

PL ISSN 0324-833X

POLSKIE
TOWARZYSTWO
ANATOMICZNE

POLSKIE
TOWARZYSTWO
BIOLOGII
KOMÓRKI

TOM 23 NR-1'96
(1-148)

PL - 35
P2435

Postępy Biologii Komórki

Kwartalnik Polskiego Towarzystwa Anatomicznego, Polskiego Towarzystwa Biologii Komórki, Polskiej Sieci UNESCO oraz Fundacji Biologii Komórki i Biologii Molekularnej wydawany z częściową pomocą finansową Komitetu Badań Naukowych.

Redaguje Kolegium:

Szczepan BILINSKI (biologia rozwoju, embriologia, cytoszkielet, połączenia międzykomórkowe – *Instytut Zoologii UJ, 30-060 Kraków, ul. Ingardena 6*),

Jerzy KAWIAK (immunologia, cytometria, hematologia, biologia nowotworów – *Zakład Cytologii Klinicznej CMKP, 01-813 Warszawa, ul. Marymoncka 99*),

Maciej KAWALEC (biologia, immunologia i immunoterapia nowotworów – *Zakład Cytologii Klinicznej CMKP, 01-813 Warszawa, ul. Marymoncka 99*),

Wincenty KILARSKI (mięśnie, skurcz mięśniowy, ruchy komórek – *Instytut Zoologii UJ, 30-060 Kraków, ul. Ingardena 6*),

Jan MICHEJDA (szlaki informacyjne, błony komórek, energetyka komórki – *Zakład Bioenergetyki UAM, 61-701 Poznań, ul. Fredry 10*),

Maria OLSZEWSKA (komórki roślinne, informacja genetyczna w komórkach roślinnych i zwierzęcych – *Zakład Cytologii i Cytochemii Roślin Instytutu Fizjologii i Cytologii UŁ, 90-237 Łódź, ul. Banacha 12/16*),

Maciej ZABEL (histologia ogólna, endokrynologia, histochemia (immunocytochemia, hybrydocytochemia), ultrastruktura komórek – *Zakład Histologii AM, 50-368 Wrocław, ul. Chalubińskiego 6a*)

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, tel. 340 344, fax 340470.

Artykuły nadesłane do Redakcji w roku 1995 recenzowali:

Jolanta Barańska, Warszawa

Szczepan Biliński, Kraków

Antonina Harłodzińska-Szymka, Wrocław

Wiktor W. Jędrzejczak, Warszawa

Maciej Kawalec, Warszawa

Jerzy Kawiak, Warszawa

Wincenty Kilarski, Kraków

Zofia Kiliańska, Warszawa

Andrzej Klein, Kraków

Anna M. Kordowiak, Kraków

Leszek Kordylewski

Włodzimierz Korohoda, Kraków

Wanda M. Krajewska, Łódź

Maria Kwiatkowska, Łódź

Andrzej Lange, Wrocław

Andrzej Łukaszyk, Poznań

Jan Litwin, Kraków

Ludwik Malendowicz, Poznań

Kazimierz Marciniak

Jan Michejda, Poznań

Olgierd Narkiewicz, Gdańsk

Jerzy Nowak, Poznań

Maria Olszewska, Łódź

Stanisław Orkisz, Łódź

Regina Osiecka

Zofia Osuchowska, Warszawa

Zygmunt Pojda, Warszawa

Jan Rowiński, Warszawa

Wojciech Sawicki, Warszawa

Stanisława Stokłosowa, Kraków

Józef Stryma

Barbara Wachowicz, Łódź

Maciej Zabel, Wrocław

Zdzisław Żak, Kraków

Mariusz Żydowo, Gdańsk

Za tę społecznie wykonaną pracę serdecznie dziękujemy.

© Fundacja Biologii Komórki i Biologii Molekularnej

Wszystkie prawa zastrzeżone. Zabrania się kopiowania części lub całości bez uprzedniego pisemnego zezwolenia Fundacji Biologii Komórki i Biologii Molekularnej.

Ark. wyd. 12,0 Ark. druk. 9,0. Oddano do składu w listopadzie 1995 r. Podpisano do druku w styczniu 1996 r. Druk ukończono w lutym 1996 r.

W tym zeszycie • Postępów Biologii Komórki •

- Artykuł o powtórzeniach sekwencji mikrosatelitarnych w genomie człowieka na stronie 19 jest dalszym ciągiem referatów wygłoszonych podczas XXV Konferencji Biologii Komórki w dniu 18.11.1995 r. w Warszawie. Większość referatów została opublikowana w suplemencie PBK nr 6 z 1995 r. na temat "Postępy badań DNA".
- Promieniowanie jonizujące zaburza cykl komórkowy. Uszkodzony promieniowaniem DNA wyzwała pośrednio syntezę inhibitora zależnych od cyklin kinaz białkowych oznaczonego p21. Skutki jego działania omówiono na s. 49.
- Do lat osiemdziesiątych sądzono, że relaksyna jest związana jedynie z okresem późnej ciąży i przez swoje oddziaływanie na mięśniówkę gładką macicy, na szyjkę macicy oraz spojenie łonowe przygotowuje drogi rodne samicy do porodu. Udział peptydu w rozwoju mózgowia i regulacji funkcji sercowo-naczyniowych to nowe informacje o funkcjach relaksyny (s. 83).
- Jednym z niedawno zidentyfikowanych hormonów jest PTHrP (parathyroid hormone-related peptide). Jest to czynnik regulujący gospodarkę wapniową, działający bezpośrednio na osteoblasty i komórki kanalików nerkowych (s. 127).
- Warto zwrócić uwagę na komunikaty na stronach 143–146. Na stronie 147 umieszczono erratę do rysunków z nr 3 z 1995 r.



CYTOGENETYKA MĘSKIEJ GAMETOGENEZY. CZEŚĆ 2. TRANSLOKACJE ROBERTSONOWSKIE I INWERSJE

CYTOGENETICS OF HUMAN MALE GAMETOGENESIS. PART II. ROBERTSONIAN TRANSLOCATIONS AND INVERSIONS

Artur BARCZYK

**Zakład Biologii i Genetyki Medycznej, Instytut Nauk Podstawowych, Wojskowa
Akademia Medyczna, Łódź**

Streszczenie: Artykuł kontynuuje omówienie wpływu aberracji kariotypu somatycznego na przebieg mejozy u mężczyzn i następstwa tego zjawiska obserwowane w procesie rozrodu. Prezentuje on wyniki badania chromosomów na różnych etapach gametogenezy, a także mechanizmy powstawania zaburzeń w translokacjach robertsonowskich oraz inwersjach pericentrycznych i paracentrycznych. W pracy zestawiono dane pochodzące z badań prowadzonych w trakcie mejozy, badań plemników oraz badań prenatalnych i postnatalnych.

Słowa kluczowe: mejoza, ludzkie chromosomy, aberracje chromosomowe, translokacje, inwersje, segregacja chromosomów

Summary: This article continues the discussion about the influence of somatic karyotype aberrations on the course of meiosis in human male, and their consequences observed in reproduction. It presents the results of chromosome investigations during different stages of gametogenesis, and also the mechanisms of disturbance arising in Robertsonian translocations, paracentric and pericentric inversions. Data from meiotic and sperm surveys, prenatal and postnatal studies are compared.

Key words: meiosis, human chromosomes, chromosome aberrations, translocations, inversions, chromosome segregation

1. CYTOGENETYKA MEJOZY U MEŹCZYŹN-NOSICIELI TRANSLOKACJI CHROMOSOMÓW AKROCENTRYCZNYCH

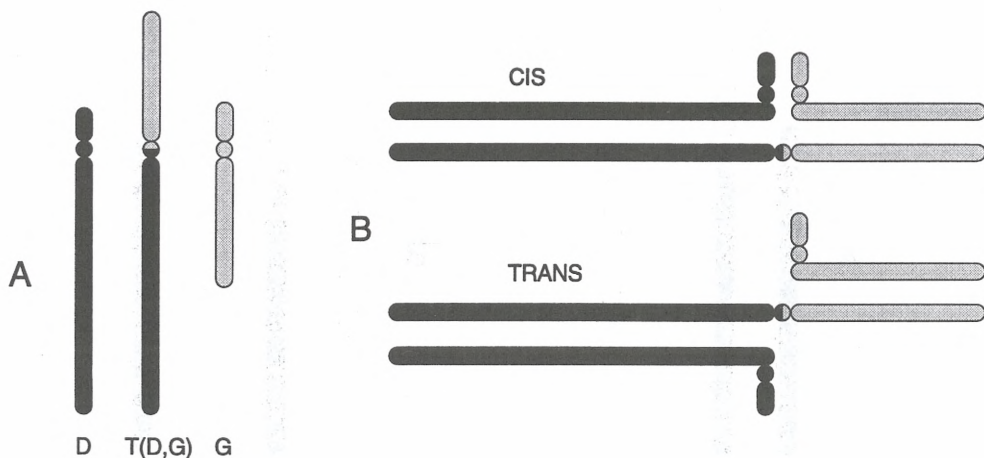
1.1. TRANSLOKACJE ROBERTSONOWSKIE

Translokacje między dwoma chromosomami akrocentrycznymi występują u obu płci, zwykle nie powodując zmian fenotypowych. Ujawniają się dopiero w procesie rozrodu powodując u ich nosiciela niepłodność, poronienia samoistne lub urodzenia dzieci z niezrównoważonym kariotypem [79]. Ten typ aberracji występuje kilkakrotnie częściej u niepłodnych mężczyzn niż w populacji noworodków [19], powodując zmniejszenie liczby plemników w nasieniu [52, 60], rzadziej ich brak. W biopsji jąder stwierdza się duże zróżnicowanie budowy histologicznej i aktywności spermatogonicznej: od ciężkiego uszkodzenia do obrazu zbliżonego do normy [16, 23]. Najczęściej spotykane są translokacje niehomologiczne między chromosomami 13 i 14 oraz 14 i 21 [77].

Struktura translokacji między niehomologicznymi akrocentrykami różni się od translokacji wzajemnych. Za pomocą technik barwienia prążkowego określono większość powstałych tą drogą chromosomów pochodnych jako dwucentromerowe. Wykorzystanie metod genetyki molekularnej pozwoliło zlokalizować miejsca pęknięć w obrębie ramion krótkich obu uczestniczących w translokacji chromosomów. Najczęściej są one położone dystalnie od sekwencji alfa-satelitarnych centromeru, w obrębie sąsiadujących z nimi sekwencji satelitarnych III ramion krótkich, a proksymalnie od sekwencji rybosomalnego DNA nitek satelitonośnych i flankujących je sekwencji beta-satelitarnych [9, 22, 30, 85]. Rzadkie przypadki, w których stwierdza się obecność chromatyny barwiącej się NOR, świadczą o możliwości innej lokalizacji miejsc pęknięć.

Chromosom powstały z ramion długich ma zatem dwa centromery, z których jeden traci charakterystyczny kształt przewężenia i pozostaje nieczynny. Proces inaktywacji centromeru nie jest losowy, istnieje hierarchia zdolności do zachowania funkcji centromeru poszczególnych akrocentryków [73]. Fragmenty ramion krótkich dystalne od miejsc pęknięć ulegają utracie i nie obserwuje się ich w dalszych podziałach mitotycznych ani mejotycznych.

Parowanie odcinków homologicznych powoduje powstanie w pachytenie pierwszego podziału mejotycznego struktury złożonej z 3 chromosomów, zwanej triwalentem, w konfiguracji cis lub trans (rys. 1). Rozejście triwalentu powstałego z chromosomów niehomologicznych może mieć postać segregacji naprzemiennej, przyległej lub 3:0. W wyniku segregacji naprzemiennej do jednej gamety trafiają 2 prawidłowe chromosomy (rys. 2A), a do drugiej chromosom pochodny, powstały z ich homologów (rys. 2B). Gamety te mają prawidłowy i zbalansowany kariotyp, a ich udział w zapłodnieniu prowadzi do prawidłowego kariotypu w pierwszym przypadku oraz nosicielstwa translokacji zrównoważonej w drugim. Segregacja przyległa (rys. 3) ma miejsce wtedy, gdy do jednej gamety przechodzi jeden chromosom prawidłowy i chromosom pochodny, do drugiej drugi chromosom prawidłowy. Obie gamety mają nieprawidłowy kariotyp, a ich udział w zapłodnieniu prowadzi do trisomii lub mono-

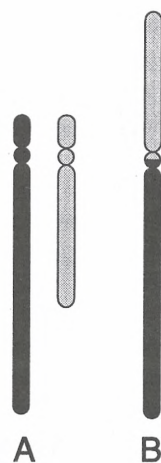


Rys. 1. Chromosomy u nosiciela translokacji robertsonowskiej 45,XY,t(D;G): A – chromosomy w komórce somatycznej: D – przykładowy chromosom z grupy D; t(D;G) – przykładowy chromosom pochodny; G – przykładowy chromosom z grupy G; B – triwalent pachytenowy utworzony z tych chromosomów

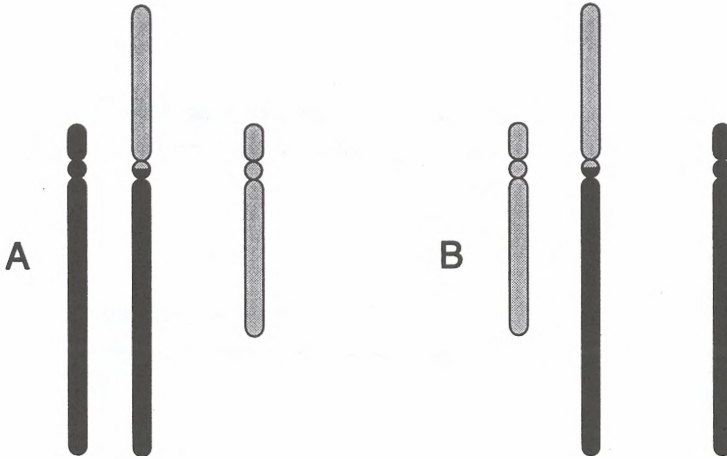
somii. Segregacja 3:0 oznacza przejście do jednej gamety obu chromosomów prawidłowych i chromosomu pochodnego (rys. 4A), do drugiej gamety nie trafia żaden chromosom z par objętych translokacją (rys. 4B). Również w tym przypadku obie gamety mają nieprawidłowy kariotyp, a ich udział w zapłodnieniu prowadzi do tetrasomii lub nullisomii. Te wszystkie niezrównoważone aberracje strukturalne, będące wynikiem segregacji przyległej i 3:0 w mejozie, są określane mianem aneusomii segregacyjnej.

Obserwacje rodzin nosicieli translokacji robertsonowskich pozwoliły stwierdzić, że w porównaniu z grupą translokacji wzajemnych, ryzyko pojawienia się aneusomii segregacyjnej u potomstwa jest znacznie niższe. Dotyczy to zarówno płodów diagnozowanych prenatalnie [18], jak i noworodków [72]. Występowanie niemal wyłącznie kariotypów prawidłowych lub zrównoważonych wskazuje na mechanizm segregacji naprzemiennej jako dominującej w translokacjach robertsonowskich u mężczyzn.

Badania przebiegu mejozy wykonane u nosicieli translokacji robertsonowskich, rozpoznawanych głównie z powodu niepłodności, wydają się potwier-



Rys. 2. Segregacja naprzemienna – chromosomy par objętych translokacją: A – z komórki o kariotypie 23, X lub Y; B – z komórki o kariotypie 22, Y lub X,t(D;G)

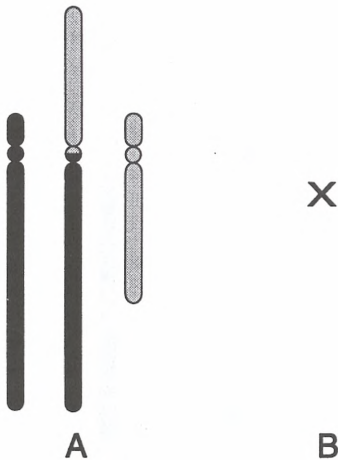


Rys. 3. Segregacja przyległa – chromosomy par objętych translokacją: A – z komórki o kariotypie 23,X lub Y,-G,+t(D;G) i 22,Y lub X,-D; B – z komórki o kariotypie 23,Y lub X,-D,+t(D;G) i 22,Y lub X,-G

dzać powyższą hipotezę. Przy zastosowaniu mikroskopu świetlnego w stadium pachytenu (P I) obserwowano 21 biwalentów i jeden triwalent, występujący zawsze w pozycji cis [47, 76, 82]. Uważa się, że taka konfiguracja sprzyja rozejściu się homologicznych centromerów do przeciwnych biegunów. Zauważono też, że triwalent leży w pobliżu lub łączy się z biwalentem płciowym [28, 34, 47, 69]. Badania w mikroskopie elektronowym wykazały pełne parowanie długich ramion wolnych chromosomów z homologicznymi odcinkami chromosomu pochodnego, podczas gdy ich

okolice okołocentromerowe oraz ramiona krótkie pozostają niesparowane i łączą się z chromosomami płci [44]. Wydaje się, że odsetek komórek z asocjacjami triwalent-XY jest wyższy u mężczyzn wykazujących niższą liczbę plemników w nasieniu [43, 44, 63]. Może to wskazywać na mechanizm zaburzenia mejozy i wyjaśniać przyczynę niepłodności. Liczba chiazm w stadium diakinezy może być nieco obniżona [7, 59, 76].

Do tej pory wykonano badania chromosomów plemnikowych u 8 nosicieli translokacji robertsonowskich, rozpoznanych w badaniach rodzinnych lub przypadkowo, uzyskując metodą penetracji oocytów chemicznych 776 kariotypów (tab. 1). Wzór segregacji mejotycz-



Rys. 4. Segregacja 3:0 – chromosomy par objętych translokacją: A – z komórki o kariotypie 24,X lub Y,+t(D;G); B – z komórki o kariotypie 21,Y lub X,-D,-G

TABELA 1. Wyniki badania kariotypów plemnikowych u nosicieli translokacji robertsonowskich

Autor	Aberracja	Segregacja (w %)			Liczba kariotypów
		N	P	3:0	
Balkan [2]	t(14;21)	87,5	12,5	–	24
Cozzi [13]	t(13;14)	94,5	5,5	–	73
Martin [54]	t(13;14)	73,5	26,5	–	117
Martin [56]	t(15;22)	89,6	10,4	–	115
Pellestor [65]	t(13;14)	91,3	7,7	–	78
Pellestor [66]	t(13;15)	89,6	10,4	–	67
Syme [74]	t(15;22)	90,2	8,5	1,3	153
Syme [75]	t(21;22)	96,6	2,7	0,7	149

Typy segregacji: N – naprzemienna; P – przyległa;

nej powstały po uśrednieniu danych przedstawia się następująco: segregacja naprzemienna 89,3%; przyległa 10,3%; 3:0 – 0,4%. W obrębie segregacji naprzemiennnej stwierdzono 46,4% kariotypów prawidłowych i 42,9% kariotypów zbalansowanych, co w przybliżeniu odpowiada spodziewanej proporcji 1:1. Podobnie jak w translokacjach wzajemnych, nie odnotowano wzrostu odsetka plemników z anomaliami chromosomowymi, które byłyby niezależne od aberracji strukturalnej (brak efektu międzychromosomowego).

Z badań tych wynika, że model domimującej segregacji naprzemiennnej u nosicieli translokacji robertsonowskich jest prawdziwy niezależnie od metody badawczej i sposobu doboru badanych. Ich wyniki wskazują, że ryzyko wystąpienia niezrównoważonego kariotypu u potomstwa mężczyzny, będącego nosicielem niehomologicznej translokacji robertsonowskiej jest niewielkie.

Translokacja robertsonowska między chromosomami homologicznymi powstaje bardzo rzadko i w większości wypadków chromosom pochodny ma tylko jeden centromer [85]. Możliwy jest tylko jeden sposób segregacji, tak że powstają gamety o wyłącznie nieprawidłowych kariotypach: jedna z gamet zawiera chromosom pochodny (oba homologi), w drugiej brak chromosomów z pary objętej translokacją. Z tego powodu u potomstwa nosiciela może wystąpić wyłącznie trisomia lub monosomia danej pary chromosomów, przejawiające się najczęściej w postaci poronień samoistnych [79]. Badania chromosomów mejotycznych i plemnikowych nie były dotąd prowadzone u nosicieli tego typu aberracji, stąd brak danych o jej wpływie na przebieg mejozy u mężczyzn.

1.2. Translokacje wzajemne z udziałem chromosomów akrocentrycznych

Translokacje wzajemne z udziałem chromosomu akrocentrycznego wykazują pewne podobieństwa do translokacji robertsonowskich. Badania nasienia wykonane

u ich nosicieli wykazały azoospermie [25] lub ciężką oligozoospermie [43, 48], a badanie histologiczne wskazywało na zredukowanie i zahamowanie spermatogenezy na etapach postmeiotycznych. Chociaż kompleksowe badania nosicieli oparte są na bardzo nielicznej grupie nieplodnych mężczyzn, wpływ takiej aberracji na rezultat spermatogenezy wydaje się być najbardziej destrukcyjny wśród translokacji wzajemnych [25].

Obserwacje dokonane w przebiegu mejozy wykazują istnienie dalszych podobieństw. Polegają one na występowaniu mniej lub bardziej ścisłego kontaktu między kwadriwalentem pachytenowym a chromosomami płci w większości komórek oraz powiązaniu między odsetkiem komórek, w których takie połączenie istnieje, a wartościami spermogramu [21, 25, 43, 48]. Zastosowanie mikroskopu elektronowego uwidoczniło zaburzenia parowania chromosomów tworzących kwadriwalent, szczególnie w okolicy miejsc pęknięcia oraz ramion krótkich chromosomów akrocentrycznych. Niesparowanie w obrębie miejsc pęknięcia wiąże się z bardziej ścisłym kontaktem z chromosomami płci, podczas gdy ograniczenie niesparowania do heterochromatyny krótkich ramion akrocentryków zwykle ogranicza połączenie pęcherzyka płciowego z ich wolnym końcem. Komputerowa rekonstrukcja jąder spermatocytów pierwszego rzędu potwierdziła zarówno występowanie niesparowanych odcinków w obrębie kwadriwalentu, jak i powiązania niesparowanych odcinków z chromosomami płci [35]. Oba te zjawiska uznawane są za przyczynę degeneracji komórek nabłonka płciowego i związanej z tym nieplodności, choć zaburzenia parowania wydają się odgrywać bardziej istotną rolę.

Interesujący rezultat przyniosło badanie mężczyzny będącego nosicielem nie zrównoważonej translokacji wzajemnej (11;15). Z uwagi na utratę materiału pochodzącego z terminalnego odcinka ramienia długiego chromosomu 11 i krótkiego ramienia chromosomu 15 w pachytenie utworzył się triwalent. Mimo nie zrównoważenia translokacji jej wpływ na spermatogenezę i mejozę nie odbiegał od opisanych poprzednio translokacji z udziałem akrocentryku [36].

Należy nadmienić, że wśród wszystkich translokacji wzajemnych poddanych badaniu chromosomów plemnikowych, nosiciele tego typu translokacji charakteryzowali się najwyższym odsetkiem plemników z nieprawidłowym kariotypem – t(11;22), t(8;15). W tej grupie odnotowano też największe odstępstwa od uśrednionego wzoru segregacji oraz najmniejszą liczbę możliwych od uzyskania kariotypów – t(5;13), t(6;14), t(7;14) (porównaj z tabelą 1 w części I [3]).

2. CYTOGENETYKA MEJOZY U MĘŻCZYZN-NOSICIELI INWERSJI

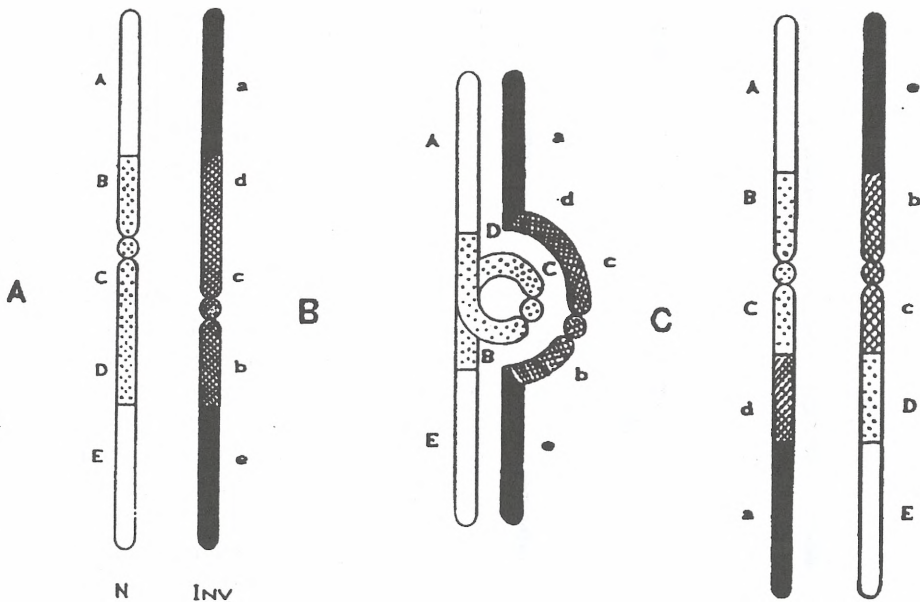
2.1. INWERSJE PERICENTRYCZNE

Inwersja pericentryczna, czyli okołowcentromerowa polega na odwróceniu odcinka chromosomu o 180° , tak że centromer jest zlokalizowany pomiędzy punktami pęknięcia. Asymetria odcinków leżących po obu stronach centromeru powoduje zmianę

morfologii chromosomu, co ułatwia wykrycie większości tego typu aberracji (rys. 5A). Inwersje pericentryczne stanowią przeważającą większość wszystkich inwersji. Mogą występować we wszystkich chromosomach, najczęściej dużych i średnich z grup A, B i C, rzadziej D i F [31]. Niektóre inwersje pericentryczne są uznawane za cechy polimorficzne [39, 45, 78]. Dotyczy to odwrócenia heterochromatyny okołocentromerowej chromosomów 1 (p11q12), 3 (p13q12), 9 (p12q13) i Y (p11q11). Ich znaczenie, w tym wpływ na rozród człowieka, jest dyskutowane i nie wyjaśnione do końca [10, 71].

Inwersje pericentryczne będące aberracjami zrównoważonymi z reguły nie wywołują zmian fenotypowych u nosiciela i mogą być dziedziczone bezobjawowo przez wiele pokoleń [5]. Mogą jednak wpływać na proces rozmnażania: powodując poronienia samoistne [37, 46, 84] lub niepłodność u mężczyzn. Badania nasienia wykonane u mężczyzn z zaburzeniami płodności najczęściej ujawniają oligozoospermie, rzadziej azoospermie [19]. Biopsja jąder w takich wypadkach zwykle wykazuje osłabienie aktywności spermatogenicznej na wszystkich jej etapach, a przy azoospermii – brak komórek płąciowych.

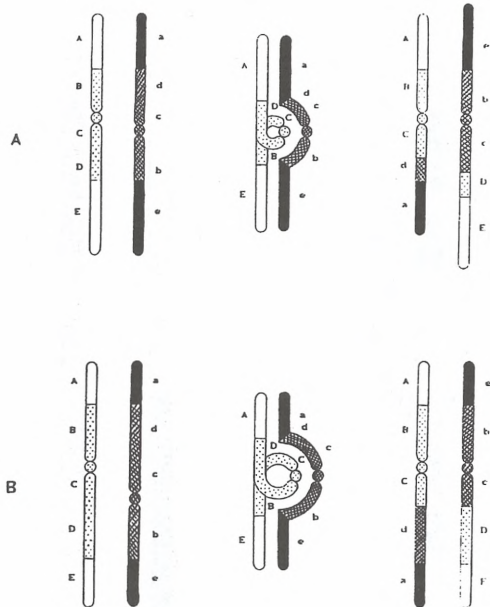
Podczas profazy mejozy chromosomy tworzą biwalent, przy czym zjawisko parowania w odwróconym odcinku najprawdopodobniej jest związane z jego długością [17, 45]. Jeśli jest on krótki, może wystąpić całkowity brak parowania (asynapsis) lub parowanie niehomologiczne (heterosynapsis). W obu wypadkach biwalent ma



Rys. 5. Chromosomy u nosiciela inwersji pericentrycznej: A – chromosomy w komórce somatycznej: N – chromosom normalny; Inv – chromosom z inwersją; B – pętla inwersyjna w pachytenie; C – zrekombinowane chromosomy przy punkcie pęknięcia między C i D: dup(p) del(q) i dup(q) del(p)

kształt liniowy, a w odwróconym odcinku ma miejsce supresja powstawania chiazm, co uniemożliwia rekombinację. Dłuższy fragment będzie wymagał powstania pętli inwersyjnej (rys. 5B), w obrębie której występuje parowanie homologiczne (homosynapsis), przy czym większa długość fragmentu zwiększa szansę na wytworzenie chiazm i rekombinację. Zaproponowano też inną teorię pozwalającą przewidzieć sposób parowania chromosomów oparty na lokalizacji miejsc pęknięć w obrębie heterochromatyny i euchromatyny. W jej myśl, pęknięcia w obrębie jasnych prążków G (euchromatyna) promują powstawanie pętli, podczas gdy pęknięcia w obrębie ciemnych prążków G (heterochromatyna) powodują liniowe parowanie niehomologiczne [20]. W dotychczas wykonanych badaniach mejotycznych z zastosowaniem mikroskopii elektronowej, zgodnie z tą teorią w trzech przypadkach pęknięć w jasnych prążkach G, obserwowano powstawanie pętli [4, 26, 40]. W kolejnych czterech, gdzie pęknięcia były zlokalizowane w ciemnych prążkach G, stwierdzano brak pętli [8, 27, 29, 70], mimo że w trzech przypadkach odwrócony odcinek obejmował ponad 70% długości chromosomu [8, 27, 29].

Segregacja mejotyczna inwersji pericentrycznej jest stosunkowo prosta. Jeśli nie nastąpiła rekombinacja, do połowy gamet trafia chromosom prawidłowy, a do pozostałych chromosom z inwersją. W wypadku rekombinacji w obrębie odwróconego



Rys. 6. Zależność między wielkością odwróconego odcinka a wielkością niezrównoważenia chromosomowego po rekombinacji: A – mały odcinek, B – duży odcinek

odcinka (rys. 5B) powstają dwa chromosomy jednocentromerowe nierównej lub równej długości (rys. 5C), z duplikacją i delecją tym większą, im mniejszy odcinek uległ inwersji. Analogicznie do wcześniej opisanych translokacji, wystąpienie niezrównoważonego kariotypu z aberracją strukturalną zostało określone jako aneusomia rekombinacyjna.

Ryzyko urodzenia dzieci z aneusomią rekombinacyjną wydaje się być niewielkie. Ponieważ mały fragment daje po zrekombinowaniu większe niezrównoważenie chromosomowe (rys. 6A), zmniejszające szanse przeżycia do porodu, największe szanse na urodzenie dziecka z taką aberracją mają nosiciele, u których odwrócony fragment ma dość duże rozmiary (rys. 6B). Wartość graniczna jest oceniana na 30–33% długości chromosomu [80, 83].

Badania chromosomów plemnikowych były wykonane u 6 nosicieli inwersji pericentrycznych (tab. 2). W trzech przypadkach stosunkowo długich

TABELA 2. Wyniki badania kariotypów plemnikowych u nosicieli inwersji pericentrycznych i nosiciela inwersji paracentrycznej

Autor	Inwersja	Segregacja (w %)			Liczba kariotypów
		N	I	R	
Balkan [1]	3 (p11q11)	57,7	42,3	–	111
Jenderny [42]	20 (p13q11)	53,8	46,2	–	26
Martin [53]	7 (q11q22)	36,1	62,7	–	94
Martin [55]	3 (p25q21)	37,6	31,6	30,8	133
Martin [57]	8 (p23q22)	47,5	41,1	11,4	158
Martin [58]	1 (p31q12)	45,9	54,1	–	157
Navarro [64]	7 (p13q36)	37,9	37,1	25,0	140

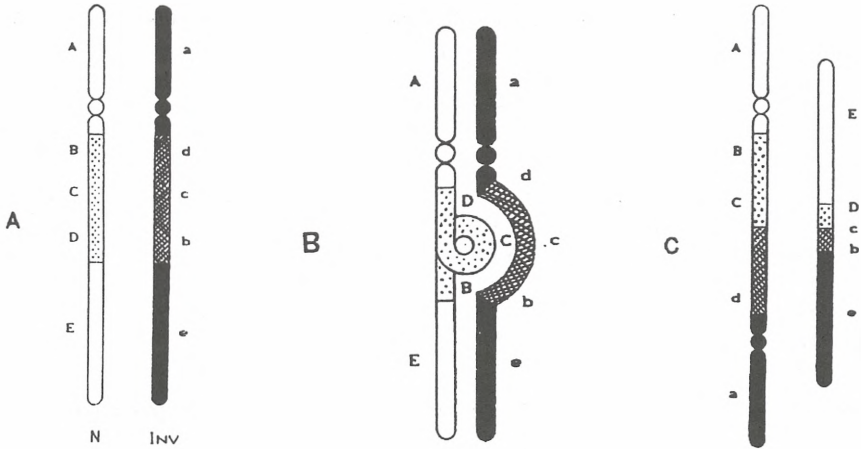
Segregacja: N – kariotypy prawidłowe; I – kariotypy z inwersją; R – kariotypy z rekombinacją

inwersji z punktami pęknięć w jasnych prążkach G, obserwowano pewien odsetek kariotypów będących wynikiem rekombinacji [55, 57, 64]. W dwóch przypadkach krótkich inwersji z punktami pęknięć w ciemnych prążkach G rekombinacji nie stwierdzono [1, 58]. Ostatni przypadek pozostaje w sprzeczności z oczekiwaniami: mimo znacznej długości i pęknięć w jasnych prążkach G badanie niewielkiej ilości kariotypów nie wykazało rekombinacji [42]. Obecnie zbyt mała liczba analizowanych przypadków nie pozwala wyciągnąć ostatecznych wniosków co do teorii, tłumaczącej wystąpienie rekombinacji mejozy u nosiciela inwersji pericentrycznej.

Opisano dwa przypadki nosicieli podwójnej inwersji. Pierwszy z nich dotyczył nieplodnego mężczyzny z azoospermia i dwoma różnymi inwersjami pericentrycznymi chromosomu 9 [14]. Drugi to rodzinny przypadek inwersji chromosomów 1 i 9, w którym spermatogeneza i przebieg mejozy nie różniły się od typowego obrazu stwierdzanego u nosicieli pojedynczej inwersji [33].

2.2. INWERSJE PARACENTRYCZNE

Inwersje paracentryczne są zlokalizowane w obrębie jednego z ramion chromosomu (rys. 7A). Odwrócenie małego fragmentu zlokalizowanego poza centromerem nie powoduje zmiany morfologii chromosomu, dlatego do rozpoznania tego rodzaju aberracji konieczne jest zastosowanie barwienia prążkowego. Inwersje paracentryczne są rzadko spotykaną aberracją, np. nie były opisywane w badaniach noworodków prowadzonych na dużych populacjach, a w badaniach prenatalnych wykrywano przypadkowo pojedyncze przypadki [38, 41]. Również w badaniach mężczyzn o obniżonej płodności stwierdzono pojedynczych nosicieli inwersji paracentrycznych: chromosomów 1 (q12q21) i 10 (q11q25) [12], chromosomu 14 [15] oraz chromosomu 11 (q21q23) [49]. We wszystkich tych przypadkach stwierdzono oligozoospermie, jednak zwykle nosiciele są zdolni do rozrodu i aberracja dziedziczy się niekiedy przez



Rys. 7. Chromosomy u nosiciela inwersji paracentrycznej: A – chromosomy w komórce somatycznej; N – chromosom normalny; Inv – chromosom z inwersją B – pętla inwersyjna w pachytenie; C – zrekombinowane chromosomy przy punkcie pęknięcia między C i D: dic rec i ace rec

wiele pokoleń [50, 81]. Opisano inwersje paracentryczne wszystkich chromosomów, najczęściej dużych: 3, 7, 11, 14 [11, 32], natomiast stosunkowo rzadko spotykane są inwersje małych chromosomów: 17, 18, 19, 20, 21, 22 i Y [67].

Do tej pory nie przeprowadzono badań mejotycznych u nosiciela inwersji paracentrycznej, dlatego nie dysponujemy danymi o zachowaniu tej aberracji podczas mejozy u człowieka. Należy się jednak spodziewać, że podobnie jak w inwersjach pericentrycznych w profazie chromosomy tworzą biwalent. Może wystąpić całkowity brak parowania (asynapsis), parowanie niehomologiczne (heterosynapsis) lub parowanie homologiczne (homosynapsis). W dwóch pierwszych wypadkach biwalent ma kształt liniowy, a w odwróconym odcinku ma miejsce supresja powstawania chiazm, co uniemożliwia rekombinację. W ostatnim wypadku powstaje pętla inwersyjna, w obrębie której mogą powstać chiazmy i nastąpić rekombinacja (rys. 7B). Szansa na wytworzenie chiazm i rekombinację rośnie wraz z długością odwróconego fragmentu.

Możliwa jest dwójaka segregacja mejotyczna biwalentu. Jeśli nie doszło do rekombinacji, do połowy gamet trafi chromosom prawidłowy, do połowy – chromosom z inwersją. W wypadku rekombinacji w obrębie pętli inwersyjnej powstają fragment acentryczny i chromosom dwucentromerowy (rys. 7C). Fragment acentryczny podlega utracie w trakcie podziałów, natomiast zachowanie dicentryka jest bardziej skomplikowane. Połączenie obu centromerów z jednym biegunem wrzeczona powoduje jego odziedziczenie w całości, wywołujące duplikację odcinków chromosomowych zlokalizowanych poza pętlą. Jeśli centromery będą przesuwały się do przeciwnych biegunów, powstanie mostek chromatydowy, który podczas anafazy pęka w przypadkowym miejscu, tak że do komórek potomnych trafiają dwa nierównej długości chromosomy monocentryczne z różnej wielkości duplikacjami lub delecjami. Odnotowano też przypadki aneusomii, których mechanizm powstania tłumaczony jest zaburzeniami rekombinacji: nierównomierny crossing-over u podstawy pętli, powo-

dujący małą interstycjalną delecję lub duplikację [62], pęknięcie i połączenie chromatyd w kształcie litery U, powodujące duplikację lub delecje fragmentu pętli [61], oraz połączenie miejsca pęknięcia z telomerem siostrzanej chromatydy przy dystalnym położeniu odwróconego odcinka [68].

Obserwacje potomstwa wskazują na niskie ryzyko urodzenia dziecka z aneusomią rekombinacyjną. Stosunkowo duże niezrównoważenie chromosomowe wywołane rekombinacją zmniejsza zdolność do przeżycia zarodków o nieprawidłowych kariotypach, powodując ich eliminację we wczesnym okresie ciąży [24]. Fakt, że w grupie nosicieli zwykle nie odnotowuje się podwyższonej częstości poronień lub bezpłodności [32], wydaje się świadczyć o rzadko występującej rekombinacji mejotycznej w obrębie odwróconego odcinka. Prawdopodobnie dlatego niezrównoważone kariotypy u potomstwa zaobserwowano tylko u dwojga dzieci, które odziedziczyły dicentryk pochodzenia matczynego [62, 86]. Należy zaznaczyć, że jedynie wymienione przypadki aneusomii z obecnością dicentryka są bezdyskusyjnie wywołane inwersjami paracentrycznymi u rodziców. Znanych jest też 14 przypadków, w których stwierdzono chromosomy jednocentromerowe z małymi delecjami lub duplikacjami interstycjalnymi [67]. Jednak ich powstanie daje się także wytłumaczyć przez zaburzenia mejotyczne w innym typie aberracji (insercje) [6, 51].

Badanie chromosomów plemnikowych wykonano jak dotąd tylko u jednego nosiciela inwersji paracentrycznej inv(7q). Jego wynik wskazuje na brak rekombinacji i potwierdza niskie ryzyko związane z rozrodem [53]. Jest jednak możliwe, że część drobnych inwersji paracentrycznych pozostaje niewykrytych i może ujawniać się u potomstwa powodując wady wrodzone związane z drobną delecją lub duplikacją mylnie interpretowaną jako aberracja powstała *de novo* [62].

LITERATURA

- [1] BALKAN W, BURNS K, MARTIN RH. Sperm chromosome analysis in a male heterozygous for a pericentric inversion of chromosome number 3. *Cytogenet Cell Genet* 1983;**35**:295–297.
- [2] BALKAN W, MARTIN RH. Segregation of chromosomes into the spermatozoa of a man heterozygous for a 14;21 Robertsonian translocation. *Am J Med Genet* 1983;**16**:169–172.
- [3] BARCZYK A. Cytogenetyka męskiej gametogenezy. Część I. Translokacje wzajemne. *Post Biol Kom* 1995;**22**:113–129.
- [4] BATANIAN J, HULTEN MA. Electron microscopic investigations of synaptonemal complexes in an infertile human male carrier of a pericentric inversion inv(1)(p32q42). *Hum Genet* 1987;**76**:81–89.
- [5] BOYD H, KASTE J, HOVI E, RITANEN-MOHAMMED UM, KÄÄRIÄINEN H, DE LA CHAPELLE A, LEHESJOKI AE. Familial pericentric inversion inv(8)(p23q11). *J Med Genet* 1994;**31**:201–205.
- [6] CALLEN DF, WOOLLATT E, SUTHERLAND G. Paracentric inversions in man. *Clin Genet* 1985;**27**:87–92.
- [7] CHANDLEY AC, HARGREAVE TB, FLETCHER JM. Translocation 21q22q in an infertile human male. *J Med Genet* 1982;**19**:366–369.
- [8] CHANDLEY AC, McBEATH S, SPEED RM, YORSTON L, HARGREAVE TB. Pericentric inversion in human chromosome 1 and the risk for male sterility. *J Med Genet* 1987;**24**:325–334.

- [9] CHEUNG SW, SUN L, FEATHERSTONE T. Molecular cytogenetic evidence to characterize breakpoint regions in Robertsonian translocations. *Cytogenet Cell Genet* 1990;**50**:97–102.
- [10] CHICHŁOWSKA-ŚLIWIŃSKA M, SAŚIADEK M, PAPROCKA, HAUS O, ŁUKASIK-MAJCHROWSKA M. Inwersja perycentryczna chromosomu 9 u małżeństw z niepowodzeniami rozrodu. *Post Med Klin Dośw* 1992;**1**:271–274.
- [11] CHODIRKER BN, GREENBERG CR, PABELLO PD, CHUDLEY AE. Paracentric inversion 11q in Canadian Hutterites. *Hum Genet* 1992;**89**:450–452.
- [12] COCO R, GALLEGO MS, BRUGO S, CARRERE C, NICHOLSON R. Cytogenetic findings in 301 sterile and/or infertile men with abnormal spermograms. *Medicina (B. Aires)* 1986;**46**:303–310.
- [13] COZZI J.: Analyse directe de ségrégation des translocations par l'étude des chromosomes de spermatozoïdes. These D.E.A., Grenoble, 1990.
- [14] CROQUETTE MF, COUTURIER J, DUTRILLAUX B, TURLEAU C, DE GROUCHY J. Présence chez un homme stérile de deux inversions péricentriques des chromosomes 9: inv(9)(p11q1209), inv(9)(pter q1209). *Ann Genet* 1979;**22**:53–56.
- [15] CROQUETTE MF, FOURLINNIE JC. Intérêt du caryotype dans les azoospermies et les oligoathénospermies sévères. *J Gyn Obst Biol Reprod* 1980;**9**:177–178.
- [16] CURTIS D, THOMAS A, WILLIAMS JL, LENTON E, COOKE ID. Cytogenetic and histological studies in a series of subfertile males. *Int J Androl* 1982;**5**:113–129.
- [17] DANIEL A. Structural differences in pericentric inversions. Application to a model of risk of recombinants. *Hum Genet* 1981;**56**:321–328.
- [18] DANIEL A, HOOK EB, WULF G. Risk of unbalanced progeny at amniocentesis to carriers of chromosome rearrangements: data from United States and Canadian laboratories. *Am J Med Genet* 1989;**31**:14–53.
- [19] DE BRAEKELEER M, DAO TN. Cytogenetic studies in male infertility: a review. *Hum Reprod* 1991;**6**:245–250.
- [20] DE PERDIGO A, GABRIEL-ROBEZ O, RUMPLER Y. Correlation between chromosomal breakpoints and synaptic behaviour in human males heterozygous for a pericentric inversion. *Hum Genet* 1989;**83**:274–276.
- [21] DE PERDIGO A, GABRIEL-ROBEZ O, RUMPLER Y. Analysis of synaptonemal complexes in a heterozygous human male carrier of reciprocal translocation involving an acrocentric chromosome: heterosynapsis without previous homosynapsis. *Hum Genet* 1991;**87**:602–606.
- [22] EARLE E, SHAFFER LG, KALITSIS P, McQUILLAN C, CHOO KH. Identification of DNA sequences flanking the breakpoint of human t(14q21q) Robertsonian translocations. *Am J Hum Genet* 1992;**50**:717–724.
- [23] FAED MJW, LAMONT MA, BAXBY K. Cytogenetic and histological studies of testicular biopsies from subfertile men with chromosome anomaly. *J Med Genet* 1982;**19**:49–56.
- [24] FRYNS JP, KLECZKOWSKA A, VAN DEN BERGHE H. Paracentric inversions in man. *Hum Genet* 1986;**73**:205–213.
- [25] GABRIEL-ROBEZ O, RATOMPONIRINA C, DUTRILLAUX B, CARRÉ-PIGEON F, RUMPLER Y. Meiotic association between the XY chromosomes and the autosomal quadrivalent of a reciprocal translocation in two infertile men, 46,XY,t(19;22) and 46,XY,t(17;21). *Cytogenet Cell Genet* 1986;**43**:154–160.
- [26] GABRIEL-ROBEZ O, RATOMPONIRINA C, RUMPLER Y, LE MAREC B, LUCIANI JM, GUICHAOUA MR. Synapsis and synaptic adjustment in an infertile human male heterozygous for a pericentric inversion in chromosome 1. *Hum Genet* 1986;**72**:148–152.
- [27] GABRIEL-ROBEZ O, RATOMPONIRINA C, CROQUETTE MF, MAETZ JL, COUTURIER J, RUMPLER Y. Reproductive failure and pericentric inversion in man. *Andrologia* 1987;**19**:662–669.

- [28] GABRIEL-ROBEZ O, RATOMPONIRINA C, CRANZ C, WEILL A, GOLDSCHMIT PA, BOLLACK C, RUMPLER Y. Robertsonian heterozygosity and male sterility. *Andrologia* 1988;**20**:463–466.
- [29] GABRIEL-ROBEZ O, RATOMPONIRINA C, CROQUETTE MF, COUTURIER J, RUMPLER Y. Synaptonemal complexes in a subfertile man with a pericentric inversion in chromosome 21. Heterosynapsis without previous homosynapsis. *Cytogenet Cell Genet* 1988;**48**:84–87.
- [30] GRAVHOLT CH, FRIEDRICH U, CAPRANI M, JORGENSEN AL. Breakpoints in Robertsonian translocations are localized to satellite III DNA by fluorescence *in situ* hybridisation. *Genomics* 1992;**14**:924–930.
- [31] GROUPE DE CYTOGÉNÉTICIENS FRANÇAIS. Pericentric inversions in man. A French collaborative study. *Ann Genet* 1986;**29**:129–168.
- [32] GROUPE DE CYTOGÉNÉTICIENS FRANÇAIS. Paracentric inversions in man. A French collaborative study. *Ann Genet* 1986;**29**:169–176.
- [33] GUICHAIOUA MR, GABRIEL-ROBEZ O, RATOMPONIRINA C, DELAFONTAINE D, LE MAREC B, TAILLEMITE JL, RUMPLER Y, LUCIANI JM. Meiotic behaviour of familial pericentric inversions of chromosomes 1 and 9. *Ann Genet* 1986;**29**:207–214.
- [34] GUICHAIOUA MR, QUACK B, SPEED RM, NOEL B, CHANDLEY AC, LUCIANI JM. Infertility in human males with autosomal translocations: meiotic study of a 14;22 Robertsonian translocation. *Hum Genet* 1990;**86**:162–166.
- [35] GUICHAIOUA MR, DE LANVERSIN A, CATALDO C, DELAFONTAINE D, ALASIA C, FRATERNO M, TERRIOU P, STAHL A, LUCIANI JM. Three dimensional reconstruction of human pachytene spermatocyte nuclei of 17;21 reciprocal translocation carrier: study of XY-autosome relationships. *Hum Genet* 1991;**87**:709–715.
- [36] GUICHAIOUA MR, SPEED RM, LUCIANI JM, DELAFONTAINE D, CHANDLEY AC. Infertility in human males with autosomal translocations. II. Meiotic studies in three reciprocal rearrangements, one showing tertiary monosomy in a 45-chromosome individual and his father. *Cytogenet Cell Genet* 1992;**60**:96–101.
- [37] HAAGERUP A, HERTZ JM. Pericentric inversion of chromosome 12; a three family study. *Hum Genet* 1992;**89**:292–294.
- [38] HOOK EB, HEALY NP, WILLEY AM. How much difference does chromosome banding make? *Ann Hum Genet* 1989;**59**:237–242.
- [39] HSU LYF, BENN PA, TANNENBAUM HL, PERLIS TE, CARLSON AD. Chromosomal polymorphisms of 1, 9, 16, and Y in 4 major ethnic groups: A large prenatal study. *Am J Med Genet* 1987;**26**:95–101.
- [40] HULTEN MA, SAADALLAH N, BATANIAN J. Meiotic chromosome pairing in the human male: experience from surface spread synaptonemal complexes. *Chromosomes Today* 1987;**9**:218–226.
- [41] JACOBS PA, BROWNE C, GREGSON N, JOYCE C, WHITE H. Estimates of the frequency of chromosome abnormalities detectable in unselected newborns using moderate levels of banding. *J Med Genet* 1992;**29**:103–108.
- [42] JENDERNY J, GEBAUER J, ROHRBORN G, RUGER A. Sperm chromosome analysis in man heterozygous for a pericentric inversion of chromosome 20. *Hum Genet* 1992;**89**:117–119.
- [43] JOHANNISSON R, LÖHRS U, WOLFF HH, SCHWINGER E. Two different XY-quadrivalent associations and impairment of fertility in men. *Cytogenet Cell Genet* 1987;**45**:222–230.
- [44] JOHANNISSON R, SCHWINGER E, WOLFF HH, VOM ENDE V, LÖHRS U. The effect of 13;14 Robertsonian translocations on germ-cell differentiation in infertile males. *Cytogenet Cell Genet* 1993;**63**:151–155.
- [45] KAISER P. Pericentric inversions: their problems and clinical significance. [w] Daniel A. The Cytogenetics of Mammalian Autosomal Rearrangements. New York: A.R. Liss Inc. 1988: 183–247.

- [46] LINDBERG L, PELTO K, BORGSTRÖM GH. Familial pericentric inversion (3)(p12q24). *Hum Genet* 1992;**89**:433–436.
- [47] LUCIANI JM, GUICHAIOUA MR, MATTEI A, MORAZZANI MR. Pachytene analysis of a man with a 13q;14q translocation and infertility. *Cytogenet Cell Genet* 1984;**38**:14–22.
- [48] LUCIANI JM, GUICHAIOUA MR, DELAFONTAINE D, NORTH MO, GABRIEL-ROBEZ O, RUMPLER Y. Pachytene analysis in a 17;21 reciprocal translocation carrier: role of the acrocentric chromosomes in male sterility. *Hum Genet* 1987;**77**:246–250.
- [49] MADAN K, SEABRIGHT M, LINDENBAUM RH, BOBROW M. Paracentric inversions in man. *J Med Genet* 1984;**21**:407–412.
- [50] MADAN K, PIETERS MHEC, KUYT LP, van ASPEREN CJ, de PATER JM, HAMERS AJH, GERSSEN-SCHOORL KBJ, HUSTINX TWJ, BRREED ASPM, VAN HEMEL JO, SMEETS DFCM. Paracentric inversion inv(11)(q21q23) in the Netherlands. *Hum Genet* 1990;**85**:15–20.
- [51] MADAN K, MENKO FH. Interchromosomal insertions: a case report and a review. *Hum Genet* 1992;**89**:1–9.
- [52] MARMOR D, TAILLEMITE JL, VAN DEN AKKER J, PORTNOI MF, LE PORRIER N, JIYE N, DELAFONTAINE D, ROUX C. Semen analysis in subfertile balanced-translocation carriers. *Fertil Steril* 1980;**34**:496–502.
- [53] MARTIN RH. Sperm chromosome analysis in man heterozygous for a paracentric inversion of chromosome 7(q11q22). *Hum Genet* 1986;**73**:97–100.
- [54] MARTIN RH. Cytogenetic analysis of sperm from a male heterozygous for a 13;14 Robertsonian translocation. *Hum Genet* 1988;**80**:357–361.
- [55] MARTIN RH. Cytogenetic analysis of sperm from a man heterozygous for a pericentric inversion, inv(3)(p25q21). *Am J Hum Genet* 1991;**48**:856–861.
- [56] MARTIN RH, KO E, HILDEBRAND K. Analysis of sperm chromosome complements from a man heterozygous for a Robertsonian translocation 45,XY,(15q;22q). *Am J Med Genet* 1992;**43**:855–857.
- [57] MARTIN RH. Analysis of sperm chromosome complements from a man heterozygous for a pericentric inversion, inv(8)(p23q22). *Cytogenet Cell Genet* 1993;**62**:199–202.
- [57] MARTIN RH, CHERNOS JE, LOWRY BR, PATTINSON HA, BARCLAY L, KO E. Analysis of sperm chromosome complements from a man heterozygous for a pericentric inversion of chromosome 1. *Hum Genet* 1994;**93**:135–138.
- [59] MIČIĆ MD, NIKOLIŠ JG, MIČIĆ SR. 13/14 translocation in man with reproductive failure. *Hum Genet* 1980;**55**:137–139.
- [60] MIČIĆ M, MIČIĆ S, DIKLJIĆ V. Chromosomal constitution of infertile men. *Clin Genet* 1984;**25**:33–36.
- [61] MITCHELL JJ, VEKEMANS M, LUSCOMBE S, HAYDEN M, WEBER B, RICHTER A, SPARKES R, KOJIS T, WATTERS G, DER KALOUSTIAN VM. U-type exchange in a paracentric inversion as a possible mechanism of origin of inverted tandem duplication of chromosome 8. *Am J Med Genet* 1994;**49**:384–387.
- [62] MULES EH, STAMBERG J. Reproductive outcomes of paracentric inversion carriers: report of liveborn dicentric recombinant and literature review. *Hum Genet* 1984;**67**:126–131.
- [63] NAVARRO J, VIDAL F, BENET J, TEMPLADO C, MARINA S, EGOZCUE J. XY-trivalent association and synaptic anomalies in a male carrier of a Robertsonian t(13;14) translocation. *Hum Reprod* 1991;**6**:376–381.
- [64] NAVARRO J, BENET J, MARTORELL MR, TEMPLADO C, EGOZCUE J. Segregation analysis in man heterozygous for a pericentric inversion of chromosome 7(p13;q36) by sperm chromosome studies. *Am J Hum Genet* 1993;**53**:214–219.
- [65] PELLESTOR F, SELE B, JALBERT H. Chromosome analysis of spermatozoa from a male heterozygous for a 13;14 Robertsonian translocation. *Hum Genet* 1987;**76**:116–120.

- [66] PELLESTOR F. Analysis of meiotic segregation in man heterozygous for a 13;15 Robertsonian translocation and review of the literature. *Hum Genet* 1990;**85**:49–54.
- [67] PETTENATI MJ, RAO PN, PHELAN MC, GRASS F, RAO KW, COSPER P, CARROLL AJ, ELDER F, SMITH JL, HIGGINS MD, LANMAN JT, HIGGINS RR, BUTLER MG, LUTHARDT F, KEITGES E, JACKSON-COOK C, BROWN J, SCHATZ S, VAN DYKE DL, PALMER CG. Paracentric inversions in humans: a review of 446 paracentric inversions with presentation of 120 new cases. *Am J Med Genet* 1995;**55**:171–187.
- [68] PHELAN MC, STEVENSON RE, ANDERSON AJR. Recombinant chromosome 9 possibly derived from breakage and reunion of sister chromatids within a paracentric inversion loop. *Am J Med Genet* 1993;**46**:304–308.
- [69] ROSENMAN A, WAHRMAN J, RICHLER C, VOSS R, PERSITZ A, GOLDMAN B. Meiotic association between the XY chromosomes and unpaired autosomal elements as a cause of human male sterility. *Cytogenet Cell Genet* 1985;**39**:19–29.
- [70] SAADALLAH N, HULTEN M. EM investigations of surface spread synaptonemal complexes in a human male carrier of a pericentric inversion inv(13)(p12q14): the role of heterosynapsis for spermatocyte survival. *Ann Hum Genet* 1986;**50**:369–383.
- [71] SCARINCI R, ANICHINI C, VIVARELLI R, BERARDI R, PUCCIL, ROSAIA L, TOMAC-CINI D. Correlazioni fra fenotipo clinico ed inversioni pericentriche del cromosoma 9. *Boll Soc Ital Biol Sper* 1992;**68**:175–181.
- [72] STENE J, STENDEL-RUTKOWSKI S. Genetic risk of familial reciprocal and Robertsonian translocation carriers. [w] *The Cytogenetics of Mammalian Rearrangements*. Alan R. Liss, Inc. 1988:3–72.
- [73] SULLIVAN BA, WOLFF DJ, SCHWARTZ S. Analysis of centromeric activity in Robertsonian translocations: implications for a functional acrocentric hierarchy. *Chromosoma* 1994;**103**:459–467.
- [74] SYME RM, MARTIN RH. Meiotic segregation of sperm chromosomes in a man heterozygous for a 15;22 Robertsonian translocation. *Am J Hum Genet* 1989;**45** Suppl.:A107.
- [75] SYME RM, MARTIN RH. Meiotic segregation of a 21;22 Robertsonian translocation. *Hum Reprod* 1992;**7**:825–829.
- [76] TEMPLADO C, VIDAL F, NAVARRO J, MARINA S, EGOZCUE J. Meiotic studies and synaptonemal complex analysis in two infertile males with a 13/14 balanced translocation. *Hum Genet* 1984;**67**:162–165.
- [77] THERMAN E, SUSMAN B, DENNISTON C. The nonrandom participation of human acrocentric chromosomes in Robertsonian translocations. *Ann Hum Genet* 1989;**53**:49–65.
- [78] THERMAN E, SUSMAN M. Structurally abnormal human autosomes. [w] Therman E, Susman M. *Human Chromosomes. Structure, Behaviour, and Effects*. 3rd ed. New York: Springer-Verlag 1993:254–272.
- [79] THERMAN E, SUSMAN M. Robertsonian translocations. [w] Therman E, Susman M. *Human Chromosomes. Structure, Behaviour, and Effects*. 3rd ed. New York: Springer-Verlag 1993:288–301.
- [80] TRUNCA C, OPITZ JM. Pericentric inversion of chromosome 14 and the risk of partial duplication of 14q (14q31→14qter). *Am J Med Genet* 1977;**1**:217–228.
- [81] VENTER PA, DAWSON B, DU TOIT JL, SMITH EL, KRITZINGER N, LANDMAN AS, CRONJE AS, OP'T HOF J. A familial paracentric inversion: a short review of the current status. *Hum Genet* 1984;**67**:121–125.
- [82] VIDAL F, TEMPLADO C, NAVARRO J, MARINA S, EGOZCUE J. Meiotic and synaptonemal complex studies in a 14/21 translocation carrier. *Int J Androl* 1982;**5**:21–26.
- [83] WINSOR EJT, PALMER CG, ELLIS PM, HUNTER JLP, FERGUSON-SMITH MA. Meiotic analysis of a pericentric inversion, inv(7)(p22q32), in the father of a child with duplication-deletion of chromosome 7. *Cytogenet Cell Genet* 1978;**20**:169–184.

- [84] WOLF GC, MAO J, IZQUIERDO L, JOFFE G. Paternal pericentric inversion of chromosome 4 as a cause of recurrent pregnancy loss. *J Med Genet* 1994;**31**:153–155.
- [85] WOLFF DJ, SCHWARTZ S. Characterisation of Robertsonian translocations by using fluorescence *in situ* hybridisation. *Am J Hum Genet* 1992;**50**:174–181.
- [86] WORSHAM MJ, MILLER DA, DEVRIES JM, MITCHELL AR, BABU VR, SURLI V, WEISS L, VAN DYKE DL. A dicentric recombinant 9 derived from a paracentric inversion: phenotype, cytogenetics, and molecular analysis of centromeres. *Am J Hum Genet* 1989;**44**:115–123.

Otrzymano: 29.05.1995 r.

Przyjęto: 23.10.1995 r.

Adres autora: 90-647 Łódź, Pl. gen. Hallera 1

POWTÓRZENIA SEKWENCJI MIKROSATELITARNYCH W GENOMIE CZŁOWIEKA

REPEATS OF MICROSATELLITE SEQUENCES IN HUMAN GENOME

Jolanta KWIATKOWSKA², Ryszard SŁOMSKI^{1,2,3}

¹Zakład Genetyki Człowieka Polskiej Akademii Nauk, Poznań

²Katedra Biochemii i Biotechnologii Akademii Rolniczej, Poznań

³Laboratorium Genetyki Molekularnej, Poznań

Streszczenie: Sekwencje powtórzone stanowią około 30% genomu człowieka. Sekwencje te występują w tandemowych blokach lub są rozproszone w genomie. Na podstawie wielkości jednostki powtórzonej, częstości i miejsca występowania w chromosomie podzielono sekwencje powtórzone na sekwencje satelitarne, minisatelitarne i mikrosatelitarne. Sekwencje minisatelitarne i mikrosatelitarne charakteryzują się wysokim polimorfizmem i dlatego znalazły praktyczne zastosowanie w diagnostyce molekularnej chorób genetycznych, w badaniach identyfikacyjnych oraz w dochodzeniu spornego ojcostwa.

Słowa kluczowe: Polimorfizm DNA, sekwencje mikrosatelitarne, tandemowe powtórzenia, diagnostyka molekularna

Summary: Approximately 30% of human genome consists of DNA repeats. These sequences are organised in tandem blocks or are interspersed in the genome. Classification of DNA repeats is based on size of repeated motif, frequency of occurrence and distribution on chromosomes and involve satellite, minisatellite and microsatellite sequences. Minisatellite and microsatellite sequences are highly polymorphic and this made them useful in molecular diagnostics of human diseases, identification studies and paternity disputes.

Key words: Polymorphism of DNA, microsatellite sequences, tandem repeats, molecular diagnostics

WSTĘP

W genomach *Eukaryota* poza sekwencjami kodującymi białka występują powtórzenia nukleotydów DNA. Stanowią one nawet do 20–30% genomu i warunkują polimorfizm DNA. Pierwsze doniesienia o polimorfizmie DNA pochodzą z prac

Chargaffa [6], który jeszcze przed poznaniem struktury DNA zauważył, że poszczególne gatunki można charakteryzować pod względem zawartości zasad G i C w DNA. Termin polimorfizm obejmuje wg Vogela i Motulsky'ego cechy dziedziczone zgodnie z prawami Mendla, które występują w populacji co najmniej w dwóch fenotypach i których częstość występowania przekracza 1% [24]. O polimorfizmie DNA decydują najczęściej pojedyncze zmiany sekwencji nukleotydów, które mogą być obecnie dość łatwo wykrywane, gdyż prowadzą do powstania lub zaniku charakterystycznych sekwencji rozpoznawanych przez enzymy restrykcyjne (RFLP). Polimorfizm DNA obserwowany w badaniach typu RFLP występuje w genomie co 200–300 par zasad (pz). Sekwencje polimorficzne nie są jednak równomiernie rozmieszczone w genomie. Polimorficzne sekwencje DNA, nie zmieniające miejsc restrykcji, mogą być obecnie wykrywane metodą PCR lub hybrydyzacji z sondami molekularnymi swoistymi dla określonych alleli (ASO). Polimorfizm DNA może wynikać również z występowania sekwencji powtórzonych w genomie człowieka. Sekwencje powtórzone zalicza się do dwóch grup: grupa I obejmuje sekwencje tworzące duże tandemowe bloki, w których jednostki powtarzające się występują kolejno po sobie, natomiast grupa II obejmuje sekwencje tworzące małe tandemowe bloki zgrupowane lub rozproszone w genomie.

Do grupy I sekwencji powtórzonych należy satelitarny DNA. Ten rodzaj DNA wykryto, zanim pojawiły się pierwsze prace o badaniach DNA metodą RFLP z zastosowaniem wirowania preparatów DNA w gradientach gęstości. Zaobserwowano satelitarny DNA jako pasma towarzyszące głównej frakcji genomowego DNA organizmów eukariotycznych. Sekwencje satelitarnego DNA różnią się od całkowitego DNA podwyższoną zawartością par GC. Liczba powtórzeń i częstość ich występowania stanowi charakterystyczną cechę danego gatunku. U człowieka występują 4 frakcje satelitarne i stanowią one blisko 6% całkowitego DNA. W poszczególnych frakcjach występują homologiczne sekwencje tzw. rodziny wspólnych sekwencji. Jedną z charakterystycznych cech sekwencji satelitarnych jest występowanie konserwatywnych motywów. Stosując sekwencje powtórzone gryzoni jako sondy molekularne w hybrydyzacji z DNA człowieka wykazano, że wysoce konserwatywna jest sekwencja (GGAAT) $_n$, która występuje u wszystkich *Eukaryota*.

Poza satelitarnym DNA do grupy I sekwencji powtórzonych należy kilka rodzin sekwencji. Jedną z rodzin – alfa satelitarny DNA – dominuje w genomie człowieka i sekwencje tej rodziny występują w centromerach wszystkich chromosomów. Innym przykładem rodziny sekwencji satelitarnego DNA są sekwencje beta satelitarne, zwane również rodziną Sau3A, które występują z częstością 4×10^4 w genomie człowieka.

W 1985 roku Jeffreys doniósł o występowaniu II grupy polimorficznych sekwencji DNA, które w odróżnieniu od sekwencji satelitarnych nazwano sekwencjami minisatelitarnymi [10]. Termin sekwencje minisatelitarne został wprowadzony do oznaczania konserwatywnych sekwencji rdzeniowych, w wyizolowanym polimorficznym fragmencie sekwencji powtórzonych. Jak się potem okazało, sekwencja GGGNNGTGGGG występuje w wielu opisanych dotychczas sekwencjach charakteryzujących się zmienną liczbą tandemowych powtórzeń i jest komplementarna do

sekwencji "chi" u *E. coli* [8,9]. Wkrótce po doniesieniach Jeffreysa, Nakamura i wsp. [18,19] opisali dalsze *loci* sekwencji minisatelitarnych, wykazali polimorfizm powtarzających się jednostek, jak również zaproponowali dla nich nazwę VNTR (ang. *variable number of tandem repeats*) – zmienna liczba tandemowych powtórzeń. Sekwencje minisatelitarne różnią się od sekwencji satelitarnych stopniem powtarzalności, długością jednostki powtarzającej, są bardziej rozproszone w genomie, chociaż wykazują tendencje do grupowania się w regionach telomerowych, szczególnie w chromosomach człowieka. Analiza sekwencji minisatelitarnych znalazła natychmiastowe zastosowanie w praktyce i pod nazwą DNA *fingerprinting* jest obecnie szeroko stosowana w badaniach pokrewieństwa, którego potrzeba zachodzi nie tylko w sprawach sądowych, lecz również niezbędna jest dla potrzeb medycznych w poradnictwie genetycznym, diagnostyce prenatalnej i transplantologii. Badania DNA *fingerprinting* są wykonywane rutynowo w ponad 30 krajach, a ich wartość potwierdzają wyniki prac wielośrodkowych [1].

Funkcja biologiczna minisatelitarnego DNA nie jest jeszcze wyjaśniona, nie mniej sekwencje zlokalizowane są w miejscach chromosomów, które są odpowiedzialne za tworzenie homologicznych par chromosomów i ich ewentualną rekombinację. Niektóre sekwencje powtórzone są wprawdzie przepisywane na matrycę RNA, ale nie kodują one aminokwasów cząsteczki białkowej. Funkcja tych sekwencji nie została dotychczas wyjaśniona. Przypuszcza się, że biorą one udział w procesach regulacji ekspresji genów, wpływają na trwałość transkryptów i przede wszystkim odpowiedzialne są za określoną strukturę poszczególnych chromosomów. Klasyfikacja sekwencji powtórzonych uwzględnia wielkość jednostki powtórzonej oraz częstość i miejsce występowania w chromosomie. Szczegółowa klasyfikacja i charakterystyka

TABELA 1. Charakterystyka powtórzeń DNA

Charakterystyka	Satelity	Minisatelity	Mikrosatelity
Częstość powtórzeń	10^3 – 10^7	2–400	5–100
Liczba loci	1–2/chromosom	4000	10^4 – 10^5
Jednostka powtórzenia	200–5000 pz	7–100 pz	1–6 pz
Lokalizacja	Heterochromatyna Centromery	Rozproszone Często telomery	Równomierna Często transkrybowane
Wykrywanie	Ultrawierowanie w gradiencie gęstości CsCl lub Ag–Cs ₂ SO ₄	Hybrydyzacja (1–20 tys. pz) PCR (100–1000 pz)	PCR (100–500 pz)
Zastosowanie	Identyfikacja chromosomów	Diagnostyka molekularna	Mapowanie genów Diagnostyka molekularna
Charakterystyczne motywy powtórzeń	Duża różnorodność	Duża różnorodność	A,AC,AAAT,AG,AT,AAAG
Występowanie	Człowiek, zwierzęta, rośliny, grzyby, bakterie	Człowiek, zwierzęta, rośliny, bakterie	Człowiek, zwierzęta

powtórzeń DNA została przedstawiona w artykule przeglądowym Kwiatkowskiej i Słomskiego [14], natomiast ogólna charakterystyka powtórzeń DNA przedstawiona jest w tabeli 1. W niniejszej pracy przedstawiono współczesne poglądy dotyczące jeszcze jednej grupy powtórzeń DNA, tzw. sekwencji mikrosatelitarnych, które podobnie jak sekwencje minisatelitarne należą do grupy II sekwencji powtórzonych. Na szczególną uwagę zasługują krótkie powtórzenia tandemowe (STR), których badania są obecnie najbardziej rozpowszechnione.

SEKWENCJE MIKROSATELITARNE

Sekwencje mikrosatelitarne tworzą proste, tandemowe powtórzenia, złożone z jednego do sześciu nukleotydów. Charakteryzują się wysokim polimorfizmem i występują równomiernie w genomie co 6–10 kbp. Polimorficzne sekwencje typu STR zostały opisane zarówno w genach, jak i między genami. Sekwencje mikrosatelitarne występujące w regionach genów występują nie tylko w intronach i w sekwencjach flankujących, ale również w sekwencjach kodujących. Litt i Luty [16] zaproponowali, aby te sekwencje w odróżnieniu od minisatelitów nazwać mikrosatelitami. W 1991 r. Edwards i wsp. [7] wprowadzili dodatkowo określenie STR (ang. *short tandem repeat*) – krótkie powtórzenia tandemowe. Ponad 90% przebadanych dotychczas sekwencji mikrosatelitarnych od mononukleotydów do tetranukleotydów wykazywały polimorfizm. W genomie człowieka najczęściej występuje 5 grup powtórzeń, przy czym A>AC>AAAB>AAB>AG (B oznacza cytozynę, guaninę lub tymidynę). Te 5 grup stanowi 76% wszystkich sekwencji mikrosatelitarnych. Około 12% tych sekwencji stanowią tandemy długości równej lub większej niż 40 nukleotydów. Prawie 80% sekwencji z grupy A, AAB, AAAB, 50% sekwencji typu AT oraz inne sekwencje mikrosatelitarne, charakteryzujące się niską częstością występowania w genomie człowieka, znajdują się w sąsiedztwie rozproszonych powtórzeń rodziny Alu. Polimorfizm sekwencji mikrosatelitarnych znalazł zastosowanie w diagnostyce molekularnej chorób człowieka, głównie w tzw. diagnostyce pośredniej, w której nie identyfikuje się molekularnego podłoża choroby. Do prześledzenia dziedziczenia zmutowanego genu wykorzystać można polimorfizm markera genetycznego, który wykazuje sekwencja mikrosatelitarna.

W ostatnich latach podjęto starania, aby określić rozproszenie i częstotliwość mikrosatelitów w genomach różnych organizmów. Najczęstszym sposobem było przeszukiwanie w tym celu sekwencji DNA w istniejących bankach genów [12,25,26]. Tego typu podejście badawcze okazało się szczególnie ważne w przypadku powtórzeń trzech nukleotydów, gdyż kilka chorób genetycznych, np.: zespół łamliwego chromosomu X, choroba Huntingtona, dystrofia miotoniczna, są wynikiem mutacji dynamicznych, w której dochodzi do zwiększenia liczby powtórzeń trzech nukleotydów. Niepokojący jest jednak fakt, że podawana liczba motywów mikrosatelitarnych różni się w poszczególnych opracowaniach [2,7,12] i nasuwa się pytanie, czy taka analiza może doprowadzić do jednoznacznych wyników. Beckman i Weber

[2] donieśli o występowaniu 10 trójnukleotydowych powtórzeń i 32 czteronukleotydowych, natomiast Kalaitsidaki i wsp. [12] opisali 14 możliwych powtórzeń trójnukleotydowych i 56 czteronukleotydowych. Jin i wsp. [11] opracowali teoretycznie możliwą liczbę motywów od jednego do sześciunukleotydowego powtórzenia i wynosi ona kolejno 4, 16, 64, 256, 1024 i 4096 motywów. Tabela 2 przedstawiająca wykaz powtórzeń 1-,2-,3-,4-,5-nukleotydowych jest ważna ze względu na ujednoczenie nazewnictwa powtórzeń sekwencji mikrosatelitarnych. Nadal np. homologiczny motyw powtórzeń $(CCG)_n$ w *locus* FRAXA i $(GGC)_n$ w *locus* FRAXE przedstawiany jest jako dwa różne motywy. Ponieważ sekwencje mikrosatelitarne ułożone są tandemowo, to niektóre motywy są równoważne względem innych np.: motyw $(GAAA)_n$ i motyw $(AAAG)_n$.

Dotychczas w diagnostyce pośredniej najbardziej użytecznymi były sekwencje $(CA)_n/(GT)_n$. Inne mikrosatelity, jak $(A)_n/(T)_n$ i $(AAAT)_n/(TTTA)_n$, wykazują również polimorfizmem i coraz częściej stosowane są w badaniach [22,23,28]. Obecnie w diagnostyce molekularnej najbardziej przydatne są sekwencje $(NNN)_n$ i $(NNNN)_n$, które w porównaniu z sekwencjami $(CA)_n/(GT)_n$ wykazują dwie istotne zalety – łatwiejszy rozdział elektroforetyczny i identyfikację poszczególnych alleli oraz mniejsze prawdopodobieństwo powstawania artefaktów wywołanych błędami polimerazy. Przydatność tych sekwencji ograniczona jest jednak ich mniejszą częstością występowania w genomie.

Większość sekwencji mikrosatelitarnych zlokalizowanych w sekwencjach Alu występuje w regionie 3' tych sekwencji w pozycji, w której zazwyczaj występują sekwencje poli(A). Trzy grupy sekwencji mikrosatelitarnych (dwie: $(A)_n/(T)_n$ i jedna $[(AC)_n/(TG)_n, (AG)_n/(TC)_n]$) znaleziono wewnątrz sekwencji rodziny Alu w miejscu przeznaczonym dla krótkich sekwencji typu $(A)_n/(T)_n$. Dotychczas nie stwierdzono sekwencji mikrosatelitarnych w regionie 5' elementów Alu [2].

Najczęściej w genomie człowieka występuje powtórzenie dwunukleotydu $(CA)_n/(GT)_n$ potocznie określane powtórzeniem CA. W genomie człowieka występuje około 50–100 tys. sekwencji powtórzonych CA i pojawiają się one średnio co 30 kbp w euchromatynie [21]. W 1989 r. trzy grupy badawcze doniosły równocześnie o różnorodności sekwencji mikrosatelitarnych wykrytej w reakcji PCR [16,22,25]. Powtórzenia CA mogą być wyszukane w znanych sekwencjach genomu dzięki zastosowaniu programów komputerowych lub dzięki przeszukaniu bibliotek krótkich sekwencji sondami poli(dC:dA)/poli(dG:dT). Weissenbach i wsp. [27] obierając drugą strategię zidentyfikowali ponad 5000 mikrosatelitów w genomie człowieka z czego 85% analizować można było poprzez PCR. Jak się później okazało 93% amplifikowanych markerów wykazywało polimorfizm.

Druga grupa sekwencji mikrosatelitarnych obejmuje powtórzenia trzy- lub czteronukleotydowe. Rodziny powtarzających się czteronukleotydów GATA i GACA zostały zidentyfikowane i wyizolowane z satelitarnego DNA węża. Wkrótce okazało się, że tego typu powtórzenia występują u wszystkich *Eukaryota* i że są wysoce polimorficzne. Zaletą analizy powtórzeń czteronukleotydów jest to, że nie muszą być rozdzielane na dużych żelach sekwencyjnych, co ma miejsce w przypadku powtórzeń CA. Trzy- i czteronukleotydowe powtórzenia występują co 300–500 tys. pz w

TABELA 2. Wykaz możliwych kombinacji sekwencji mikrosatelitarnych

Mononukleotydy (2)						
A	C					
Dwunukleotydy (4)						
AC	AG	AT	CG			
Trójnukleotydy (10)						
AAC	AAG	AAT	ACC	ACG	ACT	AGC
ATC	CCG	ACG				
Czteronukleotydy (33)						
AAAC	AAAG	AAAT	AACC	AACG	AACT	AAGC
AAGT	AATC	AATG	AATT	ACAG	ACAT	ACCC
ACCT	ACGC	ACGG	ACGT	ACTC	ACTG	AGAT
AGCG	AGCT	AGGC	AGGG	ATCC	ATCG	ATGC
CCGG	AAGG	ACCG	AGCC	CCCG		
Pięcionukleotydy(102)						
AAAAC	AAAAG	AAAAT	AAACC	AAACG	AAACT	AAAGC
AAAGT	AAATC	AAATG	AAATT	AACAC	AACAG	AACAT
AACCG	AACCT	AACGC	AACGG	AACGT	AACTC	AACTG
AAGAC	AAGAG	AAGAT	AAGCC	AAGCG	AAGCT	AAGGC
AAGGT	AAGTC	AAGTG	AATAC	AATAG	AATAT	AATCC
AATCT	AATGC	AATGG	AATGT	AATCC	ACACC	ACACG
ACAGC	ACAGG	ACAGT	ACATC	ACATG	ACCAG	ACCAT
ACCCG	ACCCT	ACCGC	ACCGG	ACCGT	ACCTC	ACCTG
ACGAT	ACGCC	ACGCG	ACGCT	ACGGC	ACGGG	ACGTC
ACTAT	ACTCC	ACTCG	ACTCT	ACTGC	ACTGG	AGAGC
AGATC	AGATG	AGCAT	AGCCC	AGCCG	AGCCT	AGCGC
AGCTC	AGGAT	AGGCT	AGGCG	AGGGC	AGGGG	ATATC
ATCCG	ATCGC	ATGCC	CCCCG	CCCGG	CCGCG	ACCCT
AAAGG	AACCC	AACTT	AAGGG	AATCG	ACACT	ACGAG
ACTAG	AGAGG	AGCGG	ATCCC			

chromosomie człowieka i są rozmieszczone równomiernie w całym genomie (około 10 000 *loci*) [7]. Ta grupa powtórzeń znalazła zastosowanie w praktyce, w diagnostyce molekularnej, a szczególnie w medycynie sądowej, te sekwencje bardzo często poddaje się analizie, ponieważ charakteryzują się krótkimi i polimorficznymi allelami, co jest szczególnie ważne przy pracy z częściowo zdegradowanym DNA.

SEKWENCJE MIKROSATELITARNE A CHOROBY GENETYCZNE

Sekwencje mikrosatelitarne charakteryzują się bardzo wysokim polimorfizmem, który może być następstwem pomyłek polimerazy DNA, tzw. ślizgania się polimerazy (ang. *polymerase slippage*) prowadzących do wydłużania dwunukleotydowych sekwencji powtórzonych. Innym zjawiskiem jest zwielokrotnienie charakterystycznego, krótkiego motywu sekwencji mikrosatelitarnych w obrębie określonego genu.

TABELA 3. Przykłady sekwencji powtórzonych typu STR o zastosowaniu praktycznym

Locus	Lokalizacja	Sonda lub Gen	Motyw (pz)	Liczba alleli	Heterozygotyczność (%)	Startery dla PCR lub sekwencja powtórzona w DNA	Produkt (pz)
HUMRENA4(ACAG)n	1q32	Renina	4	6		GAGTACTTCCCTCCTACTCA CTCTATGGAGCTGGTAGAACCTGA	255-275
HUMRENA4(ACAG)n	1q32	Renina	4	6		GAGTACTTCCCTCCTACTCA CTCTATGGAGCTGGTAGAACCTGA	255-275
HUMFABP(AAT)n	4q28-q31	Białko wiążące kwasy tłuszczowe	3	8	56-80	GATGATCAGTTTCATAGGGTCACC CAGTTGGTTCCATTGTCTGCCG	199-220
HUM CSF1PO(AGAT)n	5q33.3-34	Protoonkogen c-fms dla receptora CSF-1	4	9	73-81	AACCTGACTTGCACAGGACTAGC TTCCACACACCACTGGCCATCTTC	295-327
ACTBP2	6	SE33	4	>23	95	AATCTGGGCACAAGAGTGA AATCCCTACCCTATA	
HUMF13A01(AAAG)n/F13A1	6p24-25	Czynnik krzepnięcia F13	4	14	64-80	GAGGTTGCACCTCGAGCTTTGCCAA TTCTGAATCATCCCAAGCCACA	283-331
HUMLIPO1(AAAT)n	8p22	Lipaza lipoproteinowa	4	7	54-73	CTGACCAAGATAGTGGGATATAG GGTAACTGAGCGGAGACTGTGTCT	
HUMTH01(AATG)n	11p15.5	Hydroksylaza tyrozynowa	4	8	79	GTGGGCTGAAAAGCTCCCGATTAT AITCAAAGGGTATCTGGGCTCTGG	179-203
HUMCD4(AAAG)n	12p12-pter	Antygen	4	8	27-65	TTGGAGTCGCAAGCTGAAC TAGCG CCAGGAAGTTGAGGCTGCA GTGAA	125-175
HUMVWF(AGAT)n	12p12-pter	Czynnik von Willebrandta	4	7	ND	GGACAGATGATAAATACATAGGATGGATGG CCCTAGTGGATGATAAGAAATATC	
HUMFLA2A1(AAAT)n	12q23-qter	Fosfolipaza trzustkowa A-2	3	8	72-82	GGTTGTAAGCTCCATGAGGTTAGA TTGAGCATCTATGTGCCAGGCT	118-139
HUMCYAR04(AAAT)	n15q21.1	Cytochrom P-450	4	8	57-78	GGTAAAGCAGTACTTAGTAGCTAC GTACAGGTGAGCCAAGGTCGTGAG	173-201
HUMFESFP3(AAAT)n	15q25-qter	Protoonkogen c-fes/fps	4	8	71-73	GCTTGTAAATTCATGTAGGGAAGGC GTAGTCCAGCTACTTGGCTACTC	222-250
HUMARA1(AGC)n	Xcen-q13	Receptor androgenu	3		57-78	TCCAGAATCTGTTCCAGAGCGTGC GCTGTGAAAGTTTCTGTTCTCAT	255-315
HUMHPR1B	Xq26	Fosforibozylotransferaza hipoksaninyowa	4	12	67-77	ATGCCACAGATAATACACATCCCC CTCTCCAGAAATGTTAGATGATGAG	259-299

Zjawisko to określono jako mutacje dynamiczne. Dotyczą one najczęściej zwielokrotnienia nawet o 300 razy trójnukleotydowej sekwencji powtórzonej, co w efekcie prowadzi do wystąpienia choroby genetycznej. Te niestabilne sekwencje charakteryzują się występowaniem w różnych regionach poszczególnych genów; ich występowanie wykazano w regionach 5 i 3 oraz w regionie centralnym genu. W trakcie przekazywania genu z defektem liczba powtórzeń prawie zawsze wzrasta z pokolenia na pokolenie. Tylko dla nielicznych przypadków wykazano, że dzieci dziedziczą po rodzicach zmniejszoną liczbę powtórzeń. Nie jest wykluczone, że mechanizm wydłużania lub, znacznie rzadziej, skracania sekwencji o kilka nukleotydów jest prawdopodobnie taki sam w przypadku sekwencji trójnukleotydowych, jak i dwunukleotydowych, jednak drastyczny przyrost liczby powtórzeń o kilkanaście lub nawet kilkaset podczas pojedynczej mejozy jest prawdopodobnie skutkiem wielokrotnej wymiany siostrzanych chromatyd. Dotychczas zostało opisanych kilka chorób genetycznych, które są wynikiem mutacji dynamicznych obejmujących ekspansję trójnukleotydów. Najczęściej występujące to zespół łamliwego chromosomu X, w którym w locus Xq27.3 dochodzi do powielenia tripletu CGG [15,20], dystrofia miotoniczna sprzężona z locus 19q13 z niestabilnością powtórzenia CTG oraz rdzeniowy zanik mięśni typu Kennedyego [3,20], płasawica Huntingtona i ataksja rdzeniowo-mózdkowa typu 1 będące wynikiem niestabilności powtórzenia CAG [20], a także sekwencja GCC powielona w locus Xq28 (FRAXE) powodująca lekkie upośledzenie umysłowe (tab. 4). Chorzy na wymienione choroby posiadają wyraźne objawy kliniczne i w większości przypadków przekazują je swoim dzieciom w formie jeszcze bardziej nasilonej.

W 1994 pojawiły się doniesienia, że mutacje sekwencji mikrosatelitarnych, a w szczególności powtórzeń dwunukleotydowych są charakterystyczne dla nowotworów układu pokarmowego. W komórkach guzów jelita grubego może występować znaczna liczba mutacji somatycznych w obrębie krótkich sekwencji powtórzonych, która może przekraczać nawet setki tysięcy. U chorych z nowotworem żołądka wykazano na podstawie analizy powtórzeń (CA)_n w dziesięciu loci, dwa rodzaje zmian w obrębie tych sekwencji – polegającą na utracie sekwencji powtórzonej na jednym chromosomie, a więc zaniku heterozygotyczności (ang. *loss of heterozygosity*, LOH) oraz polegającą na skróceniu lub wydłużeniu tych sekwencji.

TABELA 4. Przykłady niestabilności sekwencji mikrosatelitarnych prowadzących do wystąpienia chorób

Gen	Lokalizacja	Powtórzenie	Norma n	Premutacja n	Mutacja n	Choroba
IT15	4p16.3	(CAG) _n	11–33	34–41	>42	Płasawica Huntingtona
DM-1	19q13	(CTG) _n	5–36	37–49	>50	Dystrofia miotoniczna
AR	Xcen-q13	(CAG) _n	13–29	30–38	39–60	Rdzeniowy zanik mięśni
FMR1	Xq27.3	(CGG) _n	6–54	55–200	>200	Zespół Fra-X

n – liczba powtórzeń

ANALIZA SEKWENCJI MIKROSATELITARNYCH

Najbardziej przydatną techniką do analizy sekwencji typu STR jest reakcja PCR typu multiplex [4,17], w której jednocześnie amplifikuje się kilka *loci* [5,13]. Prawdopodobieństwo uzyskania dwóch identycznych wyników dla dwóch osobników maleje w miarę stosowania coraz większej liczby analizowanych loci STR. Dlatego zastosowanie tego typu analizy jest szczególnie przydatne w medycynie sądowej. Natomiast w diagnostyce medycznej markery STR stosuje się, gdy nie można w analizie bezpośredniej określić rodzaju miejsca mutacji w danej chorobie genetycznej. Analizuje się wówczas dwa lub więcej markerów sprzężonych z genem odpowiedzialnym za określoną jednostkę chorobową w celu wykluczenia możliwości rekombinacji jak również celem zapobieżenia błędnemu odczytaniu wyniku, co może być spowodowane nowymi mutacjami zachodzącymi w obrębie tych sekwencji. Reakcję amplifikacji regionów mikrosatelitarnych wykonuje się w warunkach radioaktywnych lub nieradioaktywnych. Szczególnie analiza dwunukleotyдовых powtórzeń wymaga stosowania radioizotopów lub znaczników fluorescencyjnych, gdyż tego typu powtórzenia muszą być frakcjonowane na dużych żelach sekwencyjnych (30x40 cm), a następnie poddawane autoradiografii lub analizowane przez czytniki fluorescencyjne. W przypadku radioizotopów stosuje się jeden lub dwa startery znakowane przy pomocy kinazy polinukleotyдовой na końcu 5 izotopem fosforu z trójfosforanu nukleotydu. Alternatywę stanowi dodanie trójfosforanu nukleotydu, zawierającego izotop w pozycji alfa bezpośrednio do mieszaniny reakcyjnej. Stosowanie drugiego sposobu prowadzi często do wystąpienia niespecyficznych produktów powstających w wyniku błędów polimerazy. Otrzymywane obrazy autoradiograficzne są czasem trudne do odczytania i zanalizowania. Nieradioaktywne produkty PCR frakcjonuje się najczęściej w małych (20x20 cm), wysokorozdzielczych żelach poliakrylamidowych, a następnie wybarwia azotanem srebra. Metoda barwienia srebrem jest ok. 10 razy czulsza niż wybarwienie bromkiem etidionowym i umożliwia detekcję zarówno pojedynczoniciowych, jak i dwuniciowych DNA. Jedynie produkty PCR zawierające powtórzenia 3–6 nukleotydiv mogą być barwione bromkiem etidionowym. Obecnie coraz więcej uwagi poświęca się stosowaniu ligandów fluorescencyjnych do detekcji produktów PCR i stosowaniu zautomatyzowanych czytników laserowych do ich detekcji podczas rozdzielów elektroforetycznych na płytach lub w kapilarach.

PRAKTYCZNE ZASTOSOWANIE ANALIZY SEKWENCJI MIKROSATELITARNYCH

Sekwencje mikrosatelitarne typu STR są idealnymi sekwencjami stosowanymi do mapowania genów i analizy sprzężeń, ponieważ występują w genomie z dużą częstością, charakteryzują się wysokim polimorfizmem i mogą być łatwo analizowane przy użyciu reakcji PCR. Wiele dotychczas opisanych *loci* STR ma duże znaczenie

diagnostyczne w chorobach genetycznych, takich jak dystrofia miotoniczna, mukowiscydoza, dystrofia Duchenne'a i Beckera oraz choroba Huntingtona. Dlatego dużo uwagi poświęca się opracowywaniu map genetycznych genomu człowieka przedstawiających *loci* STR. Poza wykorzystaniem sekwencji typu STR w mapowaniu i analizie sprzężeń sekwencje te mogą być, a nawet stanowią bardzo ważne narzędzie w badaniach identyfikacyjnych i w dochodzeniu spornego ojcostwa. Analiza DNA oparta o reakcje amplifikacji sekwencji mikrosatelitarnych jest techniką znacznie czulszą w porównaniu z technikami klasycznymi stosowanymi w medycynie sądowej. Ponieważ wielkość tych alleli jest mała, zwykle nie przekracza 300 pz, mogą być one stosowane do badania nie zabezpieczonego materiału biologicznego, zawierającego zdegradowany DNA, przechowywanego nawet przez wiele lat. Frakcjonowanie produktów PCR w żelach poliakryloamidowych umożliwia dokładne oznaczenie alleli u poszczególnych osobników i w ten sposób możliwe jest dokładne prześledzenie dziedziczenia cech genetycznych u poszczególnych osobników.

LITERATURA

- [1] BÖHM I, KRAWCZAK M, NURNBERG P, HAMPE J, HUNDRIESER J, POCHE H, PETERS C, SŁOMSKI R, KWIATKOWSKA J, NAGY M, POPPERL A, EPPLER JT, SCHMIDTKE J. Oligonucleotide DNA fingerprinting: results of a multi-center study on reliability and validity. W *DNA Fingerprinting: State of the Science*, Wyd. SDJ Pena, R Chakraborty, JT Eppelen and AJ Jeffreys, Birhauser Verlag 1993; 257–260.
- [2] BECKMAN JS, WEBER JL. Survey of human and rat microsatellites. *Genomics* 1992; **12**: 627–631.
- [3] BROOK JD, MCCURRACH ME, HARLEY AE, BUCKLER AJ, CURCH D, ABURATANI H, HUNTER K, STANTON VP, THIRION J-P, HUDSON T, SOHN R, ZEMELMAN B, SNELL RG, RUNDLE SA, CROW S, DAVIES J, SHELBOURNE P, BUXTON J, JONES C, JUVONNENV, JOHNSON K, HARPER PS, SHAW DS, HOUSMANDE. Molecular basis of myotonic dystrophy: expansion of trinucleotide (CTG) repeats at the 3' end of transcript encoding a protein kinase family member. *Cell* 1992; **68**: 799–808.
- [4] CHAMBERLAIN JS, GIBBS RA, RANIER JE, CASKEY CT. Multiplex PCR for the diagnosis of Duchenne muscular dystrophy. W Innis M, Gelfand D, Sninski J, White T, eds. *PCR protocols: a guide to methods and applications*. Academic Press, San Diego, 1990; 272–281.
- [5] CHAMBERLAIN JS, GIBBS RA, RANIER JE, NGUYEN PN, CASKEY CT. Deletion screening of the Duchenne muscular dystrophy locus via multiplex DNA amplification. *Nucleic Acids Res* 1988; **16**: 11141–11156.
- [6] CHARGAFF E. Structure and function of nucleic acids as cell constituents. *Fed Proc* 1951; **10**: 654–659.
- [7] EDWARDS A, CIVITELLO A, HAMMOND HA, CASKEY CT. DNA typing and genetic mapping with trimeric and tetrameric tandem repeats. *Am J Hum Genet* 1991; **49**: 746–756.
- [8] JEFFREYS AJ, MACLEOD A, TAMAKI K, NEIL DL, MONCKTON DG. Minisatellite repeat coding as a digital approach to DNA typing. *Nature* 1991; **354**: 204–209.
- [9] JEFFREYS AJ, NEUMANN R, WILSON V. Repeat unit sequence variation in minisatellites: a novel source of DNA polymorphism for studying variation and mutation by single molecule analysis. *Cell* 1990; **60**: 473–485.
- [10] JEFFREYS AJ, WILSON V, THEIN SW. Hypervariable "minisatellite" region in human DNA. *Nature* 1985; **314**: 67–73.

- [11]JIN L, ZHONG Y, CHAKRABORTY R. The exact numbers of possible microsatellite motifs. *Am J Hum Genet* 1994; **55**: 582–583.
- [12]KALAITSIDAKI M, COX T, CHACRAVARTI A, ANTONARAKIS E. Cloning and linkage mapping of three polymorphic tetranucleotide (TAAA)_n. Repeats on human chromosome 21. *Genomics* 1992; **14**: 1071–1075.
- [13]KIMPTON CP, GILL P, WALTON A, URQUHART A, MILLICAN ES, ADAMS M. Automated DNA profiling employing multiplex amplification of short tandem repeat loci. *PCR Methods and Applications* 1993; **3**: 13–22.
- [14]KWIATKOWSKA J, TRZECIAK T, SŁOMSKI R. Powtórzenia DNA. *Postępy Biochemii* 1995; **41**: 15–22.
- [15]LA SPADA AR, ROLING D, HARDING AE, WARNER CL, SPIEGEL R, HAUSMANOWA PETRUSEWICZ I, YEE WC, FISCHBECK KN. Meiotic stability and genotype-phenotype correlation of the trinucleotide repeat in X linked signal and bulbar muscular atrophy. *Nature Genet* 1992; **2**: 301–304.
- [16]LITT M, LUTY JA. A hypervariable microsatellite revealed by *in vitro* amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. *Am J Hum Genet* 1989; **44**: 397–401.
- [17]MULLIS KB, FALOONA FA. Specific synthesis of DNA *in vitro* via polymerase-catalysed chain reaction. *Methods Enzymol* 1987; **155**: 335–350.
- [18]NAKAMURA Y, CARLSON M, KRAPCHO K, KANAMORI M, WHITE R. New approach for isolation of VNTR markers. *Am J Hum Genet* 1988; **43**: 854–859.
- [19]NAKAMURA Y, JULIER C, WOLFF R, HOLM R, O'CONNELL P, LEPPERT M, WHITE R.: Characterization of a human “midisatellite” sequence. *Nucleic Acids Res* 1987, **15**, 2537–2547.
- [20]RIGGINS GL, LOKEY LK, CHASTAIN JL, LEINER HA, SHERMAN SL, WILKINSON KD, WARREN ST. Human genes containing polymorphic trinucleotide repeats. *Nature* 1992; **2**: 186–191.
- [21]STALLINGS RL, FORD AF, NELSON D, TORNEY DC, HILDEBRAND CE, MOYZIS RK. Evolution and distribution of (GT)_n repetitive sequences in mammalian genomes. *Genomics* 1990; **10**: 807–815.
- [22]TAUTZ D. Hypervariability of simple sequences as a general source of genetic variation. *Nucleic Acids Res* 1989; **17**: 6463–6471.
- [23]TAUTZ D. Notes on the definition and nomenclature of tandemly repetitive DNA sequences. W *DNA Fingerprinting: State of the Science*, Wyd. SDJ Pena, R Chakraborty, JT Epplen and AJ Jeffreys, Birhauser Verlag, 1993.
- [24]VOGEL F, MOTULSKY AG. *Human Genetics – Problems and Approaches*, Wyd. 2. Springer, Berlin, 1986.
- [25]WEBER JL, MAY PE. Abundant class of human DNA polymorphism which can be typed using the polymerase chain reaction. *Am J Hum Genet* 1989; **44**: 388–396.
- [26]WEBER JL. Informativeness of human (dC-dA)_n-(dG-dT)_n polymorphism. *Genomics* 1990; **7**: 524–530.
- [27]WEISSENBACH J, GYAPAY G, DIB C, VIGNAL A, MORISSETTE J, MILASSEAU P, VAYSSEIX G. i wsp. A second generation linkage map of the human genome. *Nature* 1992; **359**: 794–801.
- [28]ZULIANI G, HOBBS HH. A high frequency of length polymorphisms in repeated sequences adjacent to Alu sequences. *Hum Genet* 1990; **46**: 963–969.

KIERUNKI BADAŃ NAD CYTOSZKIELETEM KOMÓREK ROŚLINNYCH

RESEARCH ON THE CYTOSKELETON IN PLANT CELLS

Renata ŚNIEŻKO

Zakład Biologii Komórki, Instytut Biologii UMCS, Lublin

Streszczenie: Wykazano wiele podobieństw między cytoszkieletem komórek roślinnych i zwierzęcych. Budowa chemiczna mikrotubul i mikrofilamentów oraz białek współdziałających z nimi jest bardzo zbliżona, co udowodniono metodami immunocytochemicznymi i biochemicznymi. W komórkach roślinnych wykryto tubulinę α , β i γ . Stwierdzono, że w genomach roślin geny dla tubuliny występują w wielu kopiach, które różnią się zdolnością do ekspresji, a nie produktem. Powstawanie i rozpad mikrotubul regulują podobne do zwierzęcych białka MTOC, MAP, tau i γ -tubulina. Białkami motorycznymi współdziałającymi z mikrotubulami jest dyneina i kinezyrna. Mikrofilamenty aktynowe są (jak w komórkach zwierzęcych) lokalizowane dzięki reakcji, w której F-aktyna wiąże się specyficznie z falloidyną, a następnie jest znakowana rodaminą. Z białek współdziałających z mikrofilamentami wykryto miozynę, profilinę, spektrynę i kalmodulinę. Wiele białek zaliczanych do filamentów pośrednich nie zostało dotychczas zlokalizowanych w komórkach roślinnych. Najnowsze badania zmierzają do poznania funkcji cytoszkieletu w różnych typach komórek roślinnych.

Słowa kluczowe: cytoszkielet, tubulina, aktyna, filamenty pośrednie

Summary: Cytoskeleton in plant cells is similar to that of animal ones. Microtubules and proteins which cooperate with them e.g. tubulin, dynein and kinesin, are chemically very close to those present animal cells. Microfilaments (F-actin) chemically resemble animal cytoskeleton, but when they do not support the shape of the cell seemed to be less abundant. Myosin, profilin, spectrin, and other enzymes have been found to cooperate with actin. Some other proteins connected with cytoskeleton, like calmodulin, are also present in plant cells. Progress in the study on the plant cytoskeleton is aiming to find out the mechanism of rearrangement of the fibrillar elements according to physiological state of the cell.

Key words: plant cell cytoskeleton, tubulin, actin, intermediate filaments.

WSTĘP

W ostatnim dziesięcioleciu znacznie poszerzyła się wiedza o strukturze i funkcjach cytoplazmy. Już w latach siedemdziesiątych ustalił się pogląd, że cytoplazma składa się z cytosolu (płynnego koloidu) i elementów włóknistych, czyli cytoszkieletu.

Cytoszkieleł ma postać subtelnych rureczek – mikrotubul i włókienek aktynowych — mikrofilamentów. Układ elementów włóknistych jest utrzymywany dzięki różnorodnym białkom wiążącym się z mikrotubulami lub mikrofilamentami. Białka te zalicza się do filamentów pośrednich lub białek regulacyjnych – enzymów odpowiedzialnych za polimeryzację lub depolimeryzację mikrotubul i mikrofilamentów. Regulacja aktywności tych białek umożliwia szybką modyfikację struktury cytoszkieletu i dostosowanie go do fizjologicznego stanu komórki, który zmienia się pod wpływem różnorodnych bodźców.

Obszar cytoplazmy, w którym występuje gęsta sieć powiązanych ze sobą mikrofilamentów, ma konsystencję żelu, zaś tam gdzie mikrofilamenty są mniej liczne i nie tak ściśle połączone, cytoplazma ma konsystencję zolu. Stan ten może szybko ulegać zmianom np. pod wpływem bodźca świetlnego lub zmiany kierunku sił grawitacyjnych. Między cytoszkieletem a błoną plazmatyczną istnieją liczne połączenia dzięki białkom integralnym błony wiążącym zarazem struktury włókniste cytoszkieletu. Miejsca tych połączeń mogą zmieniać swoje położenie zależnie od bodźców oddziałujących na komórkę.

Struktura oraz liczne funkcje cytoszkieletu są już stosunkowo dobrze poznane i opisane w monografiach i podręcznikach [2, 3, 11, 23], przy czym lepiej poznany jest cytoszkieleł w komórkach zwierzęcych. Funkcjonowanie cytoszkieletu odgrywa ważną rolę we wszystkich procesach życiowych komórki, jest więc on nadal przedmiotem intensywnych badań. Obecnie uzyskuje się bardzo dokładne informacje dzięki nowoczesnym metodom biochemicznym oraz lokalizacji białek *in situ* [23]. Najnowsze badania polegają na wyznakowaniu białek metodami immunofluorescencyjnymi, a następnie obserwacji preparatów w mikroskopie konfokalnym. Niektóre z tych białek są lokalizowane w żywych komórkach, także roślinnych, np. łagiewkach pyłkowych lub strzępkach grzyba [8, 24, 26, 95, 109, 147, 149, 151]. Pozwala to na dokładne oznaczenie typu białka i obserwację zmian jego rozmieszczenia w komórce w różnych stanach fizjologicznych [23, 57]. Większość badań prowadzi się na komórkach zwierzęcych, gdyż jest to materiał łatwiejszy metodycznie, a także dlatego, że wyniki niektórych badań są wykorzystywane w medycynie, np. odkrycie charakterystycznych zmian w cytoszkielecie komórek stransformowanych znalazło zastosowanie w diagnostyce zmian nowotworowych [64].

Materiał roślinny jest mniej dogodny do prowadzenia badań, ponieważ ściana komórkowa utrudnia szybkie, a zarazem delikatne utrwalenie cytoplazmy oraz dostęp przeciwnie do komórki. Jednakże w wielu laboratoriach trudności techniczne zostały pokonane, dzięki czemu wiedza o cytoszkielecie w komórkach roślinnych znacznie się poszerzyła. Dąży się do wyjaśnienia znaczenia i funkcji cytoszkieletu w sytuacji, kiedy pewne właściwości mechaniczne zapewnia ściana komórkowa, zaś ruch jest bardzo ograniczony i ma inny charakter niż w organizmach zwierzęcych [45, 78, 99, 109].

Stwierdzono wiele podobieństw między cytoszkieletem komórek roślinnych i zwierzęcych [3, 45, 47, 66, 94, 127, 134, 135]. U roślin, podobnie jak u zwierząt, jest on także strukturą zdolną do bardzo szybkich reakcji na bodźce oddziałujące na komórkę i przystosowuje się do stanu fizjologicznego i funkcji komórki.

Wykryto też pewne cechy specyficzne cytoszkieletu roślinnego przejawiające się w charakterystycznym układzie mikrotubul. Jest to pasmo lub pierścień preprofazy tworzący się z mikrotubul przed podziałem mitotycznym (ang. skrót PPB – *preprophase band*) [44, 45, 89, 90, 98]. W komórkach roślinnych nieco inna niż w zwierzęcych wydaje się też rola cytoszkieletu aktynowego, ponieważ odmienna jest ich motoryka i mechanizmy ruchu, a także sposób utrzymywania kształtu komórek [1, 21, 27, 102, 105, 122].

Wobec szybkiego postępu badań biologom, zajmującym się inną niż cytoszkielet problematyką, może być trudno śledzić ukazujące się bardzo liczne publikacje. Wydaje się więc zasadne przynajmniej częściowe podsumowanie wiedzy na temat cytoszkieletu w komórkach roślinnych.

MODELE BADAŃ NAD CYTOSZKIELETEM ROŚLINNYM

Badania prowadzi się na bardzo wielu typach komórek: glonów, mszaków, paprotników oraz różnych roślin nasiennych. Do badań botanicznych wlicza się też badania prowadzone na grzybach, chociaż grzyby w obecnie obowiązującym systemie stanowią odrębny takson. Komórki roślinne wykorzystywane jako obiekt badań nad cytoszkieletem bardzo różnią się genotypem, kształtem, wiekiem, funkcjami itp. Mogą to być np.: komórki epidermalne, miękiszu asymilacyjnego, kory łodyg lub korzeni, merystematyczne, szparkowe, kambialne, włósniki, strzępki grzybów, komórki międzywęzła glonów, nici spermatogeniczne, komórki gametofitowe roślin okryto- i nagonasiennych, generatywne lub wegetatywne w pyłku i łagiewce pyłkowej. Łagiewki pyłkowe okazały się bardzo dogodnym materiałem w różnych typach badań nad cytoszkieletem. Niekiedy kilka typów komórek stanowi model do badania podobnego problemu, np:

1. Zachowanie cytoszkieletu w czasie wzrostu szczytowego bada się na włósnikach, łagiewkach pyłkowych, splątkach mszaków i strzępkach grzybów [4, 7, 26, 63, 108, 132, 139].

2. Cytoszkielet podczas wzrostu i wakuolizacji komórki obserwuje się w komórkach miękiszu strukturalnego łodyg i korzeni, epidermie tych organów oraz w komórkach kalusa lub łagiewkach [5, 6, 9, 48, 54, 68, 71, 103, 104, 129].

3. Powiązania plazmolemy z cytoszkieletem, a z drugiej strony ze ścianą komórkową badano w komórkach glonów [72, 74–76], w komórkach miękiszowych roślin wyższych [38, 79, 120], w łagiewkach pyłkowych, w których na skutek plazmolizy plazmolema odsunęła się od ściany, lub w protoplastach z łagiewek [69, 113].

4. Nad rolą cytoszkieletu w budowie ściany komórkowej prowadzi się badania na bardzo różnych komórkach zależnie od rodzaju substancji, z których budowana jest ściana [120].

► Wpływ cytoszkieletu na odkładanie mikrofibryli celulozowych zbadano w rurkach sitowych i komórkach miękiszowych *Triticum aestivum* L. [35, 104, 144],

komórkach aparatów szparkowych *Allium* [88], włoskach na nasieniu bawełny [117, 118], w glonach *Closterium* sp. [43] i *Chaetomorpha moniligera* [72] lub w czasie celularyzacji bielma *Ranunculus sceleratus* [148].

► Modelem do badania procesu wbudowywania pektyn w ścianę mogą być strzępki grzyba [63, 112], łagiewki pyłkowe [54, 55, 83] lub ich protoplasty odbudowujące ścianę [113].

► Wpływ układu mikrotubul na odkładanie warstw ligniny w ścianie wtórnej obserwowano na różnicujących się elementach drewna, cewkach lub komórkach sklerenchymatycznych [79].

5. Znaczenie cytoszkieletu w utrzymaniu pozycji lub zmianach rozmieszczenia organelli w komórce bada się na komórkach czapeczki korzeniowej ze statolitami (ziarna skrobi lub kryształy białkowo-mineralne) [21, 145] oraz w strzępkach grzybów i glonów ze statolitami [106, 112, 137]. Rozmieszczenie plastydów zależne od cytoszkieletu stwierdzono w komórkach sporogennych mszaków oraz w komórkach miękiszu asymilacyjnego liści roślin okrytonasiennych [13, 14, 75–77, 84, 124, 128, 140].

6. W badaniach nad udziałem cytoszkieletu w podziale komórkowym model stanowią komórki merystematyczne i meiotyczne. Podczas mitozy i mejozy we wrzecionie podziałowym wykryto zarówno układy mikrotubul, jak i mikrofilamentów, zaś po rozejściu się chromosomów powstaje fragmoplast ze znaczącym udziałem mikrotubul, który jest charakterystyczny dla większości komórek roślinnych [5, 8, 13–19, 20, 33, 42, 59, 97, 98, 99, 100, 101, 146, 150, 151].

7. Komórki szparkowe i leżące u podstawy ogonków liściowych *Mimosa* lub szeregi komórek przy głównym nerwie liści roślin owadożernych zmieniają swój kształt na skutek zmian turgoru. Najnowsze badania dowodzą, że równocześnie przekształca się w nich układ mikrotubul i mikrofilamentów, czyli cytoszkielet [27, 40].

8. Zmiany cytoszkieletu pod wpływem stresów i substancji degradujących enzymy obserwuje się też w komórkach kalusa i protoplastach [1, 37, 39, 40, 46, 49, 61, 68, 69, 91, 113, 114, 125, 147, 149].

9. Strukturę i funkcje cytoszkieletu w organellach ruchu, takich jak wici i rzęski, oraz budowę ciał podstawowych bada się na jednokomórkowych glonach z wiciami lub plemnikach mszaków i paprotników [70, 107, 134, 136].

10. Modelem do badania szkieletu cytoplazmatycznego w komórkach roślinnych pozbawionych ściany celulozowej, poruszających się aktywnie przy równoczesnych zmianach kształtu są komórki plemnikowe roślin okrytonasiennych [8, 24, 25, 30, 92, 93, 99, 100–102, 130, 131, 150]. Obserwuje się je w łagiewkach *in vivo* lub jako wyizolowane komórki na pożywkach.

11. W woreczkach załączkowych roślin okrytonasiennych antypody i synergidy mogą mieć charakter komórek wydzielniczych i stanowią obiekt badań współdziałania cytoszkieletu z organellami, takimi jak diktiosomy i retikulum endoplazmatyczne. Współdziałanie cytoszkieletu z ER bada się także podczas celularyzacji endospermy (bielma) *Zea mays*, *Ranunculus* i *Arabidopsis* oraz w komórkach glonów i grzybów [57, 58, 81, 84, 124, 139, 141, 143, 148].

Powyższe przykłady nie wyczerpują listy możliwych modeli doświadczeń, ale pozwalają zorientować się w głównych nurtach badań nad rolą cytoszkieletu w rozmaitych procesach życiowych komórki roślinnej.

TYPY BIAŁEK W CYTOSZKIELECIE ROŚLINNYM

1. Tubulina i towarzyszące jej białka. Pierwszym elementem szkieletu cytoplazmatycznego wykrytym w komórkach roślinnych były mikrotubule. Znalaziono je w wiciach w układzie zupełnie takim samym jak u pierwotniaków lub w wiciach plemników zwierzęcych. Układ ten potwierdzają najnowsze badania [70, 107, 134]. Fakt ten nasunął przypuszczenie, że na poziomie ultrastrukturalnym i biochemicznym występować powinno więcej podobieństw między cytoszkieletem roślinnym i zwierzęcym. I rzeczywiście, w wielu typach komórek roślinnych wykryto mikrotubule w cytoplazmie i wrzecionie kariokinetycznym rozmieszczone analogicznie jak w komórkach zwierzęcych.

W interfazowych komórkach roślinnych najczęściej występuje stosunkowo cienka warstwa przyściennej cytoplazmy, duża centralna wakuola poprzecinana pasmami cytoplazmy, zaś jądro może znajdować się w warstwie przyściennej lub być zawieszony bliżej środka komórki w pasmach cytoplazmy. W takich komórkach wyróżnia się tzw. szkielet korykalny – układ mikrotubul ustawionych równolegle do powierzchni komórki i nieco skośnie do jej długiej osi. Ustawienie mikrotubul może ulegać zmianom pod wpływem różnych czynników, np. zmiany kierunku oddziaływania sił grawitacji lub zmiany ciśnienia atmosferycznego [44, 45]. Oprócz szkieletu korykalnego mikrotubule występują w pasmach cytoplazmy oraz w strefie wokółjądrowej [9, 12, 29, 49, 73, 78, 103, 104, 114, 117, 118].

W komórkach roślinnych stwierdzono, że mikrotubule powstają dzięki polimeryzacji dimerów tubuliny (alfa i beta) podobnie jak w komórkach zwierzęcych [45]. Tylko w dużych plastydach glonu *Oedogonium capilliforme* wykryto struktury bardzo podobne do mikrotubul, które nie wykazywały obecności α -tubuliny [137]. Zasadniczo wyróżnia się 3 typy tubuliny: alfa, beta i gamma. Cząsteczki tubuliny alfa i beta łączą się w dimery, a następnie w protofilamenty i rureczki – mikrotubule. Tubulina typu gamma ma charakter enzymatyczny i stymuluje proces polimeryzacji mikrotubul [85]. Wykryto też tubulinę, która występuje we frakcji błon komórkowych podobnie jak inne białka integralne [82].

W genomie komórek roślinnych wykryto wiele genów kodujących tubulinę [41, 44, 73, 85]. Ich występowanie tłumaczy się amplifikacją locus tubuliny, jaka miała miejsce podczas ewolucji roślin. Produkty ekspresji tych genów nie różnią się zasadniczo od siebie. Różne geny tubuliny mają specyficzną zdolność do ekspresji tylko w określonym typie komórek tej samej rośliny, tzn. że inny gen jest odpowiedzialny za syntezę tubuliny w komórkach miękkiszowych, a inny w merystematycznych. Wiąże się to z faktem, że mikrotubule pełnią inne funkcje w zróżnicowanych komórkach interfazowych, a inne w komórkach dzielących się. Ekspresja określonego genu

tubuliny jest zatem regulowana poprzez stan fizjologiczny komórki i decyduje o funkcji mikrotubul, które powstaną z tubuliny kodowanej przez dany gen. Powiązanie ekspresji wybranych genów tubuliny z funkcją mikrotubul udowodniono w komórkach zmieniających swoje funkcje, np: komórka mięksiszowa może zmienić się w komórkę dzielącą się. Wtedy cytoszkielet mikrotubularny leżący tuż pod plazmolemą komórki mięksiszowej zanika. Po pewnym czasie w cytoplazmie przyściennej pojawia się układ mikrotubul w postaci pierścienia wokół przyszłej płaszczyzny podziału. Po przesunięciu się jądra komórkowego i ustawieniu w tej płaszczyźnie pierścienia mikrotubularny zanika, a zaczyna rozwijać się układ mikrotubul wrzeciona kariokinetycznego [44]. Tubulina będąca prekursorem każdego z wymienionych układów mikrotubul pochodzi z ekspresji innego loci spośród kilku występujących w genomie [67, 119]. Znalaziono też zmutowane geny dla tubuliny np. odporny na działanie herbicydów antymikrotubularnych gen dla α -1-tubuliny u *Chlamydomonas reinhardtii* [65].

Obecnie wiadomo, że mikrotubulom towarzyszą białka typu tau, MTOC i MAP, które są bardzo podobne do białek zwierzęcych i pełnią analogiczne funkcje związane z syntezą i stabilizacją mikrotubul [47, 66, 94, 138].

W wiciach glonów i plemników roślinnych mikrotubulom towarzyszą centryna i dyneina, która jest białkiem motorycznym [38, 70, 133, 136]. Białkiem motorycznym współdziałającym z mikrotubulami jest także kinezyzna, która została wykryta w cytoplazmie komórek rosnących: łagiewek pyłkowych i strzępek grzyba. Jej funkcja wiąże się z przemieszczaniem pęcherzyków transportujących w cytoplazmie. W łagiewkach pyłkowych pęcherzyki takie zawierające prekursorsy ściany komórkowej są przesuwane ku wierzchołkowi łagiewki, włączają się w plazmolemę i uwalniają swoją zawartość nie na samym jej wierzchołku, lecz nieco poniżej. Zaobserwowano przyżyciowo taki właśnie tor przesuwania się cząsteczek kinezyny w rosnących łagiewkach pyłkowych [109].

2. Aktyna. W komórkach roślinnych istotną rolę odgrywa cytoszkielet zbudowany z mikrofilamentów aktynowych. Podobnie jak w komórkach zwierzęcych mikrofilamenty są to spolimeryzowane w cienkie włókienka cząsteczki aktyny (postać F-aktyny), które powstają przez polimeryzację cząsteczek globularnego białka rozpuszczonego w cytoplazmie, czyli G-aktyny. Szkielet aktynowy jest tu równie labilny i zmienny jak w komórkach zwierzęcych [1, 4, 21, 33, 115, 116, 147, 149, 151–153]. Białka enzymatyczne czynne podczas polimeryzacji F-aktyny są bardzo podobne do białek zwierzęcych lub pochodzących z drożdży [1, 32]. Do białek regulujących polimeryzację mikrofilamentów należy m.in. profilina, którą znalaziono w komórkach *Zea mays* w trzech odmianach nieznacznie różniących się od siebie. Każdy typ cząsteczek profiliny był produktem innego genu [123].

Mikrofilamenty aktynowe współdziałają z miozyną i kalmoduliną podczas ruchu cytoplazmy i przemieszczania się organelli, takich jak plastydy lub mitochondria [32, 39, 40]. Układ mikrofilamentów widoczny jako zagęszczona otoczka wokół struktur komórkowych ulega zmianie podczas przemieszczania się statolitów, organelli lub jądra, co może następować po zadziałaniu jakichś bodźców, np. zmiany położenia organu, lub podczas ruchów wzrostowych komórek [10, 50, 53, 60, 115, 129, 145, 150].

Zmiany w cytoszkielecie aktynowym przypuszczalnie następują na skutek dwóch różnych procesów:

- 1) depolimeryzacji białek wiążących mikrofilamenty i
- 2) rozpadu, czyli depolimeryzacji samych mikrofilamentów.

Według Bershadskego i Vasilieva [11] badania biochemiczno-genetyczne wykazały, że w komórkach pierwotniaków zmiany te są także związane z gwałtowną degradacją mRNA dla aktyny i pojawieniem się w cytoplazmie nowej frakcji mRNA na krótko przed ustaleniem się innej struktury cytoszkieletu aktynowego. Proces ten jest stosunkowo szybki, gdyż czas półtrwania określonej formy aktynowego mRNA oceniono na 20 min. Przypuszcza się, że procesy te w komórkach roślinnych mogą przebiegać analogicznie. Duże podobieństwa do procesów w komórkach zwierzęcych stwierdzono w tempie ekspresji genów dla aktyny i tubuliny u glonu *Chlamydomonas* [65].

3. Filamenty pośrednie oraz liczne białka współdziałające z elementami włóknistymi cytoszkieletu. W komórkach roślinnych znaleziono pewne białka przypominające filamenty pośrednie lub białka występujące w połączeniach z mikrofilamentami podobnie, jak to opisano w komórkach zwierzęcych [89]. Do tej pierwszej grupy należy zaliczyć fibronektynę i centrynę [70] oraz spektrynę i cytokeratynę [37, 38].

Powszechnie stwierdza się współdziałanie z włóknkami cytoszkieletu miozyny lub kinezyny – białek określanych jako motoryczne, gdyż aktywnie uczestniczą w procesach ruchowych, np. cyrkulacji cytoplazmy, przesuwanie pęcherzyków transportujących lub plastydów [22, 55, 78, 135]. Wykryto także grupy białek oznaczone w literaturze angielskojęzycznej jako:

MAR (wiążące cytoszkielec z błonami retikulum endoplazmatycznego),

PAP (pozostające w bardzo ścisłym związku z plazmolemą),

SAP (stanowiące połączenie cytoszkieletu ze ścianą komórkową poprzez plazmolemę) [74, 75].

Są to różnego rodzaju białka wbudowujące się w błony komórkowe jako białka integralne, które jednocześnie wiążą się z włóknkami cytoszkieletu, mikrofilamentami bądź też mikrotubulami. Podobną funkcję pełni pewna forma tubuliny, która została zlokalizowana jako integralne białko w plazmolemie komórek mięksiszowych w liściach *Nicotiana* [82]. Wymienione białka nie są identyczne, jak w komórkach zwierzęcych, ale mają bardzo podobne sekwencje aminokwasów, bardzo podobne epitopy reagujące z przeciwciałami i pełnią takie same funkcje [47, 89].

PODOBIENSTWO BIAŁEK CYTOSZKIELETU ROŚLINNEGO I ZWIERZĘCEGO

Podobieństwo chemiczne elementów cytoszkieletu roślinnego do zwierzęcego najdobitniej potwierdza fakt, że większość z nich została wykryta dzięki zastosowaniu

przeciwciał wyprodukowanych dla antygenów pochodzenia zwierzęcego [22, 23, 31, 37, 94, 146]. Mikrotubule roślinne wykrywa się przeciwciałem uzyskanym po immunizacji tubuliną z mózgu cielęcia [23, 45].

Aktynę w różnego typu komórkach roślinnych wykrywa się identycznie jak w komórkach zwierzęcych dwustopniową reakcją z falloidyną i rodaminą [10, 27, 52, 53, 56, 87, 116, 122, 153].

Fibronektynę i cytokeratynę B (filamenty pośrednie) [37, 89] oraz kinezynę i miozynę (białka motoryczne) [22, 31, 135] wykryto także przeciwciałami wyprodukowanymi do identyfikacji białek zwierzęcych. Reakcja immunocytochemiczna uważana jest za bardzo specyficzną, więc wykrywane za pomocą tej metody białka cytoszkieletu roślinnego muszą być prawie identyczne jak ich odpowiedniki zwierzęce. Podobieństwo dotyczy co najmniej części białka łączącej się z przeciwciałem, czyli epitopu. Wyraźne podobieństwo dotyczy także sekwencji aminokwasów i masy cząsteczkowej białek, co stwierdzono metodami biochemicznymi [31, 34, 38, 62, 66, 121, 123, 127, 142].

Białka o różnych funkcjach regulacyjnych przeważnie mają charakter enzymów np: MTOC, MAP, kalmodulina mają bardzo podobną budowę i właściwości jak w komórkach zwierzęcych [31, 32, 47, 66, 70, 89, 94, 96, 133, 135, 138]. Kalmodulina pełni funkcję aktywatora białek motorycznych kompleksu miozyny w obecności jonów wapnia [108, 146]. Enzymatyczny charakter białek typu MAP i MTOC przejawia się w ich funkcji blokowania bądź stymulacji syntezy mikrotubul z cząsteczek tubuliny [45]. Stąd szczególnie wyraźne skupienie białek MTOC występuje w czasie formowania się wrzeciona kariokinetycznego, mimo braku centrioli w eukariotycznych komórkach roślinnych [47]. Niekiedy białka regulacyjne występują w kilku formach izomerycznych. Wydaje się, że przynajmniej niektóre z białek enzymatycznych współdziałających z cytoszkieletem w komórkach roślinnych to izomery enzymów wykrytych u zwierząt.

Niewiele doniesień opisuje połączenia cytoszkieletu mikrotubularnego bądź aktynowego z plazmolemą, lecz tutaj także można znaleźć pewne podobieństwa do systemu występującego u zwierząt. Wydaje się, że w plazmolemie komórek roślinnych działa podobny jak w zwierzęcych system białek receptorowych powiązanych od strony cytoplazmy z cytoszkieletem [80]. Wykryto także swoiste białka biorące udział w procesach przylegania komórek, np. koaktozyna (ang. *coactosin*) biorąca udział w połączeniach między przylegającymi do siebie myksoamebami *Dictyostelium discoideum* [32]. U pokrewnego śluzowca *D. purpureum* występuje specyficzne białko gp40, które może odgrywać aktywną rolę w procesie przylegania służni do podłoża [121].

WPLYW RÓŻNYCH CZYNNIKÓW NA STRUKTURĘ CYTOSZKIELETU

Podobnie jak w komórkach zwierzęcych cytoszkielet roślinny jest bardzo wrażliwy na różnorodne czynniki destrukcyjne, np.:

- szok termiczny [28],
- szok osmotyczny [1],

ciśnienie atmosferyczne [29, 115],
zranienie [59, 60],
zmiany pH i stężeń jonowych [22, 39, 55, 108],
działanie antybiotyków, narkotyków lub innych substancji toksycznych [46, 65, 97, 115].

Niska temperatura powoduje depolimeryzację mikrotubul [6, 115], podobnie jak działanie kolchicyny i innych cytostatyków [45, 61, 65, 118]. KARBAMINIANY FENYLOWE i benzimidazolowe powodują destrukcję kortykalnego układu mikrotubul, a także inaktywują białka MTOC [45]. Zaburzenia w polimeryzacji tubuliny można wywołać działając wysoką temperaturą i promieniowaniem UV [126]. Układy mikrotubul można rearanżować działając na komórkę podwyższonym ciśnieniem lub zmieniając kierunek działania siły grawitacji [12, 21].

Mikrotubule i mikrofilamenty są wrażliwe na stężenie jonów wapnia, sodu i potasu [40, 45, 110, 111]. Przypuszczalnie jony te, jako element aktywacji enzymów, wpływają na białka odpowiedzialne za polimeryzację lub depolimeryzację elementów włóknistych, a także utrzymanie ich struktury. Obecność jonów potasu korzystnie wpływa na aktywny udział cytoszkieletu w gojeniu ran u *Acetabularia*. Niedobór tych jonów uniemożliwia obkurczenie się plazmolemy wokół rany – prawdopodobnie zakłócony jest mechanizm skurczu szkieletu aktywnego, który zależy od aktywacji białek enzymatycznych i motorycznych [39]. Potencjał wapniowy odgrywa ważną rolę w funkcjonowaniu rzęsek i wici, które mają mikrotubularny szkielet z białkiem motorycznym – dyneiną. Uważa się, że rola wapnia jest istotna nie tyle dla mikrotubul, co dla dyneiny i innych enzymatycznych białek aktywnych podczas ruchu [45]. Wykryto też podobną jak w komórkach zwierzęcych wrażliwość kalmoduliny na zmiany stężenia jonów wapniowych. Zablokowanie kanałów jonowych dla wapnia powoduje spadek aktywności tego enzymu [96].

Stwierdzono, że skażenia metalami ciężkimi (ołowiem i aluminium) powodują zaburzenia w funkcjonowaniu cytoszkieletu, co odbija się np. na wzroście komórek, ich kształcie i budowie ściany, ruchu organelli i cytoplazmy [4].

Cytoszkielet aktywny jest także wrażliwy na zmiany pH, skażenie metalami ciężkimi, promieniowanie UV oraz działanie siły grawitacji [63, 115]. Ulega on destrukcji pod wpływem cytochalazyny B i D podobnie, jak to się dzieje w komórkach zwierzęcych [4, 27, 50, 51, 86].

Na podstawie równoczesnego badania zmian układów mikrotubul i mikrofilamentów pod wpływem silnych bodźców lub w czasie wyraźnych zmian stanu fizjologicznego komórek nie można jednoznacznie wnioskować o wzajemnych zależnościach między układami mikrotubularnymi a mikrofilamentami. W dyskusjach kilku prac autorzy zaznaczają, że równoczesne zmiany w organizacji mikrotubul i mikrofilamentów nie są dowodem na ich wzajemne uzależnienie, a tylko na zachodzącą w tym samym czasie reakcję na bodźce. Zaobserwowano jednak, że w komórkach motorycznych *Mimosa* podczas zmiany turgoru wszystkie elementy cytoszkieletu wydają się współdziałać w zmianach kształtu komórek [40]. Podobnie w komórkach merystemu korzeniowego *Allium* [36] i podczas mikrosporogenezy oraz

mitozy w pyłku storczyka *Phalaenopsis* [17, 18, 19] mikrotubule i mikrofilamenty współuczestniczą w ustalaniu płaszczyzny podziału i organizacji wrzeciona kariokinetycznego.

Działając czynnikami destrukcyjnymi selektywnie dla mikrotubul lub dla mikrofilamentów wykazano, że niekiedy jeden z układów może pozostać niezmieniony mimo poważnych zaburzeń w drugim układzie [16, 33].

Zainteresowanie cytoszkieletem w komórkach roślinnych nadal nie słabnie, a uwaga naukowców jest skierowana na dokładne poznanie mechanizmów enzymatycznych regulujących modyfikacje cytoszkieletu podczas procesów rozwojowych lub przemian wynikających z funkcji pełnionych przez wyspecjalizowane komórki roślinne.

LITERATURA

- [1] ABE S, ITO Y, DAVIES E. Association of cytoskeletal proteins in the membrane-bound polysome fraction from peas using conventional polysome isolation buffers. *Plant Physiol Biochem* 1994; **32**: 547–554.
- [2] AEBI U, ENGEL J. (red.) Cytoskeletal and extracellular proteins, structure, interactions and assembly. Springer Series in Biophysics. Berlin, Heidelberg, New York: Springer Verlag 1989; Vol. 3.
- [3] ALBERTS B, BRAY D, LEWIS J, RAFF M, ROBERTS K, WATSON JD. Molecular Biology of the Cell. Gerland Publ. Inc. 1989: 613–680.
- [4] ALFANO F, RUSSEL A, GAMBARDELLA R, DUCKETT JG. The actin cytoskeleton of the liverwort *Riccia fluitans* – effects of cytochalasin-B and aluminium ions on rhizoid tip growth. *J Plant Physiol* 1993; **142**: 569–574.
- [5] BALUSKA F, BARLOW PW. The role of the microtubular cytoskeleton in determining nuclear chromatin structure and passage of maize root cells through the cell cycle. *Eur J Cell Biol* 1993; **61**: 160–167.
- [6] BALUSKA F, PARKER JS, BARLOW PW. The microtubular cytoskeleton in cells of cold-treated roots of maize (*Zea mays* L.) shows tissue-specific responses. *Protoplasma* 1993; **172**: 84–96.
- [7] BARTALESI A, MOSCATELLI A, CASINO DC, TIEZZI A, CRESTI M. About the role of the cytoskeleton in the pollen tube of *Nicotiana tabacum*. *Giorn Bot Ital* 1990; **124**: 654–655.
- [8] BARTALESI A, CASINO DC, MOSCATELLI A, CAI G, TIEZZI A. Confocal laser scanning microscopy of the microtubular system of dividing generative cell in *Nicotiana tabacum*. *Giorn Bot Ital* 1991; **125**: 21–28.
- [9] BASKIN TI, BUSBY CH, FOWKE LC, SAMMUT M, GUBLER F. Improvements in immunostaining samples embedded in methacrylate: Localization of microtubules and other antigens throughout developing organs in plants of diverse taxa. *Planta* 1992; **187**: 405–413.
- [10] BEDNARA J, WILLEMSE MTM, Van LAMMEREN AAM. Organization of the actin cytoskeleton during megasporogenesis in *Gasteria verrucosa* visualized with fluorescently-labelled phalloidin. *Acta Bot Neerl* 1990; **39**: 43–48.
- [11] BERSHADSKY AD, VASILIEV JM. Cytoskeleton. New York, London: Plenum Press 1988.

- [12] BLANCAFLOR EB, HASENSTEIN KH. Organization of cortical microtubules in graviresponding maize roots. *Planta* 1993; **191**: 231–237.
- [13] BRAUN RC, LEMMON BE. Monoplastidic cell division in lower land plants. *Amer J Bot* 1990; **77**: 559–571.
- [14] BRAUN RC, LEMMON BE. The quadripolar microtubule system a meiotic spindle ontogeny in horn worts. *Amer J Bot* 1990; **77**: 1482–1490.
- [15] BRAUN RC, LEMMON BE. A possible explanation for the hemispherical cell plate in unequal pollen mitosis. *Amer J Bot* (suppl.) 1991; **78**: 19.
- [16] BRAUN RC, LEMMON BE. Radial microtubules define cytoplasmic domains following faulty first meiotic division in daylily. *Amer J Bot* (suppl.) 1991; **78**: 19–20.
- [17] BRAUN RC, LEMMON BE. Pollen development in orchids: 1. Cytoskeleton and the control of division plane in irregular patterns of cytokinesis. *Protoplasma* 1991; **163**: 9–18.
- [18] BRAUN RC, LEMMON BE. Pollen development in orchids: 2. The cytokinetic apparatus in simultaneous cytokinesis. *Protoplasma* 1991; **165**: 155–166.
- [19] BRAUN RC, LEMMON BE. Pollen development in orchids: 3. A novel generative pole microtubule system predicts unequal pollen mitosis. *J Cell Sci* 1991; **99**: 183–192.
- [20] BRAUN RC, LEMMON BE. Pollen development in orchids: 4. Cytoskeleton and ultrastructure of the unequal pollen mitosis in *Phalaenopsis*. *Protoplasma* 1992; **167**: 183–192.
- [21] BRAUN M, SIEVERS A. Centrifugation causes adaptation of microfilaments. *Protoplasma* 1993; **174**: 50–61.
- [22] CAI G, BARTALESI A, CASINO CD, MOSCATELLI A, TIEZZI A, CRESTI M. The kinesin-immunoreactive homologue from *Nicotiana tabacum* pollen tubes: biochemical properties and subcellular localization. *Planta* 1993; **191**: 496–506.
- [23] CARRAWAY KL, CARRAWAY CAC (red.) The Cytoskeleton: A practical approach. Oxford New York Tokyo: IRL Press 1992.
- [24] CASINO CD, MOSCATELLI A, BARTALESI A, TIEZZI A, CRESTI M. Generative cell cytoskeleton: immunofluorescence studies by the confocal scanning laser microscope. *Giorn Bot Ital* 1990; **124**: 670–671.
- [25] CASINO CD, TIEZZI A, WAGNER VT, CRESTI M. The organization of the cytoskeleton in the generative cell and sperms of *Hyacinthus orientalis*. *Protoplasma* 1992; **168**: 41–50.
- [26] CASINO CD, LI YQ, MOSCATELLI A, SCALI M, TIEZZI A, CRESTI M. Distribution of microtubules during the growth of tobacco pollen tubes. *Biol Cell* 1993; **79**: 125–132.
- [27] CHO SO, WICK SM. Actin in the developing stomatal complex of winter rye: a comparison of actin antibodies and Rh-phalloidin labelling of control and CB-treated tissues. *Cell Motility and the Cytoskeleton* 1991; **19**: 25–36.
- [28] CHU B, KERR GP, CARTER JV. Stabilizing microtubules with taxol increases microfilament stability during freezing of rye root tips. *Plant Cells and Environment* 1993; **16**: 883–889.
- [29] CLEARY AL, HARDHAM AR. Pressure induced reorientation of cortical microtubules in epidermal cells of *Lolium rigidum* leaves. *Plant Cell Physiol* 1993; **34**: 1003–1008.
- [30] CRESTI M, MURGIA M, THEUNIS Ch. Microtubule organization in sperm cells in the pollen tubes of *Brassica oleracea* L. *Protoplasma* 1990; **154**: 151–156.
- [31] DĄBROWSKA R. Cytoplazmatyczne białka motoryczne. *Post Biochem* 1994; **40**: 96–105.
- [32] DEHOSTOS EL, BRADTKE B, LOTTSPREICH F, GERISCH G. Coactosin, a 17 kDa F-actin binding protein from *Dictyostelium discoideum*. *Cell Motility and the Cytoskeleton* 1993; **26**: 81–191.
- [33] DINIS AM, MESQUITA JF. The F-actin distribution during microsporogenesis in *Magnolia soulangeana* soul (*Magnoliaceae*). *Sex Plant Reprod* 1993; **6**: 57–63.
- [34] DUCHESNE LC, CHAREST PJ. Effect of promotor sequence on transient expression of the beta-glucuronidase gene in embryogenic calli of *Larix eurolepis* and *Picea mariana* following microprojection. *Can J Bot* 1992; **70**: 175–180.

- [35] ELEFTHERIOU EP. Abnormal structure of protophloem sieve element cell wall in colchicine-treated roots of *Triticum aestivum*. *Planta* 1994; **193**: 266–274.
- [37] FAIRBAIRN DJ, GOODBODY KC, LLOYD CW. Simultaneous labelling of microtubules and fibrillar bundles in tobacco BY-2 cells by the anti-intermediate filament antibody, ME 101. *Protoplasma* 1994; **182**: 160–169.
- [38] FARADAY CD, SPANSWICK RM. Evidence for a membrane skeleton in higher plants – a spectrin-like polypeptide co-isolated with rice root plasma membranes. *FEBS Letters* 1993; **318**: 313–316.
- [39] FESTER R, HOPKINS C, MANDOLI DF. Wounds incurred in routine cell culture prolong the duration of the life cycle of *Acetabularia acetabulum* and require K^+ to heal. *Protoplasma* 1994; **177**: 123–131.
- [40] FLEURATLESSARD P, SCHMIT AC, VANTARD M, STOECKEL H, ROBLIN G. Microtubules and F-actin filaments in protoplasts of *Mimosa pudica* motor cells. *Plant Physiol Biochem* 1993; **31**: 757–764.
- [41] FOSKET DE, MOREJOHN LC. Structural and functional organization of tubulin. *Ann Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 1992; **43**: 201–240.
- [42] GAMARDELLA R, DUCKETT JG, ALFANO F, GARGIULO M, SQUILLACIOTI C. Studies on the sporogenous lineage in the moss *Timmiella barbuloidea*. 7. The microtubule arrays at meiosis. *Bot Acta* 1993; **106**: 350–355.
- [43] GIDDINGS TH, STAEHELIN LA. Spatial relationship between microtubules and plasma-membrane rosettes during the deposition of primary wall microfibrils in *Closterium* sp. *Planta* 1988; **173**: 22–30.
- [44] GODDARD RH, WICK SM, SILFLOW CD, SNUSTAD DP. Microtubule components of the plant cell cytoskeleton. *Plant Physiol* 1994; **104**: 1–6.
- [45] GUNNING BES, HARDHAM AR. Microtubules. *Ann Res Plant Physiol*. 1982; **33**: 651–698.
- [46] HASEK J, SVOBODOVA J, STREIBLOVA E. Immunofluorescence of the microtubular skeleton in growing and drug-treated yeast protoplasts. *Eur J Cell Biol* 1986; **41**: 150–156.
- [47] HASEZAWA S, NAGATA T. Microtubule organizing centers in plant cells: localization of 49 kDa protein that is immunologically cross-reactive to a 51 kDa protein from sea urchin centrosomes in synchronized tobacco BY-2 cells. *Protoplasma* 1993; **176**: 64–74.
- [48] HAUSE G, HAUSE B, Van LAMMEREN AAM. Microtubular and actin configurations during microspore and pollen development in *Brassica napus* cv. Topas. *Can J Bot* 1992; **70**: 1369–1376.
- [49] HAUSE G, HAUSE B, PECHAN P, Van LAMMEREN AAM. Cytoskeletal changes and induction of embryogenesis in microspore and pollen culture of *Brassica napus* L. *Cell Biol Intern* 1993; **17**: 153–158.
- [50] HELSOP-HARRISON J, HELSOP-HARRISON Y. Restoration of movement and apical growth in the angiosperm pollen tube following cytochalasin-induced paralysis. *Phil Trans Roy Soc London Biol Sci* 1991; **331**: 225–236.
- [51] HESLOP-HARRISON J, HELSOP-HARRISON Y, CRESTI M, CIAMPOLINI F. Ultrastructural features of pollen tubes of *Endymion nonscriptus* modified by cytochalasin D. *Sex Plant Reprod* 1991; **4**: 73–80.
- [52] HESLOP-HARRISON J, HELSOP-HARRISON Y. The actin cytoskeleton in unfixed pollen tubes following microwave-accelerated DMSO-permeabilisation and TRITC-phalloidin staining. *Sex Plant Reprod* 1991; **4**: 6–11.
- [53] HESLOP-HARRISON J, HELSOP-HARRISON Y. Intracellular motility, the actin cytoskeleton and germinability in the pollen of wheat (*Triticum aestivum* L.) *Sex Plant Reprod* 1992; **4**: 247–255.
- [54] HESLOP-HARRISON Y, HELSOP-HARRISON J. Germination of monocolpate angiosperm pollen: evolution of the actin cytoskeleton and wall during hydration, activation and tube emergence. *Ann Bot* 1992; **69**: 385–394.

- [55] HELSOP-HARRISON Y, HELSOP-HARRISON J. Germination of monocot pollen: effects of inhibitory factors and the Ca^{+2} -channel blocker, nifedipine. *Ann Bot* 1992; **69**: 395–403.
- [56] HU SY, LI CG, ZHU C. Ultrastructure of microfilaments in pollen and pollen tubes of *Hosta ventrica*. *Acta Bot Sin* 1992; **34**: 8–14.
- [57] HUANG BQ, PIERSON ES, RUSSEL SD. Video microscopic observations of living, isolated embryo sacs of *Nicotiana* and their component cells. *Sex Plant Reprod* 1992; **5**: 156–162.
- [58] HUANG BQ, SHERIDAN WF. Female gametophyte development in maize: Microtubular organization and embryo sac polarity. *Plant Cell* 1994; **6**: 845–861.
- [59] HUSH JM, HAWES CR, OVERALL RL. Interphase microtubule reorientation predicts a new cell polarity in wounded pea roots. *J Cell Sci* 1990; **96**: 47–61.
- [60] HUSH JM, OVERALL RL. Re-orientation of cortical F-actin is not necessary for wound-induced microtubule re-orientation and cell polarity establishment. *Protoplasma* 1992; **169**: 97–106.
- [61] IGBAL MCM, MOLLERS C, ROBBELEN G. Increased embryogenesis after colchicine treatment of microspore cultures of *Brassica napus* L. *J Plant Physiol* 1994; **143**: 222–226.
- [62] JABLONSKY PP, ELLIOT J, WILLIAMSON RE. Purification of a mung bean protein binding to microtubules through two defined sites in the carboxyl-terminal domain of beta-tubulin. *Plant Sci* 1993; **1–2**: 35–45.
- [63] JACKSON SL, HEATH IB. UV microirradiation implicates F-actin in reinforcing growing hyphal tips. *Protoplasma* 1993; **175**: 67–74.
- [64] JAGŁA K, STAFIEJKO-MROCZKA B, DOMANIEWSKI J. Niektóre zmiany w cytoskieletcie po transformacji nowotworowej. *Post Biochem* 1991; **37**: 34–40.
- [65] JAMES SW, SILFLOW CD, STROOM P, LEFEBVRE PA. A mutation in the alpha-1-tubulin gene of *Chlamydomonas reinhardtii* confers resistance to anti-microtubule herbicides. *J Cell Sci* 1993; **106**: 209–218.
- [66] JIANG CJ, SONOBE S. Identification and preliminary characterization of a 65-kDa higher-plant microtubule-associated protein. *J Cell Sci* 1993; **105**: 891–901.
- [67] JOYCE CM, VILLEMUR R, SNUSTAD DP, SILFLOW CD. Tubulin gene expression in maize (*Zea mays* L.): change in isotype expression along the developmental axis of seeding root. *J Mol Biol* 1992; **227**: 97–107.
- [68] JUNG G, HAHNE B, WERNICKE W. Cell cycle in potentially dedifferentiating cereal mesophyll protoplasts cultured *in vitro*. II. Behaviour of the cytoskeleton. *J Plant Physiol* 1993; **141**: 428–435.
- [69] KAKIMOTO T, SHIBOAKA H. Action filaments and microtubules in the preprophase band and phragmoplast of tobacco cells. *Protoplasma* 1987; **140**: 151–156.
- [70] KATSAROS CI, MEIER I, MELKONIAN M. Immunolocalization of centrin in the flagellar apparatus of male gametes of *Ectocarpus siliculosus* (*Phaeophyceae*) and other brown algal motile cells. *J Phycol* 1993; **6**: 787–797.
- [71] KENGEN HMP, AMSTEL TV, KNUMAN B. Basket-shaped structures formed by F-actin in the nuclei of elongating cells of *Nicotiana tabacum*. *Can J Bot* 1993; **71**: 725–731.
- [72] KIMURA S, MIZUTA S. Role of the microtubule cytoskeleton in alternating changes in cellulose-microfibril orientation in the coenocytic green alga *Chaetomorpha moniligera*. *Planta* 1994; **193**: 21–31.
- [73] KOPCZAK SD, HAAS NA, HUSSEY PJ, SILFLOW CD, SNUSTAD DP. The small genome of *Arabidopsis* contains at least six expressed α -tubulin genes. *Plant Cell* 1992; **4**: 539–547.
- [74] KOUTOULIS A, LUDWIG M, WETHERBEE R. A scale associated protein of *Apedinella radians* (*Pedinellophyceae*) and its possible role in the adhesion of surface components. *J Cell Sci* 1993; **104**: 391–398.

- [75] KOUTOULIS A, WETHERBEE R. Cytoskeletal dynamics of *Apedinella radians* (Pedinellophyceae). I. Pre-division development and the formation of spine-scales and body scales. *Protoplasma* 1993; **175**: 17–28.
- [76] KOUTOULIS A, WETHERBEE R. Cytoskeletal dynamics of *Apedinella radians* (Pedinellophyceae). II. Cell division and the maintenance of cell polarity and symmetry. *Protoplasma* 1993; **175**: 29–42.
- [77] KOUTOULIS A, WETHERBEE R. Cytoskeletal dynamics of *Apedinella radians* (Pedinellophyceae). III. Post-division development, maintenance of cell symmetry, and the re-establishment of interphase morphology. *Protoplasma* 1993; **175**: 43–57.
- [78] KURODA K. Cytoplasmic streaming in plant cells. *Int Rev Cytol* 1990; **121**: 267–307.
- [79] KUTERNOZIŃSKA W. Udział cytoszkieletu w procesie różnicowania ksylemu w roślinach wyższych. *Post Biol Kom* 1990; **17**: 39–53.
- [80] KWIATKOWSKA K, SOBOTA A. Capping receptorów powierzchniowych komórki – rola aktyny i białek jej towarzyszących. *Kosmos* 1993; **42**: 535–556.
- [81] LAMMEREN VAN AAM. Structure and function of the microtubular cytoskeleton during endosperm development in wheat: an immunofluorescence study. *Protoplasma* 1988; **146**: 18–27.
- [82] LAPORTE K, ROSSIGNOL M, TRAAS JA. Interaction of tubulin with the plasma membrane: tubulin is present in purified plasmalemma and behaves as an integral membrane protein. *Planta* 1993; **191**: 413–416.
- [83] LI YQ, CHEN F, LINSKENS HF, CRESTI M. Distribution of unesterified pectins in cells walls of pollen tubes of flowering plants. *Sex Plant Reprod* 1994; **7**: 145–152.
- [84] LIGRONE R, DUCKETT JG. Cytoplasmic polarity and endoplasmic microtubules associated with the nucleus and organelles are ubiquitous features of food-conducting cells in bryoid mosses (*Bryophyta*). *New Phytologist* 1994; **127**: 601–614.
- [85] LIU B, MARC J, JOSHI HC, PALEVITZ BA. α -tubulin-related protein associated with the microtubule arrays of higher plants in a cell cycle-dependent manner. *Cell Sci* 1993; **104**: 1217–1228.
- [86] MCCURDY DW, PALEVITZ BA, GUNNING BES. Effect of cytochalasins in actin on dividing root tip cells of *Allium* and *Triticum*: a comparative immunocytochemical study. *Cell Motility and the Cytoskeleton* 1991; **18**: 107–112.
- [87] MCDONALD AR, GARBARY DJ, DUCKETT JG. Rhodamine-phalloidin staining of F-actin in *Rhodophyta*. *Biotechnic & Histochemistry* 1993; **68**: 91–98.
- [88] MCDONALD AR, LIU B, JOSHI HC, PALEVITZ BA. γ -tubulin is associated with a cortical-microtubule-organizing zone in the developing guard cells of *Allium cepa* L. *Planta* 1993; **191**: 357–361.
- [89] MENZEL D. Chasing coiled coils – intermediate filaments in plants. *Bot Acta* 1993; **106**: 294–300.
- [90] MINEUKI Y, PALEVITZ BA. Relationship between preprophase band organization F-actin and the division site in *Allium*: Fluorescence and morphometric studies on cytochalasin-treated cells. *J Cell Sci* 1990; **97**: 283–296.
- [91] MORISSET C, GAZEAU C, HANSZ J, DEREUDDRE J. Importance of actin cytoskeleton behaviour during preservation of carrot cell suspensions in liquid nitrogen. *Protoplasma* 1993; **173**: 35–47.
- [92] MOSCATELLI A, TIEZZI A, CAI G, CIAMPOLINI, CRESTI M. Cytoskeletal proteins in pollen tubes. *Giorn Bot Ital* 1988; **122**: 90–91.
- [93] MOSCATELLI A, TIEZZI A, VIGNANI R, CAI G, BARTALESI A, CRESTI M. Presence of kinesin in tobacco pollen tube. (w) Cresti M, Gori P, Pacini E (red.) Sexual reproduction in higher plants. Berlin, Heidelberg, New York, Tokyo: Springer 1988: 205–209.

- [94] MOSCATELLI A, CASINO CD, CAI G, CRESTI M. Interaction between tobacco pollen tube microtubules and mikrotubule associated proteins (MAPs) from mammalian nervous system. *Giorn Bot Ital* 1991; **125**: 1011–1019.
- [95] MOTOMURA T. Electron and immunofluorescence microscopy on the fertilization of *Fucus distichus* (Fucales, Phaeophyceae). *Protoplasma* 1994; **178**: 97–110.
- [96] OBERMAYER G, WEISESEEL MH. Calcium channel blocker and calmodulin antagonists affect the gradient of free calcium ions in lily pollen tubes. *Eur J Cell Biol* 1991; **56**: 319–327.
- [97] PALEVITZ BA. Accumulation of F-actin during cytokinesis in *Allium*. Correlation with microtubule distribution and the effects of drugs. *Protoplasma* 1987; **141**: 24–32.
- [98] PALEVITZ BA. Organization of cortical microfilaments in dividing root cells. *Motility and the Cytoskeleton* 1992; **23**: 252–264.
- [99] PALEVITZ BA. Relationship between the generative cell and vegetative nucleus in pollen tube of *Nicotiana tabacum*. *Sex Plant Reprod* 1993; **6**: 1–19.
- [100] PALEVITZ BA. Organization of the mitotic apparatus during generative cell division in *Nicotiana tabacum*. *Protoplasma* 1993; **174**: 25–35.
- [101] PALEVITZ BA, CRESTI M. Cytoskeletal changes during generative cell division and sperm formation in *Tradescantia virginiana*. *Protoplasma* 1989; **150**: 54–71.
- [102] PALEVITZ BA, LIU B. Microfilaments (F-actin) in generative cells and sperm: an evaluation. *Sex Plant Reprod* 1992; **5**: 89–100.
- [103] PANTERIS E, APOSTOLAKOS P, GALATIS B. Microtubule organization, mesophyll cell morphogenesis, and intercellular space formation in *Adiantum capillus veneris* leaflets. *Protoplasma* 1993; **172**: 97–110.
- [104] PANTERIS E, APOSTOLAKOS P, GALATIS B. Microtubule organization and cell morphogenesis in 2 semi-lobed cell types of *Adiantum capillus veneris* leaflets. *New Phytologist* 1993; **125**: 509–520.
- [105] PARTHASARATHY MV, PERDUE TD, WITZTUM A, ALVERNAZ J. Actin network as a normal component of the cytoskeleton in many vascular plant cells. *Amer J Bot* 1985; **72**: 1318–1322.
- [106] PERRET E, DAVOUST J, ALBERT M, BESSEAU L, SOYERGOBILLARD MO. Microtubule organization during the cell cycle of the primitive eucaryote *Dinoflagellate Cryptohcodinium-Cohnii*. *J Cell Sci* 1993; **104**: 639–651.
- [107] PICKETT-HEAPS JD, MARTIN A. An early, neglected description of the fibres (microtubules) in the eucaryotic flagellum. *Protoplasma* 1993; **176**: 14–16.
- [108] PICTON JM, STEER MW. Evidence of the Role of Ca⁺² Ions in Tip Extension in Pollen Tubes. *Protoplasma* 1993; **115**: 11–17.
- [109] PIERSON ES, CRESTI M. Cytoskeleton and cytoplasmic organization of pollen and pollen tubes. *Int Rev Cytol* 1992; **140**: 73–117.
- [110] PIERSON ES, SMITH PJS, SHIPLEY AM, JAFFE LF, CRESTI M, HEPLER PK. Ca⁺² fluxes around pollen grains and pollen tubes of lily: Normal development of boric acid from the medium. *Biol Bull* 1993; **185**: 302–303.
- [111] PIERSON ES, MILLER DD, CALLAHAM DA, SHIPLEY AM, RIVERS BA, CRESTI M, HEPLER PK. Pollen tube growth is coupled to the extracellular calcium ion flux and the intracellular gradient: Effect of BAPTA-type buffers and hypertonic media. *Plant Cell* 1994; **6**: 1815–1828.
- [112] ROBERSON RW, VARGAS MM. The tubulin cytoskeleton an its sites of nucleation in hyphal tips of *Allomyces macrogynus*. *Protoplasma* 1994; **182**: 19–31.
- [113] RUTTEN TLM, KROHN M, KNUIMAN B. Cell-wall regeneration in pollen subprotoplasts. *Acta Bot Neerl* 1991; **40**: 211–216.
- [114] RUTTEN TLM, DERKSEN J. Microtubules in pollen tube subprotoplasts: organisation during protoplast formation and protoplast outgrowth. *Protoplasma* 1992; **167**: 231–237.

- [115] SALTVEIT ME. Effect of high-pressure gas atmospheres and anaesthetics on chilling injury of plants. *J Exp Bot* 1993; **44**: 1361–1368.
- [116] SCHLIWA M. The Cytoskeleton. *Cell Biology Monographs* 1986; vol. 13.
- [117] SEAGULL RW. Changes in microtubule organization and wall microfibril orientation during *in vitro* cotton fiber development: an microfluorescent study. *Can J Bot* 1986; **64**: 1373–1381.
- [118] SEAGULL RW. The effects of microtubule and microfilament disrupting agents on cytoskeletal arrays and wall deposition in developing cotton fibers. *Protoplasma* 1990; **159**: 44–59.
- [119] SNUSTAD DP, HAAS NA, KOPCZAK SD, SILFLOW CD. The small genome of *Arabidopsis* contains at least nine expressed β -tubulin genes. *Plant Cell* 1992; **4**: 549–556.
- [120] SONESSON A, WIDELL S. Cytoskeleton components of inside-out and right-side-out plasma membrane vesicles from plants. *Protoplasma* 1993; **177**: 45–52.
- [121] SPRINGER WR, HAYWOODREID PL. Antibodies specific for gp40 inhibit cell-cell adhesion by cross-linking the protein on the surface of *Dictyostelium purpureum*. *J Cell Biochem* 1993; **53**: 85–97.
- [122] STAIGER CJ, SCHLIWA M. Actin localization and function in higher plants. *Protoplasma* 1987; **141**: 1–1.
- [123] STAIGER CJ, GOODBODY KC, HUSSEY PJ, VALENTA R, DROBAK BK, LLOYD CW. The profilin multigene family of maize – differential expression of three isoforms. *Plant J* 1993; **4**: 631–641.
- [124] STANKOVIC B, ABE S, DAVIES E. Co-localization of polysomes, cytoskeleton, and membranes with protein bodies from corn endosperm – evidence from fluorescence microscopy. *Protoplasma* 1993; **177**: 66–72.
- [125] STAXEN I, KLIMASZEWSKA K, BORNMAN CH. Microtubular organization in protoplasts and cells of somatic embryo-regenerating and non-regenerating cultures of *Larix*. *Physiol Plant* 1994; **91**: 680–686.
- [126] STAXEN I, BORNMAN CH. A morphological and cytological study of *Petunia hybrida* exposed to UV-B radiation. *Physiol Plant* 1994; **91**: 735–740.
- [127] STEINERT PM, ROOP DR. Molecular and cellular biology of intermediate filaments. *Am Rev Biochem* 1988; **57**: 593–626.
- [128] TANAKAI. Microtubule-determined plastid distribution during microsporogenesis in *Lilium longiflorum*. *J Cell Sci* 1991; **99**: 21–32.
- [129] TANAKA I, WAKABAYASHI T. Organization of action and microtubule cytoskeleton preceding pollen germination. *Planta* 1992; **186**: 473–482.
- [130] THEUNIS CH, PIERSON ES, CRESTI M. Isolation of male and female gametes in higher plants. *Sex Plant Reprod* 1991; **4**: 145–154.
- [131] THEUNIS CH, PIERSON ES, CRESTI M. The microtubule cytoskeleton and the rounding of isolated generative of *Nicotiana tabacum*. *Sex Plant Reprod* 1992; **5**: 64–71.
- [132] THIMANN KV, REESE K, NACHMIAS VT. Actin and the elongation of plant cells. *Protoplasma* 1992; **171**: 153–166.
- [133] TIEZZI A, CASINO CD, BARTALESI A, PIERSON ES, CRESTI M. Pollen formation, pollen tube growth and generative cell division in *Nicotiana tabacum*: the role of microtubules. *Giorn Bot Ital* 1991; **125**: 955.
- [134] TIEZZI A, PIERSON ES, THEUNIS CH, CIAMPOLINI F, CAI GP, BARTALESI A, CRESTI M. The motile apparatus of sperm cells in angiosperms: correlations with lower plants, gymnosperms and animals. *Serono Symposia Publications from Raven* 1991; **77**: 1017–1020.
- [135] TIEZZI A, MOSCATELLI A, CAI G, BARTALESI A, CRESTI M. An immunoreactive homolog of mammalian kinesin in *Nicotiana tabacum* pollen tubes. *Cell Motility and the Cytoskeleton* 1992; **21**: 132–137.

- [136] TRIMER RE, LEWANDOWSKI CL. Ultrastructure of the basal apparatus and putative vestigial feeding apparatuses in a quadriflagellate euglenoid (*Euglenophyta*). *J Phycol* 1994; **30**: 28–38.
- [137] UEDA K, KAWAGUCHI T, NOGUCHI T. Chloroplast microtubules in *Oedogonium capilliphorme* (*Chlorophyta*). *J Phycol* 1994; **30**: 23–28.
- [138] VANTARD M, SCHELLENBAUM P, PETER C, LAMBERT AM. Higher plant microtubule-associated proteins – *in vitro* functional assays. *Biochimie* 1993; **75**: 725–730.
- [139] VARGAS MM, ARONSON JM, ROBERSON RW. The cytoplasmic organization of hyphal tip cells in the fungus *Allomyces macrogynus*. *Protoplasma* 1993; **176**: 43–52.
- [140] WADA M, GROLIG F, HAUPT W. Light-oriented chloroplast positioning – contribution to progress in photobiology. *J Phytochem Phytohiol B - Biology* 1993; **17**: 3–25.
- [141] WEBB MC, GUNING BEES. The microtubular cytoskeleton during development of the zygote, proembryo and free-nuclear endosperm in *Arabidopsis thaliana*. *Planta* 1911; **184**: 187–195.
- [142] WELCH MD, VINH DBN, OKAMURA HH, DRUBIN DG. Screens of extragenic mutations that fail to complement Act 1 alleles identify genes that are important for actin function in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 1993; **135**: 265–274.
- [143] WENT JV, CRESTI M. Pre-fertilization degeneration of both synergids in *Brassica campestris* ovules. *Sex Plant Reprod* 1998; **1**: 208–216.
- [144] WERNICKE W, JUNG G. Role of cytoskeleton in cell shaping of developing mesophyll of wheat (*Triticum aestivum*). *Eur J Cell Biol* 1992; **57**: 88–94.
- [145] WHITE RG, SACK FD. Actin microfilaments in presumptive statocytes of root caps and coleoptiles. *Am J Bot* 1990; **77**: 17–26.
- [146] WICK SM, MUTO S, DUNIEC J. Double immunofluorescence labelling of calmodulin and tubulin in dividing plant cells. *Protoplasma* 1985; **126**: 198–206.
- [147] XU SX, ZEE SY. Confocal microscopic observations on actin filament distribution in lily pollen protoplasts. *Acta Bot Sin* 1992; **34**: 907–911.
- [148] XU SX, Van LAMMEREN AAM. Microtubular configurations during the cellularization of coenocytic endosperm in *Ranunculus sceleratus* L. *Sex Plant Reprod* 1993; **6**: 127–132.
- [149] XU SX, LI CG, ZHU C. Confocal microscopy observations on actin cytoskeleton in the pollen and pollen protoplast of *Narcissus*. *Acta Bot Sin* 1993; **35**: 12–19.
- [150] YU HS, RUSSELL SD. 3-dimensional ultrastructure of generative cell mitosis in the pollen tube of *Nicotiana tabacum*. *Eur J Cell Biol* 1993; **61**: 338–348.
- [151] ZHANG D, WADSWORTH P, HEPLER PK. Dynamics of microfilaments are similar, but distinct from microtubules during cytokinesis in living, dividing plant cells. *Cell Motility and the Cytoskeleton* 1993; **24**: 151–155.
- [152] ZHU C, LI CG, HU SY. Visualisation of actin filament patterns in pollen tubes of *Hosta caerulea* Tratt. with non-fixation and TRITC-phalloidin method. *Acta Bot Sin* 1991; **33**: 1–6.
- [153] ZHOU C, YANG HY, XU SX. Fluorescence microscopic observations on actin filament distribution in corn pollen and *Gladiolus* pollen protoplasts. *Acta Bot Sin* 1990; **32**: 657–662.

Otrzymano: 19.05.1995 r.

Przyjęto: 27.09.1995 r.

Adres autora: 20-033 Lublin, ul. Akademicka 19

REGULACJA CYKLU KOMÓRKOWEGO W NAPROMIENIONEJ KOMÓRCIE ZWIERZĘCEJ

CELL CYCLE REGULATION IN THE IRRADIATED ANIMAL CELL

Irena SZUMIEL

Zakład Radiobiologii i Ochrony Zdrowia Instytutu Chemii i Techniki Jądrowej
w Warszawie

Streszczenie: Promieniowanie jonizujące (X i γ) zaburza przechodzenie komórki zwierzęcej przez cykl komórkowy, przejściowo blokując ją w fazie G₂, na granicy faz G₁/S oraz spowalniając przejście przez fazę S. Następuje to w wyniku generacji sygnału alarmowego w uszkodzonym przez promieniowanie DNA. Jednym z możliwych “czujników molekularnych” jest aktywowana przez nacięcie nici DNA kinaza białkowa, która z kolei aktywuje gen supresorowy guzów (*tumor suppressor gene*) – p53; to pociąga za sobą syntezę p21, inhibitora cyklozależnych kinaz białkowych. Ten ostatni odpowiada bezpośrednio za blok G₁/S. Praca omawia skutki działania p21 oraz hipotetyczne mechanizmy regulacji bloku G₂, a także związek między zaburzeniami w cyklu komórkowym i promieniowrażliwością komórkową.

Słowa kluczowe: cykl komórkowy, blok G₁/S, blok G₂, p53, p21, promieniowanie jonizujące

Summary: Ionizing radiation (X and γ) disturbs the animal cell's progress through the cell cycle, reversibly blocking it in G₂ phase, at the G₁/S boundary and delaying the progress through the S phase. It is assumed that this is the result of generation of an alarm signal in the radiation-damaged DNA. One possible “molecular sensor” is DNA-activated protein kinase, which, in turn, activates the tumour suppressor gene – p53; then follows the induction of p21, inhibitor of the cyclin-dependent protein kinases. The latter is directly responsible for the G₁/S block. In this paper consequences of action of p21 and the hypothetical mechanisms of G₂ block are discussed, as well as relations between cell cycle disturbances and cellular radiation sensitivity.

Key words: cell cycle, G₁/S block, G₂ block, p53, p21, ionizing radiation

Wykaz skrótów: AT – ataxia telangiectasia – choroba dziedziczna, której towarzyszy m.in. podwyższona promieniowrażliwość, cdk – cyklozależna kinaza białkowa, cDNA – DNA komplementarny, CIP1 (ang. *cdk-interacting protein 1*) – synonim białka p21, DNA-PK – kinaza białkowa aktywowana przez

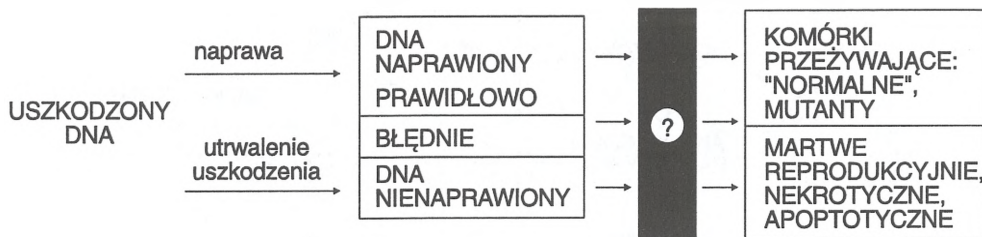
nacięcia nici DNA, **Gadd** (ang. *growth arrest, DNA damage*) – białka syntetyzowane przez uszkodzone komórki, **Gy** – grej, jednostka dawki pochłoniętej promieniowania (1 dżul/kg), **MAPK** – kinaza aktywowana przez czynnik mitogeny, **NFκB** – czynnik transkrypcyjny aktywowany w stresie oksydacyjnym, **PARP** – polimeraza poli (ADP-rybozy), **PCNA** (ang. *proliferating cell nuclear antigen*) – antygen jądrowy komórek proliferujących, **RPA** (ang. *replication protein A*) – czynnik replikacyjny, **SF2** – ułamek przeżywalności po dawce 2 Gy, **topo II** – topoiizomeraza II, **V(D)J** – odcinek zmienny, różnorodności, łączący w genach immunoglobulin, także nazwa rekombinacji w tych genach, **WAF1** (ang. *wild type p53 activated fragment 1*) – synonim białka p21, **XIP** – białka indukowane przez promieniowanie rentgenowskie (X).

Na uszkodzenie przez promieniowanie jonizujące, takie jak rentgenowskie lub gamma, komórki zwierzęce reagują m.in. zaburzeniami w przechodzeniu przez cykl komórkowy: najsilniej zaznaczone jest zatrzymanie w fazie G2, tzw. opóźnienie mitotyczne lub blok G2; nieco słabiej – przejście z fazy G1 do S oraz przechodzenie przez fazę S. Zaburzenia te są proporcjonalne do wielkości dawki promieniowania i w wielu przypadkach związane z promieniowrażliwością właściwą komórki. Pierwsze obserwacje tych zaburzeń (nie tylko popromiennych, także po działaniu innych czynników uszkadzających DNA) pochodzą z lat sześćdziesiątych, dopiero jednak ostatnio postęp w biologii komórki umożliwił poznanie mechanizmów tego zjawiska [2, 18, 24], jakkolwiek bardzo wiele jeszcze pozostaje do zbadania.

Do niedawna milcząco zakładano powiązanie skutków biologicznych promieniowania wyłącznie z uszkodzeniami popromiennymi DNA i ich naprawą. Cały ciąg procesów zachodzących między indukcją uszkodzenia a śmiercią komórki pozostawał nieznanym. Pokazane na rysunku 1 związki przyczynowe są znakomicie udowodnione doświadczalnie, ale nie jest to cała prawda. Z tym “centralnym dogmatem radiobiologii” niezgodne są liczne obserwacje wskazujące na związek między funkcjonowaniem układu przekazywania sygnałów a losem napromienionej komórki. Przytoczę 2 takie przykłady.

Porównanie krzywych przeżywalności fibroblastów zarodkowych szczura, kontrolnych i transfekowanych zmutowanymi onkogenami *ras* i *myc* wskazują na związek między promienioopornością komórkową a tymi onkogenami [27]. Z tego co wiemy o ich funkcji w komórce, nic nie wskazuje na związek z procesami naprawy DNA. Procesy te zachodzą w komórkach transfekowanych z taką samą wydajnością jak w komórkach nie transfekowanych [8, 17].

Tymocyty z myszy homozygotycznych pozbawionych genu supresorowego guzów *p53*^{-/-} wykazują niezwykłą oporność na promieniowanie, jak można sądzić z ich wysokiej żywotności, w porównaniu ze szczepem dzikim *p53*^{+/+} i heterozygotą *p53*^{+/-}. W tym przypadku wyjaśniono (przegląd w [21], że jest to spowodowane niezdolnością komórek *p53*^{-/-} do wejścia na drogę apoptozy, śmierci popromiennej częściej w komórkach limfoidalnych, której towarzyszą charakterystyczne objawy: zmniejszenie objętości, kondensacja chromatyny, usieciowanie białek i degradacja DNA na odcinki, będące wielokrotnością odcinka między 2 fragmentami łącznikowymi (przegląd w [39]).



Rys. 1. “Centralny dogmat radiobiologii”, czyli obserwowane na poziomie komórkowym skutki napromienienia jako wynik uszkodzeń DNA (błędnie naprawionych lub nie naprawionych); procesy pośredniczące między zmianami na poziomie cząsteczkowym i komórkowym zawarte w “czarnej skrzynce”

Okazało się też, że czynniki wzrostu oraz inhibitory kinaz białkowych modyfikują przeżywalność napromienionych komórek [36]. Wszystkie te obserwacje zwróciły uwagę na rolę układu przekazywania sygnałów w odpowiedzi komórkowej na promieniowanie [39].

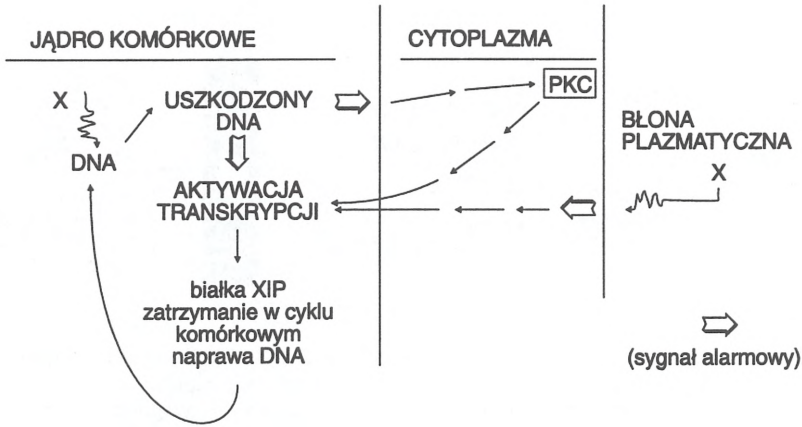
SYGNAŁ ALARMOWY I POPROMIENIENNY BLOK NA GRANICY FAZ G1/S

W 1991 r. Weichselbaum i wsp. (41) opierając się na obserwacjach grupy Herrlich [20] i własnych sformułował hipotezę “pętli sygnalizacyjnej”. Według tych autorów uszkodzenie DNA generuje sygnał alarmowy, który wychodzi z jądra komórkowego do cytoplazmy i – z udziałem kinazy białkowej C – jest odsyłany z powrotem do jądra, co powoduje aktywację transkrypcji. W wyniku tego syntetyzowane są białka XIP (*X-ray-induced proteins*) potrzebne do odnowy komórkowej, a także następuje zahamowanie przechodzenia przez cykl komórkowy (rys. 2).

Nie jest to jedyny postulowany obieg hipotetycznego sygnału alarmowego generowanego w komórce przez promieniowanie jonizujące. Możliwa jest generacja sygnału alarmowego w błonie plazmatycznej, natomiast prace nad aktywowaną przez uszkodzenie DNA kinazą białkową (DNA-PK) (przegląd w [1, 37]) wskazują, że sygnał alarmowy w ogóle nie musi opuszczać jądra komórkowego.

DNA-PK zbudowana jest z 3 podjednostek (rys. 3); p350 – katalitycznej oraz p70 i p80* – podjednostek Ku (identycznych z antygenem Ku u ludzi z chorobami

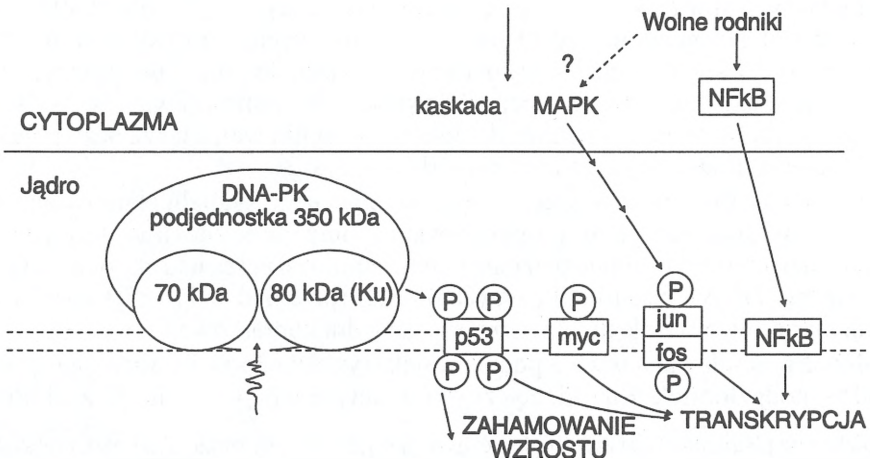
* Ponieważ w piśmiennictwie radiobiologicznym przyjęło się oznaczenie p70 i p80, mimo dokładniejszego późniejszego oznaczenia masy cząsteczkowej (72 i 86) pozostawiamy bez zmian.



Rys. 2. Możliwe drogi przekazywania sygnału alarmowego, wytworzonego przez uszkodzenie popromienne DNA: pętla sygnalizacyjna [41] i droga bezpośrednia (z DNA-PK); generacja sygnału w błonie plazmatycznej jako niezależna droga "alarmowa"

autoimmunologicznymi) (przegląd w [1]). Kinaza ta fosforyluje *in vitro* wiele białek, m.in. czynników transkrypcyjnych. Jest to zatem stosunkowo prosty mechanizm bezpośredniej aktywacji transkrypcji przez uszkodzenia DNA (rys. 3).

Substratami DNA-PK *in vitro* jest wiele ważnych białek (tab. 1); o ich fosforylacji *in vivo* wnioskujemy jednak pośrednio. Dimer podjednostek p70 i p80 okazał się mieć aktywność helikazową. Właściwość ta wskazuje na możliwą rolę DNA-PK w naprawie rekombinacyjnej DNA, biorąc pod uwagę ostatnio zidentyfikowane geny naprawy DNA: XRCC5 (*X-ray cross-complementing gene 5*) [4, 33] – to podjednostka p86; DNA-PK; XRCC7 to podjednostka katalityczna tego enzymu, p350 [14].



Rys. 3. Budowa DNA-PK i powiązania z komórkowym układem przekazywania sygnałów (wg [1], zmodyfikowane)

Transfekcja cDNA dla białka Ku komórek XR-VI5B, xrs5 i innych grupy XR CC5 kompensuje w nich defekt naprawy pęknięć podwójnoniciowych DNA i jednocześnie brak zdolności do rekombinacji V(D)J (*Variable, Diversity, Joining* w immunoglobulinach) [33]. Krzywe przeżywalności kontrolnego transfektanta V79 (linii szczepu dzikiego) i mutanta promieniowrażliwego wyraźnie różnią się nachyleniem, świadcząc o różnicy w promieniowrażliwości. Transfekcja cDNA dla mniejszej podjednostki Ku nie zmienia przeżywalności, natomiast dla większej podjednostki (p80) lub obu (p70 i p80) – zwiększa promieniooporność. Na obecnym etapie badań trudno ustalić, czy jest to skutek bezpośredniego udziału tych białek w naprawie rekombinacyjnej pęknięć podwójnoniciowych DNA, wydaje się to jednak prawdopodobne.

Funkcja sygnalizacyjna DNA-PK polegałaby natomiast na aktywacji p53. Rola p53 w komórce zwierzęcej jest przedmiotem wielkiego zainteresowania, o czym świadczy lawina prac (przeglądy w [21, 22, 31]). W komórce uszkodzonej przez promieniowanie ta rola wydaje się być niezwykle ważna. Jednym z następstw uszkodzenia DNA jest przyrost ilości p53 dzięki spowolnieniu degradacji tego białka [18, 19, 23]. Jego $t_{1/2}$ wynosi 30 min, po napromienieniu zaś ulega wydłużeniu dzięki procesom jeszcze nie do końca zidentyfikowanym, ale napewno obejmującym zahamowanie ubiquitytacji i proteolizy [9]. Skorelowany z tym przyrostem jest stopień zahamowania przejścia komórek z fazy G1 do S. Ten tzw. blok G1 nie występuje w komórkach ze zmutowanym p53.

Jednym z genów, którego transkrypcję pod wpływem p53 udowodniono wprost, jest *mdm2*; zadaniem tego genu jest regulacja ilości p53 na zasadzie sprzężenia zwrotnego. Ponadto wiążemy z p53 syntezę białka GADD45 (*growth arrest – DNA damage*) i p21. Oba są powodem bloku G1 w napromienionych komórkach.

GADD45 wiąże PCNA (*proliferating cell nuclear antigen*), niezbędny składnik kompleksu replikacyjnego [34]. Zaobserwowano, że hamuje to replikację DNA i pobudza jego naprawę z wycięciem, jednak szczegółowy mechanizm nie jest znany. Indukcja apoptozy przez p53 odbywa się poprzez aktywację transkrypcji genu *bax* [45]. Białko BAX wiąże się z białkiem BCL-2, inhibitorem apoptozy.

Z punktu widzenia regulacji cyklu komórkowego (przegląd polskojęzyczny zob. [43, 44]) najistotniejsze wydaje się indukowanie przez p53 białka p21, znanego też jako CIP1 (*cdk-interacting protein 1*) lub WAF1 (*wild type p53 activated fragment 1*). Jest to inhibitor kinaz cyklinozależnych [15] i jego działania w napromienionej komórce wiąże się z blokiem w G1, a także z zahamowaniem replikacji DNA, jeżeli komórka otrzymuje dawkę promieniowania będąc w fazie S. Drugim mechanizmem

TABELA 1. Niektóre substraty DNA-PK *in vitro* wg [1]

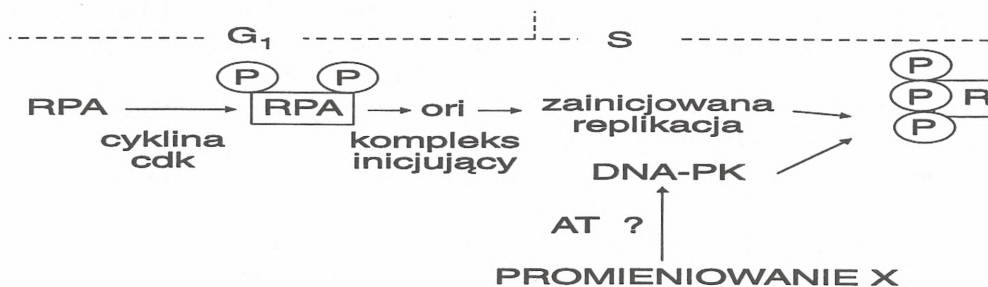
Białka wiążące DNA	Inne
SV40 T Ag	hsp90
p53	białko tau
Ku p70 i p80	kazeina
polimeraza RNA II	foswityna
SRF	
Czynniki transkrypcyjne: cJun, cFos, Oct1, Sp1, cMyc, CTF/NF- κ B, TFIIID, czynnik replikacyjny RPA, topoizomerazy I i II (+ 7 innych)	

jest hiperfosforylacja czynnika replikacyjnego A (RPA). W komórce nienapromienionej następuje ona po zainicjowaniu replikacji danego replikonu, co stanowi rodzaj "znacznika molekularnego" dla tego replikonu [38]. Po napromienieniu zachodzi ona najprawdopodobniej pod wpływem genu AT z udziałem DNA-PK (hipoteza Sweezy'ego i Fishela [38]) lub innej kinazy i można przypuszczać, że mechanizmu tego brak w komórkach AT (rys. 4).

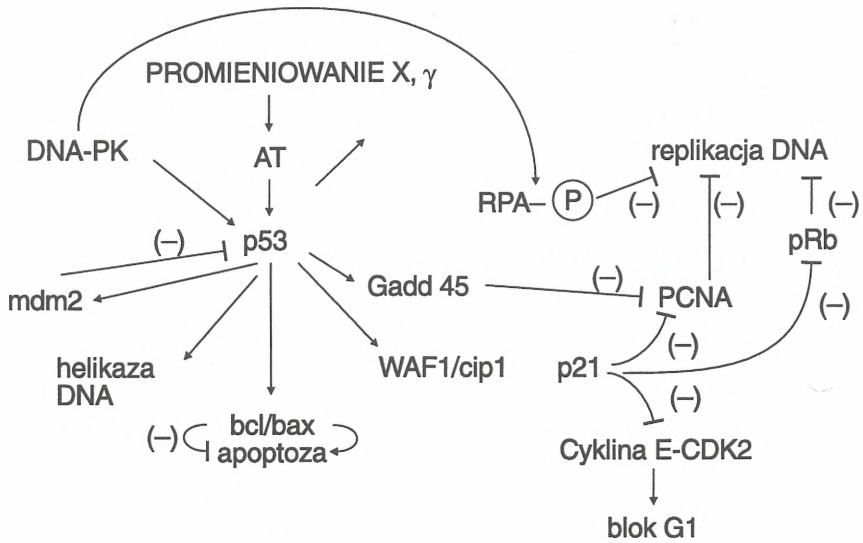
Trzecim mechanizmem jest zahamowanie fosforylacji białka pRb (gen supresorowy retinoblastoma). Jego postać niefosforylowana wiąże swoisty dla fazy S czynnik transkrypcyjny E2F, natomiast ufosforylowanie powoduje uwolnienie E2F. Zahamowanie fosforylacji jest zatem dodatkowym czynnikiem hamującym przejście komórek z fazy G1 w S. Na rysunku 5 przedstawione są omówione powiązania między procesami pobudzonymi przez napromienienie komórki.

Dowody doświadczalne na związek między p53, p21 i popromiennym blokiem w G1 pochodzą głównie z pracy Dulicia i wsp. [11]. Zbadano w niej działanie promieniowania γ na przechodzenie populacji synchronicznej fibroblastów ludzkich przez cykl komórkowy. W czasie 0 przesiewano fibroblasty mitotyczne; procent populacji komórek w fazie S, kontrolnej i napromienionej w 6 h po przesianiu dawką 6 Gy promieniowania γ (dane ze znakowania [^3H]tymidyna) porównywano z aktywnością cyklozależnych kinaz (cdk) skompleksowanych z cyklina E lub A. Substratem był histon H1. Porównanie wskazuje, że wejście w fazę S zbiega się z maksimum aktywności kompleksu cdk-cyklina E, zaś przechodzenie przez fazę S – ze wzrostem aktywności kompleksu cdk-cyklina A. Po napromienieniu aktywności obu kinaz są znacznie mniejsze. Immunobloty z przeciwciałami do cyklin E, D1 i A oraz białka retinoblastoma pRb wskazują, że napromienienie nie zmienia ilości cyklin E i D1, wyraźnie mniej jest natomiast cykliny A i białka pRb, zwłaszcza formy hiperfosforylowanej (prążek o niższej ruchliwości elektroforetycznej).

Ponieważ fosforylacja pRb zachodzi z udziałem kinaz cyklozależnych [12, 16], spadek ich aktywności po napromienieniu tłumaczy brak lub spadek ilości formy hiperfosforylowanej pRb.



Rys. 4. Mechanizm działania czynnika replikacyjnego A (RPA) i postulowany udział genu AT według hipotezy Sweezy'ego i Fishela [38]



Rys. 5. Związki między aktywowaną DNA-PK, p53 i p21 w napromienionej komórce zwierzęcej (na podstawie prac [6, 7, 19, 22, 23, 31, 34, 40, 45])

Fibroblasty napromienione (6 Gy) i spoczynkowe zawierały czynnik hamujący kinazę cykliczną (E)-zależną wyizolowaną z komórek HeLa. Z fibroblastów przygotowywano ekstrakt w 6 i 12 h po przesianiu komórek mitotycznych (były one w fazach G1 i G1/S); taki sam ekstrakt przygotowywano z fibroblastów napromienionych w 6 h po przesianiu. Działał on jeszcze silniej niż ekstrakt z komórek nienapromienionych w fazie G1; promieniowanie indukowało zatem czynnik hamujący kinazę cykliczną (E)-zależną. Był on zawarty również w ekstraktach z komórek spoczynkowych.

Dalsze badania [11] wykonano na następujących liniach komórkowych: NHF, normalne fibroblasty ludzkie, Neo, NHF transfekowane wektorem z Neo, E6, NHF transfekowane retrowirusem z białkiem E6 (powodującym degradację p53), LFO87, homozygotyczne fibroblasty od chorego z zespołem Li-Fraumeni (mutacja w p53), AT, homozygotyczne fibroblasty od chorego z AT.

Tylko 2 pierwsze linie po napromienieniu (6 Gy γ) zatrzymywały się w fazie G1, pozostałe wchodziły w fazę S bez opóźnienia (wszystkie populacje zsynchronizowane). Spadek aktywności kinazy cykliczną (E)-zależnej występował po napromienieniu także tylko w tych 2 liniach. Pozostałe linie wykazywały deficyt funkcji p53 wywołany w różny sposób: LFO87 zawierały zmutowany p53, w E6 brak było p53, AT wprawdzie zawiera p53, ale jego ilość nie wzrasta po napromienieniu w sposób typowy dla komórek z normalnie funkcjonującym układem regulacji p53.

Uzyskane wyniki świadczyły, że brak funkcji p53 szedł w parze z brakiem bloku G1/S po napromienieniu oraz z nie zmniejszoną aktywnością kinazy cykliczną (E)-za-

leżnej; jednocześnie na elektroforogramach pojawiał się prążek odpowiadający hiperfosforylowanemu pRb. Zatem zahamowanie kinazy cyklicznej (E)-zależnej po napromienieniu uzależnione było od statusu p53. Okazało się, że ekstrakty z napromienionych komórek NHF i Neo zawierają silną aktywność inhibitorową w stosunku do tego enzymu; zidentyfikowano ją jako p21 za pomocą swoistego przeciwciała monoklonalnego.

ROLA BLOKU G1/S W PROMIENIOWRAŻLIWOŚCI

Nasuwa się pytanie, czy indukcja bloku G1/S ma znaczenie ochronne dla napromienionej komórki. Prób znalezienia zależności między statusem p53 i promieniowrażliwością przeprowadzono wiele i wyniki były zarówno pozytywne, jak i negatywne. Z pewnością linie limfoidalne są bardziej promieniooporne w wyniku mutacji p53 [13], gdyż chroni je to przed wejściem na drogę apoptozy [38]; w innych typach komórek wyniki są mniej jednoznaczne [3, 5, 10, 30, 35].

McIlwrath i wsp. [26] porównali blok G1/S i promieniowrażliwość transfektantów ze zmutowanym p53 oraz komórek kontrolnych A2780, pochodzących z raka jajnika (transfekowanych tylko wektorem). Z 3 transfektantów 2 straciły zdolność zatrzymywania się w bloku G1 i były równocześnie bardziej promieniooporne od pozostałych badanych linii, w tym trzeciego transfektanta ze zmutowanym p53.

Porównanie większej liczby linii ludzkich komórek nowotworowych w 2 grupach promieniowrażliwej (SF2 od 0,11 do 0,27) i promienioopornej (SF2 od 0,56 do 0,8) wykazało dobrą korelację między blokiem G1 a promieniowrażliwością. Miarą bloku był wskaźnik znakowania bromodeoksyurydyną, wyrażony w % kontroli, a 24 godz. po napromienieniu dawką 2 Gy. Im silniej zaznaczony blok G1, tym wyższa była promieniowrażliwość. Należy sądzić na podstawie tych wyników, że blok G1 trwa dłużej w liniach promieniowrażliwych, ponieważ naprawa pęknięć DNA przebiega w nich wolniej. Wtedy uszkodzenia nie naprawione są powodem przedłużonej aktywacji DNA-PK, nagromadzenia się i fosforylacji p53 oraz pobudzenia syntezy p21. Spowolniona naprawa DNA często towarzyszy podwyższonej promieniowrażliwości, zaś zahamowaniu naprawy przez inhibitor poli(ADP-rybozylacji) – 3-amino-benzamid towarzyszy podwyższone nagromadzenie się p53 [23]. Zatem blok G1/S jest raczej wskaźnikiem statusu p53 w danej linii komórkowej niż czynnikiem powodującym modyfikację promieniowrażliwości, zaś do zrozumienia wszystkich aspektów funkcji p53 w napromienionej komórce potrzebne są dalsze badania.

Popularny wśród radiobiologów pogląd, że replikacja DNA na uszkodzonej macierzy prowadzi do utrwalenia się uszkodzeń i do skutków letalnych oparty jest głównie na obserwacji braku bloku G1/S w napromienionych komórkach AT (natomiast prawidłowa komórka "broni się" zatrzymując na granicy faz G1/S). Przyniesione dane przeczą takiemu prostemu tłumaczeniu. Ponadto komórki AT mają defekt w naprawie DNA i ich promieniowrażliwość jest niezależna od bloku G1/S (przegląd w [7]).

POPROMIENIENNY BLOK W FAZIE G2

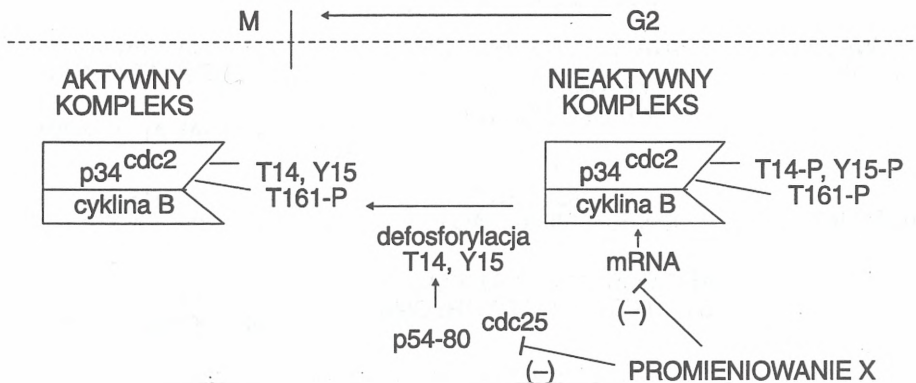
Nasuwa się pytanie, jaka jest rola drugiego bloku popromiennego (w G2) w promieniowrażliwości komórkowej i czy jego indukcja ma związek ze statusem p53.

Mc Ilwrath i wsp. [26] sporządzili dla tych samych dwóch grup komórek nowotworowych, co w przypadku badania bloku G1/S, zestawienie promieniowrażliwości i bloku G2. Jego miarą była liczba komórek z podwojoną zawartością DNA, wyrażona w % kontroli, 24 godz. po napromienieniu. Zebrano wyniki dla komórek napromienionych dawką 2 Gy oraz dawką obniżającą przeżywalność do ok. 25%; stwierdzono brak korelacji między blokiem w G2 a promieniowrażliwością.

Tym niemniej są przykłady świadczące o promienioochronnym działaniu bloku w G2. Wspominałam na początku o szczyrzach komórkach zarodkowych (REF lub REC) transformowanych onkogenami H-ras i c-myc, które są znacznie promieniooporniejsze od nietransformowanych [27] lub transformowanych tylko jednym z tych onkogenów. W linii 3.7 podwójnie transformowanej nie stwierdzono zmian w indukcji uszkodzeń DNA i w szybkości ich naprawy w porównaniu z komórkami macierzystymi, REF [17]. Zaobserwowano natomiast znaczne wydłużenie bloku G2 [28]. Podobne wyniki uzyskano dla innych transformantów.

Dalszych argumentów przemawiających za ochronnym znaczeniem bloku w G2 dostarczają prace nad mutantem RAD9 *Saccharomyces cerevisiae*, który jest promieniowrażliwy i nie zatrzymuje się w fazie G2, natomiast "wymuszenie" bloku G2 podnosi promieniooporność [42]; w dodatku ma miejsce promieniouczulające działanie związków, takich jak kofeina i inne metyloksantyny, które skracają popromienny blok G2 i jednocześnie działają promieniouczulająco [24].

Indukowane przez p53 białko inhibitorowe p21 teoretycznie mogłoby hamować cyklinozależne kinazy białkowe regulujące przechodzenie przez fazę G2 [35], jednakże nie stwierdzono zależności między statusem p53 i długością popromiennego bloku G2 [10]. Prawdopodobny mechanizm regulacji tego bloku przedstawiono na rysunku 6.



Rys. 6. Drogi regulacji bloku G2 w komórce zwierzęcej przez hamowanie defosforylacji T14 i Y15 kompleksu p34^{cdc2}/cyklina B oraz spadek syntezy mRNA cykliny B (na podstawie prac [25, 29, 32])

TABELA 2. Trwałość mRNA cykliny B wg [25]

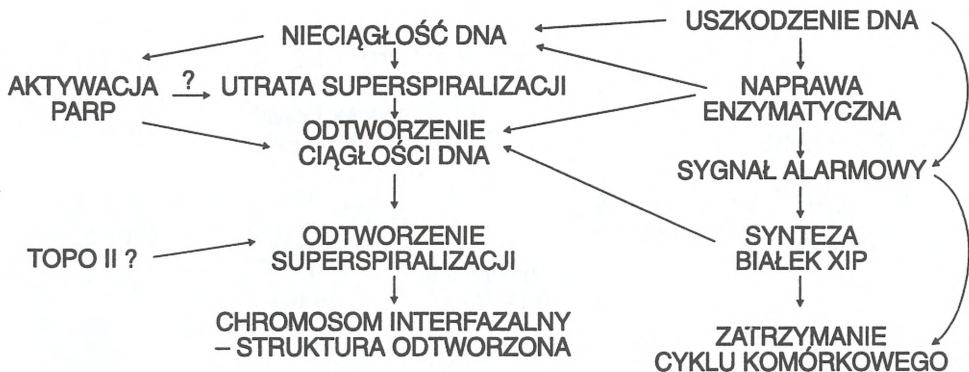
Faza cyklu komórkowego		$t_{1/2}$ godz.	$t_{1/2}$ po 10 Gy X godz.
Wczesna G1	(dośw. 1)	1,2	–
	(dośw. 2)	1,7	–
Późna G1		1,8	–
S		8,2	5,4
G2/M		12	2,8

Komórki HeLa synchronizowane podwójnym blokiem tymidynowo-afidikolinowym

Dla regulacji przejścia komórek z fazy G2 do M podstawowe znaczenie ma kinaza $p34^{cdc2}$ w kompleksie z cykliną B. Aktywacja tej kinazy następuje przez defosforylację reszt treoniny 14 i tyrozyny 15 katalizowaną przez fosfatazę $cdc25$. Stwierdzono, że w bloku popromiennym G2 kinaza $p34^{cdc2}$ występuje w postaci hiperfosforylowanej, a zatem nieaktywnej. W jaki sposób promieniowanie powoduje inaktywację fosfatazy, pozostaje niewiadome.

Drugi mechanizm regulacyjny działa przez ograniczenie wytwarzania mRNA dla cykliny B. Maksimum ekspresji genu tej cykliny przypada na fazę G2, zaś trwałość mRNA – jak to ilustruje tabela 2 – zmienia się w cyklu komórkowym; w okresie bloku popromiennego G2 okres półtrwania mRNA ulega bardzo znacznemu skróceniu [25]. Ma na to wpływ zahamowanie ekspresji genu cykliny B, zaś zwalniają to zahamowanie związki skracające blok G2, np. kofeina [24].

Zatem obserwacje dotyczące roli bloku G2 w promieniowrażliwości komórkowej przemawiają za jego promieniochronnym charakterem i potwierdzają słuszność poglądu głoszącego, że podział mitotyczny komórki, wyprzedzający naprawę materiału genetycznego prowadzi do skutków letalnych.



Rys. 7. Zależności między naprawą DNA a skutkami przekazania sygnału alarmowego

UWAGI KOŃCOWE

Rysunek podsumowujący naszą wiedzę na temat zdarzeń w napromienionej komórce (rys. 7) pokazuje, że oprócz drogi prowadzącej od uszkodzonego DNA do odtworzenia struktury chromosomu interfazalnego istnieje niemniej ważna droga indukcji i przekazywania sygnału alarmowego. Istotną częścią odpowiedzi na ten sygnał jest zatrzymanie napromienionej komórki w cyklu komórkowym. Ponadto syntetyzowane są białka XIP, które prawdopodobnie są ważne dla komórkowych mechanizmów obronnych i procesów odnowy popromiennej.

LITERATURA

- [1] ANDERSON CW. DNA damage and the DNA-activated protein kinase. *Trends Biochem Sciences* 1993; **18**: 443–437.
- [2] BERNHARD EJ, MCKENNA WG, MUSCHEL RJ. Cyclin expression and G2-phase delay after irradiation. *Radiat Res* 1994; **138**: S64–S67.
- [3] BIARD DSF, MARTIN M, LE RHUN Y, DUTHU A, LEFAIX JL, MAY E, MAY P. Concomitant p53 gene mutation and increased radiosensitivity in rat lung embryo epithelial cells during neoplastic development. *Cancer Res* 1994; **54**: 3361–3364.
- [4] BOUBNOV NV, HALL KT, WILLS Z, EUN LEE S, MING HE D, BENJAMIN DW, PULASKI CR, BAND H, REEVES W, HENDRICKSON EA, WEAVER DT. Complementmentation of the ionizing radiation sensitivity, DNA and binding, and V(D)J recombination defects of double-strand break repair mutants by the p86 Ku autoantigen. *Proc Natl Acad Sci* 1995; **92**: 890–894.
- [5] BRISTOW RG, JANG A, PEACOCK J, CHUNG S, BENCHIMOL S, HILL RP. Mutant p53 increases radioresistance in rat embryo fibroblasts simultaneously transfected with HPV16-E7 and/or activated H-ras. *Oncogene* 1994; **9**: 1527–1536.
- [6] BRUSH GS, ANDERSON CW, KELLY TJ. The DNA-activated protein kinase is required for the phosphorylation of replication protein A during simian virus 40 DNA replication. *Proc Natl Acad Sci* 1994; **91**: 12520–12524.
- [7] CANMAN CE, WOLFF AC, CHEN C-Y, FORNACE AJ, KASTAN MB. The p53-dependent G1 cell cycle checkpoint pathway and ataxia-telangiectasia. *Cancer Res* 1994; **54**: 5054–5058.
- [8] CHEONG N, WANG Y, ILIAKIS G. Radioresistance induced in rat embryo cells by transfection with the oncogenes H-ras plus v-myc is cell cycle dependent and maximal during S and G1. *Int J Radiat Biol* 1993; **63**: 623–629.
- [9] CHOWDARY DR, DERMODY JJ, JHA KK, OZER HL. Accumulation of p53 in a mutant cell line defective in the ubiquitin pathway. *Molec Cell Biol* 1994; **14**: 1997–2003.
- [10] CLARKE AR, GLEDHILL S, HOOPER ML, BIRD CC, WYLLIE AH. p53 dependence of early apoptotic and proliferative responses within the mouse intestinal epithelium following gamma-irradiation. *Oncogene* 1994; **9**: 1767–1773.
- [11] DULIC V, KAUFMANN WK, WILSON SJ, TLSTY TD, LEES E, HARPER JW, ELLEDGE SJ, REED SI. p53 dependent inhibition of cyclin-dependent kinase activities in human fibroblasts during radiation-induced G1 arrest. *Cell* 1994; **76**: 1013–1023.
- [12] EWEN ME, SLUS HK, SHERR CJ, MATSUSHIME H, KATO JY, LIVINGSTON DM. Functional intractions of the retinoblastoma protein with mammalian D-type cyclins. *Cell* 1993; **73**: 487–497.

- [13] FAN S, EL-DEIRY WS, BAE I, FREEMAN J, JONDLE S, BHATIA K, FORNACE AJ, jr, MAGRATH I, KOHN KW, O'CONNOR PM. p53 gene mutations are associated with decreased sensitivity of human lymphoma cells to DNA damaging agents. *Cancer Res* 1994; **54**: 5824–5830.
- [14] FINNIE NJ, GOTTLIEB TM, BLUNT T, JEGGO PA, JACKSON SP. DNA-dependent protein kinase activity is absent in xrs-6 cells: implications for site-specific recombination and DNA doublestrand break repair. *Proc Natl Acad Sci* 1995; **92**: 320–324.
- [15] HARPER JW, ADAMI GR, WEIN, KEYOMARSIK, ELLEDGE SJ. The p21 cdk-interacting protein cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases. *Cell* 1993; **75**: 805–816.
- [16] HINDS PW, MITTNACHT S, DULIC V, ARNOLD A, REED SI, WEINBERG RA. Regulation of retinoblastoma protein functions by ectopic expression of human cyclins. *Cell* 1992; **70**: 993–1006.
- [17] ILIAKIS G, METZGER L, MUSCHEL RJ, MCKENNA WG. Induction and repair of DNA double strand breaks in radiation-resistant cells obtained by transformation of primary rat embryo cells with the oncogenes H-ras and v-myc. *Cancer Res* 1990; **50**: 6575–6579.
- [18] KASTAN MB, KUERBITZ SJ. Control of G1 arrest after DNA damage. *Environ Health Perspectiv* 1993; **10**: 55–58.
- [19] KHANNA KK, LAVIN MF. Ionizing radiation and UV induction of p53 protein by different pathways in ataxia-telangiectasia cells. *Oncogene* 1993; **8**: 3307–3312.
- [20] KRAEMER M, STEN B, MAI S, KUNZ E, KOENIG H, LOFERER H, GRUNICKE HH, PONTA H, HERRLICH P, RAHMSDORF HJ. Radiation-induced activation of transcription factors in mammalian cells. *Radiat Environ Biophys* 1990; **29**: 303–313.
- [21] LANE DP, LU X, HUPP T, HALL PA. The role of the p53 protein in the apoptosis response. *Phil Trans R Soc Lond B* 1994; **345**: 277–280.
- [22] LEE JM, ABRAHAMSON JLA, BERNSTEIN A. DNA damage, oncogenesis and the p53 tumour-suppressor gene. *Mutat Res* 1994; **307**: 573–581.
- [23] LU X, LANE DP. Differential induction of transcriptionally active p53 following UV or ionizing radiation: defects in chromosome instability syndromes? *Cell* 1993; **75**: 765–778.
- [24] MAITY A, MCKENNA WG, MUSCHEL RJ. The molecular basis for cell cycle delays following ionizing radiation: a review. *Radiotherapy Oncol* 1994; **31**: 1–3.
- [25] MAITY A, MCKENNA WG, MUSCHEL RJ. Evidence for post-transcriptional regulation of cyclin B1 mRNA in the cell cycle and following irradiation in HeLa cells. *EMBO J* 1995; **14**: 603–609.
- [26] MCILWRATHAJ, VASEY PA, ROSS GM, BROWN R. Cell cycle arrests and radiosensitivity of human tumor cell lines: dependence on wild-type p53 for radiosensitivity. *Cancer Res* 1994; **54**: 3718–3722.
- [27] MCKENNA WG, WEISS MC, ENDLICH B, LING CC, BAKANAUSKAS VJ, KELSTEN ML, MUSCHEL RJ. Synergistic effect of the v-myc oncogene with H-ras on radioresistance. *Cancer Res* 1990; **50**: 97–102.
- [28] MCKENNA WG, ILIAKIS G, WEISS MC, BERNHARD EJ, MUSCHEL RJ. Increased G2 delay in radiation-resistant cells obtained by transformation of primary rat embryo cells with the oncogenes H-ras and v-myc. *Radiat Res* 1991; **125**: 283–287.
- [29] MUSCHEL RJ, ZHANG HB, ILIAKIS G, MCKENNA WG. Cyclin B expression in HeLa cells during the G2 block induced by ionizing radiation. *Cancer Res* 1991; **51**: 5113–5117.
- [30] PARDO FS, SU M, BOREK C, PREFFER F, DOMBKOWSKI D, GERWECK L, SCHMIDT EV. Transfection of rat embryo cells with mutant p53 increases the intrinsic radiation resistance. *Radiat Res* 1994; **140**: 180–185.
- [31] PICKSLEY SM, LANE DP. P53 and Rb: their cellular roles. *Cell Biol* 1994; **6**: 853–858.
- [32] SMEETS MFMA, MOOREN EHM, BEGG AC. The effect of radiation on G2 blocks, cyclin B expression and cdc2 expression in human squamous carcinoma cells lines with different radiosensitivities. *Radiotherapy Oncol* 1994; **33**: 217–227.

- [33] SMIDER V, RATHMELL WK, LIBER MR, CHU G. Restoration of X-ray resistance and V(D)J recombination in human cells by Ku cDNA. *Science* 1994; **265**: 288–291.
- [34] SMITH ML, CHEN IT, ZHAN Q, BAE I, CHEN CY, GILMER TM, KASTAN MB, O'CONNOR PM, FORNACE jr AJ. Interaction of the p53-regulated protein Gadd45 with proliferating cell nuclear antigen. *Science* 1994; **266**: 1376–1380.
- [35] STEWART N, HICKS GG, PARASKEVAS F, MOWAT M. Evidence for a second cell cycle block at G2/M by p53. *Oncogene* 1995; **10**: 109–115.
- [36] SUTHERLAND RM, AUSSERER WA, GRANT TD, KNAPP AM, KNUECHEL R, KWOK TT, LADEROUTE KR, MILLER SC, MANSBRIDGE JN. Regulatory polypeptide factors, signal transduction and radiation response (w) Dewey WC, Edington M, Fry RJM, Hall EJ, Whitmore GF (red.) Radiation research, a twentieth-century perspective. San Diego: Academic Press 1992; 824–829.
- [37] SUWA A, HIRAKATA M, TAKEDA Y, JESCH SA, MIMORI T, HARDIN JA. DNA-dependent protein kinase (Ku protein-p53 complex) assembles on double-stranded DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; **91**: 6904–6908.
- [38] SWEETZY MA, FISHEL R. Multiple pathways leading to genomic instability and tumorigenesis. *Ann NY Acad Sci* 1994; **726**: 165–177.
- [39] SZUMIEL I. Ionizing radiation-induced cell death. *Int J Radiat Biol* 1994; **66**: 329–341.
- [40] WAGA S, HANNON GJ, BEACH D, STILLMAN B. The p21 inhibitor of cyclin-dependent kinases controls DNA replication by interaction with PCNA. *Nature* 1994; **369**: 574–578.
- [41] WEICHELBAUM RR, HALLAHAN DE, SUKHATNE V, DRITSCHILO A, SHERMAN ML, KUFEL DW. Biological consequences of gene regulation after ionizing radiation exposure. *J Natl Cancer Inst* 1991; **83**: 480–484.
- [42] WEINERT TA, HARTWELL LH. The RAD 9 gene controls the cell cycle response to DNA damage in *Saccharomyces cerevisiae*. *Science* 1988; **241**: 241–317.
- [43] WÓJCIK C. Mechanizmy regulacji cyklu komórkowego. *Post Biol Kom* 1993; **20**: 331–352.
- [44] WÓJCIK C. Inhibitory kinaz zależnych od cyklin. *Post Biol Kom* 1994; **21**: 243–248.
- [45] ZHAN Q, FAN S, BAE I, GUILOFF C, LIEBERMANN DA, O'CONNOR PM, FORNACE AJ, jr. Induction of *bax* by genotoxic stress in human cells correlates with normal p53 status and apoptosis. *Oncogene* 1994; **9**: 3743–3751.

Otrzymano: 05.07.1995 r.

Przyjęto: 30.11.1995 r.

Adres autora: 03-195 Warszawa, ul. Dorodna 16.

UDZIAŁ CYTOKIN I INNYCH MEDIATORÓW W PROCESIE GOJENIA RANY

THE PARTICIPATION OF CYTOKINES AND OTHER MEDIATORS IN WOUND HEALING

Janusz KOCIK

Zakład Hematologii Radiacyjnej Wojskowego Instytutu Higieny i Epidemiologii,
Warszawa

Streszczenie: Na proces gojenia rany składa się szereg wzajemnie ze sobą powiązanych zjawisk, które, przynajmniej w części, są regulowane przez polipeptydowe czynniki wzrostowe, cytokiny i składniki substancji międzykomórkowej. W artykule przedstawiono funkcje, interakcje i mechanizmy działania tych czynników w kontekście procesów naprawczych związanych z gojeniem rany. Opis właściwości czynników i wstępnych danych, dotyczących ich klinicznego zastosowania poprzedzany jest omówieniem komórkowych i molekularnych zjawisk, związanych z danym etapem naprawy tkankowej.

Słowa kluczowe: gojenie ran, cytokiny, czynniki wzrostowe

Summary: The well-orchestrated, complex series of events resulting in the repair of wounds are, at least in part, regulated by polypeptide growth factors, cytokines and extracellular matrix components. This review provides an overview of the known functions, interactions, and mechanisms of action of these factors in the context of the overall repair process in the wound. An overview of the cellular and molecular events involved in tissue repair is initially presented, followed by the accounts of the factors and the preliminary results from clinical trials evaluating the effects of the factor in wound healing.

Key words: wound healing; cytokines; growth factors.

Wykaz skrótów: a**FGF** (*acidic Fibroblast Growth Factor*) – kwaśny czynnik wzrostu fibroblastów, b**FGF** (*basic Fibroblast Growth Factor*) – zasadowy czynnik wzrostu fibroblastów, **CRP** (*C reactive protein*) – białko C reaktywne, **DIC** (*disseminated intravascular coagulation*) – zespół wykrzepiania wewnątrznaczyniowego, **ECM** (*extracellular matrix*) – substancja międzykomórkowa, **EDRF** (*Endothelium Derived Relaxing Factor*) – śródbłonkowopochodny czynnik rozszerzający naczynia, **EGF** (*Epidermal Growth Factor*) – naskórkowy czynnik wzrostu, **ELAM 1** (*endothelial leucocyte adhesion molecule 1*) – śródbłonkowa cząsteczka adhezji leukocytów, **ET 1** (*endothelin 1*) – endotelina 1, **GAG** (*glycosaminoglycans*) – glikozaaminoglikany, **G-CSF** (*Granulocyte Colony Stimulating Factor*) – czynnik stymu-

lujący kolonie makrofagalne, **GH** (*Growth Hormone*) – hormon wzrostu, **GM-CSF** (*Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor*) – czynnik stymulujący kolonie granulocytarno-makrofagalne, **IFN** (*Interferon*) – interferon, **IGF** (*Insulin-like Growth Factor*) – insulinopodobny czynnik wzrostu, **IL** (*Interleukin*) – interleukina, **KGF** (*Keratinocyte Growth Factor*) – czynnik wzrostu keratynocytów, **M-CSF** (*Macrophage Colony Stimulating Factor*) – czynnik stymulujący kolonie makrofagalne, **MMP** (*Metalloproteinase*) – metaloproteinaza, **PAF** (*Platelet Activating Factor*) – czynnik aktywujący płytki; **PDGF** (*Platelet Derived Growth Factor*) – płytkopochodny czynnik wzrostu, **SAA** (*Serum Amyloid A*) – amyloid osoczowy A, **TGF β** (*Transforming Growth Factor β*) – transformujący czynnik wzrostu β , **TIMPs** (*Tissue inhibitors of metalloproteinases*) – tkankowe inhibitory metaloproteinaz, **TNF α** (*Tumor Necrosis Factor α*) – czynnik martwicy nowotworu α

WPROWADZENIE

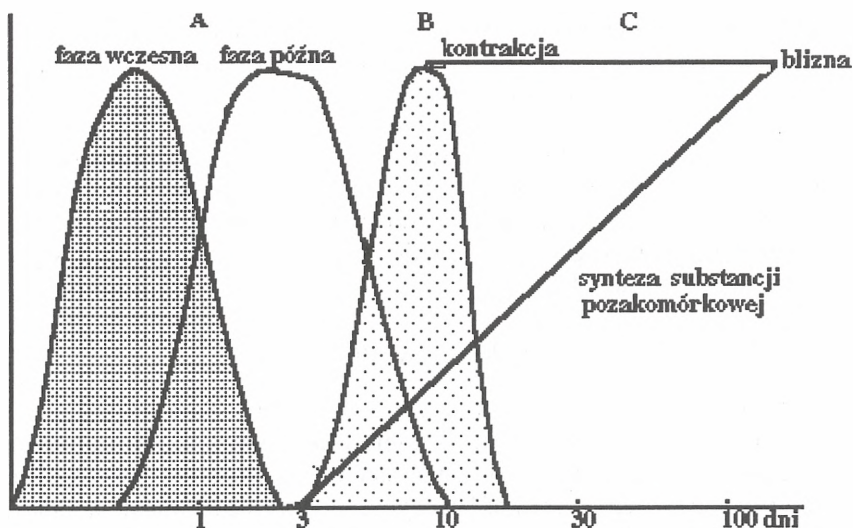
Gojenie rany jest procesem patofizjologicznym, dzięki któremu organizm może naprawić szkody powstałe w wyniku urazu, naruszającego ciągłość jego tkanek. Wynikiem uszkodzenia tkanek jest reakcja ostrej fazy, zapoczątkowująca liczne odczyny neuroendokryne, hematologiczne i immunologiczne [15,43,60,71]. Zależą one od udziału wielu komórek i wydzielanych przez nie mediatorów, tworzących sieć powiązań między sobą. Procesy zachodzące przy udziale “klasycznych” mediatorów (katecholaminy, histamina, kininy) zostały względnie dobrze poznane. Obecnie przedmiotem badań są mediatory komórkowe, zwane cytokinami, wśród nich: interleukiny i polipeptydowe czynniki wzrostowe oraz udział substancji międzykomórkowej w procesie gojenia rany.

Zranienie wywołuje szereg zjawisk, zwykle rozpatrywanych odrębnie, aczkolwiek częściowo nakładających się i ściśle ze sobą powiązanych. Chociaż rozdział tych procesów w skali czasu stanowi uproszczenie, jest on użyteczny dla utworzenia zrozumiałego modelu gojenia rany. Dla tego celu odpowiedź tkankową na uszkodzenie podzielono na trzy, częściowo nakładające się okresy: zapalenie; tworzenie ziarniny i przebudowa z końcowym, choć nie zawsze występującym efektem w postaci blizny [45] (rys. 1).

W niniejszej pracy podjęto próbę omówienia etapów gojenia rany, kładąc nacisk na czynniki regulujące to zjawisko.

ZAPALENIE

Odpowiedzią ustroju na uszkodzenie jest reakcja zapalna, rozwijająca się w miejscu urazu. Wiele różnych czynników bierze udział w tym procesie, częstokroć dublując swoje działanie. Obfitość mediatorów jest prawdopodobnie wynikiem życiowej roli, jaką odgrywa zapalenie w reakcji obronnej ustroju [71].



Rys. 1. Fazy gojenia rany: A – zapalenie, B – utworzenie tkanki ziarninowej, C – synteza i przebudowa substancji pozakomórkowej; fazy te nakładają się wzajemnie; zapalenie podzielono na fazę wczesną, w której dominują granulocyty i fazę późną, gdzie przewagę mają makrofagi; wraz z rozwojem tkanki ziarninowej brzegi rany ulegają zbliżeniu (kontrakcji), a ubytek tkanki wypełniany jest składnikami substancji komórkowej produkowanymi przez fibroblasty

Zjawiskami zapoczątkowującymi ostrą reakcję zapalną są zmiany naczyniowe; przerwanie ciągłości śródbłonna z wynaczynieniem składników krwi; aktywacja układów krzepnięcia i fibrynolizy; agregacja płytek i rekrutacja leukocytów krwi obwodowej.

ZMIANY NACZYNIOWE

Natychmiast po przerwaniu ciągłości naczynia dochodzi do krótkotrwałego jego obkurczenia (wazokonstrykcji). Pod wpływem mediatorów uwalnianych do osocza, przez uszkodzony śródbłonek i płytki dochodzi do rozszerzenia i zwiększenia przepuszczalności naczyń, co makroskopowo daje efekt w postaci zaczerwienienia i obrzęku – klinicznych wykładników zapalenia. W zależności od rodzaju i ciężkości urazu zjawiska te mogą być natychmiastowe i przejściowe, a także występować z opóźnieniem i długotrwałe. Zależy to od stopnia bezpośredniego uszkodzenia naczynia i udziału czynników endogennych [60].

Działanie obniżające napięcie naczynia odbywa się poprzez stymulację śródbłonna do wydzielania EDRF (*Endothelium-Derived Relaxing Factor*), który został zidentyfikowany jako tlenek azotu (NO). Przy jego udziale swój wpływ wywierają m.in. histamina, serotonina, trombina, bradykinina, substancja P [3].

Pierwszym zidentyfikowanym czynnikiem rozszerzającym naczynia była histamina. Jest ona produkowana i magazynowana w tkankowych komórkach tucznych, granulocytach zasadochłonnych i płytkach krwi. Uwalniana jest pod wpływem wielu bodźców zapalnych (np. immunoglobulin: IgE, IgG; białek dopełniacza: C3a, C5a;

substancji P). Histamina powoduje skurcz komórek śródbłonna i poszerzenie przestrzeni międzykomórkowych, przez co zwiększa przepuszczalność naczyń; jest również czynnikiem chemotaktycznym dla eozynofiliów.

Produkty układu kinin: kallidyna i bradykinina wywierają także silny efekt rozszerzający naczynia. Także produkty kaskady kwasu arachidonowego: prostaglandyny, szczególnie PGE₂ i prostacyklina PGI₂ oraz niektóre neuropeptydy mają silne działanie rozszerzające naczynia. Szczególnie podkreśla się wpływ substancji P i wazopasywnego peptydu jelitowego (VIP), z których pierwsza działa synergistycznie z bradykininą w wywoływaniu bólu.

AKTYWACJA PŁYTEK

Płytki pełnią kluczową rolę w wielu fazach gojenia rany. Są pierwszymi elementami komórkowymi pojawiającymi się w miejscu uszkodzenia. Inicjują hemostazę poprzez formowanie i konsolidację skrzepu. Są też rezerwuarem mediatorów powodujących zwiększoną przepuszczalność naczyń, chemotaksję leukocytów, odkładanie substancji międzykomórkowej, epitelializację i angiogenezę.

Płytki są aktywowane przez klasyczne aktywatory hemostazy, takie jak: trombina, ADP, pochodne kwasu arachidonowego i włókna kolagenowe ściany naczynia pozabawionej śródbłonna oraz przez mediatory zapalenia: kompleksy immunologiczne, dopełniacz, PAF (*Platelet-activating Factor*) – mediator fosfolipidowy uwalniany przez komórki tuczne, neutrofile i makrofagi, monocyty, komórki śródbłonna i limfocyty.

Rola płytek w procesie krzepnięcia wyczerpująco opisana jest gdzie indziej [72]. Należy jedynie wspomnieć, że aktywowane płytki uwalniają cztery duże białka o właściwościach adhezyjnych (fibrynogen, czynnik von Willebrandta, trombospondynę i fibronektynę). Biorą one udział w interakcji między ścianą naczynia, a płytkami, w czasie ich agregacji i adhezji. Odbywa się to przy udziale grupy białek receptorowych zwanych cytoadhezynami (np. GPIIb/IIIa), obecnych m.in. na powierzchni komórek śródbłonna. Ponadto uwolnione białka adhezyjne (szczególnie fibronektyna), wraz z innymi komponentami substancji międzykomórkowej, modulują tworzenie prowizorycznej ECM, co szczegółowo omówiono dalej. Płytki krwi uwalniają także czynniki wzrostu pełniące ważne funkcje w dalszych etapach gojenia rany. Są to: PDGF (*Platelet-derived Growth Factor*), który przyspiesza wzrost komórek tkanki łącznej, TGF β (*Transforming Growth Factor β*), wpływający m.in. na produkcję składników substancji międzykomórkowej, EGF (*Epidermal Growth Factor*), modulujący m.in. reepitelializację.

UDZIAŁ ŚRÓDBŁONKA W REGULACJI PROCESU KRZEPNIĘCIA

Ograniczenie tworzenia skrzepu do miejsca uszkodzenia naczynia jest regulowane nie tylko przez interakcje białek osoczowych, ale także przez mediatory komórkowe. W naczyniach o nienaruszonym śródbłonku przeważają mechanizmy zapobiegające krzepnięciu. Obok dobrze znanych właściwości antykoagulacyjnych komórki śródbłonna pod wpływem mediatorów wczesnej fazy zapalenia przejawiają aktywność

prokoagulacyjną. Interleukina 1, $\text{TNF}\alpha$ uwolnione z komórek zapalnych i endotoksyna – z komórek bakteryjnych stymulują śródbłonek do przyłączenia i aktywacji czynników krzepnięcia, promując w ten sposób kaskadę krzepnięcia. Aktywowane proteazy wpływają zwrotnie na komórki śródbłonna, powodując uwolnienie związków o aktywności mitogennej (*PDGF-like factors*), wytwarzanie endogennej interleukiny 1. Interleukina 1 i $\text{TNF}\alpha$ powodują uwalnianie przez śródbłonek PAF oraz czynnika tkankowego o aktywności prokoagulacyjnej (*Tissue Factor*). Przedstawione zjawiska podkreślają równorzędność śródbłonna i płytek w regulowaniu procesu krzepnięcia.

GRANULOCYTY OBOJĘTNOCHŁONNE

Granulocyty obojętnochłonne (neutrofile) uznaje się za pierwszą linię obrony przed mikroorganizmami w ranie zakażonej. Neutrofile i inne komórki zapalne (makrofagi) są przyciągane do miejsca uszkodzenia tkanki przez plejadę czynników chemotaktycznych uwalnianych w procesie krzepnięcia, agregacji płytek i aktywacji dopełniacza (chemotaksja). Po drodze aktywnie pokonują barierę śródbłonna. Umiejętność przylegania do powierzchni śródbłonna (adherencja) i przeciskania się przez połączenia międzykomórkowe (diapedeza) komórki zapalne zawdzięczają białkom adhezyjnym (selektyny, integryny) [16,32,37]. Ekspresja tych białek na powierzchni komórek śródbłonna i leukocytów zachodzi m.in. pod wpływem cytokin wczesnej fazy reakcji zapalnej (Interleukina 1, $\text{TNF}\alpha$). I tak na przykład wczesna faza migracji neutrofila (tzw. *“slow rolling”*) koordynowana jest przez białka z grupy selektyn. Integryny kontrolują drugą fazę – adhezję leukocyta do powierzchni śródbłonna (*“tight adhesion”*) oraz przyłączenie się do białek substancji międzykomórkowej: m.in. fibronektyny, kolagenu, lamininy [16,36]. Dzięki adhezji do białek substancji międzykomórkowej neutrofile są zdolne do reagowania wybuchem tlenowym na małe stężenia cytokin [16]. Dalszą migrację ułatwia wpływ enzymów proteolitycznych wydzielanych przez granulocyty.

Zasadniczym zadaniem neutrofila w procesie gojenia rany jest usuwanie (fagocytoza) bakterii. Fagocytozę ułatwia proces opłaszczania (opsonizacji) mikroorganizmów przez przeciwciała (IgG), składowe dopełniacza (C3b), białka osocze (fibronektyna) [28]. Fagocytywane bakterie są zabijane przez uwalniane enzymy proteolityczne, laktoferynę i rodniki tlenowe – produkty wybuchu tlenowego. Czynniki te, wyrzucone na zewnątrz komórki przyczyniają się do dalszego, wtórnego uszkodzenia otaczającej tkanki.

Rola granulocytów w ranie niezakażonej, a za taką uważa się ranę zadaną i opracowaną ręką chirurga, wydaje się być znikoma [66]. Natomiast w przypadku współistniejącej infekcji, zaburzenia funkcji granulocyta (np. adhezji lub produkcji rodników tlenowych) prowadzą do przewlekłego utrzymywania się zakażenia i opóźnienia procesów naprawczych, pod postacią przewlekłej choroby ziarniniakowej, czy nadmiernego bliznowacenia [3]. Najnowsze doniesienia podkreślają także to, że we wczesnej fazie zapalenia neutrofile są głównym źródłem interleukiny 6, pełniącej ważną rolę w początkowym etapie gojenia rany [50].

ROLA CYTOKIN WCZESNEJ FAZY ZAPALENIA W PROCESIE GOJENIA RANY

W przebiegu reakcji zapalnej towarzyszącej uszkodzeniu tkanki szereg komórek zaangażowanych w ten proces uwalnia substancje z racji swego pochodzenia i funkcji zwane cytokinami. Są to związki o budowie polipeptydów lub glikopolipeptydów. Interleukiny (cytokiny produkowane przez leukocyty) mają masę cząsteczkową 8–60 kDa i liczbę aminokwasów w cząsteczce – 72–269 [62]. Czas ich działania jest bardzo krótki, a stężenie we krwi poza okresem aktywności zwykle nieoznaczalne. Uwalniane cytokiny powodują wydzielanie następnych, modelują ich działanie, tworząc sieć powiązaną także z innymi mediatorami reakcji zapalnej: steroidami kory nadnerczy, metabolitami kwasu arachidonowego i rodnikami tlenowymi [13,56].

Z licznych cytokin wczesnej fazy zapalenia główną rolę w procesie gojenia rany wydają się grać: interleukina 1 (IL1), kachektyna (TNF α – *Tumor Necrosis Factor* α), Interleukina 6 (IL6). Inne, bardzo ważne dla prawidłowego przebiegu procesu naprawy tkankowej mediatory wydzielane również przez komórki zapalne (TGF β , bFGF, PDGF, EGF) omówiono dalej.

Interleukina 1

Interleukina 1 – produkt monocytów, makrofagów, keratynocytów, komórek śródbłónka; jeden z głównych mediatorów zapalenia, obok swych funkcji ogólnoustrojowych, towarzyszących urazowi ma również wpływ na środowisko rany [62]. Poprzez indukcję wydzielania przez komórki zapalne enzymów proteolitycznych, takich jak: metaloproteinazy (kolagenaza, stromelizyna) czy aktywator plazminogenu, powoduje niszczenie składników substancji międzykomórkowej. Stwierdzono, że wiele biologicznych aktywności IL 1 może ulec zablokowaniu przez działanie TGF β , np. TGF β hamuje niszczenie chrząstki, zachodzące pod wpływem IL1 [2]. Antagonistyczny wobec IL 1 i TNF α wpływ TGF β ujawnia się w późniejszych etapach gojenia rany, co m.in. decyduje o przejściu od zapalenia do fazy odnowy tkankowej. IL 1 jest też silnym czynnikiem chemotaktycznym dla granulocytów obojętnochłonnych, co wiąże się z wpływem tej cytokiny na ekspresję białek receptorowych dla leukocytów na powierzchni śródbłónka m.in. selektyny E, zwanej także adresyną ELAM-1 (*endothelial leukocyte adhesion molecule-1*)[60,62].

IL 1 wpływa także korzystnie na środowisko rany. *In vitro* działa synergistycznie z TGF β na fibroblasty, zwiększając m.in. ich proliferację [68]. Cytokina ta stymuluje proliferację komórek mięśni gładkich *in vitro*. Przyspiesza także odnowę nabłonka (reepitelializację) [10,51], prawdopodobnie poprzez zwiększanie produkcji przez fibroblasty czynnika wzrostu keratynocytów (*Keratinocyte Growth Factor* – KGF) [14]. Działanie takie mogą wywierać także inne cytokiny zapalne (TNF α , IL6) [12].

Kachektyna

Kachektyna (TNF α), mimo iż strukturalnie różna od IL-1 ujawnia wiele z jej biologicznych aktywności ogólnoustrojowych np. stymulacja wątroby do produkcji białek ostrej fazy, podwyższenie temperatury ciała (pyrogenność). Nadprodukcja tych

cytokin w urazie wielonarządowym i posocznicy doprowadza do uogólnienia procesu zapalnego, wstrząsu, zespołu wykrzepiania wewnątrznaczyniowego (DIC), którym ostatnio próbuje się zapobiegać, stosując m.in. przeciwciała monoklonalne przeciw TNF α [15,62]. Miejscowo, w środowisku rany oba te czynniki są mediatorami ostrej fazy zapalenia (reakcji ostrej fazy), chemokinezy i aktywacji granulocytów obojętno-chłonnych i monocytów. W procesie gojenia rany aktywność prozapalna TNF α wydaje się opóźniać przejście do fazy odnowy tkankowej. Cytokina ta wpływa na wczesną syntezę kolagenu, hamując ekspresję jego genu, a także zwiększa produkcję kolagenazy, prowadząc do niszczenia substancji międzykomórkowej [35]. W badaniach prowadzonych na zwierzętach z genetycznie uwarunkowanym defektem wydzielania TNF α przez makrofagi stwierdzono poprawę parametrów gojenia rany we wczesnych fazach procesu [7].

Maksymalny poziom i działanie TNF α i IL 1 osiągają we wczesnej fazie rozwoju tkanki ziarninowej. W późniejszym okresie ich stały, choć niewielki poziom związany jest z ciągłym napływem i aktywacją makrofagów je wydzielających. Sugeruje się, że działanie omawianych cytokin w tym okresie ogranicza się do auto- i parakrynnnej kontroli przebudowy ziarniny (*remodelling*) i udziału w procesie kontrakcji rany [2].

Interleukina 6

Interleukina 6 (IL6) jest to polipeptyd powstający głównie w makrofagach oraz monocytach, komórkach śródbłonna i fibroblastach pod wpływem: TNF α , IL1, PDGF, TGF β [23]. Jest ona jednym z głównych mediatorów reakcji ostrej fazy odpowiedzialnym za wątrobową produkcję białek ostrej fazy np. CRP (*C-reactive protein*), SAA (*serum amyloid A*) [36]. Jest ona również odpowiedzialna za stymulację pourazowego wydzielania hormonu adrenokortykotropowego, stanowiąc połączenie między układem odpornościowym a neuroendokrynnym [36,56]. Osoczowy poziom IL 6 wzrasta pod wpływem uszkodzenia tkanek i zależy od rozległości, rodzaju i czasu trwania urazu, co wykorzystywane jest w ocenie powikłań i rokowaniu np. w oparzeniach, po zabiegach chirurgicznych [15,49,50].

IL 6 działa na wszystkich etapach gojenia rany. Prawdopodobnie bierze ona udział w aktywacji fibroblastów do wydzielania kolagenu w tworzeniu niedojrzałej tkanki ziarninowej. Zarówno *in vitro*, jak i *in vivo* kontroluje migrację keratynocytów w mechanizmie zależnym od fibronektyny. Poziomy IL 6 w wysięku z rany u zwierząt z cukrzycą są znamienne niższe niż u zdrowych. U zwierząt tych występują również zaburzenia w organizacji ziarniny i angiogenezie, co może wskazywać na znaczenie IL 6 w tych procesach [4].

MONOCYTY (MAKROFAGI)

Kolejnymi komórkami pojawiającymi się w środowisku rany po 14–18 h są makrofagi [71]. W większości rekrutują się one z monocytów krążenia obwodowego, które pod wpływem czynników chemotaktycznych migrują i różnicują się, przyjmując fenotyp “profesjonalnego” makrofaga. Pozostała część to rezydentne makrofagi

tkankowe, pochodzące od monocytów, które w normalnych warunkach przechodzą z krążenia obwodowego do tkanek i tam się osiedlają, a pod wpływem mediatorów zapalenia nabierają immunokompetencji.

Makrofagi, zarówno bezpośrednio, jak i poprzez wydzielane mediatory kontrolują proces gojenia rany na wielu jego etapach, w sposób wielokierunkowy i często ambiwalentny. Uwalniając mediatory zapalenia (np. IL1, TNF α , PDGF) przyczyniają się do rekrutacji dodatkowych komórek zapalnych. Jednocześnie, przejmując funkcje granulocytów, dokonują fagocytozy pozostałych bakterii, resztek tkankowych i zużytych neutrofilów, istotnie przyczyniając się do rozejścia się zapalenia. Biorą udział w tworzeniu ziarniny, uwalniając pod wpływem niedotlenienia i kwasu mlekowego czynniki angiogenne i odpowiedzialne za produkcję składników substancji międzykomórkowej (TGF β). Modelują tę substancję zarówno bezpośrednio, wydzielając proteazy (elastaza, kolagenaza, aktywator plazminogenu), jak i poprzez stymulację fibroblastów do wydzielania kolagenazy. Wreszcie poprzez niektóre mediatory (IL1, TNF α) uczestniczą w procesie kontrakcji i reepitelializacji rany. Wymienione powyżej funkcje makrofaga świadczą o kluczowej roli, jaką odgrywa on w przejściu od zapalenia do fazy odnowy tkankowej [45,62].

TKANKA ZIARNINOWA

Po zakończeniu fazy zapalnej rozpoczyna się proces formowania tkanki ziarninowej. Termin: tkanka ziarninowa pochodzi od jej wyglądu, gdzie nowopowstające naczynia krwionośne tworzą makroskopowo obserwowane ziarnistości. Proces ten obejmuje akumulację makrofagów i fibroblastów, odkładanie składników substancji międzykomórkowej (fibroplazja), tworzenie zawiązków nowych naczyń (angiogeneza) i ich wrastanie do prymitywnej ECM, wreszcie odnowę naskórka (reepitelializacja) i ściągnięcie brzegów rany (kontrakcja). Zjawiska te są kontrolowane przez szereg mediatorów uwalnianych głównie przez płytki i makrofagi, będących czynnikami chemotaktycznymi, mitogennymi i modulującymi funkcje fibroblastów, komórek endothelialnych i keratynocytów.

MIGRACJA

Mechanizmy ukierunkowanej migracji komórek parenchymalnych

W badaniach *in vitro* obserwuje się wiele sposobów ukierunkowanego poruszania się komórek. Bodźcem do migracji komórki może być: wzrastające stężenie (gradient) rozpuszczalnego czynnika chemotaktycznego (chemotaksja); gradient pojedynczego składnika podłoża, po którym porusza się komórka (haptotaksja); czy trójwymiarowy układ składników substancji międzykomórkowej tkanki (*contact guidance*). Komórki ściśle połączone ze sobą (keratynocyty) poruszają się razem, przy czym komórki brzegowe wysuwają lammelipodia w kierunku: od pozostałych (*free edge effect*). *In*

in vivo w procesie tworzenia ziarniny komórki wykorzystują różne sposoby migracji, w zależności od bodźca i otaczającego środowiska. Największą rolę wśród czynników kontrolujących te zjawiska zdają się odgrywać PDGF, TGF β i składnik substancji międzykomórkowej – fibronektyna [25].

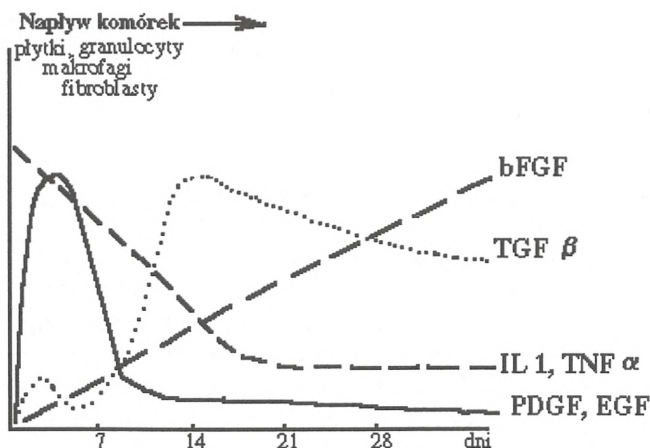
Płytkopochodny czynnik wzrostowy – PDGF (*Platelet-Derived Growth Factor*)

Głównym źródłem tego czynnika są α granule aktywowanych płytek [32]. Jest on także uwalniany przez aktywowane makrofagi, komórki śródbłonna, mięśni gładkich, fibroblasty i keratynocyty [31]. Istnieje w trzech formach dimerycznych (PDGF-AA, PDGF-AB, PDGF-BB). Aktywuje komórki poprzez specyficzne receptory powierzchniowe, pobudzając układ kinazy tyrozynowej. Jest silnym czynnikiem chemotaktycznym dla monocytów, granulocytów obojętnochłonnych, fibroblastów i komórek śródbłonna. Powoduje także proliferację komórek pochodzenia mezenchymalnego, takich jak fibroblasty i komórki mięśnia gładkiego. W stosunku do monocytów i neutrofilów nie wykazuje aktywności mitogennej, choć powoduje ich aktywację i chemokinezę. Dodatkowo PDGF stymuluje produkcję fibronektyny i kolagenazy w fibroblastach, ale nie zwiększa produkcji kolagenu.

Badania przeprowadzone *in vivo* wykazują, że PDGF przyspiesza gojenie rany, choć niektórzy badacze twierdzą, że wymaga on obecności innych czynników wzrostu (TGF β) wydzielanych pod jego wpływem przez makrofagi, by działać efektywnie [3,18,48,55]. W prospektywnych, randomizowanych badaniach potwierdzono korzystny wpływ miejscowo stosowanego PDGF na proces gojenia przewlekłych owrzodzeń skórnych, m.in. stanowiących powikłanie cukrzycy [39,41,67].

Transformujący czynnik wzrostowy β 1 – TGF β 1 (*Transforming Growth Factor β 1*)

Transformujący czynnik wzrostowy β 1 (TGF β 1) jest uwalniany przez wiele komórek zapalnych: płytki, neutrofile, monocyty, makrofagi, fibroblasty i limfocyty. Jest on wydzielany w formie nieaktywnej. *In vivo* uwalnianie TGF β z latentnego kompleksu zachodzi pod wpływem działania enzymów proteolitycznych, np. plazminy. W badaniach immunocytochemicznych ziarniny potwierdzono jego związek z makrofagami, fibroblastami i rejonami wzmożonego odkładania kolagenu. Głównym efektem działania TGF β jest wzrost odkładania substancji międzykomórkowej. Odbywa się to poprzez zmniejszenie produkcji proteaz degradujących; wzrost wytwarzania składników ECM i poziomu inhibitorów proteaz. Jest także silnym czynnikiem chemotaktycznym dla wielu rodzajów komórek [18]. Zwiększa ekspresję białek receptorowych (integryn) dla fibronektyny, co ułatwia migrację keratynocytom [25]. Jednakże TGF β jest bifunkcyjnym regulatorem wzrostu i różnicowania komórek. *In vitro* jest bowiem inhibitorem wzrostu komórek epitelialnych, endotelialnych, hemopoetycznych i limfoidalnych. Próbuje się to wyjaśnić przy użyciu dwufazowego modelu wydzielania TGF β (rys. 2). Nagły wyrzut czynnika z ziarnistości płytek ma działanie prozapalne, natomiast jego późniejsze wydzielanie przez makrofagi i fibroblasty w połączeniu z sekwestracją przez ECM ma antyzapalny, korzystny dla środo-



Rys. 2. Schemat ilustrowujący kinetykę wydzielania cytokin podczas tworzenia tkanki ziarninowej

wiska rany charakter [2]. W wielu badaniach *in vivo*, w ranach o opóźnionym gojeniu (cukrzyca, sterydy) stwierdzono przyśpieszenie procesu gojenia pod wpływem TGF β [3].

Naskórkowy czynnik wzrostowy – EGF (*Epidermal Growth Factor*)

Naskórkowy czynnik wzrostowy (EGF) jest polipeptydem, wykazującym 30% zgodność budowy z innym czynnikiem wzrostu – TGF α , mediatorem neowaskularyzacji. EGF powoduje chemotaksję i proliferację wielu komórek, a szczególnie fibroblastów i komórek śródbłonna [5,31]. Badania *in vivo* wykazują dodatni wpływ EGF na szybkość rozwoju tkanki ziarninowej. Jest on efektem zwiększonej proliferacji fibroblastów [42]. W badaniach immunocytochemicznych ziarniny stwierdzono ścisły związek EGF z błoną podstawną naczyń i tkanką łączną je otaczającą [2]. Posługując się wieloma modelami ran o utrudnionym gojeniu (przewlekłe owrzodzenia podudzi, oparzenia) wykazano, że miejscowe podanie tego czynnika przyśpiesza ich gojenie. Szczególnie korzystny wpływ wywiera on na uszkodzony nabłonek rogówki, przyśpieszając gojenie jej przewlekłych owrzodzeń i pourazowych ubytków, co stanowi o klinicznym zastosowaniu EGF w tych przypadkach [40,58]. Jednakże odległy efekt leczenia EGF wydaje się być niepewny. Według niektórych doniesień zmniejsza on odkładanie kolagenu, z następowym obniżeniem wytrzymałości blizny na rozciąganie [3].

Czynnik stymulujący kolonie granulocytarno-makrofagalne – GM-CSF (*Granulocyte Macrophage-Colony Stimulating Factor*) oraz czynnik stymulujący kolonie granulocytarne – *Granulocyte-Colony Stimulating Factor* (G-CSF)

Czynniki powodujące powstawanie kolonii granulocytarnych i granulocytarno-makrofagalnych (G-CSF, GM-CSF) są glikoproteinami specyficznie stymulującymi prekursorzy niektórych szeregów hemopoetycznych szpiku do różnicowania w ko-

mórki docelowe. Znalazły one, a szczególnie GM-CSF, kliniczne zastosowanie w leczeniu ubocznego mielosupresyjnego wpływu chemioterapii i radioterapii i w odnowie krwiotworzenia po przeszczepach szpiku [62].

Z racji swojej wielofunkcyjności mogą one wywierać wpływ również na komórki zaangażowane w proces gojenia rany. Czynniki te są uwalniane, pod wpływem cytokin zapalnych (IL1, TNF α), przez wiele komórek środowiska rany: makrofagi, fibroblasty, limfocyty T, komórki śródbłonna i keratynocyty. Powodują chemotaksję leukocytów, hamują ich migrację, zwiększają adhezję, syntezę i uwalnianie innych cytokin, aktywację granulocytów i uwalnianie przez nie rodników tlenowych. GM-CSF powoduje proliferację i aktywację makrofagów, komórek o zasadniczym znaczeniu dla pomyślnego gojenia rany. Nie wyklucza się także wpływu GM-CSF na komórki niehemopoetycznego pochodzenia. *In vitro* wykazano stymulujący wpływ tego czynnika na migrację komórek śródbłonna i keratynocytów [34,38]. GM-CSF jest również kandydatem do roli mediatora procesu obkurczania ziarniny (kontrakcji). Zaobserwowano bowiem jego związek z powstawaniem komórek o cechach ultrastrukturalnych i immunohistochemicznych miofibroblastu, odpowiedzialnego za ten proces [64].

W badaniach klinicznych obserwowano korzystny wpływ GM-CSF w leczeniu nie gojących się ran, bezpośrednio [17] i posługując się techniką przeszczepu autogennego [59]. Wykazano również poprawę gojenia ran u pacjentów z trądem i mięsakiem Kaposiego [6,38].

Hormon wzrostu – GH

Hormon wzrostu (GH) jest polipeptydem uwalnianym przez przedni płat przysadki. Mechanizm działania GH w procesie gojenia rany jest niejasny. Niedawne badania wykazują częściową zgodność budowy receptora tego hormonu z rodziną "hemopoetycznych receptorów" takich czynników, jak: erytropoetyna, G-CSF, GM-CSF, IL-3, IL-4, IL-6, IL-7 [31]. Istnieje więc prawdopodobieństwo, że mają one zdolność krzyżowego działania. Receptory dla GH spostrzegano na powierzchni fibroblastów w hodowlach i *in vivo*. *In vitro* wykazano mitogeny wpływ GH na fibroblasty. Jest on również czynnikiem chemotaktycznym dla monocytów i powoduje ich aktywację [78]. Opisano także dodatni wpływ GH, podnoszący zawartość kolagenu i wytrzymałość mechaniczną blizny, nawet w warunkach niedożywienia organizmu. Wykazano zdolność GH do przyspieszenia gojenia miejsc donorowych po przeszczepie skóry (*split-thickness skin grafting*).

Insulinopodobny czynnik wzrostowy – IGF (*Insulin-like Growth Factor*)

Przedstawiciele rodziny insulinopodobnych czynników wzrostowych (*IGF-family*), IGF-I i IGF-II, zwane także somatomedinami, są produkowane głównie w wątrobie i wykazują znaczną homologię budowy z proinsuliną. IGF-II jest wydzielany głównie w czasie rozwoju płodowego, podczas gdy synteza IGF-I utrzymuje się na wysokim poziomie w wielu tkankach dorosłych m.in. w wątrobie, sercu, płucach i nerkach. IGF-I wchodzi w skład ziarnistości płytek i jest uwalniany w dużych ilościach

podczas krzepnięcia. Jest silnym czynnikiem chemotaktycznym dla komórek śródbłonna [6]. Stymuluje mitozę wielu komórek *in vitro*, m.in. fibroblastów. Jego receptory występują na keratynocytach; przyspiesza on reepitelializację ubytku naskórka [31]. Ponieważ podanie egzogenego GH stymuluje syntezę IGF-1 w wątrobie i tkankach, postuluje się, że IGF-1 pośredniczy w działaniu hormonu wzrostu [31]. Aktywność kombinacji tych czynników jest wyższa niż każdego z osobna. IGF-I wykazuje także synergizm z PDGF. Wykazano, że IGF-I samodzielnie, a także w kombinacji z białkiem go wiążącym przyspiesza gojenie rany skórnomięśniowej [74].

NEOWASKULARYZACJA

W procesie tworzenia tkanki ziarninowej podstawowe znaczenie dla prawidłowej odnowy tkankowej ma zjawisko odtwarzania sieci naczyniowej (neowaskularyzacja). Komórki śródbłonna stymulowane przez produkty rozpadu macierzy pozakomórkowej, zmianę warunków przestrzennych mikrośrodowiska oraz przez liczne czynniki chemotaktyczne uwalniają się ze ścisłego związku z błoną podstawną naczyń i rozpoczynają migrację. Przejście przez błonę podstawną i poruszanie się w przestrzeni okołonaczyniowej ułatwiają komórkom śródbłonna enzymy proteolityczne (kolagenaza, trombina, aktywator plazminogenu) wydzielane przez leukocyty i przez nie same [57]. Z pewnym opóźnieniem komórki pozostające w naczyniu "rodzicielskim" zaczynają proliferować, a komórki potomne dołączają do migrujących. Komórki znajdujące się na czubku pączkującego naczynia nie proliferują. Następnie nowouformowana kapilara uzyskuje światło i ulega stabilizacji. Po zakończeniu neowaskularyzacji część naczyń zanika w wyniku: spadku stężenia czynników angiogennych wydzielanych przez komórki zapalne; wenostazy i zakrzepicy prowadzącej do śmierci komórek endotelialnych; mediatorów hamujących angiogenezę.

Prawidłowy przebieg opisanego procesu zależy od wielu mediatorów, wśród których dużą rolę grają chemotaktyczne i mitogenne czynniki wzrostowe: PDGF, bFGF, aFGF, TGF α i β oraz EGF [24,44].

Dostępność hodowli komórek śródbłonna *in vitro* oraz fakt, że biorą one czynny udział w procesie angiogenezy, skierowały wysiłki badaczy na izolację i oczyszczenie czynników wzrostowych śródbłonna. Odkryto szereg substancji o działaniu angiogennym, z których wiele przejawia silne powinowactwo do heparyny (*Angiogenic Heparin-Binding Endothelial Cell Growth Factors*).

Jedną z grup tej rodziny, do której zaliczają się m.in. kwaśny czynnik wzrostowy fibroblastów (*Acidic Fibroblast Growth Factor* – aFGF), składa się z anionowych polipeptydów, występujących głównie w tkance nerwowej. Do przedstawicieli drugiej grupy należą głównie kationowe polipeptydy, zbliżone budową do zasadowego czynnika wzrostowego fibroblastów (*Basic Fibroblast Growth Factor* – bFGF). Tenże czynnik jest opisywany jako najszerszej występujący i najsilniejszy stymulator angiogenezy [24]. W tkankach nienaruszonych pozostaje nieaktywny, związany przez komponenty macierzy pozakomórkowej. Uważa się, że uwolnienie aktywnego bFGF zachodzi pod wpływem uszkodzenia tkanki i działania heparanazy, wydzielanej przez granulocyty obojętnochłonne i płytki. Prawidłowe ziarninowanie rany wymaga utwo-

zenia nowych naczyń, proliferacji fibroblastów i odkładania składników substancji międzykomórkowej. bFGF bierze udział w każdym z etapów tego procesu, stymulując do proliferacji komórki śródbłonna i fibroblasty, a te ostatnie do produkcji fibronektyny i kolagenu.

Niektóre z wymienionych mediatorów działają “bezpośrednio”, przyspieszając powstawanie nowych naczyń zarówno *in vivo*, jak i *in vitro* (bFGF, aFGF, TGF α). Inne (TGF β), mimo wyraźnego wpływu angiogenego *in vivo*, w hodowlach nie powodują wzrostu komórek śródbłonna, a nawet go hamują, co świadczy o “pośrednim”, bardziej złożonym ich wpływie na angiogenezę w organizmie żywym.

FIBROPLAZJA

Opisane czynniki chemotaktyczne powodują pojawienie się po 2–4 dniach od chwili zranienia fibroblastów, powstających z nie zróżnicowanych komórek mezenchymalnych otaczającej tkanki łącznej [60]. Pod wpływem różnych cytokin: TGF β 1, EGF, trombiny oraz mleczanu uwalnianego przez komórki zapalne fibroblasty rozpoczynają produkcję składników substancji międzykomórkowej: kolagenu typ I i III, fibronektyny, proteoglikanów i kwasu hialuronowego. Wśród nich czynną i bardzo ważną rolę w procesie gojenia rany pełni fibronektyna.

Fibronektyna

Fibronektyna jest glikoproteiną o wysokiej masie cząsteczkowej występującą w postaci osoczowej i związanej ze zrębem tkanki łącznej. W środowisku rany fibronektyna jest produkowana przez fibroblasty, komórki śródbłonna i keratynocyty lub wychwytywana z osocza. Fibronektyna posiada szereg różnych miejsc wiążących o powinowactwie do wielu komórek, substancji i składników substancji międzykomórkowej, dzięki czemu nazwano ją “klejem molekularnym” [28]. Fragmenty tej glikoproteiny, powstające pod wpływem proteinaz komórek zapalnych (elastaza neutrofilowa) mają wpływ na przebieg fazy zapalnej gojenia rany poprzez np. wzrost aktywności fagocytarnej makrofaga i neutrofila (opsonizacja), chemotaksji monocytów i proliferacji fibroblastów [27]. Fibronektyna jest składnikiem skrzepu, powstającego w procesie krzepnięcia. Za pomocą czynnika krzepnięcia XIIIa tworzy sieć połączeń z fibryną, która służy za podstawę do migracji dla fibroblastów i innych komórek “wkraczających” do miejsca zranienia. “Prymitywna” substancja międzykomórkowa syntetyzowana przez fibroblasty zawiera także duże ilości fibronektyny, wykorzystywanej przez miofibroblasty w procesie kontrakcji ziarniny [61]. Interakcje między komórkami, a fibronektyną zachodzą dzięki białkom adhezyjnym (integrynom), których ekspresja na powierzchni komórek jest regulowana przez cytokiny, np. TGF β [25,36].

REEPITELIALIZACJA

Właściwa i szybka odnowa nabłonka (naskórka) pozwala odtworzyć barierę między środowiskiem zewnętrznym a wewnętrznym organizmu, co zwiększa jego szanse na przeżycie urazu. Reepitelializacja ubytku rozpoczyna się kilka godzin po zranieniu

poprzez migrację keratynocytów z “wolnego brzegu” tkanki. W komórkach tych, podobnie jak w fibroblastach, tworzących tkankę ziarninową, zachodzą zmiany fenotypowe, nadające komórce mobilność. Dochodzi do retrakcji włókien kurczliwych cytoplazmy, zmniejszenia ilości połączeń międzykomórkowych (desmosomów), w cytoplazmie pojawiają się włókna aktynowe. Keratynocyty czasowo rozluźniają związek z błoną podstawną, poprzez zmniejszenie ilości hemidesmosomów. Jeśli błona podstawna jest uszkodzona przez uraz czy późniejszą degradację enzymatyczną, podłoże dla migracji keratynocytów stanowi prowizoryczna substancja międzykomórkowa.

Po 1–2 dniach keratynocyty znajdujące się na brzegu rany zaczynają proliferować, tworząc dodatkową populację migrujących komórek. Proliferacja pozostaje pod kontrolą innych komórek i wielu mediatorów. Jak wspomniano wcześniej, funkcję taką przypisuje się EGF. Innym mediatorem, wykazującym aktywność mitogenną jest *Keratinocyte Growth Factor* (KGF) zwany także FGF-7, polipeptyd z rodziny fibroblastycznych czynników wzrostu [77]. Podczas gojenia rany dochodzi do uwalniania tego czynnika m.in. przez fibroblasty [12]. Silny wpływ modulujący to zjawisko przejawia IL 1, natomiast PDGF-BB, IL 6 i TGF α umiarkowanie podnoszą poziom ekspresji mRNA KGF w fibroblastach [12,14].

KONTRAKCJA

W trakcie gojenia ubytku tkankowego, w wyniku kurczenia się tkanki ziarninowej, brzegi rany są stopniowo zbliżane do siebie. Zjawisko to, zwane kontrakcją rany, pozwala na redukcję ilości tkanki łącznej, potrzebnej do uzupełnienia defektu i zmniejszenie rozmiarów blizny. Jednakże, w zależności od rodzaju, rozległości i umiejscowienia uszkodzenia, kontrakcja może prowadzić do zniekształceń i upośledzenia funkcji narządu czy kończyny. Za kontrakcję odpowiadają specyficzne komórki, zwane miofibroblastami, które wykorzystując elementy kurczliwe cytoplazmy, dokonują zmniejszenia powierzchni ziarniny. Siła skurczu przenoszona jest na sąsiednie komórki i składniki substancji komórkowej, które kontrolują przebieg procesu. Przewaga typu III kolagenu w świeżej bliznie powoduje szybszą kontrakcję w porównaniu z blizną dojrzałą, gdzie dominuje typ I kolagenu [22].

Komórką macierzystą miofibroblastu jest według większości autorów fibroblast [11,21]. Miofibroblast ma jednakże niektóre cechy ultrastrukturalne i biochemiczne komórek mięśnia gładkiego: obecność wiązek mikrofilamentów i α SM aktyny. Ta forma aktyny szczególnie obficie występuje w komórkach mięśniówki gładkiej naczyń. Kiedy proces kontrakcji zakończy się, komórki o fenotypie miofibroblastu znikają, prawdopodobnie w rezultacie apoptozy, a blizna zawiera niewiele typowych fibroblastów, z dobrze rozwiniętą szorstką siateczką śródplazmatyczną, ale bez mikrofilamentów [65].

Czynniki kontrolujące powstawanie komórek o cechach miofibroblastu nie są jeszcze dokładnie określone. Wśród kandydatów wymienia się GM-CSF, powodujący

wzrost ilości miofibroblastów i przyspieszenie kontrakcji [63,64]. Może nim być także TGF β indukujący powstawanie włókien α SM aktywny w miofibroblastach [19,53], a także Endotelina-1 (ET-1), obecna *in vivo* w miejscach nasilonej kontrakcji [73].

UTWORZENIE I PRZEBUDOWA SUBSTANCJI MIĘDZYKOMÓRKOWEJ

Ostatnią opisywaną fazą gojenia rany jest utworzenie substancji międzykomórkowej i jej przebudowa. W rzeczywistości “produkcja” substancji międzykomórkowej rozpoczyna się równocześnie z pojawieniem się młodej ziarniny. Jednakże, długo po zakończeniu fazy ziarninowania tkanka łączna substancji międzykomórkowej ciągle ulega zmianom. W miejsce składników czynnie biorących udział w poszczególnych procesach pojawiają się substancje nadające powstającej bliznie mechaniczną wytrzymałość na rozciąganie. I tak, spada poziom fibronektyny i kwasu hialuronowego, stanowiących podłoże migracji, wzrostu i różnicowania komórek środowiska rany. Zastępują je proteoglikany, a także kolagen typu III i kolagen typu I, które mają właściwości mechaniczne.

Mimo iż TGF β jest główną cytokiną, odpowiedzialną za tworzenie substancji międzykomórkowej, jej obecność nie tłumaczy sekwencyjnego pojawiania się poszczególnych jej składników. Wydaje się, że w proces ten mogą być zaangażowane również interferony (IFNs). IFN γ (uwalniany głównie przez limfocyty T) hamuje proliferację fibroblastów, syntezę kolagenu i ekspresję α SM aktywny, a stymuluje produkcję glikoaminoglikanów (GAG). IFN α (produkowany głównie w fibroblastach) i β (produkt głównie leukocytów) wykazuje hamujący wpływ także na produkcję GAG [20]. Jest więc możliwe, że autokrynne działanie IFN α przez fibroblasty może regulować przebudowę substancji międzykomórkowej.

W procesie modelowania EMC udział biorą enzymy z rodziny metaloproteinaz [8]. Działanie ich hamowane jest przez tkankowe inhibitory metaloproteinaz (TIMP). Wykazano obecność tych enzymów w tkankach, otaczających miejsce zranienia. Kolagenaza i TIMP lokalizują się głównie na styku: strupa, regenerującego naskórka i skóry właściwej oraz wokół naczyń [68,69]. Opisano dwa rodzaje kolagenazy. Jedna z nich jest produkowana przez granulocyty obojętnochłonne, druga – przez fibroblasty [47]. Kolagenazy produkowane są także przez limfocyty i monocyty-makrofagi. Trawią one typy: I–III kolagenu. Produkty degradacji kolagenu modulują przebieg gojenia na bardzo wczesnym etapie poprzez wpływ na migrację i aktywność kluczowych komórek zapalenia – makrofagów. Te same komórki uwalniają szereg, opisywanych wcześniej cytokin, regulujących wydzielanie kolagenaz. Wśród nich są: IL 1, TNF α , PDGF, aFGF, bFGF, EGF, stymulujące wydzielanie enzymu i TGF β , który hamuje jego produkcję [8,30].

Istnieją także kolagenazy, trawiące inne typy kolagenu oraz żelatynę (żelatynazy). Wśród nich dwie: MMP-2 o masie cząsteczkowej 72 kDa i MMP-9 (92 kDa) wydają się pełnić ważne funkcje na różnych etapach gojenia rany [1,8,80].

INNE CZYNNIKI O POTENCJALNYM WPŁYWIE NA PRZEBIEG PROCESU GOJENIA RANY

Obecnie znanych jest ponad 100 różnych czynników mających związek z gojeniem rany lub biorących udział w procesach, w przebiegu których zachodzą podobne zjawiska. Ze względu na brak potwierdzenia ich wpływu *in vivo* i nieustalony jeszcze wpływ kliniczny jedynie pokrótce omówiono niektóre z nich poniżej.

Interferon gamma (IFN γ) wydzielany jest przez aktywowane limfocyty T i prawdopodobnie przez naturalne komórki cytotoksyczne (NK). Kluczowa jego rola w regulacji procesów odpornościowych polega na jego pobudzającym wpływie na aktywację makrofagów. Zwiększa wytwarzanie nadtlenu w granulocytach i makrofagach. Opisywana jest jego aktywność chemotaktyczna wobec keratynocytów [29]. Z drugiej strony jednak zwiększa ekspresję metaloproteinaz, nie mając wpływu na TIMP, przez co podnosi aktywność proteolityczną w fazie przebudowy. Hamuje pączkowanie nowych naczyń w procesie angiogenezy. Podany ogólnie istotnie obniża wytrzymałość na rozerwanie i stopień neowaskularyzacji nowoutworzonej tkanki [52].

Czynnik stymulujący kolonie makrofagowe (M-CSF – *Macrophage-Colony Stimulating Factor*) ma istotne znaczenie w wytwarzaniu i funkcjonowaniu monocytów i makrofagów. Powoduje ich chemotaksję, nasila fagocytozę i cytotoksyczność. Ponieważ makrofagi mają podstawowe znaczenie dla pomyślnego przebiegu odnowy, M-CSF jest kolejnym krwiotwórczym czynnikiem wzrostowym, budzącym nadzieje na jego korzystny wpływ w procesie gojenia [79].

Analogicznie, czynniki, których aktywność biologiczna związana jest z makrofagami, mogą pośrednio wpływać na przebieg opisywanego procesu. Wśród nich wymienić należy: IL-2, najważniejszy czynnik wzrostowy limfocytów T; IL-3, stymulator proliferacji wielopotencjalnych komórek macierzystych, IL-4, czynnik wywierający wpływ na limfocyty B i T, aktywujący monocyty, powodujący proliferację komórek śródbłonna i fibroblastów.

Interleukina 8 (IL-8) jest cytokiną specyficznie aktywującą neutrofile i wywołującą ich akumulację w ogniskach zapalenia. Opisywana jest także jako czynnik przyspieszający neowaskularyzację [70].

Czynnik wzrostowy komórek śródbłonna (*Vascular Endothelial Growth Factor*) jest mitogenem specyficznym dla komórek śródbłonna. W przeciwieństwie do PDGF, do którego rodziny należy, nie wywiera wpływu na inne typy komórek. Jego zdolność do przyłączania heparyny i wpływ angiogenetyczny *in vivo* sugerują, że może on być ważnym mediatorem odnowy tkankowej [6].

Amfiregulina (*Amphiregulin*), czynnik należący do rodziny EGF, jest opisywany jako identyczny z peptydem niedawno wyizolowanym z ludzkich keratynocytów (*Keratinocyte-Derived Autocrine Factor*). Sugeruje się, że może on być ważnym, autokrynnym czynnikiem wzrostowym dla keratynocytów [6].

PODSUMOWANIE

Proces gojenia rany pozostaje pod kontrolą wielu mediatorów, wśród nich głównie interleukin i polipeptydowych czynników wzrostowych. Są one w centrum zainteresowania badaczy, ze względu na możliwość pozyskiwania ich w dużych ilościach, przy użyciu metody rekombinacji genu. Ze zmiennym skutkiem, są stosowane w klinicznych próbach modyfikacji przebiegu gojenia. Jest mało prawdopodobne, aby nieprawidłowości procesu odnowy mogły być korygowane za pomocą pojedynczych czynników. Wyraźne efekty powinny natomiast przynieść sekwencyjne stosowanie kilku mediatorów. Konieczne jest więc dalsze, dokładne poznanie natury, funkcji mediatorów i interakcji między nimi.

LITERATURA

- [1] AGREN MS. Gelatinase activity during wound healing. *Br J Dermatol* 1994; **131**: 634–640.
- [2] APPLETON I, TOMLISSON A, COLVINE-NASH PR. Temporal and spatial immunolocalization of cytokines in murine chronic granulomatous tissue. *Lab Invest* 1993; **69**: 405–414.
- [3] APPLETON I. Wound repair: the role of cytokines and vasoactive mediators. *J Roy Soc Med* 1994; **87**: 500–502.
- [4] ASHCROFT GS, MASTERS ON GR. Interleukin-6 and wound healing. *Br J Anaesth* 1994; **73**: 426–432.
- [5] BANKS AR. The role of growth factors in tissue repair II: Epidermal Growth Factor. [w] Clark RAF, Henson PM. [red.] The molecular and cellular biology of wound repair. New York: Plenum Press 1988.
- [6] BENNETT NT, SCHULTZ GS. Growth factors and wound healing: Biochemical properties of growth factors and their receptors. *Am J Surg* 1993; **165**: 728–737.
- [7] BETTINGER DA, PELLICANE JV, TARRY WC, YAGER DR, DIEGELMANN RF, LEE R, COHEN IK, DEMARIA EJ. The role of inflammatory cytokines in wound healing: accelerated healing in endotoxin-resistant mice. *J Trauma* 1994; **36**: 810–813.
- [8] BIRKEDAL-HANSEN H, MOORE WGI, BODDEN MK. Matrix metalloproteinases: a review. *Critical Reviews in Oral Biology and Medicine*. 1993; **4**: 197–250.
- [9] BOENTE P, SAMPAIO C, BRANDEO M. Local peri-lesional therapy with GM-CSF for Kaposi sarcoma. *Lancet* 1993; **341**: 1154.
- [10] BOISJOLY HM, LAPLANTE C, BERNATCHEZ SF, SALESSE C, GIASSON M, JOLY MC. Effects of EGF, IL 1 and their combination on *in vitro* corneal epithelial wound closure and cell chemotaxis. *Exp Eye Res* 1993; **57**: 293–300.
- [11] BOISSOU H, PIERRAGGI M, JULIAN M. i inni. Fibroblasts in dermal tissue repair. Electron and immunohistochemical study. *Int J Dermatol* 1988; **27**: 564–570.
- [12] BRAUCHLE M, ANGERMEYER K, HUBNER G. Large induction of keratinocyte growth factor expression by serum growth factors and pro-inflammatory cytokines in cultured fibroblasts. *Oncogene* 1994; **9**: 3199–3204.
- [13] BUSSOLINO F, ZICHE M, WANG JM. *In vitro* and *in vivo* activation of endothelial cells by colony-stimulating factors. *J Clin Invest* 1991; **87**: 986–995.
- [14] CHEDID M, RUBIN JS, CSAKY KG, AARONSON SA. Regulation of keratinocyte growth factor gene expression by interleukin 1. *J Biol Chem* 1994; **269**: 10753–10757.
- [15] CIESIELSKI LK. Rola cytokin w stanach nagłych w chirurgii ogólnej. *Polski Przegląd Chirurgiczny* 1993; **65**: 1244–1251.

- [16] CIOFFI WG, BURLESON DG, PRUITT BA. Leukocyte responses to injury. *Arch Surg* 1993; **128**: 1260–1267.
- [17] DE COSTA RM, ANICETO C, JESUS FM. Quick healing of leg ulcers after molgramostim. *Lancet* 1994; **344**: 481.
- [18] CROMACK DT, PORRAS-REYES B, PURDY JA. Acceleration of tissue repair by transforming growth factor beta 1: Identification of *in vivo* mechanism of action with radiotherapy-induced specific healing deficits. *Surgery* 1993; **113**: 36–42
- [19] DESMOULIERE A, GEINOZ A, GABBIANI F. Transforming growth factor beta 1 induces alpha -smooth muscle actin expression in granulation tissue, myofibroblasts and in quiescent and growing cultured fibroblasts. *J Cell Biol* 1993; **122**: 103–111.
- [20] DUNCAN MR, BERMAN B. Differential regulation of glycosaminoglycans, fibronectin and collagenase production in cultured dermal fibroblasts by interferon-alpha, -beta, and -gamma. *Arch Dermatol Res* 1989; **281**: 11–18.
- [21] EDDY RJ, PETRO JA, TOMASEK JJ. Evidence for the nonmuscle nature of the “myofibroblasts” of granulation tissue and hypertrophic scar. An immunofluorescence study. *Am J Pathol* 1988; **130**: 252–260.
- [22] EHRlich HP. Wound closure: evidence of cooperation between fibroblasts and collagen matrix. *Eye* 1988; **2**: 149–157.
- [23] ELIAS JA. Interleukin-6: On target for disease and approaching the bedside. *J Lab Clin Med* 1992; **120**: 672–674.
- [24] FOLKMAN J, KLAGSBRUN M. Angiogenic Factors. *Science* 1987; **235**: 442–447.
- [25] GAILIT J, WELCH MP, CLARK RAF. TGF-beta 1 stimulates expression of keratinocyte integrins during re-epithelialization of cutaneous wounds. *J Invest Dermatol* 1994; **103**: 221–227.
- [26] GREENHALGH DG, RIEMAN M. Effect of basic fibroblast growth factor on the healing of partial-thickness donor sites. *Wound Rep Regen* 1994; **2**: 113–121.
- [27] GRINNELL F, ZHU M. Identification of neutrophil elastase as the proteinase in burn wound fluid responsible for degradation of fibronectin. *J Invest Dermatol* 1994; **103**: 155–161.
- [28] GRZYBOWSKI J, DOBKE M. Znaczenie glikoproteidowej opsoniny-fibronektyny dla diagnostyki i terapii ciężko poparzonych. *Post Hig Med Dośw* 1987; **41**: 29–44.
- [29] GYULAI R, HUNYADI J, KENDERESSY-SZABO A. Chemotaxis of freshly separated and cultured human keratinocytes. *Clin Exp Dermatol* 1994;**19,4**: 309–311.
- [30] HATZRA, VONJANCS, SCHILDBERGF. The role of collagenase in wound healing [w] Westerhof W, Vanscheidt W. [red.] Proteolytic enzymes and wound healing. Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg, 1994.
- [31] HERNDON DN, NGUYEN TT, GILPIN DA. Growth factors: local and systemic. *Arch Surg* 1993; **128**: 1227–1233.
- [32] HOGG N, LANDIS C. Adhesion molecules in cell interactions. *Cur Op Immunol* 1993, **5**: 383–390.
- [33] HUANG JS, OLSEN TJ, HUANG SS. The role of growth factors in tissue repair I: Platelet-derived growth factor.(w) Clark RAF, Hensen PM.[red.]: The molecular and cellular biology of wound repair. New York, Plenum Press, 1988: 257.
- [34] IYUNG RW, LIANCUN W, PIERCE GF, MUSTOE TA. Granulocyte/macrophage colony-stimulating factor and granulocyte-colony stimulating factor: Differential action of incisional wound healing. *Surgery* 1994; **115**: 325–334.
- [35] JAATELLA M. Biologic activities and mechanisms of action of tumour necrosis alfa/ cachectin. *Lab Invest* 1991; **64**: 724–742
- [36] JAKÓBISIAK M. [red.] Immunologia. PWN Warszawa 1995:280
- [37] JAKUBICZ D, MAŚLIŃSKI S. Białka adhezyjne w zapaleniu. *Reumatologia* 1994; **13**, **1**: 34–48.

- [38] KAPLAN G, WELSH G, GUIDO LS, MEYN P, BURKHARDT RA, ABALOS RM, BARKER J, FRINDT PA, FAJARDO TF, CELONA R, COHN ZA. Novel responses of human skin in intradermal recombinant Granulocyte/Macrophage - Colony Stimulating Factor: Langerhans cell recruitment, keratinocyte growth and enhanced wound healing. *J Exp Med* 1992; **175**: 1717-1728.
- [39] KNIGHTON DR, CIRESI K, FIEGEL VD. Stimulation of repair in chronic, cutaneous ulcers using platelet-derived wound healing formula. *Surg Gynecol Obstet* 1990; **170**: 56-60.
- [40] KNORR M, SCHULLER S, STEUHL KP. EGF in therapy of corneal diseases. Principles and possible uses. *Ophthalmologie* 1992; **89**: 119-127.
- [41] KRUPSKI WC, REILLY LM, PEREZS. A prospective randomized trial of autologous platelet derived growth factor wound healing factors for treatment of chronic non-healing wounds: a preliminary report. *J Vasc Surg* 1991; **14**: 526-532.
- [42] LAATO M, KAHARI VM, NIKOSKI J. Epidermal growth factor increases collagen production in granulation tissue by stimulation of fibroblast proliferation and by activation of procollagen genes. *Biochem J* 1987; **247**: 385-388.
- [43] LASEK J. Wpływ urazu na reakcje odpornościowe ustroju. *Pol Przegl Chirurg* 1993; **65**: 1043-1049.
- [44] LEEK RD, HARRIS AL, LEWIS CE. Cytokine networks in solid human tumors: regulation of angiogenesis. *Leukocyte Biology* 1994; **56**: 423-432.
- [45] LONGAKER MT, BOUHANABS, HARRISON MR. Wound healing in fetus. Possible role for inflammatory macrophages and transforming growth factor-beta isoforms. *Wound Rep Regen* 1994; **2**: 104-112.
- [46] LOWRY SF. Cytokine mediators of immunity and inflammation. *Arch Surg* 1993; **128**: 1235-1242.
- [47] MALLYA SK, MOOKHTIAR KA, GAO Y. Characterization of 58-kilodalton human neutrophil collagenase: comparison with human fibroblast collagenase. *Biochemistry* 1990; **29**: 10628-10634.
- [48] MARTIN PM, WOOLEY JH, MCCLUSKEY J. Growth factors and cutaneous wound repair. *Prog Growth Factor Res* 1992; **99**: 343-349.
- [49] MARUSZYŃSKI M, POJDA Z. Interleukin-6 levels in the monitoring of surgical trauma: a comparison of serum concentrations in patients treated by cholecystectomy via laparotomy or laparoscopy. *Surgical Endoscopy* (w druku).
- [50] MATEO RB, REICHNER JS, ALBINA JE. Interleukin-6 activity in wounds. *Am J Physiol* 1994; **266**: R1840-1844.
- [51] MERTZ PM, SAUDER DL, DAVIS SC. IL 1 as a potent inducer of wound re-epithelialization. *Prog Clin Biol Res* 1991; **365**: 473-480.
- [52] MILES RH, PAXTON TP, ZACHEIS D. Systemic administration of interferon-gamma impairs wound healing. *J Surg Res* 1994; **56**: 288-294.
- [53] MONTESANO R, ORCIL. Transforming growth factor beta stimulates collagen-matrix contraction by fibroblasts: Implications for wound healing. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; **85**: 4894-4897.
- [54] MUELLER R V, HUNT TK, TOKUNAGA A. The effect of insuline-like growth factor I on wound healing variables and macrophages in rats. *Arch Surg* 1994; **129**: 262-265.
- [55] MUSTOE TA, PURDY J, GRAMATES P, DEUEL T, THOMASON A, PIERCE GF. Reversal of impaired wound healing in irradiated rats by platelet-derived growth factor-BB. *Amer J Sur* 1989; **158**: 345-350.
- [56] NAITO Y. Responses of plasma Adrenocorticotrophic Hormone, Cortisol and cytokines during and after upper abdominal surgery. *Anesthesiology* 1992; **77**: 426-431.
- [57] ORGILL D, DEMLING RF. Current concepts and approaches to wound healing. *Crit Care Med* 1988; **16**: 899-909.
- [58] PASTOR JC, CALONGE M. Epidermal growth factor and corneal wound healing: a multicenter study. *Cornea* 1992; **11**: 311-314.
- [59] POJDA Z, STRUŻYNA J. Treatment of non-healing ulcers with rh GM-CSF and skin grafts. *Lancet* 1994; **344**: 1100.

- [60] POLLOCK A. Immunology in Surgical Practice. London 1991.
- [61] RAGHOWR. The role of extracellular matrix in postinflammatory wound healing and fibrosis. *FASEB J* 1994; **8**: 823–831.
- [62] ROBAK T. Biologia i farmakologia cytokin. PWN Warszawa- Łódź 1995.
- [63] ROBSON M, KUCUKCELEBI A, CARP SS. Effects of granulocyte-macrophage colony stimulating factor on wound contraction. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1994; **13**: S41–S46.
- [64] RUBBIA BRANDY L, SAPPINO AP, GABBIANI G. Locally applied GM-CSF induces the accumulation of alpha-smooth muscle actin containing myofibroblasts. *Virchows Arch B Cell Pathol* 1991; **60**: 73–82.
- [65] SCHMITT GRAFF A, DESMOULIERE A, GABBIANI G. Heterogeneity of myofibroblast phenotypic features: an example of fibroblastic cell plasticity. *Virchows Arch* 1994; **425**: 3–24.
- [66] SIMPSON DM, ROSS R. The neutrophilic leukocyte in wound repair: A study with antineutrophil serum. *J Clin Invest* 1972; **51**: 2009–2023.
- [67] STEED D, GOSLEN B, HAMBLEY R. Clinical trials with purified platelet releasate. *Prog Clin Biol Res* 1991; **365**:103–113.
- [68] STRICKLIN GP, NANNEY LB. Immunolocalization of collagenase and TIMP in healing human burn wounds. *J Invest Dermatol* 1994; **103**: 488–492.
- [69] STRICKLIN GP, LI LY, NANNEY LB. Localization of mRNAs representing interstitial collagenase, 72-kDa gelatinase and TIMP in healing porcine burn wounds. *J Invest Dermatol* 1994; **103**: 352–358.
- [70] STRIETER RM, KUNKEL SL, ELNER VM. Interleukin-8 – A Corneal Factor That Induces Neovascularization. *Am J Pathol* 1992; **141**: 1279–1284.
- [71] TCHÓRZEWSKI H. Zapalenia [w] Tchórzewski H. [red.] Wykłady z patofizjologii Wojskowa Akademia Medyczna, Łódź 1990.
- [72] TERKELTAUB AR, GINSBERG MH. Platelets and response to injury. [w] Clark RAF, Henson PM. [red.] The molecular and cellular biology of wound repair. New York, London, Plenum Press. 1988.
- [73] THIEMERMANN C, CORDER R. Is endothelin-1 a regulator of myofibroblast contraction during wound healing? *Lab Invest* 1992; **67**: 677–679.
- [74] TSUBOIR, SHICM, SATOC. Co-administration of insulin-like growth factor (IGF)-I and IGF-binding protein stimulate wound healing in animal models. *J Invest Dermatol* 1995; **104**: 199–203.
- [75] UNEMORIEN, EHSANIN, WANGM. Interleukin-1 and transforming growth factor-alpha: synergistic stimulation of metalloproteinases, PGE₂ and proliferation of human fibroblasts. *Exp Cell Res* 1994; **210**: 166–171.
- [76] VLADAVSKY I, FUKS Z, ISHALI-MICHAELI R. Extracellular matrix-resident basic fibroblast growth factor: Implication for the control of angiogenesis. *J Cell Biochem* 1991; **45**: 167–176.
- [77] WERNER S, BREADEN M, HUBNER G. Induction of keratinocyte growth factor expression is reduced and delayed during wound healing in the genetically diabetic mouse. *J Invest Dermatol* 1994; **103**: 469–473.
- [78] WIEDERMANN CJ, REINISCHN, KAHLER C. *In vivo* activation of circulating monocytes by exogenous growth hormone in man. *Brain Behav Immun* 1992; **6**: 387–393.
- [79] WIKTOR-JĘDRZEJCZAK W, SZWECH P. CSF-1 – Od odkrycia do Kliniki. *Acta Haematol Pol* 1994; **25**: 66–70.
- [80] YOUNG PK, GRINNELL F. Metalloproteinase activation cascade after burn injury: A longitudinal analysis of the human wound environment. *J Invest Dermatol* 1994; **103**: 660–664.

Otrzymano: 14.09.1995 r.

Przyjęto: 10.12. 1995 r.

Adres autora: 01-163 Warszawa, ul. Kozielska 4

FIZJOLOGICZNA ROLA RELAKSYNY

THE PHYSIOLOGICAL ROLE OF RELAXIN

Anita FRAN CZAK, Genowefa KOTWICA

Instytut Fizjologii Zwierząt, Akademia Rolniczo-Techniczna, Olsztyn

Streszczenie: W pracy przedstawiono dane o biologicznej roli relaksyny w przebiegu cyklu rujowego, ciąży, porodu i laktacji. Porównano funkcje tego hormonu, regulację jego syntezy oraz sekrecji, a także zebrano dane o wpływie relaksyny na tkanki i narządy oraz o miejscu jej syntezy zarówno u człowieka, jak i różnych gatunków zwierząt. Opisano również molekularny mechanizm oddziaływania relaksyny na tkankę łączną i mięśniówkę gładką. Zaprezentowano też, ostatnio odkryty, udział peptydu w rozwoju mózgowia i regulacji funkcji sercowo-naczyniowych u szczurów.

Słowa kluczowe: relaksyna, pęcherzyk jajnikowy, ciało żółte, macica, szyjka macicy, spojenie łonowe, gruczoł mlekowy, tkanka łączna, tkanka mięśniowa.

Summary: The paper presents data on the biological role of relaxin in course of the oestrous cycle, pregnancy, parturition and lactation. The functions, regulation of the synthesis and secretion of relaxin have been compared in numerous species including man. Moreover the informations about the influence of relaxin of different tissues and organs and also about this peptide synthesis sources in the body are given. Finally, it was described the molecular mechanism of relaxin action on connective tissue and smooth muscles and involvement of this peptide in brain development and in cardiovascular regulation.

Key words: relaxin, ovarian follicle, *corpus luteum*, uterus, cervix, pubic symphysis, mammary gland, connective tissue, smooth muscles.

WSTĘP

Relaksyna jest hormonem białkowym odkrytym przez Hisaw i wsp. w 1926 roku jako produkt ciążyowego ciała żółtego. Do lat osiemdziesiątych sądzono, że relaksyna jest związana jedynie z okresem późnej ciąży i przez swoje oddziaływanie na mięśniówkę gładką macicy, na szyjkę macicy oraz na spojenie łonowe przygotowuje drogi rodne samicy do porodu. Odkrycie innych miejsc biosyntezy relaksyny aniżeli ciało

żółte ciążowe oraz obserwacja biologicznych wpływów tego peptydu na różne tkanki i narządy pozwoliło rozszerzyć naszą wiedzę o jego fizjologicznej roli. Wykazano przede wszystkim, że ekspresja genu relaksyny i potranslacyjne przemiany preprohormonu zachodzą w komórkach ściany pęcherzyka jajnikowego, w komórkach lutealnych cyklicznego ciała żółtego oraz w śluzówce macicy różnych gatunków samic. Dane te sugerują, że relaksyna może uczestniczyć w regulacji cyklu rujowego. Przypuszcza się, że relaksyna w sposób parakryny i/lub autokryny wpływa na rozwój pęcherzyka jajnikowego i ciała żółtego. Relaksyna uczestniczy też we wzroście oraz rozwoju macicy (wpływ uterotropowy) i gruczołu mlekowego (wpływ mammotropowy) [16]. Peptyd ten może także regulować ciśnienie krwi i funkcje sercowo-naczyniowe. Ponadto relaksynę wykryto w plazmie nasienia i stwierdzono, że ma ona wpływ na ruchliwość plemników [32, 63].

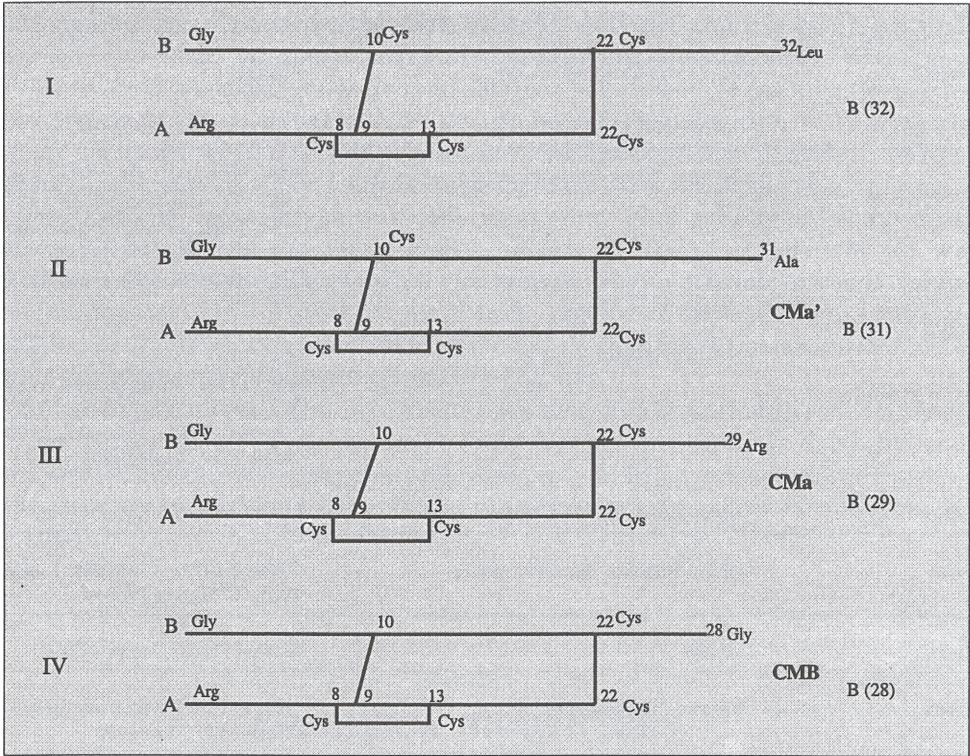
Celem niniejszej pracy jest zaprezentowanie danych o biologicznej roli relaksyny w różnych tkankach i narządach oraz o komórkowym mechanizmie działania tego hormonu. Większość cytowanych w niniejszej pracy badań, z uwagi na ich powszechność, dotyczy świni. Mniej szczegółowo przedstawiono dane dotyczące innych gatunków.

I. MIEJSCA BIOSYNTETY I BUDOWA CZĄSTECZKI RELAKSYNY

Wyniki dotychczasowych badań wskazują na różnorodne miejsca występowania i syntezy relaksyny w organizmie samic różnych gatunków. Obecność relaksyny w tkankach i narządach wykrywano metodami immunocytochemicznymi [3, 11, 29, 40] i metodą radioimmunologiczną [84, 111, 112]. Dodatkowo, w niektórych narządach (jajnik, macica, mózg) badano ekspresję genu i potranslacyjne przemiany prohormonu [13, 16, 88, 140]. W tabeli 1 przedstawiono dane o występowaniu relaksyny w różnych tkankach i narządach charakterystycznych dla poszczególnych gatunków samic. W okresie ciąży relaksyna syntetyzowana jest w miejscach, w których odbywa się także produkcja progesteronu podtrzymującego ciążę. I tak ciało żółte jest głównym źródłem relaksyny u świń i szczurów, a łożysko u ciężarnych owiec, kłaczy, królików, świnek morskich, kotów, psów i chomików. U naczelnych jest to ciało żółte i dodatkowo łożysko i błona doczesnowa, zaś u krów ciało żółte i łożysko. Ponadto ekspresję genu relaksyny stwierdzono podczas cyklu rujowego w jajnikach i w śluzówce macicy świni oraz w niektórych strukturach mózgowia szczura. Dodatkowo, hormon ten występuje w gruczole mlekowym kobiety, świnki morskiej i psa, w guzach nowotworowych przewodu pokarmowego człowieka oraz w prostaty u mężczyzn. Peptyd homologiczny do relaksyny ssaków stwierdzono w jajnikach ryb i ptaków [109].

TABELA 1. Występowanie relaksyny

Gatunek	Miejsce występowania relaksyny	Autorzy
Człowiek	¹ ciałko żółte (*cykliczne, ciążowe), ² łożysko, ³ śluzówka macicy, ⁴ błona doczesnowa, ⁵ gruczoł mlekowy, ⁶ guzy przewodu pokarmowego, ⁷ prostate	¹⁻⁷ Bryant-Greenwood 1994, ^{1-1*} Yki-Jarvinen 1984, ^{1*,7} Ivell 1989, ² Schwabe 1978, ^{2,3} Sherwood 1988, ³ Bryant-Greenwood 1984, 1993, ⁴ Bigazzi 1980, ^{2,4} Bryant-Greenwood 1991a, ⁵ Mazoujian 1990, ⁶ Stemmermann 1994, ⁷ Colon 1994
Świnia	¹ pęcherzyk jajnikowy, ² ciałko żółte (cykliczne*, ciążowe), ³ śluzówka macicy	¹ Bryant-Greenwood 1980, ¹ Matsumoto 1980, ¹ Loeken 1983, ² Sherwood 1974, ² Dening-Kendall 1989, ² Anderson 1973, ^{2*} Fields 1985, ^{2*} Evans 1983, ^{2*} Bagnell 1990, ³ Afele 1979, ³ Zhang 1992
Krowa	¹ ciałko żółte (ciążowe), ² łożysko	¹ Anderson 1982, ^{1,2} Fields 1980
Owca	¹ jajnik, ² łożysko, ³ śluzówka macicy	¹ Dubois 1978, ^{1,2,3} Renegar i wsp. 1985, ^{1,2,3} Wathes 1988
Klacz	łożysko	Stewart 1986ab, Stewart 1991
Królik	¹ łożysko, ² śluzówka macicy	¹ Hisaw 1926 (za Sherwood 1993), ¹ Fields 1985, ² Lee 1990
Szczur	¹ ciałko żółte (ciążowe), ² śluzówka macicy, ³ mózg, ⁴ przedsionki serca	¹ Fields 1984, ¹ Golos 1984, ^{1,2} Fields 1992, ³ Osheroff 1993, ⁴ Taylor 1994
Świnka morska	¹ śluzówka macicy, ² gruczoł mlekowy	¹ Hisaw 1944 (za Sherwood 1993), ¹ Bryant-Greenwood 1991b, ² Peaker 1989
Kot	łożysko	Addiego 1987
Pies	¹ łożysko, ² gruczoł mlekowy	¹ Stewart 1992, ² Tsutsui 1991, ² Goldsmith 1994
Chomik	łożysko	Renegar 1993
Knur	jądra	Dubois 1978
Wieloryb	jajnik	Schwabe 1989 (za Sherwood 1993)
Pies morski	jajnik	Büllesbach 1986 (za Sherwood 1993)
Kura	jajniki odżółtkowane	Brackett 1985 (za Sherwood 1988)
Rekin	ciałko żółte	Reining 1981



Rys. 1. Schemat budowy cząsteczki relaksyny (I) i jej homologicznych frakcji (II, III, IV) uzyskanych z ciała żółtego ciężarnej świni: łańcuch A, zawierający 22 aminokwasy ($^1\text{Arg}-^{22}\text{Cys}$) i łańcuch B, składający się z 32 aminokwasów ($^1\text{Gly}-^{32}\text{Leu}$), połączone dwoma kowalencyjnymi wiązaniami (mostki disiarczkowe): $\text{B}^{10}\text{Cys}-\text{A}^9\text{Cys}$ i $\text{B}^{22}\text{Cys}-\text{A}^{22}\text{Cys}$; w łańcuchu A występuje trzecie wiązanie disiarczkowe: $^8\text{Cys}-^{13}\text{Cys}$; homologiczne frakcje relaksyny (II – CMa'; III – CMA; IV – CMB) różnią się długością łańcucha B (CMa' – B₃₁, CMA – B₂₉; CMB – B₂₈); ich masa cząsteczkowa wynosi ok. 6 kDa, a punkt izoelektryczny od pH 10,6–10,8; frakcje wykazują 2,5–3 razy większą aktywność biologiczną w porównaniu do światowego standardu relaksyny (Warner-Lambert Porcine Relaxin Reference Standard W 1164, 48E-2103a); aktywność biologiczną różnych frakcji relaksyny można testować, badając po ich podaniu, zmiany długości spojenia łonowego myszy [117]

Ciała żółte świń z okresu późnej ciąży są głównym źródłem, z którego ekstrahowana jest relaksyna (ok. 34–38 mg z kg tkanki lutealnej), służąca do badań jej budowy oraz fizjologicznej roli również u innych gatunków (np. u człowieka, bydła i szczerów) [110].

Relaksyna jest peptydem o masie cząsteczkowej 6,3 kDa składającym się z łańcucha A i B, które zawierają odpowiednio 22 i 32 aminokwasy. Oba łańcuchy połączone są wiązaniami kowalencyjnymi poprzez dwa mostki disiarczkowe. Trzecie wiązanie disiarczkowe występuje w łańcuchu A [61, 104]. Różnice gatunkowe budowy i biologicznego działania relaksyny są słabo zaznaczone [115]. W badaniach stosuje się powszechnie jedną z trzech frakcji relaksyny, izolowanej z ciała żółtego ciężarnej

świni, oznaczonych jako: CMa', CMa, CMB. Frakcje różnią się między sobą długością łańcucha B i wielkością punktu izoelektrycznego, ale mają identyczne działanie biologiczne i właściwości immunologiczne [86]. Budowę natywnego hormonu i trzech homologicznych frakcji relaksyny przedstawiono schematycznie na rysunku 1.

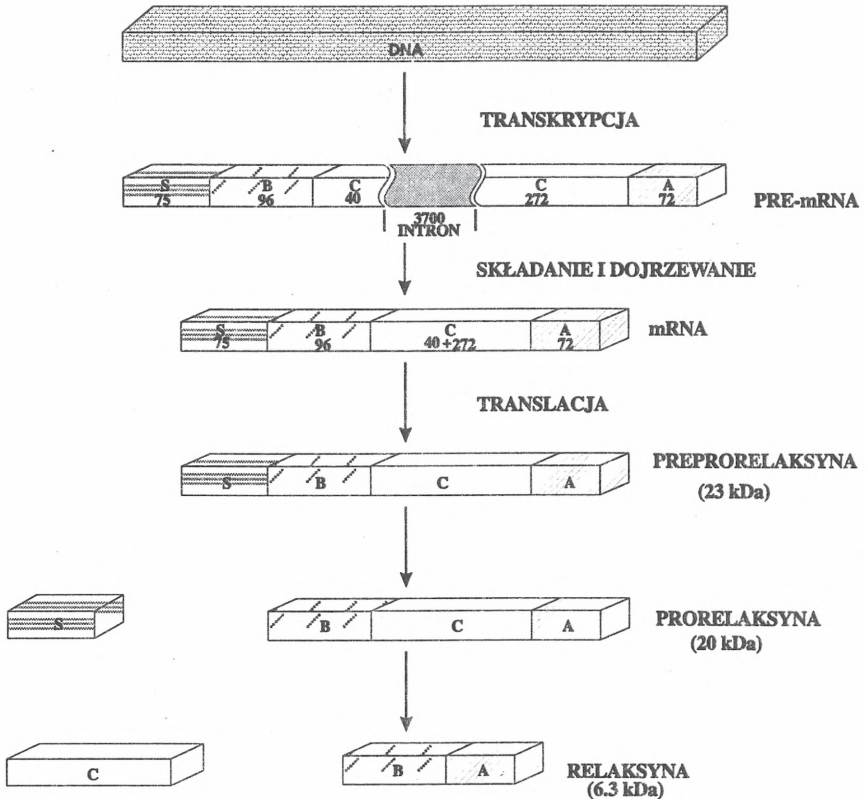
Cząsteczka relaksyny ma budowę homologiczną do cząsteczki insuliny i czynników insulino-podobnych (IGF-I, IGF-II) zarówno pod względem długości łańcuchów, jak i ułożenia mostków disiarczkowych [105]. U gatunków niżej zorganizowanych relaksyna i insulina powstały w wyniku duplikacji tego samego genu związanego z tym samym chromosomem [115]. W toku ewolucji, w wyniku chromosomalnej translokacji doszło do rozdzielenia tych dwóch genów. Stąd u ssaków gen kodujący powstanie insuliny zlokalizowany jest w chromosomie 11, relaksyny zaś w chromosomie 9. U naczelnych gen pierwotny kodujący syntezę relaksyny uległ duplikacji, dlatego też np. u człowieka zidentyfikowano dwa geny H1 i H2. Ekspresja genu H2 zachodzi w jajnikach podczas ciąży, natomiast sugeruje się, że gen H1 może kodować syntezę relaksyny w innych narządach (łożysko, błona doczesnowa, prostata). U innych gatunków ssaków nie wystąpiła duplikacja genu relaksyny, a jego struktura u świni i gryzoni odpowiada strukturze genu H1 u naczelnych [115].

Relaksyna i insulina, należące do tej samej rodziny hormonów [20, 105], wykazują tylko 25% sekwencji aminokwasów wspólnych dla obu cząsteczek [59]. Determinanty antygenowe relaksyny i insuliny nie są homologiczne. Relaksyna nie wiąże się z receptorami insulinowymi, receptorami insulino-podobnego czynnika wzrostu (IGF-I), ani przeciwciałami insulinowymi [87]. Również insulina nie wykazuje powinowactwa do przeciwciał relaksynowych [48, 100].

Cząsteczka relaksyny nie zawiera tyrozyny i histydyny – aminokwasów, do których przyłączają się atomy radioaktywnego jodu (^{125}J) w czasie znakowania hormonu, dlatego do oznaczeń radioimmunologicznych używa się homologicznego koniugatu N α A1formyl tyrosyl relaksynę [107, 111]. Preparat ten otrzymywany jest w drodze modyfikacji łańcucha A cząsteczki relaksyny; zachowuje on właściwości immunologiczne i biologiczne natywnego hormonu.

Wyniki badań, w których stosowano modyfikacje różnych aminokwasów w łańcuchu A cząsteczki relaksyny, wskazują, iż zmiany w obrębie argininy powodują niemalże całkowite zniesienie aktywności biologicznej hormonu. Przypuszcza się, że arginina bierze udział w interakcji relaksyny ze swoim receptorem molekularnym [8, 108].

Biologiczna synteza relaksyny przebiega w kilku etapach [44]. Pierwszym produktem translacji mRNA jest pojedynczy łańcuch prekursorowy (pre-pro-relaksyna m. cz. 23 kDa), w którym występuje peptyd łączący położony pomiędzy C-końcowym fragmentem łańcucha B i N-końcowym fragmentem łańcucha A. Dodatkowo do N-końcowego fragmentu łańcucha B przylega peptyd sygnałowy (peptyd S). W drugim etapie odłączany jest peptyd sygnałowy i powstaje prorelaksyna (m. cz. 20 kDa). Po odłączeniu zaś łańcucha 104 aminokwasów, czyli peptydu łączącego, powstaje cząsteczka immunoreaktywnej relaksyny (m. cz. 6,3 kDa). Budowę pre-mRNA i przebieg potranslacyjnej przemiany preprohormonu przedstawiono schematycznie na rysunku 2.



Rys. 2. Schemat ilustrujący przepływ informacji z genomowego DNA relaksyny, powstanie preprorelaksyny i jej potranslacyjne przemiany: liczby 75, 96, 40, 272, 72 oznaczają liczbę par zasad pre-mRNA i mRNA; symbole: S – peptyd sygnałowy, B – łańcuch B cząsteczki relaksyny, C – peptyd łączący, A – łańcuch A cząsteczki relaksyny

II. SEKRECJA I ROLA RELAKSYNY PODCZAS CYKLU RUJOWEGO, CIĄŻY, PORODU I LAKTACJI

Cykl rujowy – faza pęcherzykowa

Odkrycie w 1980 roku przez Bryant-Greenwood immunoreaktywnej relaksyny zarówno w płynie pęcherzyków jajnikowych świni, jak i w ścianie pęcherzyka sugerowało lokalną biosyntezę i możliwość oddziaływania biologicznego tego peptydu w pęcherzyku jajnikowym [21,75]. Sugestie te zostały potwierdzone przez wyniki badań immunocytochemicznych u różnych gatunków, jak i w warunkach *in vitro*, w których hodowano komórki pęcherzyka jajnikowego [10, 21, 34]. Głównym miejscem syntezy relaksyny w rosnących pęcherzykach jajnikowych świń, aż do fazy pęcherzyka przedowulacyjnego, są komórki osłonki wewnętrznej. Stosując analizę

Northern blot i hybrydyzację *in situ* wykazano, że ekspresja genu relaksyny odbywa się w komórkach osłonki wewnętrznej, a nie w komórkach warstwy ziarnistej podczas wzrostu pęcherzyka aż do fazy przedowulacyjnej [13]. Również rozmieszczenie i odpowiednia koncentracja mRNA relaksyny w komórkach tekalnych skorelowana jest z produkcją relaksyny *in vitro* [10, 15, 34]. Z kolei komórki warstwy ziarnistej rozpoczynają biosyntezę relaksyny wtedy, gdy pęcherzyk przedowulacyjny poddany będzie wpływom hormonu luteinizującego. W warunkach *in vitro* komórki warstwy ziarnistej z dużych pęcherzyków jajnikowych świń wykazywały obecność niewielkich ilości mRNA relaksyny oraz produkowały ten hormon po dodaniu LH do hodowli komórek [33, 74]. Relaksyna występuje w ulegających luteinizacji komórkach ziarnistych przedowulacyjnego pęcherzyka kobiet [42, 138] i świń [11]. Tak więc luteinizacja komórek warstwy ziarnistej, wywołana przedowulacyjnym wyrzutem LH, jest niezbędna do aktywacji ekspresji genu relaksyny w tych komórkach i do jej produkcji. Podsumowując, pochodzenie relaksyny w pęcherzyku jajnikowym jest zróżnicowane i zależne od stopnia dojrzałości pęcherzyka jajnikowego: komórki tekalne syntetyzują relaksynę w okresie wzrostu i rozwoju pęcherzyka, a komórki warstwy ziarnistej produkują peptyd w okresie okołowulacyjnym.

Podczas fazy pęcherzykowej cyklu rujowego relaksyna pobudza wzrost i rozwój pęcherzyków jajnikowych [16, 22]. Bierze udział także w procesie owulacji. Mechanizm działania relaksyny w tej fazie polega na stymulowaniu proliferacji komórek ścianki pęcherzyka jajnikowego oraz na jej degradacyjnym wpływie na tkankę łączną [15]. Relaksyna produkowana przez komórki osłonki wewnętrznej lokalnie oddziałuje na te same komórki (funkcja autokrynnna) oraz na sąsiadujące komórki warstwy ziarnistej i komórki osłonki zewnętrznej (funkcja parakrynnna). Autokrynnne działanie relaksyny pobudza proliferację komórek osłonki wewnętrznej. Efektem działania parakrynnego relaksyny na komórki warstwy ziarnistej może być także wzmocnienie podziału tych komórek. Zwiększoną, zależną od dawki peptydu, proliferację komórek ziarnistych pobranych z małych pęcherzyków jajnikowych świń, wykazano w warunkach *in vitro* [139, 141]. Wzrost ten był skorelowany ze zwiększeniem włączania ³H-tymidyny w łańcuch DNA w komórkach granulocy. Relaksyna pobudzała również syntezę DNA w komórkach ziarnistych pochodzących ze średnich i dużych pęcherzyków jajnikowych świń [139, 141].

Wpływ relaksyny na tkankę łączną może być bezpośredni – na włókna kolagenu występujące w osłonce zewnętrznej i osłonce białawej lub pośredni przez aktywację enzymów zawartych w komórkach warstwy ziarnistej (funkcja parakrynnna), które rozluźniają włókna kolagenu [16, 22]. Pobudzenie przez relaksynę występującego w komórkach warstwy ziarnistej aktywatora plazminogenu (PA), przekształca plazminogen w plazminę. Plazmina aktywuje z kolei kolagenazę, która degraduje włókna kolagenu obecne w ścianie pęcherzyka jajnikowego. Aktywność PA zwiększa się trzykrotnie w komórkach warstwy ziarnistej pochodzących z dużych pęcherzyków jajnikowych i hodowanych w warunkach *in vitro* w ciągu 24 h [15]. Dodanie FSH w połączeniu z relaksyną do medium inkubacyjnego wzmaga aktywność PA w komór-

kach ziarnistych, pobranych zarówno z małych jak i dużych pęcherzyków. Ta właściwość wykorzystywana jest podczas wzrostu i rozwoju pęcherzyka oraz jego owulacji [93].

Podsumowując, relaksyna podczas fazy pęcherzykowej cyklu pobudzając proliferację komórek warstwy ziarnistej i komórek tekalnych umożliwia wzrost i rozwój pęcherzyków jajnikowych. Ponadto, relaksyna bierze udział w przemodelowaniu ściany pęcherzyka jajnikowego, wzmagając degradację włókien kolagenu zarówno w czasie wzrostu pęcherzyka, jak i w okresie przedowulacyjnym. Pobudzenie syntezy relaksyny przed owulacją umożliwia przygotowanie ścianki pęcherzyka do owulacji, a więc relaksyna pośrednio warunkuje czas i przebieg owulacji [93]. Jednakże do tej pory brak wyników badań dotyczących receptorów relaksynowych w pęcherzyku jajnikowym.

Cykl rujowy – faza lutealna

Obecność relaksyny w komórkach tworzącego się ciałka żółtego świni wykazano przy użyciu metody immunocytochemicznej [3, 11, 29, 40]. Badano również ekspresję genu relaksyny w komórkach lutealnych w różnych dniach cyklu rujowego [12]. Koncentracja relaksyny w ciałku żółtym jest bardzo mała do 3 dnia cyklu i wzrasta stopniowo od 7 dnia, osiągając maksymalne stężenie między 11 a 15 dniem cyklu rujowego, wynoszące 1–3 $\mu\text{g/g}$ tkanki lutealnej [3]. Po 15 dniu cyklu stężenie relaksyny w komórkach lutealnych stopniowo obniża się, a niewielkie ilości hormonu obserwowano jeszcze 18 dnia cyklu. Między 19 i 21 dniem cyklu relaksyna nie występuje w tkance lutealnej [3, 11, 29]. Tak więc cykliczne ciałko żółte świni produkuje relaksynę w rosnących koncentracjach w miarę swojego rozwoju, ale produkcja hormonu zanika, gdy ciałko żółte ulega regresji. Dla porównania zawartość hormonu podczas późnej ciąży jest wielokrotnie większa (300 $\mu\text{g/g}$ tkanki lutealnej) [11, 29, 40].

Badając populacje małych i dużych komórek lutealnych izolowanych z ciałka żółtego świni wykazano, że zmienia się nie tylko ilość syntetyzowanego hormonu, ale również miejsce jego biosyntezy. W czasie formowania się ciałka żółtego (wczesna faza lutealna) synteza relaksyny odbywa się w małych komórkach lutealnych pochodzenia tekalnego. W rozwiniętym ciałku żółtym (środkowa faza lutealna) następuje zmiana miejsca biosyntezy hormonu z małych komórek na duże komórki lutealne (pochodzące z komórek warstwy ziarnistej). Takie “przełączenie” obserwowano między 11 a 14 dniem cyklu i towarzyszył mu wzrost intensywności produkcji relaksyny [29]. Jednakże czynniki warunkujące rozpoczęcie biosyntezy relaksyny w dużych komórkach lutealnych są nieznane. Brak regresji ciałka żółtego powodował dodatkowe nasilenie syntezy relaksyny w dużych komórkach lutealnych.

Ekspresja genu relaksyny w cyklicznym ciałku żółtym narasta wraz z jego rozwojem i jest równoległa do zmian stężenia hormonu podczas cyklu rujowego [12]. Spadek ilości mRNA relaksyny obserwowano w czasie, gdy ciałko żółte ulegało regresji. Ponadto, stwierdzono, że produkt transkrypcji genu relaksyny do około 9 dnia cyklu rujowego był związany z małymi komórkami lutealnymi. Po tym okresie

(od 10 dnia) mRNA relaksyny wystąpiło po raz pierwszy w dużych komórkach lutealnych [17]. Podsumowując, wykazano, że wyłącznie małe komórki lutealne syntetyzują relaksynę w młodym ciałku żółtym. Tak więc komórki tekalne utrzymują swoją zdolność do ekspresji genu relaksyny w czasie luteinizacji. Z kolei ulegające luteinizacji komórki warstwy ziarnistej, które przekształcają się w duże komórki lutealne, tracą zdolność do syntezy relaksyny we wczesnej fazie lutealnej, a uzyskują ją w środkowej fazie lutealnej. Właściwość ta wiąże się z gwałtownym wzrostem stężenia relaksyny w tkance lutealnej.

Badania sekrecji relaksyny u świń są nieliczne. Wyniki doświadczeń Messine i wsp. [78], opracowane jedynie w formie komunikatu, wskazują na wzrost koncentracji relaksyny we krwi obwodowej wraz z rozwojem ciała żółtego u świń. Stężenie hormonu wahało się od około 0,1 ng/ml szóstego dnia cyklu do około 0,6 ng/ml 15–16 dnia cyklu. Po luteolizie nie wykrywano relaksyny we krwi obwodowej. W innych badaniach wykazano, że sekrecja relaksyny w czasie późnej fazy lutealnej u świń przebiegała w sposób podobny do sekrecji progesteronu [69]. Koncentracja relaksyny we krwi żyły maciczo-jajnikowej była skorelowana z poziomem progesteronu i czasem luteolizy. Stwierdzono, że średnie stężenie relaksyny było wyższe w żyłę maciczo-jajnikowej ($1,6 \pm 0,07$ ng/ml) w porównaniu z koncentracją hormonu w żyłę szyjnej zewnętrznej ($0,6 \pm 0,1$ ng/ml). Potwierdza to jajnikowe pochodzenie relaksyny. Stężenie hormonu w obu naczyniach obniżało się pomiędzy 14 a 17 dniem cyklu. Przypuszcza się, że relaksyna łącznie z progesteronem w czasie fazy lutealnej cyklu rujowego świń hamuje spontaniczne skurcze mięśniówki macicy [31] oraz pobudza wzrost śluzówki macicy [43]. Sugeruje się również możliwość działania relaksyny na rozwój ciała żółtego, ale nie ma bezpośrednich dowodów na to, iż relaksyna pobudza proliferację komórek lutealnych. Być może angiogeniczne właściwości relaksyny są wykorzystywane podczas wzrostu ciała żółtego [128].

Ostatnio odkryto, że również śluzówka macicy świń może być miejscem lokalnej biosyntezy relaksyny [2, 140]. Wskazuje to na szczególne znaczenie hormonu w rozwoju tej tkanki. Stwierdzono ekspresję genu relaksyny w śluzówce macicy między 10 a 20 dniem cyklu [68].

Regulacja sekrecji relaksyny podczas fazy lutealnej cyklu rujowego jest nieznana. Badano jedynie wpływ prostaglandyny $F_{2\alpha}$ ($PGF_{2\alpha}$) na wydzielanie relaksyny, używając zróżnicowane wyniki w zależności od dawki i sposobu podania $PGF_{2\alpha}$. Wykazano, iż iniekcje $PGF_{2\alpha}$ 13–15 dnia cyklu rujowego do tętnicy jajnikowej w ilości 100 μ g nie uwalniały relaksyny z ciała żółtego [14]. Jednakże domięśniowa, luteolityczna dawka analogu $PGF_{2\alpha}$ (Estrumate, 500 μ g) spowodowała krótkotrwały (20 min) wzrost stężenia relaksyny w żyłę maciczo-jajnikowej świń 13 dnia cyklu rujowego [70]. Dalszych badań wymaga wyjaśnienie regulacji sekrecji relaksyny oraz jej powiązania z oksytocyną jajnikową i hormonami steroidowymi podczas cyklu rujowego świń.

Ciąża i poród

Podczas ciąży i porodu u różnych gatunków samic relaksyna wykazuje szeroki zakres oddziaływania fizjologicznego, a jej biosynteza i sekrecja w tym okresie jest gatunkowo zróżnicowana (tab. 1).

Świnie – ciąża

Głównym źródłem i miejscem akumulowania biologicznie aktywnej relaksyny u świń jest ciało żółte ciążowe [29]. Tkanka lutealna syntetyzuje relaksynę podczas całej ciąży, a granule sekrecyjne będące miejscem magazynowania peptydu są dobrze widoczne w tym okresie [6, 18, 40, 64]. Wykazano także, iż nabłonek powierzchniowy błony śluzowej macicy podczas wczesnej ciąży (do około 42 dnia) może syntetyzować relaksynę, ale w mniejszej koncentracji niż ciało żółte [68]. Obecność zarodków w rogach macicy ciężarnej świni w okresie między 12 a 14 dniem ciąży powoduje gwałtowny wzrost syntezy relaksyny w ciałku żółtym [29]. Heap i wsp. [53] sugerują, że estrogeny produkowane i wydzielane przez blastocystę mogą przyczynić się do zwiększenia biosyntezy tego peptydu. Koncentracja relaksyny w ciałku żółtym świń, niska podczas pierwszych dni ciąży, wzrasta około stukrotnie, osiągając maksymalne wartości (300 µg/g tkanki lutealnej) w czasie późnej ciąży (105–110 dzień). Zmiany stężenia relaksyny w tkance lutealnej są równoległe do danych o ekspresji genu relaksyny. Niskie stężenie mRNA relaksyny w ciałku żółtym świni w fazie lutealnej cyklu rujowego wzrasta w czasie ciąży [12]. Dla przykładu ilość mRNA relaksyny w tkance lutealnej 40 dnia ciąży przewyższała 50-krotnie wartości obserwowane 13 dnia cyklu rujowego [12]. Ekspresja genu relaksyny wzrasta 16 dnia ciąży i utrzymuje się na maksymalnym poziomie do 65 dnia [73]. Wiadomo, że wzrost ekspresji genu wiąże się z procesem translacji, powstaniem prekursorowego białka i objawia się dramatycznym wzrostem zawartości immunoreaktywnej relaksyny w ciążowym ciałku żółtym [29].

Stężenie relaksyny we krwi obwodowej ciężarnych świń zmienia się w zależności od stopnia zaawansowania ciąży [112]. Obserwowano niskie koncentracje hormonu (2 ng/ml) w czasie pierwszych 100 dni ciąży i stopniowy wzrost poziomu peptydu do około 12 ng/ml na 3 dni przed porodem. Gwałtowne zwiększenie stężenia relaksyny wynoszące 145–200 ng/ml wystąpiło około 14 h przed porodem. Maksymalnym wyrzutem relaksyny towarzyszył wzrost stężenia prolaktyny i gwałtowny spadek poziomu progesteronu [114, 123].

Czynnikami, które mogą pobudzać syntezę relaksyny i synchroniczne wydzielanie relaksyny i progesteronu z tkanki lutealnej podczas ciąży, mogą być LH, prolaktyna i IGF-I [7, 37, 54, 72, 113, 125, 134].

Rola relaksyny podczas ciąży u świń jest wielostronna [116]. Gwałtowny wzrost ekspresji genu relaksyny i biosyntezy hormonu w okresie 12–14 dnia po zapłodnieniu oraz sugerowany stymulujący wpływ estrogenów blastocysty na produkcję relaksyny wskazują, że relaksyna łącznie z estrogenami zarodkowymi może uczestniczyć w procesie matczynego rozpoznania ciąży i ochronie ciałka żółtego przed luteolizą.

Jednakże brakuje bezpośrednich dowodów na takie działanie relaksyny, a iniekcje relaksyny w dniach od 6 do 11 po zapłodnieniu loszek, nie spowodowały zmian w sekrecji czynnika luteolitycznego ($\text{PGF}_{2\alpha}$) u badanych zwierząt [43].

We wczesnej ciąży u świń relaksyna może zwiększać objętość, masę i obwód macicy [43]. Egzogenna relaksyna (0,5 mg podawana co 6 h od 6 do 11 dnia po zapłodnieniu) powodowała wzrost macicy. Pod wpływem relaksyny wystąpiło zwiększone zatrzymywanie H_2O przez komórki macicy, ale nie obserwowano proliferacji komórek. Hypertroficzne oddziaływanie relaksyny na macicę wzmagane jest przez estrogeny, które mogą pobudzać koncentrację receptorów relaksynowych w macicy [50, 77]. Relaksyna lokalnie produkowana w śluzówce macicy uczestniczy nie tylko w powiększaniu rozmiarów macicy, ale współdziałając z estrogenami wydzielanymi przez zarodki, ułatwia proces zagnieżdżenia i wytworzenia łożyska [68].

Kolejne znaczenie fizjologiczne relaksyny dotyczy jej udziału w hamowaniu aktywności skurczowej mięśni gładkich macicy ciężarnych świń [95]. Relaksyna w ten sposób zapobiega przedwczesnemu porodowi. Ta funkcja relaksyny nabiera szczególnego znaczenia w okresie przedporodowym podczas spadku poziomu progesteronu, wówczas gdy mięśniówka macicy może kurczyć się spontanicznie. Relaksyna obniża częstotliwość skurczów, nie wpływając na ich amplitudę [96]. W warunkach *in vitro* relaksyna hamowała spontaniczne skurcze mięśniówki ciężarnych świń, ale nie zapobiegała skurczom wywołanym przez oksytocynę, prostaglandynę E_2 i $\text{F}_{2\alpha}$ [99].

Podczas ciąży występuje też oddziaływanie relaksyny na gruczoł mlekowy [16]. Hormon pobudza wzrost gruczołu, rozluźnia włókna kolagenowe tkanki łącznej oraz powoduje wzrost zawartości H_2O . U owariektomizowanych, ciężarnych świń, u których ciążę utrzymywano podając egzogenny progesteron, relaksyna stymulowała syntezę DNA gruczołu mlekowego, wpływała na wzrost zrazikowo-pęcherzykowy, natomiast ograniczała rozwój wyściółki tłuszczowej [57].

Podobne oddziaływanie relaksyny na gruczoł mlekowy synergistyczne z estradiolem i progesteronem stwierdzono u ciężarnych loszek [57, 68, 137]. Hall i wsp. [49] wykazali uterotropowy wpływ relaksyny polegający na zwiększeniu zawartości H_2O , białka i DNA podczas rozwoju macicy również u niedojrzałych płciowo loszek. Vasilenko [128] sugeruje, że zmiany w obrębie macicy stymulowane są wzrostem unaczynienia narządu i w konsekwencji zwiększeniem przepływu krwi, co umożliwiłoby lepsze odżywienie narządu.

Świnie – poród

Dynamiczne zmiany stężenia relaksyny we krwi obwodowej pojawiają się na 1–2 dni przed porodem. Występują wtedy 2 lub 3 wyrzuty hormonu, trwające 10–20 h i osiągające wartości 60–250 ng/ml [66, 114]. W dniu porodu koncentracja hormonu we krwi żyły maciczno-jajnikowej waha się od 10–50 ng/ml, a obniża się stopniowo w miarę wydalania kolejnych płodów [123]. Pierwszego dnia po porodzie koncentracja hormonu jest bardzo niska (1 ng/ml). Wyrzutem relaksyny towarzyszy wzrost sekrecji estradiolu i prolaktyny oraz obniżające się stężenie progesteronu [65, 66, 123]. Podczas spontanicznego porodu u świń wykazano asynchroniczną sekrecję relaksyny

i progesteronu z ciałek żółtych [123]. Uważa się, że występowanie przedporodowych wyrzutów relaksyny jest precyzyjnie określone, niezależne od kontroli płodu lub macicy [36]. Jednakże wielkość i czas trwania tych wyrzutów mogą być zwiększane pod wpływem LH, prolaktyny i IGF-I [35, 37, 54].

Wykazano, że u świń relaksyna może regulować szybkość przebiegu porodu dzięki hamującemu działaniu na aktywność motoryczną mięśniówki macicy [131]. Funkcja unieruchamiania macicy przez relaksynę odgrywa ważną rolę w okresie okołoporodowym, kiedy rozpoczyna się obniżanie stężenia progesteronu we krwi, ale akcja porodowa jeszcze się nie rozpoczęła [131]. Stwierdzono, że u świń, u których obserwowano wyższą amplitudę okołoporodowych wyrzutów relaksyny, przerwy między wydalaniem poszczególnych płodów były dłuższe [130]. Nie spowodowało to jednak obniżenia przeżywalności noworodków. U szczurów wykazano, że relaksyna może zapobiegać przedwczesnemu uwalnianiu oksytocyny z nerwowej części przysadki [124]. Jednakże nie ma dowodów na podobne oddziaływania relaksyny u świń. Zastosowanie egzogennej relaksyny w okresie okołoporodowym u świń dało odmienne, do cytowanych wyżej, wyniki. Podanie domięśniowo 600 U/dzień relaksyny lochom 107 lub 109 dnia ciąży powodowało przedwczesne rozluźnienie szyjki macicy, skrócenie czasu od początku akcji porodowej do urodzenia pierwszego noworodka, zmniejszenie czasu trwania porodu wszystkich noworodków. Nie obserwowano obniżenia stężenia progesteronu po egzogennej relaksynie [67].

Krowy – ciąża i poród

Źródłem relaksyny podczas ciąży u krów są duże komórki lutealne ciała żółtego oraz łożysko (tab. 1). Koncentracja relaksyny we krwi obwodowej wzrasta w pierwszych dniach ciąży i utrzymuje się na tym samym poziomie ($<0,2$ ng/ml) do okresu późnej ciąży. Jeden dzień przed porodem stężenie relaksyny wynosi 0,2 ng/ml, a w dniu porodu 0,8 ng/ml. W ciągu kilku dni po porodzie stężenie relaksyny znacznie się obniża [5, 9, 38, 79, 80, 81, 82, 115]. Nie ma danych wskazujących na obecność granul sekrecyjnych zawierających relaksynę w tkance lutealnej krów, a ekstrakty tej tkanki zawierały niskie ilości relaksyny [5, 38]. Łožysko u krów produkuje również niewielkie ilości relaksyny [5, 38].

Wskazuje się na różne możliwości zastosowania relaksyny w okresie okołoporodowym u krów w celu ułatwienia przebiegu porodu i profilaktycznie dla zapobieżenia komplikacjom poporodowym [79]. Farmakologiczne dawki relaksyny (3000 U, co odpowiada 1 mg relaksyny) podawane domięśniowo lub do szyjki macicy, 5 dni przed spontanicznym porodem, powodowały podwyższenie stężenia hormonu we krwi obwodowej jałówek do 21 ng/ml w ciągu 1 h po podaniu. Wysokie stężenie, przekraczające 40-krotnie poziom endogennej relaksyny, utrzymywało się kilka godzin. W tym samym czasie, u zwierząt kontrolnych stężenie hormonu nie przekraczało 0,5 ng/ml. U jałówek otrzymujących relaksynę obserwowano przyspieszenie porodu o 3 dni, nie występowało zatrzymanie łożyska i inne komplikacje poporodowe. Obserwowano rozszerzenie szyjki macicy i rozluźnienie spojenia łonowego [79]. Profile progesteronu i estrogenów były podobne, jak w czasie porodu spontanicznego. Z kolei podanie farmakologicznej dawki relaksyny łącznie z analogiem $\text{PGF}_{2\alpha}$ i deksameta-

zonem na 10 dni przed spodziewanym porodem spowodowało u jałówek spadek sekrecji progesteronu w ciągu 90 min [80]. Towarzyszył temu wzrost biosyntezy estrogenów w łożysku. Również dwie domięśniowe iniekcje relaksyny przed spontanicznym porodem przyspieszały czas wycielenia, powodowały spadek progesteronu, rozluźnienie spojenia łożowego i dróg rodnych i nie obserwowano komplikacji poporodowych [9].

Należy jednak zaznaczyć, że dawka egzogennej relaksyny może nie mieć wpływu na przyspieszenie i ułatwienie porodu. Wyniki badań Caldwell'a [27] wskazują, że niższe dawki relaksyny, powodujące 15-krotne podwyższenie stężenia hormonu we krwi nie wywołują pozytywnych zmian w przebiegu porodu. Dopiero dawki, które 40-krotnie podwyższają stężenie hormonu, mają wpływ pozytywny.

Owce

Niskie stężenie immunoreaktywnej relaksyny znaleziono w łożysku, śluzówce macicy i tkance lutealnej (0,05–11,00 ng/g tkanki lutealnej) owiec od 21 dnia ciąży do momentu porodu [102, 129]. Nie obserwowano drastycznych zmian stężenia relaksyny w czasie ciąży. Do 149 dnia wynosiło ono około 0,2 ng/ml. Najwyższe koncentracje hormonu (0,6–3,9 ng/ml) występowały 4–5 dni przed porodem (149–150 dnia ciąży), a więc przedporodowe wyrzuty relaksyny pojawiały się wcześniej niż u świń, krów i kłaczy. Cztery dni przed porodem i w dniu porodu poziom relaksyny był niski (0,5 ng/ml) i towarzyszyło mu obniżenie produkcji progesteronu [45].

Klacz

U kłaczy głównym i prawdopodobnie jedynym źródłem relaksyny jest łożysko, jednakże nie magazynuje ono relaksyny tak jak ciało żółte świń [120, 121]. Stężenie relaksyny we krwi obwodowej kłaczy wynosiło poniżej 10 ng/ml w ciągu pierwszych 80 dni ciąży i wzrastało do 50–80 ng/ml pomiędzy 150–180 dniem ciąży. Obniżenie stężenia relaksyny występuje ponownie w ciągu kolejnych 60 dni ciąży, a wzrost, do 60–100 ng/ml, tuż przed wyżrebieniem. Wyrzut relaksyny ma miejsce tuż przed porodem, osiąga wartość maksymalną krótko po porodzie i spada w czasie odejścia łożyska [119].

Laktacja

Dane u szczuryc w okresie laktacji wskazują, że relaksyna może wpływać na funkcje podwzgórza i przysadki mózgowej. W czasie późnej ciąży i w okresie laktacji u szczuryc relaksyna hamowała uwalnianie OT prawdopodobnie poprzez system endogennych opioidów [62, 85, 132]. Jednakże wyniki prac dotyczących wpływu relaksyny na przebieg laktacji u świń i krów dostarczają odmiennych danych. W czasie laktacji u świń dożylnie iniekcje relaksyny (1,5–3 ng) nie powodowały zmian w ilości uwalnianej OT w czasie ssania [56]. Podobnie, nie obserwowano zmian w koncentracji relaksyny po iniekcjach OT oraz w czasie ssania. Nie wiadomo, czy u świń relaksyna wydzielana jest podczas laktacji. Obserwowano bowiem niskie stężenie, albo w ogóle brak relaksyny we krwi loch w tym okresie [66, 97, 98]. Biorąc pod

uwagę fakt, że głównym źródłem relaksyny u świń jest ciało żółte, to po porodzie zawiera ono bardzo małe ilości relaksyny [4, 66]. Wykazano też, że metabolizm relaksyny w czasie laktacji jest bardzo aktywny, a półokres trwania hormonu wynosi w tym czasie 20 s [133], podczas gdy dla relaksyny świń nie będących w okresie laktacji – 60 minut [114]. Istnieją przesłanki, że u świń po porodzie źródłem relaksyny może być macica [2]. Podobne wątpliwości dotyczą syntezy i roli relaksyny podczas laktacji u krów, u których obserwuje się małą zawartość relaksyny w ciałku żółtym w okresie późnej ciąży [38]. Brak również danych o granulach sekrecyjnych u krów w okresie laktacji.

III. WPŁYW RELAKSYNY NA SZYJKĘ MACICY, SPOJENIE ŁONOWE I MIĘŚNIÓWKĘ MACICY

WPŁYW NA SZYJKĘ MACICY I SPOJENIE ŁONOWE

Szyjka macicy świń zawiera receptory dla relaksyny [77], a przedporodowe wyrzuty relaksyny powodują wzrost rozluźnienia szyjki macicy i tkanki łącznej spojenia łonowego [51, 115]. Towarzyszy temu wzrost zawartości H_2O i depolimeryzacja glikoproteidów [67]. U krów podanie relaksyny do szyjki macicy 276 lub 278 dnia ciąży powoduje jej rozluźnienie w ciągu 8–12 godzin po iniekcji [79].

Molekularny mechanizm zmian pod wpływem relaksyny, obserwowanych w szyjce macicy i spojeniu łonowym związany jest z kolagenem i proteoglikanami tkanki łącznej. Wykazano wpływ relaksyny na 3 enzymy, które mogą zmieniać właściwości tkanki łącznej. Stwierdzono, że relaksyna wraz z LH/FSH aktywuje aktywator plazminogenu (PA), kolagenazę, proteoglikanazę – enzymy oddziałujące na plazminogen i przekształcające go w plazminę. Plazmina aktywuje kolagenazę, która powoduje degradację kolagenu [136]. U kobiet obserwuje się zwiększenie koncentracji cAMP w szyjce macicy po inkubacji jej skrawków z relaksyną oraz hamowanie włączania 3H -proliny do komórek szyjki macicy [83]. Wiadomo, że receptory relaksyny są obecne w tkance łącznej szyjki macicy, a w oddziaływaniu relaksyny z receptorami pośredniczy kinaza białkowa zależna od cAMP [30, 55]. Następujące pod koniec ciąży przerwanie zrębu włókien kolagenowych szyjki macicy jest rezultatem zmian w metabolizmie kolagenu. Obserwuje się wzrost zawartości wody i kwasu hialuronidowego w szyjce macicy po iniekcji relaksyny. Elastyczność i rozszerzalność szyjki macicy jest rezultatem rozluźnienia struktury kolagenu oraz połączeń dermatyny i siarczanu chondroityny [58]. Oddziaływanie relaksyny na włókna kolagenowe szyjki macicy i spojenia łonowego odbywa się więc poprzez dezintegrację kolagenu i proteoglikanów [94, 95, 106, 128].

WPLYW NA MIĘŚNIÓWKĘ MACICY

Wiadomo, że relaksyna jest również regulatorem aktywności skurczowej mięśniówki macicy w czasie cyklu rujowego i ciąży [31]. Znany jest molekularny mechanizm hamowania skurczów mięśniówki macicy przez relaksynę. Może on przebiegać dwiema drogami:

➤ Połączenie relaksyny ze swoistym receptorem błonowym powoduje wzrost cAMP, który jest drugim przekaźnikiem wewnątrzkomórkowym i przyczynia się do aktywacji kinazy białkowej A. Enzym ten katalizuje fosforylację podjednostki enzymu kinazy łańcuchów lekkich miozyny (MLCK). Fosforylacja MLCK redukuje połączenie kompleksu MLCK-Ca-kalmodulina, powstaje nieaktywny kompleks MLCK-P, spada aktywność ATP-azy aktomiozynowej, co prowadzi do relaksacji macicy [30].

➤ Otwarcie kanałów K^+ (hiperpolaryzacja), zamknięcie kanałów Ca^{+2} , zmniejszenie stężenia Ca^{+2} , akumulacja difosfoinozytolu i trifosfoinozytolu [30].

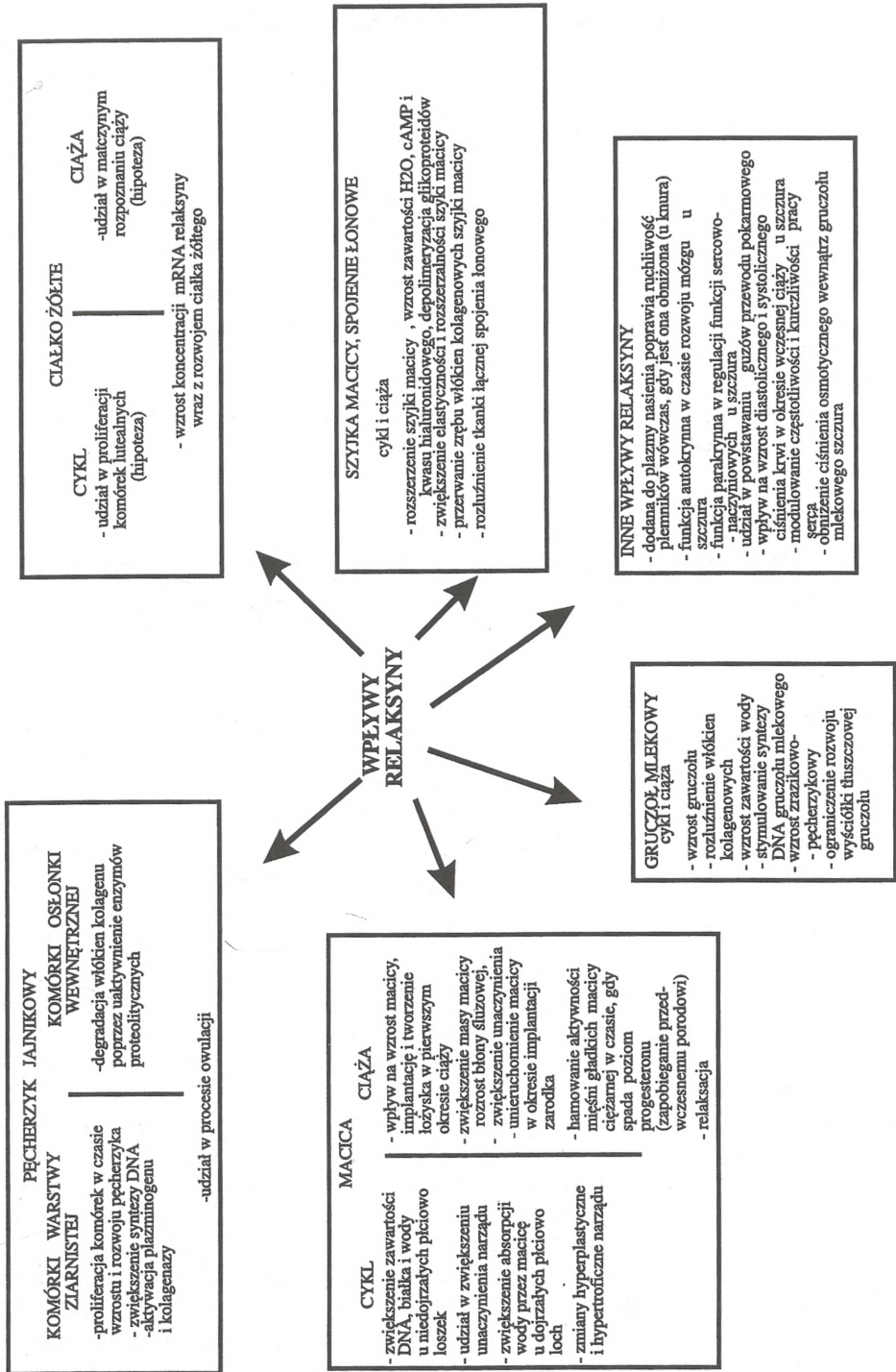
IV. FIZJOLOGICZNE ZNACZENIE RELAKSYNY NIE ZWIĄZANE Z UKŁADEM ROZRODCZYM

W ostatnich latach wykazano, że fizjologiczna rola relaksyny wiąże się nie tylko z układem rozrodczym. Istnieją dowody, że relaksyna może być produkowana również w prostatie u świń [63]. Stwierdzono, że relaksyna dodana do plazmy nasienia poprawia ruchliwość plemników wówczas, gdy jest ona obniżona. Nie stwierdzono jednak jej wpływu na normalną, fizjologiczną ruchliwość plemników [91].

Relaksyna może być też wydzielana do mleka [26]. Przypuszcza się, że jest ona produkowana przez gruczoł mlekowy u ludzi [26], świńek morskich [92] i psów [46].

Przy użyciu hybrydyzacji *in situ* odkryto mRNA relaksyny w mózgu szczurów (obszar hipokampa, kory nowej, jądra opuszki węchowej, blaszki pokrywy, kory gruszkowatej) [88, 89]. Badania nad rozwojem osobniczym szczurów wykazały, że mRNA relaksyny jest obecny w mózgu pierwszego dnia po urodzeniu, podczas gdy receptory relaksyny nie pojawiają do około 7 dnia po urodzeniu. Wzrost ilości receptorów między 7 i 29 dniem rozwoju postnatalnego, sugeruje udział relaksyny w procesie dojrzewania mózgu.

Jakkolwiek mRNA relaksyny jest nieoznaczalne w tkance mięśnia sercowego, to wysoki poziom receptorów dla relaksyny wykryto w przedsionku serca szczurów w pierwszej dobie po urodzeniu. Ta ilość receptorów utrzymuje się na podobnym poziomie w okresie rozwoju postnatalnego, co wskazuje na funkcję relaksyny w układzie sercowo-naczyniowym. Wykazano bezpośredni wpływ chronotropowy i inotropowy relaksyny na izolowany mięsień sercowy szczura [52]. Zlokalizowanie mRNA relaksyny w mózgu szczura i receptorów w przedsionku serca pozwala sugerować autokrynną funkcję relaksyny w procesie rozwoju mózgu i parakrynną w regulacji funkcji sercowo-naczyniowych [89, 126]. Han i wsp. [52] sugerują, że



Rys. 3. Biologiczne znaczenie relaksyny

relaksyna moduluje kurczliwość i częstotliwość pracy serca poprzez zwiększenie otwarcia kanałów wapniowych. Molekularny mechanizm tego oddziaływania jest związany z cAMP, aktywacją kinazy białkowej związanej z cAMP. Ta funkcja może się wiązać z niektórymi chorobami mięśnia sercowego. Relaksyna wpływa na wzrost diastolicznego i systolicznego ciśnienia krwi i powoduje wzrost stężenia wazopresyny i oksytocyny we wczesnej ciąży u szczuryc [90]. Od 14 dnia ciąży te funkcje relaksyny były osłabione. W okresie późnej ciąży bowiem spada wrażliwość naczyń na wazopresynę, angiotensynę II, noradrenalinę, z czym wiąże się brak wzrostu ciśnienia krwi.

Relaksyna u szczurów zmniejsza ciśnienie osmotyczne wewnątrz gruczołu mlekowego przez pobudzanie uwalniania wazopresyny i oksytocyny [135].

Sugeruje się obecność relaksyno-podobnych peptydów w guzach przewodu pokarmowego, jednakże ich funkcja nie jest znana [118].

Biologiczne znaczenie relaksyny u różnych gatunków zwierząt przedstawiono w postaci podsumowania na schemacie (rys. 3).

PIŚMIENNICTWO

- [1] ADDIEGO LA, TSUTSUI T, STEWART DR, STABENFELDT GH. Determination of the source of immunoreactive relaxin in the cat. *Biol Reprod* 1987; **37**: 1165–1169.
- [2] AFELE S, BRYANT-GREENWOOD GD, CHAMLEY WA, DAX EM. Plasma relaxin immunoactivity in the pig at parturition and during nuzzling and suckling. *J Reprod Fertil* 1979; **56**: 451–457.
- [3] ALI SM, MCMURTRY JP, BAGNELL CA, BRYANT-GREENWOOD GD. Immunocytochemical localization of relaxin in *corpora lutea* of sows throughout the estrous cycle. *Biol Reprod* 1986; **34**: 139–143.
- [4] ANDERSON LL, FORD JJ, MELAMPY RM, COX DF. Relaxin in porcine *corpora lutea* during pregnancy and after hysterectomy. *Am J Physiol* 1973; **225**: 1215–1219.
- [5] ANSERSON LL, PEREZGROVAS R, O'BYRNE EM, STEINETZ BG. Biological actions of relaxin in pigs and beef cattle. *Ann New York Acad Sci* 1982; **380**: 131–150.
- [6] ANDERSON LL, ADAIR V, STROMER MH, McDONALD WG. Relaxin production and release after hysterectomy in the pig. *Endocrinology* 1983; **113**: 677–686.
- [7] ANDERSON LL. Regulation of relaxin secretion and its role in pregnancy. *Adv Exp Med Biol* 1987; **219**: 421–463.
- [8] BÜLLESBACH EE, SCHWABE C. On the receptor binding site of relaxins. *Int J Peptide Protein Res* 1988; **32**: 361–367.
- [9] BAGNA B, SCHWABE C, ANDERSON LL. Effects of relaxin on facilitation in dairy heifers. *J Reprod Fertil* 1991; **91**: 605–615.
- [10] BAGNELL CA, FRANDO LB, DOWNEY BR, TSANG BK, AINSWORTH L. Localization of relaxin in the pig follicle during preovulatory development. *Biol Reprod* 1987; **37**: 235–240.
- [11] BAGNELL CA, AYAU E, DOWNEY BR, TSANG BK, AINSWORTH L. Localization of relaxin during formation of the porcine *corpus luteum*. *Biol Reprod* 1989; **40**: 835–841.
- [12] BAGNELL CA, TASHIMA L, TSARK W, ALI SM, MCMURTRY JP. Relaxin gene expression in the sow *corpus luteum* during the cycle, pregnancy and lactation. *Endocrinology* 1990a; **126**: 2514–2520.

- [13] BAGNELL CA, TSARK W, TASHIMA L, DOWNEY BR, TSANG BK, AINSWORTH L. Relaxin gene expression in the porcine follicle during preovulatory development induced by gonadotropins. *J Molec Endocrinol* 1990b; **5**: 211–219.
- [14] BAGNELL CA, BAKER NK, McMURTRY JP, BROCHT DM, LEWIS GS. Control of luteal relaxin release by prostaglandin F_{2α}: Differences in the sow cycle and pregnancy. *PSEBM* 1990c; **194**: 125–130.
- [15] BAGNELL CA. Production and biologic action of relaxin within the ovarian follicle: an overview. *Steroids* 1991; **56**: 242–246.
- [16] BAGNELL CA, ZHANG Q, DOWNEY B, AINSWORTH L. Source and biological actions of relaxin in pigs. *J Reprod Fertil* 1993; Suppl. **48**, 127–138.
- [17] BAGNELL CA, ZHANG Q, OHLETH K, CONNOR ML, DOWNEY BR, TSANG BK, AINSWORTH L. Developmental expression of the relaxin gene in the porcine *corpus luteum*. *J Molec Endocrinol* 1993; **10**: 87–97.
- [18] BELT WD, ANDERSON LL, CAVAZOS LF, MELAMPY RM. Cytoplasmic granules and relaxin levels in porcine *corpora lutea*. *Endocrinology* 1971; **89**: 1–10.
- [19] BIGAZZI M, NARDI E, BRUNI P, PETRICCI F. Relaxin in human decidua. *J Clin Endocrinol Metab* 1980; **51**: 939–941.
- [20] BLUNDELL TL, HUMBEL RE. Hormone families: pancreatic hormones and homologous growth factors. *Nature* 1980; **87**: 781–786.
- [21] BRYANT-GREENWOOD GD, JEFFREY R, RALPH MM, SEAMARK RF. Relaxin production by the porcine ovarian Graafian follicle *in vitro*. *Biol Reprod* 1980; **23**: 792–800.
- [22] BRYANT-GREENWOOD GD. Relaxin as a new hormone. *Endocrine Rev* 1982; **3**: 62–90.
- [23] BRYANT-GREENWOOD GD. Human decidual and placental relaxins. *Reprod Fertil Dev* 1991a; **3**: 385–389.
- [24] BRYANT-GREENWOOD GD, TASHIMA L, GREENWOOD FC, TAYLOR E, PEAKER M. Endometrial relaxin: Effect of mastectomy in the cyclic and pregnant guinea pig. *Endocrinology* 1991b; **129**: 2119–2125.
- [25] BRYANT-GREENWOOD GD, RUTANEN E M, PARTANEN S, COELHO TK, YAMAMOTO SY. Sequential appearance of relaxin, prolactin IGFBP-1 during growth and differentiation of the human endometrium. *Molec Cellul Endocrinol* 1993; **95**: 23–29.
- [26] BRYANT-GREENWOOD GD, SCHWABE C. Human relaxins: chemistry and biology. *Endocrin Rev* 1994; **15**, **1**: 5–26.
- [27] CALDWELL RV, BELLOWS RA, HALL JA, ANTHONY RV. Administration of pig relaxin to beef heifers 4 or 7 day *pre partum*. *J Reprod Fertil* 1990; **90**: 165–174.
- [28] COLON JM, SANTORO N, GOLDSMITH LT, WHITCOMB R, MUSKET D, WEISS G. Relaxin secretion into human semen is independent of gonadotropin stimulation. *Biol Reprod* 1994; **50**: 187–192.
- [29] DENNING-KENDALL PA, GULDENAAR SEF, WATHES DC. Evidence for a switch in the site of relaxin production from small theca-derived cells to large luteal cells during early pregnancy in the pig. *J Reprod Fert* 1989; **85**: 261–271.
- [30] DOWNING SJ, McILWRATH, HOLLINGSWORTH A. Cyclic adenosine 3'5'-monophosphate and the relaxant action of relaxin in the rat uterus *in vivo*. *J Reprod Fert* 1992; **96**: 857–863.
- [31] DOWNING SJ, HOLLINGSWORTH A. Action of relaxin on uterine contractions – a review. *J Reprod Fert* 1993; **99**: 275–282.
- [32] DUBOIS MP, DACHEUX JL. Relaxin, a male hormone? *Cell Tiss Res* 1978; **187**: 201–214.
- [33] EINSPIANIER R, PITZEL L, WUTTE W, HAGENDORFF G, PRENß KD, KARDALINOUE, SCHEIT KH. Demonstration of mRNAs for oxytocin and prolactin in porcine granulosa and luteal cells. *FEBS Letters* 1986; **204**: 37–40.

- [34] EVANS G, WATHES DC, KING GJ, ARMSTRONG DT, PORTER DG. Changes in relaxin production by the theca during the preovulatory period of the pig. *J Reprod Fertil* 1983; **69**: 677–683.
- [35] FELDER KJ, MOLINA R, BENOIT AM, ANDERSON LL. Relaxin's time release from aging porcine *corpora lutea* during different reproduction states. Programm and Abstracts of the 65th Annual Meeting of the Endocrine Society, Baltimore, MD, abstract 610, 1985.
- [36] FELDER KJ, MOLINA JR, BENOIT AM, ANDERSON LL. Precise timing for peak relaxin and decreased progesterone secretion after hysterectomy in the pig. *Endocrinology* 1986; **119**: 1502–1509.
- [37] FELDER KJ, KLINDT J, BOLT DJ, ANDERSON LL. Relaxin and progesterone secretion as affected by luteinizing hormone and prolactin after hysterectomy in the pig. *Endocrinology* 1988; **122**: 1751–1760.
- [38] FIELDS MJ, FIELDS PA, CASTRO-HERNANDEZ A, LARKIN LH. Evidence for relaxin in *corpora lutea* of late pregnant cows. *Endocrinology* 1980; **107**: 869–876.
- [39] FIELDS PA. Intracellular localization of relaxin in membrane-bound granules in the pregnant rat luteal cell. *Biol Reprod* 1984; **30**: 753–762.
- [40] FIELDS PA, FIELDS MJ. Ultrastructural localization of relaxin in the *corpus luteum* of nonpregnant, pseudopregnant and pregnant pigs. *Biol Reprod* 1985; **32**: 1169–1179.
- [41] FIELDS PA, LEE AB, HAAB LM, HWANG JJ, SCHERWOOD OD. Evidence for a dual source of relaxin in the pregnant rat: immunolocalization in the *corpora lutea* and endometrium. *Endocrinology* 1992; **130**: 2985–2990.
- [42] GAGLIARDI CL, GOLDSMITH LT, SAKETOS M, WEISS G, SCHMIDT CL. Human chorionic gonadotropin stimulation of relaxin secretion by luteinized human granulosa cells. *Fertil Steril* 1992; **58**: 314–320.
- [43] GALVIN JM, ANTHONY RV, DAY BN. Effects of purified porcine relaxin on the uterus of gilts during early pregnancy. *Anim Reprod Sci* 1991; **26**: 293–301.
- [44] GAST MJ. Characterization of preprorelaxin by tryptic digestion and inhibition of its conversion to prorelaxin by amino acid analogs *J Biol Chem* 1983; **258**: 9001–9004.
- [45] GAZAL OS, LI Y, SCHWABE C, ANDERSON LL. Attenuation of antepartum relaxin surge and induction of parturition by antiprogesterone RU 486 in sheep. *J Reprod Fertil* 1993; **97**: 233–240.
- [46] GOLDSMITH LT, LUST G, STEINETS BG. Transmission of relaxin from lactating bitches of their offspring via suckling. *Biol Reprod* 1994; **50**: 258–265.
- [47] GOLOS TG, WEYHENMEYER JA, SHERWOOD OD. Immunocytochemical localization of relaxin in the ovaries of pregnant rats. *Biol Reprod* 1984; **30**: 257–261.
- [48] GREENWOOD FC, MERCADO-SIMMEN RG, BRYANT-GREENWOOD GD. Insulin-related peptides examined by radioimmunoassay and radioreceptor assay: a note. In *Relaxin Elsevier/North Holland*. New York: GD Bryant-Greenwood, HD Niall and FC Greenwood 1981; 97–98.
- [49] HALL JA, CANTLEY TC, DAY BN, ANTHONY RV. Uterotropic actions of relaxin in prepubertal gilts. *Biol Reprod* 1990; **42**: 769–774.
- [50] HALL JA, CANTLEY TC, GALVIN JM, DAY BN, ANTHONY RV. Influence of ovarian steroids on relaxin-induced uterine growth in ovariectomized gilts. *Endocrinology* 1992; **130**: 3159–3166.
- [51] HALL JA, ANTHONY RV. Influence of ovarian steroids on relaxin-induced distensibility and compositional changes in the porcine cervix. *Biol Reprod* 1993; **48**: 1348–1353.
- [52] HAN X, HABUCHI Y, GILES WR. Relaxin increases heart rate by modulating calcium current in cardiac pacemaker cells. *Circ Res* 1994; **74**: 537–541.
- [53] HEAP RB, FLINT APF, GASDSBY JE. Role of embryonic signals in the establishment of pregnancy. *Brit Med Bull* 1979; **35**: 125–135.

- [54] HUANG CJ, LI Y, STROMER MH, ANDERSON LL. Synergistic effects of insulin-like growth factor I and gonadotropins on relaxin and progesterone secretion by ageing *corpora lutea* of pigs. *J Reprod Fertil* 1992; **96**: 415–425.
- [55] HUANG CJ, LI Y, ANDERSON LL. Stimulation of collagen secretion by relaxin and effect of oestrogen on relaxin binding in uterine cervical cells of pig. *J Reprod Fert* 1993; **98**: 153–158.
- [56] HUNTER MG, DENNING-KENDALL P, BOULTON MI, RENSIS F, De WILD ML, FOXCROFT GR. Lack of stimulation of relaxin secretion in lactating sows by suckling *in vivo* or by oxytocin *in vitro*. *J Reprod Fertil* 1992; **94**: 121–128.
- [57] HURLEY WL, DOAENE RM, O'DAY-BOWMAN MB, WINN RJ, MOJONNIER LE, SHERWOOD OD. Effect of relaxin on mammary development in ovariectomized pregnant gilts. *Endocrinology* 1991; **128**: 1285–1290.
- [58] HUSZER G. Biology and biochemistry of myometrial contractility and cervical motivation. *Semin Perineonatal* 1981; **5**: 216.
- [59] ISSACS N, DODSON G. Models of relaxin. Relaxin. Eds GD Bryant-Greenwood, HD Niall and FC Greenwood, Elsevier/North-Holland, Amsterdam 1981; 101–106.
- [60] IVELL R, HUNT N, KHAN-DAWOOD F, DAWOOD MY. Expression of the human gene in the *corpus luteum* of the menstrual cycle and in the prostate. *Molec Cellul Endocr* 1989; **66**: 251–255.
- [61] JAMES R, NIALL HD, KWOK S, BRYANT-GREENWOOD GD. Primary structure of porcine relaxin and homology with insulin and related growth factors. *Nature* 1977; **267**: 544–546.
- [62] JONES SA, SUMMERLEE AJS. Relaxin acts centrally to inhibit oxytocin release during parturition: an effect that reversed by naloxone. *J Endocrinol* 1986; **111**: 99–102.
- [63] JUANG HH, MUSAH AI, SCHWABE C, ANDERSON LL. Immunoactive relaxin in boar seminal plasma and its correlation with sperm motility. *Anim Reprod Sci* 1990; **22**: 47–53.
- [64] KENDALL JZ, PROPER CG, BRYANT-GREENWOOD GD. Ultrastructural immunoperoxidase demonstration of relaxin in *corpora lutea* from a pregnant sow. *Biol Reprod* 1978; **18**: 94–98.
- [65] KENDALL JZ, RICHARDS GE, SHIH LN, FARRIS T S. Plasma relaxin concentrations in the pig during the periparturient period: association with PRL, estrogen and P₄ concentrations. *Theriogenology* 1982; **17**: 677–686.
- [66] KENDALL JZ, RICHARDS GE, SHIH LI-CHEN N. Effect of haloperidol, suckling, oxytocin and hand milking on plasma relaxin and prolactin concentrations in cyclic and lactating pigs. *J Reprod Fertil* 1983; **68**: 271–277.
- [67] KERTILES LP, ANDERSON LL. Effect of relaxin on cervical dilatation, parturition and lactation in the pig. *Biol Reprod* 1979; **21**: 57–68.
- [68] KNOX RV, ZHANG Z, DAY BN, ANTHONY RV. Identification of relaxin gene expression and protein localization in the uterine endometrium during early pregnancy in the pig. *Endocrinology* 1994; **135**: 2517–2525.
- [69] KOTWICA G, DUSZA L, CIERESZKO R, OKRASA S, SCHAMS D. Evidence for relaxin and progesterone synchronous secretion on days 13–17 of the oestrous cycle in sows. *Exp Clin Endocrinol* 1991; **98**: 3–8.
- [70] KOTWICA G. Udział oksytocyny i relaksyny w regulacji cyklu rujowego u świń. *Acta Acad Agric Techn Ols Suppl. G.*, 1992; **34**: 4–30.
- [71] LEE VH, FIELDS PA. Rabbit endometrial relaxin: immunohistochemical localization during preimplantation, pregnancy, and lactation. *Biol Reprod* 1990; **42**: 737–745.
- [72] LI Y, HUANG C, KLINDT J, ANDERSON LL. Stimulation of prolactin secretion in the pig: Central effects of relaxin and the antiprogesterone RU 486. *Endocrinology* 1993; **133**: 1205–1212.

- [73] LOBB KD, PORTER DG. Rapid increase in relaxin gene expression in early pregnancy in the pig. *Molec Cellul Endoc* 1992; **89**: R5-R8.
- [74] LOEKEN MR, CHANNING CP, D'ELETTO R, WEISS G. Stimulatory effect of luteinizing hormone upon relaxin secretion by culture porcine granulosa cells. *Endocrinology* 1983; **112**: 769-771.
- [75] MATSUMOTO D, CHAMLEY WA. Identification of relaxins in porcine follicular fluid and in the ovary of the immature sow. *J Reprod Fertil* 1980; **58**: 369-375.
- [76] MAZOUJIAN G, BRYANT-GREENWOOD GD. Relaxin in the breast tissue. *Lancet* 1990; **335**: 298-299.
- [77] MERCADO-SIMMEN RC, GOODWIN B, UENO MS, YAMAMOTO SY, BRYANT-GREENWOOD GD. Relaxin receptors in the myometrium and cervix of the pig. *Biol Reprod* 1982; **26**: 120-128.
- [78] MESSINE O, BARROS C, CHANG SM, THATCHER WW, FIELDS MJ. Relaxin secretion during the cycle and early pregnancy in the pig. *Biol Reprod* 1989; **40**: 58 (Abstract).
- [79] MUSAH AI, SCHWABE C, WILLHAM RL, ANDERSON LL. Relaxin on induction of parturition in beef heifers. *Endocrinology* 1986; **118**: 1476-1482.
- [80] MUSAH AI, SCHWABE C, WILLHAM RL, ANDERSON LL. Induction of parturition, progesterone secretion, and delivery of placenta in beef heifers given relaxin with cloprostenol or dexamethasone. *Biol Reprod* 1987a; **37**: 797-803.
- [81] MUSAH AI, SCHWABE C, ANDERSON LL. Acute decrease in progesterone and increase in estrogen secretion caused by relaxin during late pregnancy in beef heifers. *Endocrinology* 1987b; **120**: 317-324.
- [82] MUSAH AI, SCHWABE C, WILLHAM RL, ANDERSON LL. Dystocia, pelvic and cervical dilatation in beef heifers after induction of parturition with relaxin combined with cloprostenol or dexamethasone. *Anim Reprod Sci* 1988; **16**: 237-248.
- [83] NORSTROM A, WIQVIST I. Relaxin-induced changes in adenosine 3'-5'- monophosphate levels in the human cervix. *Acta Endocr Copenh* 1985; **109**: 122-125.
- [84] O'BYRNE EM, STEINETZ BG. Radioimmunoassay (RIA) of relaxin in sera of various species using an antiserum to porcine relaxin (39377). *Proc Soc Exp Med* 1976; **152**: 272-276.
- [85] O'BYRNE KT, ELTRINGHAM L, CLARKE G, SUMMERLEE AJS. Effects of porcine relaxin on oxytocin release from the neurohypophysis in the anaesthetized lactating rat. *J Endocrinol* 1986; **109**: 393-397.
- [86] O'BYRNE EM, TABACHNICK M, ANDERSON LL, STEINETZ BG. Characterization of the circulating form of relaxin: biological activity and terminal amino acid. *Endocrinology* 1989; **124**: 2920-2927.
- [87] OLEFSKY JM, SAEKOW M, KROC RL. Potentiation of insulin binding and insulin action by purified porcine relaxin. *Ann NY Acad Sci* 1982; **380**: 200-215.
- [88] OSHEROFF PL, PHILIPS HS. Autoradiographic localization of relaxin binding sites in rat brain. *Proc Natl Acad Sci* 1991; **88**: 6413-6417.
- [89] OSHEROFF PL, HO WEI-HSIEN. Expression of relaxin mRNA and relaxin receptors in postnatal and adult rat brains and hearts. *J Biol Chem* 1993; **20**: 15193-15199.
- [90] PARRY LJ, POTERSKI RS, SUMMERLEE AJS. Effects of relaxin on blood pressure and the release of vasopressin and oxytocin in anaesthetized rats during pregnancy and lactation. *Biol Reprod* 1994; **50**: 622-628.
- [91] PEACOCK AJ, KIRKWOOD RN, THACKER PA. A note on the influence of added relaxin on the fertility of aged boar semen. *Anim Prod* 1994; **58**: 419-421.
- [92] PEAKER M, TAYLOR E, TASHIMA L, REDMAN TL, GREENWOOD FC, BRYANT-GREENWOOD GD. Relaxin detected by immunocytochemistry and Northern analysis in the mammary gland of the guinea pig. *Endocrinology* 1989; **125**: 693-698.

- [93] POLITIS I, SRIKANDAKUMAR A, TURNER JD, TSANG BK, AINSWORTH L, DOWNEY BR. Changes and partial identification of the plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor systems during ovarian follicular maturation in the pig. *Biol Reprod* 1990; **43**: 636–642.
- [94] PORTER DG. Relaxin: old hormone, new prospect. *Oxford Rev Reprod Biol* 1979a; **1**: 1–57.
- [95] PORTER DG. The myometrium and the relaxin enigma. *Anim Reprod Sci* 1979b; **2**: 77–96.
- [96] PORTER DG, WATTS AD. Relaxin and progesterone are myometrial inhibitors in the ovariectomized non-pregnant mini-pig. *J Reprod Fert* 1986; **76**: 205–213.
- [97] PORTER DG. Lack of effect of relaxin on oxytocin output from the porcine neural lobe *in vitro* or in lactating sows *in vivo*. *J Reprod Fertil* 1992a; **96**: 251–260.
- [98] PORTER DG, FRIENDSHIP RM, RYAN PL, WASNIDGE C. Relaxin is not associated with poor milk yield in the postpartum sow. *Can J Vet Res* 1992b; **56**: 204–207.
- [99] PUPULA M, MacLENNAN AH. Effect of porcine relaxin on spontaneous, oxytocin-driven and prostaglandin-driven pig myometrial activity *in vitro*. *J Reprod Med* 1989; **43**: 819–823.
- [100] RAWITCH AB, MOORE WV, FRIEDEN EH. Relaxin-insulin homology: predictions of secondary structure and lack of competitive binding. *Int J Biochem* 1980; **11**: 357–362.
- [101] REINING JW, DANIEL LN, SCHWABE C, GOWAM LK, STEINETZ BG, O'BYRNE EM. Isolation and characterization of relaxin from the sand tiger shark (*Odontaspis taurus*). *Endocrinology* 1981; **109**: 537–543.
- [102] RENEGAR RH, LARKIN LH. Relaxin concentrations in endometrial, placental, and ovarian tissue, and in sera from ewes during middle and late pregnancy. *Biol Reprod* 1985; **32**: 840–847.
- [103] RENEGAR RH, OWNES CR, CHALOVICH JM. Purification and partial characterization of relaxin precursor from hamster placenta. *Biol Reprod* 1993; **49**: 154–161.
- [104] SCHWABE C, MCDONALD JK, STEINETZ BG. Primary structure of A chain of porcine relaxin. *Biochem Biophys Res Commun* 1976; **70**: 397–405.
- [105] SCHWABE C, MCDONALD JK. Relaxin: A disulfide homolog of insulin. *Science* 1977; **197**: 914–915.
- [106] SCHWABE C, STEINETZ BG, WEISS G, SEGALLOF A, MCDONALD JK, O'BYRNE EM, HOCHMAM J, CARRIERE B, GOLDSMITH L. Relaxin. *Recent Prog Horm Res* 1978; **34**: 123–199.
- [107] SCHWABE C. N- α -Formyl-Tyrosyl-Relaxin – a reliable tracer for relaxin radioimmunoassay. *Endocrinology* 1983; **113**, 815.
- [108] SCHWABE C, BÜLLESBACH E. Chemistry and physiology of mammalian relaxins. *Atlas Sci Biochem* 1988; **5**: 220–224.
- [109] SCHWABE C, BÜLLESBACH E. Mini-review. Relaxin. *Comp Biochem Physiol* 1990; **96**: **1**, 15–21.
- [110] SHERWOOD OD, O'BYRNE EM. Purification and characterization of porcine relaxin. *Arch Biochem Biophys* 1974; **160**: 185–196.
- [111] SHERWOOD OD, ROSENTRERER KR, BIRKHIMER ML. Development of a radioimmunoassay for porcine relaxin using 125 J-labeled polytyrosyl-relaxin. *Endocrinology* 1975a; **96**: 1106–1114.
- [112] SHERWOOD OD, CHANG CC, BEVIER GW, DZIUK PJ. Radioimmunoassay of plasma relaxin levels throughout pregnancy and at parturition in the pig. *Endocrinology* 1975b; **94**: 834–837.
- [113] SHERWOOD OD, NARA BS, CMERKOVIC VE, FIRST NL. Relaxin concentrations in pig plasma after the administration of indomethacin and prostaglandin F $_{2\alpha}$ during late pregnancy. *Endocrinology* 1979; **104**: 1716–1721.
- [114] SHERWOOD OD. Relaxin at parturition in the pig. *Control of Pig Reprod.*, Wyd. DJA Cole, Foxcroft GR, Butterworth Sci 1980; 343–375.

- [115] SHERWOOD OD. Relaxin. The Physiol. Reprod. Wyd. E Knobil, J Neil i wsp. Raven Press, 1988; **16**: 585–673.
- [116] SHERWOOD OD, DOWNING SJ, LAO GUICO-LAMM M, HWANG JJ, O'DAY-BOWMAN MB, FIELDS PA. The physiological effects of relaxin during pregnancy: studies in rats and pigs. *Oxford Rev Reprod Biol* 1993; **15**:147–188.
- [117] STEINETZ BG, BEACH VL, KROC RL, STASILLI NR, NUSSBAUM RE, NEMITH PJ, DUN RK. Bioassay of relaxin using a reference standard: A simple and reliable method utilizing direct measurement of interpubic ligament formation in mice. *Endocrinology* 1960; **67**: 102–115.
- [118] STEMMERMANN GN, MESIONA W, GREENWOOD FC, BRYANT-GREENWOOD GD. Immunocytochemical identification of a relaxin-like protein in gastrointestinal epithelium and carcinoma: a preliminary report. *J Endocrinol* 1994; **140**: 321–325.
- [119] STEWART DR. Development of a homologous equine relaxin radioimmunoassay. *Endocrinology* 1986a; **119**: 1100–1104.
- [120] STEWART D R, PAPKOFF H. Purification and characterization of equine relaxin. *Endocrinology* 1986b; **119**: 1093–1099.
- [121] STEWART DR, NEVINS B, HADAS E, VANDLEN R. Affinity purification and sequence determination of equine relaxin. *Endocrinology* 1991; **129**: 375–383.
- [122] STEWART DR, HENZEL WJ, VANDLEN R. Purification and sequence determination of canine relaxin. *J Protein Chem* 1992; **11**: 247–253.
- [123] STONE BA, PETRUCCO OM, SEAMARK RF, MacLENNAN AH. Concentrations of steroid hormones, and of relaxin, in utero-ovarian venous plasma of periparturient sows. *Anim Reprod Sci* 1987; **15**: 227–239.
- [124] SUMMERLEE AJS, O'BYRNE KT, PACISLEY K, BREEZE MF, PORTER DG. Relaxin affects the central control of oxytocin release. *Nature* 1984; **309**: 372–374.
- [125] TAVERNE M, BEVERS M, BRADSHAW JMC, DIELEMAN SJ, WILLEMSE AH, PORTER DG. Plasma concentrations of prolactin, progesterone, relaxin and oestradiol-17 β in sows treated with progesterone, bromocriptine or indomethacin during late pregnancy. *J Reprod Fertil* 1982; **65**: 85–96.
- [126] TAYLOR MJ, CLARK CL. Evidence for a novel source of relaxin; atrial cardiocytes. *J Endocrinol* 1994; **143**: R5–R8.
- [127] TSUTSUI T, STEWART R. Determination of the source of relaxin immunoreactivity during pregnancy in the dog. *J Vet Med Sci* 1991; **53**: 1025–1029.
- [128] VASILJENKO P, MEAD J P, WEIDMANN JE. Uterine growth-promoting effects of relaxin: A morphometric and histologic analysis. *Biol Reprod* 1986; **53**: 987–999.
- [129] WATHES DC, RESS JM, PORTER DG. Identification of relaxin in the placenta of the ewe. *J Reprod Fertil* 1988; **84**: 247–257.
- [130] WATHES DC, KING GJ, PORTER DG, WATHES CM. Relationship between pre-partum relaxin concentrations and farrowing intervals in the pig. *J Reprod Fert* 1989; **87**: 383–390.
- [131] WATTS AD, FLINT APF, FOXCROFT GR, PORTER DG. Plasma steroid, relaxin and dihydro-keto-prostaglandin $F_{2\alpha}$ changes in the minipig in relation to myometrial electrical and mechanical activity in the pre-partum period. *J Reprod Fertil* 1988; **83**: 553–564.
- [132] WAY SA, LENG G. Relaxin increases the firing rate of supraoptic neurones and increases oxytocin secretion in the rat. *J Endocrinol* 1992; **132**: 149–158.
- [133] WHITELEY J, WILLCOX DL, HARTMANN PE, YAMAMOTO SY, BRYANT-GREENWOOD GD. Plasma relaxin levels during suckling and oxytocin stimulation in the lactating sow. *Biol Reprod* 1985; **3**: 705–714.
- [134] WIDOWSKI TM, CURTIS SE, DZIUK PJ, WAGNER WC, SHERWOOD OD. Behavioral and endocrine responses of sows to prostaglandin $F_{2\alpha}$ and cloprostenol. *Biol Reprod* 1990; **43**: 290–297.

- [135] WILSON BC, SUMMERLEE AJS. Effects of exogenous relaxin on oxytocin and vasopressin release and the intramammary pressure response to central hyperosmotic challenge. *J Endocrinol* 1994; **141**: 75–80.
- [136] WINN RJ, BAKER MD, SHERWOOD OD. Individual and combined effects of relaxin, estrogen and progesterone in ovariectomized gilts. I. Effects on the growth, softening and histological properties of the cervix. *Endocrinology* 1994a; **135**: 1241–1249.
- [137] WINN RJ, BAKER MD, MARLE CA, SHERWOOD OD. Individual and combined effects of relaxin, estrogen and progesterone in ovariectomized gilts. II. Effects on mammary development. *Endocrinology* 1994b; **135**: 1250–1255.
- [138] YKI-JARVINEN H, WAHLSTROM T, TENHYNEN A, KOSKIMES AI, SEPPALA M. The occurrence of relaxin in hyperstimulated human preovulatory follicles collected in an *in vitro* fertilization program. *J In Vitro Fertilization and Embryo Transfer* 1984; **1**: 180–182.
- [139] ZHANG Q, OHLETH K, BAGNELL CA. Biological action of relaxin in the development pig follicle: effects on cell proliferation and deoxyribonucleic acid (DNA) synthesis *in vitro*. *Biol Reprod* 1992a; **46**: Suppl. 1, Abstr. 217.
- [140] ZHANG Z, DAY BN, SAMSON WK, ANTHONY RV. Relaxin is expressed by pregnant uterine epithelium during early pregnancy in swine. 74th Annual Meeting of Endocrine Society, San Antonio 1992b; Abstr. 1464.
- [141] ZHANG QI, BAGNELL CA. Relaxin stimulation of porcine granulosa cell deoxyribonucleic acid synthesis *in vitro*: Interactions with insulin and insulin-like growth factor I. *Endocrinology* 1993; **132**: 1643–1650.

Otrzymano: 29.06. 1995 r.

Przyjęto: 10.10.1995 r.

Adres autora: 10-718 Olsztyn, ul. Oczapowskiego 5

CZYNNIKI WZROSTOWE RODZINY EGF I ICH ROLA W KARCINOGENEZIE JELITA GRUBEGO

EPIDERMAL GROWTH FACTOR-RELATED PEPTIDES AND THEIR ROLE IN COLORECTAL CARCINOGENESIS

Ewa MAŁECKA-PANAS

Klinika Przewodu Pokarmowego i Przemiany Materii AM w Łodzi

Streszczenie: Czynniki wzrostowe są to białka, które regulują wzrost komórek poprzez przyłączenie się do swoistych receptorów znajdujących się w błonie komórkowej. Większość receptorów czynników wzrostowych wykazuje aktywność kinazy tyrozynowej (Tyr-k), której stymulacja decyduje o dalszych etapach wewnątrzkomórkowej transmisji sygnału. Na podstawie podobieństwa struktury i funkcji, a także wiązania się ze wspólnym receptorem czynniki wzrostowe grupuje się w tzw. rodziny. Do rodziny naskórkowego czynnika wzrostowego (EGF) zaliczane są obecnie: EGF – transformujący czynnik wzrostowy α (TGF- α), amfiregulina, naskórkowy czynnik wzrostowy wiążący heparynę (HB-EGF) i betacellulina, które wiążą się z tym samym receptorem: EGF (EGF-R). Ponadto opisano polipeptydy pokrewne dla tej rodziny, tj. czynnik różnicowania neu i hereguliny, wiążące receptory homologiczne dla EGF-R: erbB-2, erbB-3 i erbB-4. Czynniki wzrostowe rodziny EGF należą do promotorów chemicznej i wirusowej karcinogenezy. W ostatnich latach nagromadzono wiele danych dokumentujących udział czynników wzrostowych należących do rodziny EGF wraz z ich receptorem w karcinogenezie jelita grubego. Wyniki dotychczasowych badań doświadczalnych nad tymi czynnikami budzą nadzieje na opracowanie nowych metod terapii chorób nowotworowych, zwłaszcza raka okrężnicy.

Słowa kluczowe: czynniki wzrostowe, EGF, TGF- α , receptor EGF, proliferacja, karcinogeneza jelita grubego

Summary: Growth factors (GF) are proteins that control cell proliferation by binding to specific cell surface membrane receptors with intrinsic tyrosine kinase (Tyr-k) activity. Tyr-k activation initiates the next steps in the intracellular signal transduction pathway, initiated by GF. GF are classified into families, based on structural and functional homology and binding to the same receptor of high affinity. The epidermal growth factor (EGF) family now includes: EGF, transforming growth factor- α , (TGF- α), amphiregulin, heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor (HB-EGF) and betacellulin, all of them binding to the EGF receptor (EGF-R). Recently, EGF-related proteins and their receptors were described: neu-differentiation factor and heregulins, which bind to the receptors homologous to EGF-R: erbB-2, erbB-3 and erbB-4. EGF family growth factors promote chemical and viral carcinoge-

nesis. Lately, the data is accumulating on the significant role of the EGF family peptides and their receptor in colorectal carcinogenesis. Our present knowledge of the role of EGF receptors and their ligands in colorectal cancer offers the opportunities for new therapeutic options in this disease.

Key words: growth factors, EGF, TGF- α , EGF receptor, proliferation, colorectal carcinogenesis

Wykaz skrótów: **AR** – amfiregulina, **c-onc** – onkogeny komórkowe, **CRDG** – czynnik wzrostowy wyizolowany z komórek jelita grubego, **EGF** – naskórkowy czynnik wzrostowy, **EGF-R** – receptor dla naskórkowego czynnika wzrostowego, **HB-EGF** – czynnik wzrostowy wiążący heparynę, **PCR** – reakcja łańcuchowa z udziałem polimerazy, **PLC** – fosfolipaza C, **SDGF** – czynnik wzrostowy wyizolowany z nerwiaka, **TGF- α** – transformujący czynnik wzrostowy α , **Tyr-k** – kinaza tyrozynowa, **v-onc** – onkogeny wirusowe

Komórki nabłonka przewodu pokarmowego podlegają nieustannym, pozostającym w równowadze, procesom proliferacji, różnicowania i obumierania. W błonie śluzowej jelita istnieją ponadto odrębne strefy zawierające komórki znajdujące się w poszczególnych fazach rozwojowych. Stąd, nabłonek ten stał się idealnym modelem dla badań nad wzrostem i odnową komórek organizmów żywych [2, 42].

Nie ulega również obecnie wątpliwości, że zrozumienie mechanizmów karcinogenezy, może być w znaczny sposób wzbogacone poprzez badania nad patofizjologią i regulacją procesów prowadzących do proliferacji komórek [22, 53].

W regulacji tych procesów uczestniczy wiele czynników, m.in. składniki pożywienia, hormony i peptydy regulacyjne [43, 59, 94]. Wśród peptydów regulacyjnych, czynniki wzrostowe wraz z ich receptorami stały się w ciągu ostatnich dwudziestu lat obiektem znacznego zainteresowania badaczy.

W niniejszej pracy omówione będą funkcje i mechanizmy działania czynników wzrostowych rodziny EGF ze szczególnym uwzględnieniem ich znaczenia w karcinogenezie jelita grubego.

Czynniki wzrostowe są to białka, które już w stężeniu rzędu ng/ml, regulują wzrost komórek po przyłączeniu się do swoistych receptorów znajdujących się w błonie komórkowej [2, 104, 105]. Uczestniczą one we wzroście i różnicowaniu wszystkich komórek organizmu, inicjując mitozy lub umożliwiając progresję cyklu podziałowego [104]; są powiązane wielorakimi, skomplikowanymi i nie do końca wyjaśnionymi zależnościami, wzajemnie osłabiając i wzmacniając swoje działanie [3, 88, 112].

Mechanizm działania czynników wzrostowych może przybierać m.in. formy: autokrynną i parakrynną [2, 106]. W mechanizmie autokrynnym komórkami docelowymi są te same, które syntetyzują dany czynnik posiadając na swej powierzchni swoiste dla niego receptory. W mechanizmie parakrynnym zaś czynniki wzrostowe powstające w określonych komórkach wywołują zmiany w komórkach sąsiadujących, ale różnych histologicznie. Ponadto opisano dodatkowy mechanizm regulacji, gdy czynnik wzrostowy związany z receptorem na powierzchni jednej komórki stymuluje aktywność biologiczną w komórce sąsiadującej (*juxtacrine regulation*) [7, 117]. Trzeba dodać, że biologiczne znaczenie tej drogi regulacji nie zostało dotychczas ustalone. Ostatnio, w wyniku obserwacji komórek produkujących znaczne ilości naskórkowego czynnika wzrostowego (EGF) i nie reagujących na ligand egzogenny wobec braku swoistego receptora na swojej powierzchni zaproponowano model intrakrynną transmisji sygnału mitogennego. Czynniki wzrostowe działające w spo-

sób intrakryny dla wykonywania swoich funkcji biologicznych nie muszą być wydzielane na zewnątrz komórki i nie wymagają wiązania z receptorem na jej powierzchni, zaś proces aktywacji mitogennej zachodzi wewnątrzkomórkowo [69]. Jeśli nawet taka możliwość istnieje, to należy podkreślić, że brak jest dotychczas danych o wewnątrzkomórkowych szlakach przewodzenia sygnału w tym mechanizmie, tj. bez udziału receptorów błonowych.

Regulacja autokryny ma istotne znaczenie biologiczne, bowiem jest jednym ze sposobów uniezależnienia się komórek nowotworowych od obecności egzogenego czynnika wzrostowego [22, 81]. Zaburzenia regulacji wydzielania autokrynych czynników wzrostowych lub odpowiedzi komórkowej na działanie tych czynników są prawdopodobnymi mechanizmami proliferacji autonomicznej komórek linii nowotworowych w hodowli [1, 12, 27]. Komórki takie wykazują następujące cechy: wzrost zależny od ich gęstości w medium, nie wymagający zaś obecności egzogenych czynników wzrostowych, jednoczesna ekspresja endogenego czynnika wzrostowego i jego receptora oraz zahamowanie wzrostu przez przeciwciała przeciwko temu czynnikowi lub jego receptorowi [12].

RECEPTORY CZYNNIKÓW WZROSTOWYCH

Receptory czynników wzrostowych są białkami transbłonowymi złożonymi z trzech części domeny zewnątrzkomórkowej, tzw. akceptorowej, która rozpoznaje i wiąże ligand, domeny śródbłonowej i domeny wewnątrzkomórkowej, efektorowej, wykazującej aktywność kinazy tyrozynowej (Tyr-k) [40, 98, 116]. Kinazy tyrozynowe, enzymy uczestniczące w procesach proliferacji, różnicowania i transformacji komórek katalizują wprowadzenie grupy fosforanowej do reszt tyrozyny białek docelowych, tzn. tworzą estrowe wiązanie fenolowej grupy OH tyrozyny z resztą kwasu fosforowego pochodzącego z ATP [54].

Ze względu na strukturę receptory wykazujące aktywność kinazy tyrozynowej podzielono na 4 klasy [113]. Receptory klasy I są monomerami, domena zewnątrzkomórkowa zawiera fragmenty bogate w cysteinę, zaś domena wykazująca aktywność Tyr-k jest ciągła. Receptory klasy II (np. insuliny) są heterotetramerami. Receptory kl III i IV w domenie zewnątrzkomórkowej mają "kieszzenie" podobne do występujących w cząsteczkach immunoglobulin, a domena kinazowa przedzielona jest wstawką.

Czynniki wzrostowe należące do rodziny naskórkowego czynnika wzrostowego stymulują mitogenezę poprzez stymulację swoistego receptora na powierzchni komórki, należącego do klasy I [11, 29, 113]. Receptor ten został po raz pierwszy zidentyfikowany w badaniach nad EGF i nazwany receptorem EGF-R lub receptorem typu 1 czynników wzrostowych, związanym z EGF, ale może on także być równie wydajnym miejscem wiązania dla innych peptydów omawianej rodziny [88, 104]. Należy do receptorów najlepiej poznanych i o największym znaczeniu biologicznym.

Ostatnio wykryto szereg receptorów strukturalnie homologicznych do EGF-R: erbB-2 (także znany jako c-neu), erbB-3 i erbB-4 [2, 64, 86]. Okazało się, że z tymi receptorami wiążą się pokrewne dla rodziny EGF czynniki wzrostowe, takie jak czynnik różnicowania neu i hereguliny [2, 15, 86, 103].

Przyłączenie liganda powoduje dimeryzację receptora EGF-R i co za tym idzie wzrost aktywności katalitycznej jego kinazy tyrozynowej [17, 59]. Następnie dochodzi do autofosforylacji kinazy tyrozynowej receptora w trzech miejscach, co jest etapem koniecznym dla pełnej jego aktywności i pozwala na dostęp komórkowych substratów do części katalitycznej EGF-R [74, 89]. W wyniku aktywacji kinazy tyrozynowej receptora EGF dochodzi do fosforylacji przez tę kinazę szeregu substratów komórkowych, w tym białka stymulującego aktywność GTP-azową-GAP (*GTP-ase Activating Protein*), fosfolipazy C- γ (szlak kinazy białkowej C), fosfatydyloinozytolo-3 kinazy oraz kinaz białkowych rodziny raf [38, 40, 65, 74, 98]. Te ostatnie ulegają fosforylacji i w jej wyniku aktywują kinazy MAP [59, 65]. Aktywowane przez mitogeny kinazy białkowe (*MAP kinases*) są kinazami białkowymi serynowo-treoninowymi (Ser/Thr), ale same, w odpowiedzi na mitogen, są aktywowane przez fosforylację reszt tyrozyny i treoniny [65, 74]. Poszczególne szlaki regulacyjne są obecnie obiektem intensywnych badań i nie wszystkie ich etapy zostały dotychczas poznane.

Przyłączenie się czynnika wzrostowego do jego receptora prowadzi ostatecznie do pobudzenia wzrostu lub różnicowania poprzez uaktywnianie lub hamowanie odpowiednich genów. Dochodzi do tego za pośrednictwem wielu skomplikowanych szlaków przekazywania sygnału mitogennego prowadzących poprzez cytoplazmę i jądro. Transmisja ta jest obecnie obiektem szczególnego zainteresowania badaczy, bowiem pozostaje w związku z procesami uczestniczącymi w inicjowaniu i promowaniu karcinogenezy [10, 37, 51, 82, 99].

W warunkach nadmiaru odpowiedniego czynnika wzrostowego dochodzi do obniżenia liczby jego receptorów w błonie komórkowej, co jest spowodowane przewagą internalizacji kompleksu czynnika wzrostowego z receptorem i degradacji receptorów nad ich syntezą i recykliczacją. Zjawisko to jest określane w piśmiennictwie anglojęzycznym jako tzw. "*down regulation*" [61, 104]. Zmiany w powinowactwie receptorów do czynników wzrostowych mogą zaś być wynikiem zmian struktury receptora lub jego oddziaływania z innymi elementami błony komórkowej w efekcie przyłączenia liganda do innego receptora. Te wzajemne wpływy poszczególnych receptorów po ich aktywacji, a raczej poszczególnych szlaków regulacyjnych określa się jako "*cross-talk*" lub transmodulacja [3, 54, 59].

LIGANDY RECEPTORÓW CZYNNIKÓW WZROSTOWYCH (RODZINA EGF)

Rodzina naskórkowego czynnika wzrostowego składa się z białek charakteryzujących się homologiczną sekwencją, powinowactwem do tego samego receptora — EGF-R i podobną aktywnością biologiczną.

Obecnie, obok EGF do tej rodziny zaliczane są także: transformujący czynnik wzrostowy alfa (TGF- α), amfiregulina (AR), naskórkowy czynnik wzrostowy wiążący heparynę (HB-EGF) i betacellulina [2, 44, 52, 89]. Opisano także dwa polipeptydy pokrewne: czynnik różnicowania – neu i heregulina [2, 89]. Czynniki rodziny EGF aktywują receptor EGF, pełnią funkcje biologiczne podobne do EGF i są wobec niego strukturalnie homologiczne.

EGF – peptyd złożony z 53 aminokwasów jest produkowany głównie przez ślinianki podżuchwowe i gruczoły Brunnera w dwunastnicy, zaś jego niewielkie ilości przez część zewnątrzwydzielniczą trzustki [2, 17, 57, 97]. Czynniki ten stymuluje wzrost i różnicowanie wielu komórek o typie nabłonkowym zarówno *in vivo*, jak i *in vitro* [51, 88].

EGF stymuluje rozwój błony śluzowej żołądka i jelit i ma wpływ na aktywność disacharydaz błony śluzowej jelita cienkiego i amylazy trzustkowej u płodów i noworodków [10, 59]. Stwierdzono silny wpływ EGF potęgujący proliferację komórek błony śluzowej jelit u szczurów [42]. Hamuje także wydzielanie kwasu solnego w żołądku i przyspiesza gojenie nisz wrzodowych [13, 42].

TGF- α jest produkowany przez wiele typów komórek, w tym przez większość komórek nabłonka [9, 10, 17]. Czynniki ten wykrywano w oskrzelach, jelitach, cewkach nerkowych, drogach rodnych i nowotworach jajnika [62]. Thomas i wsp. przy pomocy metod immunohistochemicznych stwierdzili znacznie częstsze niż EGF występowanie TGF- α w obrębie przewodu pokarmowego [111]. Sugestie wielu autorów wskazują na to, że głównym ligandem dla receptora EGF w obrębie przewodu pokarmowego jest TGF- α [2, 42, 63].

W ostatnich latach wyizolowano nowe peptydy zaliczone następnie do rodziny EGF. Jeden z nich, to amfiregulina (AR), modulator wzrostu, uzyskany w wyniku oczyszczania z płynu hodowlanego komórek MCF-7 ludzkiego gruczolaka sutka poddanych działaniu estru forbolu [100]. AR wykazuje 38% homologii strukturalnej z EGF i hamuje jego wiązanie ze swoistym receptorem. Wysoki poziom ekspresji tego czynnika wzrostowego wykrywano w łożysku, trzustce, jelitach i innych tkankach człowieka [2]. Amfiregulina jest czynnikiem wzrostowym wiążącym heparynę, a inkubacja z siarczanem heparyny całkowicie hamowała jej aktywność biologiczną [23].

Kolejne białka należące do rodziny EGF wyizolowano dzięki ich właściwości wiązania się z heparyną. Jednym z nich jest SDGF (*Schwannoma-derived growth factor*), czynnik wzrostowy wyizolowany z nerwiaka, który okazał się odpowiednikiem AR [60]. Drugi, nazwany CRDG (*Colorectum Cell-Derived Growth Factor*), uzyskano z komórek raka jelita grubego [27]. HB-EGF, zaś, tj. czynnik wzrostowy wiążący heparynę, najbliższy strukturalnie amfiregulinie [50] uzyskano z makrofażów. Przewyższa on EGF w powinowactwie do EGF-R i aktywności mitogennej wobec komórek mięśni gładkich [2]. Czynniki stymulujące proliferację, takie jak estry forbolu czy angiotensyna II, wywołują wzrost ekspresji HB-EGF w tych komórkach [32, 110]. HB-EGF i AR uważa się obecnie za odgrywające kluczową rolę w regulowaniu wczesnej odpowiedzi komórki na czynniki stymulujące proliferację [88, 89].

W ostatnim czasie do czynników wzrostowych rodziny EGF włączono betacellulinę. Została oczyszczona jako białko o aktywności mitogennej z linii komórkowej wyprowadzonej z mysiego wyspiaka [96]. Wykazuje ona 32% homologii z mysim EGF i 50% z mysim TGF- α i aktywuje kinazę tyrozynową receptora EGF-R. Badania z zastosowaniem metody *Northern blot* wykrywały obecność mRNA dla betacelluliny w wątrobie, trzustce i jelicie cienkim [2].

ZNACZENIE CZYNNIKÓW WZROSTOWYCH RODZINY EGF W ROZWOJU NOWOTWORÓW JELITA GRUBEGO

EGF uczestniczy w karcinogenezie w warunkach nadmiernej produkcji tego czynnika wzrostowego, zwiększonej ekspresji jego receptorów w błonie komórkowej lub zaburzeń wewnątrzkomórkowej transmisji sygnału [1, 7]. Dodanie EGF do hodowli komórek prawidłowych może wywołać w nich zmiany typowe dla transformacji nowotworowej, jak np. utratę kontroli nad swoim wzrostem i jego zależności od czynników wzrostowych w medium [12, 79]. W komórkach takich obserwowano wzrost zawartości fosfotyrozyny białek i aktywności dekarboksylazy ornitynowej [14, 42, 74].

Wykazano sekrecję EGF i TGF- α przez komórki 7 linii komórkowych wyprowadzonych z ludzkiego raka jelita grubego oraz obecność na ich powierzchni EGF-R i to dwóch rodzajów: o niskim i wysokim powinowactwie [53].

Zwiększona ekspresja EGF była stwierdzana także w 12% raka trzustki, 68% raka stercza, 20% raka żołądka [5, 39, 89, 108]. EGF, jak wykazywano, stymuluje proliferację i różnicowanie komórek linii Caco-2 wyprowadzonych z ludzkiego raka jelita grubego [25]. Opisywano wytwarzanie i wydzielanie EGF przez HT-29, linię komórkową pochodzącą z ludzkiego gruczolakoraka jelita grubego [26].

W badaniach nad EGF stosowano związki antysensowne, tj. krótkie oligonukleotydy, które w wyniku specyficznego rozpoznania i hybrydyzacji komplementarnej sekwencji blokują ekspresję danego genu i w konsekwencji aktywność biologiczną jego produktu. Wprowadzenie w drodze transfekcji związku antysensownego dla EGF-R do komórek raka jelita grubego, ze stwierdzoną uprzednio wysoką ekspresją EGF prowadziło do zmniejszenia się liczby receptorów EGF-R na powierzchni komórek i wyraźnie hamowało ich proliferację [90].

W badaniach z zastosowaniem modelu doświadczalnego dla wywoływania raka jelita grubego u szczurów, jednoczesne podanie EGF i 1,2-dwumetylohydrazyny (karcinogen wywołujący raka jelita grubego u gryzoni) prowadziło do rozwoju guzów w większej liczbie i o większych rozmiarach niż wówczas, gdy stosowano tylko sam karcinogen [68].

Oceniano także wiązanie egzogenego EGF do swoistych receptorów oraz wpływ tego czynnika wzrostowego na wzrost komórek linii DiFi (hodowla komórek nowotworowych uzyskanych od pacjentki z rakiem jelita grubego i zespołem Gardnera). Komórki te wykazywały amplifikację genu i znacznie podwyższoną ekspresję mRNA

dla EGF-R [46]. Podanie egzogenego EGF w wysokim stężeniu prowadziło do obniżenia proliferacji komórek tej linii, co autorzy tłumaczą interakcją liganda z receptorami o niskim powinowactwie. Należy dodać, że funkcja takich receptorów, czy receptorowych miejsc wiążących o niskim powinowactwie nie jest dotychczas wyjaśniona.

Poszukiwanie czynników wzrostowych uczestniczących w procesie karcinogenezy doprowadziło do wykrycia grupy polipeptydów znanych jako transformujące czynniki wzrostowe – *Transforming Growth Factors* [2, 31, 76]. Polipeptydy te, oprócz działania mitogennego, wywołują odwracalną transformację fenotypową komórek prawidłowych. Stymulują one do proliferacji komórki mezenchymalne w hodowli agarowej nadając im zdolność do wzrostu wielowarstwowego i niezależnego od przylegania do podłoża (ang. *anchorage independent*) [2, 88]. Po raz pierwszy zostały one wyizolowane z płynu, w którym uprzednio hodowano mysie fibroblasty 3T3 transformowane przez wirus mięsaka Moloneya [30]; dodane do prawidłowych fibroblastów wywoływały transformację złośliwą komórek. Dalsze badania pozwoliły na wyróżnienie obecności dwóch polipeptydów, określonych jako TGF- α i TGF- β [22, 63]. Białka te, jak się okazało, różnią się pod względem struktury i funkcji i należą do różnych rodzin czynników wzrostowych.

TGF- α uważa się za typowy przykład autokrynych regulatorów wzrostu, ponieważ jego zwiększona ekspresja jest często stwierdzana jednocześnie z podwyższoną ekspresją receptora EGF-R, np. w ludzkich rakach jelita grubego [35, 53, 114].

Wykazano, że komórki wielu linii komórkowych wyprowadzonych z ludzkich nowotworów przewodu pokarmowego, a zwłaszcza z żołądka i okrężnicy wytwarzały i wydelały TGF- α [5, 9, 93, 109, 114]. Z kolei przeciwciała skierowane przeciw temu czynnikowi wzrostowemu hamowały wzrost komórek nowotworowych [59, 73, 102]. Obserwowano, że przekształcenie nowotworowe prawidłowych komórek jelita cienkiego szczura łączy się z pojawieniem w nich wzmożonej ekspresji mRNA dla TGF- α [88].

Znaczny postęp w zakresie poznania funkcji TGF- α przyniosły prace z zastosowaniem metod biologii molekularnej prowadzących do nadmiernej produkcji tego czynnika wzrostowego. U transgenicznych myszy z wywołaną podwyższoną ekspresją TGF- α dochodziło do rozwoju hiperplazji błony śluzowej przewodu pokarmowego, raka wątroby i sutka [55, 95]. Na podstawie tych badań należy wnioskować, że TGF- α jest silnym mitogenem dla tkanki nabłonkowej, w warunkach jego podwyższonej ekspresji, utrzymującej się przez dłuższy czas *in vivo*. Z drugiej strony myszy, u których gen TGF- α został usunięty ("*gene knock-out*"), z zastosowaniem techniki celowego modyfikowania genomu ("*gene targeting*") – rozwijają się względnie prawidłowo, a zwłaszcza nie stwierdza się u nich zmian w obrębie przewodu pokarmowego [70, 72]. Należy przypuszczać, że czynność TGF- α przejmują wówczas inne czynniki wzrostowe rodziny EGF. Natomiast pozbawienie zwierząt receptora EGF-R metodą "*gene targeting*" okazuje się zaburzeniem letalnym, uniemożliwia bowiem implantację zapłodnionego jaja w macicy [2]. Jest to kolejny dowód potwierdzający istotne znaczenie biologiczne tej rodziny czynników wzrostowych.

Stwierdzano nadmierną ekspresję TGF- α w pierwotnych guzach płuc i okrężnicy [67]. Okazało się również, że ekspresję TGF- α można wykryć metodami immunohistochemicznymi w preparatach resekowanego jelita grubego u 84% chorych z rakiem tego narządu [94].

Niektóre czynniki wzrostowe produkowane przez guzy nowotworowe są wykrywane w moczu chorych. Osatnio, określano aktywność biologiczną TGF- α w moczu u osób cierpiących na raka różnych narządów przewodu pokarmowego. U 93% chorych z rakiem jelita grubego aktywność ta znacznie przewyższała najwyższe wartości wykrywane u osób zdrowych i wykazywała korelację dodatnią z rozmiarami guza. Wskazuje to na możliwość zastosowania tej metody jako prostego, nieinwazyjnego markera dla raka przewodu pokarmowego [85].

Wykazano, że proces starzenia, któremu towarzyszy wzrost aktywności proliferacyjnej błony śluzowej jelita grubego i wzrost częstości występowania nowotworów tego narządu, wiąże się ze zwiększoną reaktywnością *in vitro* izolowanych kolonocytów na EGF i TGF- α . Wzrostowi aktywności Tyr-k swoistej dla EGF-R towarzyszył wzrost aktywności fosfolipazy C (PLC), prawdopodobnie w związku z dalszymi etapami transmisji sygnału mitogennego [71]. Można więc przypuszczać, że w miarę starzenia dochodzi do aktywacji EGF-R, co przyczynia się do rozwoju hiperprolifracji błony śluzowej jelita grubego.

Dla ustalenia udziału EGF i TGF- α w mechanizmach karcinogenezy jelita grubego analizowano zmiany aktywności Tyr-k receptora EGF-R w kolonocytach izolowanych od szczurów poddanych działaniu azoksymetanu (AOM – karcinogen wywołujący raka jelita grubego u zwierząt doświadczalnych). Stwierdzono, że we wczesnych etapach karcinogenezy wywołanej przez AOM, obok wzmożonej proliferacji błony śluzowej jelita grubego obserwuje się wzrost reaktywności kolonocytów na wymienione czynniki wzrostowe, wyrażony pobudzeniem aktywności Tyr-k receptora EGF-R [77].

Amfiregulina może mieć zarówno stymulujący, jak i hamujący wpływ na wzrost komórek, zależnie od ich rodzaju i stężenia liganda [56, 100]; stymuluje ona proliferację ludzkich fibroblastów, ale wyraźnie hamuje wzrost komórek dwóch linii ludzkiego raka sutka, wykazujących wzmożoną ekspresję TGF- α i EGF-R [2, 84, 89]. Ekspresja tego czynnika wzrostowego wykazywała korelację ujemną z ekspresją TGF- α w poszczególnych liniach komórkowych [112]. Mechanizmy tego dwukierunkowego wpływu amfireguliny na wzrost nie zostały dotychczas poznane.

Stwierdzono, że u chorych na łuszczycę i raka jelita grubego ekspresja mRNA dla amfireguliny jest znacznie podwyższona w tkankach dotkniętych chorobą w porównaniu z niezmiennymi tkankami sąsiadującymi [24]. Wykazano wyższą niż w komórkach prawidłowych ekspresję mRNA dla amfireguliny w większości linii komórkowych wyprowadzonych z raka jelita grubego i w guzach tego narządu [20, 56, 94].

Związki antysensowe skierowane przeciwko mRNA dla amfireguliny i TGF- α w podobnym stopniu hamowały proliferację hodowanych komórek raka jelita grubego,

a zastosowane jednocześnie wywoływały efekt synergistyczny. Autorzy tej pracy sugerują, że czynniki wzrostowe rodziny EGF wspomagają wzajemnie swoje działanie [83].

Culouscou i wsp. wykazali, że komórki ludzkiego gruczolaka jelita grubego linii HT 29 wydzielają czynnik przypominający EGF o masie cząsteczkowej 25 kDa [27]. Białko to, nazwane CDRG, okazało się identyczne z amfireguliną i wykazywało konkurencyjne wiązanie z receptorem EGF i autokryny mechanizm działania w komórkach raka jelita [28]. Ponadto wywoływało ono, jak EGF i TGF-alfa, fosforylację tyrozyny receptora EGF-R.

CZYNNIKI WZROSTOWE A ONKOGENY

Znaczny postęp w badaniach nad karcinogenezą przyniosło odkrycie onkogenów wirusowych (v-onc) odpowiedzialnych za nowotworową transformację tkanek zwierząt doświadczalnych, zakażonych niektórymi retrowirusami [14, 40]. Okazało się następnie, że w prawidłowych genomach kręgowców znajdują się geny homologiczne do v-onc, tzw. onkogeny komórkowe (c-onc), które są zmutowanymi formami prawidłowych genów występujących w komórkach kręgowców, tj. protoonkogenów [1, 10, 33, 91].

Badania nad wzrostem komórek prawidłowych i nowotworowych doprowadziły do znalezienia wielu wspólnych cech pomiędzy strukturą i funkcją polipeptydowych czynników wzrostowych i białkowych produktów ekspresji onkogenów. Okazało się, że produkty wielu onkogenów mają budowę podobną do receptorów czynników wzrostowych. Różnią się od swoich odpowiedników w komórkach prawidłowych przede wszystkim brakiem części odpowiadającej domenie akceptorowej receptora, np. onkogeny wirusowe v-erbB i v-fms kodują zmienione, nie posiadające części akceptorowej postaci receptorów dla czynników wzrostowych, odpowiednio EGF i CSF-1 [9, 14, 34, 40]. Przy aktywnej, wewnątrzkomórkowej części katalitycznej receptora dochodzi więc do stałej, niezależnej od obecności liganda stymulacji komórek do wzrostu [14, 34].

Białka kodowane przez onkogeny podzielono na następujące 4 klasy:

- 1) czynniki wzrostowe,
- 2) receptory czynników wzrostowych,
- 3) wewnątrzkomórkowe mediatory transmisji sygnału zainicjowanego przez czynnik wzrostowy,
- 4) czynniki transkrypcyjne [14].

W warunkach prawidłowych podział i różnicowanie komórek są zależne od sygnałów regulacyjnych przekazywanych przez czynniki wzrostowe, hormony i inne substancje przekazywające, które mogą pobudzać lub hamować te procesy [41, 74]. W przypadku komórek nowotworowych natomiast kontrola taka ulega zaburzeniu lub przestaje istnieć i co za tym idzie dochodzi do niekontrolowanej proliferacji [1, 22].

Produkt onkogeny v-erbB wykazujący homologię z receptorem EGF jest najlepiej poznanym białkiem odpowiadającym zmodyfikowanej postaci receptora czynnika wzrostowego. Onkogen ten wykryto w genomie wirusa erythroblastozy kurzej AEV-H (*Avian Erythroblastosis Virus H*) [17]. Komórkowy odpowiednik tego onkogeny, tj. protoonkogen c-erbB, okazał się być identyczny z genem kodującym receptor EGF-R [34]. Amplifikację genu c-erbB wykryto również w pewnych nowotworach ludzkich, a mianowicie w rakach skóry, sutka, płuc i w glejakach [1, 2].

Metody biologii molekularnej umożliwiły identyfikację 3 ludzkich białek: c-erbB-2, c-erbB-3 i c-erbB-4, homologicznych pod względem struktury z EGF-R (c-erbB-1) [2, 86, 89].

Amplikację genów kodujących c-erbB-2 i c-erbB-3 stwierdzano w ludzkich rakach piersi i żołądka o złym rokowaniu [2, 56]. Wynika stąd, że badania immunocytochemiczne biopłatów guza w kierunku tych receptorów mogłyby pomóc w identyfikacji chorych zwiększonego ryzyka, wymagających intensywnego monitorowania i odpowiednio dobranego reżimu terapeutycznego [2, 22].

Ostatnio okazało się, że erbB-3 jest receptorem dla hereguliny, a fosforylacja tyrozyny receptora c-erbB-2 pod jej wpływem odbywa się w drodze heterodimeryzacji z udziałem receptora c-erbB-3. Podobnie, c-erbB-4 jest swoistym receptorem dla hereguliny, a ta ostatnia wywołuje fosforylację c-erbB-2 w drodze interakcji z c-erbB-4 [15, 16, 87].

We fragmentach tkanek prawidłowego nabłonka, gruczolaków i gruczolakoraków jelita grubego poszukiwano metodami immunohistochemicznymi produktu protoonkogeny c-erbB-2. Porównywano intensywność reakcji z monoklonalnym przeciwciałem przeciwko c-erbB-2 w komórkach w zależności od stopnia dysplazji, stadium raka jelita grubego w klasyfikacji Duke'a i czasu przeżycia chorych. Tkanki prawidłowego jelita i gruczolaków o typie cewkowym wykazywały niską intensywność barwienia o ograniczonej lokalizacji. Wysoką ekspresję c-erbB-2 stwierdzono w strefach dysplazji gruczolaków o typie kosmkowym i cewkowym. Wśród 40 badanych gruczolakoraków aż 38 wykazywało średnio lub wysoce intensywny stopień reakcji z badanym przeciwciałem [58].

Homologię strukturalną z obszarem o aktywności kinazy tyrozynowej receptora EGF wykazują także białka będące produktami onkogenów v-src, v-yes, v-fes, v-fps, v-fgr, v-abl i wiele innych [1, 2, 47, 74]. Mają one *in vitro* aktywność Tyr-k. Nadal jednak nie udało się w sposób pełny ustalić dalszych etapów transmisji sygnału mitogennego z udziałem tych onkogenów. Istotną rolę w nowotworzeniu odgrywają protoonkogeny rodziny ras, w skład której wchodzi trzy geny K-ras, H-ras i N-ras [18, 19]. Protoonkogeny H-ras i K-ras są komórkowymi homologami onkogenów występujących w genomach wirusów mięsaka myszy, szczepów Harveya i Kirstena [48, 99]. Białka będące ich produktami, tj. białka p21 (o m. cz. 21 kDa), wykazują aktywność GTP-azy i pewne podobieństwo strukturalne z podjednostką beta białek G [38, 41, 48]. Działanie EGF i insuliny stymuluje wiązanie GTP przez białko p21 [59, 75]. Mutacje w genach ras występują w 90% raków trzustki i 50% przypadków raka jelita grubego [99]. O znaczeniu onkogeny ras w inicjacji procesu rozwoju nowotworu może również świadczyć obecność zmutowanego genu ras w łagodnych

polipach okrężnicy [6]. U chorych ze wczesną postacią raka jelita grubego udało się, metodą reakcji łańcuchowej z udziałem polimerazy PCR, wykryć obecność onkogenów ras w kale, co w przyszłości może prowadzić do opracowania nowych, swoistych testów przesiewowych w tej chorobie [101].

Analizowano wpływ TGF- α na wzrost komórek błony śluzowej jelita, które uległy transformacji pod wpływem uaktywnionego protoonkogeny Ha-ras. Zmutowany Ha-ras wprowadzono do komórek RIE-1 nabłonka jelita szczura wraz z genomem wirusa SV40, tj. metodą transfekcji wirusowej. Metoda ta polega na przeniesieniu biologicznie aktywnego kariotypicznego DNA w DNA komórek biorców. Komórki poddane transfekcji ulegają transformacji nowotworowej, tworząc charakterystyczne ogniska w jednowarstwowej kolonii [92]. W klonach komórek potomnych poszukiwano mRNA dla czynników wzrostowych rodziny EGF metodą Northern blot. W niektórych doświadczeniach stosowano ponadto 4,5-dwuaniłinoftalimid (DAPH), odwracalny inhibitor Tyr-k receptora EGF-R. Komórki poddane transfekcji wirusowej wykazywały morfologiczne cechy transformacji i wzrost niezależny od stałego podłoża. Zawierały w swojej cytoplazmie kilkadziesiąt razy więcej TGF- α i wydzielaly 5–55-krotnie więcej tego czynnika wzrostowego do środowiska niż kontrolne komórki tej linii. mRNA dla TGF- α wykrywano we wszystkich klonach komórek potomnych, podczas gdy nie znajdowano go w komórkach macierzystych. Zawartość mRNA dla HB-EGF w komórkach poddanych transfekcji była 5-krotnie wyższa niż w komórkach macierzystych. DAPH hamował w 84% formowanie ognisk przez komórki potomne. Autorzy tej pracy sugerują, że aktywacja receptora EGF-R uczestniczy w regulacji wzrostu komórek transformowanych nowotworowo w wyniku mutacji genu ras [45].

Wielu badaczy zajmuje się ostatnio poszukiwaniem tzw. biomarkerów raka jelita grubego, tj. cech genetycznych, biochemicznych lub histopatologicznych błony śluzowej wyróżniających osoby aktualnie zdrowe, ale obciążone wysokim ryzykiem wystąpienia tej choroby w przyszłości. Nie ulega bowiem wątpliwości, że wczesne wykrywanie takich zmian ma zasadnicze znaczenie dla zapobiegania chorobom nowotworowym przewodu pokarmowego [66, 115].

Mutacje genów K-ras wykrywano w biopsjach z fragmentów niezmięnionej makroskopowo ani histopatologicznie błony śluzowej u 20% chorych z rakiem jelita grubego. Autorzy tej pracy wnioskują, że wykrywanie takich mutacji w prawidłowej błonie śluzowej pozwoli na identyfikację osób o wysokim ryzyku raka jelita grubego, a więc należy je zaliczyć do grupy genetycznych biomarkerów (78).

PERSPEKTYWY KLINICZNEGO ZASTOSOWANIA BADAŃ NAD CZYNNIKAMI WZROSTOWYMI RODZINY EGF

Spośród wszystkich produktów onkogenów, czynniki wzrostowe wydają się najodpowiedniejszym celem terapii przeciwnowotworowej, ponieważ działają na powierzchni błony komórkowej i biorą udział w tworzeniu guzów o nasilonej agresywności

klinicznej [1, 48, 89]. Wiele zainteresowania wzbudzają obecnie poszukiwania metod terapeutycznych polegających na ingerencji w szlaki przekazywania sygnału mitogenowego zainicjowanego przez te czynniki.

Interwencja taka byłaby teoretycznie możliwa poprzez hamowanie wiązania liganda przez receptor, dimeryzacji receptora, aktywacji kinazy tyrozynowej receptora, wreszcie obniżenie ekspresji samego czynnika wzrostowego lub jego receptora. Uzyskano monoklonalne przeciwciała skierowane przeciwko zarówno ligandom, jak i swoistym receptorom rodziny EGF, a także przeciw zewnątrzkomórkowej domenie c-erbB-2. Przeciwciała przeciw EGF i TGF-alfa okazały się skuteczne *in vitro*, ale nie przyniosły spodziewanych efektów *in vivo* [22, 47]. Przypuszczalnie należy to wiązać z działaniem ostatnio wykrytych alternatywnych ligandów dla EGF-R, takich jak amfiregulina, SDGF, HB-EGF i innych.

Zastosowanie przeciwciał dla samych receptorów wydaje się bardziej obiecujące. Przeciwciała takie mogą działać w mechanizmach: "down regulation", transmodulacji, hamowania wiązania ligandów lub jako nośniki substancji toksycznych dla komórek guza [1, 2, 79]. W niektórych liniach komórkowych wyprowadzonych z ludzkich raków okrężnicy stwierdzono hamowanie proliferacji okrężnicy przez monoklonalne przeciwciała dla tego EGF-R [59]. Stwierdzono, że komórki raka jelita grubego linii 3T3 z indukowaną wzmożoną ekspresją dekarboksylazy ornitynowej (marker podwyższonej proliferacji), wytwarzają więcej niż pozostałe ognisk nowotworzenia, czemu towarzyszy wzrost aktywności Tyr-k swoistej dla EGF-R. Tyrfostryna, syntetyczny inhibitor, selektywny dla Tyr-k receptora EGF, już w stężeniu 10 μM hamowała powstawanie tych ognisk, nie wywołując cytotoksycznego wpływu na komórki [80].

Stwierdzenie obecności receptora EGF-R na powierzchni większości komórek, w tym również prawidłowych zdaje się przeczyć możliwościom terapeutycznym związanym z blokowaniem działania jego ligandów. Należy jednak podkreślić, że gęstość tych receptorów w przypadku komórek nowotworowych jest kilkaset razy wyższa niż w komórkach prawidłowych, a ich powinowactwo do poszczególnych ligandów może być zmienione za pomocą wspomnianych mechanizmów "down regulation" i transmodulacji. Działania uboczne zaś, związane z omawianą terapią, a dotyczące komórek prawidłowych, są niestety udziałem większości znanych dotychczas leków przeciwnowotworowych.

UWAGI KOŃCOWE

Wprowadzenie metod biologii molekularnej zrewolucjonizowało badania nad biologią komórki. Techniki te, stosowane od niedawna w badaniach dotyczących przewodu pokarmowego przyniosły już wyraźny postęp w tej dziedzinie [48, 107]. Izolacja i charakterystyka genów kodujących czynniki wzrostowe i ich receptory w znaczny sposób wzbogaca nasze zrozumienie mechanizmów proliferacji komórek [8, 14]. Badanie sekwencji nukleotydów i ekspresji genów umożliwia obecnie dokładne poznanie struktury pierwszo-, drugo- i trzeciorzędowej czynników wzrostowych [67, 107].

Wprowadzenie hodowli zwierząt transgenicznych, przekazujących zmieniony genom swojemu potomstwu umożliwiło badania nad efektami obniżonej lub podwyższonej ekspresji czynników wzrostowych lub genów kodujących ich receptory [36]. Wielce obiecujące na przyszłość wydają się badania obejmujące delecję poszczególnych genów z genomu zwierząt, umożliwiając szczegółowe studia nad funkcją ich produktu [49].

Pewne ograniczenia w badaniach nad wpływem czynników wzrostowych na wzrost i różnicowanie nabłonka jelit są jednak związane z faktem, iż nie udało się dotąd uzyskać hodowli prawidłowych komórek błony śluzowej tego narządu. Niemniej, wiele informacji w tej dziedzinie przynoszą obecnie badania z zastosowaniem izolowanych kolonocytów, hodowli krypt jelita cienkiego i hodowli komórek linii wyprowadzonych z raka jelita grubego [2, 18, 21, 71, 77].

Intensywnie prowadzone badania nie pozwoliły jednak, jak dotąd wyjaśnić w sposób wyczerpujący mechanizmów działania czynników wzrostowych w komórkach docelowych. Dalszych badań wymagają zwłaszcza kolejne etapy wewnątrzkomórkowych szlaków przekazywania sygnału, poszukiwanie substratów kinaz białkowych, mechanizmy pobudzania replikacji DNA i selektywnej aktywacji genów.

Ewentualne wprowadzenie przeciwciał dla receptora EGF do terapii nowotworów będzie wymagało przeprowadzenia jeszcze wielu badań. Skuteczność takiej terapii będzie zależało m.in. od tego, czy postęp rozwoju guza zależy od ciągłej stymulacji EGF-R przez lokalne ligandy. Ponadto, analiza reaktywności poszczególnych tkanek na blokowanie EGF-R być może pozwoli na wyodrębnienie guzów podatnych na taką terapię.

Jak już wspomniano, w ocenie odpowiedzi komórki należy również brać pod uwagę stopień powinowactwa receptora do swojego liganda. Uzyskano ostatnio wiele dowodów na to, że receptory EGF-R o wysokim powinowactwie mają istotne znaczenie dla przekazywania sygnału mitogennego, podczas gdy receptory o niskim powinowactwie nie uczestniczą w tym procesie [59, 88].

Dokładniejsza znajomość mechanizmu działania nowych ligandów dla receptora, zwłaszcza amfireguliny, która hamuje wzrost niektórych komórek umożliwi może opracowanie nowych metod hamujących aktywność EGF-R.

Powodzenie tych badań nie tylko przyczyni się do poszerzenia naszej wiedzy o mechanizmach nowotworzenia, ale umożliwi, jak się wydaje, także wprowadzenie nowych metod diagnozowania, monitorowania i leczenia raka u ludzi.

PIŚMIENNICTWO

- [1] AARONSON SA. Growth factors and cancer. *Science* 1991, **254**: 1146–1153.
- [2] BARNARD J, BEAUCHAMP D, RUSSELL W, DUBOIS R, COFFEY R. Epidermal Growth Factor-Related peptides and their relevance to gastrointestinal pathophysiology. *Gastroenterology* 1995, **108**: 564–580.
- [3] BARNARD JA, GRAVES-DEAL R, PITTELKOW MF, DUBOIS RN, COOK P, COFFEY RJ. Auto- and cross-induction within the mammalian epidermal growth factor – related peptide family. *J Biol Chem* 1994; **269**: 22817–22822.

- [4] BARRANDON Y, GREEN H. Cell migration is essential for sustained growth of keratinocyte colonies: the roles of transforming growth factor α and epidermal growth factor. *Cell* 1987; **50**: 131–1137.
- [5] BARTON CM, HALL PA, HUGHES CM, GULLICK WJ, LEMOINE NR. Transforming growth factor alpha and epidermal growth factor in human pancreatic cancer. *J Pathol* 1991; **163**: 111–116.
- [6] BOS JL. The ras family and human carcinogenesis. *Mutation Res* 1988; **195**: 255–271.
- [7] BOSENBERG MW, MASSAGUE J. Juxtacrine cell signaling, molecules. *Curr Opin Cell Biol* 1993; **5**: 832–838.
- [8] BJORGE JD, PATERSON AJ, KUDLOW JE. Phorbol ester or epidermal growth factor (EGF) stimulates the concurrent accumulation of mRNA or the EGF receptor and its ligand transforming growth factor-alpha in a breast cancer cell line. *J Biol Chem* 1989; **264**: 4021–4027.
- [9] BORLINGHAUS P, WIESER S, LAMERZ R. Epidermal growth factor, transforming growth factor-alpha and epidermal growth factor receptor content in normal and carcinomatous gastric and colonic tissue. *Clin Investig* 1993; **71**, **11**: 903–907.
- [10] BOYLE W. Growth factors and tyrosine kinase during development and cancer. *Curr Opinion in Oncology* 1992; **4**: 156–162.
- [11] BRACHMANN R, LINDQUIST PB, NAGASHIMI M, KOHR W, LIPARI T, NAPIER M, DERYNCK R. Transmembrane TGF- α precursors activate EGF/TGF α receptors. *Cell* 1989; **56**: 691–700.
- [12] BROWDER TM, DUNBAR CE, NIEHUIS AW. Private and public autocrine loops in neoplastic cells. *Cancer Cells* 1989; **1**: 9–17.
- [13] BRZOZOWSKI T, KONTUREK S, MAJKA J, DEMBIŃSKI A. Epidermal growth factor, polyamines and prostaglandins in healing of stress-induced gastric lesions in rats. *Dig Dis Sci* 1993; **38**, **2**: 276–283.
- [14] CANTLEY LC, AUGER KR, CARPENTER C, DUCKWORTH B, GRAZIANI A, KAPPELLER R, SOLTOFF S. Oncogenes and signal transduction. *Cell* 1991; **64**: 281–302.
- [15] CARRAWAY KI, CANTLEY LC. A Neu acquitance for erbB3 and erbB4: a role for receptor heterodimerization in growth signalling. *Cell* 1994; **78**: 5–8.
- [16] CARRAWAY KL, SLIWKOWSKI MX, AKITA R, PLATKO JV, NUSJENS A, DIAMONTI AJ, VANDLEN RL, CANTLEY LC. The rbB3 gene product is a receptor for heregulin. *J Biol Chem* 1994; **269**: 14303–14306.
- [17] CARPENLER G, WAHI MI. The epidermal growth factor family (w). Sporn MB, Roberts AB (wyd.) Handbook of experimental pharmacology Volume 851. Peptide growth factors and their receptors. Berlin. Springer Verlag, 1990; 69–171.
- [18] CELANO P, BERCHTOLD C, MABRY M, CARROLL M, SIDRANSKY D, CASERO R, LUPU R. Induction of markers of normal differentiation in human colon carcinoma cells by the v-ras oncogene. *Cell Growth & Differentiation* 1993; **4**: 341–347.
- [19] CIARDELLO F, HYNES N, KIM N, VALVERIUS E, LIPPMAN ME, SALOMON DS. Transformation of mouse mammary epithelial cells with the H-ras but not with the neu oncogene results in gene dosage-dependent increase in transforming growth factor-alpha production. *FEBS Lett* 1989; **250**: 474–478.
- [20] CIARDELLO F, KIM N, SAEKI T, DONO R, PERSICO MG, PLOWMAN GD, GAR-RIGUES J, RADKE S, TODARO GJ, SALOMAN DS. Differential expression of epidermal growth factor-related proteins in human colorectal tumors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; **88**: 7792–7796.
- [21] COFFEY RJ, SHIPLEY GD, MOSES HL. Production of transforming growth factors by human colon cancer lines. *Cancer Res* 1986; **46**: 1164–1169.
- [22] CONTEAS C, DESAI TK, ARLOW F. Relationship of hormones and growth factors to colon cancer. *Gastroenterol. Clin North Am* 1988; **17**, **4**: 7761–7724.

- [23] COOK PW, MATTOX PA, KEEBLE WE, PITTELKOW MR, PLOWMAN GD, SHOYAB M, ADELMAN JP, SHIPLEY G. A heparine sulfate-regulated human keratinocyte autocrine factors similar or identical to amphiregulin. *Mol Cell Biol* 1991; **11**: 2547–2557.
- [24] COOK P, PITTEKO M, KEEBLE W, GRAVES-DEAL R, COFFEY R jr. Amphiregulin messenger RNA is elevated in psoriatic epidermis and gastrointestinal carcinomas. *Cancer Res* 1992; **52**: 3224–3227.
- [25] CROSS H, QUARONI A. Inhibition of sucrase-isomaltase expression by EGF in the human colon adenocarcinoma cells Caco-2. *Am J Physiol* 1991; **261**: C1173–C1183.
- [26] CULOUSCOU JM, REMACLE-BONNETY M, GARROUSTE F, MARVALDI J, POMMIER G. Simultaneous production of IGF-I and EGF competing growth factors by HT-29 human colon cell line. *Int J Cancer* 1987; **40**: 646–652.
- [27] CULOUSCOU JM, GARROUSTE F, REMACLE-BONNET M, BETTETINI D, MARVALDI J, POMMIER G. Autocrine secretion of a colorectum-derived growth factor by HT-29 human colon carcinoma cell line. *Int J Cancer* 1988; **42**, 895–901.
- [28] CULOUSCOU J, REMACLE-BONNET M, CARITON G, PLOWMAN G, SHOYAB M. Colorectum cell-derived growth factor (CRDGF) is homologous to amphiregulin, a member of the epidermal growth factor family Growth Factors. 1992; **7**: 195–205.
- [29] DECKER SJ. Epidermal growth factor and transforming growth factor- α induce differential processing of epidermal growth factor receptor. *Biochem Biophys. Res Commun* 1990; **166**: 615–621.
- [30] DELARCO JE, TODARO GJ. Growth factors from murine sarcoma-transformed cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1978; **75**: 4001–4005.
- [31] DERYNCK R. The physiology of transforming growth factor-alpha. *Adv Cancer Res* 1992; **58**: 27–52.
- [32] DLUZ SM, HIGASHIYAMA SM, DAMM D, ABRAHAM JA, KLAGSBRUN M. Heparin-binding epidermal growth factor-like growth expression in cultures of fetal human vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* 1993; **268**: 18330–18334.
- [33] DOBASHI Y, STERN DF. Membrane anchored forms of EGF stimulate focus formation and intercellular communication. *Oncogene* 1991; **6**: 1151–1159.
- [34] DOWNWARD J, YARDEN Y, MAYES E i wsp. Close similarity of epidermal growth factor receptor and the v-erbB oncogene protein sequences. *Nature* 1984; **307**: 521–527.
- [35] DURRANT LG, WATSON SA, HALL A, MORRIS DZ. Co-stimulation of gastrointestinal tumor cell growth by gastrin, TGF-alpha and JGF-I. *Br J Cancer* 1991; **63**: 67–70.
- [36] EBERT KM, LOW MJ, OVERSTROM EW. A Moloney MLV-rat somatotropin fusion gene produces biologically active somatotropin in transgenic pig. *Mol Endocrinol* 1988; **2**: 277–283.
- [37] EBNER R, DERYNCK R. Epidermal growth factor and transforming growth factor- α differential intracellular routing and processing of ligand-receptor complexes. *Cell Regul* 1991; **2**: 599–612.
- [38] ELLIS C, MORAN M, MCCORMICK F, PASON T. Phosphorylation of GAP and GAP-associated proteins by transforming and mitogenic tyrosine kinases. *Nature* 1990; **343**: 3771–3821.
- [39] FOWLER JE, LAU JT, GHASH L, MILLS SE, MOUNZER A. Epidermal growth factor and prostatic carcinoma an immunohistochemical study. *J Urology* 1988; **139**: 857–861.
- [40] GAWLIK P, GNIADKOWSKI M. Onkogeny kodujące elementy układu czynnik wzrostowy/ receptor. *Post Bioch* 1992; **38**: 6–12.
- [41] GLENNEY JR. Tyrosine-phosphorylated proteins: mediators of signal transduction from the tyrosine kinases. *Biochim Biophys Acta* 1992; **1134**: 113–127.
- [42] GOODLAND R, WRIGHT N. Growth factors in the gastrointestinal tract. *Balliere's Clin Gastroenterol* 1990; **4**: 97–118.

- [43] GOODLAND RA, MADGWICK AJA, MOFFATT MR, LEVIN S, ALLEN JI, WRIGHT NA. Prostaglandins and the gastric epithelium, effect of misoprostol on cell migration and transit in dog stomach. *Gastroenterology* 1990; **96**: 1–6.
- [44] GREGORY H. Isolation and structure of urogastrone and its relationship to epidermal growth factor. *Nature* 1975; **257**: 325–327.
- [45] GANGAROSA LM, GRAVES-DEAL R, COFFEY RJ. The epidermal growth factor family in ras transformed rat intestinal cells. *Gastroenterology* 1995; **108**: 4, suppl. A: 969.
- [46] GROSS M, ZOBAS M, DANELS Y, GARCIA R, GALLICK GE, OLIVE M, BRATTAIN MG, BOMAN B, YEOMAN L. Cellular growth response to epidermal growth factor in colon carcinoma cells with an amplified epidermal growth factor receptor derived from familial adenomatous polyposis patient. *Cancer Res* 1991; **51**: 1452–1459.
- [47] GULLICK W. Inhibitors of growth factor receptors. (w) Genes and Cancer. Carney D, Sikora K (ed) Chichester, UK, Wiley, 1990, 263–273.
- [48] HAMILTON S. The molecular genetics of colorectal neoplasia. *Gastroenterology* 1993; **105**: 7–21.
- [49] HANAHAN D. Transgenic mice as probes into complex systems. *Science* 1989; **246**: 1265–1275.
- [50] HIGASHIYAMA S, ABRAHAM JA, MILLER J, FIDDES JC, KLAGSBRUN M. A heparin-binding growth factor secreted by macrophage-like cells that is related to EGF. *Science* 1991; **251**: 936–939.
- [51] HOMMEL U, DUDGEON TJ, FALLON A, EDWARDS RM, CAMPBELL A. Structure-function relationships in human epidermal growth factor studied by site-directed mutagenesis and H NMR. *Biochemistry* 1991; **30**: 8891–8898.
- [52] HORI R, NOMURA H, IWAKAWA S, OKUMURA K. Characterization of epidermal growth factor receptors on plasma membranes isolated from rat gastric mucosa. *Pharmaceutical Res* 1990; **7**: 665–669.
- [53] HUANG S, TRUJILLO M, CHAKRABARTY S. Proliferation of human colon cancer cells: role of epidermal growth factor and transforming growth factor alpha. *Int J Cancer* 1992; **52**: 978–986.
- [54] IWASHITA S, KOBAYASHI M. Signal transduction system for growth factor receptors associated with tyrosine kinase activity. *Cellular Signalling* 1992; **4**: 123–131.
- [55] JHAPPAN C, STAHL C, HANKINS R, FAUSTO N, SMITH G, MERLINO GT. TGF-alpha overexpression in transgenic mice induces liver neoplasia and abnormal development of the mammary gland and pancreas. *Cell* 1990; **61**: 1137–1146.
- [56] JOHNSON GR, SAEKI T, AUERSBERG N, GORDON AW, SHOYAB M, SALOMON DS, STROMBERG K. Response to and expression of amphiregulin by ovarian carcinoma and normal surface epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1991; **180**: 481–488.
- [57] KAJIKAWA K, YASUI W, SUMIYOSHI H, YOSHIDA K, NAKAYAMA H, AYHAN A, YOKOZAKI H, ITO H, TAHARA E. Expression of epidermal growth factor in human tissues. immunohistochemical and biochemical analysis. *Virchows Arch A: Pathol Anat* 1991; **418**: 27–32.
- [58] KAPITANOVIC S, SPAVENTI R, POLJAK L, KAPITANOVIC M, PAVELIC Z, GLUCKMAN J, SPAVENTI S, PAVELIC K. High c-erbB-2 protein level in colorectal adenocarcinomas correlates with clinical parameters. *Cancer Detection and Prevention* 1994; **18**: 97–101.
- [59] KARNES WE. Epidermal growth factor and TGF- α . (w) Gut peptides: biochemistry and physiology. Walsh JH, Dockry GJ (ed) Raven, New York, 1994, 553–586.
- [60] KIMURA H, FISHER W, SCHUBERT D. Structure, expression and function of a schwannoma-derived growth factor. *Nature* 1990; **348**: 257–260.
- [61] KLEIN A. Peptydy jako nośniki informacji biologicznej. *Post Bioch* 1993; **20**, suppl 3–12: 125–150.

- [62] KOMMOS F, WINTZER HO, von KLEIST S, KOHLER M, WALKER R, LANGTON B, BAUKNECHT T. *In situ* distribution of transforming growth factor alpha in normal human tissues and in malignant tumours of the ovary. *J Pathol* 1990; **162**: 223–230.
- [63] KOYANA SY, PODOLSKY DK. Differential expression of transforming growth factors alpha and beta in rat intestinal epithelial cells. *J Clin Invest* 1989; **83**: 1768–1773.
- [64] KRAUS MH, ISSING W, MIKI T, POPESCU NC, AARONSON SA. Isolation and characterisation of ERBB3, a third member of ERBB/epidermal growth factor receptor family evidence for overexpression in a subset of human mammary tumours. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; **86**: 9193–9197.
- [65] LEVIN D, ERREDE B. Multitude of MAP kinase activation pathways. *J NIH Res* 1993; **5**: 49–52.
- [66] LIPKIN M. Biomarkers of increased susceptibility to gastrointestinal cancer; a new application to studies of cancer prevention. *Cancer Res* 1988; **48**: 235–245.
- [67] LIU C, WOO A, TSAO MS. Expression of transforming growth factor alpha in primary colon and lung carcinomas. *Br J Cancer* 1990; **62**: 425–429.
- [68] LIU GL, ZHANG WD, ZHOU DY. Epidermal growth factor enhance the effect of DMH in induction of colorectal cancer in Wistar rat. World Congresses of Gastroenterology Los Angeles, USA, October 2–7, 1994, Abstract I, 1527 P.
- [69] LOGAN A. Intracrine regulation at the nucleus. *J Endocrinol* 1990; **125**: 339–343.
- [70] LUETTEKE NC, QUI TH, PEIFFER RL, OLIVER P, SMITHIES O, LEE DC. TGF- α deficiency results in hair follicle and eye abnormalities in targeted and waved-1 mice. *Cell* 1993; **73**: 263–278.
- [71] MAŁECKA-PANAS E, MEAHN, TUREAUD J, RELAN NK, MAJUMOAR APN. Increased activation of EGF-R tyrosine kinase and phospholipase C by EGF and TGF-alpha in colonic mucosa of aged rats. *Gastroenterology* 1994; **106**: A 620.
- [72] MANN GB, FOWLER KJ, GABRIEL A, NICE EC, WILLIAMS RL, DUNN AR. Mice with a null mutation of the TGF- α gene have abnormal skin structure, wavy hair and curly whiskers and often develop corneal inflammation. *Cell* 1993; **73**: 249–261.
- [73] MARKOWITZ SD, MOKKENTIN K, GERBIC C, JACKSON J, STELLATO T, WILSON JKV. Growth stimulation by coexpression of transforming growth factor-alpha and epidermal growth factor-receptor in normal and adenomatous human colon epithelium. *J Clin Invest* 1990; **86**: 356–362.
- [74] MARSHALL CJ. Specificity of receptor tyrosine kinase signalling: transient versus sustained extracellular signal-regulated kinase activation. *Cell* 1995; **80**: 179–185.
- [75] MARSHALL CJ. Tumor suppressor genes. *Cell* 1991; **64**: 313–323.
- [76] MASSAGUE J. Transforming growth factor-alpha: a model for membrane-anchored growth factors. *J Biol Chem* 1990; **265**: 21393–21396–26.
- [77] MAŁECKA-PANAS E, FLIGIEL S, MEAH N, DINDA J, DUTTA S, MAJUMDAR APN. Azoxymethane enhances ligand-induced activation of EGF—receptor tyrosine kinase in colonic mucosa of rats. *Carcinogenesis* w druku.
- [78] MINAMOTO T, YAMASHITA N, OCHIAI A, MAI M, SUGIMURA T, RONAI Z. Mutant K-ras in apparently normal mucosa of colorectal cancer patients. *Cancer* 1995; **75**: 1520–1526.
- [79] MERLINO GT. Epidermal growth factor receptor regulation and function. *Semin Cancer Biol* 1990; **1**: 277–284.
- [80] MOSHIER J, MAŁECKA-PANAS E, DOSESCU J, GENG H, TUREAUD J, SKUNCA M, MAJUMDAR APN. Ornithine decarboxylase induced transformation of NIH/3T3 cells is mediated by epidermal growth factor receptor activation. *Cancer Res* w druku.
- [81] MULDER KM, CHILDRRESS FIELDS KE. Characterization of a serum-free culture system comparing growth factor requirements of transformed and untransformed cells. *Exp Cell Res* 1990; **188**: 254–261.

- [82] NABER SP. Molecular pathology-detection of neoplasia. *N Engl J Med* 1994; **331**, 22: 1508–1511.
- [83] NORMANNO N, BIANCO AR, DAMIANO V, SALOMON DS, CIARDELLO F. Growth inhibition of human colon carcinoma cells by anti-EGF-related growth factors antisense oligonucleotides. *Proc Am Assoc Cancer Res* 1995; **36**: 431.
- [84] NORMANNO N, SELVAM MP, QI C, SAEKI T, JOHNSON G, JOHNSON G, KIM N, CIARDELLO F, SHOYAB M, PLOWMAN G, BRANDT R, TODARO G, SALOMAN DS. Amphiregulin as an autocrine growth factor for c-Ha-ras and c-erbB-2-transformed human mammary epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; **91**: 2790–2794.
- [85] O'BRIEN F, COLLINS JK, HERLIHY S, SHANAHAN F, O'SLLIVAN GC. Urinary transforming growth factor activity: a marker of gastrointestinal malignancy. *Gastroenterology* 1995; **108**: 4, suppl, A 518.
- [86] PLOWMAN GD, COLOUSCOU JM, WHITNEY GS, GREEN JM, CARLTON GW, FOY L, NEUBAUER MG, SHOYAB M. Ligand specific activation of HER/p180, a fourth member of the epidermal growth factor receptor family. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; **90**: 1746–1750.
- [87] PLOWMAN GD, GREEN JM, COLOUSCOU JM, CARLTON GW, ROTHWELL VM, BUCKLEY S. Heregulin induces tyrosine phosphorylation of HER/p180 erbB4. *Nature* 1993; **366**: 373–475.
- [88] PODOLSKY D. Peptide Growth Factors in the Gastrointestinal Tract. *Regulatory Peptide Lett* 1993; **5**: 10–17.
- [89] PRIGENT S, LEMOINE N. The type 1 (EGF-related) family of growth factor receptors and their ligands. *Progress in Growth Factor Res* 1992; **4**: 1–24.
- [90] RAJAGOPAL S, CHAKRABARTY S, UT MD. Epidermal growth factor expression in human colon and epidermal tumors, antiproliferative effect of antisense epidermal growth factor receptor RNA. *Proc Am Assoc Cancer Res* 1995; **36**: 168.
- [91] RESH M. Interaction of tyrosine kinase oncoproteins with cellular membranes. *Biochim Biophys Acta* 1993; **1153**: 307–322.
- [92] RUPNIEWSKA Z. Przepuszczalne mechanizmy działania niektórych produktów wirusowych genów "onc". *Post Biol Kom* 1985; **12**: 99–120.
- [93] SAEKI T, LYNCH M, PELOSI L, CARBONI J, MERWIN J, COLEMAN K, WANG R., HENRY D, BRATTAIN M. TGF-beta induces TGF-alpha promoter activity and TGF-alpha secretion in human colon adenocarcinoma cell line FET. *Cancer Res* 1993; **53**: 4041–4047.
- [94] SAEKI T, CISTIANO A, LYNCH M, BRATTAIN M, KIM N, NORMANNO N, KENY N, CIRDELLO F, SALOMON DS. Regulation by estrogen through the 5'-flanking region of the TGF-alpha gene. *Mol Endocrinol* 1991; **5**: 955–1963.
- [95] SANDGREN EP, LUETTEKE NC, PALMITER RD, BRINSTER RL. Overexpression of TGF-alpha in transgenic mice: induction of epithelial hyperplasia, pancreatic metaplasia and carcinoma of the breast. *Cell* 1990; **61**: 1121–1135.
- [96] SASADA R, ONO Y, TANIYAMA Y, SHING Y, FOLKMAN J, IGARISHI K. Cloning and expression of cDNA encoding human betacellulin, a new member of the EGF family. *Biochem Biophys Res Commun* 1993; **190**: 1173–1179.
- [97] SAVAGE CR, INAGAMI T, COHEN S. The primary structure of epidermal growth factor. *J Biol Chem* 1972; **247**: 7612–7621.
- [98] SCHLESSINGER J, ULLRICH A. Growth factor signalling by receptor tyrosine kinase. *Neuron* 1992; **9**: 383–391.
- [99] SCOTT N, QUIRKE P. Molecular biology of colorectal neoplasia. *Gut* 1993; **34**: 289–292.
- [100] SHOYAB M, MCDONALD VL, BRADLEY JT, TODARO GJ. Amphiregulin: a bifunctional growth-modulating glycoprotein produced by the phorbol 12-myristate 13 acetate treated human breast carcinoma cell line MCF-7. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; **85**: 6528–6532.
- [101] SIDRANSKY D, TOKINO T, HAMILTON SR i wsp. Identification of ras oncogene mutations in the stool of patients with curable colorectal tumors. *Science* 1992; **256**: 102–105.

- [102] SIZELAND AM, BURGESS AW. Anti-sense transforming growth factor a inhibit autocrine stimulated proliferation of a colon carcinoma cell line. *Mol Biol Cell* 1992; **3**: 1235–1243.
- [103] SLIWKOWSKI MX, SCHAEFER G, AKITA RK, LOFGREN JA, CARRAWAY KL. Coexpression of erbB2 and erbB3 proteins reconstitutes a high affinity receptor for heregulin. *J Biol Chem* 1994; **269**: 14661–14665.
- [104] SPORN MB, ROBERTS AB. People Growth factors and their receptors. Wyd. New York: Springer-Verlag, 1991.
- [105] SPORN MB, ROBERTS AB. Peptide growth factors are multifunctional, *Nature* 1988; **332**: 217–219.
- [106] SPORN MW, ROBERTS AB. Autocrine secretion-10 years later. *Ann Intern Med* 1992; **117**: 408–414.
- [107] SPURR N. Molecular genetic approaches to the analysis of colorectal cancer. *Balliere's Clin Gastroenterol* 1990; **4**: 171–189.
- [108] SUGIYAMA K, YONEMURA Y, MIYAZAKI I. Immunohistochemical study of epidermal growth factor and epidermal growth factor receptor in gastric carcinoma. *Cancer* 1989; **63**: 1557–1561.
- [109] TANAKA S, IMANISHI K, YOSHIHARA M, HARUMA K, SUMII K, KAJIYAMA G, AKAMATSU S. Immunoreactive transforming growth factor-alpha is commonly present in colorectal neoplasia. *Am J Pathol* 1991; **139**: 123–129.
- [110] TOLIZER DH, YOSHIZUMI M, PERELLA MA, SUSANNI EE, QUERTERMOUS T, LEE ME. Induction of heparin-binding epidermal growth factor factor-like growth factor mRNA by phorbol ester and angiotensin II in rat aortic smooth muscle cells. *J Biol Chem* 1992; **267**: 24892–24896.
- [111] THOMAS DM, NASIM MM, GULLICK WJ i wsp. Immunoreactivity of transforming growth factor alpha in the normal adult gastrointestinal tract. *Gut* 1992; **33**: 628–631.
- [112] TODARO GJ, ROSE TM, SPOONER TM, SHOYAB M, PLOWMAN GD. Cellular and viral ligands that interact with the EGF receptor. *Semin Cancer Biol* 1990; **1**: 257–263.
- [113] ULRICH A, SCHLESSINGER J. Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity. *Cell* 1990; **61**: 203–212.
- [114] UNTAWALE S, ZORBAS M, HODGSON C, COFFEY R, GALLICK G, NORTH S, WILDRICK D, OLIVE M, BLICK M, YEOMAN L, BOMAN B. Transforming growth factor-alpha production and autoinduction in a colorectal carcinoma cell line (DiFi) with an amplified epidermal growth factor receptor gene. *Cancer Res* 1993; **53**: 1630–1636.
- [115] WASYLYSHYN ML, WESTBROOK CA. Genetic abnormalities of colorectal carcinoma. *Hepatogastroenterol* 1992; **39**: 226–231.
- [116] WINKLER ME, O'CONNOR L, WINGET M, FENDLY B. Epidermal growth factor and transforming growth factor- α bind differently to the epidermal growth factor receptor. *Biochemistry* 1989; **28**: 6373–6378.
- [117] WONG ST, WINCHELL LF, MCCUNE BK, EARP HS, TEIXIDO J, MASSAGUE J, HERMAN B, LEE DC. The TGF- α precursor expressed on the cell surface binds to the EGF receptor on adjacent cells, leading to the signal transduction. *Cell* 1989; **56**: 495–506.
- [118] YASUI W, JI Z-Q, KUNIYASU H, AYHAN A, YOKOZAKI H, ITO H, TAHARA E. Expression of transforming growth factor alpha in human tissues: immunohistochemical study and Northern blot analysis. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol* 1992; **421**: 513–519.

Otrzymano: 10.09.1995 r.

Przyjęto: 20.11. 1995 r.

Adres autora: Klinika Przewodu Pokarmowego i Przemiany Materii AM, 90-153 Łódź, ul. Kopcińskiego 22.

PTHrP (PARATHYROID HORMONE-RELATED PEPTIDE) – NOWY PEPTYDOWY HORMON O WIELU FUNKCJACH*

PTHrP – PARATHYROID HORMONE-RELATED PEPTIDE – A NEW MULTIFUNCTIONAL PEPTIDE HORMON

Mirosław SOPEL, Maciej MURAWSKI, Maciej ZABEL

Katedra i Zakład Histologii i Embriologii AM we Wrocławiu oraz Katedra i Zakład
Histologii i Embriologii AM w Poznaniu

Streszczenie: Parathyroid hormone-related peptide (PTHrP) został zidentyfikowany w 1987 w wyniku badań nad humoralną hiperkalcemią towarzyszącą nowotworom (*Humoral Hipercalcemia of Malignancy – HHM*). Ten nowo odkryty czynnik regulacji gospodarki wapniowej został wyizolowany i oczyszczony z guzów nowotworowych, określono strukturę genu, złożone mechanizmy regulacji jego ekspresji, sekwencję aminokwasów oraz mechanizmy potranslacyjnej obróbki peptydu. N-koniec peptydu PTHrP posiada duże podobieństwo z parathormonem i działa poprzez wspólny receptor PTH/PTHrP związany z białkiem G, aktywując jednocześnie dwa szlaki transdukcji sygnału poprzez cyklazę adenylową i fosfolipazę C. W wyniku wiązania z receptorami osteoblastów i kanalików nerki, powoduje resorpcję kości i zatrzymanie jonów wapnia, podwyższając jego stężenie w osoczu krwi. PTHrP oraz matrycowe RNA dla PTHrP i jego receptora zostało zlokalizowane w wielu różnorodnych tkankach innych niż docelowe tkanki parathormonu (PTH) wskazując na udział PTHrP w wielu istotnych procesach fizjologicznych. Liczne badania wskazują, że PTHrP w drodze parakrynowej lub autokrynowej bierze udział w regulacji wzrostu i różnicowania w okresie zarodkowym, płodowym i życiu dorosłym, w transporcie jonów wapnia przez nabłonki w różnych narządach oraz w relaksacji mięśni gładkich.

Słowa kluczowe: Parathyroid Hormone-Related Peptide (PTHrP), humoralna hiperkalcemia towarzysząca nowotworom

Summary: Parathyroid hormone-related peptide (PTHrP) has been identified in 1987 as a result of studies on humoral hypercalcemia of malignancy (HHM). The newly discovered factor of calcium metabolism control has been isolated and purified from neoplasma. Structure of the corresponding gene has been defined as well as the complex regulation mechanisms of its expression, amino acid sequence and mechanisms of post-translational processing of the peptide. N-terminal part of the PTHrP significantly

*Praca finansowana w ramach działalności statutowej AM Wrocław

resembles parathormone and acts through the common PTH/PTHrP receptor. The receptor is linked with protein G, activating in parallel two signal transduction pathways mediated by, respectively, adenylyl cyclase and phospholipase C. As a result of binding with the receptors on osteoblasts and on renal tubules, the hormone induces bone resorption and calcium ion resorption, thus augmenting calcium level in plasma. PTHrP as well as template RNAs for PTHrP and for its receptor have been localized in a wide spectrum of tissues distinct from target tissues for PTH, pointing to participation of PTHrP in many significant physiological processes. Numerous studies indicate that, acting on a paracrine or an autocrine way, PTHrP participates in growth and differentiation control during embryonal, fetal life and in life of mature individuals, in calcium ion transport across epithelia in various organs and in relaxation of smooth muscles.

Key words: Parathyroid hormone-related peptide (PTHrP) – humoral hypercalcemia of malignancy

Wykaz używanych skrótów: HHM – humoralna hiperkalcemia towarzysząca nowotworom, PTH – parathormon, PTHrP – parathyroid hormone-related peptide

Parathyroid hormone related protein (PTHrP) został wyizolowany z ludzkich guzów nowotworowych pobranych od pacjentów z objawami humoralnej hiperkalcemii towarzyszącej nowotworom (*humoral hypercalcemia and malignancy* – HHM).

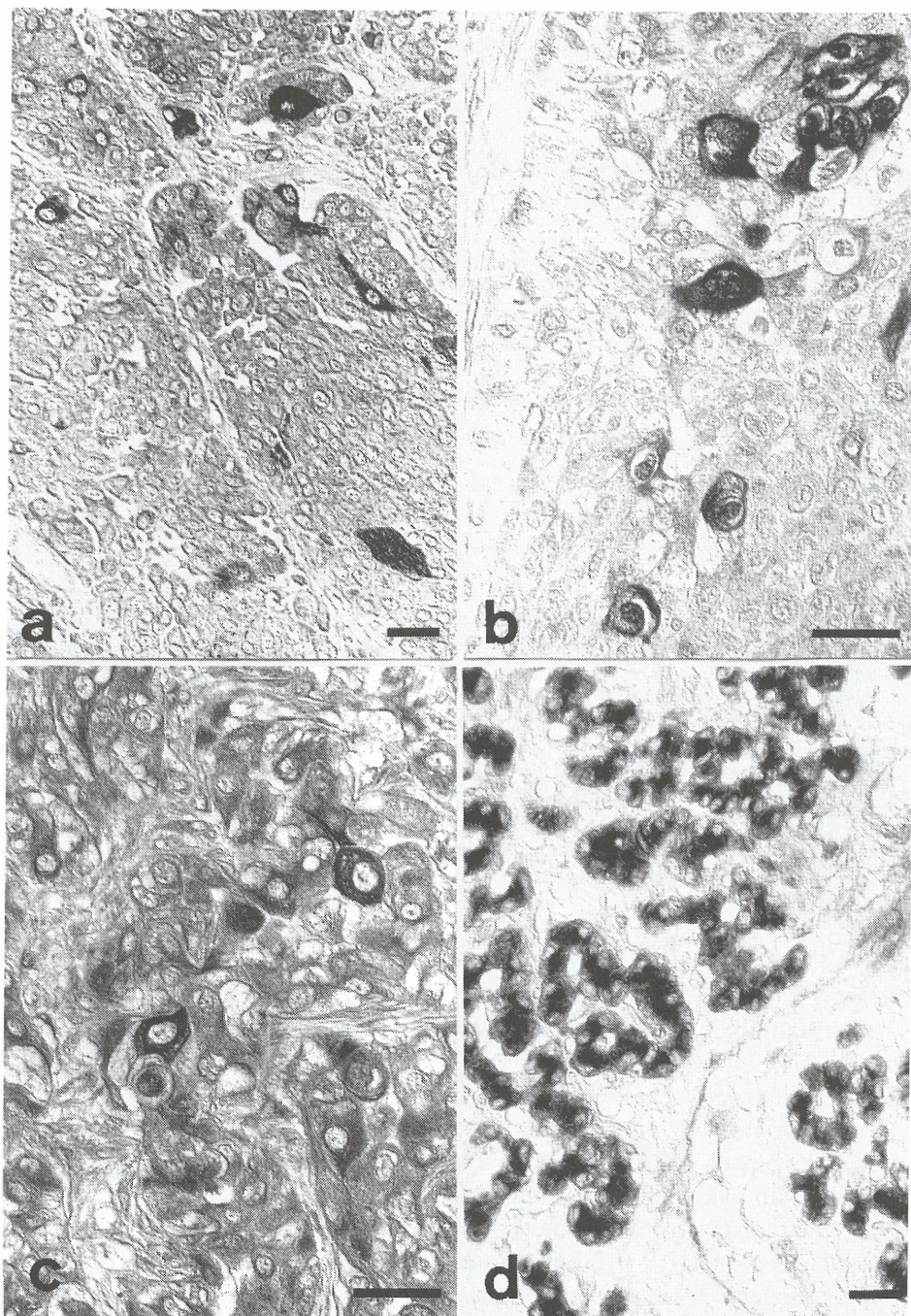
Wśród kilku proponowanych mediatorów HHM, takich jak prostaglandyny E_2 , czynniki wzrostu, Interleukina-1 i PTHrP, tylko ten ostatni uważany jest obecnie za podstawowy czynnik odpowiedzialny za ten syndrom i wykazuje bioaktywność ściśle korelującą z parathormonem (PTH) [7, 21, 37, 87].

Obecnie, zarówno peptyd PTHrP, jak i jego mRNA zostały wykryte w wielu normalnych tkankach zarówno zwierzęcych, jak i ludzkich, wliczając w to tak różne narządy, jak gruczoł mlekowy, łożysko, naskórek, kości, macica, ośrodkowy układ nerwowy, nerki i przytarczycy [23, 40, 58, 69, 74, 83]. Na podstawie dotychczas uzyskanych informacji można stwierdzić, że hormon ten oprócz działania endokrynowego działa także jako czynnik parakrynowy lub autokrynowy w regulacji wielu istotnych procesów fizjologicznych, wśród których należy wymienić takie, jak: wzrost i różnicowanie, homeostaza i transport jonów wapnia przez nabłonki oraz relaksacja mięśni gładkich [11].

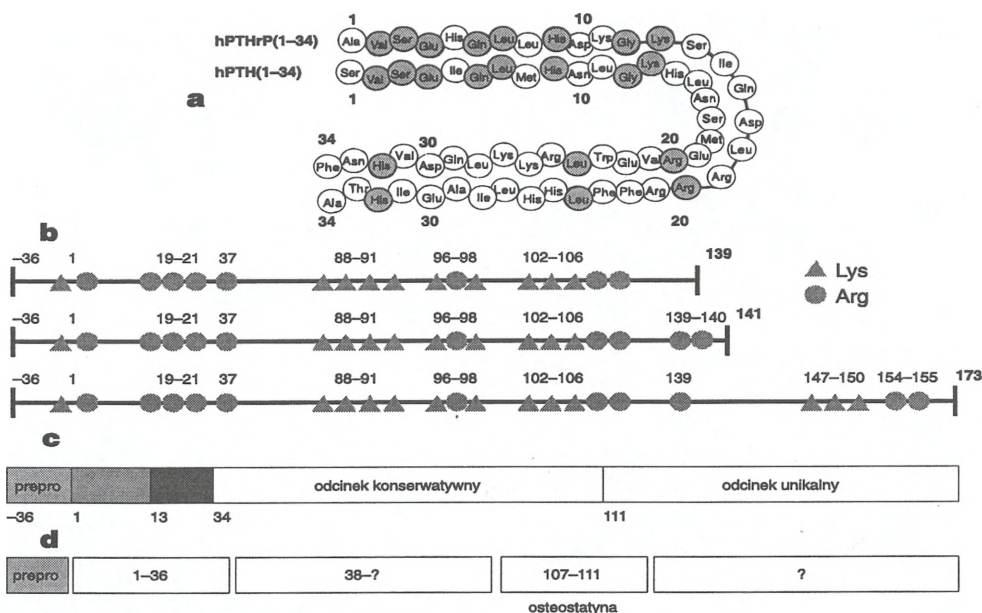
GEN PTHrP I JEGO EKSPRESJA

Ludzki gen PTHrP jest pojedynczym genem złożonym, umiejscowionym na krótkim ramieniu chromosomu 12, w analogicznej pozycji jak gen dla PTH na chromosomie 11 [35, 36, 67]. Wydaje się, że geny kodujące te dwa peptydy należą do jednej rodziny genów wywodzących się od wspólnego prekursora. Gen PTHrP mógł powstać wskutek duplikacji, w wyniku czego struktura genu PTHrP stała się bardziej złożona niż genu PTH [81]. Ponadto gen PTH wykazuje ekspresję jedynie w przytarczycach, podczas gdy transkrypty genu PTHrP zostały zidentyfikowane nie tylko w guzach nowotworowych, lecz także w licznych normalnych tkankach (rys. 1).

Gen PTHrP składa się z dziewięciu egzonów, z których jedynie dwa występują jako niezmienione w transkryptach PTHrP. Pozostałe siedem egzonów może być reprezentowanych w mRNA dla PTHrP w zmiennych złożeniach jako rezultat alternatywnego składania i przekształcania, co umożliwi powstanie około 15 różnych



Rys. 1. Przykładowa lokalizacja PTHrP w ludzkich tkankach: reakcja immunocytochemiczna z przeciwciałami skierowanymi przeciwko aminokwasom 8–15 cząsteczki PTHrP; pojedyncze immunoreaktywne komórki obserwuje się w raku rdzeniastym tarczycy (a) i w raku kolczystokomórkowym skóry (b); w raku nerki PTHrP jest obecne we wszystkich komórkach w różnych ilościach; w normalnej przytarczycy wszystkie komórki gruczołowe wykazują podobne nasilenie reakcji (d); linia w prawych narożnikach odpowiada 50 μm



Rys. 2. Schemat struktury cząsteczki PTHrP: a – pierwszorzędowa struktura N-końca cząsteczki PTHrP i odpowiadającego odcinka PTH, odcinek aminokwasów 1–13 wykazuje 70% homologię, identyczne aminokwasy zaznaczone na szaro; b – pokazano trzy produkty translacji genu PTHrP o zróżnicowanej długości, każdy z nich ma 36-aminokwasową sekwencję prepro, za którą następuje 139 identycznych aminokwasów, każda z tych izoform ma inny koniec karboksylowy, zaznaczone są miejsca umożliwiające potranslacyjną obróbkę polipeptydu; c – przedstawiono domeny funkcjonalne cząsteczki PTHrP – -36 do 1 sekwencja prepro, 1–13 sekwencja homologiczna w 70% z częścią PTH, odcinek 13–34 II- i III-rzędową strukturą naśladującą cząsteczkę PTHrP, 35–111 wysoce konserwatywny odcinek cząsteczki wykazujący niewielką zmienność gatunkową, dalszy końcowy odcinek charakteryzuje się dużą zmiennością; d – pokazano udokumentowane odcinki PTHrP powstałe w wyniku potranslacyjnej modyfikacji

transkryptów [17]. Technika immunoblotingu wykazano obecność trzech do pięciu produktów transkrypcji o zróżnicowanej wielkości od 1,6 do 4,2 kb [35]. Gen PTHrP ma trzy strukturalnie różniące się promotory, dwa o strukturze TATA i jeden bogaty w zasady GC, które podlegają odmiennym mechanizmom regulacji. Gen PTHrP posiada charakterystyczną sekwencję nukleotydów (bogata w powtarzające się kopie); podobne motywy nukleotydów występują również w genach cytokin i licznych protoonkogenach. Wspólną cechą tych genów jest indukcja przez czynniki wzrostowe, lub cykloheksamidy oraz relatywnie krótko żyjące mRNA, bogate w liczne kopie powtarzającego się motywu nukleotydów AU [17, 22].

Ekspresja genu PTHrP jest regulowana głównie na poziomie transkrypcji. Wykazano, że mitogeny, takie jak interleukina 2, czynniki wzrostu TGF- β , IGF-I, EGF, działają jako pozytywne stymulatory ekspresji genu PTHrP. Wykazano ponadto, że ekspresja genu PTHrP istotnie wzrasta w komórkach transformowanych onkogenami EJ-Ha-ras i v-src [16, 19, 33]. W badaniach *in vitro* keratynocytów, ludzkich linii

komórek neuroendokrynowych wywodzących się z raka rdzeniastego tarczycy oraz w pierwotnych hodowlach gruczołu mlekowego i transformowanych wirusem HTLV limfocytach T wykazano hamujący wpływ na ekspresję genu PTHrP aktywnej formy witaminy D3 kalcitriolu i jej syntetycznych analogów oraz glikokortykoidów (hydrokortyzon, deksametazon) [22, 33]. Hamujący wpływ witaminy D3 na transkrypcję genu PTHrP wydaje się być realizowany w podobny sposób jak w genie PTH przez obecność w rejonie promotora negatywnych sekwencji odpowiedzi hormonalnej na kalcitriol (VDRE), co potwierdzałoby ewolucyjne pokrewieństwo tych dwóch genów. Wpływ glikokortykoidów na transkrypcję genu PTHrP sugeruje również prawdopodobieństwo występowania w obrębie promotora odpowiedniej negatywnej sekwencji odpowiedzi hormonalnej [22, 33].

Tkankowo specyficzna ekspresja mRNA swoistego dla PTHrP, w wielu tkankach normalnych i zmienionych nowotworowo, wykazała obecność mRNA kodującego 3 izoformy peptydu, różniące się długością łańcucha, zawierające odpowiednio 139, 141 i 173 aminokwasy [35, 39]. Sekwencje te poprzedzone są wspólną dla tych trzech izoform sekwencją “prepro” (aminokwasy w pozycji -36 do 1), pozostałe aminokwasy aż do aminokwasu w pozycji 136 są identyczne, tak więc poszczególne izoformy różnią się jedynie końcem karboksylowym [rys. 2b]. Ludzkie tkanki i guzy nowotworowe wykazujące ekspresję PTHrP mogą zawierać wszystkie trzy transkrypty, lecz niektóre tkanki wykazują preferencyjną ekspresję poszczególnych izoform [5, 35, 69]. Fizjologiczne uzasadnienie występowania tych trzech transkryptów, decyzje kierujące przekształceniami i składaniem RNA nie są znane [80]. Trzy izoformy peptydu posiadają charakterystyczne układy aminokwasów typowe dla innych neuroendokrynowych peptydów, prawdopodobnie umożliwiające potranslacyjną modyfikację PTHrP. Dublet aminokwasów arginina-lizyna w pozycji -1 i -2 jest miejscem odcięcia prepropeptydu identycznym jak w przypadku priopromelanokortyny (POMC), parathormonu (PTH) oraz wielu innych peptydów o działaniu neuroendokrynowym [64]. Arginina w pozycji 37 jest miejscem potranslacyjnej modyfikacji PTHrP, identycznym do opisanej w przypadku wielu neurohormonów. Cięcie w pozycji Arg³⁷ prowadzi do powstania PTHrP 1–36 i regionu środkowego rozpoczynającego się przy aminokwasie 38, a kończącego na aminokwasie 88 do 111. Odcinek peptydu 88–106 posiada liczne sekwencje umożliwiające endoproteolityczną modyfikację i wytwarzanie PTHrP o różnych końcach aminowych, które mogą podlegać wielorodnym potranslacyjnym modyfikacjom [63].

Odcinek dojrzałego peptydu 1–36 naśladuje działanie parathormonu. Odcinek zawierający aminokwasy 1–13 jest w 70% homologiczny z odpowiednim rejonem PTH i jest odpowiedzialny za występowanie objawów HHM (rys. 2a). Homologia N-końca PTHrP i PTH wydaje się tłumaczyć fakt działania PTHrP przez te same receptory co parathormon (PTH) [27,49]. Potwierdzono to eksperymentalnie wykazując, że syntetyczny N-końcowy fragment PTHrP wiąże się specyficznie z receptorami PTH [48].

Odcinek środkowy zawierający aminokwasy 38–111 jest wysoce konserwatywny gatunkowo (rys. 2c) [80]. Syntetyczny peptyd odpowiadający temu odcinkowi stymuluje transport jonów wapnia przez łożysko z matki do płodu. [9]. Odcinek karboksy-

lowy peptydu zawiera wysoce konserwatywną sekwencję aminokwasów w pozycji 107–111 i uzyskuje się go po proteolitycznym trawieniu propeptydu w pozycji 102–106. PTHrP (107–111) obecny jest w osoczu pacjentów z chroniczną niewydolnością nerek i u pacjentów z objawami HHM [63]. Syntetyczny odcinek PTHrP 107–111 jest inhibitorem aktywności osteoklastów i nazywany jest osteostatyną (rys. 2d)[14,15].

Końcowy karboksylowy odcinek peptydu (pozycja 141–173) kodowany przez egzon 5 ludzkiego genu PTHrP jest sekwencją specyficzną dla ludzkiego PTHrP nieobecną w genie PTHrP myszy, szczurów i kurcząt [63, 80].

Koniec 3' każdego z trzech mRNA swoistych dla trzech izoform PTHrP zawiera charakterystyczny motyw AUUUA, typowy dla wielu neurohormonów peptydowych, umożliwiający potranslacyjną regulację ekspresji mRNA. Potranslacyjna modyfikacja PTHrP jest procesem złożonym i specyficznym dla danego typu komórki oraz poszczególnych izoform peptydu. W wyniku działania endopeptydazy przy Arg³⁷ powstaje N końcowy peptyd 1–36 i odcinek środkowy rozpoczynający się od 38 aminokwasu (Ala³⁸). Glikozylowany N-koniec 1–36 PTHrP i odcinek środkowy zawierający około 60 aminokwasów są formami sekrecyjnymi PTHrP (rys. 2d) [54,63].

Immunocytochemiczna lokalizacja PTHrP w różnych typach komórek wskazuje na zróżnicowaną immunoreaktywność i lokalizację poszczególnych odcinków peptydu. W komórkach linii RIN (*Rat insulinoma*) odcinki PTHrP 1–36 i 109–138 zostały zlokalizowane w obrębie aparatu Golgiego, natomiast odcinek środkowy 109–138 występował ponadto w pęcherzykach sekrecyjnych. Immunocytochemiczna reaktywność tego odcinka wykryta w medium hodowlanym potwierdza jednoznacznie, że jest on formą sekrecyjną PTHrP [63]. Stosując te same przeciwciała, wykazano identyczny fragment peptydu w osoczu pacjentów z objawami HHM i z chroniczną niewydolnością nerek [7]. Potranslacyjna modyfikacja PTHrP wydaje się być specyficzna tkankowo. Przeciwciała anty-PTHrP (106–141) dają pozytywną reakcję z normalnymi keratynocytami przy braku takiej reakcji w licznych gruczolakorakach. Linia hodowanych komórek przytarczyc wydziela izoformę PTHrP zbudowaną z sekwencji aminokwasów 1–84, której obecność stwierdzono zarówno w komórkach, jak i w medium hodowlanym [7,63].

Na podstawie dostępnych danych można założyć, że PTHrP może funkcjonować jako specyficzny tkankowo polihormon lub prekursor mniejszych, zróżnicowanych strukturalnie peptydów, z których każdy ma unikalną aktywność biologiczną często o przeciwstawnym działaniu oraz odmienne szlaki transdukcji sygnału [80].

RECEPTOR PTH/PTHrP I TRANSDUKCJA SYGNAŁU

Analogia N-końcowego fragmentu PTHrP (odcinek 1–34) z analogicznym odcinkiem parathormonu umożliwia wiązanie PTHrP przez receptory PTH w hodowlach komórek kości i nerek, modulując metabolizm wapnia i fosforanów w sposób iden-

czny jak w przypadku wiązania parathormonu [38,49]. Wskazuje to na możliwość modulowania wielu fizjologicznych funkcji kontrolowanych zarówno przez PTH i PTHrP przez wiązanie z jednym rodzajem receptora. Nie mniej jednak, używając sondy cDNA dla receptora PTH/PTHrP, wykazano obecność mRNA dla tych receptorów w wielu rodzajach komórek innych niż typowe komórki docelowe dla parathormonu [26,28].

Receptor PTH/PTHrP należy do rodziny receptorów działających poprzez białko G, do której zaliczamy także receptory kalcytoniny, sekretyny, wazoaktywnego peptydu jelitowego (VIP1 i 2) oraz wiele innych [26,28]. W mięśniach gładkich żołądka wykazano, że PTH, PTHrP oraz VIP mogą łączyć się z tym samym receptorem, co potwierdza przypuszczenia, że receptory te należą do tej wspólnej rodziny [4].

Struktura receptora PTH/PTHrP wykazuje silną homologię międzygatunkową i konserwatywny ewolucyjny [28]. Receptor PTH/PTHrP złożony jest z 585 aminokwasów. Fragment wiążący ligand znajduje się między 27 a 46 aminokwasem i wiąże z równym powinowactwem zarówno PTH (1–34), jak i PTHrP (1–36). Podobnie jak inne receptory wiążące białka G ma on siedem hydrofobowych domen śródbłonowych i przynajmniej dwa miejsca umożliwiające N-glikozylację [26,28]. Aktywacja receptora PTH/PTHrP w hodowanych osteoblastach i komórkach nerki oposa, uruchamia przynajmniej dwa szlaki transdukcji sygnału poprzez jednoczesną aktywację cykazy adenylowej i fosfolipazy C, co prowadzi do wzrostu stężenia cAMP i jonów wapnia oraz aktywację kinaz białkowych A i C [2].

Coraz liczniejsze doniesienia, wskazujące na zróżnicowaną aktywność biologiczną poszczególnych odcinków peptydu PTHrP, sugerują obecność różnych tkankowo specyficznych receptorów PTHrP, innych niż klasyczny receptor PTH/PTHrP [26].

NADEKSPRESJA PTHrP

Nadekspresja PTHrP wywołuje humoralną hiperkalcemię towarzyszącą nowotworom (HHM). Jest to ogólny, paraneoplastyczny zespół towarzyszący około 10% pacjentów z zaawansowaną chorobą nowotworową [50]. HHM najczęściej towarzyszy nowotworom płuc, kory nerek i piersi [44, 45, 82, 83]. Objawy kliniczne HHM są podobne, jak wywołane wskutek nadczynności przytarczyc. Początkowo sądzono, że za kliniczne objawy HHM odpowiedzialna jest ektopowa produkcja parathormonu (PTH), i pogląd ten utrzymywał się do lat osiemdziesiątych [6, 61, 84]. Wtedy to pojawiły się pierwsze wątpliwości, gdyż coraz częściej donoszono o przypadkach braku podwyższonego poziomu parathormonu u pacjentów z objawami hiperkalcemii. Nie stwierdzono też wydzielania parathormonu (PTH) przez guzy nowotworowe [18, 53, 65]. W wielu przypadkach HHM, poziom PTH w surowicy krwi był obniżony lub nawet niewykrywalny, a mimo to wykazywano silną bioaktywność parathormonu manifestującą się m.in. hiperkalcemią, hipofosfatemią oraz obecnością wysokiego stężenia cAMP w moczu [20,37,44,45]. Wątpliwości te zostały wyjaśnione dopiero

w 1987 roku, gdy trzem niezależnym zespołom badawczym, poszukującym czynnika odpowiedzialnego za HHM, udało się wyizolować i zsekwencjonować nowy hormon – *parathyroid hormone related protein* (PTHrP), obecnie uważany jako podstawowy mediator mechanizmów odpowiedzialnych za objawy HHM [43, 66,68].

Humoralna hiperkalcemia towarzysząca nowotworom jest spowodowana ektopowym wytwarzaniem PTHrP, który zaburza homeostazę wapniową. PTHrP, wiążąc się z receptorami osteoblastów i komórek nabłonka kanalików proksymalnych nerki powoduje wzrost resorpcji tkanki kostnej oraz nasila wchłanianie jonów wapnia i wydzielanie fosforanów [20]. Procesy te są wynikiem aktywacji cyklazy adenylowej i fosfolipazy C oraz określonych szlaków metabolicznych przez kinazy białkowe A i C. PTHrP wiążąc się z receptorem PTH/PTHrP osteoblastów powoduje transformację komórek odpowiedzialnych za formowanie kości w osteoblasty osteolityczne. W odpowiedzi na wiązanie PTHrP przez receptor osteoblastów spada synteza kolagenu oraz ekspresja fosfatazy zasadowej i osteopontyny, natomiast wzrasta wytwarzanie ostokalcyny, cytokin i neutralnych proteaz [52]. W wyniku osteolizy uwolnione zostają jony wapnia i fosforany, które dostają się do przestrzeni pozakomórkowych i osocza krwi. W odpowiedzi na wiązanie PTHrP przez receptory kanalików nerkowych zmniejsza się wydzielanie jonów wapnia, a nasila się wydzielanie fosforanów. Procesy te powodują wysoką hiperkalcemię, hipofosfatemię, i obecność dużego stężenia nefrogennego cAMP w moczu [20,65] W etiologii hiperkalcemii nie wyklucza się udziału innych czynników wytwarzanych przez guzy nowotworowe, takich jak, cytokiny resorbujące kości oraz prostaglandyny i enzymy, które mogą działać samodzielnie bądź synergistycznie z PTHrP [20].

Stosując techniki immunocytochemiczne i hybrydyzację *in situ* wykazano obecność PTHrP w licznych guzach nowotworowych, a niemal w stu procentach w rakach płaskokomórkowych wywodzących się z różnych narządów [82,83]. Badania immunocytochemiczne wykazują wysoki poziom PTHrP w surowicy krwi pacjentów z HHM, natomiast niski lub zupełny brak PTHrP u pacjentów z nowotworami z normalnym poziomem wapnia oraz u pacjentów z nadczynnością przytarczyc. Ponadto wysoki poziom PTHrP w surowicy jest charakterystyczny dla większości pacjentów z przerzutami nowotworów do kości. W serii badań prowadzonych na pacjentach z HHM wysoki poziom PTHrP w surowicy krwi stwierdzono u 88% pacjentów z litymi guzami nowotworowymi oraz jedynie u 30% pacjentów z limfomami lub szpiczakiem, co wskazuje, że PTHrP w znacznie mniejszym stopniu towarzyszy nowotworom krwi [7,46, 51,55].

Znaczenie określania poziomu PTHrP w diagnostyce nowotworów nie jest do końca ustalone. Nie mniej jednak badania ostatnich lat sugerują, że określanie poziomu PTHrP w surowicy krwi w powiązaniu z oznaczaniem PTH, może być pomocne w identyfikacji utajonych form nowotworów oraz koegzystencji nowotworów złośliwych i nadczynności przytarczyc, co może umożliwić zastosowanie odpowiedniej terapii [73].

FIZJOLOGICZNA FUNKCJA PTHrP

Chociaż PTHrP początkowo wyizolowano i zsekwencjonowano z guzów nowotworowych, to obecnie lokalizacja tego peptydu, jego mRNA oraz receptorów została stwierdzona w wielu różnych narządach i tkankach. Wykorzystując techniki hybrydyzacji *in situ* i immunocytochemii wykazano obecność PTHrP w wielu narządach, wśród których należy wymienić: skórę, serce, nerki, trzustkę, jądra, tkankę mózgową, mięśnie szkieletowe, mięsień sercowy, gruczoły endokrynowe, macicę, łożysko oraz gruczoł mlekowy. Ekspresja PTHrP w rozmaitych tkankach i narządach [38, 49, 69, 70, 81] oraz letalne konsekwencje uszkodzenia genu PTHrP [31] wskazują na potencjalną możliwość pełnienia przez ten hormon wielu istotnych i różnorodnych funkcji fizjologicznych. Wytwarzanie PTHrP rozpoczyna się jeszcze w okresie preinplantacyjnym. Obecność tego hormonu wykazano już w stadium moruli, w którym PTHrP jest zaangażowany w zależne od cAMP różnicowanie endodermy powierzchniowej. Ekspresję genu PTHrP wykazują neuroektoderma, mezenchyma i endoderma oraz narządy pierwotne wywodzące się z tych listków zarodkowych, co wskazuje na możliwość realizowania przez ten peptyd istotnych funkcji regulacyjnych w czasie rozwoju zarodkowego [72].

Lokalizacja mRNA receptorów PTH/PTHrP w zarodkach myszy w miejscach graniczenia nabłonków i mezenchymy oraz w nabłonku jelita, tkance mezenchymalnej płuc, kanalikach śródnercza, a także miejscach formowania kości i naczyń sugeruje, że interakcja PTHrP z ich receptorami odgrywa znaczącą rolę w embriogenezie oraz w procesach tworzenia narządów [32]. Ekspresja mRNA PTHrP w komórkach periostealnych płodów wskazuje na udział tego peptydu w regulacji rozwoju kości oraz ich remodelacji [14, 15].

Krótki odcinek PTHrP (67–86) wydzielany w okresie płodowym przez przytarczycę odgrywa zasadniczą rolę w transporcie jonów wapnia przez łożysko, co stwierdzono w przypadku zarodków owiec, świń oraz ludzi [1, 5, 60].

Szeroka ekspresja genu PTHrP i jego strukturalne podobieństwo do genów czynników wzrostu sugeruje, że PTHrP może funkcjonować jako parakrynowy lub autokrynowy regulator wzrostu i różnicowania [38, 81]. Funkcja ta została ostatnio opisana w hodowlach ludzkich keratynocytów, w których PTHrP działa jako czynnik antyproliferacyjny [29] i prodyferencyjny [30]. W eksperymentach na transgenicznym myszach nadekspresja PTHrP wywołuje niedorozwój gruczołu mlekowego. W badaniach prowadzonych na ludzkich keratynocytach i liniach nabłonka gruczołu mlekowego wykazano, że liczne mitogeny, takie jak EGF, insulina IGF-1 itd., stymulują ekspresję PTHrP w licznych komórkach badanych *in vitro*. W obecności mitogenów w hodowli komórkowej szybko i nagle wzrasta ekspresja mRNA dla PTHrP, co przypomina w sposób wyraźny regulację ekspresji licznych genów zaangażowanych w regulacji cyklu komórkowego, takich jak np. c-myc [77]. Rola PTHrP jako lokalnego regulatora wzrostu i różnicowania została stwierdzona w wielu rodzajach nowotworów [3, 12,25] oraz licznych komórkach normalnych, do których należy zaliczyć, poza wspomnianymi keratynocytami i nabłonkiem wydzielniczym gruczołu mlekowego także fibroblasty, osteoblasty i wiele innych [34]. Badania te wskazują,

że PTHrP może działać jako ogólny inhibitor wzrostu [78]. PTHrP jest rozpatrywany jako para- lub autokrynowy czynnik relaksacji mięśni gładkich regulujący napięcie mięśni naczyń krwionośnych, macicy, żołądka i jelit oraz pęcherza moczowego [41,42, 47, 61]. PTHrP wydzielane przez komórki śródbłonka, wiążąc się receptorami komórek mięśniowych gładkich, reguluje napięcie mięśniówki tętnic, a tym samym ciśnienie krwi. Ekspresja PTHrP wzrasta w czasie skurczu komórek mięśniowych naczyń jak również jest stymulowana czynnikami skurczowymi, np. angiotensyną II [19]. Wykazano ponadto regulacyjną funkcję PTHrP w procesach angiogenezy [57].

Ekspresja mRNA dla PTH i PTHrP w błonie śluzowej żołądka i jelit wskazuje na rolę tego peptydu w regulacji funkcji przewodu pokarmowego. Mok et al. [42] wykazali, że zarówno PTH, jak i PTHrP w stężeniach nanomolowych rozluźniają mięśnie gładkie różnych obszarów żołądka. W komórkach mięśni gładkich żołądka zlokalizowano mRNA dla PTHrP oraz wyraźny wzrost ekspresji genu PTHrP w tych komórkach w wyniku cholinergicznego stymulacji skurczu. Wskazuje to wyraźnie na funkcje PTHrP jako para- lub autokrynowego modulatora aktywności skurczowej mięśniówki żołądka. Relaksacyjne działanie PTHrP jest inicjowane silnym skurczem mięśni, a efekt jego działania jest znoszony w obecności wysokiego poziomu kortykosteronu uwalnianego do osocza krwi w czasie stresu [24]. Receptory PTH/PTHrP w mięśniówce gładkiej jelita, podobnie jak w żołądku wiążąc PTHrP (1–34) indukują relaksację mięśniówki przez aktywację cykazy adenylowej i kinazy białkowej A [4].

W mięśniówce macicy PTHrP działa rozkurczowo jedynie na warstwę mięśni podłużnych, nie wykazano natomiast wpływu PTHrP na warstwę mięśni okrężnych. Poszczególne warstwy mięśniówki i endometrium mają zróżnicowaną immunoreaktywność w stosunku do przeciwciał anti-PTHrP. Immunocytochemiczna lokalizacja PTHrP w nabłonku macicy wskazuje też inne funkcje hormonu niż tylko relaksacja mięśniówki macicy [76].

Wydzielany przez gruczoł mlekowy PTHrP oddziałując na mięśnie naczyń krwionośnych reguluje przepływ krwi przez gruczoł, gospodarkę wapniową i stymuluje sekrecję składników mleka [56, 71, 79]. Ponadto w okresie laktacji PTHrP bierze udział w regulacji skurczu komórek mioepitelialnych gruczołu mlekowego regulując ejekcję mleka [59].

Fizjologiczna aktywność PTHrP jest związana przede wszystkim z N-końcem peptydu (odcinek 1–34) wiązany przez receptory PTH/PTHrP, nie mniej jednak inne odcinki peptydu wydają się też posiadać określoną aktywność biologiczną. Odcinek peptydu obejmujący aminokwasy w pozycji 67–86 stymuluje transport jonów wapnia poprzez łożysko z matki do płodu [1]. Fragment PTHrP zawierający sekwencję aminokwasów 107–111 (tzw. osteostatyna) hamuje aktywność osteoklastów, działając antagonistycznie do odcinka peptydu zawierającego aminokwasy 1–34 [14,15]. C-końcowy odcinek PTHrP (107–111) aktywuje kinazę białkową C w izolowanych limfocytach śledziony, wskazuje na znaczenie tego peptydu jako fizjologicznego modulatora odpowiedzi immunologicznej [75].

Większość z funkcji PTHrP w tkankach niezmiennych nowotworowo wydaje się być realizowane w drodze parakrynowej lub autokrynowej. Jedynym fizjologicznym stanem, w którym poziom PTHrP w surowicy wyraźnie wzrasta, jest laktacja [56, 71].

PODSUMOWANIE

Od czasu wyjaśnienia struktury PTHrP pojawia się coraz więcej informacji dotyczących funkcji PTHrP w fizjologii komórek zarówno nowotworowych, jak i normalnych. Szeroka ekspresja PTHrP w wielu różnorodnych tkankach, silny ewolucyjny konserwatyzm, wczesna ekspresja w rozwoju zarodkowym oraz letalne konsekwencje uszkodzenia genu PTHrP wskazują na znaczącą rolę tego hormonu w realizacji wielu istotnych funkcji fizjologicznych. Ponadto złożona transkrypcyjna regulacja genu PTHrP, występowanie niestabilnych sekwencji genu i ich zmienna transkrypcja oraz składanie, a także występowanie peptydu w kilku izoformach podkreślają znaczenie tego peptydu. Struktura genu PTHrP i sposób jego ekspresji sugerują możliwość tkankowo specyficznej modyfikacji syntetyzowanego peptydu i wydzielania go w postaci kompleksu pochodnych peptydów, z których każdy może mieć specyficzny własny receptor, szlak transdukcji sygnału i zróżnicowane konsekwencje fizjologiczne. Obecnie wydaje się, że udział PTHrP w etiologii humoralnej hiperkalcemii towarzyszącej nowotworom jest zrozumiały. Natomiast fizjologiczna funkcja PTHrP wymaga dalszych prac i wyjaśnień. Należy sądzić, że badania nad PTHrP w najbliższych latach będą skoncentrowane na tych właśnie zagadnieniach.

LITERATURA

- [1] ABBAS SK, RATCLIFFE WA, MONIZ C, DIXIT M, CAPLE IW, SILVER M, FOWDEN A, CARE AD. The role of parathyroid hormone-related protein in calcium homeostasis in the fetal pig. *Exp-Physiol* 1994; **79**: 527–536.
- [2] ABOU-SAMRA AB, JUPPNER, FORCE T, FREEMAN M, KONG X-F, SCHIPANI E, URENA P, RICHARDS J, BONVENTRE JV, POTTS JT, KRONENBERG HM, SEGRE GV. Expression cloning of a common receptor for parathyroid hormone and parathyroid hormone-related peptide from rat osteoblast-like cells: a single receptor stimulates intracellular accumulation of both cAMP and inositol triphosphates and increases intracellular free calcium. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; **89**: 2732–2736.
- [3] BENITEZ-VERGUIZAS J, ESBRIT P. Proliferative effect of parathyroid hormone-related protein on the HYPERCALCEMIC Walker 256 carcinoma cell line. *Biochem-Biophys-Res-Commun* 1994; **15**; **198**: 1281–1289.
- [4] BOTELLA A, REKIK M, DELVAUX M, DAVICCO MJ, BARLET JP, FREXINOS J, BUENO L. Parathyroid hormone (PTH) and PTH-related peptide induce relaxation of smooth muscle cells from guinea pig ileum: interaction with vasoactive intestinal peptide receptors. *Endocrinology* 1994; **135**: 2160–2167.
- [5] BRANDT DW, BRUNS ME, BRUNS DE. The parathyroid hormone-related protein (PTHrP) gene preferentially utilizes a GC-rich promoter and the PTHrP 1–139 coding pathway in normal human amnion. *Biochem Biophys Res Commun* 1992, **189**: 938–945.
- [6] BUCKLE RM, McMILLAN M, MALLISON C. Ectopic secretion of parathyroid hormone by a renal adenocarcinoma in a patient with hypercalcemia. *Br Med J* 1970; **4**: 724–726.

- [7] BURTIS WJ, BRADY TG, ORLOFF JJ, ERSBACK JB, WARREL RP jr, OLSON BR, WU TL, MITNICK ME, BROADUS AE, STEWART AF. Immunochemical characterisation of circulating parathyroid hormone-related protein in patients with humoral hypercalcemia of cancer. *N Engl J Med* 1990; **322**: 1106–1112.
- [8] BURTIS WJ, WU T, BUNCH C, WYSOLMERSKI JJ, INSOGNA KL, WEIR EC. Identification of a novel 17,000-dalton parathyroid hormone like adenylate cyclase-stimulating protein from a tumor associated with humoral hypercalcemia of malignancy. *J Biol Chem* 1987; **262**: 7151–7156.
- [9] CARE AD, ABBAS S K, PICCARD DW. Stimulation of ovine placental transport of calcium and magnesium by mid-molecule fragments of human parathyroid hormone-related protein. *Exp Physiol* 1990; **75**: 605–608.
- [10] DANKS JA, EBELING PR, HAYMAN J, ET AL. Parathyroid hormone related protein: immunohistochemical localization in cancers and in normal skin. *J Bone Miner Res* 1989; **4**: 273–278.
- [11] DE PAPP AE, STEWART AF. Parathyroid hormone related protein: a peptide of diverse physiologic functions. *Trends Endocr Metab* 1993; **4**: 181–187.
- [12] DUNNE FP, ROLLASON T, RATCLIFFE WA, MARSHALL T, HEATH DA. Parathyroid hormone-related protein gene expression in invasive cervical tumors. *Cancer* 1994; **74**: 83–89.
- [13] ENDO K, ICHIKAWA F, UCHIYAMA Y, KATSUMATA K, OHKAWA H, KUMAKI K, OGATA E, IKEDA K. Evidence for the uptake of a vitamin D analogue (OCT) by a human carcinoma and its effect of suppressing the transcription of parathyroid hormone-related peptide gene *in vivo*. *J Biol Chem* 1994; **269**: 32693–32699.
- [14] FENTON AJ, KEMP BE, KENT GM, MOSSELEY JM ET AL. A carboxyl-terminal peptide from the parathyroid hormone-related protein inhibits bone resorption by osteoclasts. *Endocrinology* 1991; **129**: 1762–1768.
- [15] FENTON AJ, MARTIN TJ, NICHOLSON GC. Carboxyl-terminal parathyroid hormone-related protein inhibits bone resorption by isolated chicken osteoclasts. *J Bone Miner Res* 1994; **9**: 515–519.
- [16] FERRARI SL, RIZZOLI R, BONJOUR JP. Effects of epidermal growth factor on parathyroid hormone-related protein production by mammary epithelial cells. *J Bone Miner Res* 1994; **9**: 639–644.
- [17] GILLESPIE MT, MARTIN TJ. The parathyroid hormone-related protein gene and its expression. *Mol Cell Endocrinol* 1994; **100**: 143–147.
- [18] GOLTZMAN D, STEWART AF, BROADUS AE. Malignancy-associated hypercalcemia: Evaluation with a cytochemical bioassay for parathyroid hormone. *J Clin Endocrinol Metab* 1981; **53**: 899–904.
- [19] HONGO TJ, KUPFER J, ENOMOTO H, SHARIFFI D ET AL. Abundant expression of parathyroid hormone related protein in primary rat aortic smooth muscle cells accompanies serum induced proliferation. *J Clin Invest* 1991; **88**: 1841–1847.
- [20] HORWITZ MJ, BILEZIKIAN JP. Primary hyperparathyroidism and parathyroid hormone-related protein. *Curr Opin Rheumatol* 1994; **6**: 321–328.
- [21] HURLEY MM, FALL P, HARRISON JP, PETERSEN DN, KREAM BE, RAISZ L. Effects of transforming growth factor and interleukin-1 on DNA synthesis, collagen synthesis, procollagen mRNA levels, and prostaglandin E₂ production in cultured fetal rat calvaria. *Bone Mineral Res* 1989; **4**: 731–736.
- [22] IKEDA K, LU C, WEIR EC, MANGIN M, BROADUS AE. Transcriptional regulation of the parathyroid hormone-related peptide gene by glucocorticoids and vitamin D in a human C-cell line. *J Biol Chem* 1989; **264**: 15743–15746.
- [23] IKEDA K, WEIR EC, MANGIN M, DANNIES PS, KINDER B, DEFTOS LJ, BROWN M, BROADUS AE. Expression of messenger RNAs encoding a parathyroid hormone-like peptide in normal human parathyroid adenomas. *Mol Endocrinol* 1988; **2**: 1230–1236.

- [24] ITO M, OHTSURU A, ENOMOTO H, OZEKI S, NAKASHIMA M, NAKAYAMA T, SHICHIJO K, SEKINE I, YAMASHITA S. Expression of parathyroid hormone-related peptide in relation to perturbations of gastric motility in the rat. *Endocrinology* 1994; **134**: 1936–1942.
- [25] IWAMURA M, ABRAHAMSSON PA, FOSS KA, WU G, COCKETT AT, DEFTOS LJ. Parathyroid hormone-related protein: a potential autocrine growth regulator in human prostate cancer cell lines. *Urology* 1994; **43**: 675–679.
- [26] JUPPNER H, ABOU SAMRA AB, FREEMAN MW, KONG XF, ET AL. A G protein linked receptor for parathyroid hormone and parathyroid hormone related peptide. *Science* 1991; **254**: 1024–1026.
- [27] JUPPNER H, ABOU SAMRA AB, UNENO S, GU WX, POTTS Jr JT, SEGRE GV. The parathyroid hormone-like peptide associated with humoral hypercalcemia of malignancy and parathyroid hormone bind to the same receptor on the plasma membrane of ROS 17/2.8 cells. *J Biol Chem* 1988; **263**: 8557–8560.
- [28] JUPPNER H. Molecular cloning and characterization of a parathyroid hormone/parathyroid hormone-related peptide receptor: a member of an ancient family of G protein-coupled receptors. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 1994; 371–378.
- [29] KAISER SM, LANEUVILLE P, RHIM JS, KREMER R, GOLTZMAN D. Enhanced growth of a human keratinocyte cell line induced by antisense RNA for parathyroid hormone related peptide. *J Biol Chem* 1992; **261**: 13623–13628.
- [30] KAISER SM, SEBAG M, RHIM JS, KREMER R, GOLTZMAN D. Antisense mediated inhibition of parathyroid hormone-related peptide (PTHrP) production in a keratinocyte cell line impedes differentiation. *Mol Endocrinol* 1994; **8**: 139–147.
- [31] KARAPLIS AC, LUZ A, GLOWACKI J, BRONSON RT, TYBULEWICZ VL, KRONENBERG HM, MULLIGAN RC. Lethal skeletal dysplasia from targeted disruption of the parathyroid hormone-related peptide gene. *Genes Dev* 1994; **8**: 277–289.
- [32] KARPERIEN M, VAN-DIJK TB, HOEIJMAKERS T, CREMERS F, ABOU SAMRA AB, BOONSTRA J, DE LAAT SW, DEFIZE LH. Expression pattern of parathyroid hormone/PARATHYROID hormone related peptide receptor mRNA in mouse postimplantation embryos indicates involvement in multiple developmental processes. *Mech Dev* 1994; **47**: 29–42.
- [33] KREMER R, KARAPLIS AC, HENDERSON J, GULIVER W, BANVILLE D, HENDY GN, GOLTZMAN D. Regulation of parathyroid hormone like peptide in cultured normal human keratinocytes. Effects of growth factors and 1,25 dihydroxyvitamin D₃ on gene expression and sequencing. *J Clin Invest* 1991; **87**: 884–893.
- [34] LI X, DRUCKER DJ. Growth factor like properties of parathyroid hormone related peptide in transfected rodent cell lines (Abstract). *J Bone Miner Res* 1993; **8**: 204.
- [35] MANGIN M, JKEDA K, DREYER BE, BROADUS. AE. Isolation and characterisation of the human parathyroid hormone-like peptide gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989. **86**: 2408–2412.
- [36] MANGIN M, WEBB AC, DREYER BE, POSILICO JT, IKEDA K, WEIR EC ET AL. Identification of a cDNA encoding a parathyroid like-peptide from a human tumor associated with humoral hypercalcemia of malignancy. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; **85**: 597–601
- [37] MARTIN TJ. Humoral hypercalcemia of malignancy. *Bone Mineral* 1988; **4**: 83–87.
- [38] MARTIN TJ, MOSELEY JM, GILESPIE MT. Parathyroid hormone related protein: biochemistry and molecular biology. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 1991; **26**: 377–395.
- [39] MARTIN TJ, MOSELEY JM; Biochemistry and pathology of PTH-related gene products. *J Endocrinol Invest* 1992; **15** (suppl 6): 171–177.
- [40] MERENDINO JJ JR, INSOGNA KL, MILSTONE LM, BROADUS AE, STEWART AF. A parathyroid hormone-like protein from cultured human keratinocytes. *Science* 1986; **231**: 388–390.

- [41] MOK LS, AJIWA E, MARTIN TJ, THOMPSON JC, COOPER CW. Parathyroid related protein relaxes rat gastric smooth muscle and shows cross desensitization with parathyroid hormone. *J Bone Mineral Res* 1989; **4**: 433–439.
- [42] MOK LS, NICKOLS GA, THOMPSON JC, COOPER CW. Parathyroid hormone as a smooth muscle relaxant. *Endocr Rev* 1989; **10**: 420–436.
- [43] MOSELEY JM, KUBOTA M, DIEFENBACH-JAGER H, WETTENHALL R, KEMP B, SUVA L, RODDA C, EBELING P, HUDSON P, ZAJAC P, MARTIN T. Parathyroid hormone-related protein purified from a human lung cancer cell line. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; **84**: 5048–5050.
- [44] MUNDY GR. Hypercalcemia of malignancy revisited. *J Clin Invest* 1988; **82**: 1–6.
- [45] MUNDY GR, IBBOTSON KJ, D'SOUSA SM, SIMPSON EL, JACOBS JW, MARTIN TJ. The hypercalcaemia of cancer. Clinical implication and pathogenic mechanisms. *N Engl J Med* 1984; **310**: 1718–1727.
- [46] MUNDY GR, MARTIN TJ. The hypercalcemia of malignancy: pathogenesis and treatment. *Metabolism* 1982; **31**: 1247–1277.
- [47] NICKOLS GA, NANA AD, NICKOLS MA, DIPETTE DJ, ASIMAKIS GK. Hypotension and cardiac stimulation due to the parathyroid hormone related protein, humoral hypercalcemia of malignancy factor. *Endocrinology* 1989; **125**: 834–841.
- [48] NISSENSON RA, DIEP D, STREWLER GJ. Synthetic peptides comprising the amino-terminal sequence of a parathyroid hormone like protein from human malignancies. Binding to parathyroid hormone receptors and activation of adenylate cyclase in bone cells and kidney. *J Biol Chem* 1988; **263**: 12866–1287.
- [49] ORLOFF JJ, WU TL, STEWART AF. Parathyroid hormone-like proteins: biochemical responses and receptor interaction. *Endocr Rev* 1989; **10**: 476–495.
- [50] ORTH DN. Ectopic hormone production. [w] *Endocrinology and Metabolism* (Fellig P, Baxter JD, Broadus AE et al, eds). New York: McGraw-Hill, 1987; 1692–1735.
- [51] PANDIAN MR, MORGAN CH, CARLTON E, SEGRE G. Modified immunoradiometric assay of parathyroid hormone related protein: Clinical application in the differential diagnosis of hypercalcemia. *Clin Chem* 1992; **28**: 282–288.
- [52] PARTRIDGE NC, BLOCH SR, PEARMAN AT. Signal transduction pathways mediating parathyroid hormone regulation of osteoblastic gene expression. *J Cell Biochem* 1994; **55**: 321–327.
- [53] POWELL D, SINGER, SINGER FR, MURRAY TM, ET AL. Nonparathyroid hypercalcemia in patients with neoplastic diseases. *N Engl J Med* 1974; **289**: 176–181.
- [54] RABBANI SA, HAQ M, GOLTZMAN D. Biosynthesis and processing of endogenous parathyroid hormone related peptide (PTHrP) by rat Leydig cell tumor H-500. *Biochemistry* 1993; **32**: 4931–4937.
- [55] RALSTON SH. The pathogenesis of humoral hypercalcemia of malignancy. *Lancet* 1987; 1443–1445.
- [56] RATCLIFFE WA, THOMPSON GE, CARE AD, PEAKER M. Production of parathyroid hormone related protein by the mammary gland of the goat. *J Endocrinol* 1992; **133**: 87–93.
- [57] RIAN E, JEMTLAND R, OLSTAD OK, ENDRESEN MJ, GRASSER WA, THIEDE MA, HENRIKSEN T, BUCHT E, GAUTVIK KM. Parathyroid hormone-related protein is produced by cultured endothelial cells: a possible role in angiogenesis. *Biochem Biophys Res Commun* 1994; **198**: 740–747.
- [58] RODDA CP, KUBOTA M, HEATH JA, ET AL. Evidence for a novel parathyroid hormone-related protein in fetal lamb parathyroid gland and sheep placenta: comparisons with a similar protein implicated in humoral hypercalcemia of malignancy. *J Endocrinol* 1988; **117**: 261–271.

- [59] SEITZ PK, COOPER KM, IVES KL, ISHIZUKA J, ET AL. Parathyroid hormone-related peptide production and action in myoepithelial cell line derived from normal human breast. *Endocrinology* 1993; **133**: 1116–1124.
- [60] SEKI K, WADA S, NAGATA N, NAGATA I. Parathyroid hormone-related protein during pregnancy and the perinatal period. *Gynecol Obstet Invest* 1994; **37**: 83–86.
- [61] SHERWOOD LM, O'RIORDAN JLH, AURBACH GD, ET AL. Production of parathyroid hormone by nonparathyroid tumors. *J Clin Endocrinol Metab* 1967; **27**: 140–146.
- [62] SHEW RL, YEE JA, KLIEWER DB, KEFLEMARIAMY J, MCNEILL DL. Parathyroid hormone-related protein inhibits stimulated uterine contraction *in vitro*. *J Bone Mineral Res* 1991; **6**: 955–959.
- [63] SOIFER NE, DEE KE, INSOGNA KL. Parathyroid hormone-related protein. Evidence for secretion of a novel mid-region fragment by three different cell types. *J Biol Chem* 1992; **267**: 18236–18243.
- [64] STWART AF, ELIOTJ, BURTIS WJ, WU T, INSOGNA KL. Synthetic parathyroid hormone like protein (1–74): biochemical and physiological characterization. *Endocrinology* 1989; **124**: 642–648.
- [65] STEWART KF, HORST R, DEFTOS LJ, ET AL. Biochemical evaluation of patients with cancer-associated hypercalcemia: Evidence for humoral and non-humoral groups. *N Engl J Med* 1980; **303**: 1377–1383.
- [66] STREWLER GJ, STERN P, JACOBS J, WVELOFF J, KLEIN R, LEUNG S, ROSENBLATT M, NISSENSON R. Parathyroid hormone like protein from human renal carcinoma cells. Structural and functional homology with parathyroid hormone. *J Clin Invest* 1987; **80**: 1803–1805.
- [67] SUVA LJ, MATHER KA, GILESPIE MT, ET AL. Structure of the 5' flanking region of the gene encoding human parathyroid hormone-related protein xsw(hPTHrP). *Gene* 1989; **77**: 95–105.
- [68] SUVA LJ, WINSLOW GA, WETTENHALL REH, HAMMONDS RG, MOSELEY JM, DIEFENBACH-JAGGER H, RODDA CP, KEMP BE, RODRIGUEZ H, CHEN EY, HUBSON PJ, MARTIN TJ, WOOD WK. A parathyroid hormone related protein implicated in malignant hypercalcemia: cloning and expression. *Science* 1987; **237**: 893–896.
- [69] THIEDE MA, RODAN GA. Expression of calcium-mobilizing parathyroid hormone-like peptide in lactating mammary tissue. *Science* 1988; **242**: 278–280.
- [70] THIEDE MA, STREWLER GJ, NISSENSON RA, ROSENBLATT M, RODAN GA. Human renal carcinoma expressed two messages encoding a parathyroid hormone-like peptide: Evidence for the alternative splicing of a single copy gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; **85**: 4605.
- [71] THOMPSON GE, RATCLIFFE WA, HUGHES S, ABBAS SK, CARE AD. Local control of parathyroid hormone-related protein secretion by the mammary gland of the goat. *Comp Biochem Physiol Comp Physiol* 1994; **108**: 485–490.
- [72] VAN DE STOLPE A, KARPERIEN M, LOWIK CWGM, JUPPNER H, ET AL. Parathyroid related peptide as an endogenous inducer of parietal Endoderm differentiation. *J Cell Biol* 1993; **120**: 235–243.
- [73] WALLS J, RATCLIFFE WA, HOWELL A, BUNDRED NJ. Parathyroid hormone and parathyroid hormone-related protein in the investigation of hypercalcaemia in two hospital populations. [see comments] *Clin Endocrinol Oxf* 1994; **41**: 407–413.
- [74] WEIR EC, BRINES ML, IKEDA K, BURTIS WJ, BROADUS AE, ROBBINS RJ. Parathyroid hormone-related peptide gene is expressed in the mammalian central nervous system. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; **87**: 108–112.

- [75] WHITFIELD JF, ISAACS RJ, CHAKRAVARTHY BR, DURKIN JP, MORLEY P, NEUGEBAUER W, WILLIAMS RE, WILLYCK G, RIXON RH. C-terminal fragments of parathyroid hormone-related protein, PTHrP-(107-111) and (107-139), and the N-terminal PTHrP-(1-40) fragment stimulate membrane-associated protein kinase C activity in rat spleen lymphocytes. *J Cell Physiol* 1994; **158**: 518-522.
- [76] WILLIAMS ED, LEAVER DD, DANKS JA, MOSELEY JM, MARTIN TJ. Effect of parathyroid hormone-related protein (PTHrP) on the contractility of the myometrium and localization of PTHrP in the uterus of pregnant rats. *J Reprod Fertil* 1994; **102**: 209-214.
- [77] WOODGET JR. Early gene induction by growth factors. *Br Med Bull* 1989; **45**: 529-540.
- [78] WYSOLMERSKI J, DAIFOTIS A, BROADUS A, MILSTONE L, PHILBRICK W. Over-expression of PTHrP in Transgenic mice results in breast Hypoplasia (Abstract). *J Bone Miner Res* 1993; **8**: 149.
- [79] YAMAMOTO M, DUONG LT, FISHER JE, THIEDE MA, CAULFIELD MP, ROSENBLATT M. Suckling mediated increases in urinary phosphate and cyclic 3',5' cyclic adenosine monophosphate excretion in lactating rat: possible systemic effects of parathyroid hormone-related protein. *Endocrinology* 1991; **129**: 2614-2622.
- [80] YANG KH, DEPAPP AE, SOIFER NE, DREYER BE, WU TL, PORTER SE, BELLANTONI M, BURTIS WJ, INSOGNA KL, BROADUS AE, ET AL. Parathyroid hormone-related protein: evidence for isoform- and tissue-specific posttranslational processing. *Biochemistry* 1994; **33**: 7460-7469.
- [81] YASUDA T, BANVILLE D, HENDY GN, GOLTZMAN D. Characterisation of the human parathyroid hormone-like peptide gene: Functional and evolutionary aspects. *J Biol Chem* 1989; **264**: 7720-7725.
- [82] ZABEL M, SIEG M, ARPS H, JUPPNER H, DIETEL M. Expression of parathyroid hormone-related peptide in malignant human tumors. *Cancer Res Clin Onkol* 1990; **116**: 635.
- [83] ZABEL M, DIETEL M. Endocrine markers in malignant tumor cells producing parathyroid hormone-related peptide. *Exp Clin Endocrinol* 1993; **101**: 297-302.
- [84] ZIDAR BL, SHADDUCK RK, WINKELSTEIN KA, et al. Acute myeloblastic leukemia and hypercalcemia; *N Engl J Med* 1976; **295**: 692-694.

Otrzymano: 04.07.1995 r.

Przyjęto: 12.12.1995 r.

50-368 Wrocław, ul. Chatubińskiego 6a,

II Konferencja Cytometrii Przepływowej

Uprzejmie zawiadamiamy o organizowaniu II Konferencji Cytometrii Przepływowej na temat "*International Symposium and Tutorial Course on Flow and Image Cytometry and its Applications for in vivo and in vitro Assays*".

Konferencja jest organizowana przez Komitet Założycielski Polskiego Towarzystwa Cytometrii, Międzynarodowy Instytut UNESCO-PAN, Komisję Hodowli Komórek i Tkanek PAN przy współpracy z *International Society for Analytical Cytometry* (ISAC).

Konferencja odbędzie się w dniach 22–23 kwietnia 1996 w Warszawie. Obrady będą prowadzone w języku angielskim w sali wykładowej Instytutu Biocybernetyki i Inżynierii Biomedycznej, ul. Księcia Trojdena 4. Udział w charakterze wykładowców zadeklarowali:

James Watson (Cambridge University, Cambridge, UK):

- a) Analysis of oncoproteins and other nuclear antigens by flow cytometry,
- b) Enzyme reaction kinetics by flow cytometry,

David Hedley (Princess Margaret Hospital, Toronto, Canada):

Analysis of drug resistance by flow and image cytometry,

Carl Stewart (Roswell Park Cancer Center, Buffalo, NY USA):

Clinical applications of immunophenotyping by flow cytometry,

Paul Robinson (Purdue University, West Lafayette, IN, USA):

Cell functional assays by flow and image cytometry,

Zbigniew Darzynkiewicz (New York Medical College, Valhalla, NY, USA):

- a) Analysis of cyclin dependent kinases (cdk), cyclins and cdk inhibitors by multiparameter flow cytometry,
- b) Role of apoptosis in tumor growth and treatment,

Hanna Sovalat (Hopital du Hasenreain, Mulhouse, France) – tytuł do ustalenia

Istnieje możliwość rezerwacji miejsca hotelowego w cenie ok. 45–50 zł w pokoju dwuosobowym i 70–80 w pokoju jednoosobowym. Uczestnictwo w konferencji jest bezpłatne.

Drugi komunikat zostanie przesłany osobom, które w terminie do 10 marca br. prześlą zgłoszenie na adres:

Dr Janusz Skierski, Samodzielna Pracownia Cytometrii Przepływowej Instytutu Leków, ul. Chełmska 30/34, 00-725 Warszawa.

*Prof. dr hab. med. Jerzy Kawiak, Prof. dr hab. med. Włodzimierz Olszewski,
dr med. Janusz Skierski*

Warszawa, 5 stycznia 1996 r.



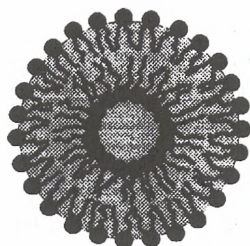
Zgłaszam chęć uczestnictwa w II Konferencji Cytometrii Przepływowej "*International Symposium and Tutorial Course on Flow and Image Cytometry and its Applications for in vivo and in vitro Assays*", która odbędzie się w Warszawie, w dniach 22–23 kwietnia 1996 r.

Nazwisko, Imię, adres, tel i fax:

Uprzejmie proszę o rezerwację miejsca w hotelu, w pokoju jednoosobowym/dwuosobowym w dniach 21/22, 22/23, 23/24 kwietnia 1996 r.

Podpis, data

W. Mejsbaum-Katzenellenbogen's Seminars



3. LIPOSOMES IN BIOLOGY AND MEDICINE

June 3–5, 1996, Wrocław, Poland

General Objective of the Seminar:

To discuss recent advances in construction and application of liposomes in research and clinical practice.

Selected Aspects:

- liposomes, techniques of their preparation and loading
- liposomal stability and its modulation
- liposomes in studies of biomembranes
- liposome technology – from lab bench to clinic
- other drug delivery systems

Daily lectures (international speakers) and facilities for posters. Social events. Exhibition of pharmaceutical, chemical and biochemical companies.

Send application requests to:

Prof. Arkadiusz Kozubek
Organising Committee
3rd Mejsbaum-Katzenellenbogen's Seminar
LIPOSOMES IN BIOLOGY AND MEDICINE
Institute of Biochemistry
Wrocław University
Przybyszewskiego 63/77
51-148 Wrocław, Poland
tel./fax +48 (71) 25 29 30

Early application is advised as Seminar LB&M is limited to 100 persons.

KOMUNIKATY

VI Ogólnopolska Konferencja Biologii Komórki

po raz kolejny odbędzie się w dniach 12–14 września 1996 r. w Lublinie.

Program naukowy Konferencji stwarza możliwość prezentacji najnowszych osiągnięć teoretycznych i doświadczalnych z zakresu biologii komórki w ramach 10 niżej wymienionych sekcji tematycznych:

- Błony biologiczne
- Patologia komórki
- Starzenie się i śmierć komórek
- Biologia rozwoju
- Ruch i cytoskielet– Komunikacja międzykomórkowa
- Komórka a środowisko
- Współczesne metody w biologii komórki
- Morfologiczna analiza ilościowa
- Varia.

Przewiduje się 40-minutowe wykłady (po 3 w każdej sekcji) oraz prezentacje prac w formie plakatów – w ramach poszczególnych sekcji.

Zgłoszenie chęci uczestnictwa w Konferencji powinno nastąpić przed 31 stycznia 1996 roku (z podaniem tytułu zgłaszanej pracy, trzech słów kluczowych oraz sugestią sekcji tematycznej).

Obrady Konferencji będą prowadzone w języku polskim.

Wszelkich informacji związanych z Konferencją udziela

dr hab. K. Trębacz
Zakład Biofizyki Instytutu Biologii UMCS
20-033 Lublin, ul. Akademicka 19
Fax: (81) 375102, tel. 375080
E-mail: TREBACZ BIOTOP. UMCS. LUBLIN. PL

Komunikat Fundacji Biologii Komórki i Biologii Molekularnej

Zarząd Fundacji Biologii Komórki i Biologii Molekularnej przyznaje doroczną nagrodę naukową, w tym również w roku 1996, za wyróżniającą się oryginalną pracę z zakresu biologii komórki, indywidualną lub zespołową, wykonaną wyłącznie w krajowej placówce naukowej, opublikowaną w ostatnich dwóch latach w czasopiśmie figurującym w Current Content.

Wysokość nagrody w 1996 r. wyniesie 600 NZŁ

Zgłoszenia wraz z dwoma odbitkami należy kierować do dnia 15 listopada każdego roku pod adresem Fundacji. Regulamin nagrody poniżej.

Fundacja Biologii Komórki i Biologii Molekularnej
ul. Marymoncka 99, 01-813 Warszawa
tel. 34-03-44, fax 3404470

Regulamin

dorocznej nagrody Fundacji Biologii Komórki i Biologii Molekularnej

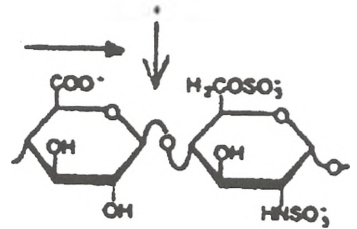
- * **1.** Raz w roku przyznawana będzie jedna nagroda za wyróżniającą się, oryginalną pracę z zakresu biologii komórki, indywidualną lub zespołową, wykonaną wyłącznie w krajowej placówce naukowej.
- * **2.** Praca musi być wydrukowana w czasopiśmie naukowym referowanym w Current Content.
- * **3.** Praca powinna być opublikowana nie wcześniej niż w ostatnich dwóch latach poprzedzających nadanie nagrody.
- * **4.** Preferowane będą prace młodych autorów.
- * **5.** Wysokość nagrody w danym roku kalendarzowym ustala Zarząd Fundacji.
- * **6.** Zgłaszać pracę do nagrody może każdy.
- * **7.** Pracę należy zgłaszać do Zarządu Fundacji ul. Marymoncka 99, 01-813 Warszawa, pokój 314 do 15 października każdego roku.
- * **8.** Ocenę kwalifikującą prace do nagrody przeprowadza Komisja Nagród powołana przez Zarząd Fundacji zasięgając w razie potrzeby opinii specjalistów.
- * **9.** Decyzja Komisji ogłaszana będzie w "Postęпах Biologii Komórki".
- * **10.** Nagroda wręczana będzie w czasie jednej z konferencji naukowych z zakresu biologii komórki.

ERRATA

Errata do pracy I. Żak: **Proteoglikany: struktura i biosynteza**. *Postępy Biologii Komórki* 1995, nr 3, 317–341.

Za powstałe zniekształcenia rysunków gorąco Autorkę przepraszamy.

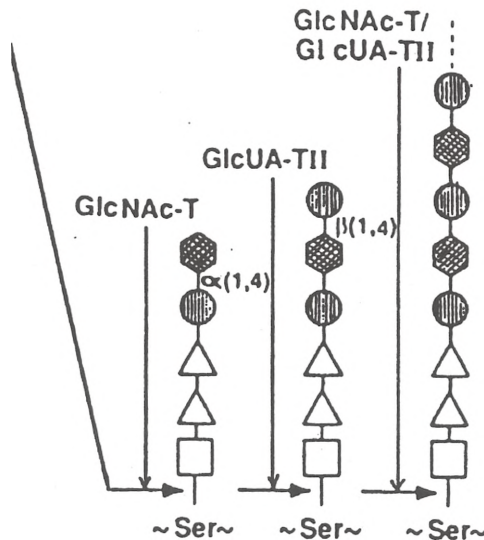
6-O-Sulfonowanie



Fragment rysunku 12 (s. 335). Modyfikacje glikozoaminoglikanów na przykładzie heparyny [wg 39, zmienione]

Glikozoaminoglikany

E



Fragment rysunku 11 (s. 334). Elongacja łańcuchów glikozoaminoglikanowych związanych z białkiem [wg 73, zmienione]

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. Prosimy Autorów o nadsyłanie prac bezpośrednio do Redaktorów odpowiedniej specjalności, a do Redakcji w Warszawie tylko artykuły, które nie odpowiadają żadnej z wymienionych specjalności.

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) doniesienia z ostatniej chwili na 3–5 stronach maszynopisu z kilkoma pozycjami bibliograficznymi ostatniego roku (licząc od daty wysłania do redakcji);

3) listy do redakcji (do 1 strony maszynopisu).

Tekst pracy i załączniki należy przysyłać w dwóch egzemplarzach na adres redakcji w Warszawie bądź jednego z Redaktorów (adresy na 2 str. okładki). Maszynopis powinien być pisany jednostronnie na papierze formatu A4 z podwójną interlinią i marginesem 4 cm po lewej stronie. Strony powinny być kolejno numerowane. Nadesłanie tekstu pracy, poprawionego po recenzjach, na dyskietce przyspieszy publikację,

Pierwsza strona nie numerowana przeznaczona jest dla redakcji i powinna zawierać: imiona i nazwiska autorów oraz ich tytuły naukowe, adresy w pracy i domowy 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, informację o dofinansowaniu pracy oraz skrót tytułu (do 40 znaków). Następną stroną powinna zawierać w języku polskim i angielskim streszczenie (do 150 słów) oraz słowa kluczowe – 3 do 10 słów zgodnych z terminami w Medical Subject Headings (Index Medicus), o ile są tam zawarte. 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 tytułowane i numerowane rozdziały oraz podrozdziały. 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 zestawiać 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 *Physarum polycephalum*. *Expil 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 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 1 egz. zeszytu PBK z opublikowaną pracą, a ponadto mogą zamówić odbitki odpłatnie.

Redakcja prosi o propozycję do 5 osób (nazwisko, imię, adres, fax), które byłyby odpowiednimi recenzentami maszynopisu, nie powinny jednak być pracownikami instytucji, w której pracuje autor, ani jego współpracownikami. Redakcja prosi także głównego Autora o dołączenie do maszynopisu podpisanej odpowiedzi na następujące pytania:

Dołączono 2 kopie maszynopisu, Treść pracy nie była uprzednio publikowana i nie została
tabel i rycin. **tak nie** wysłana do innej redakcji. **tak nie**

Wszyscy Autorzy znają i akceptują pracę. **tak nie** Dołączono kopię pracy na dyskietce z podaniem nazwy

Jest zgoda osób, których informacje niepubli- pliku i użytego programu edycyjnego z komputera IBM **tak nie**

owane są zamieszczone w tekście artykułu **tak nie** Odpowiadam za całość pracy opisanej w zał. maszyn. **tak nie**

Wyrażam zgodę na to, że artykuł po przyjęciu do druku w "Postępach Biologii Komórki" przechodzi na własność reda- **tak nie**

kcji i jego reprodukcja wymaga zgody redakcji. **tak nie** *podpis*

TREŚĆ

W tym Zeszycie • Postępów Biologii Komórki •	1
BARCZYK A.: Cytogenetyka męskiej gametogenety. Część 2. Translokacje robertsonowskie i inwersje	3
KWIATKOWSKA J., SŁOMSKI R.: Powtórzenia sekwencji mikrosatelitarnych w genomie człowieka	19
ŚNIEŻKO R.: Kierunki badań nad cytoszkieletem komórek roślinnych	31
SZUMIEL I.: Regulacja cyklu komórkowego w napromienionej komórce zwierzęcej	49
KOCIK J.: Udział cytokin i innych mediatorów w procesie gojenia rany	63
FRANCZAK A., KOTWICA G.: Fizjologiczna rola relaksyny	83
MAŁECKA-PANAS E.: Czynniki wzrostowe rodziny EGF i ich rola w karcinogenezie jelita grubego	107
SOPEL M., MURAWSKI M., ZABEL M.: PTHrP (<i>parathyroid hormone-related peptide</i>) – nowy peptydowy hormon o wielu funkcjach	127
Komunikaty	143
Errata	147

Warunki prenumeraty kwartalnika
POSTĘPY BIOLOGII KOMÓRKI

Prenumerata na rok 1996

Redakcja przyjmuje opłatę prenumeraty za rok 1996 na konto:

FUNDACJA BIOLOGII KOMÓRKI I BIOLOGII MOLEKULARNEJ, 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 + ew. 2 suplementy) na rok 1996:

dla instytucji (bibliotek) wynosi 40 zł,
a dla odbiorców indywidualnych 16 zł.

Subscription orders for POSTĘPY BIOLOGII KOMÓRKI on year 1996 is through the local press distributors or directly – Editorial Board of POSTĘPY BIOLOGII KOMÓRKI, Marymoncka str. 99, 01-813 Warszawa /Poland, account No:

FUNDACJA BIOLOGII KOMÓRKI I BIOLOGII MOLEKULARNEJ, ul. Marymoncka 99, 01-813 Warszawa; Bank Polska Kasa Opieki S. A., IV O/Warszawa 501132-40006576-2701-3-1110.

Price per year 20 dollars USA.

Indeks 369705