] HOFFMAN RA, KUNG PC, HANSEN WP, GOLDSTEIN G. Simple and rapid measurement of human T lymphocytes and their subclasses in peripheral blood. *Proc Natl Acad Sci US* 1980; **77**: 4914–4917.
- [34] HORAN PK, KAPPLER JW. Automated fluorescent analysis for cytotoxicity assays. *J Immunol Meth* 1977; **18**: 309–316.
- [35] HUGIN AW, VACCHIO MS, MORSE III HC. A virus-encoded "superantigen" in a retrovirus-induced immunodeficiency syndrome of mice. *Science* 1991; **252**: 424–427.
- [36] HULETT HR, BONNER WA, BARRET J, HERZENBERG LA. Cell sorting: automated separation of mammalian cells as a function of intracellular fluorescence. *Science* 1969; **166**: 747–749.
- [37] JAKÓBISIAK M, BRUNO S, SKIERSKI JS, DARŻYNKIEWICZ Z. Cell cycle-specific effects of lovastatin. *Proc Natl Acad Sci US* 1991; **88**: 3628–3632.
- [38] JONES KH, SENFT JA. An improved method to determine cell viability by simultaneous staining with fluorescein diacetate-propidium iodide. *J Histochem Cytochem* 1985; **33**: 77–79.
- [39] KAMENTSKY LA, MELAMED MR, DERMAN H. A New Ultra-rapid cell spectrophotometer: Preliminary observation of ultraviolet absorption in various human cells. *IBM Research Report (RW 72)* June 3, 1965
- [40] KAMENTSKY LA, MELAMED MR, DERMAN H. Spectrophotometer: New instrument for ultra-rapid cell analysis. *Science* 1965; **150**: 630–631.
- [41] KAMENTSKY LA. Rapid biological cell identification by spectroscopic analysis. *Proc 18th Ann Conf on Engineering in Biol and Med* 1965; **7**: 178.
- [42] KAPUŚCINSKI J. Interactions of nucleic acids with fluorescent dyes: spectral properties of condensed complexes. *J Histochem Cytochem* 1990; **38**: 1323–1329.
- [43] KAWIAK J, KAWALEC M, HOSER G, MIKS B, SKÓRSKI T, POJDA Z, SKURZAK H. Changes of thymocyte subpopulations induced by activities diffusing from L1210 cells. *Thymus* 1991; **18**: 185–192.
- [44] KIMMEL M, TRAGANOS F. Estimation and prediction of cell cycle specific effects of anticancer drugs. *Math Biosciences* 1986; **80**: 187–208.
- [45] LANDAU NR, WARTON M, LITTMAN DR. The envelope glycoprotein of the human immunodeficiency virus binds to the immunoglobulin-like domain of CD4. *Nature* 1988; **334**: 159–162.
- [46] LANIER LL, WARNER NL. Paraformaldehyde fixation of haematopoietic cells for quantitative flow cytometry (FACS) analysis. *J Immunol Meth* 1981; **47**: 25–30.

- [47] LARSEN JK. Flow cytometric discrimination of mitotic cells: resolution of M, as well as G₁, S, and G₂ phase nuclei with mithramycin, propidium iodide, and ethidium bromide after fixation with formaldehyde. *Cytometry* 1985; 7: 54–63.
- [48] LEINO L, LILIUS EM, NIKOSKELAINEN J, PELLINIEMI TT, RAJAMAKI A. The reappearance of 10 differentiation antigens on peripheral blood lymphocytes after allogeneic bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transpl* 1991; 8: 339–344.
- [49] LIST AF, SPIER CM, CLINE A, DOLL DC, GAREVAL H. Expression of the multidrug resistance gene product (P-glycoprotein) in myelodysplasia is associated with a stem cell phenotype. *Brit J Haematol* 1991; 78: 28–34.
- [50] LOKEN M, STALL A. Flow cytometry as an analytical and preparative test in immunology. *J Immunol Meth* 1982; 50: 85–105.
- [51] LOVETT E III, SCHNITZER B, KEREN D, FLINT A, HUDSON JL, MC CLATCHEY KD. Application of flow cytometry to diagnostic pathology. *Lab Invest* 1984; 50: 115–140.
- [52] MELAMED MR, MULLANEY PF, SHAPIRO H. An historical review of the development of flow cytometers and sorters. [w] Melamed MR, Lindmo T, Mendelsohn ML [red] *Flow Cytometry and Sorting*. New York: Wiley-Liss Inc 1990: 1–10.
- [53] MELAMED MR, STAIANO-COICO L. Flow cytometry in clinical cytology. [w] Melamed MR, Lindmo T, Mendelsohn ML [red] *Flow Cytometry and Sorting*. New York: Wiley-Liss Inc 1990: 755–772.
- [54] BENNETT JM, CATOVSKY D, DANIEL MT, FLANDRIN G, GALTON DA, GRALNICK HR, SULTAN C. Proposals for the classification of acute leukemias. *Brit J Haematol* 1976; 33: 451–458
- [55] NIEDERWIESER D, GASTL G, RUMPOLD H, MARTH C, KRAFT D, HUBER C. Rapid reappearance of large granular lymphocytes (LGL) with concomitant reconstitution of natural killer (NK) activity after human bone marrow transplantation. *Br J Haematol* 1987; 65: 301–305.
- [56] PALIARD X, WEST SG, LAFFERTY JA, CLEMENTS JR, KAPPLER JW, MARRACK P, KOTZIN BL. Evidence for the effects of a superantigen in rheumatoid arthritis. *Science* 1991; 253: 325–329.
- [57] RABER MN, BARLOGIE B. DNA flow cytometry of human solid tumors. [w] Melamed MR, Lindmo T, Mendelsohn ML [red] *Flow Cytometry and Sorting*. New York: Wiley-Liss Inc 1990: 745–754.
- [58] REINKE P, MILLER H, FIETZE E, HERBERGER D, VOLK HD et. al. Anti-CD4 therapy of acute rejection in long-term renal allograft recipients. *Lancet* 1991; 338: 702–703.
- [59] ROED H, VINDELLOV LL. Can human small-cell lung cancer cell lines be applied for optimizing chemotherapy. *Cancer Treat Res* 1989; 45: 151–172.
- [60] ROTMAN B, PAPERMASTER BW. Membrane properties of living mammalian cells as studied by enzymatic hydrolysis of fluorogenic esters. *Proc Natl Acad Sci US* 1966; 55: 134–141.
- [61] SAHIN AA, RO JY, EL-NAGGAR AK, LEE JS, AYALA AG, TEAGUE K, HONG WK. Flow cytometric analysis of the DNA content of non-small cell lung cancer. Ploidy as a significant prognostic indicator in squamous cell carcinoma of the lung. *Cancer* 1990; 65: 530–537.
- [62] SHAPIRO HM. Cell membrane potential analysis. [w] Darzynkiewicz Z, Crissman HA [red] *Methods in Cell Biology*. Volume 33 -Flow Cytometry. San Diego, New York, Boston, London, Sydney, Tokyo, Toronto: Academic Press 1990: 25–35.
- [63] SIEGLER R, KOPROWSKA I. Host responses to a transplantable "ascitic" tumor. *Cancer Res* 1962; 22: 1278–1283.
- [64] SKÓRSKI T, KAWALEC M, KAWIAK J. Early induction of immune resistance against leukemia in mice after lethal irradiation followed by syngeneic bone marrow transplantation and injection of syngeneic leucocytes. *Transplantation* 1991; 51: 843–847.
- [65] SKÓRSKI T, KAWALEC M, HOSER G, RATAJCZAK M, GNATOWSKI B, KAWIAK J. The kinetics of immunologic and hematologic recovery in mice after lethal total body irradiation and reconstitution with syngeneic bone marrow cells treated or untreated with mafosfamide (ASTA Z 7654). *Bone Marrow Transplant* 1988; 3: 543–551.
- [66] SMITH PJ, MORGAN SA, WATSON JV. Detection of multidrug resistance and quantification of responses of human tumor cells to cytotoxic agents using flow cytometric spectral shift analysis of Hoechst 33342 - DNA fluorescence. *Cancer Chemother Pharmacol* 1991; 27: 445–450.
- [67] TALLE MA, RAO PE, WESTBERG E, ALLEGAR N, MAKOWSKI M, MITTLER RS, GOLDSTEIN G. Patterns of antigenic expression on human monocytes as defined by monoclonal antibodies. *Cell Immunol* 1983; 78: 83–99.
- [68] TANAKA K, KOGA Y, TANIGUCHI K, NOMOTO K. T-Cell recruitment from the thymus to the spleen in tumor-bearing mice. I. Analysis of recruited cells by surface markers. *Cancer Immunol Immunother* 1986; 22: 37–42.

- [69] TESTAPEN LWM, SAFFORD M, KÖNERMANN S, LOKEN MR, ZURLUTTER K, BÜCHNER T, HIDE-DEMANN W, WÖRMANN B. Flow cytometric characterization of acute myeloid leukemia. Part II. Phenotypic heterogeneity at diagnosis. *Leukemia* 1991; **5**: 757-767.
- [70] THORNTHWAITE JT. High resolution DNA measurements using the nuclear isolation medium, DAPI, with the RATCOM flow cytometer. [w] Darzynkiewicz Z, Crissman HA [red] *Methods in Cell Biology*. Volume 33 - Flow Cytometry. San Diego, New York, Boston, London, Sydney, Tokyo, Toronto: Academic Press 1990: 111-119.
- [71] TRAGANOS F, KIMMEL M. The stathmokinetic experiment: a single - parameter and multiparameter flow cytometric analysis. [w] Darzynkiewicz Z, Crissman HA [red] *Methods in Cell Biology*. Volume 33 - Flow Cytometry. San Diego, New York, Boston, London, Sydney, Tokyo, Toronto: Academic Press 1990: 249-270.
- [72] TRAGANOS F. Single- and multiparameter analysis of the effects of chemotherapeutic agents on cell proliferation in vivo. [w] Melamed MR, Lindmo T, Mendelsohn ML [red] *Flow Cytometry and Sorting*. New York: Wiley-Liss Inc 1990: 773-801.
- [73] UCKUN FM, RAMSAY NKC, WADDICK KG, JASZCZ W, CHANDAN-LANGLIE M, OBUZ V, HAAKE R, GAJL-PECZALSKA K, KERSEY JH, SONG CW. In vitro and in vivo radiation resistance associated with CD3 surface antigen expression in T-lineage acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 1991; **78**: 2945-2955.
- [74] VANDILLA MA, TRUJILLO TT, MULLANEY PF, COULTER JK. Cell microfluorimetry: a method for rapid fluorescence measurement. *Science* 1969; **163**: 1213-1214.
- [75] VINDELV LL, CHRISTENSEN IJ. A review of techniques and results obtained in one laboratory by an integrated system of methods designed for routine clinical flow cytometric DNA analysis. *Cytometry* 1990; **11**: 753-770.
- [76] VOLK HD, THIEME M, HEYM S, DOCKE WP et al. Alterations in function and phenotype of monocytes from patients with septic disease-predictive value and new therapeutic strategies. *Behring Inst Mitt* 1991; Feb (88) 208-215.
- [77] WRIGHT NA, APPELTON DR. The metaphase arrest technique. A critical review. *Cell Tissue Kinet* 1980; **13**: 643-663.
- [78] WUCHERPFFENNING KW, OTA K, ENDO N, SEIDMAN JG, ROZENZWEIG A, WEINER HL, HAFLER DA. Shared human T cell receptor. Vb usage to immunodominant regions of myelin basic protein. *Science* 1990; **248**: 1016-1019.
- [79] ZUCKER RM, ADAMS DJ, BAIR KW, ELSTEIN KH. Polyploidy induction as a consequence of topoisomerase inhibition. *Biochem Pharmacology* 1991; **42**: 2199-2208.

Otrzymano: 10.03.1992 r.

Przyjęto: 10.04.1992 r.

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

MOLEKULARNE PODSTAWY ETAPU PROMOCJI NOWOTWORÓW. BADANIA NA KOMÓRKOWYCH MODELACH *IN VITRO*

MOLECULAR BASIS OF TUMOR PROMOTION. STUDIES ON *IN VITRO* CELL CULTURE MODELS

Karol DOWJAT

Zakład Cytologii Klinicznej, Centrum Medyczne Kształcenia Podyplomowego, Warszawa

Streszczenie. Artykuł omawia badania nad nową klasą genów, zwanych **pro-genami**, warunkujących wrażliwość na etap promocji w wielostopniowej karcinogenezie. **Pro-geny (pro-1 i pro-2)** wyizolowano wykorzystując istnienie modelowego układu wrażliwych i opornych na indukowaną przez estry forbolu transformację nowotworową klonów mysich komórek epidermalnych JB6. Wykazano, że wprowadzenie aktywnego **pro-genu** do komórek niewrażliwego na promocję klonu warunkuje nabycie wrażliwego fenotypu. Aktywne homologi mysich **pro-genów** wykryto i następnie sklonowano w komórkach ludzkich izolowanych od pacjentów z rakiem nosogardzieli. Klony z komórek ludzkich, podobnie jak mysie **pro-geny**, przenosiły cechę wrażliwości po transfekcji do niewrażliwych komórek. Zbadanie struktury molekularnej ludzkich homologów pozwala wnioskować o mechanizmie ich aktywacji. Stwierdzono, że w wyniku transfekcji **pro-1** do komórek pobranych od osobników genetycznie predysponowanych na raka uzyskuje się znaczne przedłużenie czasu przeżycia w hodowli *in vitro*. Wynik ten może być interpretowany jako skutek kooperacji pomiędzy wprowadzonym aktywnym **pro-geniem** i genem lub genami warunkującymi predyspozycję nowotworową, a prowadzącym w kierunku rozwoju nowotworu.

Słowa kluczowe: karcinogeneza, promocja, **pro-geny**.

Summary. The article addresses a novel class of genes, called **pro-genes**, that control promotion phase in multistep carcinogenesis. **Pro-genes** have been cloned using a model system of JB6 family of clonal mouse epidermal cell lines with variants that are sensitive or resistant to tumor promoter induced neoplastic transformation. It has been shown that transfection of activated **pro-genes** confers on insensitive cells susceptibility to induction of anchorage-independent growth by tumor-promoting phorbol esters. Subsequently, an active homologs of mouse **pro-genes** have been found and cloned from human nasopharyngeal carcinoma cells. Most of human homologs of mouse **pro-gene** has been able to transfer sensitivity to tumor promoters upon transfection into insensitive cells. Comparison of molecular structure of an active and an inactive human clones has allowed determination of their possible mode of activation. It has been shown that transfection with an activated mouse **pro-gene** specifically conferred partial immortality on the fibroblasts of basal cell nevus syndrome, a cancer-prone condition in men. This result may be interpreted as a gene cooperation phenomenon that can contribute to progression toward neoplasia.

Key words: carcinogenesis, promotion, **pro-genes**.

Każdy z obecnych modeli karcinogenezy powinien uwzględniać wielostopniowość tego procesu. Wyniki badań przeprowadzonych na modelach *in vivo* [13] i *in vitro* [1] oraz dane epidemiologiczne [16], dokumentują konieczność zaistnienia przynajmniej dwóch dziedzicznych zmian w komórce prawidłowej, aby stała się potencjalnie nowotworogenna. Jej dalsza progresja w kierunku pełnej złośliwości uwarunkowana jest dodatkowymi zmianami, takimi jak aktywacja onkogenu i inaktywacja genu supresorowego (antyonkogenu).

W procesie rozwoju nowotworu przyjęto wyróżniać trzy fazy: inicjację, promocję i progresję [22]. W klasycznym "dwufazowym" modelu karcinogenezy indukowanej w skórze myszy [4] jednorazowe podanie niewielkiej dawki karcinogenu, takiego jak benzopiren, z następującym po tym wielokrotnym podawaniem drugiego czynnika powoduje rozwój licznych guzów nowotworowych, których indukcja nie byłaby możliwa przez każdy z tych czynników osobno. Ten drugi czynnik przyjęto nazywać promotorem, a faza w rozwoju nowotworu warunkowana jego działaniem określana jest jako promocja. Inicjacja definiowana jest jako nieodwracalna zmiana w genomie komórki, natomiast promocja widziana jest jako rozrost klonalny zainicjowanych komórek, który zwiększa prawdopodobieństwo przemiany jednej z nich w kierunku pełnej złośliwości.

Zidentyfikowano już wiele związków chemicznych mających aktywność promującą nowotwory. Wśród nich, jedne z najskuteczniejszych w działaniu są estry forbolu będące aktywnymi składnikami oleju krotonowego, który początkowo stosowano jako rozpuszczalnik węglowodorów testowanych na skórze myszy jako potencjalne karcinogeny [3]. Bardzo silnym i najczęściej stosowanym w badaniach nad promocją estrem forbolu jest TPA (12-O-tetra-decanoilo-13-acetyloforbol). Czynniki spełniającymi kryteria promotorów nowotworów człowieka są azbest i dym papierosowy w raku płuc czy też promieniowanie jonizujące w rakach skóry.

Proces promocji nowotworów bez wątplenia determinowany jest zarówno czynnikami epigenetycznymi, jak i genetycznymi. O udziale tych ostatnich świadczą badania przeprowadzone na modelach zwierzęcych, w których poprzez krzyżowanie odpowiednio dobranych rodziców uzyskiwano osobniki nadwrażliwe lub też niewrażliwe na działanie promotorów [5,6,11,23]. U nadwrażliwych zwierząt odpowiedź na czynniki inicjujące była niezmieniona, co wskazuje, że inicjacja i promocja są pod kontrolą odrębnych genów. Analizując liczbę guzów indukowanych według schematu inicjator → promotor u wrażliwych i niewrażliwych rodziców, w pokoleniu F₁ oraz u mieszańców z krzyżówek wsobnych i wstecznych, stwierdzono, że wrażliwość na promotory dziedziczy się jak autosomalna, współdominująca cecha. Obserwacja, że przedwczesne zakończenie fazy promocyjnej nie prowadzi do powrotu do stanu inicjacji, a raczej do różnych stadiów postinicjacyjnych, wskazuje, że pod wpływem promotora zaszły zmiany nieodwracalne, które są najprawdopodobniej determinowane genetycznie [26]. Wszystkie te obserwacje stanowią podstawę do wnioskowania o istnieniu specyficznych genów determinujących wrażliwość na fazę promocyjną w wielostopniowym procesie karcinogenezy. Uzyskanie wielu linii komórkowych różniących się parametrami odpowiedzi na promotory nowotworów stworzyło dogodne warunki do badania tych zjawisk na poziomie molekularnym. Jednym z takich układów modelowych jest rodzina linii mysich komórek naskórka JB6 wyprowadzonych z pierwotnej hodowli w wyniku kolejnych klonowań [7]. Poszczególne klony JB6 różnią się wrażliwością na transformację nowotworową indukowaną estrami forbolu, a także innymi promotorami. Komórki wrażliwych klonów tworzą kolonie w półpłynnym agarze w obecności

TPA, podczas gdy niewrażliwe klony nie są zdolne do wzrostu w tych warunkach. Fenotyp komórek linii wrażliwych umownie oznacza się symbolem P^+ (*promotable*) w odróżnieniu od wariantów niewrażliwych, które są P^- (*nonpromotable*). Trzeci rodzaj fenotypu, jaki udało się wyróżnić wśród wariantów linii JB6, przyjęto nazywać Tx (*tumorigenic*); komórki klonów o tym fenotypie, w odróżnieniu od komórek P^+ , tworzą kolonie w półpłynnym agarze bez obecności TPA w środowisku. Kolonie komórek przeszczepione z agaru myszom allogenicznym lub nagim tworzą guzy, przeto uznawane są za nowotworowe. Wielką zaletą modelu JB6 jest duża stabilność fenotypów P^+ , P^- i Tx oraz homogenność populacji w obrębie każdej z linii składających się na ten układ.

W doświadczeniach, w których analizowano fenotyp hybryd uzyskanych w wyniku fuzji komórek P^+ i P^- , wykazano, że fenotyp P^+ zachowuje się w sposób dominujący, tj. wszystkie powstałe hybrydy były fenotypowo P^+ . Dominujący charakter fenotypu P^+ potwierdzono doświadczeniami, w których po transfekcji komórek JB6 P^- DNA izolowanym z komórek P^+ uzyskiwano transfektanty o fenotypie P^+ [8]. Obserwacja ta otworzyła drogę do prób izolowania fragmentów DNA z komórek P^+ , które są nośnikami cechy wrażliwości na transformację nowotworową indukowaną przez TPA.

Strategia, użyta do molekularnego klonowania genów determinujących cechę P^+ [21], polegała na konstrukcji biblioteki plazmidowej z DNA komórek P^+ , następnie podziale uzyskanych transformantów na grupy (*sib selection*) i testowaniu plazmidowego DNA izolowanego z komórek każdej grupy w kierunku zdolności do przenoszenia cechy P^+ (aktywność P^+) w teście transfekcji DNA do komórek JB6 P^- . Grupa transfektantów wykazująca największą aktywność była następnie dzielona na mniejsze i cały cykl testowania powtarzany. Po 6 cyklach takiej selekcji w uzyskanej grupie zawierającej 7 plazmidów, dwa były zdolne przenosić cechę P^+ po transfekcji ich DNA do komórek P^- . Fragmenty DNA z komórek P^+ wbudowane w te plazmidy nazwano **pro** genami (**pro-1** i **pro-2**) przez analogię do nazwy onkogen [21]. Sekwencje **pro-1** i **pro-2** nie wykazują żadnej homologii, chociaż oba klony przenoszą wrażliwość na promocję nowotworową do niewrażliwych komórek JB6 P^- z podobną aktywnością właściwą [21]. Oba **pro** geny różnią się od wszystkich poznanych onkogenów, jak również tych genów, których sekwencje zdeponowano w Los Alamos Data Bank. Tak więc, stanowią one zupełnie nową klasę genów nie mającą żadnych odpowiedników wśród znanych wirusowych i komórkowych genów transformujących kręgowców. Wielkość **pro-1** wynosi 1048, a **pro-2** 3800 par zasad. **Pro-1** zawiera w swym składzie dwa typy powtarzalnych sekwencji: Bam 5 i B1 Alu. Ich obecność utrudnia wykrywanie tego genu w komórkach mysich metodą hybrydyzacji. W obu **pro** genach stwierdzono obecność otwartych ramek odczytu (*open reading frame*), co wskazuje na istnienie białkowych produktów **pro-1** i **pro-2**, chociaż jak do tej pory nie udało się ich zidentyfikować.

Izolacja fragmentów DNA, które przypuszczalnie są nośnikami określonej cechy, w tym przypadku wrażliwości na przemianę nowotworową indukowaną przez TPA, to dopiero początek drogi, jaką trzeba przebyć, aby udowodnić, iż sklonowany gen warunkuje wystąpienie tej cechy. Wykazanie istnienia ścisłej korelacji pomiędzy stabilną integracją wprowadzonych do komórek JB6 P^- aktywnych **pro** genów i ekspresją fenotypu P^+ wymagało długotrwałych badań całego zespołu [9].

Komórki JB6 P^- (transfektanty **pro-1/pro-2**) po transfekcji plazmidami zawierającymi kompletne geny **pro-1** i **pro-2** wysiewano do półpłynnego agaru i hodowano w obecności lub braku TPA przez 11–13 dni [9]. Następnie izolowano kolonie komórek z agaru i przenoszono je do hodowli w płynnej pożywce uzyskując w ten sposób wiele klonalnych linii

transfektantów **pro-1** i **pro-2**. Fenotyp (P^- , P^+ , Tx) poszczególnych klonów był sprawdzany kilkakrotnie w trakcie 20–25 pasażi. Komórki wybranych klonów były również testowane na myszach nagich w celu oceny ich tumorigenności. Na 8 linii ustalonych z transfektantów **pro-1** 50% miało stabilny fenotyp P^+ lub Tx, a wśród 20 linii transfektantów **pro-2** klony o fenotypie P^+ lub Tx stanowiły 35%. W obu przypadkach liczby te były wielokrotnie wyższe od tych uzyskanych dla odpowiednich kontroli. Nabycie cechy P^+ lub Tx we wszystkich klonach było nieodwracalne. Zgodnie z oczekiwaniami, wszystkie klony zdolne do wzrostu w agarze bez obecności TPA, a więc o fenotypie Tx, były też tumorigenne. Badanie wrażliwości na TPA, mierzonej liczbą wytworzonych kolonii w agarze w obecności wzrastających stężeń TPA, wykazało obniżenie wartości tego parametru dla transfektantów **pro-2** w porównaniu do testowanych równolegle komórek linii rodzicielskiej JB6 P^+ . Czy i na ile zaobserwowane różnice we wrażliwości na TPA mogą stanowić marker pozwalający na rozróżnienie fenotypów determinowanych przez **pro-1** i **pro-2**, wyjaśnia przyszłe badania z użyciem innych niż TPA promotorów oraz przeprowadzone na większej liczbie klonów.

Jeśli hipoteza, że trwała integracja i ekspresja aktywnego **pro** genu determinuje nabycie fenotypu P^+ lub Tx, jest słuszna, to wszystkie klony transfektantów P^+ i Tx powinny zawierać wprowadzony gen. Obecność wprowadzonego genu wykrywano metodą hybrydyzacji DNA stosując jako sondę molekularną wyznakowany izotopem fragment DNA plazmidowego, stanowiący wektor dla **pro-1** i **pro-2**. Tak przeprowadzoną analizą potwierdzono słuszność założonej hipotezy, tj. wszystkie klony P^+ i Tx wykazywały obecność wektorowego DNA, co pozwala sądzić, że zawierają również wprowadzone przez ten wektor geny **pro-1** i **pro-2** [9].

Wyniki tego cyklu badań dokumentują udział **pro** genów w zdarzeniach indukowanych przez TPA, a prowadzących do przemiany nowotworowej komórki. W przypadku komórek JB6 P^- , które już są w stadium przednowotworowym, ich przemiana w komórki nowotworowe wymaga jedynie pozyskania aktywnego **pro** genu i obecności promotora [9].

Linie komórkowe JB6 stanowią dobry model in vitro do badania zjawisk fazy promocyjnej w przebiegu "dwufazowej" karcinogenezy indukowanej w skórze myszy. Brak podobnych układów dla komórek ludzkich znacznie ogranicza możliwość badania genów kontrolujących kolejne fazy w rozwoju nowotworów człowieka. W poszukiwaniu odpowiedniego modelu komórek człowieka założono istnienie odpowiedników **pro** genów w komórkach ludzkich. Przyjęto też, że ich aktywne formy mogą być wykrywalne w układzie JB6. Zgodnie z tym założeniem, izolowano DNA z komórek różnych nowotworów człowieka oraz odpowiadających im tkanek i badano ich aktywność P^+ w teście transfekcji do komórek JB6 P^- [20]. Badane próbki obejmowały DNA z komórek limfocytarnych, łożyska, wątroby i skóry oraz z komórek nowotworowych raka szyjki macicy, wątroby, płuc i nosogardzieli (NPC – *nasopharyngeal carcinoma*). W tym ostatnim przypadku źródłem DNA do transfekcji były komórki dwóch linii CNE1 i CNE2 ustalonych w Hunan Medical College (Chiny) z komórek rakowych pobranych od dwóch pacjentów z NPC [27]. Z całego zestawu tylko DNA z komórek NPC miało aktywność P^+ . Wynik ten jest szczególnie interesujący, ponieważ NPC jest jednym z niewielu ludzkich nowotworów, w którego powstawaniu daje się wyróżnić podobne fazy do tych obserwowanych na modelach zwierzęcych. Przyпуска się, że latentna infekcja wirusem Epsteina-Barr (EBV), którego DNA wykrywa się w 100% niezróżnicowanych i słabo zróżnicowanych NPC [17], jest tutaj czynnikiem inicjującym, natomiast faza promocyjna to efekt działania zespołu czynników środowiskowych. Oprócz ścisłego związku pomiędzy NPC a obecnością genomu EBV, inną cechą charakterystyczną tego nowotworu jest jego niezwykle częste występowanie w populacjach osób

zamieszkujących południowe regiony Chin [10]. Ma to zapewne związek ze sposobem odżywiania, stosowania pewnych ziół leczniczych, jak również ze składnikami gleby w tych regionach. Istotnie, po przebadaniu wielu składników żywności oraz substancji chemicznych występujących w regionach o podwyższonej zapadalności na NPC stwierdzono, że niektóre z nich mają aktywność promotorów [14]. Obserwacja, że częstość występowania NPC wśród chińskich emigrantów w różnych krajach jest znacznie wyższa od odpowiednich średnich dla danego kraju [24], pozwala sądzić, iż różnice te mogą być wynikiem pewnych predyspozycji genetycznych. Ponieważ DNA z komórek linii ustalonych z NPC przenosił cechę P^+ w układzie komórek JB6, przeto został wybrany do molekularnego klonowania ludzkich odpowiedników mysich **pro** genów [20]. Strategia klonowania polegała na konstrukcji biblioteki fagowej z DNA komórek linii CNE2, którą następnie przeszukiwano wyznakowanymi **pro-1** i **pro-2** [20]. Uzyskano 20 klonów hybrydujących z **pro-1** i tylko 3 klony dające hybrydyzację z **pro-2**. Do dalszej analizy wybrano losowo 11 klonów z grupy homologów **pro-1** i wszystkie uzyskane klony **pro-2**. Charakteryzowanie uzyskanych klonów rozpoczęto od sprawdzenia, czy mają one aktywność P^+ , podobnie jak DNA, z którego pochodzą [12,20]. Wszystkie homologi **pro-2** okazały się nieaktywne [20], całą uwagę skupiono więc na homologach **pro-1**, których aktywność P^+ zbliżona była do aktywności testowanego równolegle mysiego **pro-1**, chociaż jeden z testowanych klonów tej grupy okazał się nieaktywny [12]. Mapowanie enzymami restrykcyjnymi i analiza Southerna ujawniła istnienie 3 strukturalnie odrębnych klas klonów-homologów **pro-1**. Klony stanowiące każdą z tych klas były nierozróżnialne przy użyciu obu tych metod. Fakt występowania genu **pro-1** w składzie trzech różnych fragmentów DNA wskazuje na trzy różne lokalizacje homologów **pro-1** w genomie komórek CNE2. We wszystkich klasach zlokalizowano mniejsze fragmenty restrykcyjne, w których obrębie mieściła się cała homologia z mysim **pro-1**. Fragmenty te, wyizolowane i testowane w układzie komórek JB6, przenosiły cechę P^+ , podczas gdy odcinki nie hybrydujące z mysim **pro-1** były nieaktywne. Tak więc aktywność P^+ i homologia z mysim **pro-1** współwystępują razem we wszystkich klonach CNE2. Pozwala to wnioskować o ścisłym związku pomiędzy strukturą mysiego i ludzkiego **pro** genu a ich aktywnością biologiczną w układzie komórek JB6.

W grupie 11 przebadanych klonów CNE2 jeden był nieaktywny, co stworzyło możliwość wykrycia ewentualnych zmian strukturalnych odpowiedzialnych za aktywację genu [12]. Badania porównawcze nieaktywnego i aktywnych klonów przy użyciu takich metod, jak: mapowanie enzymami restrykcyjnymi, technika Southerna oraz analiza w mikroskopie elektronowym hybryd utworzonych z komplementarnych nici DNA aktywnego i nieaktywnego klonu, wykluczyły obecność większych przegrupowań czy też delecji obejmujących odcinek dłuższy niż 50 par zasad (czułość takiej analizy wynosi 30–50 nukleotydów). Wskazuje to raczej na mechanizm aktywacji polegający na zmianach w niewielkiej liczbie nukleotydów, taki jak mutacja punktowa lub też delecja kilku-kilkunastu par zasad. Już po opublikowaniu tych wyników [12] zidentyfikowano fragment o długości 1000 par zasad z zachowaną aktywnością biologiczną, w którym mieściła się cała homologia z mysim **pro-1**. Analogiczne fragmenty aktywnych (4 klony) i nieaktywnego klonu poddano sekwencjonowaniu i wykryto niezgodność w przypadku 5 par zasad (dane w opracowywaniu). Weryfikacja istotności znalezionych różnic dla aktywacji czy też inaktywacji ludzkiego homologu **pro-1** będzie wymagała trudnych technicznie badań obejmujących m.in.: testowanie aktywności biologicznej P^+ po zamianie odpowiednich par zasad w miejscach niezgodności, klonowanie nieaktywnych homologów **pro-1** z DNA prawidłowych komórek

nabłonka nosogardzieli i poznanie ich sekwencji oraz identyfikacji ewentualnego produktu genu **pro-1**. Tak jak w przypadku mysich **pro** genów należy zbadać, czy trwała integracja ludzkiego homologu po transfekcji do komórek JB6 P⁻ współwystępuje z fenotypem P⁺. Niezbędne jest również zbadanie większej liczby próbek DNA od pacjentów z NPC, a także z innymi postaciami nowotworów w celu sprawdzenia, czy aktywność P⁺ jest swoistym markerem raka nosogardzieli. Wyjaśnienie, dlaczego wszystkie ludzkie homologu **pro-2** były nieaktywne, powinno dostarczyć istotnych informacji co do mechanizmu działania **pro** genów, jak i sposobu ich aktywacji.

Inny przykład poszukiwań źródeł komórek w stadium przednowotworowym mogących stanowić dogodny ludzki model *in vitro* do badania fazy promocji i progresji nowotworu na poziomie molekularnym stanowią próby wprowadzania genów transformujących do komórek od osobników z uwarunkowanymi genetycznie zaburzeniami często przechodzącymi w zmiany nowotworowe. Czynniki genetyczne warunkujące te zaburzenia mogą w wyniku kooperacji z wprowadzonymi genami transformującymi uruchamiać łańcuch zdarzeń prowadzących w kierunku progresji nowotworu. Czy jest tak w istocie, było przedmiotem naszych badań z użyciem fibroblastów skórnych od pacjentów z zespołem znamion podstawnocomórkowych (BCNS – *Basal Cell Nevus Syndrom*) [25]. BCNS jest chorobą najprawdopodobniej warunkowaną przez jeden dominujący gen autosomalny i osobniki z tym zespołem często zapadają na różne nowotwory, takie jak: nabłoniak podstawnocomórkowy, włókniakomięsak szczęk, ameloblastoma jamy ustnej i medulloblastoma mózgu [15, 18]. Do badań wybrano dwa geny, o których wiadomo, że odgrywają rolę w przednowotworowych stadiach: *v-myc*, który po wprowadzeniu do pierwotnych fibroblastów szczurzych powoduje ich nieśmiertelnienie, tj. zdolność do nieograniczonej proliferacji *in vitro* [19] oraz **pro-1**, którego udział w promocyjnej fazie transformacji neoplastycznej komórek JB6 został udokumentowany badaniami autora. Fibroblasty skórne BCNS i komórki od zdrowych dawców odpowiednio dobranych pod względem rasy, płci i wieku były transfekowane mysim **pro-1** lub kurzym *v-myc* w odpowiednio dobranych wektorach plazmidowych. Ponieważ nabycie zdolności do nieograniczonej proliferacji jest uważane za konieczny etap prowadzący do pełnej transformacji komórki prawidłowej w nowotworową [2], u uzyskanych w ten sposób transfektantów oceniano głównie tę cechę, mogącą stanowić wskaźnik progresywnych zmian nowotworogennych zainicjowanych wprowadzonym genem. Miarą nieśmiertelnienia była maksymalna liczba podwojeń populacji w określonych warunkach hodowli *in vitro*. Stwierdzono, że wprowadzenie obu genów do komórek BCNS manifestowało się przedłużeniem aktywności proliferacyjnej o ok. 20 podwojeń populacji. Efekt ten obserwowano wyłącznie w przypadku transfektantów BCNS. Ich odpowiedniki od zdrowych dawców zachowywały się jak stosowne kontrole. Morfologia oraz inne parametry wzrostu komórek *in vitro*, takie jak zdolność do tworzenia kolonii w agarze czy wzrostu w pożywce o małym stężeniu surowicy, uważane za markery transformacji, były niezmienione. U transfektantów stwierdzono obecność wprowadzonego DNA, przy czym populacje transfektantów BCNS były bogatsze w **pro-1** pozytywne komórki. Obserwacja ta pozwala sądzić, że nabycie aktywnego **pro-1** przez komórkę BCNS warunkuje jej przewagę rozrостową i w efekcie pozytywną selekcję w populacji.

Unieśmiertelnienie może być interpretowane jako zaburzenie prawidłowego oprogramowania komórki określającego maksymalną liczbę jej podziałów. Przedstawione wyżej badania dowodzą, że jest to wynik kooperacji pomiędzy wprowadzonymi **pro-1** lub *v-myc* a specyficznym dla komórek BCNS genem. Fakt, że po transfekcji komórek BCNS

uzyskano tylko częściowe przedłużenie wieku hodowli in vitro, pozwala przypuszczać, że proces ten wymaga udziału jeszcze innych genów.

Omówione prace z udziałem autora są przykładem wykorzystania modeli komórkowych in vitro do badania na poziomie molekularnym genów warunkujących przebieg fazy promocji w wielostopniowym procesie karcinogenezy. Każdy model komórkowy in vitro jest dużym uproszczeniem dla analogicznych zjawisk zachodzących w całym organizmie, stąd konieczność weryfikacji wyników badań in vitro na odpowiednim modelu in vivo. Dotyczy to również mysich **pro** genów i ich ludzkich homologów. W przypadku genów mysich można tego dokonać tworząc tzw. myszy transgeniczne, tj. osobniki uzyskane po implantacji zarodków, do których wprowadzono określony gen. Ze zrozumiałych względów tego typu weryfikacja jest niemożliwa dla genów izolowanych z komórek ludzkich. Nie umniejsza to jednak znaczenia tych badań, a ich wyniki mogą posłużyć do opracowania skutecznych metod w profilaktyce nowotworów człowieka. Jeśli okaże się, że obecność aktywnego **pro** genu w komórkach jest swoistym markerem NPC, to jego wykrywanie może być wykorzystane do wczesnej diagnostyki zwiększającej szanse na skuteczną terapię, a znajomość czynników aktywujących **pro** geny może posłużyć do selektywnej eliminacji tych czynników ze środowiska.

PIŚMIENICTWO

- [1] BARRET JC, FLETCHER WF. Cellular and molecular mechanisms of multistep carcinogenesis in cell culture models. [w] Barret JC [red] Mechanisms of Environmental Carcinogenesis. Vol.2, CRC Press, Boca Raton, 1987: rozdz.12.
- [2] BARRET J.C. A multistep model for neoplastic development: role of genetic and epigenetic changes. [w] Barret JC [red] Mechanisms of Environmental Carcinogenesis. Vol.2, CRC Press, Boca Raton, 1987: rozdz.13.
- [3] BERENBLUM I. Co-carcinogenic action of croton resin. *Cancer Res* 1941; 1: 44.
- [4] BERENBLUM I. Sequential aspects of chemical carcinogenesis. [w] Becker FF [red], Skin Cancer. A Comprehensive Treatise. Vol.1, Plenum Press, New York, 1975: 323.
- [5] BOUTWELL RK. Some biological aspects of skin carcinogenesis. *Prog Exptl Tumor Res* 1980; 4: 207-250.
- [6] BURNS FJ, VANDERLAAN M, SNYDER E, ALBERT RE. Mechanisms of tumor promotion and cocarcinogenesis. [w] SłagaTJ, Sivak A, Boutwell RK [red], Carcinogenesis, Vol.2, Raven Press, New York, 1987: 91-967.
- [7] COLBURN NH. The use of tumor promoter responsive epidermal cell lines to study preneoplastic progression. [w] Franks LM, Wigley CB [red] Neoplastic Transformation in Differentiated Epithelial Cell Systems in vitro. Academic Press, New York, 1979: 113-134.
- [8] COLBURN NH, TALMADGE CB, GINDHART TD. Transfer of sensitivity to tumor promoters by transfection of DNA from sensitive into insensitive mouse JB6 epidermal cells. *Mol Cell Biol* 1983; 3: 1182-1186.
- [9] COLBURN NH, SMITH BM, WENDEL EJ, DOWJAT WK, SHIMADA T. Transfer by **pro**-gene transfection of tumor promoter-sensitive phenotype to promotion-insensitive JB6 cells. *Cancer Res* 1988; 48: 1195-1200.
- [10] de THE G. Epidemiology of Epstein-Barr virus and associated diseases in man.[w] Roizman B. [red] The Herpesviruses. Plenum Press, New York, 1982: 25-103.
- [11] Di GIOVANNI J, PRICHETT WP, DECINA PC, DIAMOND L. DBA/2 mice are as sensitive as SENCAR mice to skin tumor promotion by TPA. *Carcinogenesis* (Lond.) 1984; 5: 1493-1498.
- [12] DOWJAT WK, CAO YA, NAGASHIMA K., SAKAI A, COLBURN NH. Comparison of P⁺- active and -inactive **pro**-1 homologues from human nasopharyngeal carcinoma cells. *Mol Carcinogenesis* 1988; 1: 33-40.
- [13] FARBER E, ROTSTEIN JB, ERICKSSON LC. Cancer development as a multistep process: experimental studies in animals.[w] Barret JC [red] Mechanisms of Environmental Carcinogenesis. Vol.2, CRC Press, Boca Raton, 1988: rozdz. 9.
- [14] HIRAYAMA T. ITO J. A new view of the etiology of nasopharyngeal carcinoma. *Prev Med* 1981; 10: 614-622.

- [15] HOWELL JB, ANDERSSON DE. The nevoid basal cell carcinoma syndrome. [w] Andrade A, Gunport SL, Popkin GL, Rees TD [red] *Cancer of Skin*. Saunders Co., Philadelphia, 1976: 883–898.
- [16] KALDOR JM, DAY NE. Interpretation of epidemiological studies in the context of the multistage model of carcinogenesis. [w] Barret JC [red] *Mechanism of Environmental Carcinogenesis*. Vol. 2, CRC Press, Boca Raton, 1987: rozdz.10.
- [17] KLEIN G. The relationship of the virus to nasopharyngeal carcinoma. [w] Epstein MA, Achong BG [red] *The Epstein-Barr Virus*. Springer Verlag, Berlin, 1979: 339–346.
- [18] KRAEMER KH. Heritable disease with increased sensitivity to cellular injury. [w] Fitzpatrick TB, Eiven AZ, Austen F, Freedberg IM, Wolff K [red] *Update of Dermatology in General Medicine*. Vol.1, New York, MacGrow-Hill, 1983: 113–142.
- [19] LAND H, PARADA LF, WEINBERG RA. Tumorigenic conversion of primary embryo fibroblasts requires at least two cooperating oncogenes. *Nature (Lond.)* 1983; **304**: 596–602.
- [20] LERMAN MI, SAKAI A, KAI-TAI Y, COLBURN NH. DNA sequences in human nasopharyngeal carcinoma cells that specify susceptibility to tumor promoter-induced neoplastic transformation. *Carcinogenesis* 1987; **8**: 121–127.
- [21] LERMAN MI, HEGAMYER GH, COLBURN NH. Cloning and characterization of putative genes that specify sensitivity to neoplastic transformation by tumor promoters. *Int J Cancer* 1986; **37**: 293–302.
- [22] PITOT HC, GOLDSWORTHY T, MORAN S. The natural history of carcinogenesis. Implication of experimental carcinogenesis in the genesis of human cancer. *J Supramol Struct Cell Biochem* 1981; **17**: 133–152.
- [23] REINERS J, DAVIDSON K, NELSON K, MAMRACK M, SLAGA T. Skin tumor promotion; a comparative study of several stocks and strains of mice. [w] Langenbach R, Nesnow S, Rice JM [red] *Organs and Species Specificity in Chemical Carcinogenesis*. Vol. 24 New York, Plenum Press 1983: 173–186.
- [24] SHANMUGARATNAM K. Nasopharynx. [w] Schottenfeld D, Fraumeni JF [red] *Cancer Epidemiology and Prevention*, Philadelphia, Saunders Co., 1983: 536–553.
- [25] SHIMADA T., DOWJAT WK, GINDHARDT TD, LERMAN MI, COLBURN NH. Life span extension of Basal Cell Nevus Syndrome fibroblasts by transfection with mouse *pro-* or *v-myc* genes. *Int J Cancer* 1987; **39**: 649–655.
- [26] STRIKLAND JE, STRIKLAND AB. Host cell reactivation studies with epidermal cells of mice sensitive and resistant to carcinogenesis. *Cancer Res* 1984; **44**: 893–895.
- [27] YANG GS, PING TW, YI Z, LUN ZM, PING ZEW, HUA DW, KUN L. An epithelial cell line established from poorly differentiated nasopharyngeal carcinoma. *Cancer* 1983; **2**: 70–72.

Otrzymano: 19.04.19921 r.

Przyjęto: 15.05.1992 r.

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

MOLEKULARNE PODSTAWY MUKOWISCYDOZY*

MOLECULAR BASIS OF GENETICS, PATHOMECHANISM AND DIAGNOSTICS OF CYSTIC FIBROSIS

Anna SKIBIŃSKA i Michał WITT**

Zakład Genetyki Człowieka Polskiej Akademii Nauk, Poznań

Streszczenie. Mukowiscydoza to najczęstsza choroba autosomalna recesywna rasy białej. Gen, którego mutacje powodują powstawanie choroby, zlokalizowany jest na chromosomie 7. Mutacja powodująca ok. 70% przypadków mukowiscydozy na świecie nazwana została deltaF508. Produkt białkowy tego genu najprawdopodobniej jest kanałem chlorkowym zależnym od cAMP. U podstaw patogenezy choroby leży zaburzenie transportu jonów przez błonę komórek nabłonka wydzielniczego. W artykule przedstawiono również podstawy diagnostyki molekularnej tej choroby.

Słowa kluczowe: mukowiscydoza, polimorfizm długości fragmentów restrykcyjnych DNA, technika PCR (metoda enzymatycznego amplifikowania fragmentów DNA).

Summary. Cystic fibrosis is the most frequent autosomal recessive disorder. The gene causing the disease is localized on chromosome 7. Mutation resulting in approximately 70% of cases of cystic fibrosis in a world population is called deltaF508. The protein product of this gene is probably a cAMP-dependent chloride channel. A disturbance of ion transport through membrane of epithelial cell is involved in a pathomechanism of cystic fibrosis. In this article a principle of molecular diagnostics of cystic fibrosis is also presented.

Key words: cystic fibrosis, restriction fragment length polymorphism, polymerase chain reaction.

WSTĘP

Mukowiscydoza, inaczej zwłóknienie torbielowate (w skrócie CF, od ang. *cystic fibrosis*), jest najczęściej występującą chorobą genetyczną dziedziczącą się autosomalnie recesywnie. Charakteryzuje się zaburzeniami czynności gruczołów zewnątrzwydzielniczych manifestujących się w postaci trzech zespołów klinicznych:

*Artykuł ten został napisany w ramach realizacji tematu częściowo finansowanego przez Komitet Badań Naukowych (projekt badawczy 4 0519 91 01) oraz przez New England Biolabs Foundation.

**Autor, do którego należy kierować korespondencję.

- (1) przewlekłych, rozsianych zapaleń płuc,
- (2) niewydolności zewnątrzwydzielniczej trzustki oraz
- (3) zwiększeniem stężenia chloru i sodu w pocie.

Częstość występowania choroby wśród rasy białej oceniana jest na 1:600–1:3600 żywo urodzonych noworodków. Znacznie rzadziej obserwowano mukowiscydozę wśród innych ras. W Polsce częstość występowania mukowiscydozy wynosi ok. 1:2000 żywo urodzonych noworodków [5]. Wynika stąd, że nosicielem nieprawidłowego genu CF jest co 25 człowiek.

Z historii badań nad etiopatogenezą i kliniką mukowiscydozy ważne są szczególnie trzy daty.

- W roku 1938 opisano charakterystyczne zmiany w trzustce i nadano chorobie nazwę *fibrocystic disease of the pancreas*.

- W roku 1945 poznano skład śluzu drzewa oskrzelowego, proponując nazwę dla obserwowanej choroby *mucoviscidosis*.

- W roku 1953 wykryto podwyższone stężenie soli w pocie [12].

Jednak na zlokalizowanie i sklonowanie genu odpowiedzialnego za mukowiscydozę świat musiał poczekać do lat osiemdziesiątych.

Patologia mukowiscydozy polega na wytwarzaniu gęstego, lepkiego śluzu powodującego zaburzenia w narządach mających gruczoły śluzowe z powodu trudności w jego wydzielaniu. Wyróżnia się kilka postaci mukowiscydozy. Do najczęstszych należą: postać z przewagą zmian w układzie oddechowym, tzw. postać płucna, postać z przewagą zmian w układzie pokarmowym, tzw. brzuszna oraz najczęstsza postać mieszana łącząca obydwie te komponenty. Zaburzenia układu oddechowego występują u ponad 90% chorych. Gęsty, lepki śluz zatyka oskrzela i jest podłożem dla rozwoju bakterii: najczęściej gronkowców złocistych (*Staphylococcus aureus*) i pałeczek ropy błękitnej (*Pseudomonas aeruginosa*). U niemowlęcia pierwszym objawem jest suchy, uporczywy kaszel. Nawracające zapalenia oskrzeli i płuc, trudno poddające się leczeniu, prowadzą do rozstrzeni oskrzeli i włóknienia płuc, powodujących narastające ograniczenie pojemności życiowej oraz całkowitej pojemności płuc ze zwiększeniem się objętości zalegającej. Do rzadszych zmian chorobowych w układzie oddechowym należą polipy nosa oraz stany zapalne zatok przynosowych, występujące zwłaszcza u dzieci starszych. Zaburzenia przewodu pokarmowego są nieco rzadsze, gdyż występują u ok. 75% chorych. Gęsty, lepki śluz zatyka przewody wyprowadzające trzustki, wskutek czego produkowane tam enzymy trawienne nie mogą dotrzeć do dwunastnicy. U 10–15% chorych w okresie noworodkowym obserwuje się niedrożność smótkową (*meconium ileus*). Zaburzenie charakteryzuje się zahamowaniem oddania smółki, wymiotami, objawami niedrożności i prowadzi często do zapalenia otrzewnej. Poza okresem noworodkowym postać brzuszna mukowiscydozy charakteryzuje się przewlekłymi biegunkami, obfitymi, cuchnącymi, tłuszczowatymi stolcami. Mimo dobrego łaknienia dochodzi do objawów niedożywienia: niedoboru masy ciała i wzrostu oraz niedokrwistości z niedoboru żelaza i niedoboru witamin (A, E, K). U około 20% chorych może dojść do wypadania odbytu. Innymi objawami mukowiscydozy są: opóźnienie rozwoju fizycznego dziecka, upośledzenie rozwoju mięśni oraz aspermia, spowodowana zacopowaniem kanalików nasiennych przez gęsty śluz, co w konsekwencji prowadzi do niepłodności męskiej [2].

Leczenie mukowiscydozy polega przede wszystkim na łagodzeniu objawów choroby. Leczenie objawowe zaburzeń układu oddechowego polega na usuwaniu wydzieliny poprzez stosowanie leków mukolitycznych, drenażu oskrzeli oraz podawaniu antybiotyków. Z kolei

leczenie choroby układu pokarmowego polega na uzupełnianiu niedoborów enzymów trawiennych poprzez podawanie wyciągów z trzustki oraz stosowaniu diety wysokokalorycznej z ograniczoną ilością tłuszczów zwierzęcych. W niektórych ośrodkach klinicznych wprowadzane są ostatnio nowe, eksperymentalne podejścia terapeutyczne, mające charakter leczenia przyczynowego [19]. Przy stałym, systematycznym leczeniu duża liczba chorych osiąga wiek dojrzały, jednak mimo znacznego postępu w efektywności stosowanej terapii mukowiscydoza jest ciągle chorobą o złym rokowaniu, ze średnią długością życia wynoszącą obecnie ok. 28 lat [2].

ODKRYCIE GENU CFTR

W latach osiemdziesiątych trzy niezależne ośrodki: w Wielkiej Brytanii (Londyn), Kanadzie (Toronto) i USA (Ann Arbor) prowadziły badania nad lokalizacją genu CF. Efektem tych badań było stwierdzenie, że gen CF znajduje się na ramieniu długim chromosomu 7 [20]. Od 1987 r. dwa z wymienionych ośrodków: kanadyjski (Lap-Chee Tsui) oraz amerykański (Francis Collins) podejmują współpracę, w której wyniku w 1989 r. zostaje wyizolowany i scharakteryzowany gen CF oraz zostaje wykryta zasadnicza mutacja powodująca mukowiscydozę [33]. Wcześniej w trakcie mapowania ramienia długiego chromosomu 7 stwierdzono, że gen CF znajduje się między onkogenem "met" i anonimowym markerem J3.11 (cyt. wg [24]). Odkrycie flankujących markerów było wielkim postępem w lokalizacji genu CF, mimo że odległość dzieląca je od siebie wynosiła prawie 1600 kb (tysięcy par zasad) – odcinek taki zawierać może ok. 50 średniej wielkości genów. W Lap-Chee Tsui charakteryzowano ten odcinek fragmentami, stosując technikę kroczenia (*walking*) wzdłuż nici DNA polegającą na izolowaniu nakładających się klonów DNA aż do osiągnięcia określonego celu. Natomiast w Francis Collins charakteryzowano odcinek 1600 kb stosując technikę izolacji klonów DNA przez przeskakiwanie (*jumping*) długich fragmentów [33].

Dzięki mapowaniu długiego ramienia chromosomu 7, wysyceniu markerami genetycznymi oraz badaniu sprzężeń między tymi markerami a domniamaną mutacją powodującą mukowiscydozę, w roku 1989 wyizolowano gen, którego uszkodzenie stanowi podstawę patogenezy mukowiscydozy [30]. Gen ten zawierający ok. 250 kb DNA, zbudowany z 27 eksonów koduje białko nazwane CFTR (*cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*). Białko to jest białkiem błonowym, składającym się z 1480 reszt aminokwasowych.

MUTACJA DELTA F508

Najczęściej spotykanym defektem w mukowiscydozie jest delecja trójki nukleotydów (-CTT-) z eksonu 10 genu CFTR, zwana delta F508. Mutacja ta powoduje delecję fenyloalaniny w pozycji 508 białka CFTR [17] (rys. 1). Wykazano, że mutacja delta F508 w populacji światowej występuje u ok. 70% chorych na mukowiscydozę [17, 21]. Okazało się jednak, że istnieją populacje, w których występowanie mutacji delta F508 jest rzadsze. Polska populacja charakteryzuje się niższą częstością występowania tej mutacji: tutaj tylko ok. 50% przypadków mukowiscydozy spowodowanych jest mutacją delta F508 [3].

Do dziś poznanych zostało już ok. 200 różnych mutacji powodujących mukowiscydozę. Olbrzymia ich większość stwierdzona została tylko w jednostkowych przypadkach, w pojedynczych rodzinach. Celem identyfikacji jak największej ilości mutacji powołane zostało specjalne konsorcjum (*CF Genetic Analysis Consortium*) skupiające ok. 100 laboratoriów z ponad 20 krajów świata.

NORMALNY

DNA	GAA	AAT	ATC	ATC	TTT	GGT	GTT	TCC
Białko	Glu	Asn	Ile	Ile	Phe	Gly	Val	Ser
Pozycja	504	505	506	507	508	509	510	511

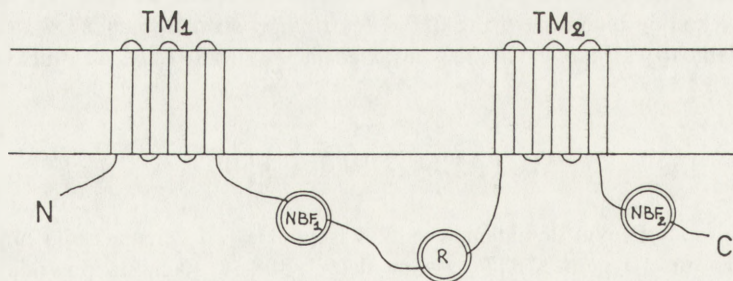
MUKOWISCYDOZA

DNA	GAA	AAT	ATC	AT-	- - T	GGT	GTT	TCC
Białko	Glu	Asn	Ile	Ile		Gly	Val	Ser

Rys. 1. Porównanie struktury fragmentu eksonu 10 genu CFTR oraz białka CFTR u osobników zdrowych i u chorych na mukowiscydozę

STRUKTURA I FUNKCJA BIAŁKA CFTR

Strukturę białka CFTR określono na podstawie sekwencji sklonowanego cDNA [30]. Białko CFTR jest białkiem błonowym zbudowanym z 1480 reszt aminokwasowych, o masie cząsteczkowej 168,138 daltonów [31], występującym w komórkach nabłonka wydzielniczego, np. w gruczołach potowych, trzustce, oskrzelach. Składa się z 12 transbłonowych, hydrofobowych helis oraz trzech hydrofilnych domen cytoplazmatycznych: NBF1, NBF2 oraz R (rys. 2). Transbłonowe helisy połączone są sześcioma pętlami. Odcinek między helisą 7 i 8 jest glikozylowany. Domeny NBF odpowiedzialne za wiązanie wysokoenergetycznych nukleotydów (ATP) składają się ze 150 reszt aminokwasowych. Domena R, kodowana w całości przez jeden ekson, zbudowana jest z 241 reszt aminokwasowych i zawiera miejsca akceptorowe dla enzymów fosforylujących (kinazy białkowe A i C), znanych z pełnienia funkcji regulatorowych w stosunku do wielu białek komórkowych. Mutacja delta F508 występuje w domenie NBF1 [31].



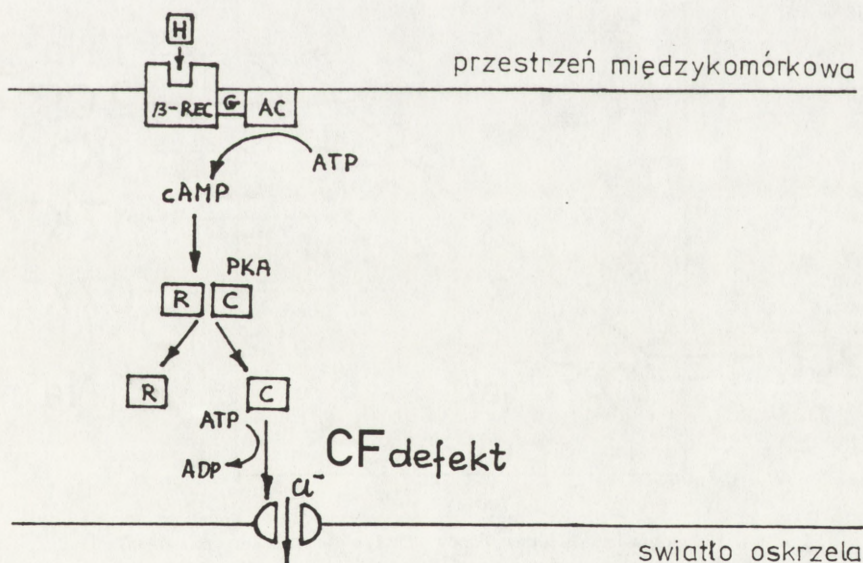
Rys. 2. Schematyczny model białka CFTR

Struktura CFTR pozwala sądzić, że należy ono do rodziny białek transportujących, określanych skrótem ABC (*ATP-binding cassette*) [14]. Rodzina ta składa się z ok. 40 różnych białek, z których wszystkie są transporterami zależnymi od ATP. Z kolei charakterystyka elektrofizjologiczna CFTR sugeruje, że jest to raczej kanał chlorkowy zależny od cAMP [1]. Innymi koncepcjami funkcji CFTR branyymi pod uwagę są:

- jest to transporter substratu innego niż jony Cl^- (np. białka regulującego kanał chlorkowy),
- sam CFTR jest białkiem regulującym endogenne kanał,
- białko to pełni złożoną funkcję tak transportera nieznanego substratu, jak i kanału Cl^- jednocześnie [13].

Nie ma dzisiaj wątpliwości, że zmiana struktury białka CFTR jest bezpośrednio odpowiedzialna za występowanie mukowiscydozy. Mimo to w dalszym ciągu dokładnie nie wiadomo, w jaki sposób zmiana ta wpływa na regulację przepływu jonów przez błonę apikalną komórek nabłonka. Jeżeli przyjąć, że białko CFTR jest kanałem chlorkowym – co obecnie wydaje się najbardziej prawdopodobne – to może ono ulegać aktywacji przez cAMP przy udziale kinazy białkowej A lub poprzez wysokie stężenie jonów wapnia przy udziale kinazy białkowej C (rys. 3) [22, 35].

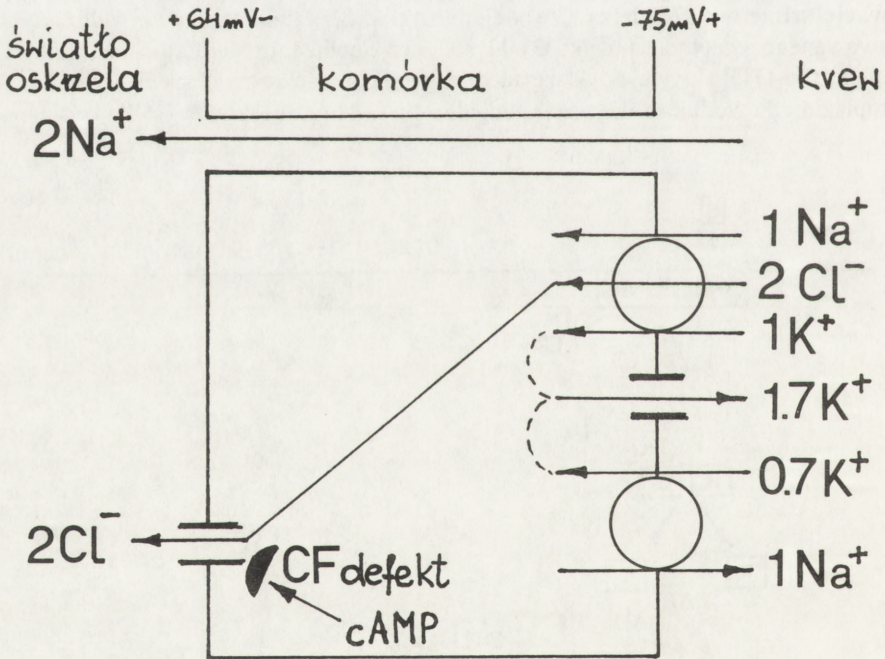
Aktywacja receptora przez ligand reguluje stan otwarcia kanału drogą pośrednią poprzez aktywację trimerowego białka G (podjednostki α, β, γ). Pod wpływem oddziaływania zaktywowanego receptora na białko G oddysocjowuje podjednostka α , która łączy się z GTP. Kompleks $\text{G}\alpha\text{-GTP}$ aktywuje cyklazę adenylanową, powodując zwiększenie stężenia cAMP w cytoplazmie. Powoduje to aktywację podjednostki katalitycznej kinazy białkowej A poprzez



Rys. 3. Komórkowy model regulacji kanału jonowego w komórkach nabłonka: β -REC – receptor β -adrenergiczny, G – białko G, AC – cyklaza adenylanowa, PKA – kinaza białkowa A, R – podjednostka regulatorowa kinazy białkowej A, C – podjednostka katalityczna kinazy białkowej A, H – hormon

wiązanie się cAMP z jej podjednostką regulatorową. Aktywna kinaza białkowa A fosforyluje białko tworzące kanał.

Komórkowy model sekrecji sodu i chloru przez komórki nabłonkowe przyjmuje, że wewnętrzny, bezpośredni transport przez podstawną błonę jest połączony z procesem kotransportu jonów sodu i potasu (rys. 4). Sód i potas, które przechodzą przez błonę razem z chlorem, powracają do naczyń krwionośnych podłoża nabłonka oddzielnie dzięki układowi pompy sodowo-potasowej i specyficznemu kanałowi potasowemu. Akumulacja chloru we wnętrzu komórki powoduje wytworzenie elektrochemicznego gradientu, który wpływając na otwarcie apikalnego kanału chlorkowego umożliwia dyfuzję jonów chlorkowych na zewnątrz nabłonka. Wszystkie te procesy powodują przesunięcie ujemnego potencjału na zewnątrz nabłonka, wpływając tym samym na międzykomórkowy ruch jonów sodu [32]. Uszkodzenie mechanizmu sekrecji jonów w mukowiscydozie polega prawdopodobnie na zablokowaniu wypływu jonów chlorkowych, a co za tym idzie również cząsteczek wody, czego konsekwencją jest powstawanie gęstego, lepkiego śluzu powodującego zaburzenia w narządach mających gruczoły śluzowe.



Rys. 4. Komórkowy model sekrecji jonów sodu i potasu przez komórki nabłonka

BADANIA ZWIĄZANE Z TERAPIĄ GENOWĄ MUKOWISCYDOZY

Pierwsze wyniki badań związanych z terapią genową mukowiscydozy opublikowane zostały w 1990 r. przez dwie niezależne grupy, które równocześnie doniosły o skorygowaniu defektu elektrofizjologicznego komórek CF transfekowanych prawidłowym genem CFTR (ściślej jego cDNA) [28].

Jedną z grup korygowała defekt CF w linii komórek nabłonka drzewa oskrzelowego, transfekowanych rekombinowanym wirusem krowianki służącym jako wektor do wprowadzenia cDNA-CFTR [29]. Druga grupa korygowała ten sam defekt w linii komórek gruczolakoraka trzustki, używając do tego samego celu rekombinowanej cząsteczki retrowirusa [6]. Innym, bardzo obiecującym modelem doświadczalnym są komórki nabłonkowe drzewa oskrzelowego, pobierane bronchoskopowo *ex vivo* i następnie transfekowane rekombinowanym adenowirusem zawierającym cDNA-CFTR [R.G.Crystal, doniesienie ustne, 1991]. Skuteczna komplementacja defektu mukowiscydozy w przeprowadzonych eksperymentach stanowi milowy krok w rozwoju efektywnej terapii genowej tej choroby stwarzając nadzieję na stosunkowo szybkie zastosowanie jej w pilotowych próbach klinicznych.

DIAGNOSTYKA MOLEKULARNA MUKOWISCYDOZY I PORADNICTWO GENETYCZNE

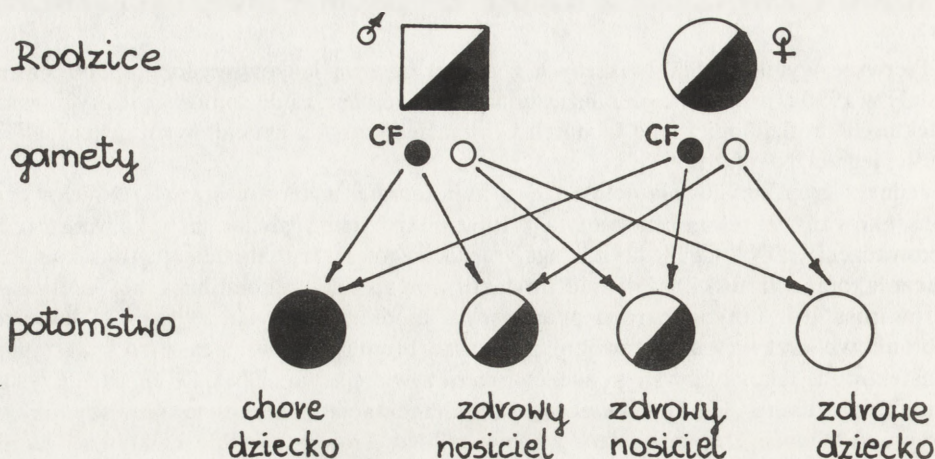
Genom każdego osobnika wykazuje zmienność osobniczą, która jest m.in. wynikiem nagromadzonych mutacji. Jeżeli określona zmiana w sekwencji nukleotydów występuje w danej populacji z częstością co najmniej 1%, określa się ją mianem polimorfizmu DNA. Polimorfizm DNA można wykryć poprzez sekwencjonowanie lub analizę polimorfizmu długości fragmentów restrykcyjnych DNA (RFLP od ang. *restriction fragment length polymorphism*). Jest to zróżnicowanie długości fragmentów restrykcyjnych powodowane obecnością lub brakiem odpowiedniego miejsca restrykcyjnego w DNA danego osobnika. Klasycznie bada się go przy użyciu techniki Southerna i hybrydyzacji ze specyficznymi sondami molekularnymi [36]. Analiza RFLP jest szeroko stosowana do diagnostyki chorób genetycznych człowieka [16, 39]. Występowanie sprzężenia nieprawidłowego allelu z jednym z polimorficznych fragmentów restrykcyjnych DNA jest warunkiem prowadzenia analizy RFLP w rodzinie obciążonej chorobą genetyczną, dziedziczącą się w sposób mendelowski.

Dzięki polimorfizmowi loci sprzężonych z genem CFTR analiza RFLP pozwala uzyskać w znacznym odsetku rodzin informatywny wynik [8]. Najczęściej w diagnostyce mukowiscydozy używa się markery XV2c i KM19 leżące w obrębie locus D7S23, sprzężonego z genem CFTR [17]. Analiza RFLP tych markerów jest typową analizą sprzężeń stosowaną w określaniu nosicielstwa nieprawidłowego allelu [15]. W

TABELA 1. Haplotypy RFLP locus sprzężonego z genem CFTR

Haplotyp	XV-2c/TaqI	KM 19/Pst I
A	-	-
B	-	+
C	+	-
D	+	+

"-" oznacza brak miejsca restrykcyjnego, "+" oznacza obecność tego miejsca (nazewnictwo za Beaudet i wsp. 1988)



Rys. 5. Dziedziczenie nieprawidłowego genu CF w rodzinach obciążonych mukowiscydozą

metodzie tej porównuje się układ markerów obojga rodziców, chorego dziecka oraz zdrowego rodzeństwa. Analiza RFLP DNA rodzin obciążonych CF opiera się na założeniu, że każde z rodziców jest nosicielem jednego nieprawidłowego allelu, oraz że chore dziecko dziedziczy nieprawidłowy allel zarówno po ojcu, jak i po matce (rys. 5).

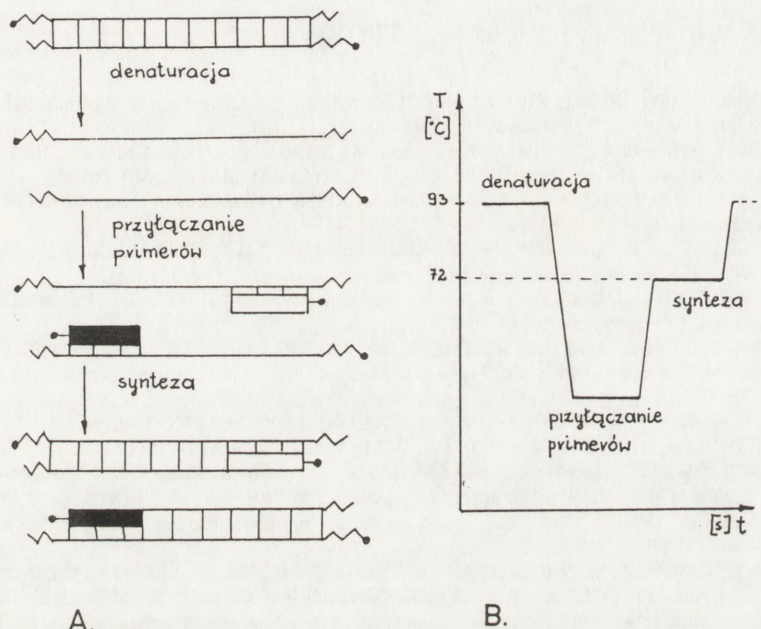
Obecnie najczęściej stosowaną metodą w badaniach rodzinnych jest analiza RFLP z zastosowaniem techniki PCR (*the polymerase chain reaction*). PCR w porównaniu z techniką Southerna ma szereg znaczących zalet:

- jest techniką znacznie szybszą i łatwiejszą technicznie,
- pomija pracę z radioaktywnymi izotopami, w związku z czym w rutynowym stosowaniu jest tańsza.

PCR jest metodą enzymatycznego amplifikowania fragmentów DNA, którego matrycą może być np. genomowy DNA [11, 25, 34]. Pozwala uzyskać duże ilości wiernych kopii badanego fragmentu DNA w sposób znacznie prostszy niż uciążliwsze i trudniejsze technicznie klonowanie w bakteriach.

PCR umożliwia również bezpośrednią detekcję wielu mutacji w rodzinach obciążonych chorobami genetycznymi. W przypadku mukowiscydozy w ten sposób bada się obecność najczęściej występującej mutacji delta F508 oraz rzadszych mutacji, takich jak np. delta I507, G551D, R553X i wiele innych. Niektóre z tych mutacji można identyfikować amplifikując kilka różnych fragmentów genu CFTR w jednej mieszaninie reakcyjnej jednocześnie, systemem *multiplex PCR* [27]. Innymi metodami stosowanymi do identyfikacji mutacji genu CFTR są:

- hybrydyzacja z sondami oligonukleotydowymi specyficznymi dla danego allelu (ASO – *allele specific oligonucleotides*) [21],
- analiza miejsc restrykcyjnych wprowadzanych w trakcie PCR (ACRS – *amplification created restriction site*) [27] czy
- PCR z użyciem selektywnie modyfikowanych primerów (ARMS – *amplification refractory mutation system*) [26].



Rys. 6. A – schemat amplifikacji DNA metodą PCR; B – profil temperaturowy jednego typowego cyklu PCR

Wydajnymi metodami screeningowymi, pozwalającymi na stosunkowo szybką detekcję mutacji są np.:

- ◆ techniki analizy jednoniciowego polimorfizmu konformacyjnego (SSCP – *single stranded conformation polymorphism*) [10] oraz

- ◆ elektroforezy w gradientowym żelu denaturującym (DGGE – *denaturing gradient gel electrophoresis*) [37].

Poradnictwo genetyczne dla rodzin z mukowiscydozą w dużej mierze może funkcjonować dzięki diagnostyce molekularnej CF, a wykrycie nosicielstwa mutacji w tych rodzinach możliwe jest jedynie dzięki zastosowaniu tej technologii. Poznanie struktury genu CFTR i wielu z jego mutacji umożliwi diagnostykę prenatalną CF na podstawie analizy DNA komórek płynu owodniowego lub komórek pobranych bezpośrednio z trofoblastu. Zastosowanie analizy DNA u rodzin obciążonych mukowiscydozą pozwala w wielu przypadkach jednoznacznie określić nosicielstwo nieprawidłowego genu CF. Analiza RFLP loci sprzężonych z locus CFTR przy użyciu dwóch markerów XV2c oraz KM19 pozwala określić haplotypy RFLP danego allelu, będące kombinacją polimorficznych alleli występujących w jednym chromosomie [7, 9, 23]. Analizę haplotypów można wykorzystać do badań defektu w genie CFTR w rodzinach z mukowiscydozą, dzięki sprzężeniu mutacji powodującej chorobę z jednym konkretnym haplotypem, zwanym "haplotypem wysokiego ryzyka" [17]. Obecnie prowadzone są intensywne badania nad korelacją genotyp - fenotyp w

mukowiscydozie, polegające na próbach przyporządkowania objawów klinicznych lub ich grup poszczególnym haplotypom i mutacjom genu CFTR [17, 38].

LITERATURA

- [1] ANDERSON MP, RICH DP, GREGORY RJ, SMITH AE, WELSH MJ. Generation of cAMP-activated chloride currents by expression of CFTR. *Science* 1991; **251**: 679–682.
- [2] BOAT TF, WELSH MJ, BEAUDET AL. Cystic fibrosis. [w] *The Metabolic Basis of Inherited Diseases*, 6th ed., Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D. (red.) New York, McGraw-Hill 1989: 2649–2680.
- [3] BAL J, MACIEJKO D, POTOCKA A, KRAWCZAK M, REISS J. Frequency of the cystic fibrosis mutation delta F508 in Poland. *Hum Genet* 1991; **86**: 329.
- [4] BEAUDET AL, SPENCE JE, MONTES M, O'BRIEN WE, ESTIVILL X, FARRALL M, WILLIAMSON R. Experience with DNA markers for the diagnosis of cystic fibrosis. *Lancet* 1988; **I**: 50–51.
- [5] BOŻKOWA K, ŻEBRAK J. Zwłóknienie torbielowate (mukowiscydoza) [w] *Pediatrics*. t. I. Górnicki B, Dębiec B (red.) Warszawa, PZWL 1985: 505–517.
- [6] DRUMM ML, POPE HA, CLIFF WH, ROMMENS JM, MARVIN SA, TSUI LC, COLLINS FS, FRIZZELL RA, WILSON JM. Correction of the cystic fibrosis defect in vitro by retrovirus-mediated gene transfer. *Cell* 1990; **62**: 1227–1233.
- [7] ESTIVILL X, FARRALL M, SCAMBLER PJ, BELL GM, HAWLEY KM, LENCH NJ, BATES GP, KRUYER HC, FREDERICK PA, STAMIR P, WATSON EK, WILLIAMSON R, WAINWRIGHT BJ. A candidate gene for the cystic fibrosis locus isolated by selection for methylation-free islands. *Nature* 1987; **326**: 840–845.
- [8] ESTIVILL X, SCAMBLER PJ, WAINWRIGHT BJ, HAWLEY K, FREDERICK P, SCHWARTZ M, BAIGET M, KEREM J, WILLIAMSON R, FARRALL M. Patterns of polymorphism and linkage disequilibrium for cystic fibrosis. *Genomics* 1987b; **1**: 257–263.
- [9] ESTIVILL X, FARRALL M, WILLIAMSON R, FERRARI M, SEIA M, GIUNTA AM, NOVELLI G, POTENZA L, DALLAPICCOLA B, BORGIO G, GASPARINI P, PIGNATTI PF, VITELE E, ROMEO G. Linkage disequilibrium between cystic fibrosis and linked DNA polymorphisms in Italian families: a collaborative study. *Hum Genet* 1988; **43**: 23–28.
- [10] ESTIVILL X, CHILLON M, CASALS T, BOSCH A, MORRALL N, NUNES V, GASPARINI P, SELA A, PIGNATTI PF, NOVELLI G, DALLAPICCOLA B, FERNANDEZ E, BENITEZ J, WILLIAMSON R. Delta F508 gene deletion in cystic fibrosis in Southern Europe. *Lancet* 1989; **II**: 1404.
- [11] GELFAND DH. Taq DNA polymerase. [w] *PCR Technology: Principles and Applications for DNA Amplification*, Erlich HA (red.) New York, Stockton Press 1989: 17–22.
- [12] GOODCHILD MC, DODGE AJ. Cystic fibrosis. [w] *Manual of Diagnosis and Management*. Bailliere AB, Tindwall CD (red.) England, WB Saunders 1985: 35–48.
- [13] HIGGINS CF, HYDE SC. Channeling our thoughts. *Nature* 1991; **352**: 194–195.
- [14] HYDE SC, EMSLEY P, HARTSHORN MJ, MIMMACK MM, GILEADI U, PEARCE SR, GALLAGHER MP, GILL DR, HUBBARD RE, HIGGINS CF. Structural model of ATP-binding proteins associated with cystic fibrosis, multidrug resistance and bacterial transport. *Nature* 1990; **346**: 361–365.
- [15] JARUZELSKA J. Analiza genu hydroksylazy fenyloalaniny w diagnostyce fenyloketonurii. *Post Biol Kom* 1989; **16**: 165–175.
- [16] JUNGERMAN M, WITT M, SŁOMSKI R. Diagnostyka chorób genetycznych technikami rekombinacji DNA. *Pol Tyg Lek* 1988; **43**: 1243–1246.
- [17] KEREM B-S, ROMMENS JM, BUCHANAN JA, MARKIEWICZ D, COX TK, CHAKRAVARTI A, BUCHWALD M, TSUI LC. Identification of the cystic fibrosis gene: genetic analysis. *Science* 1989; **245**: 1073–1080.
- [18] KEREM E, COREY M, KEREM B-S, ROMMENS J, MARKIEWICZ D, LEVISON H, TSUI LC, DURIE P. The relation between genotype and phenotype in cystic fibrosis – analysis of the most common mutation ($\Delta F508$). *N Engl J Med* 1990; **323**: 1517–1522.
- [19] KNOWLES MR, CHURCH N, WALTNER WE, YANKASKAS JR, GILLIGAN P, KING M, EDWARDS LJ, HELMS RW, BOUCHER RC. A pilot study of aerosolized amiloride for the treatment of lung disease in cystic fibrosis. *N Engl J Med* 1990; **322**: 1189–1194.
- [20] KNOWLTON RG, COHEN-HAGUENAUER O, CONG NV, FREZAL J, BROWN UA, BARKER D, BRAMAN JC, SCHUMM JW, TSUI LC, BUCHWALD M, DONIS-KELLER H. A polymorphic DNA marker linked to cystic fibrosis is located on chromosome 7. *Nature* 1985; **318**: 380–382.

- [21] LEMNA WK, FELDMAN GL, KEREM B, FERNBACH SD, ZEVKOVICH EP, O'BRIEN WE, RIORDAN JR, COLLINS FS, TSUI L-C, BEAUDET AL. Mutation analysis for heterozygote detection and the prenatal diagnosis of cystic fibrosis. *N Engl J Med* 1990; **322**: 291-296.
- [22] LI M, McCANN JD, LIEDTKE CM, NAIRN AC, GREENGARD P, WELSH MJ. Cyclic AMP-dependent protein kinase opens chloride channels in normal but not cystic fibrosis airway epithelium. *Nature* 1988; **331**: 358-360.
- [23] MACIEJKO D, BAL J, MAZURCZAK T, MEERMAN G, BUSY Ch, OOSTRA B, HALLEY D. Different haplotypes for cystic fibrosis-linked DNA polymorphisms in Polish and Dutch populations. *Hum Genet* 1989; **83**: 220-222.
- [24] MARX JL. The cystic fibrosis gene is found. *Science* 1989; **245**: 932-935.
- [25] MULLINS KB, FALOONA FA. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* 1987; **155**: 335-350.
- [26] NEWTON CR, SUMMERS C, HEPTINSTALL LE, LYNCH JR, FINNIEAR RS, OGILVIE D, SMITH JC, MARKHAM AF. Genetic analysis in cystic fibrosis using the amplification refractory mutation system (ARMS): the J3.11 MspI polymorphism. *J Med Genet* 1991; **28**: 248-251.
- [27] NG ISL, PACE R, RICHARD MV, KOBAYASHI K, KEREM B, TSUI L-C, BEAUDET AL. Methods for analysis of multiple cystic fibrosis mutations. *Hum Genet* 1991; **87**: 613-617.
- [28] QUINTON PM. Righting the wrong protein. *Nature* 1990; **347**: 226.
- [29] RICH DP, ANDERSON MP, GREGORY RJ, CHENG SH, PAUL S, JEFFERSON DM, McCANN JD, KLINGER KW, SMITH AE, WELSH MJ. Expression of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator corrects defective chloride channel regulation in cystic fibrosis airway epithelial cells. *Nature* 1990; **347**: 358-363.
- [30] RINGE D, PETSKO GA. A transport problem? *Nature* 1990; **346**: 312-313.
- [31] RIORDAN JR, ROMMENS JM, KEREM BS, ALON N, ROZMAHEL R, GRZELCZAK Z, ZIELENSKI J, LOK S, PLAVSIC N, CHOU JL, DRUMM ML, IANNUZZI MC, COLLINS FS, TSUI LC. Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. *Science* 1989; **245**: 1066-1073.
- [32] ROMEO G, DEVOTO M, GALIETTA LJV. Why is the cystic fibrosis gene so frequent? *Hum Genet* 1989; **84**: 1-5.
- [33] ROMMENS JM, IANNUZZI MC, KEREM BS, DRUMM ML, MELMER G, DEAN M, ROZMAHEL R, COLE JL, KENNEDY D, HIDAKA N, ZSIGA M, BUCHWALD M, RIORDAN JR, TSUI LC, COLLINS FS. Identification of the cystic fibrosis gene: chromosome walking and jumping. *Science* 1989; **245**: 1059-1065.
- [34] SAIKI RK, SCHARF S, FALOONA F, MULLIS KB, HORN GT, ERLICH HA, ARNHEIM N. Enzymatic amplification of β -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 1985; **230**: 1350-1354.
- [35] SCHOUMACHER RA, SHOEMAKER RL, HALM DR, TALLANT EA, WALLACE RW, FRIZZELL RA. Phosphorylation fails to activate chloride channels from cystic fibrosis airway cells. *Nature* 1987; **330**: 752-754.
- [36] SOUTHERN EM. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol* 1975; **98**: 503-507.
- [37] VIDAUD M, FANEN P, MARTIN J, GHANEM N, NICOLAS S, GOOSSENS M. Three point mutations in the CFTR gene in French cystic fibrosis patients: identification by denaturing gradient gel electrophoresis. *Hum Genet* 1990; **85**: 446-449.
- [38] WITT M, ERICKSON RP, OBER C, HOWATT WF, FARBER R. Correlation of phenotypic and genetic heterogeneity in cystic fibrosis: variability in sweat electrolyte levels contributes to heterogeneity and is increased with the XV-2c/KM19 B haplotype. *Am J Med Genet* 1991; **39**: 137-143.
- [39] ZIĘTKIEWICZ E, LATOS-BIELEŃSKA AM, SŁOMSKI R. Wykorzystanie polimorfizmu fragmentów restrykcyjnych DNA w diagnostyce chorób genetycznie uwarunkowanych. *Pol Arch Med Wewn* 1985; **74**: 269-276.

Otrzymano: 18.05.1992 r.

Przyjęto: 27.05.1992 r.

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

INFORMACJE DLA AUTORÓW

POSTĘPY BIOLOGII KOMÓRKI drukują artykuły przeglądowe z zakresu najnowszych osiągnięć biologii komórki, nie publikowane dotąd w innych wydawnictwach. Autorzy odpowiadają za ścisłość podawanych informacji. Obowiązuje terminologia zgodna z polskim mianownictwem biochemicznym, histologicznym, anatomicznym i embriologicznym. Artykuły drukowane w POSTĘPACH BIOLOGII KOMÓRKI nie mogą być bez zgody redakcji publikowane w innych periodykach.

POSTĘPY BIOLOGII KOMÓRKI zamieszczają:

1. Artykuły przeglądowe nie przekraczające 20 stron maszynopisu i do 100 pozycji bibliograficznych w zasadzie z ostatnich 5 lat (do 10% pozycji bibliograficznych starszych).

2. Artykuły przeglądowe ze wskazaniem kierunków przyszłych badań o objętości do 15 stron maszynopisu i bibliografii z ostatnich 3 lat (do 35 pozycji). Każda pozycja bibliograficzna powinna zawierać dodatkowo 1 zdanie streszczenia, a szczególnie ważne pozycje powinny być oznaczone gwiazdką.

3. Doniesienia z ostatniej chwili na 3–5 stronach maszynopisu z kilkoma pozycjami bibliograficznymi ostatniego roku (licząc od daty wystąpienia do redakcji).

4. Listy do redakcji (do 1 strony maszynopisu).

Tekst pracy i załączniki należy przysyłać w dwóch egzemplarzach. Maszynopis powinien być pisany jednostronnie na papierze formatu A4 z podwójną interlinią i marginesem 4 cm po lewej stronie. Strony powinny być kolejno numerowane. W tekście nie należy robić podkreśleń.

Pierwsza strona nie numerowana przeznaczona jest dla redakcji i powinna zawierać: imiona i nazwiska autorów oraz ich tytuły naukowe, adresy pracy i domowe wraz z telefonem, tytuł pracy w języku polskim i angielskim oraz liczbę stron maszynopisu, liczbę tabel i rysunków. Na pierwszej (numerowanej) stronie 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 i wysyłającego nadbitki, informację o dofinansowaniu pracy oraz skrót tytułu (do 40 znaków). Następna strona powinna zawierać streszczenie (do 150 słów) oraz słowa kluczowe – 3 do 10 słów zgodnych z terminami w Medical Subject Headings (Index Medicus), o ile słowa te są tam zawarte. Streszczenie i słowa kluczowe powinny być przedstawione także w języku angielskim. W tytule i streszczeniu można stosować jedynie powszechnie przyjęte skróty, np. DNA. Tekst artykułu należy rozpocząć od nowej strony. W tekście nie zamieszczać tabel, schematów lub rysunków, a jedynie zaznaczyć ołówkiem na marginesie ich lokalizację (np. tab. 1, rys. 1 itp.). Dla przejrzystości tekst można podzielić na rozdziały tytułowane i numerowane (1, 2 itd.) oraz podrozdziały (1.1, 1.2 itd.). Od nowej strony należy podać spis literatury. Skróty nazw czasopism podawać należy według Index Medicus (listy czasopism publikowane są corocznie w numerze styczniowym). Powołanie w tekście następuje przez podanie kolejnego numeru pozycji w spisie literatury w nawiasie kwadratowym (np. [5]). Spis literatury należy zestawić alfabetycznie według następującego wzoru:

[1] HNILICA LS, McLURE ME, SPELTZBERG TC. Histone biosynthesis and the cell cycle. [w] Philips MP, Schwartz E [red.] Histone and Nucleohistones. London, New York: Philips, Plenum Press 1977: 60–64.

[2] SACHSENMAJER W, REMY V, PLATTNER R. Initiation of synchronous mitosis in *Physarium polycephalum*. *Exptl Cell Res* 1980; 2: 41–48.

Tabele, opisy schematów i rysunków powinny być załączone na oddzielnych stronach. Schematy i rysunki muszą być wykonane w postaci nadającej się do reprodukcji. Fotografie prosimy zastępować raczej rysunkami, ale jeżeli są niezbędne, powinny być kontrastowe i wykonane na błyszczącym papierze. Wymiary poszczególnych rysunków, schematów i fotografii nie mogą przekraczać 125 x 180 mm lub ich połowy. Jeżeli załączniki są zapożyczone z innych źródeł, należy podać, skąd zostały zaczerpnięte i dołączyć zgodę autora i wydawnictwa na reprodukcję, jeżeli materiały te zamieszcza się w niezmienionej formie. Wszystkie załączniki muszą być opatrzone na odwrocie nazwiskiem pierwszego autora i oznaczeniem góry i dołu ilustracji.

Stosowane jednostki miar muszą być zgodne z układem SI.

Redakcja zastrzega sobie prawo dokonywania skrótów uzgodnionych z autorem. Autor zobowiązany jest do wykonania korekty autorskiej i zwrócenia jej w ciągu 3 dni. Koszty, spowodowane większymi zmianami tekstu wprowadzanymi w korekcie poza poprawkami błędów drukarskich, ponosi autor. Autorzy otrzymują bezpłatnie 25 nadbitkę.

TREŚĆ

W tym zeszycie Postępów Biologii Komórki . . .	185
RATAJCZAK M. Z., LUGER S. M. i GEWIRTZ A. M. – Rola receptora c-kit i jego ligandu w regulacji procesów krwiotworzenia u człowieka	187
BILIŃSKA B. – Współczesne poglądy na interakcje międzykomórkowe w gonadzie męskiej ssaków	205
SZOŁTYŚ M. – Struktura i funkcja pęcherzyków jajnikowych ssaków	221
KAWIAK J. i SKIERSKI J. S. – Cytometria przepływowa w badaniach komórek i niektóre jej zastosowania lekarskie	239
DOWJAT K. – Molekularne podstawy etapu promocji nowotworów. Badania na komórkowych modelach in vitro	255
SKIBIŃSKA A. i WITT M. – Molekularne podstawy mukowiscydozy	263

**Warunki prenumeraty kwartalnika
POSTĘPY BIOLOGII KOMÓRKI**

Prenumerata na rok 1993

Redakcja przyjmuje opłatę prenumeraty za rok 1993 na konto:
FUNDACJA POSTĘPÓW BIOLOGII KOMÓRKI, ul. Marymoncka 99, 01-813 Warszawa;
Bank Polska Kasa Opieki S. A., IV O/Warszawa 501132-40006576-2701-3-1110.
Cena prenumeraty rocznika (4 zeszyty) dla instytucji (bibliotek) wynosi 190 000 zł, a dla odbiorców indywidualnych 40 000 zł.

Subscription orders for POSTĘPY BIOLOGII KOMÓRKI is through the local press distributors or directly – Editorial Board of POSTĘPY BIOLOGII KOMÓRKI, Marymoncka str. 99, 01-813 Warszawa /Poland, account No:

FUNDACJA POSTĘPÓW BIOLOGII KOMÓRKI, ul. Marymoncka 99, 01-813 Warszawa; Bank Polska Kasa Opieki S. A., IV O/Warszawa 501132-40006576-2701-3-1110.
Price per year 20 dolars USA.

Indeks 369705